



HAL
open science

Etude de la spéciation des radionucléides avec les molécules d'intérêt biologique par approche spectrométrique

Valérie Lourenço

► **To cite this version:**

Valérie Lourenço. Etude de la spéciation des radionucléides avec les molécules d'intérêt biologique par approche spectrométrique. Autre. Université Paris Sud - Paris XI, 2007. Français. NNT : . tel-00179617v2

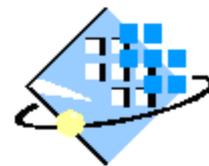
HAL Id: tel-00179617

<https://theses.hal.science/tel-00179617v2>

Submitted on 7 Nov 2007

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.



N° D'ORDRE : 8 694

**UNIVERSITE DE PARIS XI
UFR SCIENTIFIQUE D'ORSAY**

THESE

Présentée

Pour obtenir

**Le GRADE de DOCTEUR EN SCIENCES
DE L'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY**

Spécialité : Chimie

Discipline : Radiochimie

PAR

Valérie LOURENÇO

**SUJET : ETUDE DE LA SPÉCIATION DES RADIONUCLEIDES AVEC LES
MOLECULES D'INTERET BIOLOGIQUE PAR APPROCHE
SPECTROMETRIQUE**

Soutenue le 5 juillet 2007 devant la Commission d'examen :

Présidente Mme Chantal HOUÉE-LÉVIN, Professeur de l'Université Paris XI
Directeur de thèse M. Gérard COTE, Professeur à l'École Nationale Supérieure de Chimie de Paris
Rapporteur Mme Francelyne MARANO, Professeur de l'Université Paris VII
Rapporteur M. Ryszard LOBINSKI, Directeur de Recherche au CNRS, Professeur de l'Université
de Varsovie (Pologne)
Examineur M. Eric ANSOBORLO, CEA VRH Marcoule
Examineur M. Christophe MOULIN, CEA Saclay
Invité M. Maurice LEROY, Professeur de l'Université Louis Pasteur, Strasbourg

REMERCIEMENTS

Les deux prochaines pages me donnent une occasion privilégiée de remercier l'ensemble des personnes qui ont compté dans ma « vie scientifique de doctorante ». Ecrire ces remerciements c'est vraiment regarder en arrière pour la première fois...

Ce travail de thèse a été réalisé au Commissariat à l'Energie Atomique, sur le centre de Saclay. Je tiens tout d'abord à remercier Xavier Vitart, chef du Département de Physico-Chimie et Christophe Poinsot, chef du Service d'Etude du Comportement des Radionucléides, de m'avoir accueillie au sein de leurs unités.

Je souhaite maintenant exprimer ma profonde gratitude au Professeur Gérard Cote : cette aventure n'aurait pas eu lieu sans qu'il ne m'accueille en dernière année à « Chimie Paris » et n'accepte ensuite de diriger ma thèse.

Merci aussi à mes encadrants du CEA : Christophe Moulin qui m'a accueillie et encadrée par deux fois, au sein de son Laboratoire de Spéciation des Radionucléides et des Molécules. Je tiens également à le remercier pour son optimisme tout au long de cette thèse et pour m'avoir initiée au monde de la fluorescence sans pour autant livrer le secret de sa « magic touch » avec les lasers ! Je remercie aussi Eric Ansoborlo du CEA de Marcoule qui a toujours été disponible et a apporté sa vision de biochimiste à ce travail.

Je souhaite à présent exprimer ma profonde reconnaissance aux membres du jury pour m'avoir permis de soutenir et pour l'honneur qu'ils m'ont fait de juger mon travail. Merci à Chantal Houée-Lévin, Professeur à l'Université Paris Sud (Orsay), qui a accepté d'être présidente du jury. Je remercie Francelyne Marano, Professeur à l'Université Denis Diderot (Paris VII), pour avoir accepté de juger ce mémoire en tant que rapporteur et pour ses critiques judicieuses qui m'ont permis d'améliorer les aspects de biologie décrits dans ce manuscrit. Merci à Ryszard Lobinski, Directeur de Recherche au CNRS, pour son rapport positif et critique, et pour ses questions toujours constructives lors de la soutenance. J'adresse mes remerciements au Professeur Maurice Leroy, de l'Université Louis Pasteur (Strasbourg), pour avoir accepté l'invitation à participer à ce jury et apporté une autre perspective à mon travail lors de la discussion pendant la soutenance.

Un grand merci à Thomas Vercoouter pour son apport au quotidien en SLRT ainsi qu'à Christine Lucas-Lamouroux et Carole Bresson pour leur aide en ES-SM. Je tiens à remercier Christophe Den Auwer pour les mesures EXAFS de mes échantillons et pour les discussions fructueuses lors de l'interprétation des résultats. Merci aussi à Michel Tabarant, Céline Puente et Bruno Perly pour m'avoir permis d'utiliser respectivement l'ICP-SEO, l'IRTF et la RMN, à la dernière minute !

Je souhaite tout particulièrement remercier Jean-François Wagner et Denis Doizi pour leur soutien ainsi que les personnes de l'INSTN qui m'ont accueillie lors de mon dernier mois de rédaction.

Une mention particulière pour Flo, Gabriel, Guillaume, Edmond, Fred, les Vincent D, LN, Vi², la liste est longue... alors : une grande pensée à tous ceux que j'ai eu le plaisir de rencontrer au « 391 » tout au long de ces années et qui ont aussi apporté leur bonne humeur à ce doctorat.

Merci à mes parents et à mon frère, qui ne m'ont pas beaucoup vue, à Manuel, qui a fait le déplacement d'Allemagne pour ma soutenance, une pensée également à mes grands-parents qui n'auront pas pu voir ce résultat.

Enfin, j'aimerais adresser un merci tout particulier à Violaine « ma binôme », Lionel et Carole pour leur réconfort particulièrement pendant l'intense rédaction. Carole, il m'est impossible d'exprimer toute ma gratitude... Je finirai par une pensée très spéciale pour mon Jedi, la Force est avec moi depuis janvier...

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
INTERACTIONS DES RADIONUCLEIDES AVEC LES MOLECULES D'INTERET BIOLOGIQUE	5
1. Les radionucléides.....	5
1.1. Présentation des lanthanides et des actinides	5
1.1.1. Définition	5
1.1.2. Les lanthanides.....	6
1.1.3. Les actinides.....	9
1.2. Le devenir des radionucléides	12
1.2.1. Dans le corps : la décorporation	13
1.2.2. Dans les sols.....	14
1.2.3. Influence de la masse microbienne	16
2. Les études de spéciation	16
2.1. Utilisation d'analogues chimiques	16
2.2. Modèles prédictifs.....	17
2.3. Choix des radionucléides.....	18
2.4. Complexité des systèmes – Enjeux des études de spéciation	18
2.4.1. Hydrolyse de Eu(III).....	20
2.4.2. Hydrolyse de U(VI).....	21
2.4.3. Cas particulier de la précipitation des espèces neutres	21
3. Les mécanismes d'entrée des métaux dans les cellules ; Application aux RN.....	22
3.1. Les cellules.....	22
3.2. Voies d'entrée des RN dans la cellule	24
3.2.1. Les protéines porteuses.....	26
3.2.2. Le transport actif	26
3.2.3. Les canaux ioniques.....	27
3.3. Les mécanismes connus d'entrée des RN	28
3.3.1. Un exemple concret : les similitudes $\text{Ln}^{3+}/\text{Ca}^{2+}$	28
3.3.2. Le calcium en milieu biologique	30
4. Molécules biologiques impliquées dans la prise en charge des métaux lourds.....	32
4.1. Les phospholipides	33
4.2. Les protéines séquestrices de métaux lourds.....	34
4.2.1. Les protéines	34
4.2.2. Les métallothionéines	35
4.2.3. Les phytochélatines.....	36
4.3. Choix des molécules à étudier	38
4.4. Etude des systèmes biologiques	39
4.4.1. Conditions « biologiques » et biochimie des RN.....	39
4.4.2. Biochimie des RN étudiés	40
4.4.3. Données disponibles	43
5. Conclusion	48

METHODES ANALYTIQUES : PRINCIPES ET OUTILS SPECTROMETRIQUES . 49

1. La spectrofluorimétrie laser résolue en temps (SLRT).....	49
1.1. Présentation de la technique	49
1.1.1. Principe de la fluorescence	49
1.1.2. La fluorescence	52
1.1.3. La résolution temporelle	53
1.1.4. Montage expérimental	55
1.2. Propriétés spectroscopiques de l'euporium.....	57
1.2.1. Niveaux d'énergie.....	57
1.2.2. Transitions fluorescentes	58
1.2.3. Complexation en sphère interne/ sphère externe	59
1.2.4. Nombre d'hydratation.....	60
1.3. Fluorescence de l'uranium.....	62
1.4. Longueurs d'onde d'excitation.....	62
2. L'ElectroSpray Spectrométrie de Masse (ES-SM).....	63
2.1. Les différents composants d'un spectromètre de masse	63
2.1.1. La source d'ionisation électrospray (ES) ou électronébulisation	64
2.1.2. L'analyseur (trappe ionique)	66
2.2. Identification des espèces : la spectrométrie de masse en tandem (SM/SM) ou fragmentation.....	67
2.3. Un outil pour la spéciation.....	67
2.4. Comparaison avec la SLRT	68
2.5. Mode opératoire	69
3. Autres techniques utilisées.....	70
3.1. La Spectroscopie d'Absorption des rayons X (SAX).....	70
3.2. La spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	72
3.2.1. RMN du ¹ H.....	73
3.2.2. RMN du ¹³ C.....	73
3.3. Spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier en réflexion totale atténuée (ATR-IRTF).....	74
3.4. La spectrophotométrie UV-Visible	75
4. Conclusion	76

ETUDES DES INTERACTIONS DES RN AVEC LES ACIDES AMINES..... 77

1. Chélation par les petites molécules	77
2. Conditions opératoires	78
3. Interactions avec la cystéine	79
3.1. Interaction de l'euporium avec la cystéine par SLRT.....	80
3.2. Interaction de l'uranium avec la cystéine par SLRT.....	84
3.2.1. Résultats à pH 2	84
3.2.2. Résultats à pH 4	86
4. Interactions avec l'acide glutamique	88
5. Interactions avec l'histidine.....	91
5.1. Dosage Eu-His à pH 3 par SLRT	92
5.2. Effet du pH sur la complexation par l'histidine	93
5.3. Caractérisation des espèces par résolution temporelle à pH 7,7.....	94

6. Conclusion	95
----------------------------	-----------

ETUDES DES RN AVEC LES POLYPEPTIDES..... 97

1. Les polypeptides précurseurs des PC.....	97
1.1. Le glutathion réduit.....	97
1.2. Le glutathion oxydé.....	99
2. Interactions avec le GSH et le GSSG.....	101
2.1. Interactions avec le GSH.....	102
2.1.1. Etudes de Eu-GSH à pH 3 par SLRT.....	103
2.1.2. Etude de Eu-GSH à pH 3 par ES-SM.....	105
2.1.3. Eu-GSH pH 6 par SLRT.....	109
2.1.4. U-GSH pH 2 par SLRT.....	111
2.2. Interactions avec le glutathion oxydé (GSSG).....	113
2.3. Conclusion.....	116
3. Caractérisation d'échantillons concentrés en RN et en ligand.....	117
3.1. Données structurales RN-Ligands biologiques dans la littérature.....	117
3.1.1. Données structurales « Ln-AA ».....	117
3.1.2. Données structurales « Uranyle-AA ».....	118
3.2. Echantillons analysés.....	119
3.3. RMN du ¹ H et du ¹³ C.....	119
3.3.1. Cas du GSH pH 3.....	120
3.3.2. Cas du GSSG pH 3.....	122
3.4. Apport des mesures de spectrophotométrie UV-Visible.....	123
3.5. ATR-IRTF.....	125
3.5.1. Etude du GSH.....	125
3.5.2. Etude du GSSG.....	129
3.6. Spectroscopie d'Absorption des rayons X (EXAFS).....	130
3.7. Conclusion.....	131
4. Interactions avec les phytochélatines.....	132
4.1. Présentation des molécules étudiées.....	132
4.2. Echantillons.....	133
4.3. Etude des PC _n par SLRT.....	133
4.4. Etude des PC _n par ES-SM.....	137
4.4.1. Caractérisation des solutions de PC (sans Eu).....	138
4.4.2. Caractérisation des solutions de PC (avec Eu).....	139
4.5. Conclusion.....	141
5. Interactions avec les métallothionéines	142

ETUDE DE L'IMPACT DE L'EUROPIUM SUR LES KERATINOCYTES *HaCaT* . 145

1. Objectifs des études de contamination	145
1.1. Bibliographie.....	145
1.2. Choix des cellules.....	146
1.3. Choix des concentrations de contamination.....	146
2. Méthodologie	147
2.1. Solution mère de contamination.....	147
2.2. Milieux de culture contaminés.....	147
2.3. Culture des cellules.....	148

3. Analyses effectuées.....	150
3.1. Les culots cellulaires.....	151
3.1.1. Minéralisation par attaque acide.....	151
3.1.2. Minéralisation par calcination	151
3.1.3. Autre voie de minéralisation envisagée : la lyophilisation	151
3.2. Les échantillons « liquides »	152
3.2.1. Solutions de contamination	152
3.2.2. Surnageants de contamination.....	152
3.2.3. Solutions de rinçage.....	152
3.2.4. Solutions de trypsination	153
3.2.5. Témoins.....	153
4. Résultats.....	153
4.1. Bilan de matière	153
4.2. Mesure des quantités de Eu intégrées par les cellules	155
4.2.1. Quelques remarques.....	155
4.2.2. Analyses des concentrations dans les culots cellulaires.....	155
5. Conclusion	157
 CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	 159
 ANNEXES.....	 I
Liste des abréviations.....	I
Annexe 1 : Notions de chimie des solutions et formalisme.....	III
Annexe 2 : Rappels sur les phénomènes d'inhibition de fluorescence.....	VI
Annexe 3 : Exploitation du signal de fluorescence en SLRT	X
Annexe 5 : Composition du milieu de culture DMEM des cellules HaCaT	XVII
Annexe 6 : Estimation des incertitudes	XIX
Annexe 7 : Produits chimiques.....	XXII
Annexe 8 : Communications scientifiques.....	XXIII
 BIBLIOGRAPHIE.....	 XXIV

Une liste des abréviations utilisées figure en page I des Annexes de ce document.

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Classification périodique des éléments.....	5
Figure 2 : Principe des tests immunologiques.....	7
Figure 3 : Phénomènes susceptibles d'influencer la mobilité des radionucléides dans l'environnement.....	12
Figure 4 : Diagramme de spéciation de Eu(III) à $10^{-6}M$ en fonction du pH (p_{CO_2} atmosphérique, $25^{\circ}C$).....	19
Figure 5 : Diagramme de spéciation de U(VI) à $4.10^{-6}M$ en fonction du pH (p_{CO_2} atmosphérique, $25^{\circ}C$).....	19
Figure 6 : Vue en coupe d'une cellule animale eucaryote (avec noyau).....	23
Figure 7 : Schéma d'organisation comparée d'une cellule végétale et d'une cellule animale.....	24
Figure 8 : Vue en coupe de la paroi d'une cellule.....	25
Figure 9 : Comparaison entre transport actif et transport passif.....	25
Figure 10 : Représentation des analogies Eu^{3+}/Ca^{2+} (a) et Eu^{3+}/Am^{3+} (b).....	29
Figure 11 : Les voies de pompage du Ca^{2+} cytosolique vers l'extérieur.....	31
Figure 12 : Les phospholipides : (a) Molécule de phospholipide (b) Membrane cellulaire.....	33
Figure 13 : Auto-organisation des PL en milieu aqueux.....	34
Figure 14 : Structure générale des acides aminés (forme cationique).....	35
Figure 15 : Molécules de métallothionéine (a) et de cystéine (b).....	35
Figure 16 : Structure des phytochélatines.....	37
Figure 17 : Synthèse des phytochélatines (induite par le cadmium).....	37
Figure 18 : Niveaux d'énergies de la molécule et transitions électroniques observées lors des phénomènes de fluorescence et de phosphorescence.....	51
Figure 19 : Principe de la résolution temporelle.....	54
Figure 20 : Discrimination des espèces en fonction de leur temps de vie grâce à la résolution temporelle.....	55
Figure 21 : Montage expérimental réalisé au laboratoire.....	55
Figure 22 : Diagramme des niveaux d'énergie de Eu(III).....	58
Figure 23 : Niveaux d'énergie de l'ion aquo Eu(III) et transitions associées.....	59
Figure 24 : Complexation en sphère externe (a) ou interne (b).....	60
Figure 25 : Diagramme des niveaux d'énergie de Eu(III) et des niveaux d'énergie vibrationnelle de O-H et O-D.....	61
Figure 26 : Emissions de fluorescence de l'uranyle.....	62
Figure 27 : Schéma illustrant l'obtention des gouttes en sortie de capillaire avec la formation d'un cône de Taylor.....	65
Figure 28 : Schéma d'une trappe ionique.....	66
Figure 29 : Spectre d'absorption X de Am(III).....	71
Figure 30 : Spectres EXAFS d'un échantillon à base de Eu et un ligand donneur oxygéné (amplitude et transformée de Fourier en insert).....	72
Figure 31 : Accessoire de Réflexion Totale Atténuée (ATR).....	75
Figure 32 : Structure des acides aminés étudiés.....	77
Figure 33 : Formes ioniques des acides aminés.....	78
Figure 34 : Diagramme de spéciation de la cystéine.....	80
Figure 35 : Dosage Eu ($10^{-3}M$)-Cystéine (de 0 à 0,5 M) à pH 3 par SLRT ($E_{exc} = 395,7 nm$; $E_{laser} = 0,9 mJ$; $D = 1 \mu s$; $L = 500 \mu s$).....	81
Figure 36 : Dosage Eu ($10^{-6}M$)-Cystéine (de 0 à 0,5 M) à pH 5 par SLRT ($E_{exc} = 395,7 nm$; $E_{laser} = 0,6 mJ$; $D = 1 \mu s$; $L = 500 \mu s$).....	81
Figure 37 : Evaluation du temps de vie du complexe Eu+Cys à pH 3.....	82
Figure 38 : Evaluation du temps de vie du complexe Eu+Cys à pH 5.....	82
Figure 39 : Stoechiométrie et constante de formation d'un complexe : dosage Eu ($10^{-3}M$)-Cystéine (de 0 à 0,5 M) à pH 3.....	83
Figure 40 : Stoechiométrie et constante de formation d'un complexe : dosage Eu ($10^{-6}M$)-Cystéine (de 0 à 0,5 M) à pH 5.....	83
Figure 41 : Dosage U ($4,2.10^{-6}M$)-Cystéine (de 0 à $3,5.10^{-3}M$) à pH 2 par SLRT ($E_{exc} = 266 nm$; $E_{laser} = 1,0 mJ$; $D = 0,2 \mu s$; $L = 20 \mu s$).....	85

Figure 42 : Modélisation à l'aide de l'équation de Stern-Volmer : constante de quenching U(VI)-Cys pH 2 (Q=quencher=Cystéine).....	85
Figure 43 : Dosage U ($4,2 \cdot 10^{-7} M$)-Cystéine (de 0 à $3,5 \cdot 10^{-3} M$) à pH 4 par SLRT ($E_{exc} = 266 \text{ nm}$; $E_{laser} = 1,0 \text{ mJ}$; $D = 0,2 \mu\text{s}$; $L = 20 \mu\text{s}$)	86
Figure 44 : Modélisation à l'aide de l'équation de Stern-Volmer de la fluorescence de U(VI) + Cys pH 4	87
Figure 45 : Déconvolution	87
Figure 46 : Spectres d'absorption UV-Vis de solutions d'uranium libre et en présence de cystéine, à pH 3	88
Figure 47 : Diagramme de spéciation de l'acide glutamique.....	89
Figure 48 : Dosage Eu ($10^{-6} M$)-Acide glutamique (de 0 à 0,05 M) à pH 3 par SLRT ($E_{exc} = 395,7 \text{ nm}$; $E_{laser} = 0,9 \text{ mJ}$; $D = 1 \mu\text{s}$; $L = 500 \mu\text{s}$)	89
Figure 49 : Evaluation du temps de vie du complexe Eu+Glu à pH 3 (Eu($10^{-5} M$)+Glu($10^{-2} M$)).....	90
Figure 50 : Stoechiométrie et constante de formation d'un complexe : dosage Eu ($10^{-5} M$)-Acide glutamique (de 0 à 0,05 M) à pH 3.....	90
Figure 51 : Diagramme de spéciation de l'Histidine et détail de la déprotonation de la molécule	91
Figure 52 : Dosage Eu ($10^{-6} M$)-Histidine (de 0 à 0,001 M) à pH 3 par SLRT ($E_{exc} = 395,2 \text{ nm}$; $E_{laser} = 0,7 \text{ mJ}$; $D = 1 \mu\text{s}$; $L = 500 \mu\text{s}$)	92
Figure 53 : Fluorescence de solutions de Eu à $10^{-6} M$ avec [His]=0,05M, en fonction du pH ($E_{exc} = 395,2 \text{ nm}$; $E_{laser} = 0,7 \text{ mJ}$; $D = 1 \mu\text{s}$; $L = 500 \mu\text{s}$).....	93
Figure 54 : Evolution des rapports des intensités de fluorescence (Eu+His=f(pH)).....	94
Figure 55 : Comparaison des spectres mesurés pour $D=1\mu\text{s}$ et $D=500\mu\text{s}$ sur une solution Eu ($10^{-6} M$) + Histidine (0,05M) pH 7,7 ($\lambda_{exc} = 395,2 \text{ nm}$; $E=0,7\text{mJ}$; $L=500\mu\text{s}$).....	94
Figure 56 : Evaluation du temps de vie du complexe Eu ($10^{-6} M$) + Histidine (0,05M) pH 7,7.....	95
Figure 57 : Molécule de GSH : H_2L^+	97
Figure 58 : Biosynthèse du GSH chez la levure	98
Figure 59 : Diagramme de spéciation du GSH.....	99
Figure 60 : Molécule de GSSG (GSH oxydé) : H_2L^{2+}	100
Figure 61 : Diagramme de spéciation du GSSG.....	100
Figure 62 : Coordination de type bis-AA.....	101
Figure 63 : Dosage Eu ($10^{-6} M$)-GSH (de 0 à 0,5M) à pH 3 par SLRT ($\lambda_{exc}=395,7\text{nm}$; $E_{laser}=0,9\text{mJ}$; $D=1\mu\text{s}$; $L=300\mu\text{s}$).....	103
Figure 64 : Dosage Eu ($10^{-5} M$)-GSH (de 0 à 0,5M) à pH 3 par SLRT ($\lambda_{exc}=395,7\text{nm}$; $E_{laser}=0,9\text{mJ}$; $D=1\mu\text{s}$; $L=300\mu\text{s}$).....	103
Figure 65 : Décroissance de la fluorescence d'une solution de Eu $10^{-5} M$ + GSH 0,45M.....	104
Figure 66 : Stoechiométrie et constante de formation d'un complexe : dosage Eu + GSH pH 3 ([Eu]= $10^{-6} M$)..	105
Figure 67 : Stoechiométrie et constante de formation d'un complexe : dosage Eu + GSH pH 3 ([Eu]= $10^{-5} M$)..	105
Figure 68 : Spectre de masse : Eu(NO_3) $_0$ $10^{-4} M$ + GSH $10^{-3} M$ ($r = 10$) pH 3,0 ; Mode ES+	106
Figure 69 : Influence de l'excès de GSH : Eu(NO_3) $_3$ $10^{-4} M$ + GSH pH 3,0 ; Mode ES+	108
Figure 70 : Force ionique et composition des échantillons, en fonction de la concentration en ligand	109
Figure 71 : Dosage Eu ($10^{-6} M$)-GSH (de 0 à 0,5 M) à pH 6 par SLRT ($\lambda_{exc}=395,7 \text{ nm}$; $E_{laser}=0,6 \text{ mJ}$; $D=1 \mu\text{s}$; $L=500\mu\text{s}$).....	110
Figure 72 : Décroissance de la fluorescence d'une solution d'Eu $10^{-6} M$ + GSH 0,32M (pH 6,0).....	110
Figure 73 : Stoechiométrie et constante de formation d'un complexe : dosage Eu + GSH pH 6 ([Eu]= $10^{-6} M$)..	111
Figure 74 : Dosage U ($4,2 \cdot 10^{-3} M$)-GSH (de 0 à $10^{-2} M$) à pH 2 par SLRT ($\lambda_{exc}=404,9\text{nm}$; $E_{las}=0,5 \text{ mJ}$; $D=0,3\mu\text{s}$; $L=50\mu\text{s}$).....	112
Figure 75 : Modélisation à l'aide de l'équation de Stern-Volmer : constante de quenching U(VI)-GSH pH 2 (L=quencher=GSH)	112
Figure 76 : Dosage Eu ($10^{-5} M$)-GSSG (de 0 à 0,1 M) à pH 3 par SLRT ($\lambda_{exc} = 395,7 \text{ nm}$; $E_{laser} = 0,9 \text{ mJ}$; $D = 1 \mu\text{s}$; $L = 500 \mu\text{s}$)	113
Figure 77 : Dosage Eu ($10^{-6} M$)-GSSG (de 0 à 0,1 M) à pH 6 par SLRT ($\lambda_{exc} = 395,7 \text{ nm}$; $E_{laser} = 0,9 \text{ mJ}$; $D = 1 \mu\text{s}$; $L = 500 \mu\text{s}$)	114
Figure 78 : Evaluation du temps de vie du complexe Eu+GSSG à pH 3.....	114
Figure 79 : Evaluation du temps de vie du complexe Eu+GSSG à pH 6.....	115
Figure 80 : Stoechiométrie et constante de formation d'un complexe : dosage Eu + GSSG pH 3 ([Eu]= $10^{-3} M$)	115
Figure 81 : Stoechiométrie et constante de formation d'un complexe : dosage Eu + GSSG pH 6 ([Eu]= $10^{-6} M$)	116
Figure 82 : Disposition des atomes dans le solide $[\text{Pr}_2(\text{Glu})_2(\text{ClO}_4)(\text{H}_2\text{O})_7](\text{ClO}_4)_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	118
Figure 83 : Structures « uranyl-glycine ».....	118
Figure 84 : Molécule de GSH (annotée).....	120

Figure 85 : Molécule de GSSG (annotée).....	122
Figure 86 : Spectres d'absorption UV-Vis des solutions contenant de l'uranium concentré	124
Figure 87 : Spectre ATR-IR du GSH à pH 3 et à pH 5.....	126
Figure 88 : Modes de coordination possibles.....	127
Figure 89 : Spectres ATR-IR du GSH et de Eu+GSH à pH 5.....	128
Figure 90 : Coordination proposée pour Eu-GSH à pH 5 (2 Eu-2 GSH)	128
Figure 91 : Spectres ATR-IR du GSH et de Eu+GSH à pH 3.....	129
Figure 92 : Spectres EXAFS de l'échantillon [Eu]=0,05M [GSH]=0,25M pH 5 (amplitude et transformée de Fourier en insert).....	130
Figure 93 : Formation d'un pont disulfure	132
Figure 94 : Evolution de la fluorescence de Eu ($5.10^{-5}M$)-PC ₂ (de 0 à $10^{-3}M$) à pH 3 par SLRT ($\lambda_{exc}=394,6\text{ nm}$; $E_{laser}=0,4mJ$; $D=10\mu s$; $L=800\mu s$).....	134
Figure 95 : Evolution de la fluorescence de Eu ($5.10^{-5}M$)-PC ₃ (de 0 à $10^{-3}M$) à pH 3 par SLRT ($\lambda_{exc}=394,6\text{ nm}$; $E_{laser}=0,4mJ$; $D=10\mu s$; $L=800\mu s$).....	134
Figure 96 : Evolution de la fluorescence de Eu ($5.10^{-5}M$)-PC ₄ (de 0 à $6.10^{-3}M$) à pH 3 par SLRT ($\lambda_{exc}=394,6\text{ nm}$; $E_{laser}=0,4mJ$; $D=10\mu s$; $L=800\mu s$).....	135
Figure 97 : Décroissance de la fluorescence d'une solution de Eu ($5.10^{-5}M$) + PC ₂ ($10^{-3}M$) pH 3.....	136
Figure 98 : Décroissance de la fluorescence d'une solution de Eu ($5.10^{-5}M$) + PC ₃ ($10^{-3}M$) pH 3.....	136
Figure 99 : Décroissance de la fluorescence d'une solution de Eu ($5.10^{-5}M$) + PC ₄ ($6.10^{-3}M$) pH 3.....	136
Figure 100 : Molécule de PC ₄ et description de ses principaux fragments de type b et y.	137
Figure 101 : Distribution des espèces dans les solutions de PC ([PC ₂]=[PC ₃]=[PC ₄]= $10^{-4}M$, mode ES+, pH~3)	138
Figure 102 : Fragmentation MS/MS de PC ₂ (et MS ³ de y ₄ (m/z 411)).....	139
Figure 103 : Spectres ES-SM de PC ₃ ($10^{-4}M$)+Eu($10^{-4}M$) pH 3 et PC ₄ ($10^{-4}M$)+Eu($10^{-4}M$) pH 3	140
Figure 104 : Spectres ES-SM de PC ₂ ($10^{-4}M$)+Eu($10^{-4}M$) pH 3 zoom sur m/z 200-600.....	140
Figure 105 : Spectres ES-SM de PC ₂ ($10^{-4}M$)+Eu($10^{-4}M$) pH 3 zoom sur m/z 535-590.....	141
Figure 106 : Identification du complexe	141
Figure 107 : Dosage Eu ($5.10^{-5}M$)-MT (de 0 à 940ppm) à pH 4 par SLRT ($\lambda_{exc}=394,6\text{ nm}$; $E_{laser}=0,4mJ$; $D=10\mu s$; $L=800\mu s$)	143
Figure 108 : Evaluation du temps de vie de Eu + MT ($\sim 2.10^{-4}M$) pH 4.....	144
Figure 109 : Diagramme de spéciation de Eu en fonction du pH (25°C ; p_{atm})	147
Figure 110 : Diagramme de spéciation de Eu ([Eu(NO ₃) ₃]=500μM) dans le milieu de culture des cellules (composition en Annexe 5). Diagramme réalisé avec le logiciel J-CHESS (Van Der Lee et De Windt, 2002), les données thermodynamiques proviennent de la base de données de l'IUPAC (Powell, 2004).....	148
Figure 111 : Présentation des différents échantillons à analyser, issus des expérimentations de contamination cellulaire (Echantillons à « 24h » de contamination).....	149
Figure 112 : Traitements des culots cellulaires.....	150
Figure 113 : Interaction d'une molécule Q avec M*	VI
Figure 114 : Quenching statique.....	VIII
Figure 115 : Variations au cours du temps de l'intensité de fluorescence lors d'une excitation pulsée	X
Figure 116 : Adéquation entre le spectre expérimental et l'ajustement issu de notre modélisation.....	XII

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Demi-vie de quelques actinides	10
Tableau 2 : Analogues chimiques de différents actinides.....	17
Tableau 3 : Constantes de stabilité de Am(III) et de son analogue Eu(III)	17
Tableau 4 : Récapitulatif des logarithmes décimaux de formation des espèces hydrolysées de Eu(III) à 25°C et I = 0 M (Nagra/PSI : Chemical Thermodynamic Data Base (Hummel et al., 2002)).....	20
Tableau 5 : Récapitulatif des logarithmes décimaux de formation des espèces hydrolysées de U(VI) à 25°C et I = 0 M (NEA-TDB-OECD (Grenthe et al., 1992) et (Vitorge et Capdevila, 2003))	21
Tableau 6 : Récapitulatif des logarithmes décimaux des produits de solubilité associés à la mise en solution des espèces précipitées mononucléaires (Guillaumont et al., 2003; Hummel et al., 2002).....	22
Tableau 7 : Comparaison des concentrations ioniques entre l'intérieur et l'extérieur d'une cellule (mammifère) (Alberts et al., 2002)	26
Tableau 8 : Comparaison de quelques propriétés des ions Ca ²⁺ et Ln ³⁺ (Williams, 1979)	29
Tableau 9 : Récapitulatif des caractéristiques de chacun des systèmes envisagés	38
Tableau 10 : Récapitulatif des log ₁₀ K ₁ des ions Eu ³⁺ avec les molécules d'intérêt.....	44
Tableau 11 : Récapitulatif des log ₁₀ K ₁ des ions Ca ²⁺ avec les molécules d'intérêt.....	45
Tableau 12 : Récapitulatif des log ₁₀ K ₁ des ions Am ³⁺ (et Cm ³⁺) avec les molécules d'intérêt	45
Tableau 13 : Récapitulatif des log ₁₀ K ₁ des ions U(VI) avec les molécules d'intérêt.....	47
Tableau 14 : Déplacements chimiques communs en RMN du ¹³ C.....	74
Tableau 15 : Informations fournies par les techniques expérimentales mises en oeuvre.....	76
Tableau 16 : Caractéristiques des acides aminés étudiés (Smith et Martell, 1997).....	78
Tableau 17 : Etudes RN-AA réalisées	79
Tableau 18 : Résumé des résultats obtenus au cours de ce chapitre	96
Tableau 19 : Etudes RN-polypeptides réalisées	102
Tableau 20 : Pics moléculaires des espèces observées en solution (ES+ ; Eu (10 ⁻⁴ M) + GSH pH 3).....	107
Tableau 21 : Résumé des résultats obtenus avec le GSH et le GSSG	116
Tableau 22 : Composition des échantillons analysés par RMN.....	120
Tableau 23 : Récapitulatif des déplacements chimiques en RMN ¹ H (GSH libre pH 3) (Kato et al., 1999; Keramidis et al., 2002; Liu et al., 2004; Mehta et al., 2003)	121
Tableau 24 : Récapitulatif des déplacements chimiques en RMN ¹³ C (GSH libre, Eu-GSH pH 3) (Keramidas et al., 2002; Mehta et al., 2003)	121
Tableau 25 : Récapitulatif des déplacements chimiques en RMN ¹ H (GSSG libre, pH 3) (Kato et al., 1999; Rabenstein et Millis, 1995).....	122
Tableau 26 : Récapitulatif des déplacements chimiques en RMN ¹³ C (GSSG libre, Eu-GSSG pH 3).....	123
Tableau 27 : Composition des échantillons analysés par spectrophotométrie UV-Visible.....	124
Tableau 28 : Composition des échantillons analysés par ATR-IRTF	125
Tableau 29 : Attribution des bandes de vibration en ATR-IR pour le GSH et les complexes à pH 3 et pH 5 (Bieri et Burgi, 2005; Nakamoto, 1997; Popovic et al., 1999).....	127
Tableau 30 : Composition des échantillons analysés par spectrométrie d'absorption des rayons X (EXAFS)	130
Tableau 31 : Résumé des résultats obtenus partie 3 (Chapitre 4)	131
Tableau 32 : Concentration des solutions de PC _n	133
Tableau 33 : Récapitulatif des ions moléculaires des fragments de PC ₄	138
Tableau 34 : Répartition de Eu entre les différents types d'échantillons dosés par ICP-SEO (bilan de matière) 154	
Tableau 35 : Récapitulatif des données disponibles suite aux analyses des culots cellulaires : croissance des cellules, mort cellulaire et quantité intracellulaire de Eu	156
Tableau 36 : Récapitulatif des valeurs des paramètres ajustés.....	XIII
Tableau 37 : Composition du milieu de culture DMEM des cellules HaCaT.....	XVII
Tableau 38 : Composition du milieu standard HBSS.....	XVIII
Tableau 39 : Erreurs sur les volumes prélevés avec les micropipettes à volume variable	XXI

INTRODUCTION

En cas de rejet accidentel de radionucléides dans une installation nucléaire ou dans l'environnement, il existe un risque de contamination externe et interne des organismes vivants (mammifères, plantes, etc.) : la plupart de ces radionucléides ne sont pas présents en tant qu'éléments essentiels endogènes¹ (Ca, K, Mg, etc.), et il est donc important de connaître et comprendre leurs mécanismes de transport ou de transfert, afin de prédire leur comportement et de mettre en place des mesures efficaces permettant de réduire leur toxicité chimique ou radiotoxicité ainsi que la dose délivrée.

La spéciation ou la détermination des différentes formes physico-chimiques sous lesquelles ces radionucléides sont présents dans les milieux, joue un rôle primordial qui gouverne leur interaction avec les ligands présents, leur compétition avec les éléments essentiels, leur biodisponibilité, et donc leur toxicité.

Les études sur le métabolisme (distribution dans les divers organes cibles, rétention et excrétion) ou la biocinétique de la plupart des radionucléides (31 éléments) suite à une contamination interne (inhalation, ingestion ou voie cutanée) sont assez bien connues et sont décrites de façon assez détaillée dans plusieurs publications de la CIPR² (n°67, 69, 71, 100) ou du NCRP³ (Report N°156). Par contre, la connaissance à l'échelle plus microscopique (tissulaire, cellulaire ou moléculaire), des processus d'entrée, de transport, de toxicité et éventuellement d'élimination des radionucléides dans les organismes vivants est moins bien connue et constitue autant d'étapes indispensables à étudier, pour développer des méthodes efficaces de traitement de la contamination ou décontamination⁴ chez l'homme ou de détoxication chez les plantes.

Suite à une contamination interne d'un travailleur par exemple, il est important de pouvoir fournir un traitement thérapeutique par des agents chélatants qui permettront de réduire la dose, la toxicité chimique et les effets retardés des radiations ; dans le cas d'une contamination environnementale, il s'agira d'améliorer l'extraction des métaux par bioremédiation en développant des organismes (bactéries, végétaux, etc.) possédant une aptitude accrue à la séquestration, au transport, à l'excrétion ou à l'inactivation des métaux toxiques, sans interférer avec des métaux essentiels. La détermination des bases moléculaires de l'affinité, voire de la spécificité des ligands pour certains cations métalliques et/ou radionucléides, ainsi que la

¹ Terme désignant ce qui se produit dans un organisme ou qui provient de l'intérieur de celui-ci. Le terme de métaux « biologiques » sera aussi parfois employé.

² Commission Internationale pour la Protection Radiologique.

³ National Council on Radiation Protection and Measurements (institution américaine).

⁴ Ensemble des méthodes permettant de retirer les éléments radioactifs incorporés de leurs organes cibles (os, foie, reins, etc.) en utilisant des molécules chélatantes ou d'autres types de traitements pharmaceutiques.

spéciation des interactions métal-ligand synthétique sont importantes à déterminer car elle peuvent éventuellement être reliées à leur (cyto)toxicité. En parallèle, des études reposant sur la chimie théorique et la modélisation moléculaire, peuvent contribuer à la détermination structurale et thermodynamique de sites protéiques spécifiquement impliqués dans des processus de séquestration ou de transport de toxiques métalliques.

Nous avons choisi de centrer notre **étude à l'échelle cellulaire**. Les voies de transport des radionucléides à l'intérieur des cellules sont les mêmes que celles des « métaux biologiques » (Fe, Zn, Co, etc.). En effet, la sélectivité des moyens de transport (canaux, pompes, etc.) peut être assez relative, en particulier lorsque les radionucléides présentent certaines analogies avec ces ions métalliques biologiques. C'est justement le cas des lanthanides avec le calcium, ce qui explique notamment leur utilisation comme sonde moléculaire en biologie.

Une fois la membrane cellulaire traversée, le radionucléide se trouve dans le cytoplasme, en présence de molécules potentiellement complexantes, en particulier les ligands spécifiques des métaux lourds⁵ et par extension des radionucléides. Si certains métaux de transition, en particulier le cuivre et le zinc, sont des oligo-éléments essentiels à un grand nombre de processus physiologiques chez les plantes *via* l'intervention d'enzymes qui utilisent ces éléments, d'autres métaux lourds non essentiels comme le cadmium, le plomb ou le mercure sont très réactifs et peuvent donc être toxiques pour les cellules vivantes.

C'est pourquoi, les plantes, comme tout organisme vivant, ont développé et amélioré au cours de leur évolution un ensemble de mécanismes répondant à l'apport et à l'accumulation des métaux lourds essentiels ou non. Ces mécanismes englobent la chélation et la séquestration des métaux lourds par des ligands adaptés. Les deux **familles** les mieux connues **de ligands spécifiques** des métaux lourds sont les **phytochélatines** dans les cellules végétales et les **métallothionéines** dans les cellules animales. C'est pourquoi nous avons choisi de nous intéresser à ces deux protéines lors de notre étude bibliographique.

Ce travail vise à collecter des informations sur la **spéciation** des radionucléides afin de comprendre leur comportement au niveau moléculaire et prédire leur impact en milieu biologique et dans l'environnement. Le premier **élément** que nous avons **choisi** d'étudier est un **lanthanide** trivalent : l'**europium** en tant qu'analogue chimique des actinides trivalents, sans être radioactif et du fait de ses propriétés chimiques proches de celles du calcium, élément essentiel prépondérant dans les cellules. Nous avons aussi travaillé directement avec l'**uranium** naturel (très faiblement radioactif) qui présente une chimie proche de celle du neptunium et du plutonium.

Nous présentons donc dans un premier chapitre les différents éléments des systèmes que nous avons étudiés par la suite, en particulier : les radionucléides et la complexité de leur chimie. Un

⁵ Métaux dont la densité est supérieure à 4,5 g/cm³.

état de l'art concernant trois types de molécules présentes dans les cellules et capables d'intervenir dans la spéciation des radionucléides en milieu biologique est ensuite exposé.

Le deuxième chapitre est consacré aux techniques spectrométriques mises en œuvre lors de nos études. Nous avons choisi d'utiliser d'une part la Spectrofluorimétrie Laser à Résolution Temporelle (SLRT) dont le principe est fondé sur la fluorescence des cations étudiés ainsi que sur la modification de leurs propriétés de fluorescence lorsque leur environnement proche est modifié, et d'autre part l'ElectroSpray-Spectrométrie de Masse (ES-SM) dont le mode d'ionisation doux permet la conservation des interactions entre les espèces en solution. La SLRT et l'ES-SM sont des techniques suffisamment sensibles pour permettre l'utilisation de concentration de même ordre de grandeur en cation métallique et en ligand, y compris à l'état de traces. En complément, nous avons souhaité mener des études structurales sur les édifices formés. Pour cela, nous avons mis à profit d'autres techniques, moins sensibles, impliquant de travailler avec des concentrations plus élevées. Nous présentons donc également dans ce chapitre les rudiments de la Spectroscopie d'Absorption des rayons X (SAX), la spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), la spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier en mode Réflexion Totale Atténuée (ATR-IRTF) ainsi que la spectrophotométrie UV-Visible.

Notre démarche expérimentale a été de commencer par travailler avec des ligands simples (édifices de petite taille), pour évoluer vers les ligands les plus complexes comme les protéines. Nous avons débuté par l'étude des acides aminés dont ceux présents dans les phytochélatines par des études menées en SLRT et ES-SM (acide glutamique, cystéine mais aussi l'histidine). En effet, l'étude bibliographique a montré qu'il existait une grande disparité des données thermodynamiques radionucléides-acides aminés voire parfois une absence de données (dans le cas de l'euporium notamment). La complexation avec les acides aminés fait donc l'objet du troisième chapitre, où la méthodologie expérimentale mise en place pour l'ensemble des expérimentations est également décrite.

Le chapitre quatre présente l'étude des édifices de taille plus importante, constitués de plusieurs acides aminés : les polypeptides, en particulier le glutathion (réduit : GSH et oxydé : GSSG), intermédiaire capital dans la synthèse des molécules biologiques d'intérêt que sont les phytochélatines et les métallothionéines. Ce chapitre quatre présente également les résultats obtenus avec ces molécules : des phytochélatines de différentes tailles ainsi que des métallothionéines.

Enfin, le chapitre cinq présente les études en milieu biologique. Nous avons mis en place des tests de contamination cellulaire avec un radionucléide, en appliquant une méthodologie développée pour la spéciation du cobalt en milieu cellulaire⁶. La capacité des cellules à se multiplier en

⁶ Dans le cadre du projet MSBE : « Méthodologie et Spéciation en milieu Biologique et Environnemental » du programme national de recherche sur la Toxicologie Nucléaire Environnementale, développé conjointement par le CEA, le CNRS, l'INSERM et l'INRA.

présence d'un milieu de culture contenant un radionucléide a été déterminée. Nous avons ensuite défini dans quelle mesure ce radionucléide est incorporé, voire sa localisation au niveau cellulaire.

Grâce aux informations obtenues sur les stœchiométries, les structures et les constantes de complexation, nous sommes donc en mesure de compléter et/ou d'affiner diverses bases de données thermodynamiques⁷. Les données obtenues nous permettent d'établir des diagrammes de spéciation plus justes et ainsi de rendre compte de façon plus exacte du comportement des radionucléides en milieu biologique.

⁷ Notamment BASSIST : Base Appliquée à la Spéciation en Solution, aux Interfaces et aux Solubilités développée au laboratoire dans le cadre des études sur les mécanismes de transfert des radionucléides (Bion, 2003).

Chapitre 1

INTERACTIONS DES RADIONUCLEIDES AVEC LES MOLECULES D'INTERET BIOLOGIQUE

1. Les radionucléides

1.1. Présentation des lanthanides et des actinides

1.1.1. Définition

Les éléments *f* regroupent deux familles dans la classification périodique des éléments chimiques de Mendeleïev : les lanthanides (Ln) : 15 éléments allant du lanthane au lutécium et de numéro atomique variant de 57 à 71 ; et les actinides (An) : 15 éléments allant de l'actinium au lawrencium et de numéro atomique variant de 89 à 103. Ces deux familles sont représentées en jaune dans le tableau périodique (Figure 1).

H																	He	
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne	
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar	
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr	
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe	
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn	
Fr	Ra	Ac	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	Uun	Uuu	Uub							
			Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu		
			Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr		

Figure 1 : Classification périodique des éléments

Il faut noter que parmi les An, seuls les premiers de la série, jusqu'à l'uranium, se trouvent à l'état naturel (exception faite de radioéléments⁸ comme le Pu par exemple, présents dans le sol des réacteurs nucléaires naturels comme c'est le cas dans la mine d'uranium d'Oklo dont la teneur initiale en ²³⁵U du minerai était voisine de celle utilisée pour les combustibles des réacteurs actuels). Tous les An plus lourds sont générés de façon artificielle dans un réacteur nucléaire, et sont radioactifs.

⁸ Un élément dont certains isotopes sont radioactifs est un radionucléide (RN). Dans le cas où tous les isotopes sont radioactifs, on parle de radioélément (RE). Nous emploierons toutefois le terme radionucléides, plus général, pour nos études puisque nous avons travaillé avec des RN et un RE

1.1.2. Les lanthanides

Cette première partie a pour but de présenter quelques applications choisies de la chimie des Ln au degré d'oxydation +III (Ln(III)). Pour cela, nous verrons dans un premier temps, les propriétés très générales de ces Ln(III) expliquant un comportement chimique similaire au sein de la série, mais en revanche des propriétés physiques (spectroscopiques) variées qui en font toute leur richesse. Ainsi, le contrôle de la sphère de coordination des complexes de Ln(III) est essentiel pour orienter les applications.

1.1.2.1. Propriétés

La quasi identité des propriétés physiques et chimiques de l'yttrium et du scandium avec celles des Ln conduit naturellement à regrouper ces 17 éléments sous le nom de « terres rares ». Ce nom est historiquement associé à la difficulté que les chimistes avaient à les isoler sous une autre forme que l'oxyde, très réfractaire (terre en ancienne chimie). L'épithète rare rappelle leur faible concentration dans les minerais, bien que l'abondance naturelle soit globalement plus importante que celle de l'argent, du plomb ou de l'or.

La configuration électronique des Ln correspond au remplissage progressif de la couche 4f qui est blindée par les couches externes $5s^2 5p^6$. Les Ln existent tous majoritairement à l'état trivalent et présentent alors la configuration électronique $[\text{Xe}] 5d^0 6s^0 4f^n$. Ainsi, ces ions lanthanides trivalents (notés ions Ln^{3+} ou Ln(III)) présentent une remarquable homogénéité de leurs propriétés chimiques.

Les électrons de « valence » des orbitales 4f sont « enfouis » dans le nuage électronique et sont donc très peu sensibles à l'environnement chimique. Ceci a plusieurs conséquences. Tout d'abord les ions lanthanides sont des acides durs dans la « classification de Pearson des acides et bases durs et mous » (Pearson, 1963). Ils vont donc interagir préférentiellement avec des ligands durs, contenant entre autres des atomes donneurs d'oxygène (eau, carboxylates, alcoolates, etc.). Leur forte acidité au sens de Lewis conduit également à une activation d'atomes d'hydrogène présents sur les molécules d'eau coordonnées au cation métallique, favorisant ainsi la formation d'hydroxocomplexes (ou espèces hydrolysées). Ces hydroxydes de lanthanides sont insolubles à partir de pH de l'ordre de 6.

Une autre conséquence de la profondeur des orbitales 4f est que le champ cristallin est très faible, de l'ordre de quelques centaines de cm^{-1} , contre 5 000 à 30 000 cm^{-1} pour les métaux de transition. D'un point de vue structural, les liaisons métal-ligand présentent une absence de directionnalité. La position des différents ligands dans la sphère de coordination est conditionnée essentiellement par les interactions électrostatiques et stériques entre le cation métallique et les ligands. Ceux-ci s'organisent au mieux autour du cation métallique de façon à minimiser l'énergie électrostatique et les interactions stériques répulsives. Enfin, la taille de l'ion varie de façon monotone tout au long de la série. En effet, du début à la fin de la série, le rayon ionique décroît régulièrement. Ce

phénomène est appelé « contraction lanthanidique ». Ce rayon ionique est un paramètre effectif, fonction du nombre de coordination des Ln(III) en solution, qui représente le nombre de liaisons métal-ligand. Les nombres de coordination les plus fréquents des Ln(III) sont 8 ou 9, mais ils peuvent varier de 6 à 12.

1.1.2.2. Utilisations

Les domaines d'applications des Ln se sont multipliés lorsque qu'il a été possible de bien séparer les terres rares entre elles et de nos jours ces applications sont de très haute valeur ajoutée, depuis les applications en médecine ou en biochimie aux développements plus récents pour les couleurs des écrans de télévision.

1.1.2.2.1. Les tests immunologiques

Les tests immunologiques reposent sur une réaction biochimique entre un antigène (à analyser) et un anticorps spécifique. Dans les tests immunologiques luminescents, l'anticorps est marqué avec un complexe de Ln(III) : par exemple, un complexe Eu(III) avec un cryptand tris(bipyridine) est lié à un anticorps spécifique alors qu'un accepteur A est greffé sur un second anticorps spécifique, la réaction biochimique avec l'antigène va amener ces deux entités à proximité l'une de l'autre et un transfert d'énergie va avoir lieu (Figure 2).

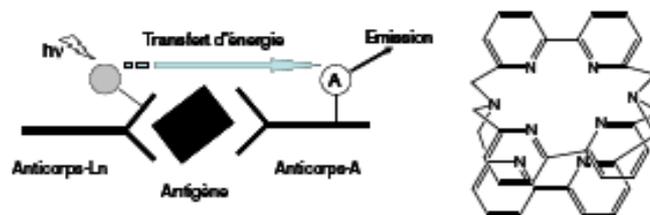


Figure 2 : Principe des tests immunologiques

Cette technique permet de détecter la prolactine avec une sensibilité similaire à celle obtenue avec des marqueurs radioactifs (moins de 0,3 μ g/L) (Mathis, 1995).

1.1.2.2.2. Les techniques d'imagerie par luminescence

En ajoutant deux dimensions spatiales à ces procédures analytiques, il est possible de réaliser de l'imagerie par luminescence. Les complexes de Ln(III) sont très intéressants du fait que ce sont des sondes très sensibles pour tous les tests biologiques et qu'ils ont des temps de vie de luminescence plus longs que les sondes fluorescentes classiques. Ainsi, les signaux provenant des Ln(III) peuvent être séparés de ceux provenant des tissus biologiques ou des composants optiques en utilisant la luminescence résolue en temps. L'utilisation de la microscopie luminescente permet d'obtenir une résolution spatiale inférieure à la dimension de la cellule, rendant possible la localisation précise de la substance à analyser ainsi que la détermination de sa concentration (Faulkner *et al.*, 2005).

1.1.2.2.3. *Agents de déplacement chimique en RMN*

Bien que les ions Ln^{3+} ne soient pas directement observables par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), ils induisent des propriétés particulières sur les noyaux environnants, observables par RMN. La RMN est une technique spectroscopique qui s'intéresse aux transitions énergétiques entre les niveaux Zeeman des spins nucléaires placés dans un champ magnétique. Ces transitions se font dans le domaine des ondes radio et sont caractéristiques de la nature et de l'environnement chimique du noyau considéré. L'étude des fréquences de résonance et des réseaux de couplage qui existent entre les spins de la molécule permet d'obtenir des informations sur sa structure et sa dynamique.

La proximité d'un métal paramagnétique avec les noyaux observés a une forte influence sur l'allure des spectres RMN. Il existe un couplage hyperfin entre le spin du noyau étudié et le spin de l'électron célibataire appartenant au cation métallique. Son influence se ressent sur le déplacement chimique du spin nucléaire étudié et sur la relaxation de ces spins, qui influe sur la largeur de raie. Les premières observations de complexes de Ln(III) en tant qu'agents de déplacement chimique remontent à 1969 (Mar *et al.*, 1973).

1.1.2.2.4. *Agents de contraste pour l'IRM*

Pour un examen d'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), technique d'imagerie médicale permettant d'avoir une vue 2D ou 3D d'une partie du corps, notamment du cerveau, l'agent de contraste est injecté par voie intraveineuse, mais il se distribue ensuite dans les espaces extracellulaires et intravasculaires. Les doses requises sont en général de 0,1 à 0,3 mmol.kg⁻¹ et la concentration de la solution injectée est importante (environ 0,5 mol.L⁻¹). Le complexe doit absolument être soluble à ces concentrations. Le deuxième point crucial est la stabilité cinétique et thermodynamique du complexe injecté.

L'ion aquo Gd^{3+} est très toxique. Sa toxicité provient essentiellement de la similitude de son rayon ionique avec celui du calcium (Ca^{2+}). Il se substitue donc au calcium dans le corps humain et empêche, entre autre, la transmission neuromusculaire en bloquant les canaux du calcium. Il est également connu pour interagir avec les protéines du sérum, et pour se déposer de façon irréversible, sous forme de sels insolubles, sur les os, le foie et la rate. Le complexe injecté doit donc être thermodynamiquement stable et cinétiquement inerte pour que la concentration de Gd(III) libre soit limitée. Ces contraintes très fortes impliquent de nombreux tests cliniques, d'un coût actuel d'au moins cent millions de dollars, avant la mise sur le marché.

1.1.2.2.5. *Autres applications liées aux propriétés optiques*

Nous avons vu que les transitions électroniques des Ln se situaient entre niveaux discrets : cela se traduit par des absorptions et des émissions de lumière à caractère fortement monochromatique.

Ainsi, de nombreux niveaux d'énergies, se succèdent à intervalles rapprochés entre le proche infrarouge et l'ultraviolet.

Dans le domaine de l'absorption, certains Ln(III) permettent l'obtention de colorations très particulières mises à profit dans l'industrie du verre et de la céramique où ils entrent dans la composition des pigments (vert de praséodyme, violet du néodyme ou rose de l'erbium).

Au niveau de l'émission, les applications se sont développées, en liaison avec la disponibilité industrielle des Ln à des puretés suffisantes : télévision couleur, éclairage fluorescent et radiographie médicale. Une grande variété d'émission peut être obtenue en fonction de la nature du Ln mis en jeu et des positions respectives des niveaux d'énergie excités ou fondamentaux. Ainsi, en télévision couleur, l'image est reproduite grâce à l'excitation cathodique sélective de trois luminophores (bleu, vert et rouge) à base de Ln déposés sur la face interne de l'écran. Suivant l'élément de Ln choisi, l'émission lumineuse est localisée dans le proche ultraviolet (avec le gadolinium, le cérium), le visible (rouge avec l'euporium, orange avec le samarium, vert avec le terbium, jaune avec le dysprosium, bleu avec le thulium), ou le proche infrarouge (avec le néodyme). Cela a permis la réalisation de lampes compactes pour les applications domestiques.

1.1.3. Les actinides

Les An sont générés par des captures de neutrons qui n'ont pas été suivies de fissions. Ils tirent leur nom de l'actinium ($Z=89$), un métal lourd qui précède de peu l'uranium dans le tableau de Mendeleïev, car ils possèdent des propriétés chimiques voisines.

1.1.3.1. Production

L'An produit le plus abondamment est le plutonium avec en tête son principal isotope le ^{239}Pu , lui-même fissile. Mais les réacteurs génèrent en quantité moindre, d'autres An qui sont dits « mineurs » pour cette raison. Les principaux sont le ^{237}Np , les ^{241}Am et ^{243}Am et les ^{244}Cm et ^{245}Cm . Les An mineurs constituent avec le plutonium une grande partie des déchets radioactifs à Haute Activité et durée de Vie Longue (HAVL), c'est-à-dire les déchets de l'industrie électronucléaire les plus dangereux.

Les transuraniens, An plus lourds que l'uranium, n'existent en général pas à l'état naturel, car leurs isotopes ont souvent une demi-vie très courte, aux exceptions notables, de quelques isotopes de Np, Pu, Am et Cm produits en quantités pondérables dans les réacteurs nucléaires (Tableau 1).

Tableau 1 : Demi-vie de quelques actinides

Isotope	Demi-vie
^{242}Cm	163 jours
^{239}Pu	$2,4 \cdot 10^4$ ans
^{235}U	$7,1 \cdot 10^8$ ans

1.1.3.2. Propriétés

Lors des premiers travaux sur la chimie des An synthétiques, la similitude avec les propriétés chimiques des Ln a été très utilisée. Comme ces éléments étaient souvent manipulés en quantité très faibles et qu'ils étaient radioactifs, la prévision de leurs propriétés par analogie avec la série des Ln s'est montrée très utile. Cependant, la série des An est très loin d'être une simple répétition de celle des Ln, il y a plusieurs différences significatives entre les deux séries, principalement dues aux différences entre les orbitales $4f$ et $5f$.

Bien que tous les An présentent le degré d'oxydation +III, ce n'est pas le plus stable pour plusieurs d'entre eux. Th(III) et Pa(III) n'existent qu'à l'état solide, et si U(III), Np(III) et Pu(III) présentent une chimie aqueuse, leurs degrés d'oxydation supérieurs sont plus stables. Contrairement aux Ln, les An utilisent plus facilement leurs électrons f et présentent les degrés d'oxydation positifs égaux à la somme des électrons $7s$, $6d$ et $5f$: Ac(III), Th(IV), Pa(V), U(VI) et Np(VII).

La chimie en milieu aqueux des ions actinides +III et +IV est compliquée par leur tendance à l'hydrolyse et à la polymérisation. Les degrés d'oxydation plus élevés sont représentés par les ions actinyle stables (ex : AnO_2^+ , AnO_2^{2+} et AnO_5^{3-}).

La différence principale entre les orbitales $4f$ et $5f$ semble dépendre des énergies relatives et des distributions spatiales des orbitales. Les orbitales f peuplées des Ln sont d'énergie suffisamment basse pour que les électrons soient rarement ionisés ou partagés (d'où la rareté des espèces +IV chez les Ln). En revanche, les électrons $5f$, au moins jusqu'au Bk, sont disponibles pour des liaisons, permettant d'atteindre des degrés d'oxydation jusqu'à +VII. De ce point de vue, ces électrons ressemblent aux électrons d des métaux de transition.

1.1.3.3. Thèmes de recherche

Les études sur les actinides sont pour la plupart orientées par les trois axes définis par la loi du 30 décembre 1991, dite « loi Bataille », qui a laissé 15 années aux acteurs du nucléaire (organismes de recherche, industriels, etc.) pour réexaminer et approfondir les solutions déjà existantes et explorer d'autres voies de gestion industrielle (définitive) des déchets nucléaires. En 2005, un débat public national a donc été organisé afin de faire le point sur ces 15 années de recherche et définir le

contenu de la loi de programme à venir. La loi, dite de « juin 2006⁹ », prolonge la démarche de la « loi Bataille » de 1991 en précisant les dates auxquelles les différentes solutions pourront entrer en vigueur. Les solutions envisagées font l'objet des paragraphes suivants.

1.1.3.3.1. 1^{er} axe : Séparation poussée et transmutation

La séparation poussée concerne quelques produits de fission et les An mineurs qui présentent après le plutonium, la radiotoxicité la plus élevée. Cette séparation s'appuie sur le développement de molécules extractantes extrêmement sélectives. Certains An sont en effet, chimiquement très proches les uns des autres et donc difficilement séparables. Une fois les éléments les plus toxiques séparés, les radioéléments restants peuvent être incorporés dans des verres, dits « verres allégés », dont la radiotoxicité décroît plus rapidement que celles des verres nucléaires classiques.

Mais que faire des éléments les plus toxiques ? Un scénario envisage la transmutation, c'est-à-dire leur transformation en d'autres isotopes moins toxiques ou lorsque la transmutation n'est pas viable, le conditionnement spécifique.

La loi de « juin 2006 » stipule que pour la séparation et la transmutation, les perspectives industrielles liées aux recherches sur la quatrième génération de réacteurs devront être arrêtées en 2012.

1.1.3.3.2. 2^{ème} axe : le stockage en formation géologique profonde

Le conditionnement constitue une alternative à la transmutation. Il s'agit d'incorporer les radioéléments dans des matrices adaptées pour résister à l'éventuelle action de l'eau conjuguée aux effets d'irradiation. On recherche des matériaux (céramiques notamment, mais aussi bitumes, bétons, etc.) présentant des structures plus résistantes à l'action de l'eau (lixiviation) que le verre "nucléaire", pendant toute la durée du stockage. Les effets d'irradiation, lors de la décroissance alpha peuvent altérer les propriétés physiques et chimiques du verre. En particulier, le pouvoir de rétention vis-à-vis des radioéléments peut être fortement réduit. Pour parer à une éventuelle arrivée de l'eau au contact du colis radioactif, celui-ci est entouré de plusieurs barrières ouvragées afin aussi de limiter les risques de migration des radionucléides vers la biosphère.

La loi de « juin 2006 » précise que tous les éléments nécessaires à une autorisation pour le stockage réversible en couche géologique profonde devront être réunis en 2015.

1.1.3.3.3. 3^{ème} axe : le conditionnement et l'entreposage de longue durée

L'amélioration des conditions d'entreposage constitue le troisième axe de la loi de 1991. L'entreposage dans les sites de surface, ou de subsurface pour une durée de quelques centaines

⁹ Loi de programme n°2006-739 du 28 juin 2006 relative à la gestion durable des matières et déchets radioactifs.

d'années, ne peut pas être considéré comme une solution définitive. A la fin de cette période, les colis doivent pouvoir être repris soit pour les stocker définitivement soit pour les recycler si des solutions plus innovantes voient le jour. Ce scénario ne s'oppose pas au stockage en formation géologique profonde si on privilégie les concepts permettant la réversibilité. En effet les générations futures doivent avoir la possibilité de récupérer les déchets et peut être les valoriser.

La date de mise en service d'un éventuel centre de stockage est fixée à 2025 par la loi de « juin 2006 », ce qui est compatible avec le calendrier de production des déchets à haute activité et à vie longue issus du cycle nucléaire français.

Le texte de loi de « juin 2006 » apporte également deux éléments essentiels dans des domaines non couverts par la loi de 1991. D'une part, il propose une véritable gestion nationale pour les déchets, mais aussi pour les matières radioactives, valorisables ou non, en instituant le plan national de gestion des déchets radioactifs. D'autre part, il donne un cadre législatif au démantèlement des installations nucléaires et, en particulier, à la question des provisions financières sécurisées constituées par les exploitants pour que le montant de 68 milliards d'euros, aujourd'hui jugé nécessaire, soit disponible. Enfin, ce texte renforce l'accompagnement socio-économique des territoires concernés par un éventuel stockage. Il vise à mieux impliquer les industriels du nucléaire dans des projets industriels locaux (concertation et information des élus et des populations).

1.2. Le devenir des radionucléides

En cas de rejet de radionucléides (RN) dans l'environnement, il est nécessaire de connaître le terme source, les phénomènes de transport et de transformation, l'interaction avec les sols, l'incorporation au milieu biologique, etc., afin de pouvoir estimer les conséquences à long terme de cette contamination.

Différents phénomènes peuvent modifier la mobilité des RN dans l'environnement (Figure 3).

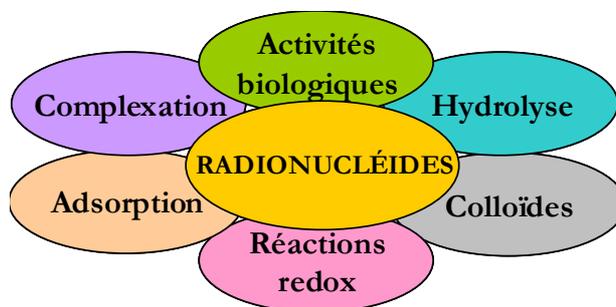


Figure 3 : Phénomènes susceptibles d'influencer la mobilité des radionucléides dans l'environnement

Une connaissance précise du comportement des RN selon leur spéciation avec les différentes molécules impliquées dans les phénomènes présentés Figure 3 est non seulement utile pour préciser les risques encourus pour l'homme et l'environnement mais aussi pour définir les

protocoles à mettre en place afin de retirer efficacement les RN du milieu (phytorémédiation et décorporation notamment).

1.2.1. Dans le corps : la décorporation

Les premières recherches concernant le traitement de la contamination interne par des An ont été menées par le Département Santé du groupe Manhattan. Différentes solutions furent envisagées (suppléments d'hormones, utilisation de citrate de zirconium ou d'acides carboxyliques communs (Schubert, 1947)) avant de considérer l'administration d'un agent chélatant capable de former avec un métal, un complexe stable, soluble et pouvant être excrété par l'organisme comme la seule thérapie envisageable. Cet agent doit idéalement posséder les caractéristiques suivantes : une plus grande affinité envers les An qu'envers d'autres espèces complexantes présentes dans le corps, une faible affinité envers d'autres cations métalliques essentiels, une faible toxicité chronique et une administration par voie orale.

La première molécule envisagée en 1947 fut l'H₄-EDTA hexadentate. En 1954, une autre molécule brevetée, l'H₅-DTPA, présentant une plus grande affinité envers les cations multivalents et une moindre affinité envers les métaux divalents fut testée. Les CaNa₃-DTPA ou ZnNa₃-DTPA sont aujourd'hui encore les seuls traitements en cas de contamination interne. Malgré son fort pouvoir complexant envers les An(III) et le Pu(IV) dans les fluides corporels, ce traitement DTPA possède aussi quelques points faibles. Ainsi, une fois le Pu lié aux tissus ou aux os, le pouvoir de mobilisation du Pu par le DTPA est faible. De plus, la thérapie DTPA peut conduire à des formes sévères d'hypocalcémie et de carences en ions métalliques divalents essentiels tels que Zn, Co, Cu et Mn. Pour finir, le DTPA n'est pas très efficace pour la décorporation d'autres An comme Th(IV), Np(IV) ou U(VI). Ceci peut poser des problèmes en cas de contamination par plusieurs métaux ou bien en cas de doute sur le contaminant.

Dans le cadre de travaux sur la décorporation, il est important de rechercher de nouvelles unités chélatantes afin d'améliorer la sélectivité des traitements vis-à-vis des RN. En matière de décorporation, une revue récente de Ansoborlo présente l'état de l'art sur la décorporation des actinides en milieu biologique (Ansoborlo *et al.*, 2007).

Une voie envisagée se base sur les sidérophores qui possèdent des unités complexantes – catécholates, catécholamines, acides amino-carboxyliques, hydroxamates ou hydroxypyridinates (HOPO) – très spécifiques de Fe(III) ainsi que de Pu(IV). Trois ligands comportant des groupes HOPO, le 5-LIO-(Me-3,2-HOPO) tétradentate, le TREN(Me-3,2-HOPO) hexadentate et le 3,4,3-LI(1,2-HOPO) octadentate sont aujourd'hui considérés comme les meilleurs agents décorporants des An (Gorden *et al.*, 2003). Ces trois molécules s'avèrent être significativement plus efficaces que le DTPA pour réduire la quantité de Pu(IV) et d'Am(III) dans le corps, ainsi que pour éliminer Np(V), Np(VI) et U(VI), pour lesquels le traitement DTPA est inactif. De plus, l'administration de ces ligands se fait par voie orale et la toxicité associée aux quantités efficaces est assez faible. Des recherches sont menées pour mettre au point un cocktail de ligands afin de

tirer le meilleur parti des spécificités de chaque molécule en cas de contamination interne par un mélange d'An.

Cependant, il est aussi possible de développer des formulations pharmaceutiques originales permettant de diriger davantage le décorporant vers les sites de transfert et de dépôt du RN, *in vivo*. Par exemple, les liposomes¹⁰ sont des formulations qui offrent toute une série de possibilités de vectorisation (par encapsulation), notamment concentrer un médicament au niveau du foie ou augmenter sa période biologique dans la circulation sanguine et ainsi améliorer son efficacité. Dans le cadre du programme national de recherche sur la Toxicologie Nucléaire Environnementale, cette démarche a été récemment appliquée avec succès pour le DTPA dont la pharmacocinétique a été étudiée chez le rat et modifiée grâce à une formulation galénique¹¹ à base de différents liposomes (Phan *et al.*, 2006a). Il a été possible d'étudier la distribution du DTPA dans les organes cibles du Pu que sont le foie et l'os, et de modifier cette distribution de façon à augmenter le temps de contact entre le complexant et le RN pour favoriser l'élimination de ce dernier (Phan *et al.*, 2006b).

1.2.2. Dans les sols

Quelque soit la source et leur forme chimique initiale, la majorité des RN est insoluble dans les sols et très peu mobile ; l'activité reste donc majoritairement dans les 10 premiers centimètres du sol (Mboulou *et al.*, 1998). La migration des RN est dite latérale car en général causée par le vent et l'érosion hydrique, mais des processus mécaniques comme l'exploitation agricole peuvent favoriser sa migration verticale. La fraction de RN hydrosoluble et échangeable dans le sol est inférieure à 0,4 % et leur dissolution peut s'étaler sur plusieurs années, conduisant à un gradient de concentration très faible (Michel *et al.*, 2002).

Pourtant, suivant les conditions locales, la fraction de RN soluble et/ou mobile peut augmenter considérablement. Différents paramètres du sol peuvent influencer la mobilité du RN dans les sols : adsorption, présence de colloïdes, de matière organique et de micro-organismes, etc.

1.2.2.1. Influence de l'adsorption

Etant donné que les carbonates forment des complexes stables avec les RN en solution, la surface des minéraux carbonatés serait susceptible d'être un site privilégié d'adsorption des An (Choppin, 2003). Le rôle important de l'adsorption des RN dans leur immobilisation ou leur transport a été discuté par de nombreux auteurs (Meece et Benninger, 1993). L'adsorption suit la même tendance que la complexation, puisqu'elle est influencée par les mêmes paramètres (charge des cations, effet

¹⁰ Les liposomes sont des petites sphères creuses composées d'une bicouche lipidique de quelques centaines de nm de diamètre. Le médicament s'insère dans la bicouche ou se trouve piégé dans la cavité centrale selon sa liposolubilité.

¹¹ Qui concerne la préparation, la présentation et la conservation des médicaments.

stériques, etc.). Dans les milieux neutres et basiques, les RN interagissent avec les groupements hydroxydes de la silice, avec les oxydes de fer ou encore les groupements hydroxydes présents à la surface des colloïdes.

1.2.2.2. Influence des colloïdes

Les colloïdes naturellement présents dans les aquifères sous forme de particules submicrométriques en suspension sont soupçonnés d'augmenter la mobilité de contaminants non solubles au dépend de l'adsorption. Ce serait également le cas pour les An (Kim, 1994). Afin de ne pas sous-estimer le transport des RN dans l'environnement, il est donc indispensable de prendre en compte d'autres facteurs que la solubilité et l'adsorption sur les roches dans les modèles de migration. Toutefois, l'influence des colloïdes sur la mobilité des An est encore sujet à polémiques.

1.2.2.3. Influence de la matière organique

Les matières organiques naturelles, issues principalement de la dégradation de la matière organique contenue dans les sols, sont essentiellement constituées de substances humiques (SH) (acides humiques AH et acides fulviques AF). La différence entre AH et AF se fait selon une définition opérationnelle, par leur différence de solubilité dans le milieu aqueux : les AH précipitent en milieu acide ($\text{pH} < 3$) tandis que les AF sont solubles quelque soit le pH et retenus sur résine hydrophobe. Les RN sont susceptibles de se complexer avec les substances organiques, notamment les AH et les AF ou les acides organiques simples. L'utilisation de l'ES-SM a permis de mettre en évidence que les SH sont un mélange de molécules organiques de masses molaires inférieures à celles observées expérimentalement, pouvant être considérées comme des supramolécules dont la cohésion pourrait être assurée par des liaisons hydrogène (Plancque *et al.*, 2001).

Dans le cas de milieux très réducteurs, même faiblement concentrés en AH (dès $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$), la spéciation des An(III) et des Ln(III) est dominée par des complexes humiques. Au-delà de pH 7, la formation de complexes mixtes de type hydroxo-humates est évoquée (Artinger *et al.*, 2002; Montavon et Grambow, 2003; Reiller *et al.*, 2002).

Dans le cas des RN au degré d'oxydation +IV, bien que l'hydrolyse soit très forte, la complexation par les SH ne doit pas être sous-estimée. Les données obtenues sur Th(IV) montrent que dès de faibles concentrations en SH (de l'ordre du mg.L^{-1}) et pour des pH neutres ou basiques, les RN(IV) seraient majoritairement associés aux SH, au lieu d'être présents sous forme d'espèces hydrolysées (Reiller *et al.*, 2003).

Dans le cas où les RN seraient présents aux degrés d'oxydation plus élevés +V ou +VI, les AH sont susceptibles de réduire ces valences en +IV, adoptant le comportement décrit

précédemment. Les groupements présumés responsables de ces processus rédox sont les hydroquinones (Reiller *et al.*, 2003).

1.2.3. Influence de la masse microbienne

Les systèmes biologiques constituent un autre mode de transport dans le sol. Les RN peuvent interagir avec les structures cellulaires et extracellulaires des bactéries et perturber l'assimilation et l'utilisation d'éléments essentiels, altérant le métabolisme cellulaire. Ces interactions peuvent transformer les RN de leurs formes les plus communes (solide, adsorbée ou colloïdale) en différentes espèces biogéochimiques. Les acides organiques produits par les cellules peuvent solubiliser les RN et augmenter leur mobilité dans l'environnement ou leur transfert dans les cellules. Les polymères associés aux parois cellulaires qui comportent des groupements phosphates et carboxylates peuvent complexer les RN et former des biocolloïdes mobiles.

Les analyses des retombées de Nagasaki dans des sols de Nishiyama ont montré que 10 % du Pu est complexé par les AH, que 3 % a migré rapidement (8 cm.an^{-1}) et que 1 % est complexé par les AF (Fujikawa *et al.*, 1999). La transformation du Pu initialement déposé sous forme d'oxydes thermovitrifiés hautement insolubles, puis incorporé dans des complexes organiques mobilisables, est attribuée à l'action des micro-organismes.

L'ensemble de ces études vise à mieux comprendre le comportement des RN dans l'environnement, point capital pour prendre les décisions adéquates concernant le traitement des RN, en matière de stockage, de dépollution ou d'utilisation médicale. Un point commun à toutes ces études est la connaissance de la spéciation des RN. Nous allons donc détailler le principe de ces études.

2. Les études de spéciation

2.1. Utilisation d'analogues chimiques

La difficulté des mesures de spéciation des RN radioactifs à l'état de traces implique la simplification des systèmes par l'utilisation d'analogues chimiques non radioactifs. Ils permettent par ailleurs la mesure de quantités macroscopiques par différentes techniques pour prédire le comportement du RN radioactif à ces concentrations en supprimant le risque radiologique. Ils sont choisis pour leurs propriétés chimiques aussi proches que possibles (rédox, taille, etc.). Le tableau ci-dessous présente les analogues les plus fréquemment utilisés pour les études de spéciation de RN courants.

Tableau 2 : Analogues chimiques de différents actinides

Eléments radioactifs	Analogue inactif (ou faiblement radioactif*)
Am(III), Cm(III), Pu(III)	Ln(III)
Np(IV), U(IV)*, Pu(IV)	Fe(III), Th(IV)*
Np(V), Pu(V)	Ca(II)
Pu(VI)	U(VI)*

Dans les eaux anoxiques à pH 7-8, les An(III) par exemple sont fortement hydrolysés et présents sous la forme d'un mélange d'espèces hydrolysées et carbonatées. Les Ln(III) sont souvent utilisés comme analogues de Am(III) ou de Cm(III) (voire de Pu(III)). Le Tableau 3 présente les constantes de stabilité de Am(III) et d'un de ses analogues : Eu(III). Il montre que ce cation peut être utilisé pour modéliser le comportement des An(III).

Tableau 3 : Constantes de stabilité de Am(III) et de son analogue Eu(III)

I = 0 mol.L⁻¹, T = 25°C (Guillaumont *et al.*, 2003; Vercoeur, 2005)

	Ligand CO ₃ ²⁻		
	log β ₁ ⁰	log β ₂ ⁰	log β ₃ ⁰
Eu(III)	7,8	12,9	13,9
Am(III)	7,8	12,3	15,2

L'acquisition de données sur la spéciation des RN est indispensable au développement et à l'utilisation de modèles prédictifs, outils décrits ci-dessous.

2.2. Modèles prédictifs

Pour prévoir le comportement des RN dans l'environnement, il est nécessaire d'utiliser des modèles pouvant fournir des informations sur la spéciation et la migration de ces derniers qui soient en accord avec les observations expérimentales. La mise en place de ces modèles requiert l'utilisation de bases de données thermodynamiques et cinétiques les plus exhaustives afin de pouvoir envisager tous les processus possibles.

Les interactions avec les colloïdes ont rarement été incluses dans les modèles de migration des actinides dans l'écosphère du fait du manque de données sur le comportement et la nature de ces colloïdes. Les modèles qui ne prennent en compte que les espèces en solution ou ceux basés uniquement sur des calculs thermodynamiques et qui négligent les phénomènes cinétiques peuvent donner accès à des estimations utiles pour les études préliminaires mais insuffisantes pour proposer des *scenarii* réalistes du comportement des RN dans l'environnement. En effet, les facteurs cinétiques peuvent conduire les systèmes à des états stationnaires différents des conditions d'équilibre prévues par la thermodynamique.

En plus de la prise en compte des colloïdes, de la cinétique et de l'état stationnaire, les bases de données utilisées doivent être validées. Les modèles doivent également permettre de prendre en compte les variations de température, la force ionique, les ions présents, le pH, le potentiel, etc. Dans le cas de certains RN : notamment le plutonium (un radioélément), l'outil informatique doit également pouvoir prendre en compte les réactions rédox.

2.3. Choix des radionucléides

Le choix des RN a été fait de manière à obtenir un échantillon représentatif de l'ensemble des RN potentiellement contaminants ainsi que pour leur adaptation aux techniques expérimentales envisagées. Nous avons donc choisi des RN à différents degrés d'oxydation : III ou VI (ainsi que diversement chargés) à savoir : les Ln(III) (ions Ln^{3+}) pour simuler les An(III) et l'uranium hexavalent : U(VI) (ion UO_2^{2+}), qui mime le Pu(VI) et le Np(VI).

Parmi les Ln(III), nous avons en particulier choisi d'étudier Eu(III), qui est en outre couramment utilisé pour représenter la série des Ln. De plus, il présente un caractère luminescent dont les propriétés dépendent fortement de l'environnement, ce qui en fait un cation métallique de choix pour les études par SLRT, technique de référence pour la spéciation en solution. Son motif isotopique particulier (~48% ^{151}Eu et ~52% ^{153}Eu) est de plus aisément identifiable en ES-SM. U(VI) présente également des propriétés de fluorescence intéressantes.

2.4. Complexité des systèmes – Enjeux des études de spéciation

Traçons des diagrammes de spéciation de Eu et de U dans un milieu « simple » : de l'eau, à pression atmosphérique, et étudions l'effet du pH sur les espèces présentes en solution (Figure 4 et Figure 5). Ces figures représentent les diagrammes de spéciation de l'euprotium et de l'uranium en fonction du pH à pression atmosphérique (donc en équilibre avec le $CO_2(g)$ de l'air).

La précipitation des espèces hydrolysées ne figure pas sur ces graphes, néanmoins les espèces neutres aqueuses sont toujours en équilibre avec l'espèce précipitée. C'est en particulier le cas de Eu à partir de pH 6. Toutefois, à ce pH et pour une concentration micromolaire en Eu, tout Eu est sous forme soluble. Les espèces carbonate, si elles ne sont pas majoritaires en solution, sont néanmoins présentes dès pH 5.

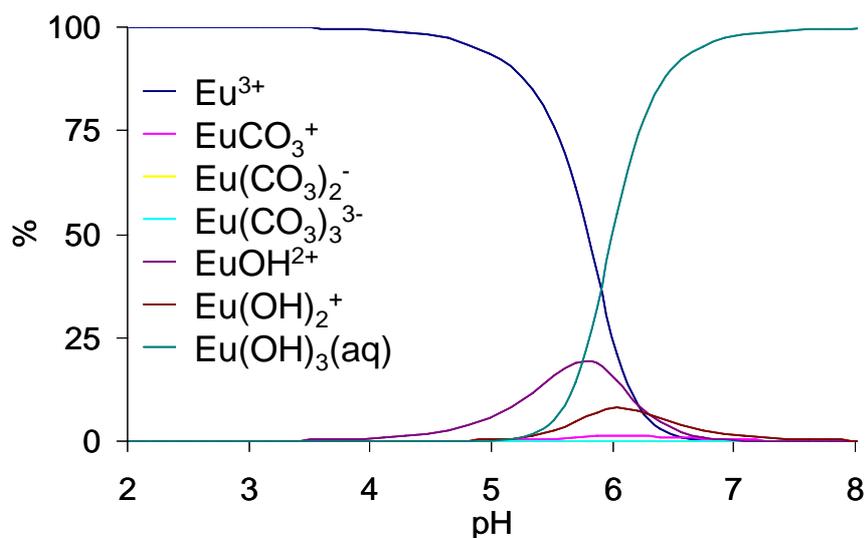


Figure 4 : Diagramme de spéciation de Eu(III) à 10^{-6}M en fonction du pH (p_{CO_2} atmosphérique, 25°C)
 Les données thermodynamiques proviennent de Nagra/PSI : Chemical Thermodynamic Data Base (Hummel *et al.*, 2002).

Dans le cas de l'uranium, une difficulté supplémentaire apparaît : il y a formation d'espèces polynucléaires en solution. La Figure 5 montre l'apparition dès pH 3 d'espèces hydrolysées de l'uranium. Celles-ci sont nombreuses et parfois polynucléaires (UO_2OH^+ , $(\text{UO}_2)_2(\text{OH})_2^{2+}$, $\text{UO}_2(\text{OH})_2$, etc.). D'autre part, si nous travaillons à pression atmosphérique, nous constatons que la quantité de CO_2 de l'air est suffisante pour que les espèces carbonate de l'uranium soient prépondérantes (et nombreuses) avant pH 7.

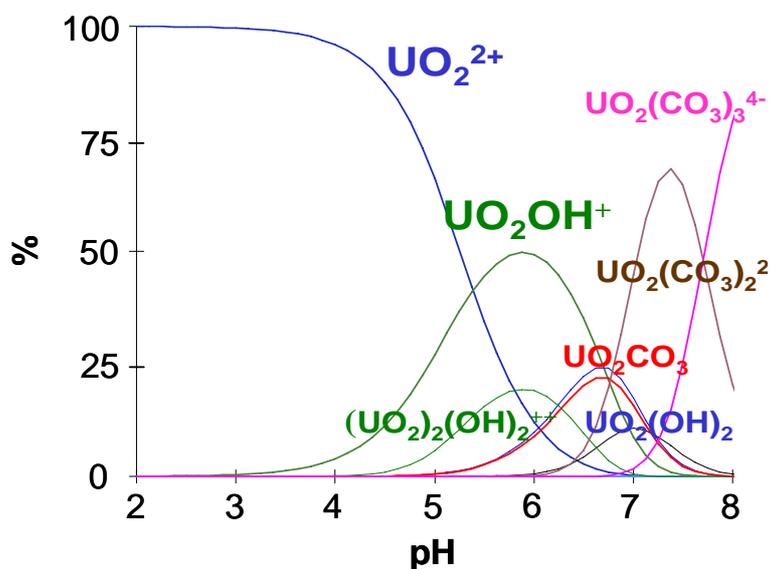


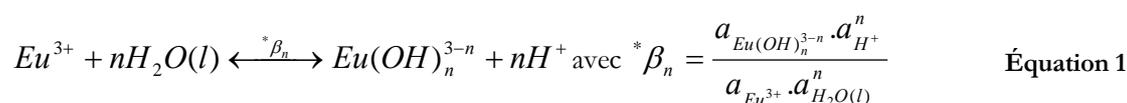
Figure 5 : Diagramme de spéciation de U(VI) à 4.10^{-6}M en fonction du pH (p_{CO_2} atmosphérique, 25°C)
 Les données thermodynamiques proviennent de NEA-TDB-OECD (Grenthe *et al.*, 1992) et (Vitorge et Capdevila, 2003).

Ces diagrammes de spéciation montrent toute la complexité de la spéciation des RN en fonction du pH même dans un milieu simplifié, où seuls les carbonates sont présents. Nous avons donc tenu compte de ces limitations (la présence de nombreuses espèces en solution ainsi que la précipitation des hydroxydes) pour dimensionner nos études de spéciation avec les ligands biologiques. Nous avons choisi de toujours étudier au moins un pH « acide », pH pour lequel le RN est présent sous une seule forme en solution et qui permet de travailler à des concentrations plus fortes en RN puisqu'il n'y a pas de domaine de précipitation des espèces hydrolysées neutres. Puis, afin d'éviter l'intervention des espèces carbonate à pH plus basique, les échantillons dont le pH est supérieur à 4 sont préparés sous atmosphère inerte : dans une boîte à gants sous circulation d'azote.

Connaître les constantes d'hydrolyse des cations est donc nécessaire, qu'il s'agisse des espèces solubles ou non, puisque ceci aura une importance capitale pour la spéciation. Les constantes que nous avons retenues sont rassemblées dans la partie suivante.

2.4.1. Hydrolyse de Eu(III)

Contrairement à U, Eu forme plutôt des espèces hydrolysées mononucléaires de stœchiométrie (1:1) à (1:4). Les équilibres de complexation (détaillés en Annexe 1) sont les suivants :



L'astérisque qui précède la constante d'équilibre indique que le ligand qui réagit est protoné au départ et qu'il se déprotone au cours de la formation du complexe.

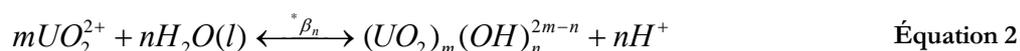
Les valeurs des logarithmes décimaux de formation des espèces hydrolysées de Eu(III) à 25°C et I = 0 M qui figurent dans le Tableau 4 sont celles de la Chemical Thermodynamic Data Base (Nagra/PSI : Chemical Thermodynamic Data Base (Hummel *et al.*, 2002)).

Tableau 4 : Récapitulatif des logarithmes décimaux de formation des espèces hydrolysées de Eu(III) à 25°C et I = 0 M (Nagra/PSI : Chemical Thermodynamic Data Base (Hummel *et al.*, 2002))

Stoechiométrie (m,n)	(1:1)	(1:2)	(1:3)	(1:4)
Complexes mononucléaires	$EuOH^{2+}$	$Eu(OH)_2^+$	$Eu(OH)_3(aq)$	$Eu(OH)_4^-$
$\log_{10}^* \beta_n$	-7,6	-15,1	-23,7	-36,2

2.4.2. Hydrolyse de U(VI)

U(VI) présente une forte tendance à l'hydrolyse et forme aussi bien des complexes mononucléaires que polynucléaires. Cependant, la concentration des espèces polynucléaires est considérée comme négligeable devant celle des espèces mononucléaires lorsque l'on travaille à faible concentration. De la même façon, les espèces hydrolysées de degré élevé ne deviennent majoritaires qu'à des pH très élevés. Les équilibres sont les suivants :



Les valeurs des logarithmes décimaux de formation des espèces hydrolysées de U(VI) à 25°C et I = 0 M qui figurent dans le Tableau 5 sont celles qui ont été retenues dans la revue de la NEA de 1992 (Grenthe *et al.*, 1992), à une modification près, la stoechiométrie (1:2) (Vitorge et Capdevila, 2003).

Tableau 5 : Récapitulatif des logarithmes décimaux de formation des espèces hydrolysées de U(VI) à 25°C et I = 0 M (NEA-TDB-OECD (Grenthe *et al.*, 1992) et (Vitorge et Capdevila, 2003))

Stoechiométrie	(1:1)	(1:2)	(1:3)	(1:4)
Complexes mononucléaires	UO_2OH^+	$UO_2(OH)_2(aq)$	$UO_2(OH)_3^-$	$UO_2(OH)_4^{2-}$
$\log_{10}^* \beta_{m,n}$	-(5,2±0,3)	-(10,3±0,1)	-(19,2±0,4)	-(33±2)
Stoechiométrie	(2:1)	(2:2)	(3:4)	(3:5)
Complexes polynucléaires	$(UO_2)_2OH^{3+}$	$(UO_2)_2(OH)_2^{2+}$	$(UO_2)_3(OH)_4^{2+}$	$(UO_2)_3(OH)_5^+$
$\log_{10}^* \beta_{m,n}$	-(2,7±1,0)	-(5,62±0,04)	-(11,9±0,3)	-(15,55±0,12)
Stoechiométrie	(3:7)	(4:7)		
Complexes polynucléaires	$(UO_2)_3(OH)_7^-$	$(UO_2)_4(OH)_7^+$		
$\log_{10}^* \beta_{m,n}$	-(31±2) ¹²	-(21,9±1,0) ¹³		

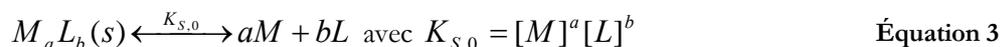
2.4.3. Cas particulier de la précipitation des espèces neutres

Il est primordial de se placer dans des conditions expérimentales qui n'impliquent pas la précipitation du cation métallique sous forme d'hydroxydes neutres. Ces données de solubilité sont utiles pour définir les concentrations de travail, en particulier à pH proche de la neutralité.

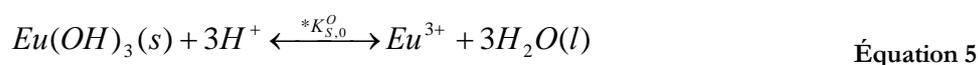
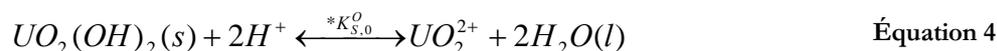
¹² Valeur estimée mais confirmée par des données expérimentales

¹³ Valeur estimée

Pour tenir compte de ce phénomène, nous utiliserons les valeurs des produits de solubilité, définis par :



L'indice 0 dans la notation indique que les espèces prises en compte dans l'équilibre ne sont pas complexées. En pratique, les réactions qui nous concernent sont :



L'exposant 0 dans la notation indique que la valeur de la constante est celle à force ionique nulle. L'ensemble des produits de solubilité des espèces hydrolysées neutres est regroupé dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Récapitulatif des logarithmes décimaux des produits de solubilité associés à la mise en solution des espèces précipitées mononucléaires (Guillaumont *et al.*, 2003; Hummel *et al.*, 2002)

Espèce	$UO_2(OH)_2(s)$	$Eu(OH)_3(s)$
$\log_{10}^* K_{s,0}^0$ (complexe mononucléaire)	$5,8 \pm 0,1$	17,6
Référence	(Guillaumont <i>et al.</i> , 2003)	(Hummel <i>et al.</i> , 2002)

Maintenant que les propriétés chimiques de base des RN ont été décrites, leur comportement en milieu biologique va être abordé.

3. Les mécanismes d'entrée des métaux dans les cellules ;

Application aux RN

L'objectif de cette partie est de comprendre comment les RN sont susceptibles d'interagir avec la membrane cellulaire et de pénétrer dans la cellule. Les différentes molécules d'intérêt biologique sélectionnées pour notre étude seront ensuite présentées.

3.1. Les cellules

Notre échelle d'étude est la cellule dont la Figure 6 est une représentation simplifiée. La complexité de l'organisation cellulaire apparaît autour du noyau (structure sphérique au centre).

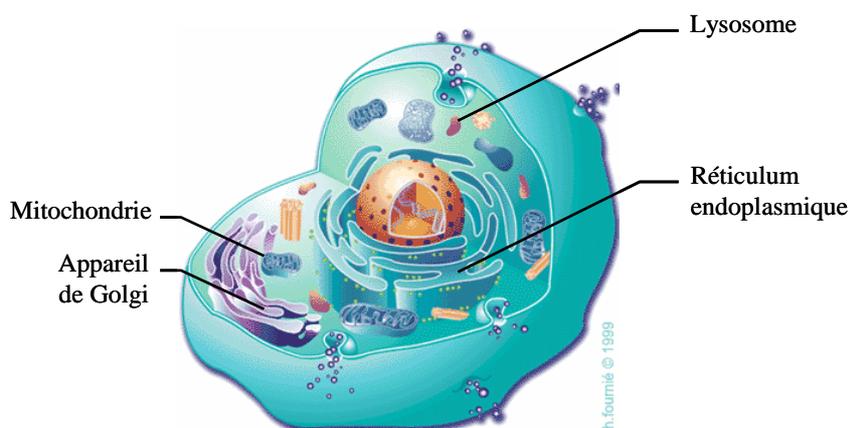


Figure 6 : Vue en coupe d'une cellule animale eucaryote (avec noyau)

Les compartiments intracellulaires sont délimités par des membranes. Ils correspondent notamment aux mitochondries¹⁴ disséminées dans le cytoplasme, au réticulum endoplasmique¹⁵, au système de saccules empilés ou appareil de Golgi¹⁶, ou enfin à des vésicules comme les lysosomes¹⁷. Ces structures sont des sites potentiels de séquestration des métaux toxiques une fois entrés dans la cellule.

Les cellules animales et végétales présentent toutefois quelques différences structurales, celles-ci sont illustrées par la Figure 7.

¹⁴ Organite membranaire à peu près de la taille d'une bactérie, qui assure la phosphorylation oxydative et produit la plus grande partie de l'ATP dans les cellules eucaryotes.

¹⁵ Compartiment membranaire labyrinthe dans le cytoplasme des cellules eucaryotes, où les lipides sont synthétisés et où les protéines membranaires sont fabriquées.

¹⁶ Organite membranaire des cellules eucaryotes où les protéines et les lipides fabriqués dans le réticulum endoplasmique sont modifiés et triés.

¹⁷ Organite membranaire dans les cellules eucaryotes contenant des enzymes digestives, qui sont habituellement plus actives au pH acide de l'intérieur des lysosomes (pH ~ 5).

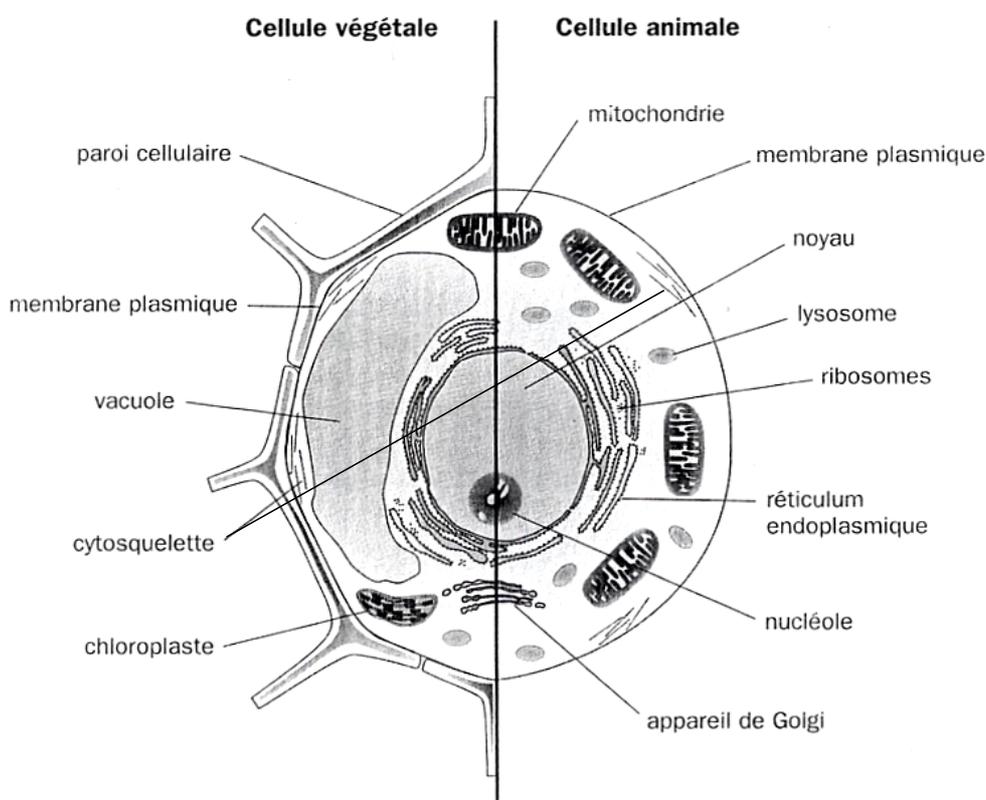


Figure 7 : Schéma d'organisation comparée d'une cellule végétale et d'une cellule animale (Tracqui et Demongeot, 2003)

Les cellules végétales se distinguent par leur paroi cellulosique rigide ainsi que par la présence de chloroplastes¹⁸ et d'une vacuole¹⁹ qui occupe la majeure partie du volume cellulaire.

L'organisation cellulaire ainsi définie permet d'aborder les différentes voies d'entrée des éléments dans les cellules.

3.2. Voies d'entrée des RN dans la cellule

En l'absence de protéines, toute molécule liposoluble diffuse à travers une double couche lipidique (membrane cellulaire) dans le sens de son gradient de concentration : c'est le transport passif. Cependant les membranes cellulaires sont agrémentées de protéines surfaciques permettant la régulation des entrées et sorties de molécules, comme l'illustre la Figure 8.

¹⁸ Les chloroplastes sont des organites spécialisés des algues vertes et des plantes qui contiennent de la chlorophylle et accomplissent la photosynthèse.

¹⁹ Les vacuoles ont un rôle dans le transport et le stockage des métabolites ainsi que dans celui des sous-produits du métabolisme.

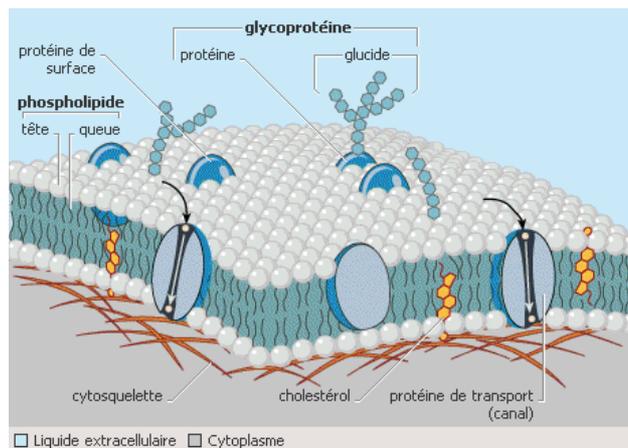


Figure 8 : Vue en coupe de la paroi d'une cellule

Les différents modes de transport à travers les membranes cellulaires sont représentés sur la Figure 9.

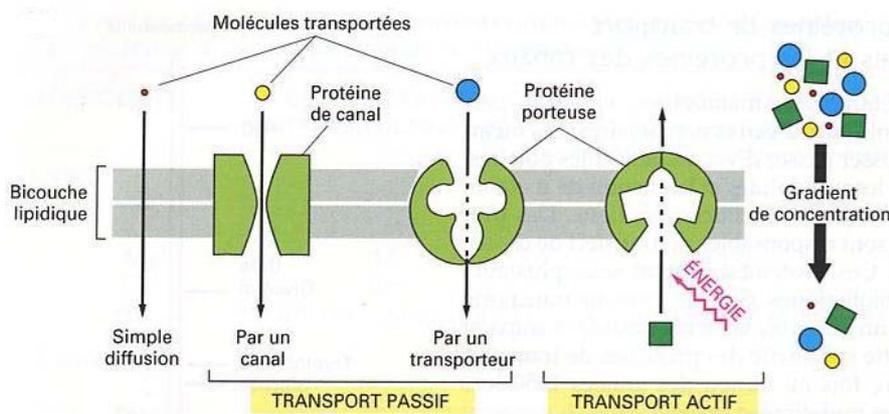


Figure 9 : Comparaison entre transport actif et transport passif
(Alberts *et al.*, 2002)

Les deux principales voies d'entrée des molécules dans une cellule sont :

- les **protéines porteuses**, possédant des segments mobiles capables de faire traverser la membrane à des molécules spécifiques,
- les **canaux ioniques** (ou protéines de canal), qui forment un pore hydrophile étroit permettant le mouvement passif de petits ions inorganiques.

Ces deux modes de transport sont dits passifs, ils ne nécessitent pas de couplage avec une source d'énergie. Par contre, lorsqu'il est nécessaire de s'opposer au gradient de concentration, un autre mécanisme existe : le transport actif, couplé à une source d'énergie (Figure 9).

3.2.1. Les protéines porteuses

Les protéines porteuses (également appelées porteurs perméases ou transporteurs) se lient au soluté spécifique qui doit être transporté et subissent un changement de conformation pour faire passer le soluté d'un côté à l'autre de la membrane. Parmi les différentes classes de protéines porteuses, nous pouvons citer les sidérophores, spécifiques du fer (mais qui présentent une très bonne affinité pour Pu(IV)).

3.2.2. Le transport actif

Les cellules ont également besoin de protéines de transport qui entraînent activement certains solutés à traverser la membrane à l'encontre du gradient électrochimique grâce au couplage du transport avec une source d'énergie : c'est le transport actif. Il ne se fait jamais par l'intermédiaire des canaux protéiques (dont le transport est toujours passif) mais par l'intermédiaire de certaines protéines de transport. Ce mécanisme permet d'établir des différences importantes entre la composition du cytoplasme et celle du milieu extracellulaire ou celle de l'intérieur des organites cellulaires.

La création de différences de concentrations ioniques à travers la double couche lipidique permet aux membranes cellulaires de stocker de l'énergie potentielle sous forme de gradient électrochimique. Le Tableau 7 présente un exemple de la composition ionique des milieux intra et extracellulaire.

Tableau 7 : Comparaison des concentrations ioniques entre l'intérieur et l'extérieur d'une cellule (mammifère) (Alberts *et al.*, 2002)

	Composant	Concentration intracellulaire (mmol.L ⁻¹)	Concentration extracellulaire (mmol.L ⁻¹)
Cations	Na ⁺	5 - 15	145
	K ⁺	140	5
	Mg ²⁺ ⁽²⁰⁾	0,5	1 - 2
	Ca ²⁺ ⁽²⁰⁾	10 ⁻⁴	1 - 2
	H ⁺	10 ^{-7,2} mol.L ⁻¹ (pH 7,2)	10 ^{-7,4} mol.L ⁻¹ (pH 7,4)
Anions ²¹	Cl ⁻	5 - 15	110

C'est par ce mécanisme que des substrats particuliers comme des acides aminés, des oses, des ions inorganiques, des peptides et même des protéines traversent sélectivement les membranes de la

²⁰ Les concentrations en Mg²⁺ et en Ca²⁺ données correspondent aux ions libres. Au total, il y a environ 20 mmol.L⁻¹ de Mg²⁺ et 1 à 2 mmol.L⁻¹ de Ca²⁺ dans les cellules mais ils sont surtout associés aux protéines entre autres et, pour le Ca²⁺, mis en réserve dans divers organites.

²¹ Les cellules doivent respecter l'électroneutralité. C'est pourquoi, en plus des ions Cl⁻, les cellules contiennent beaucoup d'autres anions, non cités dans ce tableau. En fait, la plupart des constituants cellulaires sont chargés négativement (HCO₃⁻, PO₄³⁻, les protéines, les acides nucléiques, etc.).

cellule ou de ses organites internes. Les transporteurs mis en jeu sont des ATPases (dont la pompe ubiquitaire $\text{Na}^+\text{-K}^+$ est un exemple important) qui appartiennent à la plus grande et diverse famille de protéines porteuses connue : la superfamille des transporteurs ABC. Ces ATPases possèdent une grande sous-unité catalytique qui est alternativement phosphorylée et déphosphorylée durant le cycle de pompage.

3.2.3. Les canaux ioniques

Les canaux ioniques, au contraire, n'ont pas besoin de fixer le soluté. Ils forment des pores qui traversent la double couche lipidique. Lorsque ces pores sont ouverts, ils permettent à des solutés spécifiques (habituellement des ions inorganiques de taille et de charge appropriées) de les traverser et ainsi de traverser la membrane. Le transport à travers des canaux protéiques est plus rapide que le transport induit par des protéines porteuses. C'est par ce processus, moins sélectif que le précédent, que les RN sont susceptibles de pénétrer dans la cellule, en particulier *via* les canaux spécifiques du calcium.

Remarque : il existe une différence de potentiel électrique (gradient de tension) de part et d'autre de toutes les membranes plasmiques : l'intérieur étant négatif par rapport à l'extérieur. Par conséquent, ce potentiel facilite l'entrée des cations dans les cellules mais s'oppose à celle des anions.

De nombreux canaux ioniques de la membrane plasmique de la cellule connectent le cytoplasme au milieu extérieur de la cellule, ce qui nécessite des pores hautement sélectifs et étroits. Sur le plan de l'efficacité du transport, les canaux ont, par rapport aux porteurs, l'avantage que plus d'un million d'ions peuvent traverser un tel canal chaque seconde, une vitesse plus que mille fois supérieure à celle du transport par l'intermédiaire de n'importe quelle protéine porteuse connue. Par ailleurs, les canaux ioniques ne pouvant être couplés à une source d'énergie, le transport dont ils sont les intermédiaires est toujours passif, permettant à des ions inorganiques spécifiques (principalement Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ou Cl^-) de diffuser dans le sens de leur gradient électrochimique à travers la double couche lipidique (le plus souvent vers l'intérieur de la cellule où les concentrations en ions sont maintenues très basses). Cela ne signifie toutefois pas que le transport par les canaux ne peut pas être contrôlé.

En effet, deux propriétés importantes distinguent les canaux ioniques de pores aqueux simples :

- ils présentent une sélectivité ionique, ce qui suggère que leurs pores sont assez étroits pour permettre aux ions d'avoir des contacts serrés avec la barrière du canal. Seuls les ions ayant une taille et une charge appropriées pourront passer. On pense que ces ions doivent se séparer de la plupart des molécules d'eau qui leur sont associées, pour passer en formant une file unique à travers la partie la plus étroite du canal, limitant ainsi leur flux.

- Ils ne sont pas continuellement ouverts : ce sont plutôt des "portes" qui s'ouvrent brièvement puis se referment. L'ouverture peut être provoquée par plusieurs types de *stimuli* : une modification de la transmission à travers la membrane, une stimulation mécanique, la fixation d'un ligand ou encore la phosphorylation et la déphosphorylation d'une protéine.

3.3. Les mécanismes connus d'entrée des RN

Il a souvent été observé *in vitro* que, faute de spécificité absolue, les transporteurs transfèrent aussi des éléments toxiques dont les propriétés physico-chimiques sont voisines de celles des substrats naturels. Ainsi, l'ATPase Na^+/K^+ et certains canaux K^+ facilitent l'entrée de Rb et de Cs dans les cellules. De même, Sr peut être facilement accumulé par l'ATPase- Ca^{2+} dans les compartiments de confinement subcellulaire. Par ailleurs, certains co-transporteurs sont responsables de la capture de métaux divalents (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , etc.) y compris Cd^{2+} (non essentiel).

Des stratégies d'inactivation²² et des méthodes d'imagerie cellulaire ou fonctionnelle *in vivo* sont actuellement combinées pour identifier les transporteurs et élucider les mécanismes responsables du déclenchement des réactions toxiques *in vivo* lors de contaminations. Enfin, il ne faut pas sous-estimer l'éventualité de séquestration des toxiques, physiologiques ou non, dans chaque compartiment par tout un ensemble de protéines solubles.

3.3.1. Un exemple concret : les similitudes $\text{Ln}^{3+}/\text{Ca}^{2+}$

Le fait que les ions Ln^{3+} puissent remplacer les ions Ca^{2+} dans des processus biochimiques, a été confirmé par de nombreux auteurs. Cependant, c'est à R. J. P. Williams que l'on doit les bases théoriques les plus probantes attestant que les similitudes entre le calcium et les lanthanides ne se limitent pas à leur rayon ionique mais qu'ils ont des modes de coordination très voisins comme le montre le Tableau 8 (Williams, 1979).

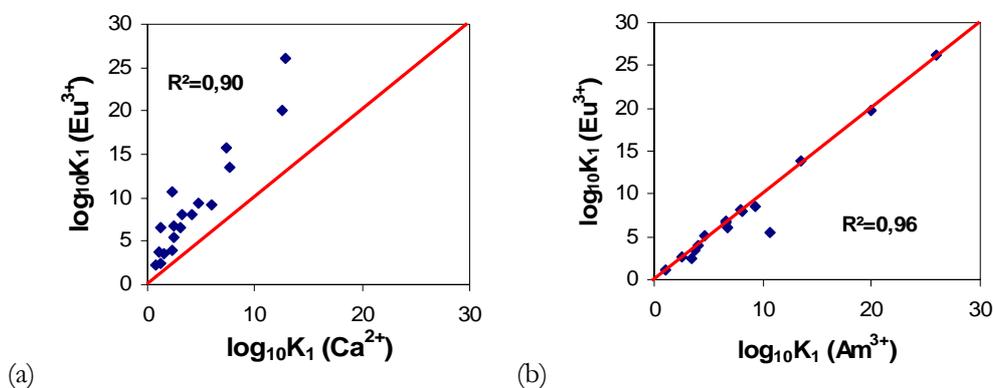
De par leurs tailles, leurs géométries de coordination et leurs affinités pour certains atomes, ces ions sont très similaires. Ce sont ces propriétés qui permettent aux ions Ln^{3+} de remplacer les ions Ca^{2+} de façon si spécifique. La nature a en effet conçu les sites de liaison de Ca^{2+} de façon à en exclure ses ions compétiteurs, en particulier les ions Mg^{2+} .

²² Modification d'un gène de sorte à produire une protéine non fonctionnelle

Tableau 8 : Comparaison de quelques propriétés des ions Ca^{2+} et Ln^{3+} (Williams, 1979)

Propriété	Ca^{2+}	Ln^{3+}
Nombre de coordination	6 - 12	6 - 12
Géométrie de coordination	Très flexible	Très flexible
Atome donneur	O>>N>>S	O>>N>>S
Rayon ionique (Å)	Entre 1,00 et 1,18 (CN 6 – 9)	Entre 0,86 et 1,22 (CN 6 – 9)
Type de liaison	Ionique	Ionique
Nombre d'hydratation	6	8 ou 9
Champ cristallin	Aucun	Négligeable

Ces similitudes peuvent en particulier être illustrées par la comparaison des constantes de formation mesurées avec divers ligands, avec Eu^{3+} d'une part et Ca^{2+} d'autre part. La Figure 10 compare les valeurs des constantes de formation de divers complexes de stoechiométrie (1:1) avec des ligands ayant un intérêt biologique selon la représentation utilisée par Ansoborlo (parmi lesquels : les ions carbonate, citrate, l'acétate, des AA et des complexants comme le DTPA ou l'EDTA, etc.) (Ansoborlo *et al.*, 2006). Les données thermodynamiques utilisées sont issues des bases de la NEA (Guillaumont *et al.*, 2003), de la Chemical Thermodynamic Data Base Nagra/PSI (Hummel *et al.*, 2002) et de l'IUPAC (Powell, 2004).


 Figure 10 : Représentation des analogies $\text{Eu}^{3+}/\text{Ca}^{2+}$ (a) et $\text{Eu}^{3+}/\text{Am}^{3+}$ (b)

La bissectrice rouge représente l'analogie « idéale », comme c'est le cas entre Eu et Am Figure 10 (b), comme nous l'avons déjà évoqué précédemment. Les données du Ca Figure 10 (a) montrent toutefois une corrélation convenable avec Eu (le coefficient de corrélation des données n'est pas négligeable, il vaut 0,90).

Du fait de ces similitudes, il est intéressant de préciser le rôle et les voies d'entrée du Ca dans les cellules.

3.3.2. Le calcium en milieu biologique

3.3.2.1. Rôle

Ca joue un rôle de messager intracellulaire ubiquitaire. Les ions Ca^{2+} peuvent traverser la membrane (et ainsi transmettre l'information) à la suite de deux phénomènes :

- l'apparition d'un potentiel d'action (dans les cellules nerveuses) dépolarise la membrane plasmique ce qui provoque un influx de Ca^{2+} dans la cellule par les canaux Ca^{2+} ,

- le second phénomène, ubiquitaire celui-là, nécessite la liaison d'une molécule informative extracellulaire aux récepteurs membranaires. Comme les événements qui se produisent à la surface cellulaire sont couplés à l'ouverture des canaux Ca^{2+} du réticulum endoplasmique, il y a alors libération de Ca^{2+} .

Les RN, dont les propriétés chimiques sont les plus proches de celles du Ca, peuvent donc bénéficier des nombreuses voies de transport réservées au Ca. Ce sera en particulier le cas des Ln qui servent de sonde fluorescente aux biologistes pour localiser et décrire les sites protéiques de chélation du Ca.

3.3.2.2. Régulation

La concentration en Ca libre cytosolique²³ est extrêmement faible ($< 10^{-7}$ M), alors qu'elle est élevée dans le liquide extracellulaire ($\sim 10^{-3}$ M) et dans le réticulum endoplasmique. Il existe donc un fort gradient qui tend à faire pénétrer Ca^{2+} dans le cytosol à travers la membrane plasmique et la membrane du réticulum endoplasmique. Lorsqu'un signal ouvre de façon transitoire les canaux Ca^{2+} de l'une de ces membranes, les ions Ca^{2+} affluent dans le cytosol, augmentant très fortement la concentration locale de Ca^{2+} ce qui active les protéines intracellulaires sensibles au Ca^{2+} .

Afin que ce mécanisme de transmission opère, il faut que la concentration cytosolique de Ca^{2+} dans les cellules reste faible, ceci est réalisé de plusieurs façons (Figure 11).

²³ Le cytosol est la partie la moins dense du cytoplasme, en pratique, il désigne la partie "liquide", sans les organites cellulaires, du cytoplasme.

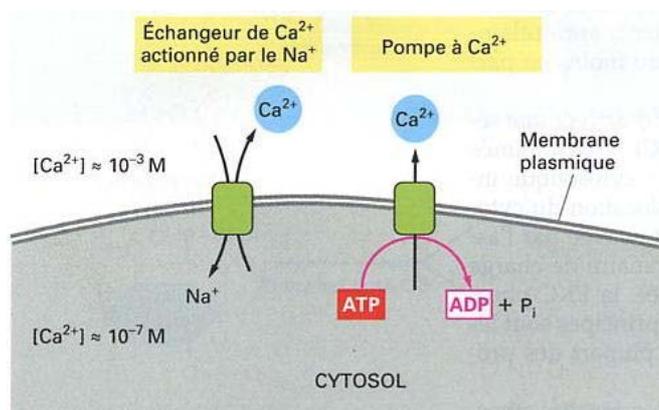


Figure 11 : Les voies de pompage du Ca^{2+} cytosolique vers l'extérieur
(Alberts *et al.*, 2002)

- Toutes les cellules eucaryotes possèdent une Ca^{2+} -ATPase dans leur membrane plasmique qui utilise l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP pour pomper les ions Ca^{2+} hors de la cellule.
- Des cellules telles que les cellules musculaires et nerveuses, qui utilisent de façon intensive le signal calcique, possèdent une pompe calcique supplémentaire dans leur membrane plasmique couplant le flux sortant de Ca^{2+} au flux entrant de Na^+ .
- Une pompe Ca^{2+} située dans la membrane du réticulum endoplasmique joue aussi un rôle important dans le maintien d'une concentration calcique faible dans le cytosol : cette Ca^{2+} -ATPase permet au réticulum endoplasmique de capter de grosses quantités de Ca^{2+} du cytosol contre un gradient de concentration élevée, même lorsque le niveau de Ca^{2+} dans le cytosol est bas.

Normalement la concentration de Ca^{2+} libre dans le cytosol varie entre 10^{-7} M (au repos) à environ $5 \cdot 10^{-6}$ M, lorsque la cellule est activée par une molécule informative. Cependant si une cellule est endommagée et qu'elle ne peut pas pomper efficacement le Ca^{2+} hors du cytosol (Figure 11), la concentration en Ca^{2+} peut dépasser des niveaux dangereusement élevés ($> 10^{-5}$ M). Dans ces circonstances, une pompe Ca^{2+} à faible affinité et forte capacité, située dans la membrane des mitochondries, capte le Ca^{2+} cytosolique en excédent.

Les différents mécanismes décrits précédemment illustrent les voies d'entrée possibles des RN dans le cytosol des cellules. Ces ions métalliques lourds vont rencontrer divers types de molécules, aux capacités complexantes très variables, principalement conçues pour lutter contre l'intrusion de métaux lourds non essentiels. L'ensemble des molécules envisagées dans cette partie bibliographique est présenté dans la prochaine partie.

4. Molécules biologiques impliquées dans la prise en charge des métaux lourds

Les cellules ne contiennent globalement que quatre familles de petites molécules organiques :

- Les glucides simples (ou monosaccharides, de formule $(CH_2O)_n$ ($n = 3 \text{ à } 7$)) qui constituent le carburant des cellules végétales, sont impliqués dans la photosynthèse donc la production de l'énergie dont la cellule a besoin.
- Les acides gras ou phospholipides, qui sont les composants des membranes cellulaires.
- Les protéines, qui sont constituées d'acides aminés. Ce sont les propriétés des chaînes latérales des acides aminés qui déterminent les propriétés donc la fonction de la protéine qu'ils constituent.
- Les nucléotides, composés d'un glucide à 5 carbones (le ribose ou le désoxyribose) et d'une base azotée. Ils forment les molécules d'ADN et d'ARN. Les nucléotides peuvent agir comme des transporteurs d'énergie stockée chimiquement sous forme d'ATP.

Parmi ces différentes classes de molécules, nous allons nous intéresser principalement à celles qui sont susceptibles d'interagir avec les RN.

Il est connu que les métaux lourds interagissent particulièrement avec les fonctions thiol et histidyl des enzymes ou des protéines membranaires, ce qui le plus souvent les rend inactives, cause des dégâts cellulaires pour enfin conduire à la mort cellulaire (Vallee et Ulmer, 1972). Toutefois, les études sur les plantes capables de se développer sur des sols pollués ont montré que la tolérance aux métaux lourds était liée soit à leur capacité à faiblement intégrer les métaux lourds, soit au développement de mécanismes permettant de séquestrer ces métaux lourds au sein des différents compartiments cellulaires.

Les mécanismes de détoxification développés par les plantes exposées aux métaux lourds sont (Tomsett et Thurman, 1988) :

- lier ces ions métalliques aux parois cellulaires,
- diminuer leur transport à travers les membranes,
- les stocker sous forme précipitée dans la vacuole²⁴,

²⁴ La vacuole est un compartiment des cellules végétales qui peut représenter jusqu'à 80-90% du volume cellulaire total. C'est un lieu de stockage des ions (Wink, 1993).

- synthétiser des composés capables de se lier sélectivement aux métaux lourds (peptides, protéines, acides organiques, composés phénoliques, etc.).

Le stockage des métaux lourds à l'intérieur de la vacuole par exemple suppose une translocation de ces ions à travers le cytoplasme, sous forme chélatée. Les molécules impliquées sont les phytochélatines (PC) dont la synthèse est une réponse fréquente des cellules végétales à l'exposition aux métaux lourds. Pour les cellules animales, des molécules au rôle équivalent existent, ce sont les métallothionéines (MT).

Nous nous sommes donc intéressés aux principaux constituants de la barrière cytoplasmique : les phospholipides. Une fois cette barrière traversée, le RN va interagir préférentiellement avec les peptides spécifiques des métaux lourds. L'étude des métallothionéines et des phytochélatines sera donc abordée.

4.1. Les phospholipides

Les acides gras, dont la dégradation peut produire, pour un même poids, plus du double d'énergie utilisable que n'en produit le glucose, constituent une source alimentaire précieuse. Ils sont stockés dans le cytoplasme de nombreuses cellules sous la forme de gouttelettes de molécules de triglycérides (formés de trois chaînes d'acides gras chacune liée à une molécule de glycérol). La fonction la plus importante des acides gras est la construction de membranes cellulaires. Ces minces feuillets imperméables, qui limitent chaque cellule et entourent leurs organites internes, sont composés en grande partie de phospholipides (PL). Chaque molécule de PL possède deux régions distinctes : une queue hydrophobe (composée de deux longues chaînes hydrocarbonées peu réactives chimiquement), et un groupement polaire très hydrophile (un groupement acide carboxylique ionisé en solution) où est situé le phosphate.

La Figure 12 représente une molécule de PL et rappelle la structure d'une membrane cellulaire.

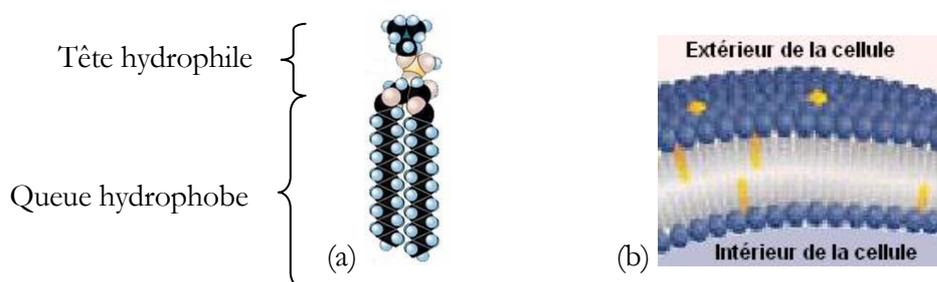


Figure 12 : Les phospholipides : (a) Molécule de phospholipide (b) Membrane cellulaire

Toutes les membranes biologiques ont une structure globale commune : ce sont des assemblages de molécules protéiques et lipidiques maintenues ensemble, principalement par des interactions non covalentes. C'est la nature amphiphile des molécules lipidiques qui provoque la formation spontanée de doubles couches en solution aqueuse (soit des micelles sphériques, soit des

bicouches). La plupart des PL et des glycolipides forment spontanément des doubles couches en milieu aqueux : la formation des membranes biologiques est donc un phénomène d'auto-assemblage comme l'illustre la Figure 13.

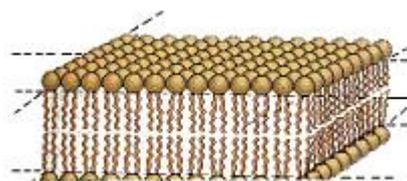


Figure 13 : Auto-organisation des PL en milieu aqueux

Ces doubles couches continues, qui mesurent environ 5 nm d'épaisseur, sont des barrières relativement imperméables au passage des molécules hydrosolubles. Les trois principaux types de lipides dans les membranes cellulaires sont : les PL (les plus abondants), le cholestérol et les glycolipides.

Cette propriété d'auto-organisation, mise à profit dans les cellules, constitue pour nos études un inconvénient majeur. Ces problèmes de solubilité ne nous permettront pas d'étudier les PL de façon optimale. Nous avons donc orienté notre choix vers les protéines.

Cependant, l'étude des protéines transmembranaires, qui sont une des voies possibles de l'acheminement des RN de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule, n'est pas envisageable non plus du fait de leur fort caractère hydrophobe. Les biochimistes qui étudient les membranes utilisent donc des détergents (SDS : sodium dodécyl sulfate (ionique) ou encore Triton X (neutre)) lors de leurs études, il se forme donc en solution des associations « détergent-protéine ». La protéine perd alors parfois sa structure tridimensionnelle, en particulier celle des sites de coordination des ions métalliques, altérant ainsi la capacité complexante de l'édifice.

Ces problèmes de solubilité et de dénaturation des molécules nous ont donc orientés vers des protéines du cytoplasme : les métallothionéines et les phytochélatines, que nous décrivons après quelques généralités sur les protéines.

4.2. Les protéines séquestrices de métaux lourds

4.2.1. Les protéines

Les protéines sont constituées d'acides aminés (AA), qui contiennent tous un groupement acide carboxylique et un groupement amine, tous deux portés par le même atome de carbone (appelé carbone α). Chaque AA est donc caractérisé par la nature de son groupement R qui peut varier (Figure 14).

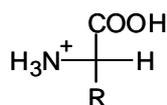


Figure 14 : Structure générale des acides aminés (forme cationique)

Les AA sont des sous-unités dans la synthèse des protéines, longs polymères linéaires d'acides aminés rattachés les uns aux autres par une liaison peptidique entre le groupement carboxylate d'un AA et la fonction amine du suivant. Bien qu'il y ait de nombreux AA possibles, seuls vingt sont retrouvés dans les protéines, chacun possédant une chaîne latérale différente liée au carbone α . Ce sont les propriétés des chaînes latérales dans leur ensemble qui déterminent les propriétés de la protéine.

4.2.2. Les métallothionéines

Le rôle des métallothionéines (MT) chez les animaux a été bien étudié : elles interviennent dans des processus biologiques comme la détoxification ou l'homéostasie²⁵ de certains métaux. Chez les plantes, leur rôle reste incertain, cependant des rôles identiques à ceux des MT animales ont été suggérés.

Les MT sont des protéines de faible poids moléculaire (~ 6 kDa) riches en cystéine (~ 20 résidus cystéine sur 60, Figure 15). Elles sont capables de séquestrer certains ions métalliques, le plus souvent : Zn, Cu et Cd en les coordonnant *via* les nombreux résidus cystéine organisés selon deux enchainements répétitifs : CysXCys ou CysXXCys (Hamer, 1986; Robinson *et al.*, 1993).

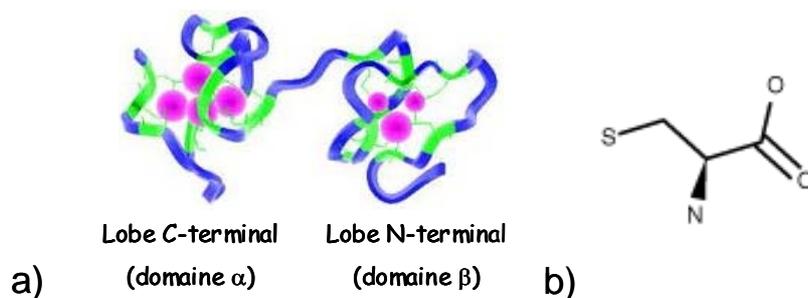


Figure 15 : Molécules de métallothionéine (a) et de cystéine (b)

La Figure 15 (a) représente une molécule de métallothionéine animale. Les deux domaines de la protéine (fragments α et β) sont capables de lier respectivement 4 et 3 atomes de cations divalents (sphères roses). Les 20 cystéines, dont la structure est présentée Figure 15 (b), de la protéine sont impliquées dans la coordination des atomes de métaux lourds.

²⁵ Faculté de maintenir ou de rétablir certaines constantes physiologiques (concentration du sang, pression artérielle, etc.) ou concentrations en métaux essentiels, quelles que soient les variations du milieu extérieur.

Des informations structurales obtenues par diffraction des rayons X et en RMN indiquent que seuls les atomes de soufre des cystéines entrent dans le schéma de coordination tétraédrique des sept cations métalliques incorporés (mais on observe au maximum deux liaisons avec un M^{n+} par cystéine) (Viarengo *et al.*, 2000).

Chez les mammifères, les MT sont divisées en quatre classes, en fonction de leur ordre d'éluion en chromatographie d'échange d'anions (Viarengo *et al.*, 2000) :

- les MT de classes 1 et 2 qui sont omniprésentes dans les cellules,
- les MT de classe 3 spécifiques du cerveau,
- enfin les MT de classe 4 spécifiques de l'épithélium dermique (peau, langue, etc.).

Les analyses par immunofluorescence confirment que les MT sont distribuées principalement dans le cytoplasme cellulaire, elles ne peuvent donc pas protéger le noyau par exemple.

Les métallothionéines sont également présentes dans les plantes, cependant, elles ont été peu étudiées dans les années 90 car la chélation métallique intracellulaire était alors attribuée aux phytochélatines exclusivement.

4.2.3. Les phytochélatines

Chez les plantes, les phytochélatines (PC) ont un rôle reconnu en matière de détoxication et d'homéostasie des métaux lourds, cependant, les complexes formés restent peu connus. Comme avec le glutathion (GSH), la complexation se fait souvent par les groupements thiols (Salt et Rauser, 1995; Zenk, 1996). Toutefois, peu d'études concernant les stœchiométries et les constantes thermodynamiques et cinétiques des complexes formés parmi les nombreux oligomères de PC et les métaux lourds ont été publiées. Ces données sont pourtant capitales du fait des applications potentielles des PC en matière de traitement de la pollution par les métaux lourds notamment.

Les PC sont des polypeptides atypiques dont la synthèse n'est pas d'origine génétique mais enzymatique. Leur structure primaire consiste en la répétition d'une séquence dipeptidique : γ -glutamyl-cystéinyl à laquelle s'ajoute un motif glycine carboxy-terminal.

La structure des PC (Figure 16) peut donc s'écrire de la façon suivante : $(\gamma\text{Glu} - \text{Cys})_n - \text{Gly}$, noté PC_n , où n peut varier entre 2 et 11, bien que les formes les plus répandues soient celles comprises entre PC_2 et PC_5 (Zenk, 1996) :

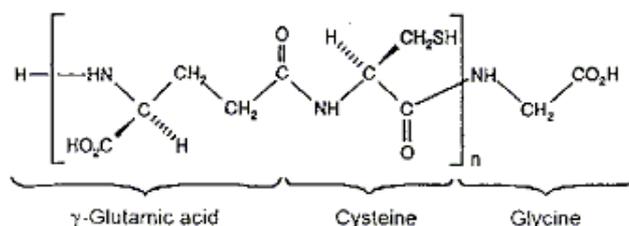


Figure 16 : Structure des phytochélatines

Les PC sont une sous-classe des MT.

La synthèse des PC (illustrée par la Figure 17) consiste en une transpeptidation du motif dipeptidique qui provient d'un tripeptide : le glutathion (de formule : $\gamma\text{Glu-Cys-Gly}$). La réaction de formation de la première PC : PC_2 , se fait par interaction d'une molécule de GSH sur une autre molécule de GSH. Pour former des édifices plus grands, l'interaction du GSH peut se faire sur une molécule plus longue (PC_n) afin de former l'oligomère PC_{n+1} . Cette réaction est catalysée par une enzyme : la phytochélatine synthase ou PCS, constitutive des cellules végétales, exclusivement en présence de certains métaux lourds.

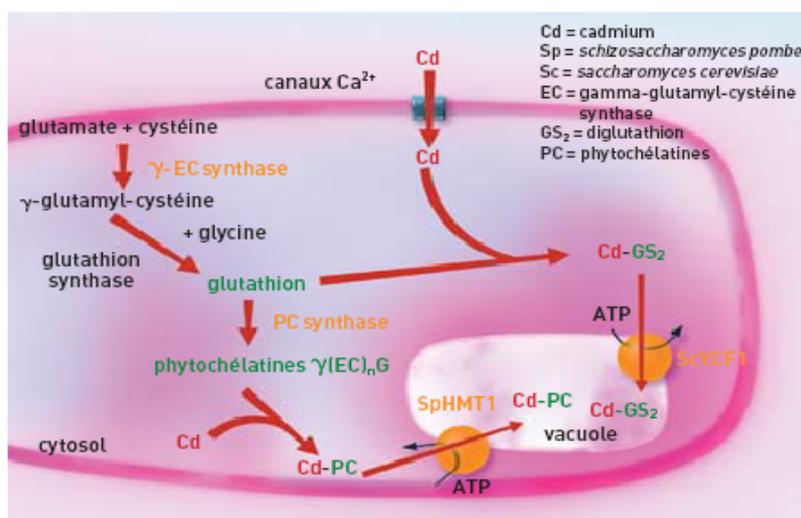


Figure 17 : Synthèse des phytochélatines (induite par le cadmium)
(Clefs Cea N°48, 2003) d'après (Cobbett et Goldsbrough, 2002)

Il a été montré récemment que le métal ne se liait pas directement à la PCS pour induire la formation des PC (Vatamaniuk *et al.*, 2000). En effet, il s'agit d'un co-substrat « GSH-M^{n+} » (ou « $\text{PC}_n\text{-M}^{n+}$ » dans le cas d'un allongement de la chaîne de la PC) qui interagit sur la partie catalytique de la PCS.

La synthèse des PC est induite par de nombreux métaux lourds, essentiels ou non ainsi que par plusieurs espèces anioniques : Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Sb^{3+} , Ag^+ , Ni^{2+} , Hg^{2+} , AsO_4^{5-} ou encore SeO_3^{2-} (Cobbett et Goldsbrough, 2002).

De nombreuses équipes travaillent à l'élucidation du mécanisme de formation des PC lors de l'interaction de la PCS avec les métaux lourds (Beck *et al.*, 2003; Clemens *et al.*, 1999; Cobbett, 2000; Grill *et al.*, 1989; Maier *et al.*, 2003; Rea *et al.*, 2004; Vatamaniuk *et al.*, 2004; Vatamaniuk *et al.*, 1999; Vatamaniuk *et al.*, 2000). L'équipe de Rea a identifié trois résidus dont la substitution annihile totalement l'activité du gène AtPCS1 : un résidu cystéine (Cys-56), un résidu histidine (His-162) et un résidu acide aspartique (Asp-180)(Rea *et al.*, 2004)(AtPCS1 est le gène responsable de la synthèse de la PCS chez *Arabidopsis Thaliana* (Vatamaniuk *et al.*, 1999)).

Pour mieux comprendre le mécanisme de synthèse des PC, la connaissance de la structure tridimensionnelle de la PCS ou de ses plus proches homologues est nécessaire. Jusqu'à présent, aucune information structurale n'est disponible pour la PCS. Cependant, l'équipe de Pignol a récemment proposé la structure cristalline d'une enzyme issue d'une cyanobactérie (*Nostoc*) : NsPCS, qui contient uniquement le domaine catalytique de la PCS des cellules eucaryotes²⁶ (Vivares *et al.*, 2005). La structure de NsPCS montre que cette enzyme fait partie de la superfamille de la papaïne²⁷. Son activité hydrolytique, en particulier l'étape de déglycination du GSH, est donc supposée, par analogie avec les enzymes de type papaïne, être due à la présence d'une triade catalytique constituée de 3 AA (Cys-70, His-183 et Asp-201).

L'étude de la réactivité des AA constitutifs de ces molécules est donc importante.

4.3. Choix des molécules à étudier

Le Tableau 9 résume les avantages et les inconvénients de chaque système envisagé :

Tableau 9 : Récapitulatif des caractéristiques de chacun des systèmes envisagés

	Phospholipides	Métallothionéines	Phytochélatines
Avantages	Petite structure (750 Da)	Disponibilité commerciale Bonne solubilité aqueuse	Oligopeptides (<2 000 Da) Bonne solubilité aqueuse Synthétisables
Inconvénients	Problème de solubilité (auto-organisation en micelles ou bicouche)	Petites protéines (>6 000 Da) Grande variabilité structurale	Structures variées

Les PL ont la structure la plus petite mais ils se lient *via* leurs nombreux groupes donneurs oxygénés, ils sont donc très peu spécifiques. En pratique, nous serions de plus confrontés à des

²⁶ Se dit des cellules composées d'un noyau vrai, délimité par une membrane nucléaire, de plusieurs chromosomes et d'organites intracytoplasmiques de structure complexe.

²⁷ La papaïne est une enzyme de la papaye et de l'ananas, elle a la propriété de fragmenter les protéines. Les enzymes de la superfamille de la papaïne sont des protéases à base de cystéine.

problèmes de solubilité, du fait de leur auto-arrangement spontané en bicouche. D'autre part, les solutions commerciales disponibles sont composées d'un mélange de différents PL, nous n'observerions donc qu'un comportement moyen.

Les MT ont été largement étudiées par les biologistes et sont également disponibles commercialement. Il ne nous serait pas possible d'étudier divers enchaînements peptidiques non commerciaux car cela impliquerait la synthèse d'une structure de plus de 60 AA, ce que nous ne maîtrisons pas au laboratoire. L'étude des structures impliquées dans la chélation serait probablement trop complexe en raison du grand nombre d'AA.

Finalement, il semble plus judicieux de s'intéresser aux PC, qui présentent les mêmes avantages que les MT tout en étant de taille plus réduite. De plus, nous pouvons disposer d'échantillons de PC par l'intermédiaire de laboratoires avec lesquels nous collaborons.

4.4. Etude des systèmes biologiques

Pour déterminer la spéciation des éléments en milieu biologique, il est nécessaire de connaître la valeur de certains paramètres essentiels comme le pH, le potentiel redox, la force ionique, etc.

4.4.1. Conditions « biologiques » et biochimie des RN

Le but de nos études est d'acquérir des données fondamentales pour l'étude du devenir des RN dans le vivant. En effet, lorsque l'on cherche à établir la spéciation d'un RN dans un milieu donné, des constantes thermodynamiques fiables du RN avec les complexants potentiels du milieu sont nécessaires. Nous nous attacherons donc à déterminer les constantes thermodynamiques conditionnelles, dans un milieu reproduisant, de façon simple, certains paramètres « biologiques », parmi lesquels (Alberts *et al.*, 2002) :

- pH cytoplasmique = 7,2

- force ionique : $I_{\text{cyt}} = 0,1 \text{ M}$

4.4.1.1. Force ionique « biologique »

Nous venons de voir que la force ionique biologique caractéristique est de 0,1M, dans nos études nous travaillerons donc à différentes forces ioniques :

- I faible : force ionique de travail sans ajout de sel de fond : $I_{\text{max}} \sim 10^{-2}\text{M}$ (c'est-à-dire force ionique seulement assurée par la présence des RN, des complexants et des espèces fixant le pH, c'est-à-dire avec au maximum : $[\text{HClO}_4] = 10^{-2}\text{M}$ lors des expériences à pH 2).

- I biologique = 0,1 M caractéristique des fluides intracellulaires. Elle est ajustée par l'ajout d'un sel de fond (NaClO_4) dans les proportions nécessaires. Pour ces valeurs de forces ioniques, l'unité

utilisée n'est d'ailleurs plus la concentration molaire ($M = \text{mol.L}^{-1}$) mais bien l'unité molale ($m = \text{mol.kg}_{\text{solvant}}^{-1}$) car on ne peut plus considérer que l'on se trouve en solution diluée (Annexe 1).

En pratique, pour quelques points des dosages, la force ionique est parfois contrôlée directement par le ligand lorsque celui-ci se trouve en forte concentration afin d'assurer une complexation totale. C'est en particulier le cas lorsque le ligand est fortement déprotoné à pH proche de la neutralité, notamment. Dans ces cas là, la force ionique des solutions peut atteindre $1 \text{ mol.kg}_{\text{solvant}}^{-1}$. Ces points seront une indication pour la détermination des constantes de complexation, mais ils ne seront pas directement pris en compte pour les calculs des constantes.

Ces études à force ionique non nulle seront menées plus particulièrement par SLRT, technique non intrusive et moins sensible que l'ES-SM à la présence de sels (en particulier Na^+).

4.4.1.2. pH

Notre but étant d'établir la spéciation des RN étudiés avec différents complexants biologiques, par conséquent, nous ne travaillerons pas forcément à pH cytoplasmique, mais sur une gamme de pH variant de 2 à 6. Le pH de certains compartiments cellulaires peut être très bas, c'est notamment le cas de la vacuole où le pH vaut entre 2 et 3.

Afin d'éviter toute complexation non spécifique, le pH de nos systèmes est, autant que possible, non tamponné (il est parfois tamponné par le ligand lui-même, présent en grande concentration pour assurer une complexation totale des RN). Le pH est alors ajusté soit par ajout d'acide perchlorique (les ions perchlorate étant les contre-ions non complexants de référence) pour diminuer le pH, soit par ajout d'hydroxyde de sodium ou d'ammoniaque pour les pH basiques (l'hydroxyde de sodium apporte des ions Na^+ , gênants en ES-SM).

Une limitation que nous avons déjà évoquée est la précipitation des RN sous la forme d'espèces hydrolysées. Nous avons donc regroupé l'ensemble des données relatives à l'hydrolyse des RN étudiés dans le paragraphe suivant.

4.4.2. Biochimie des RN étudiés

4.4.2.1. Les lanthanides trivalents en milieu biologique

Les premières études sur les Ln ont débuté dans la seconde moitié du XIX^{ème} siècle, à l'époque où l'oxalate de cérium fut largement prescrit comme antiémétique²⁸ chez la femme enceinte (Evans, 1990). L'une des premières études biochimiques des Ln a donc concerné les effets de ce traitement sur les chiens (Baehr et Wessler, 1909). Après la seconde guerre mondiale, les isotopes

²⁸ C'est-à-dire pour prévenir les nausées.

radioactifs des Ln sont devenus disponibles avec une pureté suffisante pour permettre leur utilisation en radiothérapie, du fait de leur capacité à se localiser dans certaines régions des tumeurs. En dépit de résultats prometteurs, la phase d'étude clinique n'a cependant pas été poursuivie. Toutefois, la capacité d'interaction des ions Ln^{3+} avec certains sites de coordination des molécules biologiques venait d'être observée.

Les études de Williams (Williams, 1979), ont frayé un chemin à l'utilisation des Ln en spectroscopie RMN (comme agent de contraste) pour l'étude des sites de liaison des métaux dans les molécules d'intérêt biochimique ainsi que les conformations spatiales de telles molécules en solution (Barry *et al.*, 1971). C'est d'ailleurs en tant que sonde biochimique des sites de chélation métallique que l'étude des ions Ln^{3+} est devenue de première importance.

Quant à l'étude de la toxicologie des Ln, elle est d'autant plus importante que ces derniers représentent une part importante des produits de fission (plusieurs kilogrammes sont produits pour une tonne d'U irradié, dont 2,4 kg de ^{144}Ce qui a une période de 290 jours seulement). L'accident de Tchernobyl a lui aussi relâché des isotopes radioactifs des Ln dans l'atmosphère, ce qui accentue d'autant plus l'intérêt de l'étude de la biochimie des Ln.

Les Ln sont mal absorbés par l'appareil gastro-intestinal, ils sont néanmoins lentement absorbés par les poumons. Suite à l'absorption, ils tendent à se concentrer dans le foie et le squelette. Le transport vers l'os est plus important avec les terres rares ayant un nombre atomique plus élevé. Après le dépôt dans le squelette, il peut se passer des années avant que l'élimination ne soit complète (Peltier *et al.*, 1992).

Les fortes constantes de complexation Ln-DTPA garantissent qu'à la suite de l'administration parentérale²⁹, le complexe va être en mesure de traverser le corps sans échanger les ions Ln^{3+} avec d'autres ligands biologiques. Par conséquent, sous cette forme les ions Ln^{3+} ne sont pas toxiques, c'est la raison pour laquelle Gd est utilisé comme agent de contraste en IRM sous forme de Gd-DTPA (cf. § 1.1.2.2.4 de ce chapitre). Réciproquement, le DTPA est utilisé comme décorporant des Ln radioactifs lors des contaminations accidentelles (cf. § 1.2.1 de ce chapitre).

Les liaisons des Ln sont essentiellement ioniques (acides "durs") même si un faible degré de covalence apparaît le long de la série, du La au Lu. En solution, le nombre de coordination des Ln varie de 6 à 12. Dans le cas des molécules biologiques, il est plutôt de 8 ou 9 selon des études menées par diffraction des rayons X avec des protéines. Le site majeur de fixation des Ln(III) dans les protéines est le groupement carboxylate. Les fonctions carboxylate ou les oxygènes des hydroxyles peuvent parfois compléter la coordination, en compagnie d'un nombre variable de molécules d'eau. Par contre l'azote ne peut contribuer en tant qu'atome donneur que dans des configurations multidentées où les atomes d'oxygènes participent majoritairement.

²⁹ Introduction d'une substance dans l'organisme par toute autre voie que la voie digestive (intramusculaire, intraveineuse, sous-cutanée, etc.).

Quelle que soit la voie d'administration des Ln, la distribution parmi les organes cibles change peu : le foie et le squelette séquestrent la majeure partie de l'activité. Cependant, la rétention due au foie est plus labile que celle du squelette, ainsi, à terme, c'est le squelette qui retient quasiment la totalité de la charge en Ln. Cette différence est peut être due à la composition extracellulaire particulière des os où les Ln se déposent. L'excrétion des Ln se fait ensuite *via* les fèces et l'urine. Cette dernière voie étant représentative des complexes solubles alors que l'autre reflète plutôt ce qui est relâché par le foie (*via* la bile et les intestins).

4.4.2.2. L'uranium(VI) en milieu biologique

L'uranium est un élément radioactif naturel dont les isotopes ont des périodes très élevées ($>10^5$ ans). Il est considéré avant tout comme un toxique chimique (métal lourd) plutôt que comme un radiotoxique lorsque son taux d'enrichissement en ^{235}U n'excède pas 5%.

En milieu biologique, U est disponible sous forme d'ion uranyle libre ou complexé. Les données de la publication 69 de la Commission Internationale pour la Protection Radiologique (CIPR) (Ircp, 1995) montrent que les organes cibles sont le squelette et le rein. En effet, les composés solubles de l'uranium sont néphrotoxiques³⁰ (Diamond, 1989). Une fois dans le corps, U passe rapidement du sang aux tissus et il est enfin excrété *via* l'urine (Taylor *et al.*, 2000). Dans le sang, U est lié aux ions bicarbonate (50%), aux protéines du plasma (30%) comme la transferrine ou l'albumine et enfin $\sim 20\%$ sont liés aux globules rouges. Une fois qu'il a quitté le sang, U se dirige vers les organes cibles précédemment cités (Chevari et Likhner, 1968).

Les An non trivalents (en particulier U^{4+} , Th^{4+} , Np^{4+} , Pu^{4+}) sont liés à la transferrine³¹ lorsqu'ils se trouvent dans le sang. Leurs mécanismes de fixation sur le squelette sont encore très mal connus. En ce qui concerne le foie et les autres tissus dits "mous", les An non trivalents peuvent traverser les membranes cellulaires et être déposés dans les organites cellulaires liés à la membrane, comme les lysosomes (Taylor, 1981).

Les recherches sur U en milieu biologique se concentrent sur :

- la mise au point de molécules décorporantes de ce RN, et les études de vectorisation du DTPA, qui sinon se révèle peu efficace vis-à-vis de U (Henge-Napoli *et al.*, 2000) (cf. § 1.2.1 de ce chapitre),
- les phénomènes de bioréduction des espèces solubles de U en composés moins solubles et donc moins mobiles,

³⁰ Se dit d'une substance qui a un effet toxique sur le rein.

³¹ Protéine de transport du fer dans le sang.

- la bioaccumulation et la bioprécipitation des espèces solubles de U, dans le but de dépolluer certains sites contaminés.

C'est ainsi que la réduction de U(VI) soluble en U(IV) insoluble par une espèce procaryote a été proposée comme méthode de biorémédiation des eaux souterraines contaminées par U (Finneran *et al.*, 2002). U peut donc être mis à profit, directement ou non, par les bactéries (*Geobacter metallireducens* ou *Shewanella putrefaciens* par exemple) dans des phénomènes d'oxydation (Lovley *et al.*, 1993a; Lovley *et al.*, 1992; Lovley *et al.*, 1991; Lovley *et al.*, 1993b).

U est en général réduit et précipité à la surface des cellules sous forme d'hydrogénophosphate de U(IV) par des phosphatases acides (PhoN) comme c'est le cas avec *Citrobacter sp. N14* (Macaskie *et al.*, 2000). C'est probablement ce mécanisme qui permet à différentes espèces de biosorber naturellement U (Volesky et Holan, 1995). Une fois sous forme insoluble, U demeure cependant mobilisable, par les bactéries notamment. Ainsi dans la revue de (Tuovinen et Bhatti, 1999), il est fait état de deux bactéries Fe-S (*Thiobacillus ferrooxidans* et *Leptospirillum*) capables d'oxyder en conditions aérobie, la pyrite (FeS_2) en sulfate ferreux (Fe_2O_4) puis en sulfate ferrique ($\text{Fe}_2(\text{O}_4)_3$). Les ions Fe(III) sont alors capables d'oxyder U(IV) en U(VI) soluble.

4.4.2.3. Les actinides trivalents en milieu biologique

Les Ln(III) sont utilisés dans nos études comme analogues des An(III) comme Am(III) ou Cm(III). Seules quelques données sont disponibles dans la littérature sur ces RN. Les données sur le curium sont toutefois beaucoup plus rares que celles de son voisin Am(III).

Am et Cm n'ont pas de rôle biologique spécifique. Am est supposé exister dans le corps sous un seul degré d'oxydation : Am(III). Les organes cibles des An(III) sont principalement le foie (50%) et le squelette (30%), le reste est soit fixé ailleurs, soit éliminé.

Comme pour U, il a été montré par (Macaskie *et al.*, 2000) que les phosphatases acides de la surface de *Citrobacter sp.* étaient capables de précipiter Am sous forme de complexes phosphatés. Les facteurs influençant la biosorption et la bioaccumulation de Am par les bactéries ont été étudiés (Francis *et al.*, 1998) de même que par les champignons (Liu *et al.*, 2002).

4.4.3. Données disponibles

Afin d'évaluer l'ordre de grandeur des constantes de complexation entre les RN et les AA : un état de l'art a été réalisé. Les constantes thermodynamiques de formation de complexes (1:1) entre les RN et des AA ont été répertoriées. Ces données ne sont probablement pas exhaustives. Les données obtenues pour une force ionique voisine de 0,1 M ont été privilégiées si disponibles, sinon, les données à force ionique plus élevée sont consignées. Les données ont été classées en fonction des RN.

Les études de complexation des Ln(III) par les acides aminés sont assez récentes, puisqu'elles datent de la fin des années 1980. L'idée est d'exploiter les propriétés physiques exceptionnelles des Ln(III) (luminescence, magnétisme), et de les introduire en milieu biologique avec des ligands déjà adaptés à l'environnement et pouvant servir au ciblage des sites d'intérêt. Si les métaux de transition ou les alcalins sont très présents dans le corps humain, les Ln(III) en sont totalement absents. Comme Ca présente un rayon ionique similaire à celui des Ln(III), le jeu a été de substituer le Ca des protéines à calcium par les Ln(III), et d'étudier les complexes formés.

Pour illustrer les Ln(III), Eu a de nouveau été choisi (Tableau 10). Peu de données sont disponibles, c'est pourquoi les valeurs obtenues avec Ca ont également été consignées (Tableau 11).

La formation d'espèces mononucléaires de stoechiométrie (1:1) est le mode de complexation le plus répandu entre les Ln et les AA (Kremer *et al.*, 2005). Les espèces formées sont du type : $[Ln(H_nL)]^{3+}$ ou $[Ln(H_{n-1}L)]^{2+}$ en conditions acides. Les données les plus fiables suggèrent que l'AA se coordonne de façon privilégiée sous forme zwitterionique. Les données suggérant la formation d'espèces de plus haute stoechiométrie sont rares (Kremer *et al.*, 2005). Les cas répertoriés concernent les AA qui possèdent une autre fonction carboxylate disponible sur leur chaîne latérale, comme l'acide aspartique ou l'acide glutamique. Les études conduites avec des Ln éloignés dans la classification périodique montrent une augmentation des constantes de formation des espèces, ce qui illustre la contraction lanthanidique au sein de la série (Jones et Williams, 1970; Jones et Williams, 1971).

Tableau 10 : Récapitulatif des $\log_{10}K_1$ des ions Eu^{3+} avec les molécules d'intérêt

Ligand / R (RCH(NH ₃ ⁺)COOH)	Conditions expérimentales			$\log_{10}K_1$	Source
	Technique	T(°C)	I (M) sel		
Glycine / H	distribution de phases	25	2,0 NaClO ₄	0,7	(Tanner et Choppin, 1968)
	électrode de verre	25	0,2 KNO ₃	6,4	(Limaye et Saxena, 1990)
Alanine / CH ₃	spectrophotométrie	25	1,0 R ₄ N.X	6,1	(Seguin <i>et al.</i> , 1978)
	électrode de verre	25	0,2 KNO ₃	6,6	(Limaye et Saxena, 1990)
	distribution de phases	25	2,0 ???	0,7	(Aziz et Lyle, 1971)
	électrode de verre	25	0,1 KNO ₃	4,7	(El'khilyali <i>et al.</i> , 1967)
Cystéine/CH ₂ SH	électrode de verre	20	Extrap. 0M, NaClO ₄	7,5	(Sharma et De, 1980)
Glutathion (GSH)	RMN	24	0,3 ???	1,1 ou 2,0 ³²	(Ren <i>et al.</i> , 1994) en Chinois

La dispersion des constantes déterminées pour l'équilibre Eu-Alanine est importante et ne peut être expliquée par les écarts entre les forces ioniques de travail. Il existe probablement un doute

³² $\log_{10}K_1=1,1$ correspond à une coordination par le COO⁻ du résidu acide glutamique et $\log_{10}K_1=2,0$ à une coordination par le COO⁻ du résidu glycine.

sur l'identification des espèces formées, en particulier l'état de protonation du ligand. Ceci est en particulier vrai pour les études menées par « distribution de phases » du fait de la difficulté pour les interpréter (divers solvants sont utilisés). Toutefois, dans le cas de Eu, les données issues de deux études distinctes sont en très bon accord.

Les données issues des études avec Ca par électrode de verre sont plus homogènes bien qu'issues de nombreuses études (Tableau 11). Les constantes semblent plus basses que celles obtenues avec Eu, ce qui reflète le plus faible rapport « charge/rayon ionique » de Ca^{2+} par rapport à Eu^{3+} .

Tableau 11 : Récapitulatif des $\log_{10}K_1$ des ions Ca^{2+} avec les molécules d'intérêt

Ligand / R ($\text{RCH}(\text{NH}_3^+)\text{COOH}$)	Conditions expérimentales			$\log_{10}K_1$	Source
	Technique	T(°C)	I (M) sel		
Glycine / H	électrode de verre	25	0,1 NaNO_3	5,1	(Khalil et Attia, 2000)
	électrode de verre	25	0,1 NaNO_3	4,6	(Ghandour <i>et al.</i> , 1989)
	électrode de verre	35	0,1 KNO_3	3,6	(Reddy et Reddy, 1985)
Alanine / CH_3	électrode de verre	37	0,15 NaCl	2,1	(Zhao <i>et al.</i> , 1995)
Cystéine/ CH_2SH	électrode de verre	37	0,15 NaCl	3,0	(Zucconi <i>et al.</i> , 1979)
	électrode de verre	25	0,1 NaClO_4	1,9	(Ramamoorthy et Santappa, 1970)
Serine / CH_2OH	électrode de verre	25	0,1 KNO_3	3,6	(Rey <i>et al.</i> , 1990)
Acide glutamique (CH_2) $_2\text{COOH}$	électrode de verre	25	0,1 NaNO_3	3,0	(Khalil et Attia, 2000)
	électrode de verre	37	0,15 NaClO_4	1,5	(Blaquiere et Berthon, 1987)
	électrode de verre	25	0,1 KNO_3	2,6	(Gowda et Venkatappa, 1981)
Glutathion (GSH)	électrode de verre	37	0,15 NaClO_4	3,8	(Touche et Williams, 1976)

Dans le cas des An(III), quelques données sont disponibles avec Am(III) (Tableau 12).

Tableau 12 : Récapitulatif des $\log_{10}K_1$ des ions Am^{3+} (et Cm^{3+}) avec les molécules d'intérêt

Ligand / R ($\text{RCH}(\text{NH}_3^+)\text{COOH}$)	Conditions expérimentales			$\log_{10}K_1$	Source
	Technique	T(°C)	I (M) sel		
Glycine / H	échange d'ions	25	1,0 KCl	4,1	(Rogozina <i>et al.</i> , 1974)
	distribution de phases	25	0,2 NaClO_4	0,7	(Tanner et Choppin, 1968)
	<i>distribution de phases</i>	25	0,2 NaClO_4	0,8(Cm^{3+})	(Tanner et Choppin, 1968)
Alanine / CH_3	échange d'ions	25	1,0 KCl	3,9	(Rogozina <i>et al.</i> , 1974)
Cystéine/ CH_2SH	échange d'ions	25	1,0 KCl	4,3	(Rogozina <i>et al.</i> , 1974)
Acide glutamique (CH_2) $_2\text{COOH}$	échange d'ions	25	1,0 KCl	5,6	(Rogozina <i>et al.</i> , 1974)

Les valeurs sont du même ordre de grandeur que celles répertoriées pour Eu. Les données issues des études par extraction sont très inférieures aux autres. Il est également nécessaire de souligner

que l'homogénéité des valeurs entre les AA peut être due au fait que les données consignées ne sont issues que de deux études. Pour Cm(III), seule une valeur a été trouvée, elle figure en italique.

Les données U(VI)-AA sont plus nombreuses. Elles sont répertoriées Tableau 13.

Tableau 13 : Récapitulatif des $\log_{10}K_1$ des ions U(VI) avec les molécules d'intérêt

Ligand / R (RCH(NH ₃ ⁺)COOH)	Conditions expérimentales			$\log_{10}K_1$	Source
	Technique	T(°C)	I (M) sel		
Glycine / H	électrode de verre	25	1,0 NaClO ₄	9,4	(Lagrange <i>et al.</i> , 1994)
	électrode de verre	31	0,1 NaClO ₄	7,5	(Selvaraj et Santappa, 1977)
	polarographie	30	0,5 KCl	1,6	(Chaudhari <i>et al.</i> , 1982)
	force électromotrice	25	0,5 ???	7,2	(Sergeev et Korshunov, 1973)
	spectrophotométrie	25	0,5 ???	7,3	(Sergeev et Korshunov, 1973)
	électrode de verre	25	1,0 NaClO ₄	1,2	(Bismondo <i>et al.</i> , 1983)
	électrode de verre	30	0,1 KCl	7,5	(Cefola <i>et al.</i> , 1962)
Alanine / CH ₃	voltamétrie	30	0,1 NaClO ₄	2,2	(Ramanujam <i>et al.</i> , 1979)
	voltamétrie	30	0,5 KCl	1,6	(Chaudhari <i>et al.</i> , 1982)
	électrode de verre	25	0,2 KNO ₃	7,8	(Singh et Saxena, 1992)
	force électromotrice	25	0,5 ???	7,0	(Sergeev et Korshunov, 1973)
	spectrophotométrie	25	0,5 ???	7,0	(Sergeev et Korshunov, 1973)
	électrode de verre	30	0,1 NaClO ₄	2,0	(Ramanujam et Rengaraj, 1980)
	électrode de verre	25	0,1 KNO ₃	7,3	(Nourmand et Meissami, 1982)
Cystéine/CH ₂ SH	électrode de verre	25	0,1 KNO ₃	5,8	(Nourmand et Meissami, 1982)
	électrode de verre	35	0,1 KNO ₃	6,5	(Reddy et Venkatadri, 1997)
	électrode de verre	15	0,1 NaNO ₃	13,8	(Iftekhhar et Dubey, 1984)
Serine / CH ₂ OH	électrode de verre	30	0,1 NaClO ₄	9,0	(Raghavan et Santappa, 1973)
	électrode de verre	30	0,1 NaClO ₄	7,6	(Raghavan et Santappa, 1973)
	force électromotrice	25	0,5 ???	5,9	(Sergeev et Korshunov, 1973)
	spectrophotométrie	25	0,5 ???	3,4	(Sergeev et Korshunov, 1973)
	électrode de verre	25	0,1 KNO ₃	8,7	(Nourmand et Meissami, 1982)
	électrode de verre	30	0,1 NaClO ₄	8,7	(Shelke et Jahagirdar, 1978a)
	électrode de verre	25	0,1 KNO ₃	8,4	(Ahmed <i>et al.</i> , 1996)
Acide glutamique (CH ₂) ₂ COOH	électrode de verre	25	0,1 KNO ₃	8,3	(Girdhar <i>et al.</i> , 1976)
	électrode de verre	25	0,1 KNO ₃	2,7	(Feldman et Koval, 1963)
	électrode de verre	25	1,1 NaNO ₃	8,5	(Ahuja et Dwivedi, 1995)
	électrode de verre	25	0,1 NaClO ₄	8,3	(Petit-Ramel et Mosoni, 1982)
	polarographie	25	0,1 NaClO ₄	3,1	(Saxena et Khandelwal, 1980)
	électrode de verre	30	0,1 NaClO ₄	8,4	(Shelke et Jahagirdar, 1978b)
	électrode de verre	25	0,1 KNO ₃	8,3	(Girdhar <i>et al.</i> , 1976)
Glutathion (GSH)	électrode de verre	25	0,1 NaClO ₄	8,3	(Petit-Ramel et Mosoni, 1982)
	électrode de verre	25	0,1 NaClO ₄	2,2	(Bismondo et Rizzo, 1992)

En terme de force ionique, l'ensemble des valeurs est cette fois homogène, de même pour la température. Les données présentées mettent en valeur des différences très importantes. Des hypothèses ont été avancées pour expliquer les valeurs supérieures à 8, notamment une interaction de type « (RNH₂)-uranyle » assez surprenante et qui n'est surtout corroborée par aucune donnée

structurale (Rangaraj et Ramanujam, 1977; Shelke et Jahagirdar, 1978b). L'explication la plus probable reste la viabilité des espèces identifiées, les valeurs les plus importantes sont probablement dues à la prise en compte dans ces données des constantes d'acidité des ligands.

En solution aqueuse, les constantes de complexation thermodynamiques « uranyle-carboxylate » (1:1) les plus fiables sont probablement celles de l'ordre de $\log_{10}K_1 \approx 2-5$, en accord avec les données issues des interactions « uranyle-acétate » ($\log_{10}K_1 \approx 2,12$ (Aas *et al.*, 1999)).

Une étude récente menée avec des petits peptides indique que les interactions entre l'uranyle et les fonctions carboxylate de ces peptides conduisent à la formation d'espèce mixtes, majoritaires, de type « uranyl-carbonato-peptide » en conditions physiologiques (Huang *et al.*, 2005). Des ligands tels que des peptides, ayant une affinité faible pour l'ion uranyle ($\log_{10}K \sim 3$) sont donc susceptibles de rentrer en compétition avec les ions carbonate pour former ces espèces mixtes.

En conditions physiologiques, les groupements donneurs des ligands biologiques susceptibles de déplacer l'équilibre avec le complexe tris-carbonato de l'ion uranyl (dans le sang par exemple) sont les fonctions carboxylate. En effet, ce sont les fonctions carboxylate des résidus terminaux acide aspartique et acide glutamique des protéines qui constituent la majorité des interactions en sphère interne avec l'uranium (cf. les structures référencées au sein de la Protein Data Bank : <http://www.rcsb.org/pdb/> ; mot-clé : « uranium » ou « uranyl »).

5. Conclusion

L'étude bibliographique des trois systèmes biologiques présentés, à savoir les métallothionéines (MT), les phytochélatines (PC) et les phospholipides (PL), nous a permis d'orienter notre choix vers les PC. En effet, ces dernières sont composées de cinq à une vingtaine d'acides aminés (AA), contre une soixantaine pour les MT, et sont de meilleurs chélatants que les PL, difficilement étudiables dans les conditions expérimentales envisagées.

Un état de l'art sur la complexation entre les différents RN envisagés et les molécules biologiques a été réalisé. Le plus souvent, il s'avère que les données sont peu nombreuses (sauf pour U) et dispersées. Les écarts sont trop importants pour que seules les différences de force ionique soient en cause. Il est donc nécessaire de chercher à déterminer expérimentalement ces constantes de complexation. Ceci fera en particulier l'objet du chapitre trois de ce document

La démarche expérimentale mise en œuvre est donc de commencer par étudier des peptides simples : les AA constitutifs des PC notamment par des études menées en Spectrofluorimétrie Laser Résolue en Temps (SLRT) et ElectroSpray Spectrométrie de Masse (ES-SM), pour mieux comprendre les mécanismes de complexation mis en jeu. Le système ainsi mieux cerné, l'étude est étendue à des systèmes plus complexes (polypeptides, PC et MT) avec les divers radionucléides envisagés, jusqu'à la réalisation d'expériences de contaminations cellulaires.

Chapitre 2

METHODES ANALYTIQUES : PRINCIPES ET OUTILS SPECTROMETRIQUES

Les deux techniques majeures que nous avons utilisées sont : d'une part la Spectrofluorimétrie Laser à Résolution Temporelle (SLRT) dont le principe est fondé sur la fluorescence des cations étudiés ainsi que sur la modification de leurs propriétés de fluorescence lorsque leur environnement proche est modifié, et d'autre part l'ElectroSpray-Spectrométrie de Masse (ES-SM) dont le mode d'ionisation doux permet la conservation des interactions entre les espèces en solution.

La SLRT et l'ES-SM sont des techniques suffisamment sensibles pour permettre l'utilisation de concentration de même ordre de grandeur en cation métallique et en ligand, y compris à l'état de traces.

Ces deux techniques permettent d'acquérir de façons différentes les constantes de stabilité des espèces étudiées, ceci dans le but de confirmer les résultats obtenus.

Lorsque l'étude des complexes à forte concentration est possible, la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ainsi que les études par Spectroscopie d'Absorption des rayons X (SAX) ont été utilisées comme techniques de référence pour obtenir des informations sur la géométrie des édifices formés et éventuellement confirmer les résultats obtenus par les deux techniques précédemment citées. Des informations complémentaires peuvent également être obtenues par l'intermédiaire de techniques plus conventionnelles comme la spectroscopie infrarouge (ATR-IR) en réflexion totale atténuée et la spectrophotométrie UV-Visible (UV-Vis).

Le principe de ces différentes techniques est développé de façon plus ou moins détaillée dans ce chapitre.

1. La spectrofluorimétrie laser résolue en temps (SLRT)

La SLRT est une technique très utilisée pour étudier les lanthanides (Ln) et actinides (An) fluorescents. Elle permet notamment d'étudier, sans perturber les équilibres chimiques, les phénomènes de complexation.

1.1. Présentation de la technique

1.1.1. Principe de la fluorescence

La luminescence est l'émission d'une radiation en réponse à une absorption d'énergie induite par une excitation. Il existe de nombreux types de luminescences qui se distinguent par la nature de

l'excitation et de l'émission. La fluorescence est une forme de luminescence définie par : «l'émission de radiation électromagnétique sous l'exposition d'une radiation de même type ayant soit la même énergie (résonance) soit une énergie plus grande». La phosphorescence est une fluorescence retardée se produisant après un transfert d'énergie vers un état de spin plus élevé (état triplet pour les molécules organiques).

1.1.1.1. Les niveaux d'énergie de la molécule

L'état électronique d'une molécule dépend de l'arrangement des électrons autour des noyaux, *i.e.* des valeurs de chacun des quatre nombres quantiques représentant le mouvement de chaque électron. Or, l'énergie totale d'une molécule est la somme des énergies électronique, vibrationnelle et rotationnelle. Les niveaux électroniques sont donc eux-mêmes subdivisés en niveaux vibroniques (terme qui provient de la contraction des termes vibrationnel et électronique). L'état correspondant à la plus faible énergie est appelé état fondamental, les autres étant des états excités.

Selon le principe de Pauli, le moment cinétique de spin correspondant à l'état fondamental est nul et, par conséquent, la multiplicité de ce niveau est $2S+1 = 1$, on parle d'état singulet (S_0). Lorsqu'un atome absorbe de l'énergie, ses électrons peuplent initialement l'état fondamental (S_0) sont envoyés vers des états excités, seules les transitions entre mêmes états de spin étant permises. A l'état excité, la transition d'un électron peut cependant être accompagnée d'un changement de son moment cinétique de spin. La multiplicité du niveau est alors $2S+1 = 3$, on parle cette fois d'état triplet (T_1). L'énergie d'un état triplet T_1 est légèrement inférieure à celle de l'état singulet S_1 .

Un schéma de Jablonski simplifié (cas d'une molécule organique) est présenté Figure 18. Nous verrons plus loin que cette représentation n'est pas correcte pour les L_n et les A_n , néanmoins, elle permet de décrire correctement les phénomènes photophysiques ayant lieu.

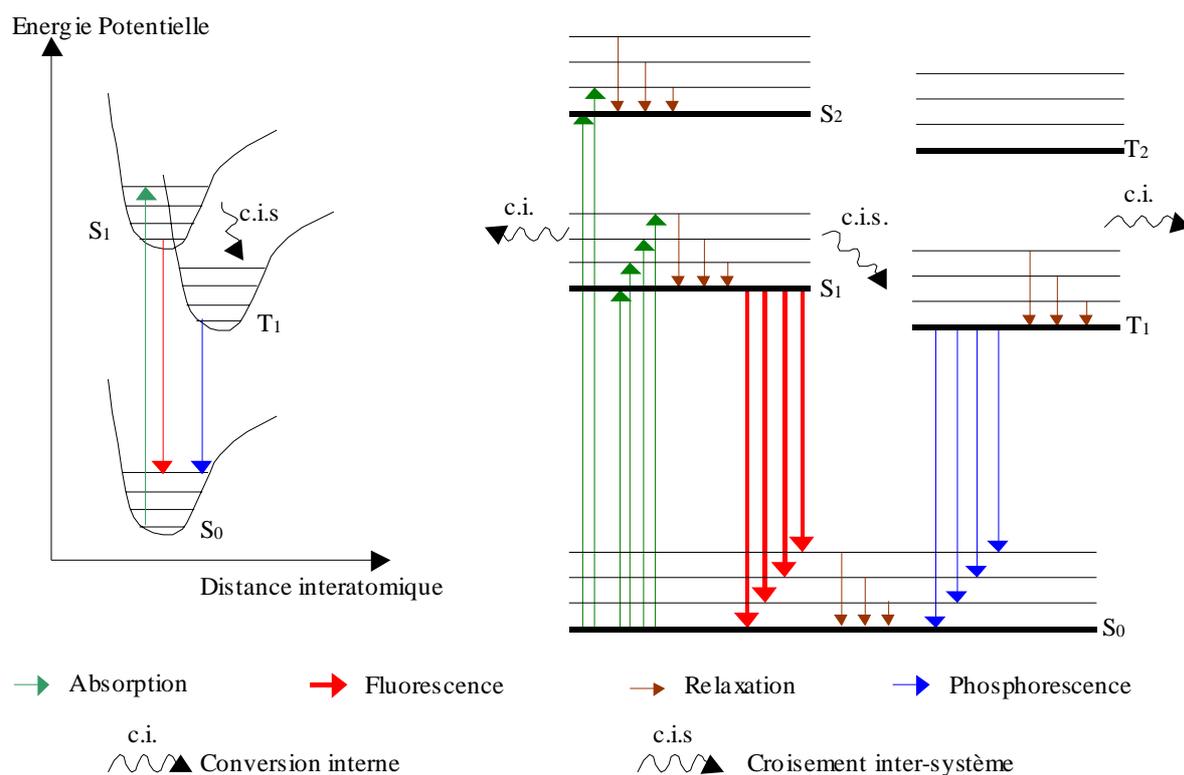


Figure 18 : Niveaux d'énergies de la molécule et transitions électroniques observées lors des phénomènes de fluorescence et de phosphorescence

1.1.1.2. Les relaxations non radiatives

Les processus de retour à l'état fondamental, ou relaxation, les plus rapides sont non radiatifs, il s'agit, d'une part, de la relaxation vibrationnelle (10^{-12} s - 10^{-14} s) et, d'autre part, de la conversion interne (10^{-12} s). Au cours du premier processus, la molécule retourne à l'état vibronique de plus basse énergie dans l'état électronique correspondant en dissipant son énergie vibrationnelle par des échanges avec les molécules de solvant. Lors du second processus, la molécule retourne à l'état électronique fondamental dans un niveau vibronique hautement excité, sans modification notable de l'énergie, le plus bas niveau vibrationnel est ensuite atteint suivant le premier processus.

A l'état fondamental, l'atome est dans un état de spin singulet (S_0) ; lorsqu'il absorbe de l'énergie, les transitions permises de ses électrons sont celles aboutissant à des états excités de même nombre quantique de spin, soit d'autres états singulets (S_i). L'inversion du spin d'un électron implique son transfert vers des états triplets (T_i). La conversion d'énergie entraînant le passage d'un état singulet à un état triplet, ou croisement inter-système, est plus lente que celle conservant l'état de spin initial. Ce processus non radiatif est suivi de la relaxation vibrationnelle de l'électron vers l'état vibronique le plus bas de l'état triplet dans lequel il se trouve.

1.1.1.3. Les relaxations radiatives

La fluorescence et la phosphorescence sont des processus de relaxation radiatifs qui ont lieu lors de la transition des électrons depuis le niveau vibronique le plus bas de l'état électronique excité dans lequel ils se trouvent vers les différents niveaux vibroniques de l'état fondamental. Les états électroniques donnant lieu à ces processus sont appelés niveaux radiatifs ou émetteurs, il s'agit souvent de l'état excité de plus basse énergie. Les niveaux émetteurs doivent être suffisamment éloignés en énergie des niveaux inférieurs pour limiter les phénomènes de désexcitation non radiative.

La fluorescence correspond à des transitions entre états de même spin, son échelle de temps se situe entre 10^{-12} s et 10^{-6} s. La phosphorescence est plus lente (10^{-6} s à quelques secondes) car elle implique un changement de spin. Dans le cas des Ln ou des An, l'émission de radiation s'accompagne d'un changement de spin, comme dans le cas de la phosphorescence, toutefois, les temps de vie sont inférieurs aux temps caractéristiques de la phosphorescence. Il conviendrait certainement mieux d'utiliser le terme de luminescence pour les éléments f, néanmoins, historiquement, c'est le terme de fluorescence qui avait été retenu pour définir l'émission radiative de ces éléments, nous conserverons donc ici le terme original de fluorescence, communément employé.

Remarques :

(i) Une molécule excitée peut parfois transmettre de l'énergie à une molécule acceptrice qui émet de la fluorescence, il s'agit du processus de transfert d'énergie.

(ii) Une inhibition partielle ou totale de la fluorescence peut avoir lieu à cause d'interactions entre l'espèce fluorescente et d'autres ions ou molécules, ce phénomène se produit souvent à travers des mouvements vibrationnels. Lorsque l'interaction molécule/inhibiteur s'effectue avec l'espèce fluorescente à l'état fondamental on parle d'inhibition statique, si l'espèce fluorescente est dans un état excité on parle d'inhibition dynamique.

1.1.2. La fluorescence

1.1.2.1. Spectres de fluorescence

Parmi les longueurs d'onde qu'il est possible d'utiliser pour exciter une molécule, toutes ne permettent pas de donner lieu à des phénomènes de fluorescence. En effet, il faut non seulement que l'énergie lumineuse incidente soit absorbée par la molécule mais aussi qu'elle permette aux électrons d'atteindre un niveau émetteur. Si on note ΔE la différence d'énergie entre un état excité et le niveau fondamental de la molécule, la lumière incidente ne sera absorbée que si elle vérifie la relation $\Delta E = h\nu$ (avec h constante de Planck).

1.1.2.2. Temps de vie

Soit un système idéal ne donnant lieu qu'à un unique processus de relaxation par fluorescence. En notant N le nombre de molécules à l'état excité et en supposant que l'évolution de cette grandeur N suit une loi de vitesse du premier ordre, le taux de désexcitation des molécules s'écrit :

$$\frac{dN}{dt} = -k_F \cdot N \quad \text{Équation 6}$$

Le temps de vie naturel de l'état excité τ_0 est défini comme l'inverse de la constante de vitesse radiative $\tau_0 = \frac{1}{k_F}$, il est caractéristique de la molécule.

Cependant, en supposant toujours que les processus de relaxation suivent des lois de vitesse du premier ordre, il est nécessaire pour un système réel de tenir compte des processus de relaxation autres que la fluorescence. On peut définir une constante de vitesse k somme des constantes de vitesse de fluorescence (k_F), de conversion interne (k_{CI}), de croisement inter-système (k_{CIS}) et d'inhibition (k_I). Le taux de relaxation des molécules s'écrit alors :

$$\frac{dN}{dt} = -(k_F + k_{CI} + k_{CIS} + k_I) \cdot N = -k \cdot N \quad \text{Équation 7}$$

Le temps de vie réel τ d'une espèce est défini par $\tau = \frac{1}{k}$, il dépend fortement de l'environnement dans lequel se trouve la molécule. Le rapport $\frac{\tau}{\tau_0}$ est appelé rendement quantique de fluorescence (noté ϕ).

1.1.3. La résolution temporelle

1.1.3.1. Le déclin de fluorescence

Dans le cas d'une excitation pulsée, on montre que l'évolution en fonction du temps de l'intensité de fluorescence émise par une espèce de temps de vie τ est :

$$F(t) = F_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad \text{Équation 8}$$

La grandeur F_0 est l'intensité de fluorescence à l'origine des temps.

1.1.3.2. Paramètres temporels

Les cations fluorescents d'intérêt dans le nucléaire tels que U ou Eu ont des temps de vie supérieurs à la microseconde. Or, ces cations peuvent parfois se trouver en solution en présence d'ions ou de molécules organiques ou inorganique capables d'émettre elles-mêmes un signal de fluorescence. Si ces espèces parasites sont en excès (électrolyte, solvant, etc.) l'intensité de leur signal masque celui du cation étudié. Or, les molécules organiques ont des temps de vie de fluorescence de l'ordre de la nanoseconde. Ainsi, si l'acquisition du signal de fluorescence ne débute qu'après un temps suffisant pour permettre l'extinction du signal parasite, il sera alors possible de mesurer la fluorescence émise par le cation considéré (Figure 19).

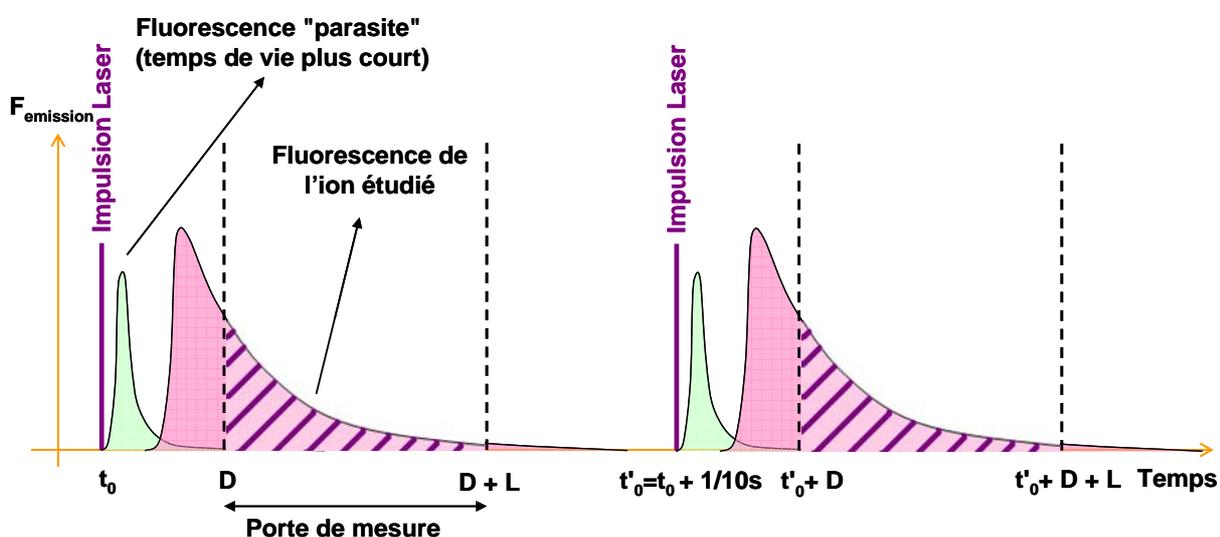


Figure 19 : Principe de la résolution temporelle

Un laser permet d'obtenir une excitation pulsée en envoyant un faisceau de longueur d'onde fixée avec des tirs d'une durée de quelques nanosecondes à une fréquence donnée (10 Hz dans notre cas). Afin de s'affranchir de l'intensité de la lumière excitatrice incidente, la mesure de la fluorescence s'effectue à partir d'un temps origine t_0 déterminé par la fin d'un tir laser. Une porte de mesure caractérisée par un délai D (par rapport à t_0) et une largeur L permet de définir un domaine de temps pendant lequel est intégré le signal de fluorescence (partie hachurée de la Figure 19). Les paramètres D et L sont ajustables afin de discriminer le signal de fluorescence de chacune des espèces présentes en solution.

Si une espèce de temps de vie de fluorescence court $\tau_A = 20\mu s$ est en présence d'une autre espèce de temps de vie $\tau_B = 200\mu s$ plus long, il est alors possible d'attendre l'extinction de la fluorescence de l'espèce à faible temps de vie en choisissant un délai $D \geq 3\tau_A$ avant de commencer à mesurer le signal émis par l'autre espèce (Figure 20). En effet, au-delà de $D \geq 3\tau_A$,

la fluorescence résiduelle de l'espèce à temps de vie court a diminué d'un facteur 20, elle devient négligeable : $F_{t>3\tau_A} < 0,05F_A^0$ et à partir de 7τ , elle est quasiment nulle $F_{t>7\tau_A} < 0,001F_A^0$.

Si les espèces n'ont pas des temps de vie trop proches, la représentation logarithmique du signal de fluorescence, en fonction du temps, permet de faire apparaître deux droites de pentes différentes, proportionnelles au temps de vie des espèces (courbe « carré vert », Figure 20).

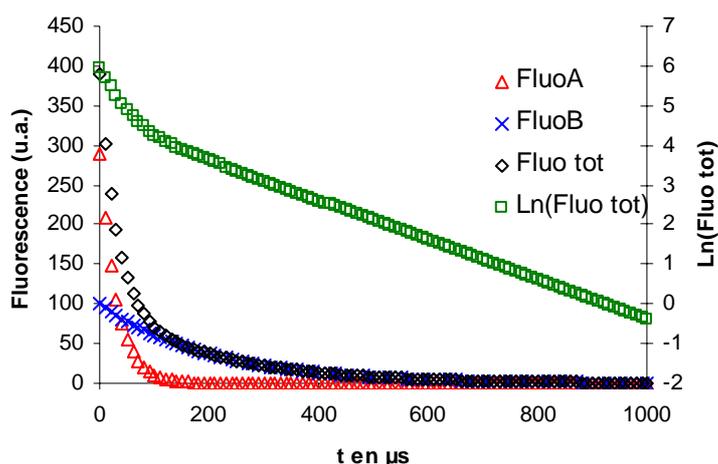


Figure 20 : Discrimination des espèces en fonction de leur temps de vie grâce à la résolution temporelle
Les caractéristiques des espèces A et B sont les suivantes : $F_A^0=300$; $F_B^0=100$; $\tau_A=30\mu s$; $\tau_B=200\mu s$.

1.1.4. Montage expérimental

Le montage réalisé au laboratoire permet à la fois l'acquisition de spectres d'émission de fluorescence et de courbes de déclin de fluorescence (Figure 21).

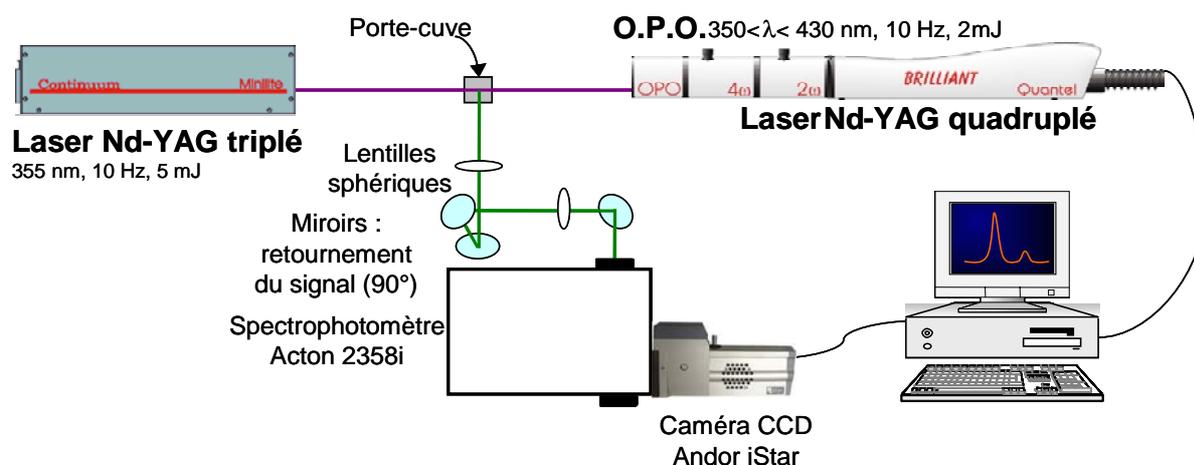


Figure 21 : Montage expérimental réalisé au laboratoire

1.1.4.1. Spectres d'émission de fluorescence

Les longueurs d'onde d'excitation sont obtenues à partir d'un faisceau laser émis par un laser Nd:YAG quadruplé (Brilliant), émettant à 266 nm, couplé à un Oscillateur Paramétrique Optique (OPO, Quantel, France). Ce système permet de délivrer des impulsions de 5 ns à 10 Hz, sur une gamme de longueurs d'onde comprises entre 350 et 430 nm, avec une énergie de l'ordre de 2 mJ. Ce faisceau traverse une cuve en quartz contenant la solution à analyser. L'émission de fluorescence étant anisotrope, sa mesure est effectuée orthogonalement au faisceau laser incident afin de s'affranchir de l'intensité transmise par ce dernier en sortie de cuve. Un système de lentilles et de miroirs focalise le faisceau de fluorescence sur la fente d'entrée d'un spectrophotomètre, muni de différents réseaux permettant de sélectionner la plage de longueur d'onde à observer. Ce signal est enfin résolu en temps et visualisé grâce au détecteur : une caméra CCD qui permet d'ajuster les différents paramètres de mesure : le délai (D en μs), la largeur de porte (L en μs), le temps d'intégration (temps pendant lequel l'intensité de signal est accumulée) et le nombre de spectres (en général 1000) qui seront moyennés pour obtenir le spectre final. Un joule-mètre placé devant le faisceau laser en sortie de cuve permet de mesurer l'énergie laser incidente et l'énergie transmise après passage à travers la cuve contenant la solution.

1.1.4.2. Mesure des temps de vie

Pour mesurer les temps de vie des espèces en solution, l'excitation de la solution luminescente se fait de la même manière que pour l'acquisition des spectres d'émission de fluorescence. Plusieurs spectres de fluorescence sont mesurés en faisant varier la valeur du délai D, il est alors possible, pour chaque longueur d'onde du spectre de fluorescence, de tracer l'évolution de la fluorescence en fonction du temps.

Si une solution contient plusieurs espèces i , la courbe de déclin de fluorescence s'écrit comme la somme des intensités de fluorescence :

$$F_{\lambda}(t) = \sum_i F_{\lambda 0i} \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \quad \text{Équation 9}$$

Un traitement mathématique permet alors de déterminer à partir de l'Équation 9 les intensités de fluorescence à l'origine $F_{\lambda 0i}$ et les temps de vie τ_i de chaque espèce en prenant en compte les paramètres de mesure tels que D et L.

1.2. Propriétés spectroscopiques de l'euporium

1.2.1. Niveaux d'énergie

La configuration électronique de Eu(III) est $[\text{Xe}] 4f^6 5d^0 6s^0$; en réponse à une excitation, le cation Eu^{3+} émet des raies fines de fluorescences provenant de transitions intra-configurationnelles $4f-4f$. L'ion totalement libre a une symétrie sphérique, les niveaux d'énergie sont déterminés en considérant les interactions entre les électrons $4f$. L'hamiltonien correspond à la somme de trois termes, le premier est un hamiltonien monoélectronique tenant compte de l'énergie cinétique et des interactions coulombiennes des électrons avec le noyau, le second terme représente les répulsions interélectroniques entre les électrons $4f$, et enfin, le troisième terme est la contribution du couplage spin-orbite.

L'hamiltonien monoélectronique détermine les niveaux d'énergie des différentes configurations électroniques de Eu(III). Les répulsions interélectroniques divisent ces configurations en termes spectroscopiques $^{2S+1}\Gamma$, avec $\Gamma = S, P, D, F, \text{etc.}$ lorsque le nombre quantique L vaut respectivement 0, 1, 2, 3, etc. La contribution du couplage spin-orbite subdivise encore ces termes en niveaux spectroscopiques $^{2S+1}\Gamma_J$, avec $L - S \leq J \leq L + S$. L'état fondamental est donné par les règles de Hund :

- le terme avec la multiplicité de spin la plus élevée ($2S_{\text{max}} + 1$) a la plus faible énergie,
- si plusieurs termes ont la même multiplicité de spin ($2S_{\text{max}} + 1$), celui qui a la plus forte dégénérescence (L_{max}) a l'énergie la plus faible,
- le niveau le plus bas en énergie est celui correspondant à la plus faible valeur de J, si la sous-couche est moins qu'à moitié remplie, et à la plus forte valeur de J si la sous-couche est plus qu'à moitié pleine.

Le niveau fondamental de Eu(III) est 7F_0 . Un diagramme partiel des niveaux énergétiques de l'ion Eu^{3+} en solution est représenté sur la Figure 22.

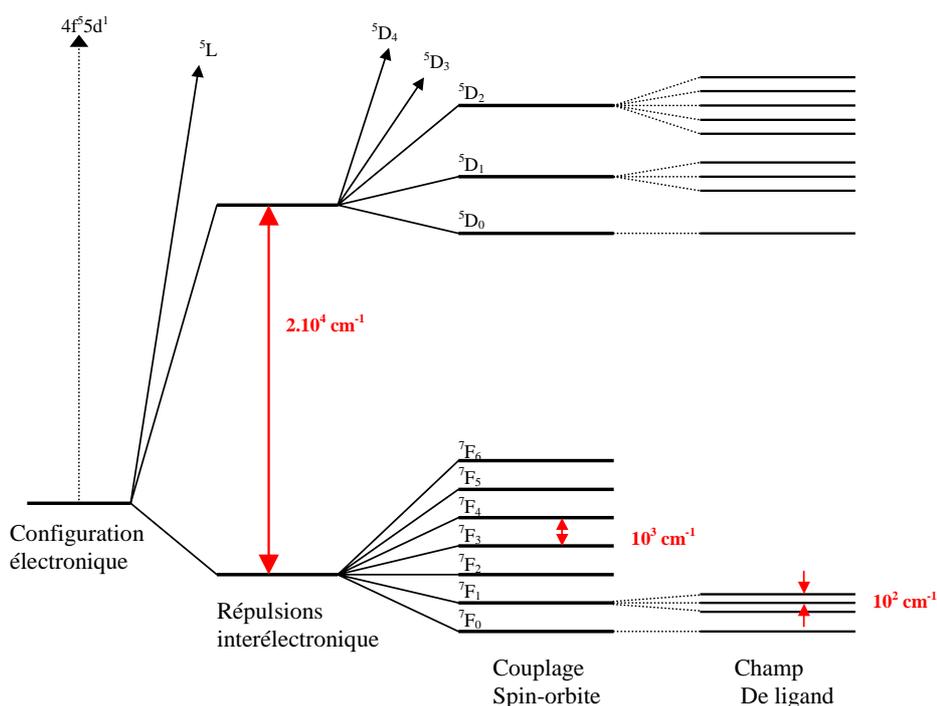


Figure 22 : Diagramme des niveaux d'énergie de Eu(III)

L'ion libre a une symétrie sphérique, lorsqu'il se trouve en solution, il subit un abaissement de symétrie sous l'influence du champ électrique asymétrique, ou champ de ligand, produit par son environnement. Cet effet de champ de ligand induit une levée de dégénérescence des niveaux spectroscopiques, l'étendue de cette levée de dégénérescence dépend de la géométrie dans laquelle se trouve l'ion, chaque niveau $^{2S+1}\Gamma_J$ pouvant être divisé au maximum en $2J + 1$ sous-niveaux.

1.2.2. Transitions fluorescentes

Le principal niveau émetteur de Eu(III) est le niveau 5D_0 , des émissions radiatives à partir du niveau 5D_1 peuvent également être observées mais elles présentent un court temps de vie de fluorescence en raison de rapides désexcitations non radiatives du niveau 5D_1 vers le niveau 5D_0 . Les niveaux d'énergie de l'ion Eu^{3+} en solution aqueuse ainsi que les longueurs d'onde des transitions entre ces mêmes niveaux sont représentés sur la Figure 23.

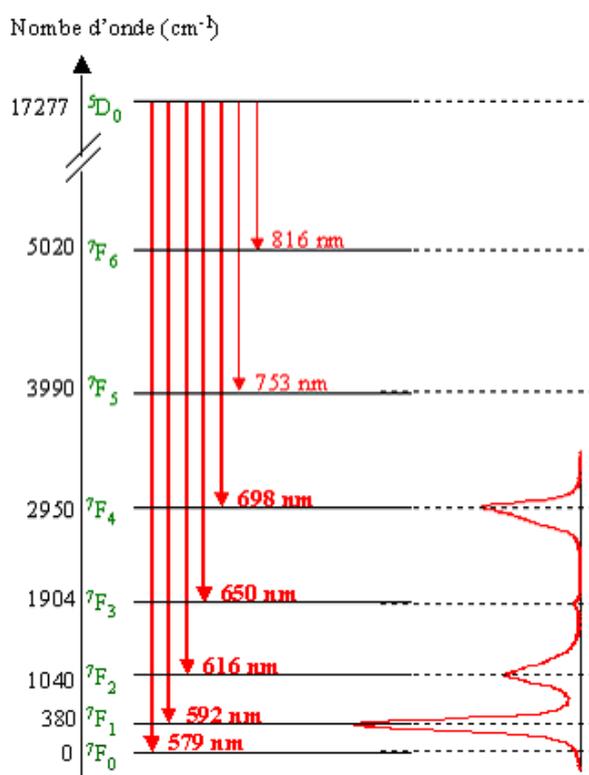


Figure 23 : Niveaux d'énergie de l'ion aquo Eu(III) et transitions associées

Les transitions les plus couramment observées sont représentées en caractères gras. Certaines transitions sont particulièrement sensibles à l'environnement de l'ion, elles sont qualifiées d'hypersensibles. Dans le cas de Eu(III), la transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ autour de 616 nm est une transition hypersensible. La transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_4$ (vers 700 nm) est également sensible à l'environnement de l'ion mais à moindre échelle.

La transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ autour de 580 nm est interdite par les règles de sélection, son intensité est donc extrêmement faible ; cependant, si l'ion se trouve dans une géométrie non centrosymétrique, cette transition peut voir son intensité augmenter. De plus, cette transition a une dégénérescence nulle, elle caractérise donc chaque espèce par un pic unique quelle que soit sa symétrie, de sorte que la détection d'épaulements est directement liée à la présence de plusieurs complexes.

1.2.3. Complexation en sphère interne/ sphère externe

Lors des études de complexation, deux cas peuvent se produire :

Un ligand L peut former un complexe en sphère externe avec un cation (au degré d'oxydation +III sur la figure). Le ligand L se situe alors dans la deuxième couche d'hydratation du métal, Figure 24 (a). La sphère primaire d'hydratation de l'ion n'en est que très faiblement perturbée. Le ligand forme ainsi des liaisons avec les molécules d'eau de la sphère d'hydratation.

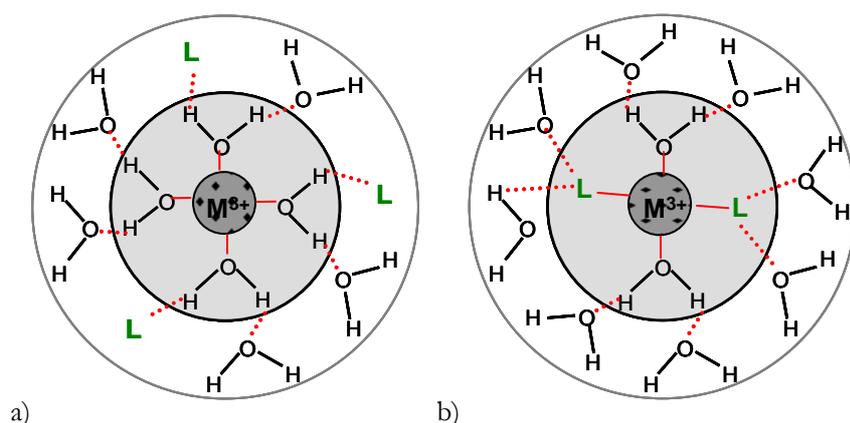


Figure 24 : Complexation en sphère externe (a) ou interne (b)

Dans le cas des réactions de complexation en sphère interne, comme dans le cas des carbonates, le ligand vient se lier directement au cation en remplaçant une ou plusieurs molécules d'eau de la première sphère d'hydratation, Figure 24(b). Le ligand peut former une ou plusieurs liaisons avec l'ion métallique; on emploie alors pour caractériser le mode de complexation les termes monodentate, bidentate, etc.

Dans le cas des Ln(III), Eu(III) notamment, il est possible de connaître le nombre de molécules d'eau en première sphère de coordination (ou sphère interne).

1.2.4. Nombre d'hydratation

La fluorescence de Eu(III) en solution dans H_2O présente une intensité et un temps de vie plus faibles que lorsque le cation est en solution dans D_2O . Le couplage des états excités de Eu(III) avec les oscillateurs O-H des molécules d'eau présentes en première sphère de coordination du cation métallique fournissent un mécanisme efficace pour le transfert d'énergie résultant en la désexcitation non-radiative des états excités du cation. Il apparaît non seulement que chaque oscillateur O-H agit indépendamment mais aussi que le taux de désexcitation suivant ce processus est directement proportionnel au nombre d'oscillateurs liés au cation. De plus, les oscillateurs O-D se montrent nettement moins efficaces que les oscillateurs O-H pour inhiber la fluorescence de Eu(III).

Le diagramme de la Figure 25 montre les niveaux d'énergie de Eu(III) ainsi que les harmoniques vibrationnelles des oscillateurs O-H ($\nu = 3\,700\text{ cm}^{-1}$) et O-D ($\nu = 2\,600\text{ cm}^{-1}$) qui lui sont liés.

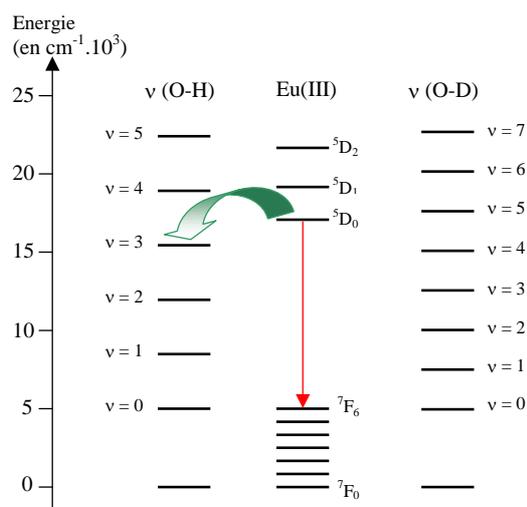


Figure 25 : Diagramme des niveaux d'énergie de Eu(III) et des niveaux d'énergie vibrationnelle de O-H et O-D

La probabilité de désexcitation non radiative est proportionnelle à l'énergie des modes de vibration présents dans l'environnement du cation. L'énergie de vibration d'un oscillateur O-D étant plus faible que celle d'un oscillateur O-H, il en résulte que l'intensité et le temps de vie de fluorescence de Eu(III) sont plus importants dans D₂O que dans H₂O.

Horrocks et Sudnick ont établi, à partir de complexes cristallins de Eu(III) de structure connue contenant n molécules d'H₂O et (9-n) molécules de D₂O en sphère de coordination interne, une relation entre le nombre d'hydratation primaire du centre métallique (N_{H_2O}) et les temps de vie du cation dans H₂O (τ_{H_2O}) et dans D₂O (τ_{D_2O}) (Horrocks et Sudnick, 1979) :

$$N_{H_2O} = 1,05 \left(\frac{1}{\tau_{H_2O}} - \frac{1}{\tau_{D_2O}} \right) \quad \text{Équation 10}$$

τ_{H_2O} et τ_{D_2O} sont exprimés en millisecondes

Par la suite, Kimura et Choppin ont déterminé une équation reliant directement le nombre de molécules N_{H_2O} liées à Eu(III) en sphère interne avec le temps de vie du cation dans l'eau (τ_{H_2O}) (Kimura *et al.*, 1998) :

$$N_{H_2O} = \frac{1,07}{\tau_{H_2O}} - 0,62 \quad \text{Équation 11}$$

τ_{H_2O} exprimé en millisecondes

Le temps de vie de l'euporium libre en solution vaut **(113±5) µs**, il correspond à la présence de **(8,8±0,5)** molécules d'eau en sphère d'hydratation interne du cation.

1.3. Fluorescence de l'uranium

De la même façon que pour Eu, U(VI) présente des propriétés de fluorescence. Les transitions énergétiques concernées et un spectre de fluorescence sont présentés Figure 26 :

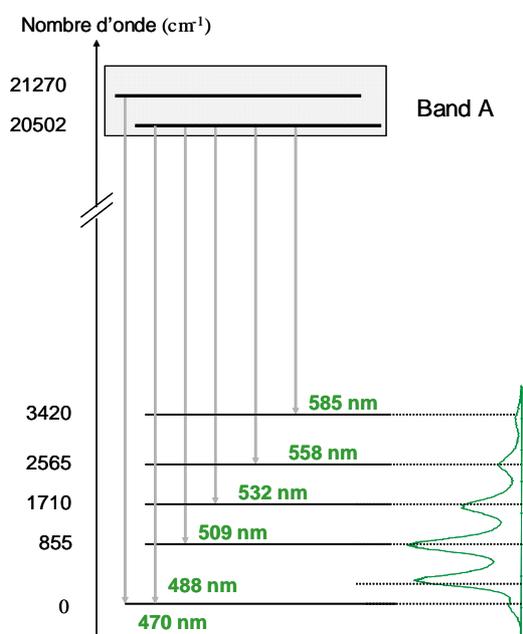


Figure 26 : Emissions de fluorescence de l'uranyle

Le temps de vie de l'uranium est très variable. Il va de quelques microsecondes pour l'ion uranyle libre à plusieurs centaines de microsecondes comme c'est le cas en milieu phosphorique.

L'uranium est très sensible aux phénomènes d'inhibition de la fluorescence, aussi appelés phénomènes de quenching, c'est pourquoi nous rappelons les bases de ces phénomènes en Annexe 2.

1.4. Longueurs d'onde d'excitation

La longueur d'onde d'excitation utilisée pour l'ensemble des études par SLRT sur l'euporium est d'environ 395 nm, qui correspond à une bande d'absorption de Eu^{3+} en solution. La longueur d'onde exacte est ensuite ajustée en fonction de chaque système étudié : l'échantillon contenant l'espèce complexée en plus grande quantité sert à optimiser la valeur exacte de la longueur d'excitation du laser, c'est pourquoi toutes les expériences ne sont pas conduites avec la même valeur de ce paramètre. Dans le cas des études sur l'uranium, la longueur d'onde d'étude se situe vers 405 nm. Un laser Nd-YAG quadruplé émettant à 266 nm a également été utilisé.

2. L'ElectroSpray Spectrométrie de Masse (ES-SM)

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse chimique permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse monoisotopique. De plus, la spectrométrie de masse permet de caractériser la structure chimique des molécules en les fragmentant.

Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

2.1. Les différents composants d'un spectromètre de masse

Initialement conçu par le britannique Joseph John Thomson, le spectromètre de masse comporte une source d'ionisation suivie d'un ou plusieurs analyseurs qui séparent les ions produits selon leur rapport m/z , d'un détecteur qui compte les ions et amplifie le signal, et enfin d'un système informatique pour traiter le signal. Le résultat obtenu est un spectre de masse représentant l'abondance relative des ions détectés en fonction des rapports m/z de ces mêmes ions.

Les études par spectrométrie de masse ont été menées sur des solutions contenant des lanthanides, en particulier ceux disposant d'un motif isotopique « simple », facilement identifiable sur les spectres (l'élément naturel contient peu d'isotopes et des pourcentages de chacun relativement élevés).

Le spectromètre de masse se compose de quatre parties :

- le système d'introduction de l'échantillon : l'échantillon peut être introduit directement dans la source, sous forme liquide ou solide ou encore par l'association à une méthode séparative (chromatographies, électrophorèse capillaire, etc.).
- la source d'ionisation : elle consiste à vaporiser les molécules et à les ioniser. Une source d'ionisation peut être utilisée soit en mode positif pour étudier les ions positifs, soit en mode négatif pour étudier les ions négatifs. Plusieurs type de sources existent et sont utilisées en fonction du résultat recherché et des molécules analysées.
- l'analyseur : il permet de séparer les ions en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Il existe des analyseurs basse résolution comme le quadropôle (Q) ou le piège à ions (« trappe ionique ») 3D (IT) ou linéaire (LIT), et des analyseurs haute-résolution permettant de mesurer la masse exacte des analytes.
- le détecteur : il transforme les impacts des ions en signal électrique. Plus les ions sont nombreux, plus le courant est important. De plus, le détecteur amplifie le signal obtenu pour qu'il puisse être traité informatiquement.

Nous avons utilisé un spectromètre LCQ Advantage MAX ou « trappe ionique » de chez Thermo Electron®, (Waltham, MA, Etats-Unis), muni d'une source électrospray de géométrie « orthogonale ».

La production des ions à analyser se fait par électronébulisation *via* une source électrospray. Ce mode d'ionisation est particulièrement adapté à l'étude des complexes en solution car c'est une méthode d'ionisation « douce », qui permet de conserver l'intégrité des édifices formés en solution. De plus, l'introduction des échantillons se fait à pression atmosphérique, ce qui facilite l'analyse des liquides.

2.1.1. La source d'ionisation électrospray (ES) ou électronébulisation

La grande importance actuelle de la technique électrospray provient des travaux initiés par Fenn ; cependant, c'est l'équipe de Dole qui a en premier reconnu la possibilité de générer des ions de macromolécules en phase gazeuse en brumisant une solution sortant de l'extrémité d'un capillaire électriquement chargé (Dole *et al.*, 1968). Sur la base des travaux de Dole, Yamashita et Fenn ont développé l'électrospray comme véritable interface pour la spectrométrie de masse (Yamashita et Fenn, 1984a; Yamashita et Fenn, 1984b). L'ES-SM est devenue de nos jours une technique incontournable pour la détermination d'ions métalliques (inorganiques, organométalliques et complexés) et d'espèces organiques et inorganiques non-métalliques.

La solution à analyser est introduite à l'aide d'une seringue à l'intérieur d'un capillaire autour duquel circule un flux d'azote gazeux dirigé vers l'intérieur du spectromètre parallèlement ou orthogonalement à l'axe de la source. Ce flux gazeux, qualifié de nébulisant, participe à la formation du spray. Un autre flux d'azote gazeux, orthogonal au précédent, permet d'évaporer une partie du solvant contenu dans les gouttes du spray et d'en diminuer ainsi leur taille. Un potentiel d'environ 3,5 kV, par rapport à la contre-électrode, est appliqué à l'extrémité du capillaire, il en résulte un champ électrique qui génère un spray de gouttes chargées, d'où le nom d'électro-spray. Ces gouttes de solution traversent ensuite un gradient de potentiel et de pression jusqu'à atteindre l'analyseur du spectromètre. Durant cette transition, la taille des gouttes diminue par évaporation de solvant et/ou par explosions coulombiennes (subdivision des gouttes résultant d'un excès de densité de charge) jusqu'à obtention d'ions totalement désolvatés.

Deux étapes sont prépondérantes dans les mécanismes impliqués dans la spectrométrie de masse à source d'ionisation électrospray : la production de gouttes chargées à l'extrémité de capillaire et l'obtention d'ions en phase gazeuse à partir de ces gouttes de solution.

2.1.1.1. La formation des gouttes (Fenn *et al.*, 1989; Kebarle, 2000)

Le champ électrique très élevé imposé entre le capillaire métallique et la contre-électrode conduit à une séparation partielle des ions positifs et négatifs de l'électrolyte dans la solution à cause de la pénétration du champ électrique dans une partie du liquide à l'extrémité du capillaire. En mode

positif, la surface du liquide est enrichie en ions positifs alors que les ions négatifs sont attirés vers l'intérieur du capillaire. La répulsion entre charges positives à la surface et la force du champ électrique sur ces mêmes charges dépassent la tension de surface du liquide. Celui-ci s'étend en un cône (le cône de Taylor, Figure 27), dont l'extrémité, qui est la partie la moins stable, s'allonge en un filament liquide. Ce filament se casse en gouttes individuellement chargées.

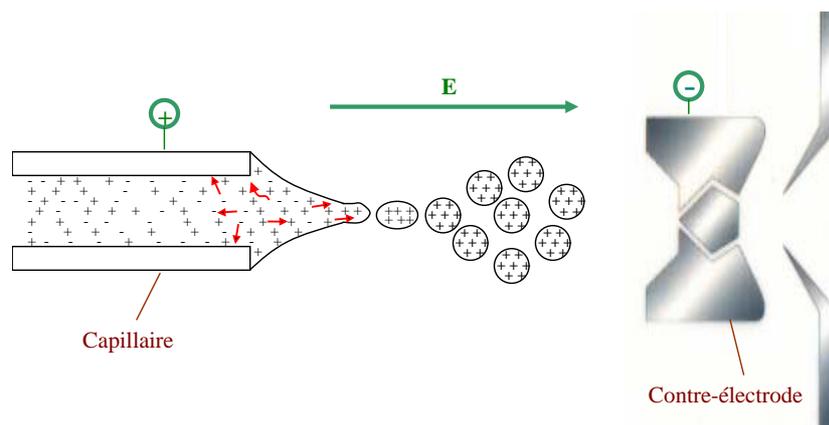


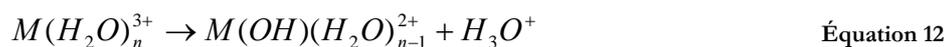
Figure 27 : Schéma illustrant l'obtention des gouttes en sortie de capillaire avec la formation d'un cône de Taylor

2.1.1.2. Les phénomènes se produisant dans la source

Différents phénomènes peuvent se produire au cours du processus conduisant de la solution à la phase gazeuse. Ces phénomènes peuvent être : (i) des réactions en phase gaz des analytes initialement présents en solution durant le processus de désolvatation (réactions de transfert de proton par exemple), (ii) des changements de la composition des gouttes de solution (sous l'effet du pH) suite à l'évaporation et à la subdivision des gouttelettes chargées (Vanberkel *et al.*, 1997).

2.1.1.2.1. La réduction de charge

Kebarle *et al.* ont montré que lors de la complexation d'un cation M^{3+} par un ligand L , l'observation des espèces $M(L)_n^{3+}$ est favorisée dans les solvants dipolaires aprotiques tels que le DMSO et le DMF (Blades *et al.*, 1990). Cependant, l'utilisation d'un solvant tel que l'eau conduit à la formation exclusive d'ions de charge réduite $M(OH)(H_2O)_{n-1}^{2+}$ suivant la réaction :



2.1.1.2.2. La variation du pH

Berkel *et al.* ont montré que sous certaines conditions électrospray, le pH de la solution peut diminuer fortement en raison des propriétés électrolytique oxydante de l'eau en mode ES-SM positif : au moins 4 unités de pH (Van Berkel *et al.*, 1997). La variation du pH de la solution est

plus importante pour un milieu non tamponné, avec un pH près de la neutralité et un capillaire en métal difficilement oxydable, tel que l'or ou le platine. La modification de pH peut être limitée en utilisant un tampon redox et un capillaire en métal facilement oxydable comme l'acier, ainsi qu'en augmentant le débit de la solution et en diminuant l'intensité du courant ionique.

2.1.2. L'analyseur (trappe ionique)

Une trappe à ions permet de piéger des ions (Trapping), de mesurer la masse des ions qu'elle a accumulés (Ejection ou Scanning) et d'isoler un ion (Isolation) pour l'exciter sélectivement afin de le fragmenter.

2.1.2.1. Le piégeage (Trapping)

Les ions produits par la source electrospray sont focalisés et transmis à la trappe ionique par l'interface de transmission (constituée d'un jeu de lentilles et de multipôles). La trappe est constituée d'un ensemble de trois électrodes; une électrode annulaire centrale, une électrode d'entrée et une électrode de sortie (Figure 28).

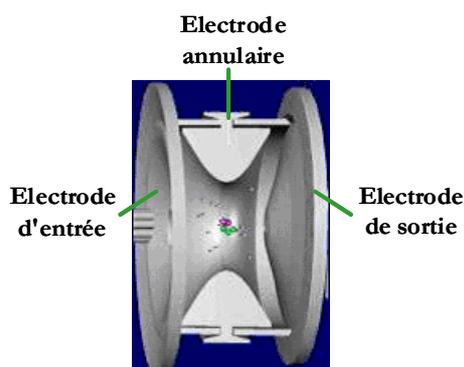


Figure 28 : Schéma d'une trappe ionique

L'électrode annulaire est utilisée pour générer un champ électrique quadrupolaire (une tension haute fréquence $V \cdot \cos(2\pi ft)$ combinée ou non à une tension continue U) qui permet de piéger les ions et de les retenir.

2.1.2.2. L'éjection (Scanning)

Cette étape correspond à l'éjection séquentielle des ions vers le détecteur. La tension de l'électrode annulaire est augmentée progressivement. Les ions sont alors éjectés suivant l'axe z , dans l'ordre de leur rapport m/z croissant. Cet axe z correspond à la droite qui passe par les orifices des électrodes d'entrée et sortie. Une moitié des ions est donc éjectée vers l'électrode d'entrée et est perdue, l'autre moitié est éjectée vers l'électrode de sortie et captée par la dynode de conversion qui les convertit en particules secondaires détectées par le multiplicateur d'électrons. D'après l'équation de Matthieu, chaque tension de l'électrode annulaire correspond à l'éjection d'un m/z

particulier. En pratique, la correspondance entre les paramètres électriques d'éjection et le m/z de l'ion éjecté est ajustée après avoir étalonné l'instrument avec des ions de masse connue.

2.1.2.3. L'isolation

Avant la fragmentation, l'ion d'intérêt doit être isolé dans la trappe. Tous les autres ions sont donc éjectés de la trappe par l'application sur les électrodes d'entrée et sortie des fréquences de résonance des ions à éjecter. Ces électrodes appliquent l'ensemble des fréquences à un voltage important (de l'ordre de 100 V) à l'exception de la fréquence de résonance de l'ion d'intérêt. Soumis à leur fréquence de résonance, les ions concernés vibrent dans des proportions qui dépassent le volume de la trappe et sont alors perdus.

2.2. Identification des espèces : la spectrométrie de masse en tandem (SM/SM) ou fragmentation

La spectrométrie de masse en tandem consiste à sélectionner un ion par une première spectrométrie de masse, à le fragmenter, puis à effectuer une deuxième spectrométrie de masse sur les fragments ainsi générés. L'identification des fragments fils générés, permet de confirmer l'identification des édifices de plus grande taille, voire de discriminer les complexes des agrégats moléculaires résultant de la désolvatation.

Au sein d'une trappe ionique, l'analyse en tandem se réalise dans un premier temps par sélection d'ions dont la valeur m/z est choisie. Tous les autres ions sont donc éjectés de la trappe en utilisant le processus d'éjection résonante pour les ions plus lourds que l'ion d'intérêt.

Ces ions piégés vont ensuite se fragmenter par collision (acquisition d'énergie interne, excitation vibrationnelle) à l'aide d'une tension radiofréquence correspondant à leur fréquence de résonance, et les ions produits formés sont à leur tour piégés. Une éjection sélective en masse des ions produits (fragments) peut alors être réalisée en vue de leur analyse.

L'obtention d'ions de générations supérieures est possible par simple renouvellement du processus (sélection d'un ion produit, fragmentation, sélection d'un ion produit de 2^{ème} génération, fragmentation, etc.). Cette séquence est appelée SM^n , n étant le nombre de générations d'ions.

2.3. Un outil pour la spéciation

Les méthodes traditionnellement employées pour déterminer des constantes de complexation reposent soit sur les propriétés luminescentes des Ln(III) (principalement Eu et Tb), soit sur des changements dans les propriétés physico-chimiques du ligand après complexation (comme dans les expériences de spectrophotométrie ou de RMN) (Muller *et al.*, 2001). L'ES-SM a été précédemment utilisée pour l'étude de la complexation des Ln par divers ligands fournissant les

structures, les stoechiométries et les états d'oxydation des complexes métal-ligand (Blades *et al.*, 1990; Delangle *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 2001; Renaud *et al.*, 1999) ainsi que pour la spéciation des An (Moulin *et al.*, 2001; Moulin *et al.*, 2000) et des Ln en solution (Colette *et al.*, 2002; Colette *et al.*, 2003; Vercouter *et al.*, 2005). Il apparaît aussi que l'ES-SM peut constituer une technique fiable pour la détermination de constantes de formation pour des complexes non covalents (Jorgensen *et al.*, 1998; Kempen et Brodbelt, 2000; Whittall *et al.*, 2000).

Contrairement aux techniques couramment utilisées pour la spéciation, l'ES-SM permet d'observer directement aussi bien les complexes que les métaux libres ou les ligands protonés non complexés. Après un passage dans la source électrospray, les espèces existent sous forme d'ions isolés rapidement détectés par spectrométrie de masse (Kebarle et Tang, 1993). Il est de plus en plus admis que les interactions non-covalentes existant en solution peuvent être maintenues sur l'échelle de temps du processus électrospray ($\sim 400 \mu\text{s}$) (Kebarle et Tang, 1993; Nierengarten *et al.*, 2002).

De plus, plusieurs études ont montré un bon accord entre l'abondance ionique en solution et en phase gazeuse pour des complexes métalliques présents dans des solutions à l'équilibre thermodynamique (Andrew *et al.*, 1998; Wang et Agnes, 1999a; Wang et Agnes, 1999b). Les cinétiques de formation et de dissociation des complexes de Ln(III) avec des ligands polyaminocarboxylates ont attiré plus d'attention en raison de l'application de ces ligands dans les analyses biomédicales (Chang *et al.*, 2001; Szilagyi et Brucher, 2000; Toth *et al.*, 1994). Il a été montré par Choppin que les effets stériques dans la coordination multidentate conduit à une formation de complexes plus lente ainsi qu'à une dissociation plus lente, et donc à une plus grande stabilité cinétique (Choppin, 1997). Récemment, la contribution de « l'effet chélate » à l'inertie vis-à-vis de la solvolysse a été illustrée par la cinétique de dissociation pour les complexes de Ln(III) avec des polyaminocarboxylates en solution aqueuse (Saito *et al.*, 2001).

Par conséquent, des systèmes tels que les acides aminés, les polypeptides ou les protéines, avec les Ln(III) ne sont pas susceptibles de subir de fortes variations dans la distribution des espèces durant l'évaporation des gouttelettes précédant la désorption. Ainsi, il semble envisageable d'établir une image de la spéciation par ES-SM avec une fiabilité suffisante pour justifier le calcul de constantes d'équilibre.

2.4. Comparaison avec la SLRT

Cette technique est moins sensible que la SLRT, cependant elle présente de nombreux avantages comme la possibilité d'observer à la fois les espèces (organiques et inorganiques) et leurs complexes sans se limiter à une catégorie de cations (fluorescents ou non). D'autre part, il est possible de visualiser les massifs isotopiques caractéristiques d'un élément donné.

Le mode d'ionisation par électrospray permet un passage progressif de la solution à la phase gazeuse tout en maintenant les interactions non-covalentes mises en jeu dans les complexes.

Cependant, cette technique nécessite de nombreuses précautions afin de s'assurer que les conditions choisies n'entraînent pas de modification de la nature et de la répartition des espèces présentes en solution après leur passage dans la source. C'est pour cette raison que l'utilisation d'une technique complémentaire telle que la SLRT est indispensable pour valider les observations faites sur les spectres de masse en tant que reflet de l'équilibre en solution et non d'un état intermédiaire entre une phase liquide et une phase gazeuse.

2.5. Mode opératoire

Les spectres de masse ont été enregistrés en mode positif sur un spectromètre LCQ Advantage MAX ou « trappe ionique » de chez Thermo Electron®, (Waltham, MA, Etats-Unis), muni d'une source électrospray de géométrie « orthogonale ».

Les expériences de spectrométrie de masse ont été menées sur des RN présentant un motif isotopique facilement identifiable, ça n'est pas le cas de l'U (qui présente un isotope très largement prépondérant : ^{238}U), par contre, parmi les lanthanides, de nombreux présentent une composition isotopique variée, c'est en particulier le cas de l'Eu ($\sim 48\%$ ^{151}Eu et $\sim 52\%$ ^{153}Eu). La résolution de la trappe ionique permet d'observer aisément le motif isotopique.

L'objectif de ce travail par électrospray spectrométrie de masse est dans un premier temps de confirmer, voire de compléter l'identification des espèces faite par SLRT. Dans un second temps, nous espérons également faire des mesures de constantes de formation par cette méthode, ce qui, nous l'avons vu dans la littérature, est aussi possible. Toutefois, nos ligands ne sont pas de grosses molécules organiques et ils présentent de nombreuses propriétés acido-basiques, il est donc probable que ce second objectif sera plus difficile à atteindre, en particulier lors de l'étude des plus petits ligands : les acides aminés.

Lors de toutes les expériences menées, les paramètres principaux de réglage des conditions d'ionisation de la source électrospray ont été optimisés. En effet, la détection des espèces peut être fortement influencée par l'énergie interne des ions en phase gazeuse (Vekey, 1996). L'objectif est d'éviter la dissociation (même partielle) des complexes non covalents lors du passage de la solution à la phase gazeuse. Les principaux paramètres à considérer sont la tension du capillaire, l'accélération des ions à l'interface (tension des optiques ioniques de l'interface de transfert vers le détecteur), la température de la source et la pression de gaz séchant (Collette *et al.*, 1998).

Idéalement, pour faire ces réglages, il faudrait optimiser le signal du ligand libre, puis le signal du métal libre et enfin choisir des paramètres intermédiaires entre les deux réglages. Nous procédons un peu différemment : une solution contenant une proportion significative d'espèce complexée est passée dans le spectromètre. L'optimisation de l'ensemble des paramètres est ensuite faite de sorte à favoriser l'observation du signal du pic du principal complexe en solution, afin d'observer le mieux les espèces composées à la fois du ligand et du métal. Ces conditions établies, elles ne

seront plus modifiées pour un même système, les étalons et les échantillons sont passés dans ces conditions.

Les échantillons sont injectés en mode direct avec un débit de $10 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Entre chaque injection, la seringue, la connexion en PEEK et le capillaire sont rincés avec de l'eau ultrapure. La durée de chaque acquisition est la même pour tous les spectres : 2 min (soit $20 \mu\text{L}$ de solution). Les spectres ont été acquis sur une gamme de m/z comprise entre 150 et 2000.

3. Autres techniques utilisées

Lorsque les gammes de concentrations des échantillons sont plus élevées, d'autres techniques peuvent être mises en œuvre. Quatre techniques complémentaires ont ainsi été utilisées : la Spectroscopie d'Absorption des rayons X (SAX), la spectrométrie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), la spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier en mode Réflexion Totale Atténuée (ATR-IRTF) et la spectrophotométrie UV-Visible. Le principe des ces techniques est brièvement rappelé.

3.1. La Spectroscopie d'Absorption des rayons X (SAX)

La connaissance du degré d'oxydation et du polyèdre de coordination des Ln et des An fournit des informations importantes sur les propriétés complexes des orbitales $4f$ et $5f$, permettant ainsi de mieux comprendre leur comportement chimique en phase condensée (solides ou solutions).

Parmi toutes les méthodes d'analyse permettant d'accéder à un environnement chimique, nombreuses sont celles qui utilisent l'interaction rayonnement matière. Le choix de la technique est orienté par certaines contraintes pratiques, notamment l'utilisation d'un rayonnement qui interagit avec un élément en particulier et non l'ensemble du milieu d'analyse. C'est en particulier le cas des rayons X produits par le rayonnement synchrotron, dont les énergies ne sont pas absorbées par le milieu environnant. La Spectroscopie d'Absorption des rayons X (SAX) est ainsi bien appropriée pour sonder, de façon non destructive, pratiquement tous les atomes dans la plupart des milieux. Elle permet d'accéder à la nature et à la position des atomes voisins de l'ion absorbeur et se révèle donc être un outil de choix pour l'étude de la spéciation des Ln et des An.

La SAX correspond à l'excitation des électrons de niveau de cœur d'un atome par absorption d'un photon X vers un niveau vide (Simoni et Den Auwer, 2005). Elle reflète donc la densité d'états vacants de niveaux de valence. Un exemple de spectre d'absorption X de Am(III) est donné Figure 29.

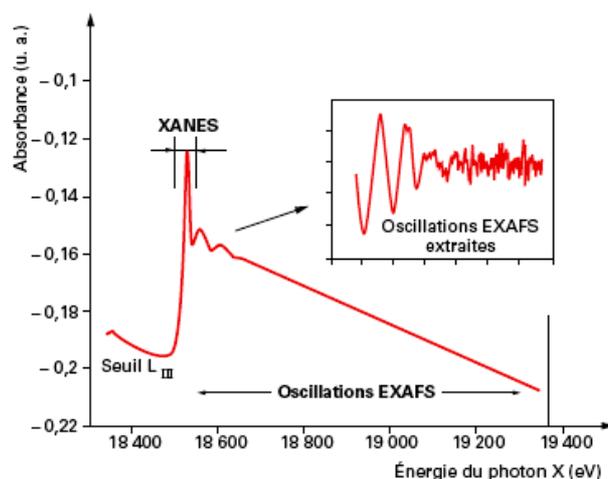


Figure 29 : Spectre d'absorption X de Am(III)

Ce spectre présente trois régions, correspondant chacune à une gamme d'énergie du photon incident, et qui traduisent trois processus électroniques différents :

- Tant que l'énergie du photon incident est inférieure à l'énergie de liaison de l'électron de cœur considéré, il n'est pas absorbé.

- Pour une énergie proche de l'énergie de liaison l'électron de cœur peut accéder aux niveaux vacants supérieurs et le coefficient d'absorption augmente brutalement. Il s'agit du seuil d'absorption. Pour des valeurs d'énergie supérieures à l'énergie de liaison, il y a transition vers les états du continuum et le photoélectron est éjecté dans le milieu où il est rétrodiffusé par les atomes voisins de l'atome absorbeur. Jusqu'à 50 eV au-dessus du seuil, le photoélectron est rétrodiffusé par plusieurs voisins (régime de diffusion multiple). Cette partie du spectre s'étendant de quelques électronvolts en dessous du seuil jusqu'à 50 eV au-dessus est appelée XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure).

- Dans le domaine d'énergie allant de 50 eV à 1 000 eV au-delà du seuil, le photoélectron est principalement rétrodiffusé par un seul voisin à la fois (diffusion simple). Le coefficient d'absorption présente alors des modulations d'amplitude amorties. C'est la partie EXAFS du spectre (Extended X-ray Absorption Fine Structure).

La partie XANES contient donc des informations électroniques et en particulier permet d'identifier le degré d'oxydation formel de l'atome absorbeur. En effet, le seuil d'absorption des photons X est dû aux transitions entre niveaux électroniques, et présente donc une position en énergie dépendante du degré d'oxydation de l'élément sondé.

La partie EXAFS permet d'accéder à l'environnement atomique local, même s'il n'existe pas d'ordre à grande distance. Les distances absorbeur-voisins sont obtenues en simulant les oscillations EXAFS extraites du spectre d'absorption. Celles-ci sont constituées d'une somme de sinusoïdes amorties, correspondant chacune à un chemin de diffusion. L'analyse des différentes

composantes de ces signaux s'effectue par analyse de Fourier. Les paramètres structuraux sont ainsi obtenus par ajustement de la courbe expérimentale à une courbe théorique. Il est à noter, cependant, que cette équation EXAFS contient non seulement ces paramètres structuraux mais également des paramètres électroniques qui doivent être déterminés, au préalable, à l'aide de composés de référence de structure connue.

Le tracé de la transformée de Fourier des oscillations EXAFS permet de « visualiser » les distances des atomes du ligand ou du solvant par rapport à l'élément sondé. Un exemple est proposé Figure 30.

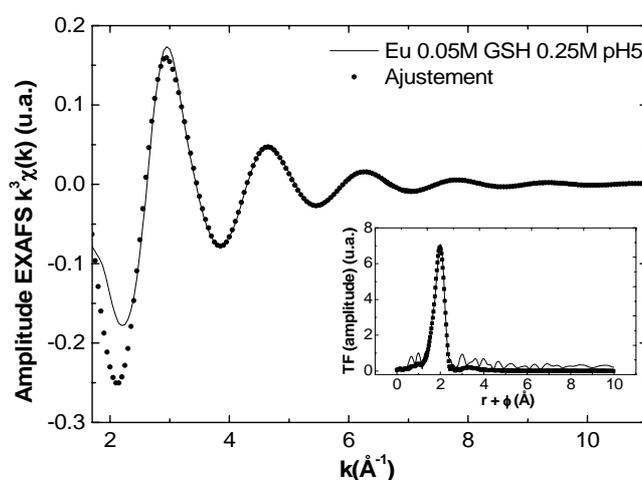


Figure 30 : Spectres EXAFS d'un échantillon à base de Eu et un ligand donneur oxygéné (amplitude et transformée de Fourier en insert)

Le pic à 2 Å est dû à la contribution des atomes d'O autour de l'ion Eu, d'autres contributions, toujours d'atomes d'O, mais plus faibles sont également visibles, à plus longue distance.

3.2. La spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Cette technique met à profit les propriétés magnétiques des noyaux atomiques dont le nombre quantique de spin est non nul. L'application d'un champ magnétique statique B_0 crée une polarisation de l'échantillon, mesurée en délivrant un champ magnétique radio-fréquence polarisé perpendiculairement à B_0 et oscillant à la fréquence de résonance du noyau observé : $\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$

(où γ le rapport gyromagnétique ne dépend que du noyau considéré).

La fréquence de résonance dépend de façon très fine de l'environnement de l'atome dans la molécule. L'effet d'écran dû aux nuages électroniques (induisant le phénomène de déplacement chimique) et l'influence directe *via* les électrons de liaison des noyaux voisins (induisant le couplage J) constituent une source riche d'information largement utilisée pour élucider la structure des molécules en solution.

Les techniques de RMN du 1H et du ^{13}C (abondance isotopique de 1,1%) sont les plus largement utilisées.

Par l'acquisition de spectres classiques (à une dimension), puis de spectres de corrélation à deux dimensions, ces techniques identifient les différents groupements chimiques présents et déterminent leur proximité mutuelle au travers des liaisons chimiques.

3.2.1. RMN du 1H

3.2.1.1. Le déplacement chimique en RMN du 1H

Les atomes d'hydrogène non chimiquement équivalents d'une molécule organique ne vont pas être soumis au même champ magnétique. Les électrons protègent (écrantent) le noyau, affaiblissant ainsi le champ magnétique effectif que celui-ci subit, l'application d'une fréquence plus faible est donc suffisante pour provoquer la résonance du noyau. De même, lorsque les électrons sont « éloignés » d'un noyau, le noyau est dit « déblindé » et « subit » plus intensément les effets du champ magnétique, il faudra donc lui apporter une plus grande énergie (donc une plus grande fréquence) pour provoquer sa résonance. C'est ainsi que la RMN est susceptible de fournir des informations sur l'environnement électronique des atomes d'hydrogène.

En général, les atomes d'hydrogène liés à des groupements voisins de groupes électro-attracteurs résonnent à des fréquences plus élevées, c'est-à-dire plus décalées vers la gauche par rapport au signal de référence du tétraméthylsilane (TMS). La fréquence de résonance d'un atome d'hydrogène par rapport au signal du TMS est appelée son déplacement chimique.

3.2.1.2. Les multiplets, l'éclatement (*Splitting*)

La RMN apporte des informations sur le nombre de voisins dont un atome d'hydrogène (ou un groupe d'atomes d'hydrogène équivalents) est entouré. En général, le signal de RMN sera « éclaté » en $N+1$ pics, avec N = nombre d'atomes d'hydrogène sur les atomes voisins.

S'il n'y a aucun atome d'hydrogène sur l'atome adjacent, le signal de résonance sera un pic seul, un singulet. S'il y a un atome d'hydrogène, le signal de résonance sera scindé en 2 pics de hauteur équivalente, un doublet. La présence de 2 atomes d'hydrogène sur un atome voisin éclatera le signal de résonance en 3 pics de ratio 1:2:1, un triplet. S'il y a 3 atomes d'hydrogène sur les atomes voisins, le signal de résonance sera scindé en 4 pics de rapports 1:3:3:1, un quartet.

3.2.2. RMN du ^{13}C

Le Carbone 13 a un spin nucléaire non nul ($I = 1/2$) et constitue 1,1% du carbone naturel, une proportion suffisante compte tenu des technologies actuelles pour faire de la RMN du ^{13}C une technique très utile. En effet, le carbone est l'élément de base de la chimie organique, la RMN du

^{13}C est donc une technique indispensable pour la détermination de la structure des molécules organiques inconnues ou pour l'étude des réactions et processus chimiques.

Le principe de la RMN du ^{13}C est le même que celle du ^1H , appliqué à un autre noyau.

Les spectres de RMN du ^{13}C fournissent en particulier des informations concernant le nombre de types différents de carbones présents dans une molécule, l'environnement électronique des différents types d'atomes de carbone, le nombre de voisins qu'un atome de carbone a (multiplets). A la différence des spectres de RMN du ^1H , il n'y a pas d'intégration des spectres de ^{13}C , les déplacements chimiques sont beaucoup plus importants (entre 0 et 200 ppm) alors que ceux du ^1H sont plutôt compris entre 0 et 10 ppm.

De la même manière qu'en RMN du ^1H , les atomes de carbone non chimiquement équivalents d'une molécule organique ne vont pas être soumis au même champ magnétique et leur signal de résonance va fournir des informations sur l'environnement électronique des atomes de carbone. En général, les carbones liés à des groupements électro-attracteurs résonnent à des fréquences plus élevées (downfield), c'est-à-dire à « gauche » du signal du TMS. A titre d'exemples, les atomes de carbone des fonctions carbonyle résonnent entre 160 et 200 ppm alors que les atomes de carbone aromatiques se situent plutôt entre 115 et 145 ppm. Le Tableau 14 présente les valeurs de déplacements chimiques communs en RMN du ^{13}C .

Tableau 14 : Déplacements chimiques communs en RMN du ^{13}C

Structure	Déplacement chimique (ppm)
Carbonyle (cétones)	202-220
Carbonyle (aldéhydes)	190-200
Carbonyle (esters, acides)	170-185
Aromatique	125-150
Alcènes	115-140
Alcynes	67-85
RCH_2OH	50-65
RCH_2Cl	40-45
RCH_2NH_2	37-45
R_3CH	25-35
$\text{CH}_3\text{CO-}$	20-30
R_2CH_2	16-25
RCH_3	10-15

3.3. Spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier en réflexion totale atténuée (ATR-IRTF)

La spectroscopie infrarouge permet d'exploiter le domaine d'énergie correspondant au domaine de vibrations des liaisons chimiques. La spectrométrie Infra-Rouge à Transformée de Fourier

(IRTF) consiste à mesurer simultanément toutes les fréquences ; une opération de transformée de Fourier permet ensuite d'obtenir le spectre. Cette technique est beaucoup plus rapide et plus sensible que la spectroscopie infrarouge dispersive qui consiste à acquérir le spectre point par point. Le montage de Réflexion Totale Atténuée (ATR, Figure 31) consiste à mettre en contact un cristal (le plus souvent ZnSe, Ge ou Si) avec l'échantillon à analyser.

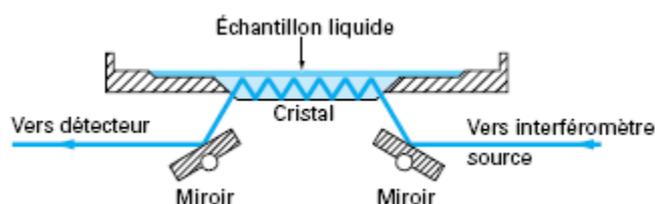


Figure 31 : Accessoire de Réflexion Totale Atténuée (ATR)

Si l'indice de réfraction du cristal est supérieur à celui de l'échantillon, alors le faisceau subit des réflexions totales au-delà d'un certain angle d'incidence à l'interface échantillon/cristal.

3.4. La spectrophotométrie UV-Visible

La spectrophotométrie est une technique très utilisée pour déterminer sans ambiguïté les divers degrés d'oxydation des An. Elle permet également d'étudier, sans perturber les équilibres chimiques, les phénomènes de complexation.

Le principe de la spectrophotométrie consiste à faire traverser un échantillon (solide, liquide ou gazeux) par un faisceau lumineux de longueur d'onde donnée. L'analyse de la lumière ayant traversé l'échantillon permet d'étudier la structure du composé ou de mesurer sa concentration. Le domaine spectral d'intérêt pour l'étude des actinides s'étend de l'ultraviolet (350 nm) au proche infrarouge (1 300 nm).

La proportion de lumière absorbée par une substance est indépendante de l'intensité de la lumière incidente, elle varie en fonction du nombre d'espèces absorbantes. La loi de Beer-Lambert s'écrit :

$$d.o. = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = \varepsilon \times l \times C$$

d.o. : densité optique

I_0 : intensité de la lumière incidente

I : intensité de la lumière transmise à travers l'échantillon

l : longueur du parcours optique

ε : coefficient d'extinction molaire

C : concentration molaire en espèce absorbante

Équation 13

Dans le cas des solutions, le coefficient d'extinction molaire dépend de la nature du soluté, de la longueur d'onde, de la température et du solvant.

Lorsqu'un faisceau lumineux monochromatique traverse une solution d'épaisseur l contenant i espèces absorbantes de concentrations C_i et de coefficients d'extinction molaire ϵ_i , la loi d'additivité s'écrit :

$$d.o. = l \sum_{i=1}^{i=n} \epsilon_i C_i \quad \text{Équation 14}$$

4. Conclusion

Les différentes techniques présentées ici nous ont permis de recueillir un certain nombre d'informations sur les systèmes que nous avons choisi d'étudier.

La nature de ces informations est rappelée dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Informations fournies par les techniques expérimentales mises en oeuvre

Technique	Information
SLRT	Stœchiométrie des espèces Solvation du cation Constantes de complexation
ES-SM	Stœchiométrie des espèces Constantes de complexation
EXAFS, RMN	Aspects structuraux
ATR-IRTF	Modifications des groupements fonctionnels
UV-Vis	Existence de complexation

Chapitre 3

ETUDES DES INTERACTIONS DES RN AVEC LES ACIDES AMINES

1. Chélation par les petites molécules

En plus des protéines et des peptides, un très grand nombre de composés de faible poids moléculaire joue un rôle important dans la prise en charge des ions métalliques dans les cellules (Briat et Lebrun, 1999). Parmi eux, un intérêt particulier est porté sur les acides organiques, les acides aminés et les dérivés phosphatés. Les ions citrate par exemple sont bien connus pour complexer les ions métalliques y compris les RN (Bonin, 2005). Une surproduction de citrate dans des plants de tabac transgénique permet d'ailleurs de les rendre plus tolérants à l'aluminium, un métal dur selon la classification de Pearson (De La Fuente *et al.*, 1997).

Certains acides aminés sont aussi d'importants complexants des métaux. Cette capacité confère parfois aux plantes une meilleure résistance à la toxicité métallique : une plus grande concentration en histidine libre est responsable d'une tolérance accrue au nickel par exemple (Kramer *et al.*, 1996).

Les acides aminés constitutifs des PC sont (variantes comprises) : l'acide glutamique, la cystéine, la glycine, la β -alanine et la sérine. En plus de certains des acides aminés précurseurs des PC, nous avons donc choisi d'étudier un AA aromatique l'histidine, dont le rôle dans le domaine catalytique de la PCS a été démontré (Rea *et al.*, 2004; Vivares *et al.*, 2005). La structure de ces molécules est présentée Figure 32.

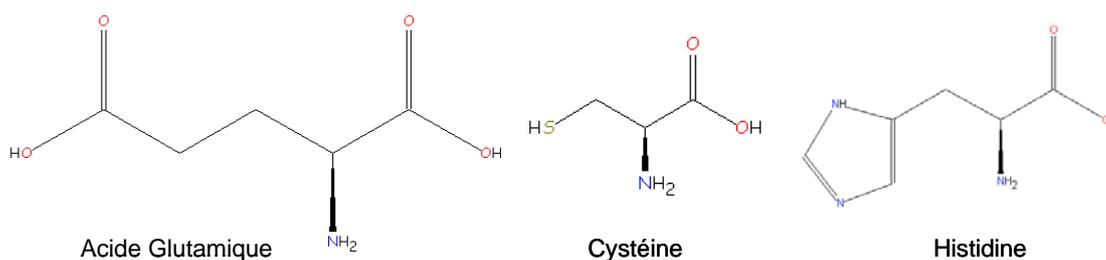


Figure 32 : Structure des acides aminés étudiés

Les acides aminés sont des acides polyprotiques faibles. Les groupements ionisables ne sont pas fortement dissociés et leur degré de dissociation dépend donc du pH du milieu. Tous les acides aminés contiennent au moins deux atomes d'hydrogène dissociables.

La Figure 33 présente (sans tenir compte des ionisations éventuelles de la chaîne latérale) les différentes formes ioniques d'un acide aminé en fonction du pH.

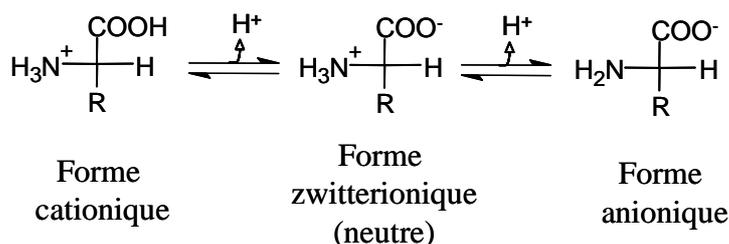


Figure 33 : Formes ioniques des acides aminés

Tous les AA, excepté la glycine (R = H) contiennent un carbone asymétrique (C_α). Toutefois, la forme optique utilisée (D, L, ou un mélange racémique DL) ne change pas la valeur des constantes de stabilité mesurées.

Les caractéristiques des acides aminés que nous avons étudiés sont présentées dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Caractéristiques des acides aminés étudiés (Smith et Martell, 1997)

Nom	Symbole	Structure (R=)	M <i>g.mol⁻¹</i>	pKa α -COOH	pKa α -NH ₃ ⁺	pK _R	Solubilité <i>g.kg⁻¹_{eau}</i> (<i>mol.L⁻¹</i>)
Acide glutamique	Glu	-(CH ₂) ₂ COOH	147,13	2,16	9,58	4,15	9 (~0,05)
Cystéine	Cys	-CH ₂ SH	121,16	1,91	10,28	8,14	Très soluble
Histidine	His	-CH ₂ (C ₂ N ₂ H ₃)	155,16	1,69	9,13	6,04	15 (~0,1)

Les connaissances bibliographiques relatives à l'interaction de ces molécules avec les RN ont été évoquées dans le Chapitre 1, exception faite de l'histidine.

2. Conditions opératoires

La complexation de la cystéine a été étudiée avec Eu et U, à divers pH, toujours acides, par SLRT. Les interactions Eu-Acide glutamique et Eu-Histidine ont été caractérisées à pH 3 ou plus, par SLRT. L'ensemble des expériences réalisées dans ce chapitre est décrit Tableau 17.

Tableau 17 : Etudes RN-AA réalisées

Ligand ([L] en mol/L ⁻¹)	RN ([RN] en mol/L ⁻¹)	pH	Technique d'analyse
Cystéine (0 à 0,5)	Eu (10 ⁻⁵)	3	SLRT
Cystéine (0 à 0,5)	Eu (10 ⁻⁶)	5	SLRT
Cystéine (0 à 3,5.10 ⁻³)	U (4,2.10 ⁻⁶)	2	SLRT
Cystéine (0 à 10 ⁻²)	U (4,2.10 ⁻⁷)	4	SLRT
Cystéine (0,1)	U (4.10 ⁻³)	1 et 3	Spectrophotométrie UV-Vis
Acide glutamique (0 à 0,05)	Eu (10 ⁻⁵)	3	SLRT
Histidine (0 à 0,001)	Eu (10 ⁻⁶)	3	SLRT
Histidine (0,05)	Eu (10 ⁻⁶)	2,5 à 7	SLRT

Nous avons réalisé des études à pH acide (pH 2 ; 3 ou 4) et plus proche de la neutralité (pH 5). Le mode de préparation des échantillons dépend du pH de travail.

A pH proche de la neutralité, nous nous sommes placés dans des conditions permettant d'éviter la présence de carbonates en solution, car la complexation par ces ligands serait rentrée en compétition avec les ligands que nous étudions. Ainsi, toutes les préparations d'échantillons à pH 5 ont été réalisées sous atmosphère inerte (dans une boîte à gants sous courant de N₂ afin d'éviter la carbonatation des solutions par échange avec le CO₂ de l'air), seules les pesées initiales des solides ont été faites à l'extérieur.

Le pH des échantillons est mesuré à l'aide d'une électrode reconditionnée en milieu NaClO₄ (sinon les ions K⁺ du compartiment interne précipiteraient avec les ions ClO₄⁻ en solution, qui servent de sel de fond).

3. Interactions avec la cystéine

La cystéine est un acide aminé soufré, qui présente une liaison « mercapto³³ » qui lui confère tout son intérêt biochimique. *Via* le groupement mercapto, la cystéine présente des affinités pour les atomes donneurs dits "mous" et peut former des ponts disulfure, ces propriétés font de la cystéine un acide aminé central dans les réactions rédox mais aussi acido-basiques des milieux biologiques. C'est pourquoi, la cystéine est souvent un des principaux acides aminés constitutifs des sites de liaison des protéines ce qui fait tout l'intérêt des études de cette molécule, en particulier de ses interactions avec les métaux (Chan *et al.*, 2002). En effet, la cystéine est capable de former des complexes stables avec les métaux lourds. D'ailleurs, c'est l'acide aminé prépondérant des protéines séquestrices des métaux lourds comme les métallothionéines ou les phytochélatines, qui sont constituées pour un tiers, de résidus cystéine (Cobbett, 2000). Les études

³³ Liaison carbone soufre.

des interactions de la cystéine avec les RN choisis sont donc indispensables pour comprendre les interactions des RN avec les phytochélatines et les métallothionéines.

Pour ces études, nous avons choisi l'euprium et l'uranium, éléments fluorescents.

La cystéine protonée présente trois acidités et peut être notée sous la forme H_3L^+ (Smith et Martell, 1997). Sa spéciation en fonction du pH est présentée Figure 34.

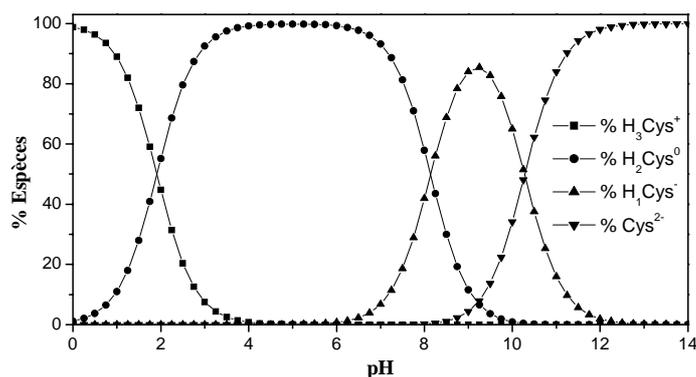


Figure 34 : Diagramme de spéciation de la cystéine

Nous avons déjà évoqué les similitudes en terme de chimie de coordination des lanthanides trivalents et du calcium (ou du strontium), qui reposent plus sur les interactions électrostatiques et la taille des ions que sur les interactions électroniques. Ainsi, le site de complexation prépondérant de la cystéine pour les lanthanides trivalents devrait être le groupement carboxylate. Le groupement thiol, même déprotoné, n'est pas supposé interagir fortement avec les RN étudiés.

3.1. Interaction de l'euprium avec la cystéine par SLRT

Les ajouts de cystéine à pH 3 (Figure 35) ou à pH 5 (Figure 36) provoquent des modifications importantes du spectre caractéristique de Eu libre. A pH 3, une augmentation de l'intensité de fluorescence de la transition hypersensible $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ à 615 nm est observée, alors que l'intensité de la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ à 592 nm varie peu. A pH 5, en revanche, c'est l'intensité de la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ à 592 nm qui diminue alors que la transition hypersensible reste stable. Dans les deux cas, la modification de l'environnement autour de Eu est confirmée par l'apparition de la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$ à 579 nm. Sa présence révèle la perte de centrosymétrie autour de Eu : c'est-à-dire le remplacement d'une ou plusieurs des 9 molécules d'eau entourant l'ion aquo libre par une ou plusieurs molécules de ligand. La force des interactions peut être comparée en calculant le rapport des intensités maximales des transitions $^5D_0 \rightarrow ^7F_2 / ^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ dans chacun des cas. A pH 5, ce rapport est proche de 1,5 contre seulement 1,0 à pH 3. Ceci reflète probablement la déprotonation de la fonction carboxylate, plus totale à pH 5 qu'à pH 3 (Figure 34).

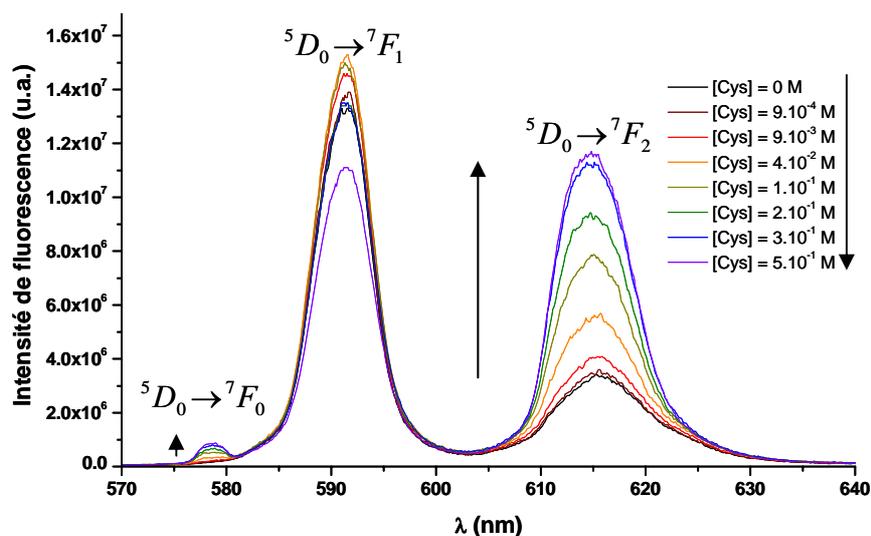


Figure 35 : Dosage Eu (10^{-5} M)-Cystéine (de 0 à 0,5 M) à pH 3 par SLRT ($E_{exc} = 395,7$ nm ; $E_{laser} = 0,9$ mJ ; $D = 1$ μ s ; $L = 500$ μ s)

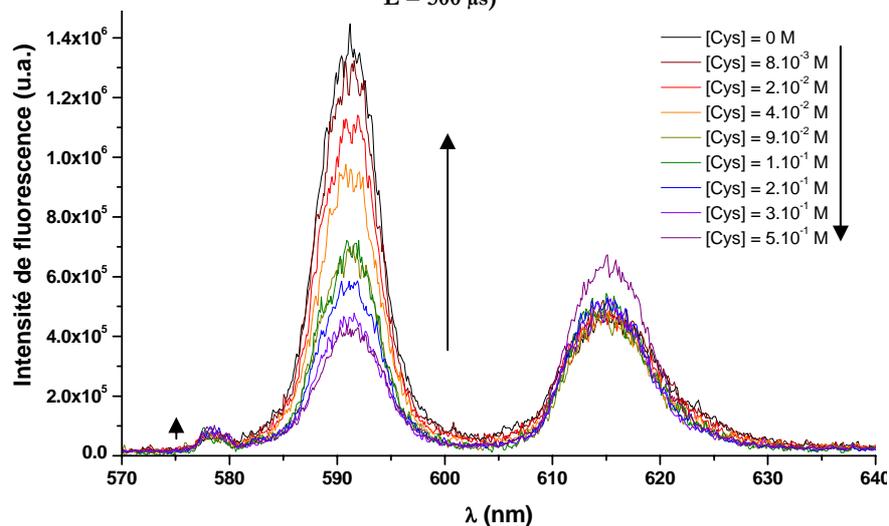


Figure 36 : Dosage Eu (10^{-6} M)-Cystéine (de 0 à 0,5 M) à pH 5 par SLRT ($E_{exc} = 395,7$ nm ; $E_{laser} = 0,6$ mJ ; $D = 1$ μ s ; $L = 500$ μ s)

A l'aide de l'Équation 37 de l'Annexe 3, l'ajustement du temps de vie à 615 nm, longueur d'onde de fluorescence maximale du spectre des espèces complexées, est réalisé.

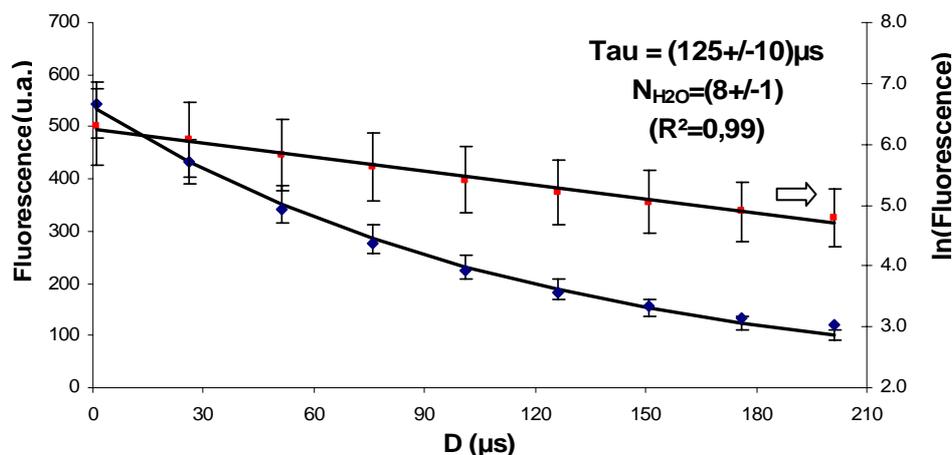


Figure 37 : Evaluation du temps de vie du complexe Eu+Cys à pH 3

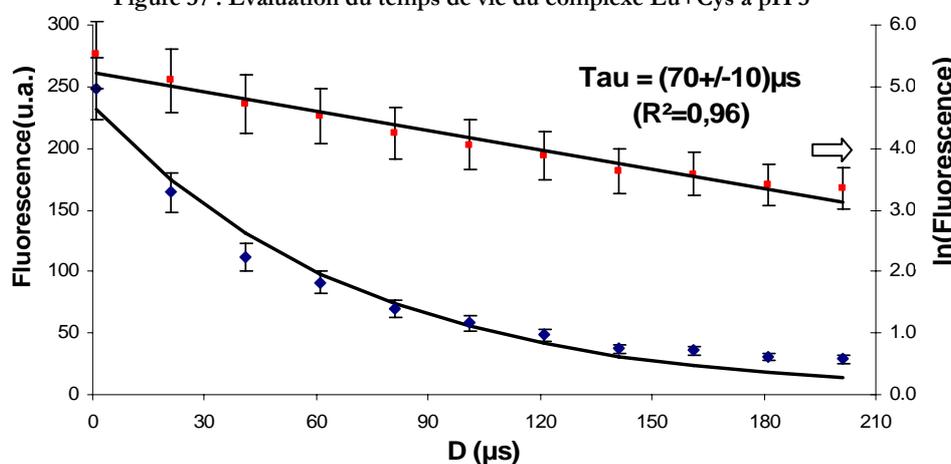


Figure 38 : Evaluation du temps de vie du complexe Eu+Cys à pH 5

A pH 3, l'ajustement du temps de vie montre la perte d'une molécule d'eau en première sphère de coordination de Eu. A ce pH, seule la fonction carboxylate est déprotonée. Ce résultat suggère donc une complexation monodente avec la fonction carboxylate de la cystéine.

A pH 5 en revanche, le temps de vie mesuré vaut $(70 \pm 10) \mu\text{s}$, ce qui est très différent du temps de vie de l'europlum libre $(113 \pm 5) \mu\text{s}$. Une diminution du temps de vie par rapport à celui de Eu libre ne permet pas d'évaluer le nombre de molécules d'eau restant en sphère interne de coordination. Ce phénomène est observé en général avec les espèces hydrolysées de Eu, dont le temps de vie vaut entre 30 et 50 μs selon la stoechiométrie de l'hydroxyde considéré (Plancque *et al.*, 2003). L'absence d'hydrolyse dans les conditions de ce dosage a été vérifiée en enregistrant le même spectre en absence de ligand. Ce temps de vie est donc bien caractéristique du complexe formé. Celui-ci présente donc des différences avec l'espèce observée à pH 3. L'hypothèse avancée est l'influence de l'interaction d'une autre fonction que la fonction carboxylate. A pH 5, nous sommes à plus de 3 unités pH du pK_a de la fonction thiol, ce qui signifie que cette forme déprotonée 2 fois, représente moins de 1% du ligand disponible. Toutefois, l'acidité de la fonction thiol de la cystéine est discutée dans la littérature, notamment en terme de complexation à des pH inférieurs

à la déprotonation de la fonction. Ce phénomène est surtout observé avec des métaux de transition comme Co (Bresson *et al.*, 2005). Toutefois, une très récente étude menée par des mesures de cinétique d'échange « deuterium/hydrogène » et complétée par modélisation *ab initio* sur la cystéine suggère que l'acidité de la fonction thiol pourrait être comparable à celle de la fonction carboxylate en phase gazeuse (Tian *et al.*, 2007).

Selon la méthode présentée en Annexe 4, afin de définir la stoechiométrie de l'espèce formée et sa

constante de formation, nous traçons $\log_{10}\left(\frac{[Cplx]}{[Eu]}\right)_{\text{exp}} = f(\log_{10} C_L)$:

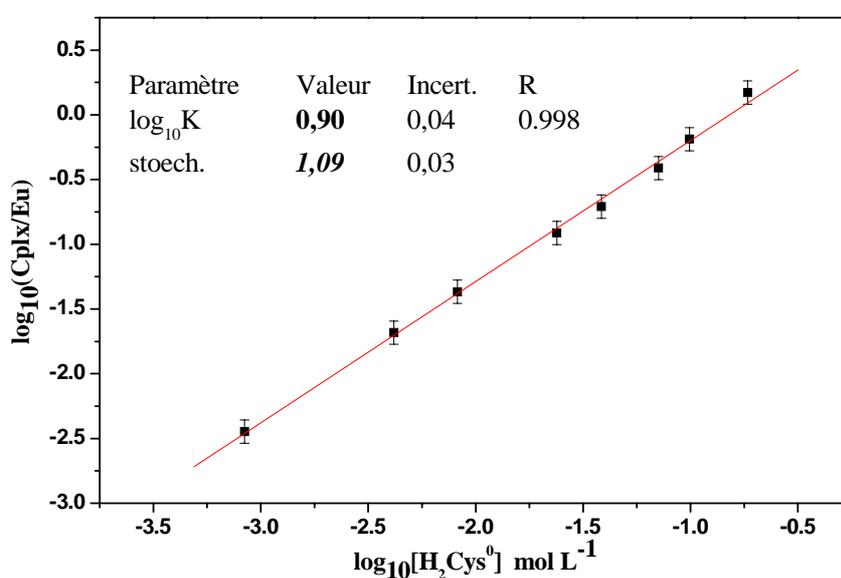


Figure 39 : Stoechiométrie et constante de formation d'un complexe : dosage Eu (10^{-5} M)-Cystéine (de 0 à 0,5 M) à pH 3

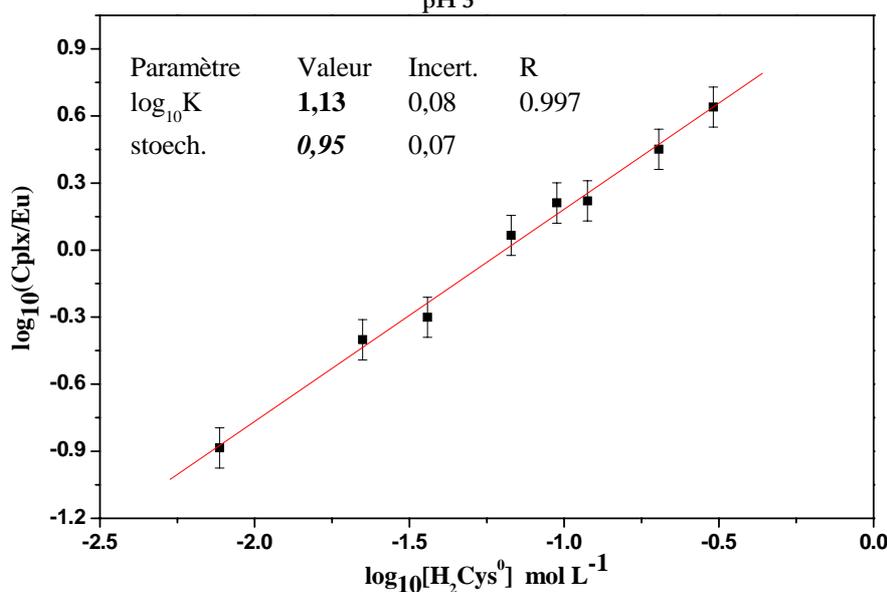


Figure 40 : Stoechiométrie et constante de formation d'un complexe : dosage Eu (10^{-6} M)-Cystéine (de 0 à 0,5 M) à pH 5

Dans les deux cas, l'espèce formée est de stoechiométrie (1:1), les constantes conditionnelles mesurées dépendent bien sûr du pH, et comme attendu la constante de formation est plus importante à pH 5 : $\log_{10}K_{1(\text{pH } 5)} = 1,1 \pm 0,2$ qu'à pH 3 : $\log_{10}K_{1(\text{pH } 3)} = 0,9 \pm 0,2$. Aux incertitudes près, ces valeurs sont équivalentes. Or, les équations de formation des complexes sont écrites avec H_2Cys^0 , il n'y a donc pas d'échange de proton. Les intervalles d'incertitude proviennent des incertitudes expérimentales et sont plus importants que ceux liés à l'ajustement mathématique des données. Ils représentent la variation de $\log_{10}K_1$ obtenue lorsque nous faisons passer la droite de pente 1, par les extrémités des barres d'erreur de chaque point du dosage.

A pH 5, l'influence de la fonction thiol est supposée, au moins en sphère externe de coordination du fait de la baisse du temps de vie du complexe par rapport à celui de Eu libre. Une stabilisation de l'édifice formé, par liaison hydrogène, n'est pas exclue.

Une valeur de constante Ln-Cystéine est disponible dans la littérature, avec le samarium, voisin de l'europium, elle vaut : $\log_{10}K_1 = 1,4$; l'incertitude sur cette mesure n'est pas précisée. Nous concluons que ces valeurs sont proches.

L'état de l'art présenté Chapitre 1, Tableau 10, illustre une grande dispersion des constantes mesurées, nos données sont proches des valeurs les plus basses répertoriées.

3.2. Interaction de l'uranium avec la cystéine par SLRT

L'interaction de U avec la cystéine a été étudiée à deux pH : pH 2 et pH 4. Dans les deux cas, les concentrations de travail choisies pour U ont permis de s'affranchir de la formation d'espèces polynucléaires ou hydrolysées.

3.2.1. Résultats à pH 2

Suite à l'addition de cystéine à pH 2, l'évolution de la fluorescence de l'uranyle est présentée Figure 41 :

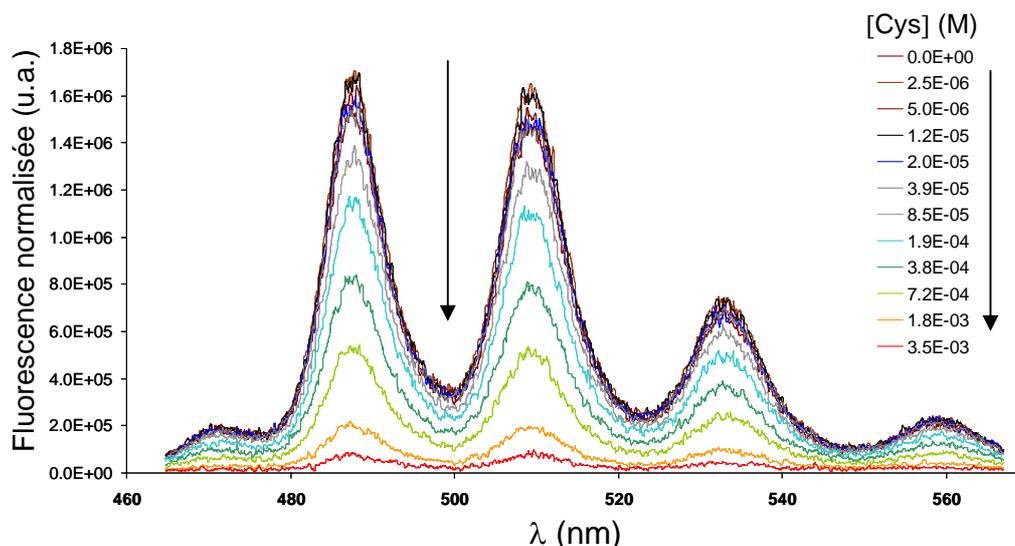


Figure 41 : Dosage U ($4,2 \cdot 10^{-6} \text{M}$)-Cystéine (de 0 à $3,5 \cdot 10^{-3} \text{M}$) à pH 2 par SLRT ($E_{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$; $E_{\text{laser}} = 1,0 \text{ mJ}$; $D = 0,2 \mu\text{s}$; $L = 20 \mu\text{s}$)

L'ajout de ligand dans la solution d'uranium résulte en une baisse du signal, jusqu'à son extinction totale pour des concentrations en ligand de l'ordre de 10^{-2}M : le spectre de départ est le spectre noir, caractéristique de la fluorescence de l'uranyle. Nous n'avons observé aucune modification spectrale de la fluorescence, seule une variation du temps de vie de $(1,9 \pm 0,2) \mu\text{s}$ (U(VI) libre) à $(0,5 \pm 0,1) \mu\text{s}$. Ceci indique que la baisse de la fluorescence est due à des phénomènes de quenching dynamique (Annexe 2). Nous cherchons donc à vérifier s'il est possible de modéliser cette extinction de la fluorescence par l'équation de Stern-Volmer (Figure 42).

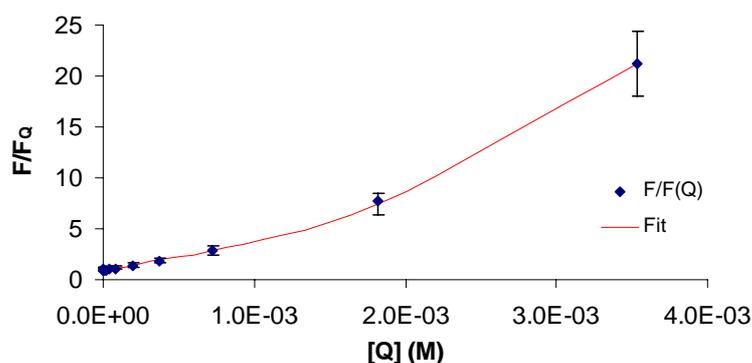


Figure 42 : Modélisation à l'aide de l'équation de Stern-Volmer : constante de quenching U(VI)-Cys pH 2 (Q=quencher=Cystéine)

L'équation de Stern-Volmer permet de bien décrire les données expérimentales. La valeur de la constante de quenching déterminée est $K_{\text{SV}} = (1850 \pm 50) \text{M}^{-1}$. Il est à noter qu'une étude récente de ce même système a été publiée, les auteurs ont observé une inhibition de la fluorescence et mesuré une constante de quenching de : $K_{\text{SV}} = (3840 \pm 40) \text{M}^{-1}$ (Günther *et al.*, 2007). L'équipe de Günther a travaillé à pH 3, avec une concentration en U de $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$. La raison probable de l'écart entre les valeurs mesurées provient des paramètres de largeur de porte choisis pour les mesures de SLRT.

Nous avons fixé ce paramètre à 10 fois la valeur du temps de vie de U(VI) libre, soit $L = 20 \mu\text{s}$, ce qui permet d'observer la décroissance totale de cette espèce. L'autre équipe a fixé ce paramètre à $2 \mu\text{s}$ seulement, ceci « tronque » l'ensemble de la fluorescence mesurée, elle apparaît donc diminuer plus rapidement, d'où une valeur plus élevée de leur constante de quenching.

Nous concluons qu'à pH 2, nous n'observons pas de complexation entre l'uranium et la cystéine mais bien des interactions de type « collisionnelles ».

3.2.2. Résultats à pH 4

A pH 4, il convient de diminuer la concentration de travail en uranyle afin d'éviter la formation d'espèce polynucléaires (cf. diagramme de spéciation, Figure 5) ainsi que la formation en d'espèces hydrolysées de l'uranyle en grande quantité car celles-ci ont un fort rendement de fluorescence et seraient susceptibles de masquer le signal que nous souhaitons observer. Nous nous plaçons donc à une concentration en uranyle, 10 fois plus basse que pour les expériences à pH 2, soit $4.2 \cdot 10^{-7} \text{M}$. Les spectres mesurés sont présentés Figure 43.

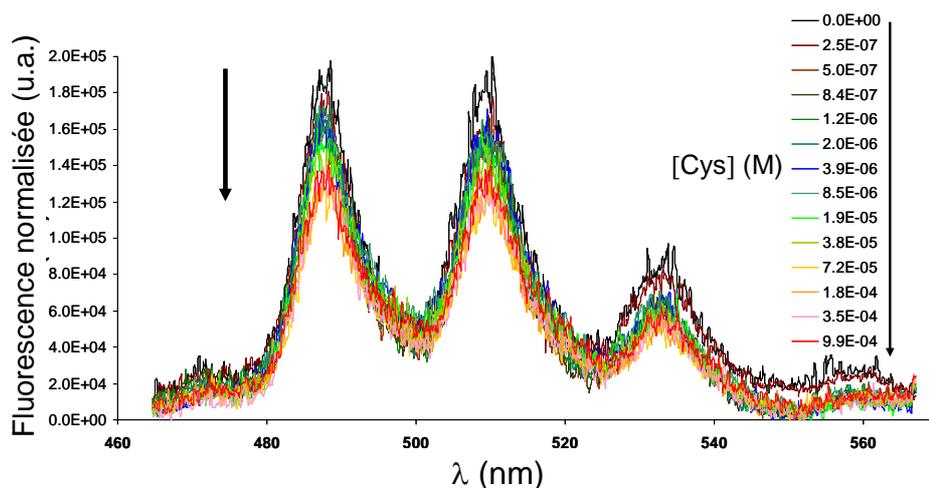


Figure 43 : Dosage U ($4,2 \cdot 10^{-7} \text{M}$)-Cystéine (de 0 à $3,5 \cdot 10^{-3} \text{M}$) à pH 4 par SLRT ($E_{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$; $E_{\text{laser}} = 1,0 \text{ mJ}$; $D = 0,2 \mu\text{s}$; $L = 20 \mu\text{s}$)

Nous observons à nouveau une diminution de la fluorescence de l'uranyle, mais dans une moindre mesure. De plus, seule une faible baisse du temps de vie de fluorescence est observée : de $(1,9 \pm 0,2) \mu\text{s}$ à $(1,6 \pm 0,2) \mu\text{s}$ (ce qui fait partie de l'incertitude de mesure du temps de vie pour des solutions de ce type, évaluée à 15%, Annexe 6).

Nous notons cette fois, la présence d'un palier à partir de $70 \mu\text{M}$ de cystéine. Les trois derniers spectres se superposent : la fluorescence ne diminue plus.

Le quenching dynamique (courbe de gauche (bleue), Figure 44) ne permet pas de rendre compte du « palier » observé.

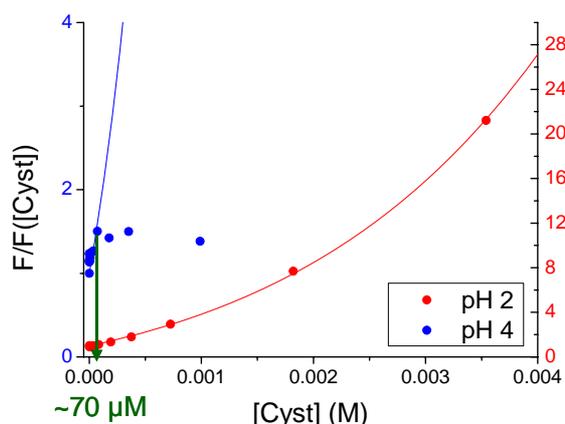


Figure 44 : Modélisation à l'aide de l'équation de Stern-Volmer de la fluorescence de U(VI) + Cys pH 4

Il est peu probable que la cystéine ait un effet d'inhibition de la fluorescence différent selon son état de protonation, par contre, s'il y a complexation, la proportion de complexe formé augmente avec le pH et la concentration en cystéine ajoutée. Il est donc possible que le palier observé soit dû à la compétition entre du quenching et la fluorescence d'une autre espèce. Si nous comparons les spectres enregistrés juste avant le palier et suite au dernier ajout de cystéine, nous observons par déconvolution, la présence d'une espèce (spectre du bas (rose), Figure 45) différente de l'uranium libre :

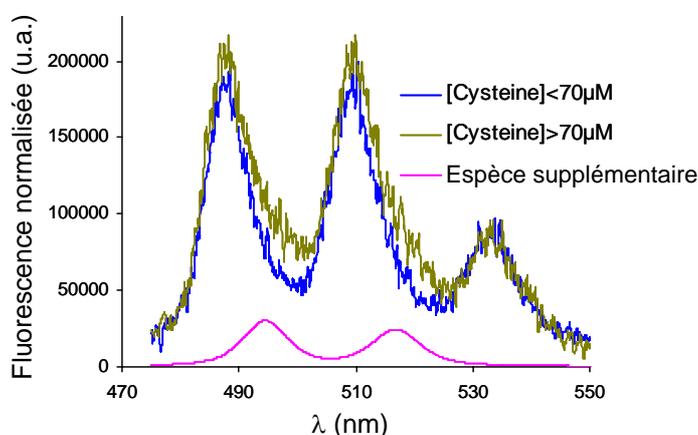


Figure 45 : Déconvolution

Les transitions observées ont lieu à 494,5 nm et 517 nm. Nous n'avons pas identifié cette espèce, elle n'est pas référencée dans la littérature comme une espèce hydrolysée de l'uranyle. La présence d'un complexe uranium cystéine est donc envisageable puisque divers complexes de l'uranium présentent des transitions de fluorescence à ces longueurs d'onde.

Nous observons donc une « saturation » du phénomène de quenching dû à la cystéine au-delà d'une concentration de 70 µM. Une espèce complexée que nous supposons être un complexe uranium-cystéine est également présente en solution. A partir de 70 µM en cystéine, son spectre ne semble plus évoluer, la complexation est donc maximale à ce stade, mais la réaction n'est pas

totale puisque nous continuons d'observer une grande quantité d'uranium libre en solution. Les intensités des raies du spectre sont trop faibles pour permettre d'évaluer la constante de formation de cette espèce.

Afin de statuer sur la complexation de l'uranium par la cystéine, il conviendrait donc de réaliser un dosage par spectrophotométrie UV-Visible, à une concentration en uranium de l'ordre de 10 mM au moins, afin d'observer des variations de densité optique suffisante au cours du dosage. Ces concentrations en uranium n'ayant aucune signification « biologique », nous n'avons pas fait ce dosage. Cependant, afin de vérifier s'il existe une complexation, nous avons comparé les spectres d'une solution d'uranium libre (4 mM) et d'une solution d'uranium avec de la cystéine, à pH 3 (Figure 46).

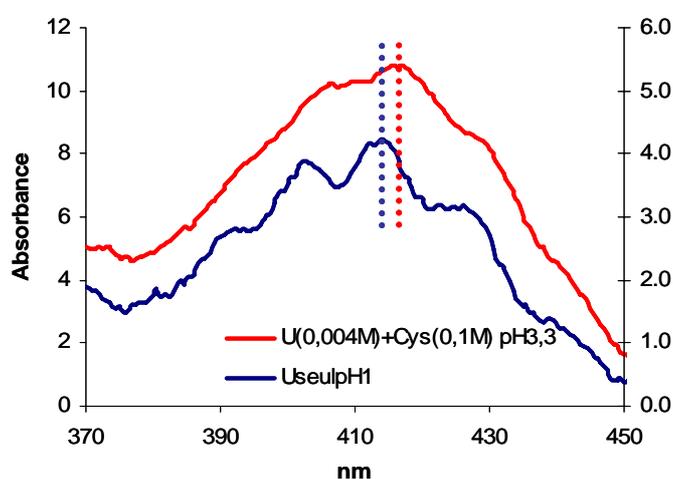


Figure 46 : Spectres d'absorption UV-Vis de solutions d'uranium libre et en présence de cystéine, à pH 3

En présence de cystéine, le spectre d'absorption de U(VI) (en bleu) est décalé d'environ 3 nm vers les grandes longueurs d'onde. La structure fine du spectre observable à pH 1 est moins bien définie en présence de ligand. L'intensité globale est en revanche doublée. Ces observations sont compatibles avec la présence d'une espèce complexée de U en solution. Ces observations sont en accord avec l'étude récente de Günther (Günther *et al.*, 2007).

4. Interactions avec l'acide glutamique

L'importance de l'acide glutamique dans les sites de complexation des protéines a été soulignée Chapitre 1. Sa spéciation en fonction du pH est présentée Figure 47.

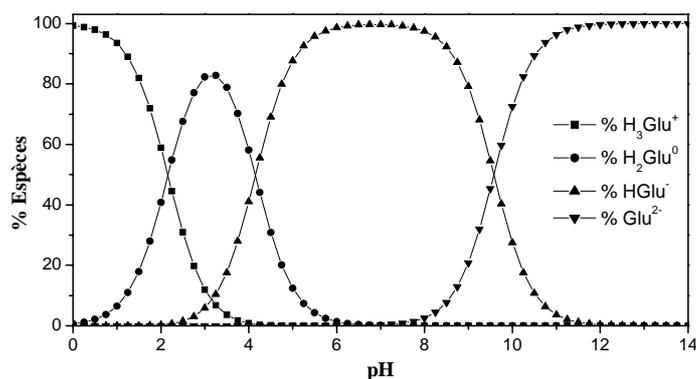
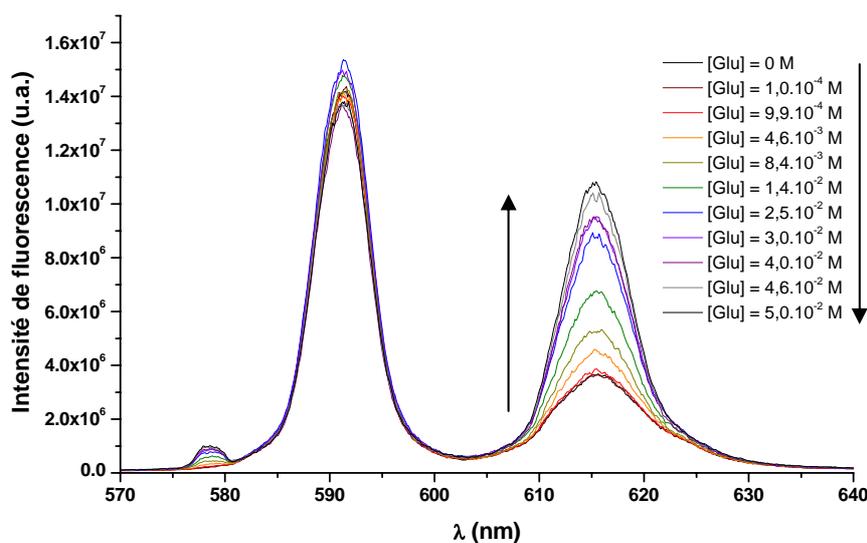
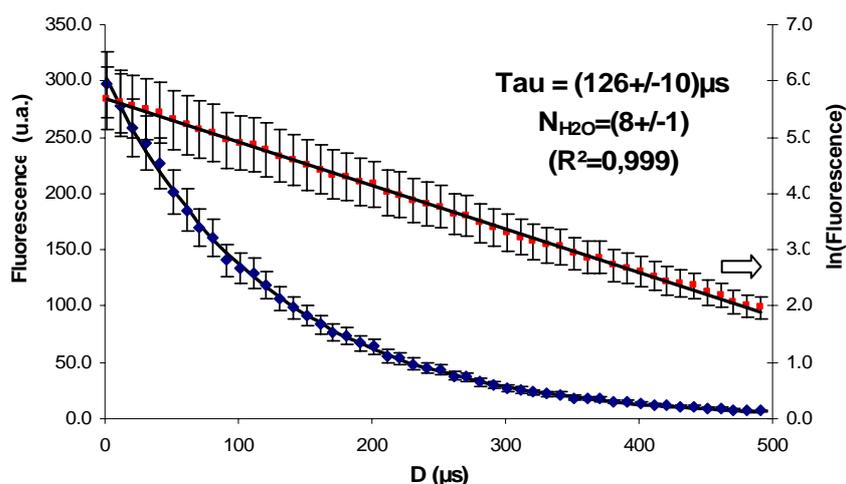


Figure 47 : Diagramme de spéciation de l'acide glutamique

Les ajouts d'acide glutamique à pH 3 (Figure 48) provoquent des modifications importantes du spectre de Eu libre, en particulier une forte augmentation de l'intensité de fluorescence de la transition hypersensible $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ à 615 nm. L'intensité de la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ à 592 nm varie peu. La perte de centrosymétrie autour de Eu est confirmée par l'apparition de la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$ à 579 nm.

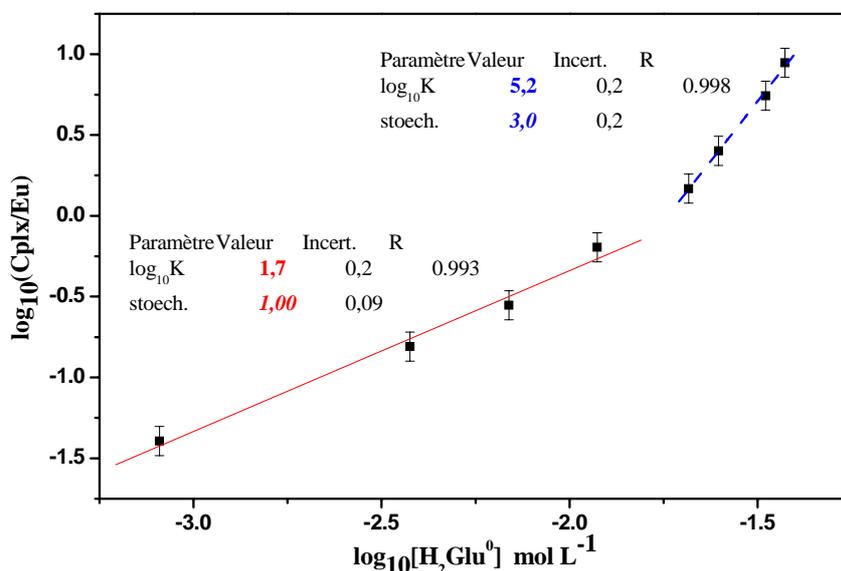

 Figure 48 : Dosage Eu (10^{-6} M)-Acide glutamique (de 0 à 0,05 M) à pH 3 par SLRT ($E_{exc} = 395,7$ nm ; $E_{laser} = 0,9$ mJ ; $D = 1$ μs ; $L = 500$ μs)

A l'aide de l'Équation 37 de l'Annexe 3, l'ajustement du temps de vie à 615 nm, est réalisé (Figure 49).


 Figure 49 : Evaluation du temps de vie du complexe Eu+Glu à pH 3 (Eu(10^{-5} M)+Glu(10^{-2} M))

À pH 3, l'ajustement du temps de vie montre la perte d'une molécule d'eau en première sphère de coordination de Eu. À ce pH, seule la fonction carboxylate est déprotonée. Ce résultat suggère donc une complexation monodente avec la fonction carboxylate de l'acide glutamique, comme avec la cystéine, au même pH.

Selon la méthode présentée en Annexe 4, la Figure 50 illustre la détermination de la stoechiométrie de l'espèce formée et sa constante de formation.


 Figure 50 : Stoechiométrie et constante de formation d'un complexe : dosage Eu (10^{-5} M)-Acide glutamique (de 0 à 0,05 M) à pH 3

L'espèce principale formée est de stoechiométrie (1:1), la constante conditionnelle mesurée vaut : $\log_{10} K_1 = 1,7 \pm 0,2$. L'écart des points mesurés pour des concentrations en ligand plus élevée ne peut pas être expliqué par des variations importantes de la force ionique des échantillons. Nous observons donc la formation d'une autre espèce, son temps de vie a été mesuré, il vaut également

(125 ± 10) μ s. La représentation de la Figure 50 ne permet pas de déterminer des stoechiométries supérieures à 1. La droite bleue indique : la présence d'un autre complexe (car les points sont sur une même droite), de stoechiométrie supérieure à 1. La valeur du temps de vie mesuré suggère une complexation par une fonction carboxylate, celle de la chaîne latérale de l'acide glutamique.

Dans la littérature, une donnée Sm-Acide glutamique est disponible, le complexe est de stoechiométrie (1:1) et la constante mesurée vaut $\log_{10} K_1 = 3,9$ (Deng *et al.*, 1991). Cette valeur qui n'est pas en accord avec celle que nous avons déterminée, rend toutefois peut être compte de la complexation de Sm avec la fonction carboxylate de la chaîne latérale de cet AA.

5. Interactions avec l'histidine

L'histidine ne fait pas partie des acides aminés précurseurs des PC, néanmoins elle est omniprésente dans les cellules, en quantité non négligeable (environ 10^{-4} M) et son rôle en matière de complexation des métaux lourds a déjà été évoqué.

La spéciation de l'histidine en fonction du pH est illustrée par le diagramme Figure 51, elle est complétée par une illustration de l'état de protonation de la molécule.

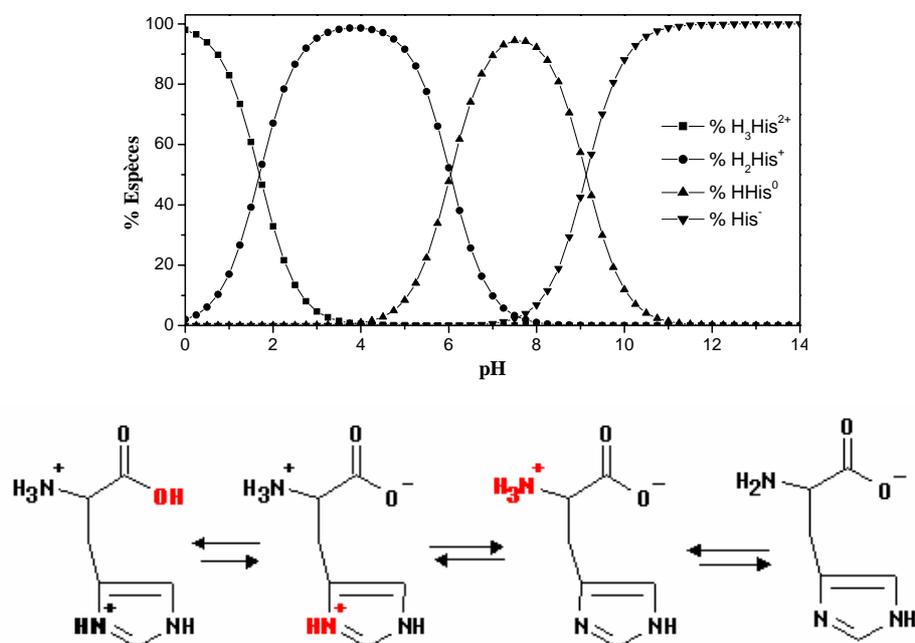


Figure 51 : Diagramme de spéciation de l'Histidine et détail de la déprotonation de la molécule

Quatre études ont été consacrées aux interactions de Ln avec l'histidine (Jones et Williams, 1970; Jones et Williams, 1971; Reddy et Rao, 1986; Torres *et al.*, 2002). L'étude de Torres, menée avec Ln = La, Pr, Nd, Sm, Gd, Dy et Er (électrode de verre, 35°C, I=0,1M KNO₃) ne reporte que la formation d'espèces (1:1) de type LnHHis dont les logarithmes des constantes de formation sont compris entre 3,4 et 4,1. L'étude du système Sm + His (électrode de verre, 35°C, I=0,15M

NaClO₄) par Reddy conclut à la formation de SmH₃His₃ avec une constante de 33,42. L'équipe de Jones a réalisé deux études, l'une à 25°C et l'autre à 37°C, dans les mêmes conditions (électrode de verre, I=3M NaClO₄). Les valeurs des constantes sont plus faibles d'environ 0,6 unité log à 37°C. Elle reporte les constantes de formation d'espèces LnHis, LnHis₂ et LnHHis avec Ln = La, Pr, Nd, Sm, Gd, Dy, Er et Yb. Les constantes de formation de LnHHis déterminées sont de l'ordre de 12, elles ne sont pas en accord avec celles de Torres, l'écart ne peut être dû au seul effet de la différence de force ionique entre ces deux études. Il existe un doute sur la nature des espèces formées.

5.1. Dosage Eu-His à pH 3 par SLRT

L'évolution de la fluorescence de Eu en fonction des ajouts d'histidine à pH 3 est illustrée Figure 52.

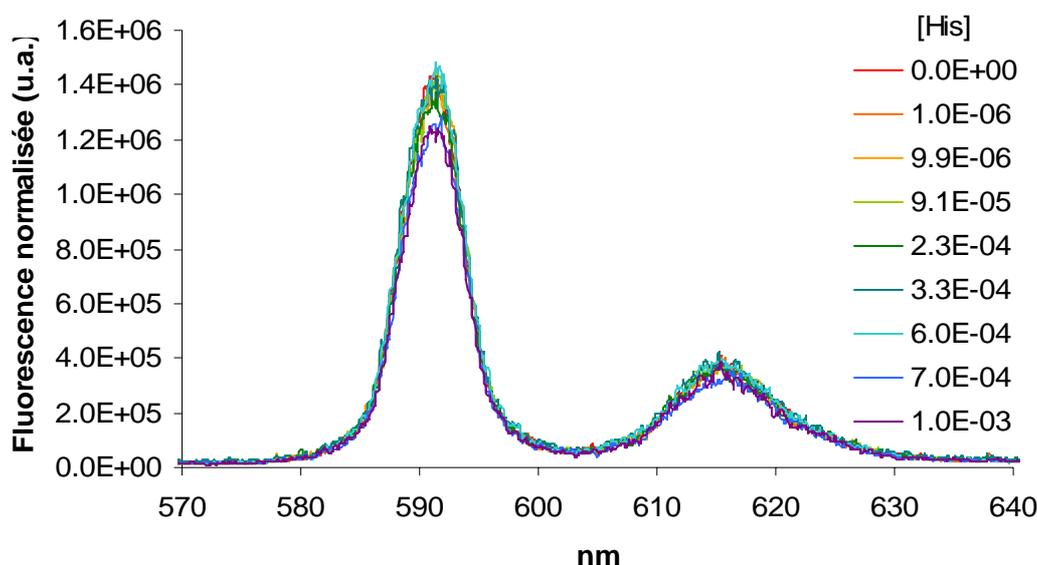


Figure 52 : Dosage Eu (10⁻⁶M)-Histidine (de 0 à 0,001 M) à pH 3 par SLRT (E_{exc} = 395,2 nm ; E_{laser} = 0,7 mJ ; D = 1 μs ; L = 500 μs)

Aucune complexation n'est observée alors qu'à pH 3, la déprotonation de la fonction carboxylate n'est pas négligeable. En réalité, ceci ne traduit pas une absence totale de complexation mais le fait que le ligand ne se trouve pas, pour des raisons de limite de solubilité, suffisamment concentré en solution pour que le pourcentage de complexe soit suffisant pour être observé dans ces conditions. En effet, la concentration maximale en histidine lors de ce dosage est 50 à 500 fois inférieure aux concentrations mises en œuvre lors des dosages avec la cystéine et l'acide glutamique.

5.2. Effet du pH sur la complexation par l'histidine

Le but de cette expérience est de déterminer si une augmentation du pH permet d'observer une complexation plus forte donc visible même si la concentration en histidine est faible. Cette concentration est tout de même multipliée par 50 par rapport à l'expérience précédente.

L'évolution de la fluorescence de la solution $[Eu] = 10^{-6}M$ et $[His] = 0,05M$ en fonction du pH est présentée Figure 53.

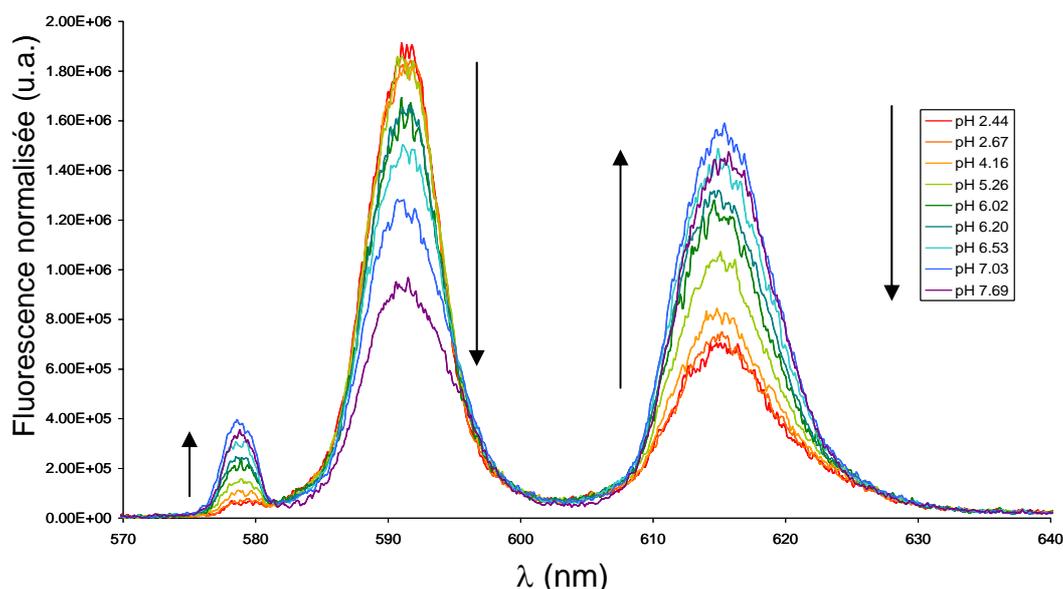


Figure 53 : Fluorescence de solutions de Eu à $10^{-6}M$ avec $[His]=0,05M$, en fonction du pH ($E_{exc} = 395,2 \text{ nm}$; $E_{laser} = 0,7 \text{ mJ}$; $D = 1 \mu s$; $L = 500 \mu s$)

Le rendement de fluorescence diminue pour la transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ (à 592 nm) et augmente pour la transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ (à 615 nm), lorsque le pH augmente. Un pic de fluorescence apparaît à 579 nm, ce qui correspond à la transition vers le niveau 7F_0 . Ces observations reflètent la formation d'un ou de plusieurs complexe(s).

L'évolution du rapport des intensités de fluorescence des deux transitions principales en fonction du pH est présentée Figure 54.

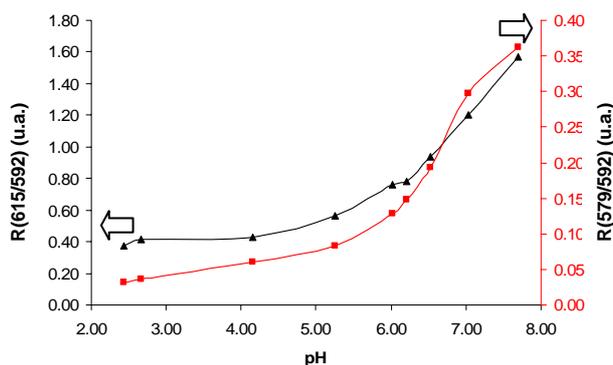


Figure 54 : Evolution des rapports des intensités de fluorescence ($\text{Eu}+\text{His}=f(\text{pH})$)

L'évolution des rapports des pics entre pH 2,5 et pH 7 indique la formation d'au moins une nouvelle espèce, à pH 7,7. La valeur initiale de ces rapports est caractéristique du spectre de Eu libre, ce qui confirme le fait que même à une concentration de 0,05M en histidine, le pourcentage de complexe formé à pH 3 est faible pour une détermination viable de la constante de formation de cette espèce.

5.3. Caractérisation des espèces par résolution temporelle à pH 7,7

Afin de s'affranchir de l'influence du spectre de Eu éventuellement encore libre en solution et dont le temps de vie vaut 110 μs , un spectre a été enregistré dans des conditions qui favorisent l'observation du ou des complexe(s) : $D = 500 \mu\text{s}$ et $L = 500 \mu\text{s}$ (Figure 55).

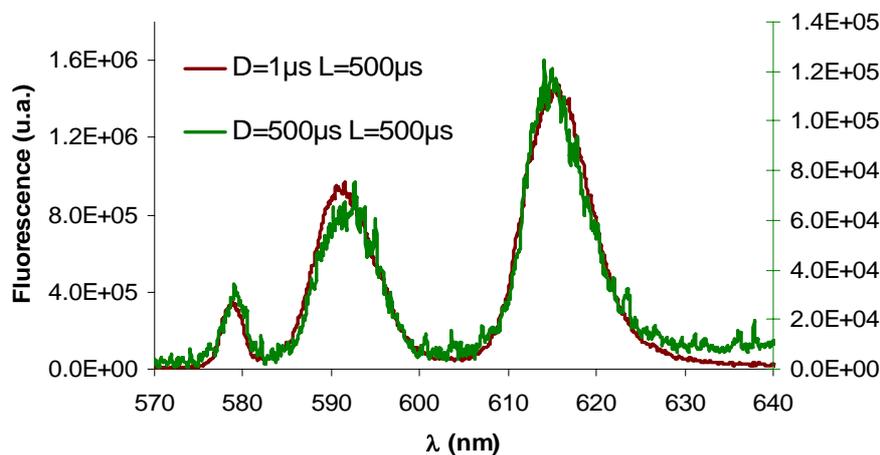


Figure 55 : Comparaison des spectres mesurés pour $D=1\mu\text{s}$ et $D=500\mu\text{s}$ sur une solution Eu (10^{-6}M) + Histidine ($0,05\text{M}$) pH 7,7 ($\lambda_{\text{exc}} = 395,2 \text{ nm}$; $E \sim 0,7\text{mJ}$; $L=500\mu\text{s}$)

A pH 7,7, il y a probablement de l'hydrolyse en plus, cependant les temps de vie des hydroxydes sont courts (ils valent entre 30 et 50 μs selon la stœchiométrie de l'hydroxyde considéré (Plancque *et al.*, 2003)). Le spectre mesuré avec un délai de 500 μs est donc caractéristique d'une espèce Eu-Histidine, probablement la même espèce que l'on commençait à voir se former à pH 3, l'augmentation du pH résulte en une augmentation de la constante conditionnelle de formation de

cette espèce, qui devient observable dès les plus faibles augmentations du pH. La superposition satisfaisante des deux spectres (à la résolution près), montre la présence d'une seule espèce en solution.

Une mesure de temps de vie (à la longueur d'onde maximale de fluorescence) est réalisée afin de caractériser l'espèce en solution (Figure 56).

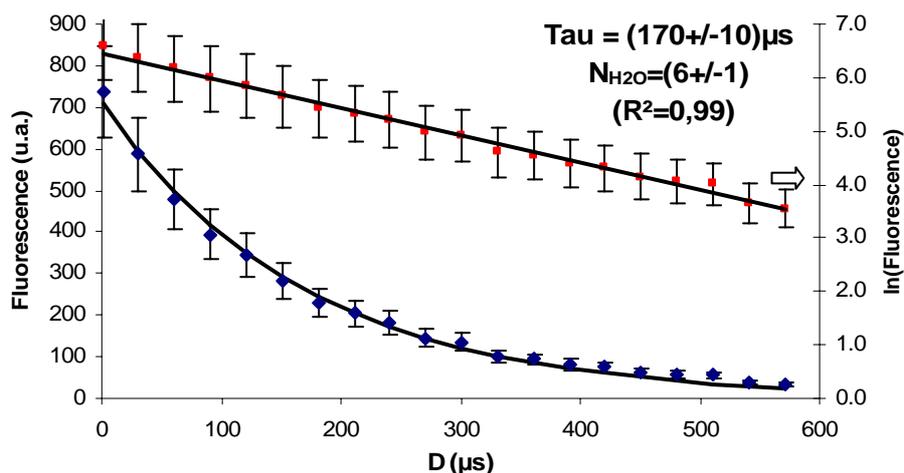


Figure 56 : Evaluation du temps de vie du complexe Eu ($10^{-6}M$) + Histidine (0,05M) pH 7,7

L'ajustement monoexponentiel de la décroissance du signal de fluorescence en fonction du temps est très satisfaisant ce qui confirme la présence d'une seule espèce en solution.

A pH 7,7 le complexe de Eu avec l'histidine a donc un temps de vie de $(170 \pm 10) \mu s$, ce qui correspond à la perte de 3 molécules d'eau autour du cation, d'après l'Équation 11. Cette perte est compatible avec une complexation bidente par la fonction carboxylate de l'histidine. Un dosage complet à ce pH serait nécessaire afin de conclure quant à la stoechiométrie de l'espèce formée et permettrait de déterminer la constante de formation associée.

6. Conclusion

Le Tableau 18 récapitule l'ensemble des données acquises dans ce chapitre.

Tableau 18 : Résumé des résultats obtenus au cours de ce chapitre

Technique	Ligand	RN	pH	Stoech.	$\log_{10}K$	τ (μ s)	N_{H_2O}
SLRT	Cystéine	Eu	3	1:1	$0,9 \pm 0,2$	125 ± 10	8 ± 1
SLRT	Cystéine	Eu	5	1:1	$1,1 \pm 0,2$	70 ± 10	/
SLRT	Cystéine	U	2	Extinction de fluorescence (quenching dynamique) : $K_{SV} = (1850 \pm 50) M^{-1}$			
SLRT	Cystéine	U	4	Quenching et complexation			
UV-Vis	Cystéine	U	1 et 3	Complexation			
SLRT	Acide glutamique	Eu	3	1:1 (voire suppl.)	$1,7 \pm 0,2$	126 ± 10	8 ± 1
SLRT	Histidine	Eu	3	Complexation très faible, non quantifiable			
SLRT	Histidine	Eu	7,7	Complexation		170 ± 10	6 ± 1

Les études réalisées sur les acides aminés ont montré que les constantes de complexation avec les radionucléides étaient plutôt proches des valeurs basses de la littérature : $\log_{10} K_{1,1} < 2$. Dans tous les cas, les espèces formées sont des espèces mononucléaires avec une seule molécule de ligand (1:1). L'interaction se fait *via* les groupements durs (donneurs oxygénés : acide carboxylique). Compte-tenu du nombre de molécules d'eau en sphère interne de coordination : la complexation observée est monodente.

La suite des études a été consacrée aux expérimentations dans des conditions se rapprochant des conditions biologiques (pH 5 ou pH 7,7). Ces études montrent que le mode de coordination avec ces molécules ne change pas, la stœchiométrie des espèces formées reste la même.

Le chapitre suivant est consacré à l'analyse d'édifices moléculaires de taille plus importante : les polypeptides. Ils sont en effet constitués de l'enchaînement de plusieurs acides aminés et sont des intermédiaires lors de la synthèse des phytochélatines. Ces études nous permettront de déterminer s'il existe une influence de la géométrie et de la taille des édifices lors de la complexation des radionucléides.

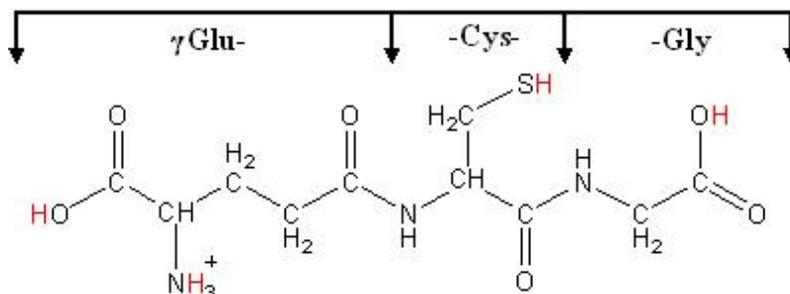
Chapitre 4

ETUDES DES RN AVEC LES POLYPEPTIDES

1. Les polypeptides précurseurs des PC

1.1. Le glutathion réduit

Le glutathion (GSH) est un tripeptide naturel important dont la séquence est la suivante : γ - glutamyl - L - cysteinyl - glycine (Figure 57). C'est un constituant normal et essentiel de toutes les cellules vivantes et le constituant intracellulaire non protéique soufré le plus important (Rabenstein *et al.*, 1979). A titre d'exemple, sa concentration moyenne dans les cellules d'*Arabidopsis* vaut $(3,0 \pm 0,5)$ mM (Meyer *et al.*, 2001).

Figure 57 : Molécule de GSH : H₄L⁺

Le GSH, comme la cystéine, existe sous forme réduite : GSH, ou oxydée : GSSG, où deux molécules de glutathion réduit s'unissent par un pont disulfure. Dans les cellules de mammifères, moins de 0,5% du glutathion total se trouve sous forme oxydée, la glutathion reductase le maintenant sous sa forme réduite. Dans des conditions normales, les cellules maintiennent le rapport GSH/GSSG à un niveau élevé, assurant ainsi une disponibilité en forme réduite du glutathion qui fait face aux radicaux libres.

La biosynthèse du GSH chez la levure (Lafaye *et al.*, 2005) est décrite Figure 58. Les enzymes qui catalysent les réactions figurent en noir.

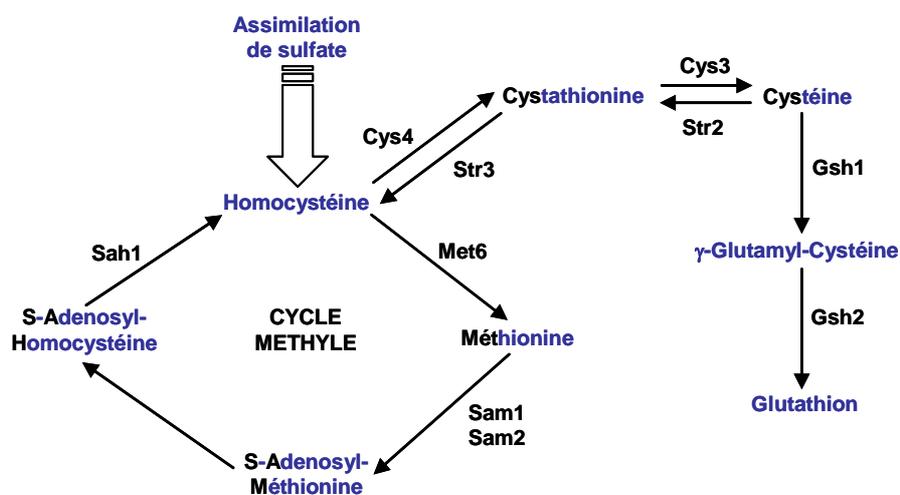
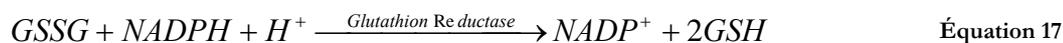


Figure 58 : Biosynthèse du GSH chez la levure

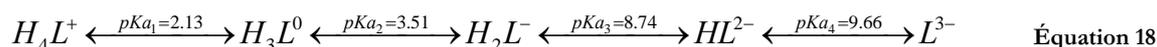
Le GSH a un rôle capital dans la protection contre la formation et les effets des radicaux libres. En particulier, il intervient dans :

- la protection et le maintien des thiols protéiques,
- la détoxification des xénobiotiques et des composés endogènes et,
- la destruction des peroxydes.

L'Équation 15 et l'Équation 16 représentent deux voies de formation du GSSG par oxydation du GSH. L'Équation 17 correspond à la réduction du GSSG en GSH.



Le GSH peut être noté sous la forme H_4L^+ puisque quatre valeurs de pKa existent à 25°C et I=0,1M (KNO_3) (Krezel et Bal, 2004) :



Ceci conduit au diagramme de spéciation suivant :

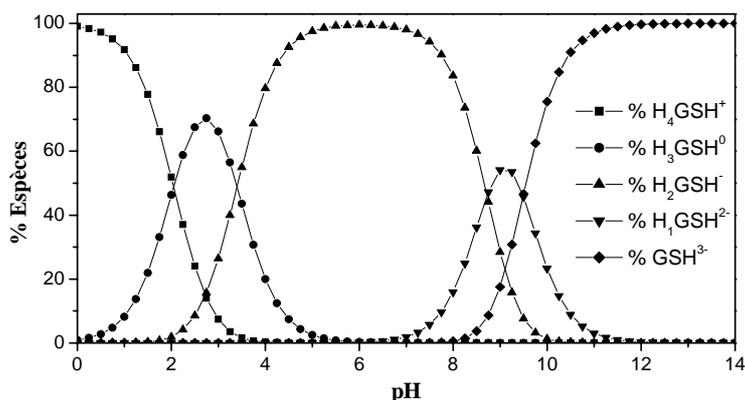


Figure 59 : Diagramme de spéciation du GSH

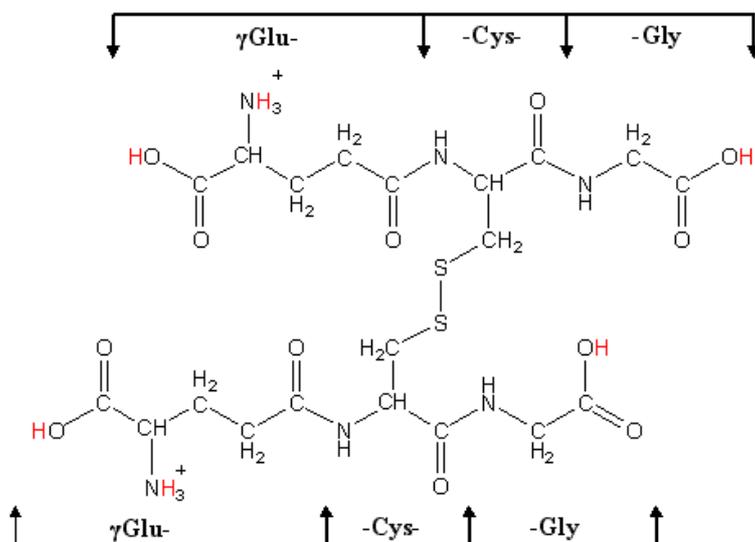
Les études sur le GSH sont nombreuses avec les métaux de transition. Ils sont peu analogues des RN. Néanmoins, le vanadium a une chimie proche de celle du Fe(III), ion dur, dont les protéines spécifiques (sidérophores) servent de modèles pour élaborer des molécules décorporantes des RN. En effet, le vanadium a une chimie très associée à l'oxygène, *via* la formation d'oxyanions et d'oxycations tels que VO_4^{2-} , VO^{2+} et VO_2^+ . Il interagit également préférentiellement avec le soufre, de la même façon que Fe est présent dans de nombreux clusters Fe-S. De nombreuses études ont montré que le GSH joue un rôle important dans la biochimie du vanadium : V(V) est réduit en oxovanadium VO^{2+} par le GSH notamment dans les cellules (Dessi *et al.*, 1993; Ferrer *et al.*, 1993). Le GSH est ensuite encore susceptible de se lier à l'oxovanadium : V(IV) ainsi produit. Dans les cellules, V, métal non essentiel, est ensuite stocké dans la vacuole, à pH 2, sous forme V(III).

Une seule donnée concernant les interactions Ln-GSH est disponible dans la littérature. Il s'agit d'un article rédigé en Chinois (Ren *et al.*, 1994), étudiant les interactions Ln-GSH par RMN du ^{13}C . La seule donnée quantitative de cet article correspond à l'étude de l'euporium avec le GSH à pH < 5. L'espèce majoritaire semble être une espèce de stoechiométrie (2:1) dont les constantes de complexation avec les fonctions carboxylate valent : $\log_{10}K_1=1,1$ (coordination par le COO^- du résidu acide glutamique) et $\log_{10}K_1=2,0$ (coordination par le COO^- du résidu glycine).

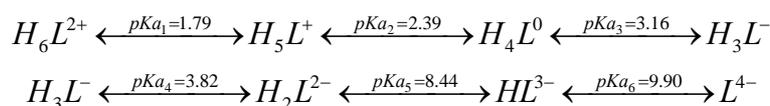
1.2. Le glutathion oxydé

Le glutathion oxydé (GSSG) peut représenter jusqu'à 1 à 2% du GSH.

La Figure 60 représente la structure du glutathion oxydé.


 Figure 60 : Molécule de GSSG (GSH oxydé) : H_6L^{2+}

Le GSSG peut être noté sous la forme H_6L^{2+} puisque six valeurs de pKa existent à 25°C et I=0,1M (KNO₃) (Varnagy *et al.*, 1988) :



Équation 19

Ceci conduit au diagramme de spéciation suivant :

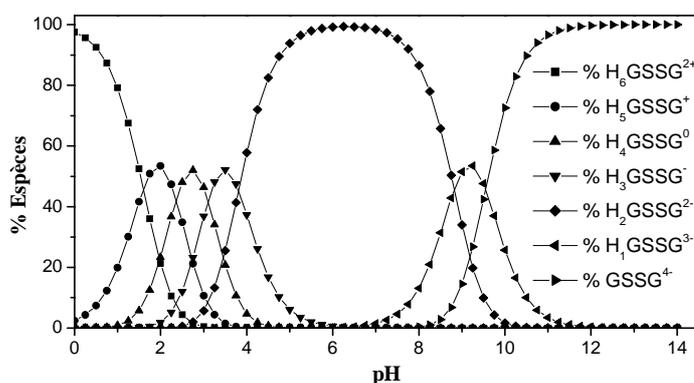


Figure 61 : Diagramme de spéciation du GSSG

Alors que les atomes de soufre donneurs sont impliqués dans un pont disulfure, donc non liants vis-à-vis du métal, le GSSG contient deux fois plus de sites donneurs potentiels que le GSH (14 au total). Ainsi, en fonction du pH, du cation et de la composition de la solution, une grande variété de coordinations est possible à partir des sites disponibles des AA_α ($\alpha-COO^-$ et NH_3^+), les atomes d'oxygène des fonctions carbonyle (O_{amide}), le carboxylate du groupe glycyl et les atomes d'azote déprotonés (N_{amide}).

Aucune structure de complexes VO^{2+} -GSH ou VO^{2+} -GSSG n'a été étudiée par diffraction des rayons X (Costa Pessoa *et al.*, 2001).

L'étude de Costa Pessoa *et al.* a été menée entre pH 2 et 11 par potentiométrie, Résonance Paramagnétique Electronique (RPE), absorption UV-Vis et dichroïsme circulaire (Costa Pessoa *et al.*, 2001). Les données obtenues en RPE sont susceptibles de fournir des informations sur les groupes coordonnés à l'oxovanadium(IV). Des techniques comme le dichroïsme circulaire sont surtout utiles lorsque le système étudié comporte des AA optiquement actifs.

Concernant la complexation avec VO^{2+} , seuls des complexes mononucléaires ont été observés. A partir des courbes de dichroïsme circulaire, à pH 3 : $\log_{10} \beta_{1,1} = 24,8$. De plus, aucune des hypothèses de formation des complexes 2:1 ou 1:2 n'a été concluante.

La structure des complexes observés avec plusieurs métaux de transition 3d est de type bis-acide aminé (Figure 62) :

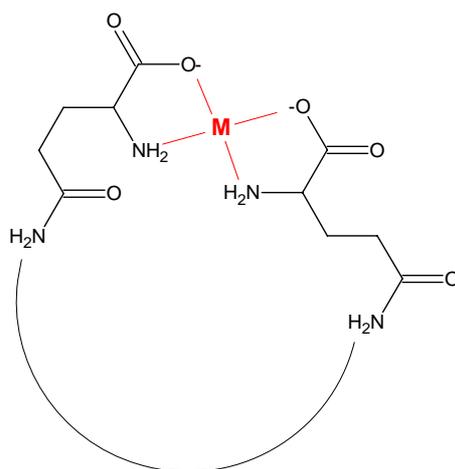


Figure 62 : Coordination de type bis-AA

Entre pH 4 et 7, les études précédemment citées montrent que le GSSG est un ligand 6 à 7 fois plus fort que le GSH pour VO^{2+} . La coordination du GSSG est de type bidentate (comme les AA simples).

Nous avons par conséquent étudié la complexation avec le GSH ainsi que sa forme oxydée GSSG.

2. Interactions avec le GSH et le GSSG

L'ensemble des études réalisées sur la complexation du GSH, du GSSG, des PC et des MT est détaillé Tableau 19.

Tableau 19 : Etudes RN-polypeptides réalisées

Ligand ([L] en M)	RN ([RN] en M)	pH	Techniques d'analyse
GSH (0 à 0,5)	Eu (10^{-5})	3	SLRT
GSH (10^{-4} à 10^{-2})	Eu (10^{-4})	3	ES-SM
GSH (0 à 0,3)	Eu (10^{-6})	6	SLRT
GSH (0 à 10^{-2})	U ($4,2 \cdot 10^{-5}$)	2	SLRT
GSSG (0 à 0,1)	Eu (10^{-5})	3	SLRT
GSSG (0 à 0,1)	Eu (10^{-6})	6	SLRT
GSH (>0,1)	Eu (0,05)	3 ou 5	RMN, ATR-IRTF, EXAFS
GSSG (>0,1)	Eu (0,05)	3 ou 5	RMN, ATR-IRTF, EXAFS
GSH (>0,1)	U ($4 \cdot 10^{-3}$)	1 et 3	UV-Vis, RMN, ATR-IRTF, EXAFS
GSSG (>0,1)	U ($4 \cdot 10^{-3}$)	3	UV-Vis, RMN, ATR-IRTF, EXAFS
PC ₂ , PC ₃ et PC ₄ (0 à 10^{-3})	Eu ($5 \cdot 10^{-5}$ et 6)	3	SLRT
PC ₂ , PC ₃ et PC ₄ (10^{-4})	Eu (10^{-4})	3	ES-SM
MT ($\sim 2 \cdot 10^{-4}$)	Eu (10^{-6})	3	SLRT

2.1. Interactions avec le GSH

Nous avons fait des études à pH acide (pH 2 ou 3) et proche de la neutralité (pH 6). Le mode de préparation des échantillons dépend du pH de travail.

A pH proche de la neutralité, il convient de se placer dans des conditions permettant d'éviter la présence de carbonates en solution notamment, car la complexation par ces ligands rentrerait en compétition avec les ligands que nous étudions. Ainsi, toutes les préparations d'échantillons à pH 6 ont été réalisées sous atmosphère inerte (dans une boîte à gants sous courant de N₂ afin d'éviter la carbonatation des solutions par échange avec le CO₂ de l'air), seules les pesées des solides ont été faites à l'extérieur. De l'eau décarbonatée sert à mettre les solides en solution, un passage sous ultrasons pendant quelques minutes est nécessaire pour la mise en solution. Des ajouts de NaOH 1M (décarbonatée) sont faits pour ajuster le pH (les sauts de pH des ligands interviennent dans la zone du pH physiologique, or nous ne souhaitons pas ajouter de tampons pour ne pas ajouter de complexation non spécifique, nous nous sommes donc placés à pH 6, zone pour laquelle le pH des échantillons est correctement ajustable, leur composition n'évolue pas pendant les mesures).

Le pH des échantillons est mesuré à l'aide d'une électrode reconditionnée en milieu NaClO₄.

Afin de réaliser plusieurs fois le même dosage et également tester l'évolution des échantillons au cours du temps, les dosages ne sont pas faits en continu par ajouts successifs de ligand dans une solution de métal, mais préparés individuellement « en batch ».

Les études ont été faites pour plusieurs concentrations en Eu, ceci permet de montrer si des espèces polynucléaires sont présentes (si les constantes obtenues diffèrent).

La spéciation du ligand en fonction du pH a été présentée Figure 59. Nous avons choisi de travailler dans deux domaines distincts : à pH 3 et à pH 6.

2.1.1. Etudes de Eu-GSH à pH 3 par SLRT

Les spectres enregistrés pendant les dosages ainsi que l'évolution du rapport des intensités de fluorescence des deux pics principaux en fonction de la concentration en ligand sont représentés pour deux concentrations de travail en Eu (10^{-6}M : Figure 63 ; 10^{-5}M : Figure 64).

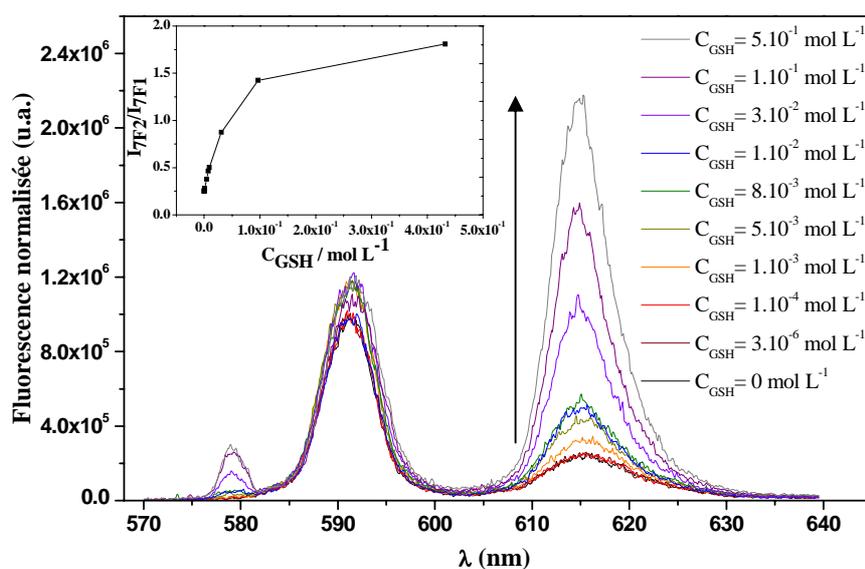


Figure 63 : Dosage Eu (10^{-6}M)-GSH (de 0 à 0,5M) à pH 3 par SLRT ($\lambda_{\text{exc}}=395,7\text{nm}$; $E_{\text{laser}}=0,9\text{mJ}$; $D=1\mu\text{s}$; $L=300\mu\text{s}$)

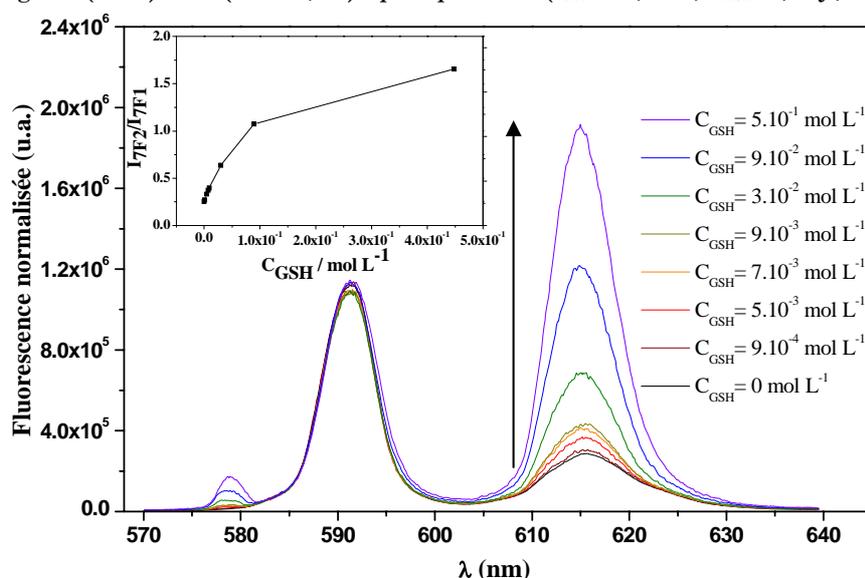


Figure 64 : Dosage Eu (10^{-5}M)-GSH (de 0 à 0,5M) à pH 3 par SLRT ($\lambda_{\text{exc}}=395,7\text{nm}$; $E_{\text{laser}}=0,9\text{mJ}$; $D=1\mu\text{s}$; $L=300\mu\text{s}$)

Les ajouts de GSH à pH 3 provoquent des modifications importantes du spectre caractéristique de Eu libre, en particulier une augmentation de l'intensité de fluorescence de la transition

hypersensible ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ à 615 nm est observée, alors que l'intensité de la transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ à 592 nm varie peu. L'apparition d'un palier dans l'évolution du rapport des intensités de fluorescence à partir de 0,1M en GSH, indique que la complexation maximale est atteinte. Pour les deux concentrations, la modification de l'environnement autour de Eu est confirmée par l'apparition de la transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ à 579 nm. Sa présence révèle la perte de centrosymétrie autour de Eu : c'est-à-dire le remplacement d'une ou plusieurs des 9 molécules d'eau entourant l'ion aquo libre par une ou plusieurs molécules de ligand.

Le nombre de molécules d'eau autour de Eu est déterminé à partir des mesures de temps de vie. Le temps de vie de la solution la plus concentrée en ligand a été mesuré (pour $[Eu]=10^{-5}M$ afin d'avoir un signal de fluorescence suffisant).

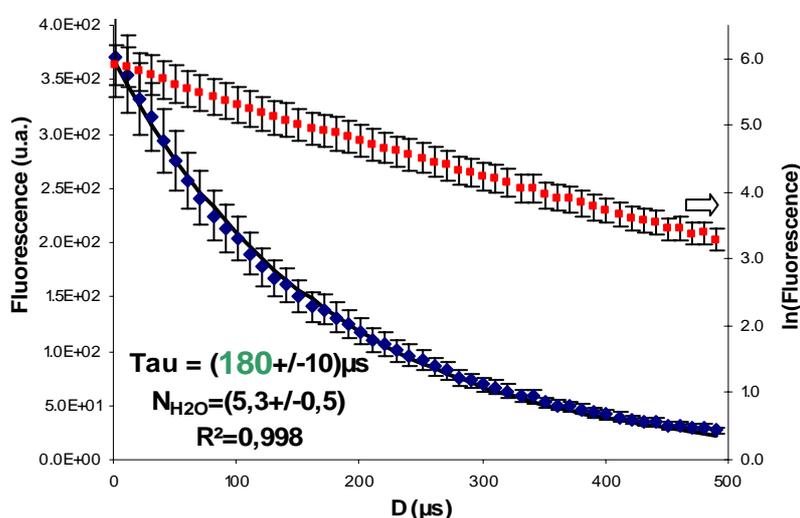
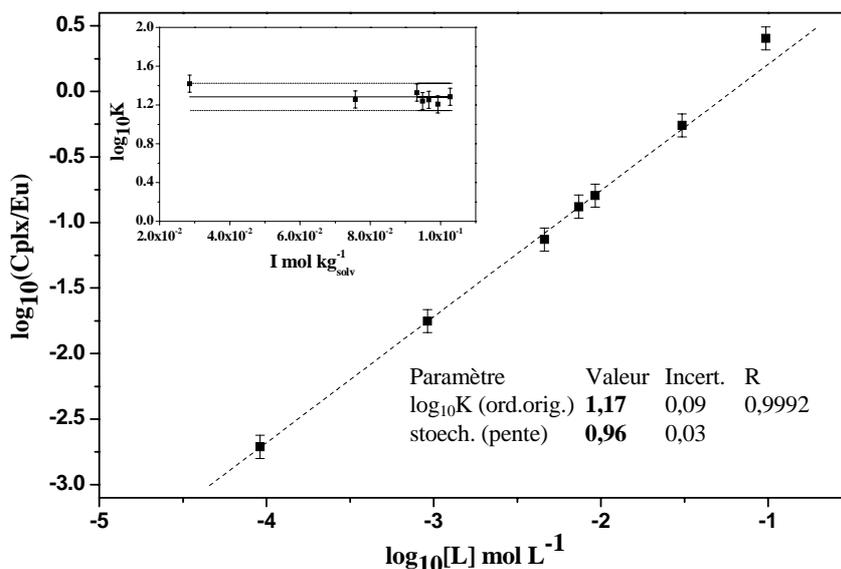
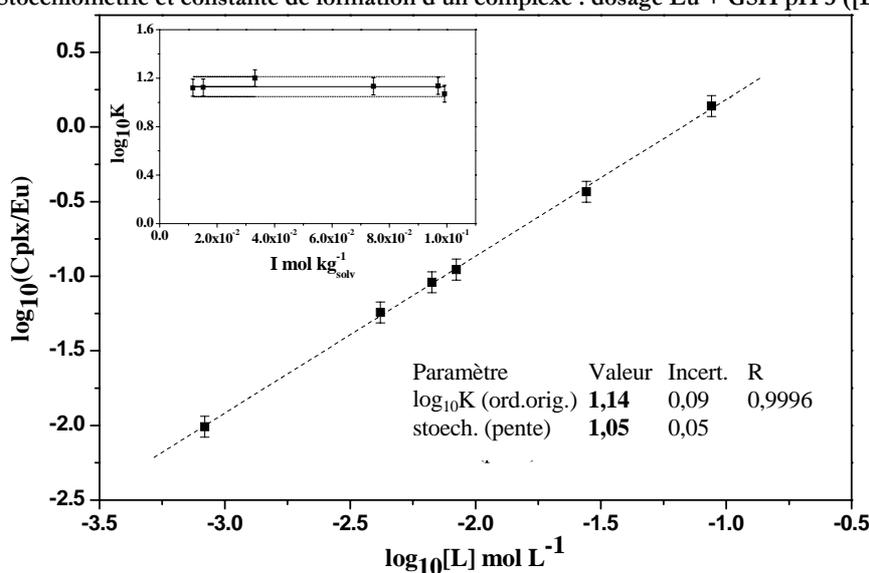


Figure 65 : Décroissance de la fluorescence d'une solution de Eu $10^{-5}M$ + GSH 0,45M

Le tracé logarithmique de l'évolution de la fluorescence en fonction du délai est une droite, ce qui suggère la présence d'une seule espèce en solution. Le temps de vie de cette espèce vaut $(180 \pm 10)\mu s$, ce qui est très différent du temps de vie de Eu libre : $(113 \pm 5)\mu s$. Le nombre de molécules d'eau qu'il reste est donné par l'application de la relation empirique présentée Équation 11. Il reste donc environ 5 molécules d'eau autour de Eu, 4 molécules d'eau ont été substituées par la ou les molécules de ligand.

Selon la méthode présentée en Annexe 4, la Figure 66 et la Figure 67 illustrent la détermination de la stoechiométrie de l'espèce formée et sa constante de formation, dans les deux conditions de dosage.

Figure 66 : Stoechiométrie et constante de formation d'un complexe : dosage Eu + GSH pH 3 ([Eu]=10⁻⁶M)Figure 67 : Stoechiométrie et constante de formation d'un complexe : dosage Eu + GSH pH 3 ([Eu]=10⁻⁵M)

Les deux dosages donnent des résultats en très bon accord pour deux concentrations différentes en Eu, il n'y a donc pas d'espèces polynucléaires en solution. La formation d'une espèce de stoechiométrie (1:1) avec une constante de formation qui vaut $\log_{10}K_1 = 1,2 \pm 0,2$ est observée. Cette valeur est proche de la seule donnée disponible dans la littérature (Tableau 10, chapitre 1, (Ren *et al.*, 1994)).

2.1.2. Etude de Eu-GSH à pH 3 par ES-SM

L'électrospray-spectrométrie de masse a été mise à contribution afin de vérifier la nature des espèces présentes en solution. L'influence de l'excès de GSH par rapport à la concentration en Eu a été abordée.

Les étapes d'identification des espèces présentes sur les spectres et l'ajustement des paramètres de la source electrospray conformément à la méthodologie décrite dans le Chapitre 2 se font conjointement au début de chaque série de dosage.

Afin de préserver les espèces (non covalentes) en solution, les analyses quantitatives par ES-SM ont été réalisées dans des conditions d'ionisation douces. Un spectre obtenu en mode positif pour une solution contenant 10^{-4}M de $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ et 10 fois plus de GSH à pH 3,0 est présenté Figure 68.

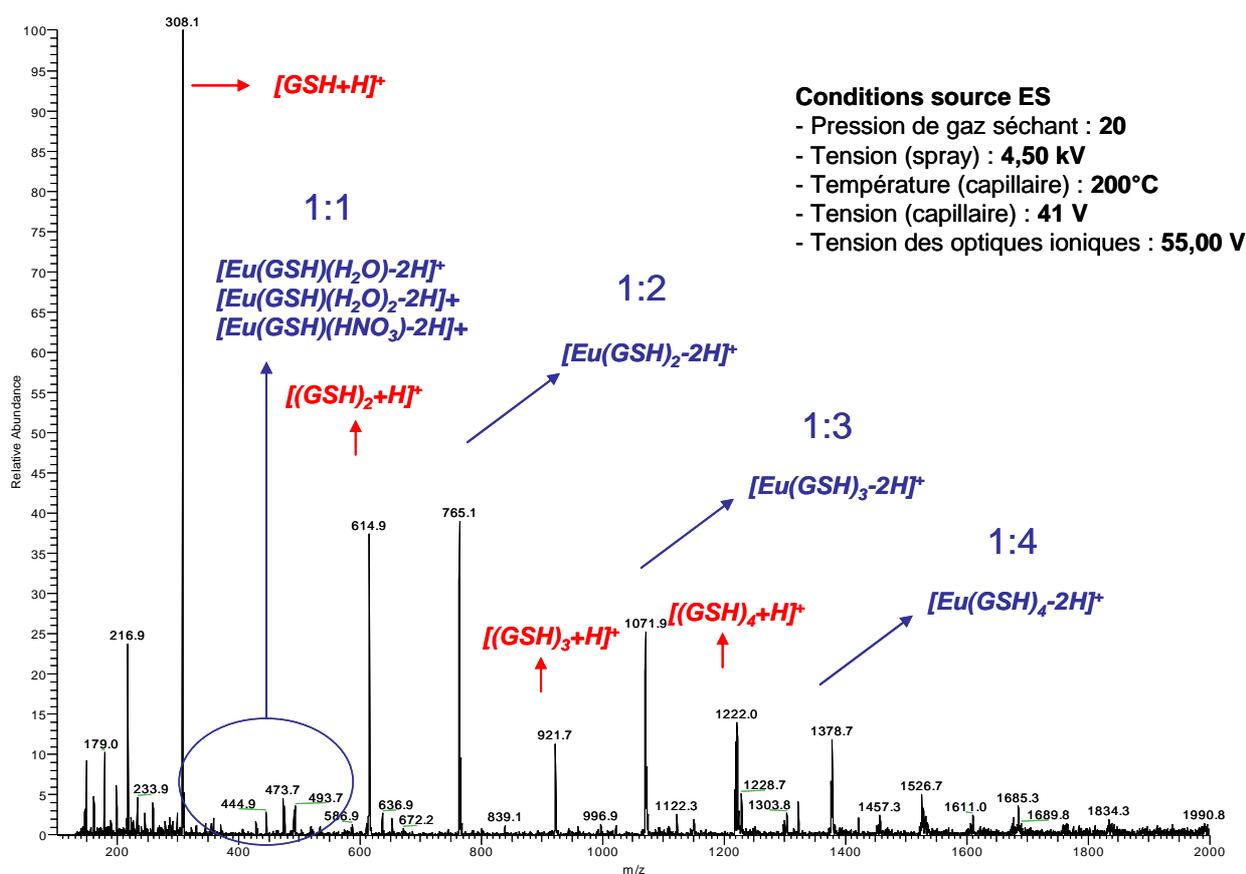


Figure 68 : Spectre de masse : $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ 10^{-4}M + GSH 10^{-3}M ($r = 10$) pH 3,0 ; Mode ES+

Les espèces identifiées sont regroupées dans le Tableau 20.

Tableau 20 : Pics moléculaires des espèces observées en solution (ES+ ; Eu (10⁻⁴M) + GSH pH 3)

Pic moléculaire (m/z)	Formule brute de l'ion positif	Stoechiométrie (M:L)	Eu
308	[H ₄ GSH+H] ⁺	L libre	
615 ; 922 ; 1229	[(H ₄ GSH) _n +H] ⁺ ; n=2-4	adduits de L	
<i>230-2 ; 248-0 ; 266-8 ; 284-6</i>	[EuO(HNO ₃)(H ₂ O) _n] ⁺ ; n=0-3	Eu « libre »	III
<i>275-7 ; 293-5 ; 311-3 ; 329-1 ; 347-9</i>	[Eu(NO ₃) ₂ (H ₂ O) _n] ⁺ ; n=0-4	Eu « libre »	III
474-6 ; 492-4	[Eu(H ₄ GSH)(H ₂ O) _{n-2} H] ⁺ ; n=1-2	(1:1)	III
519-1	[Eu(H ₄ GSH)(HNO ₃)-2H] ⁺	(1:1)	III
763-5* ; 1070-2* ; 1377-9*	[Eu(H ₄ GSH) _{n-2} H] ⁺ ; n=2-4	(1:n) ; n=2-4	III
665-7-9 ; 683-5-7	[Eu ₂ (NO ₃) ₅ (H ₂ O) _n] ⁺ ; n=3-4	Eu « libre »	III
1218*	[Eu ₂ (H ₄ GSH) ₃ -5H] ⁺	(2:3)	III

Les espèces dont les m/z figurent en italique sont des espèces minoritaires, celles en gras, majoritaires. L'astérisque indique que les espèces ont été analysées par SM/SM.

Les conditions électrospray sont plutôt douces puisque Eu n'apparaît pas sous forme réduite Eu(II). De plus, de nombreuses espèces apparaissent hydratées (alors que par SM-SM ce sont les molécules d'eau qui partent les premières). Cependant, malgré ces conditions, de nombreuses espèces formées par aggrégation sont présentes : c'est le cas des nombreux adduits de ligand libre, ou encore des espèces binucléaires de Eu.

En phase aqueuse à pH 3, Eu est majoritairement sous forme d'ions aquo : [Eu(H₂O)₉]³⁺(aq), ce qui n'est pas ce qui est observé sur le spectre où Eu apparaît de façon significative « associé » aux nitrates en plus de quelques molécules d'eau (Tableau 20). Des oxydes de Eu sont présents également : [EuO(HNO₃)(H₂O)_n]⁺ ; n=0-3, ces espèces sont généralement observées dans des conditions similaires, parfois même en plus grandes proportions, avec les Ln(III)(Vercouter *et al.*, 2005).

Nous avons attribué les espèces contenant des nitrates aux espèces « Eu libre ». En effet, à pH 3, la complexation par les ions nitrate, ajoutés par l'ajustement du pH et *via* Eu(NO₃)₃, est négligeable. La constante de formation du premier complexe avec les ions nitrate vaut : $\log_{10} K_1^{I=0} (EuNO_3^{2+}) = 1,3 \pm 0,2$ (par analogie avec *AmNO_3^{2+}* (Guillaumont *et al.*, 2003)), ce qui à pH 3 implique que moins de 3% de Eu se trouve complexé une fois par les nitrates. Le complexe avec deux molécules de nitrate est alors complètement négligeable, alors que très présent sur les spectres. L'association des nitrates, peu volatils, est donc surtout le résultat de phénomènes d'agrégation dans la source au moment du passage de la solution en phase gazeuse. Ce phénomène se produit également avec les molécules de ligand libre, qui forment divers clusters [(H₄GSH)_n+H]⁺ ; n=2-4.

La spectrométrie de masse en tandem (SM/SM) est un outil efficace pour l'analyse structurale des espèces, en particulier pour aider à l'identification des espèces : notamment les complexes

supposés de stoechiométries élevées en métal et en ligand. En effet, de telles espèces peuvent exister en solution pour un fort excès de ligand, cependant, elles peuvent aussi avoir été formées au niveau de la source électrospray et ne pas avoir d'existence réelle en solution (Van Berkel *et al.*, 1997). La spectrométrie de masse en tandem permet de distinguer les interactions caractéristiques intervenant dans les processus de la complexation par liaisons non covalentes, des complexes préformés en phase gazeuse de la source électrospray (Loo, 2000).

Une analyse SM/SM a été réalisée sur l'espèce « complexe (1:2) » à m/z 763-5, elle montre qu'il se dissocie en formant les espèces : « complexe (1:1) » (m/z 474-6) et $[\text{GSH}+\text{H}]^+$ (m/z 308), avec perte d'une molécule neutre de GSH semblant indiquer une association avec une molécule de GSH dans la source électrospray. Les analyses SM³ et SM⁴ des espèces « complexe (1:n) » ($n=3$ et 4) conduisent à un résultat similaire.

L'influence de l'introduction d'un excès de ligand a été étudiée, l'évolution du courant ionique de chaque espèce en fonction du rapport Ligand/Métal (r) est présentée Figure 69.

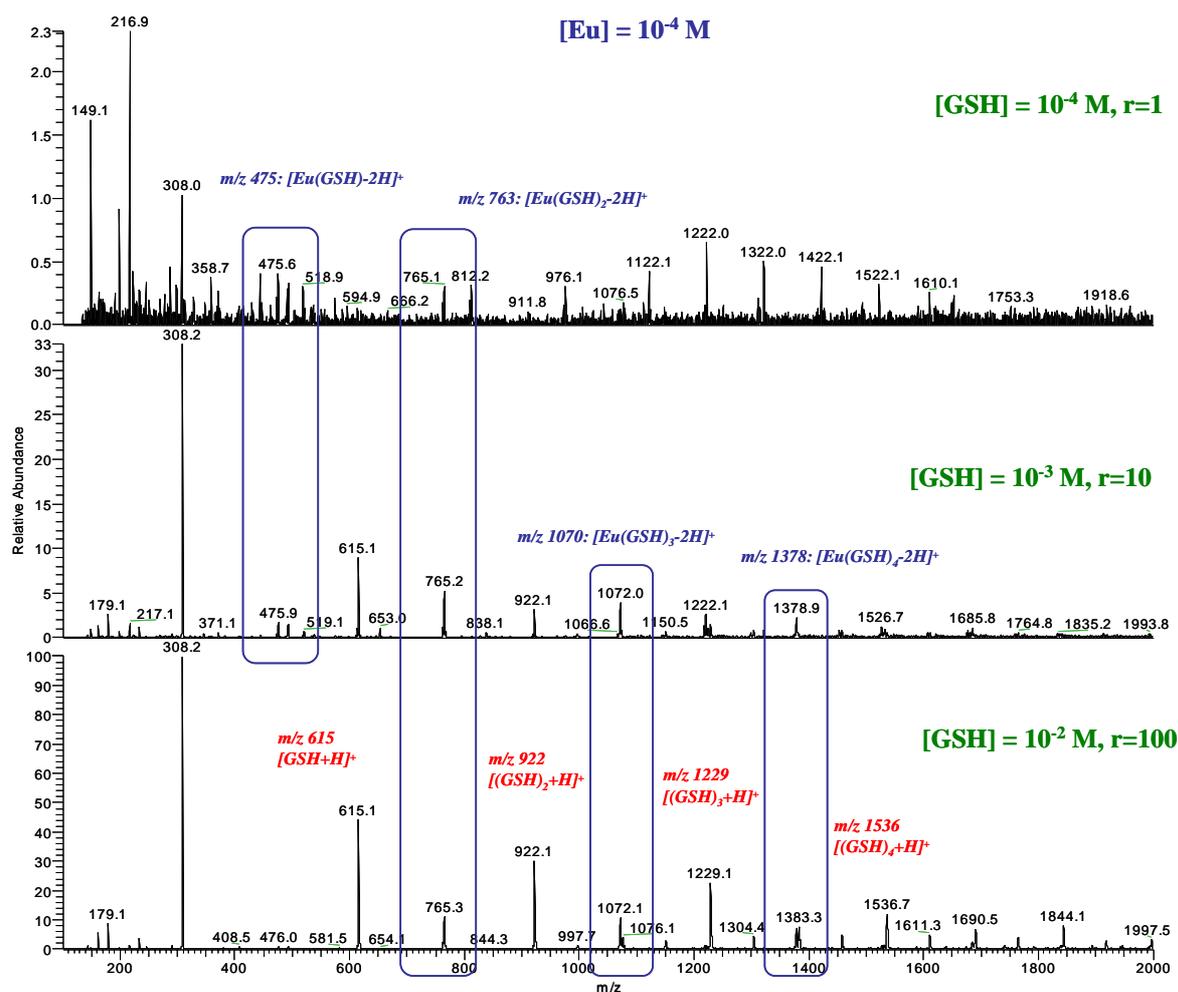


Figure 69 : Influence de l'excès de GSH : $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ 10^{-4} M + GSH pH 3,0 ; Mode ES+

L'ajout de ligand en excès favorise la formation des espèces les plus riches en ligand. Le signal du ligand libre est toujours prépondérant. La formation des adduits de ligands augmente aussi avec la concentration totale en ligand.

L'utilisation de l'ES-SM pour confirmer l'identification des espèces en solution est réalisable, il convient toutefois de confirmer les attributions par des expériences de SM/SM.

2.1.3. Eu-GSH pH 6 par SLRT

Afin de se placer dans des conditions satisfaisantes d'observation de la complexation, les concentrations de travail en GSH sont importantes. Or, à ce pH, la force ionique est contrôlée par la concentration en GSH. Nous avons choisi de ne pas ajouter un sel de fond pour fixer la force ionique car pour s'affranchir de l'effet de la concentration en GSH, il aurait fallu se placer à des forces ioniques de plusieurs unités molales. Cette valeur n'est pas du tout représentative du milieu biologique d'une part, et l'extrapolation à force ionique nulle *via* l'utilisation de la Théorie de l'Interaction Spécifique (présentée en Annexe 1), supposerait l'ajustement d'un trop grand nombre de paramètres, source d'imprécision importante.

La force ionique varie donc d'un échantillon à l'autre de la manière suivante :

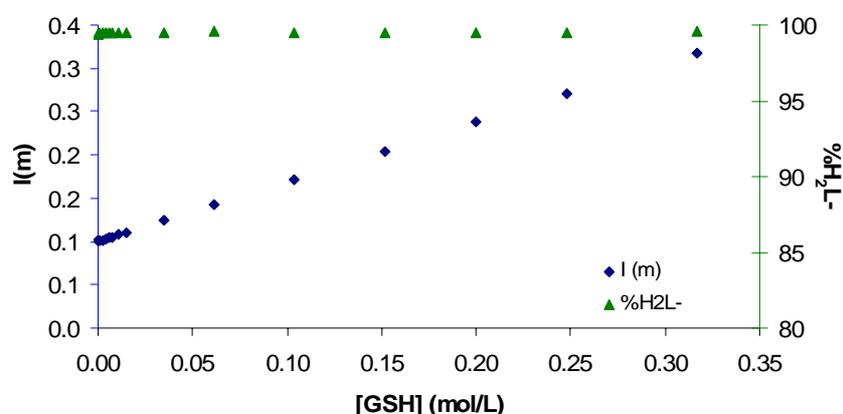


Figure 70 : Force ionique et composition des échantillons, en fonction de la concentration en ligand

Le pH des échantillons varie un peu, néanmoins, puisque l'on se trouve au niveau d'un palier sur la courbe de spéciation du ligand (Figure 59), ceci n'a pas d'incidence sur la spéciation du ligand, il se trouve à plus de 99% sous sa forme déprotonée 2 fois : H_2L^- .

L'évolution de la fluorescence au fur et à mesure des ajouts de ligand est présentée Figure 71.

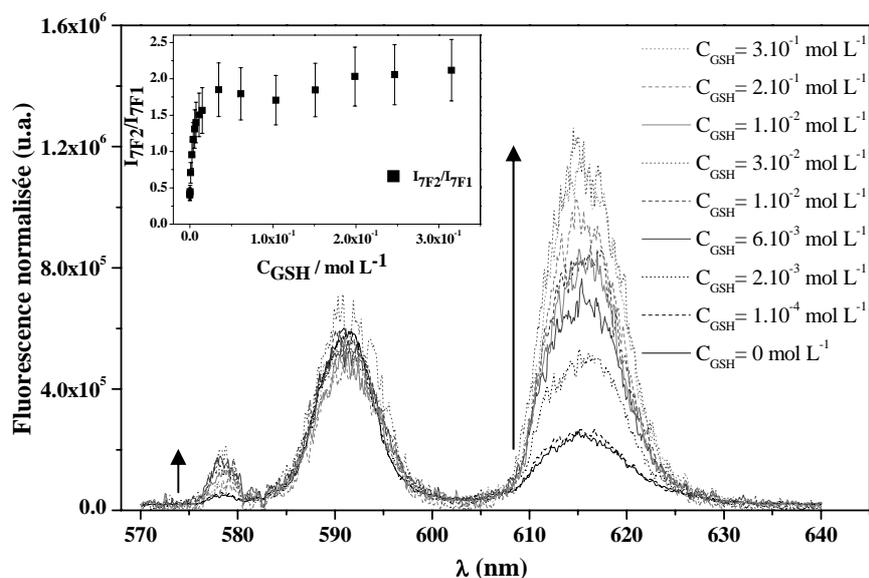


Figure 71 : Dosage Eu (10^{-6}M)-GSH (de 0 à 0,5 M) à pH 6 par SLRT ($\lambda_{\text{exc}}=395,7 \text{ nm}$; $E_{\text{laser}}=0,6 \text{ mJ}$; $D=1 \mu\text{s}$; $L=500\mu\text{s}$)

La présence de la transition 7F_0 à 579 nm indique que l'environnement autour de l'Eu n'est plus centrosymétrique et ce dès le début du dosage (nous sommes donc très probablement en présence d'un très faible pourcentage d'Eu hydrolysé, puisque le rapport des intensités de fluorescence reste très proche de celui de Eu libre). La présence d'un seul « palier » au-delà de 3.10^{-2}M de GSH semble indiquer la présence d'un seul complexe. Ceci sera à confirmer avec l'analyse des mesures de temps de vie.

Le temps de vie de la solution la plus concentrée en ligand a été mesuré :

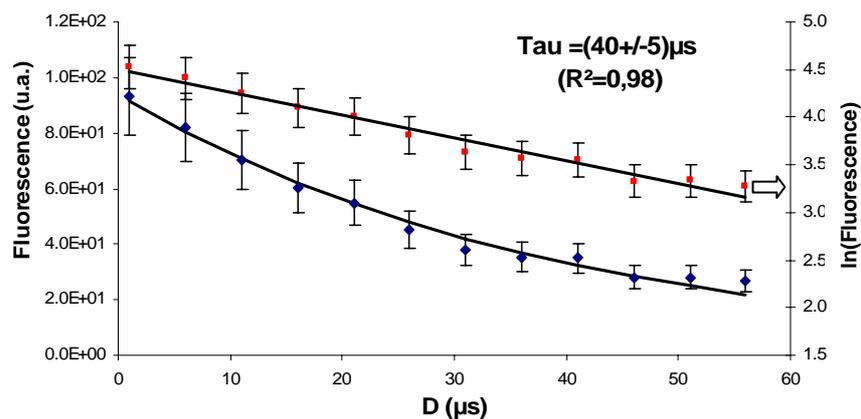


Figure 72 : Décroissance de la fluorescence d'une solution d'Eu 10^{-6}M + GSH $0,32\text{M}$ (pH 6,0)

Il n'y a qu'une seule espèce en solution. Le temps de vie de cette espèce vaut $(40 \pm 5)\mu\text{s}$, ce qui est très différent du temps de vie de l'euprotium libre ($113 \pm 5)\mu\text{s}$. Une diminution du temps de vie par rapport à celui de l'euprotium libre ne permet pas d'évaluer le nombre de molécules d'eau en sphère interne de coordination de l'euprotium. Ce phénomène est observé en général avec les

espèces hydrolysées de Eu et nous l'avons déjà observé avec le dosage par la cystéine à pH 5, chapitre 3. L'absence d'hydrolyse dans les conditions de ce dosage a été vérifiée en mesurant le même spectre sans le ligand. Nous supposons donc que ce temps de vie est caractéristique du complexe formé. Ce résultat observé de nouveau en présence d'un ligand disposant d'une fonction thiol, suggère de nouveau une influence de la fonction thiol sur la complexation. Cet effet semble même être plus important qu'avec la cystéine, car le temps de vie est encore plus diminué (d'un facteur 2), ceci est probablement dû au pH 6, plus proche du pKa de la fonction thiol.

Il sera intéressant de comparer les résultats obtenus à pH 6 avec le GSSG, dont la fonction thiol n'est pas accessible puisque engagée dans la formation d'un pont disulfure. Nous avons également passé un échantillon similaire quoique plus concentré en Eu, en EXAFS. L'influence du soufre, si celle-ci a lieu en première sphère de coordination, devrait y être détectée.

La Figure 73 permet de déterminer la stoechiométrie de l'espèce formée :

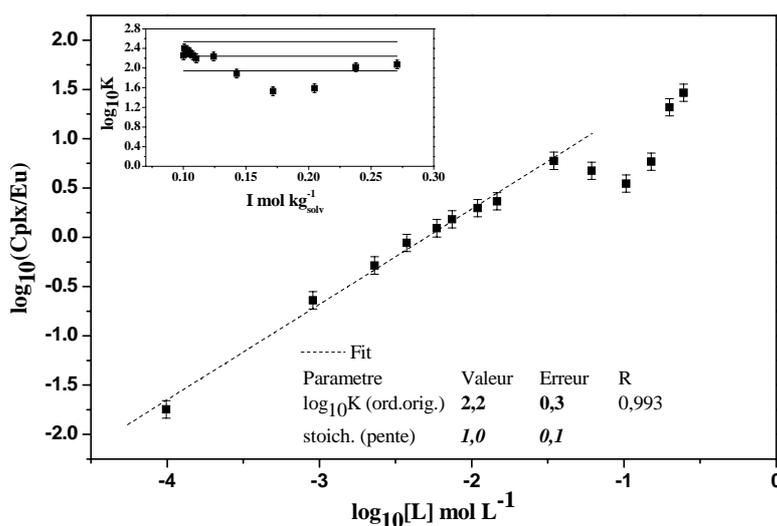


Figure 73 : Stoechiométrie et constante de formation d'un complexe : dosage Eu + GSH pH 6 ($[Eu]=10^{-6}M$)

Les points éloignés de la droite correspondent aux points à force ionique bien supérieure à 0,1 mol/kg_{solv} (insert de la figure). Ils ne servent donc pas à la détermination de la constante. La formation d'une espèce (1:1) de constante de formation $\log_{10}K_{1,1}=2,2\pm 0,3$ est observée.

2.1.4. U-GSH pH 2 par SLRT

L'interaction de U avec le GSH a été étudiée à pH 2 afin de comparer les résultats obtenus au même pH avec la cystéine. La concentration en U choisie est cette fois plus élevée ($4,2 \cdot 10^{-5}M$) afin de permettre des mesures de temps de vie pour chaque solution du dosage.

Suite à l'addition de GSH à pH 2, l'évolution de la fluorescence est présentée Figure 74.

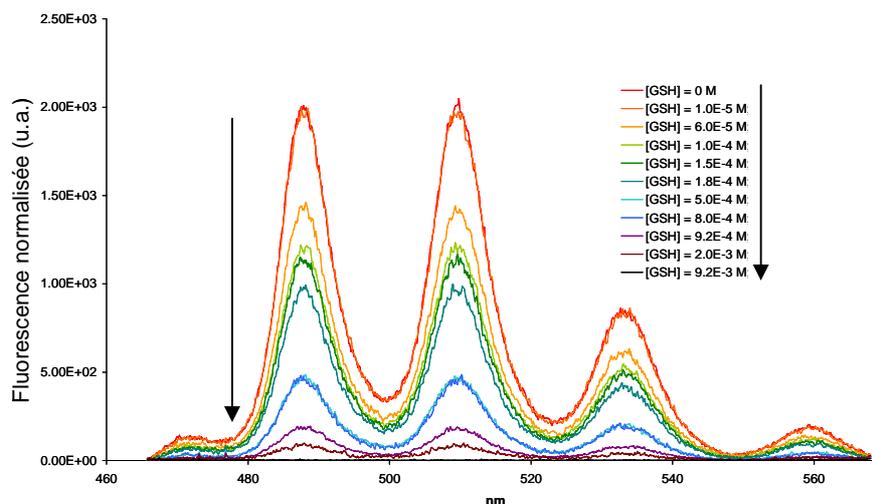


Figure 74 : Dosage U ($4,2 \cdot 10^{-5} \text{M}$)-GSH (de 0 à 10^{-2}M) à pH 2 par SLRT ($\lambda_{\text{exc}}=404,9 \text{nm}$; $E_{\text{las}}=0,5 \text{mJ}$; $D=0,3 \mu\text{s}$; $L=50 \mu\text{s}$)

L'ajout de ligand dans la solution d'uranium résulte en une baisse du signal, jusqu'à son extinction totale pour des concentrations en ligand de l'ordre de 10^{-2}M : le spectre de départ est le spectre rouge, caractéristique de la fluorescence de l'uranyle. Nous n'avons observé aucune modification spectrale de la fluorescence, seule une variation du temps de vie de $(1,9 \pm 0,2) \mu\text{s}$ (U(VI) libre) à $(0,5 \pm 0,1) \mu\text{s}$. Ceci indique que la baisse de la fluorescence est due à des phénomènes de quenching dynamique (Annexe 2), comme dans le cas de la cystéine, au chapitre précédent. Nous cherchons donc à vérifier s'il est possible de modéliser cette extinction de la fluorescence par l'équation de Stern-Volmer (Figure 75).

Il a été possible de mesurer les temps de vie pour chacun des points du dosage, la relation

$\frac{\tau_0}{\tau_Q} = f([L]) = 1 + K_{SV}[Q]$ peut donc être tracée. Si la courbe est une droite, sa pente vaut alors K_{SV} .

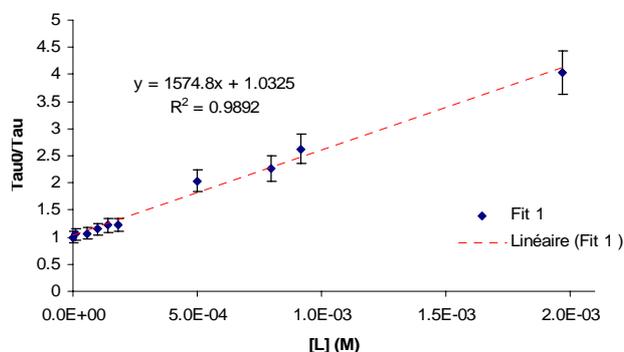


Figure 75 : Modélisation à l'aide de l'équation de Stern-Volmer : constante de quenching U(VI)-GSH pH 2 (L=quencher=GSH)

L'équation de Stern-Volmer permet de bien décrire les données expérimentales. La valeur de la constante de quenching déterminée est $K_{SV}=(1570\pm 50)M^{-1}$. Il est à noter que cette valeur est comparable à la valeur obtenue avec la cystéine ($K_{SV}=(1850\pm 50)M^{-1}$).

Nous concluons qu'à pH 2, nous n'observons pas de complexation entre l'uranium et le GSH mais bien des interactions de type « collisionnelle ». Cette observation semble être liée à la présence de ligand sulfuré en solution avec U.

2.2. Interactions avec le glutathion oxydé (GSSG)

La spéciation du ligand en fonction du pH a été présentée Figure 61. Les pH d'étude sont les mêmes que pour le GSH : pH 3 et pH 6 par SLRT.

L'évolution de la fluorescence au fur et à mesure des ajouts de ligand est présentée Figure 76 à pH 3 et Figure 77 à pH 6.

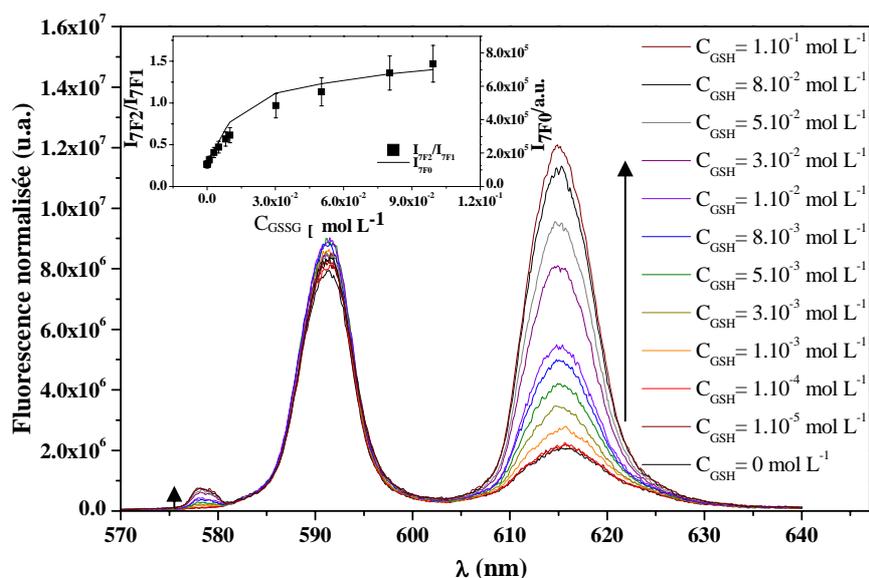


Figure 76 : Dosage Eu ($10^{-5}M$)-GSSG (de 0 à 0,1 M) à pH 3 par SLRT ($\lambda_{exc} = 395,7$ nm ; $E_{laser} = 0,9$ mJ ; $D = 1$ μ s ; $L = 500$ μ s)

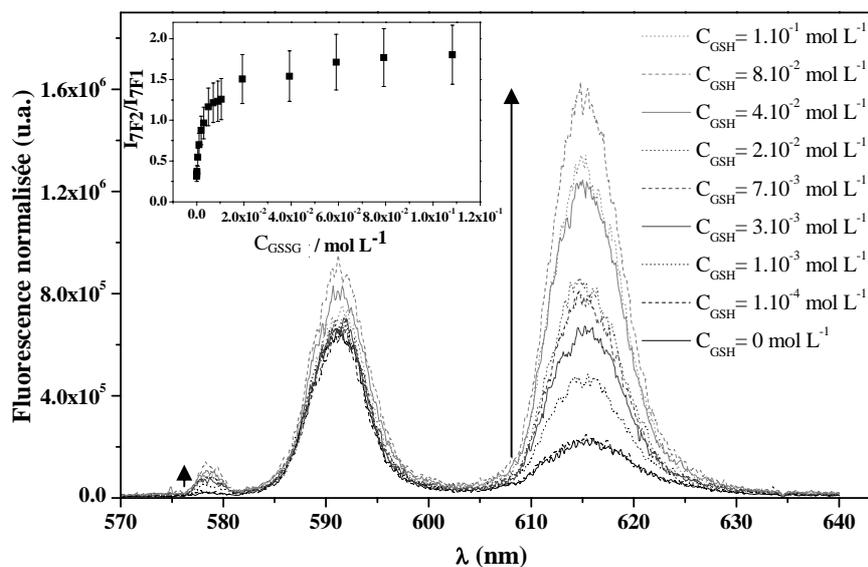


Figure 77 : Dosage Eu (10⁻⁶M)-GSSG (de 0 à 0,1 M) à pH 6 par SLRT ($\lambda_{exc} = 395,7$ nm ; $E_{laser} = 0,9$ mJ ; $D = 1$ μ s ; $L = 500$ μ s)

Les évolutions sont très similaires : apparition de la transition à 579 nm et augmentation de la fluorescence de la transition hypersensible, augmentation plus forte dans le cas de l'étude à pH 6, comme attendu. Pour les deux pH, un palier est atteint. La complexation est maximale en fin de dosage.

A l'aide de l'Équation 37 de l'Annexe 3, l'ajustement du temps de vie à 615 nm, est réalisé.

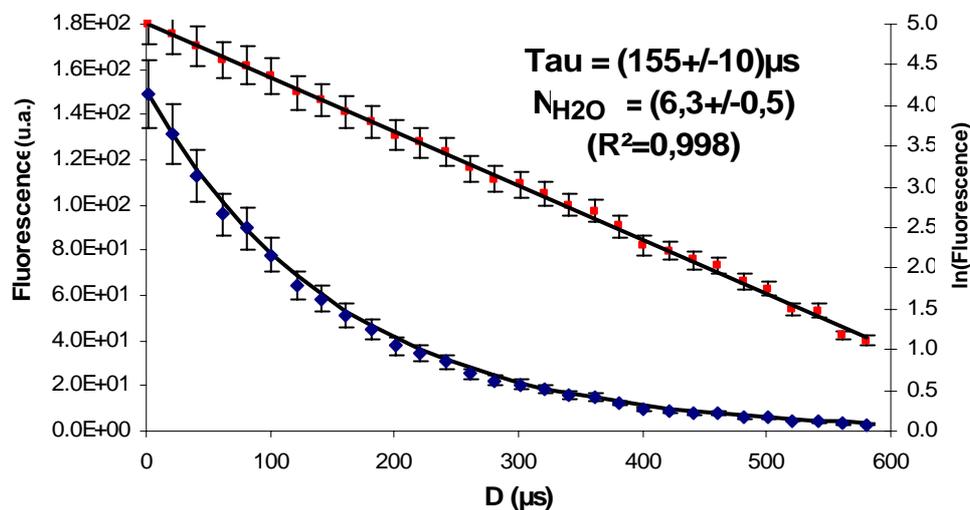


Figure 78 : Evaluation du temps de vie du complexe Eu+GSSG à pH 3

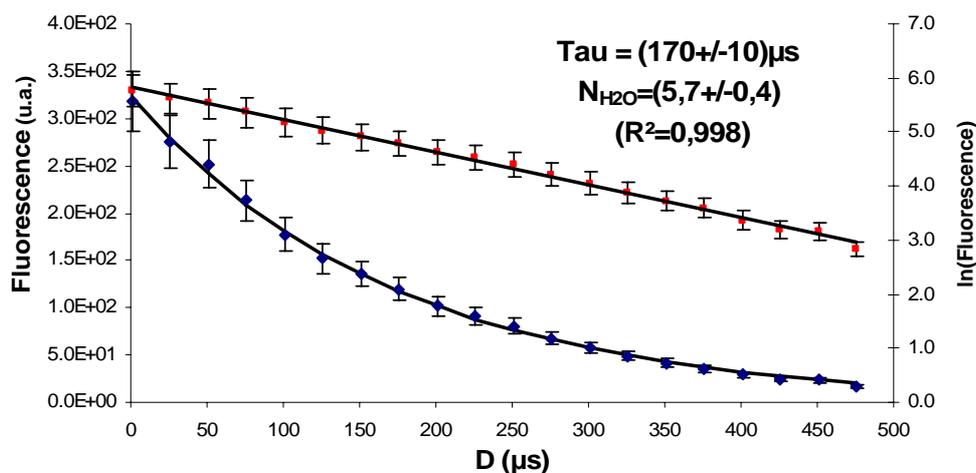


Figure 79 : Evaluation du temps de vie du complexe Eu+GSSG à pH 6

Ces valeurs sont du même ordre de grandeur et indiquent la perte de 3 molécules d'eau en première sphère de coordination à pH 3 ou 6. Le mode de complexation à ces 2 pH est similaire.

Selon la méthode présentée en Annexe 4, la Figure 80 et la Figure 81 illustrent la détermination de la stoechiométrie de l'espèce formée et sa constante de formation, dans les deux conditions de dosage.

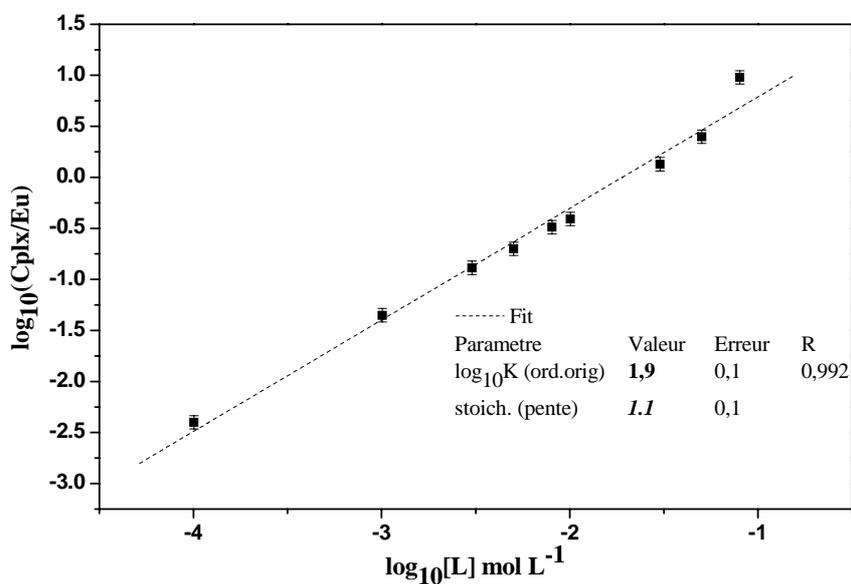


Figure 80 : Stoechiométrie et constante de formation d'un complexe : dosage Eu + GSSG pH 3 ($[\text{Eu}] = 10^{-5} \text{M}$)

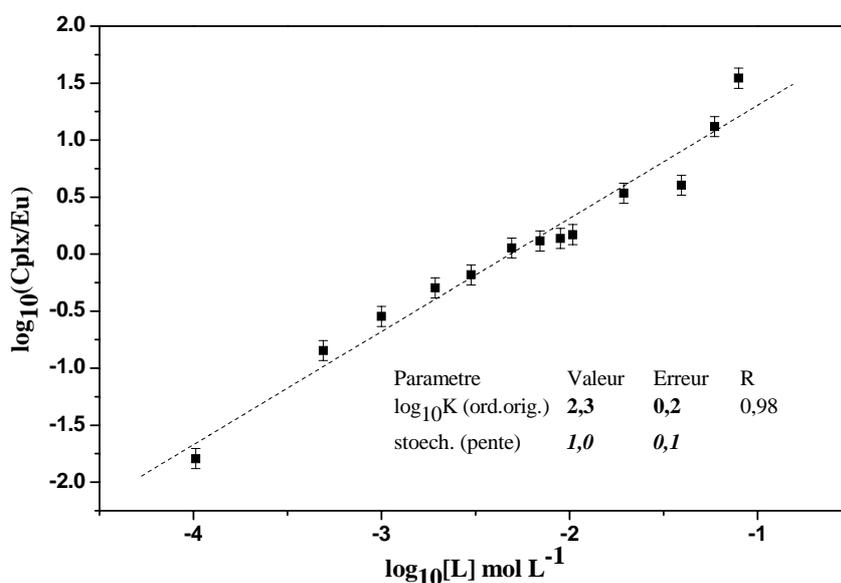


Figure 81 : Stoechiométrie et constante de formation d'un complexe : dosage Eu + GSSG pH 6 ($[Eu]=10^{-6}M$)

La formation d'une espèce (1:1) est observée à pH 3 ainsi qu'à pH 6. Les points un peu éloignés de la droite correspondent à des solutions pour lesquelles la valeur de la force ionique est plus élevée. Ils ne sont pas pris en compte dans l'évaluation de la constante. Les constantes de formation valent $\log_{10}K_{1,1(pH3)}=1,9\pm 0,2$ et $\log_{10}K_{1,1(pH6)}=2,3\pm 0,2$. Aucune donnée de la littérature n'est disponible pour comparer.

2.3. Conclusion

Le Tableau 21 récapitule l'ensemble des données acquises avec le GSH et le GSSG.

Tableau 21 : Résumé des résultats obtenus avec le GSH et le GSSG

Technique	Ligand	RN	pH	Stoech.	$\log_{10}K$	τ (μs)	N_{H_2O}
SLRT	GSH	Eu	3	1:1	$1,2\pm 0,2$	180 ± 10	$5,3\pm 0,5$
SLRT	GSH	Eu	6	1:1	$2,2\pm 0,3$	40 ± 5	/
SLRT	GSSG	Eu	3	1:1	$1,9\pm 0,2$	155 ± 10	$6,3\pm 0,5$
SLRT	GSSG	Eu	6	1:1	$2,3\pm 0,2$	170 ± 10	$5,7\pm 0,4$
SLRT	GSH	U	2	Extinction de fluorescence (quenching dynamique) : $K_{SV}=(1570\pm 50)M^{-1}$			
ES-SM	GSH	Eu	3	Complexe majoritaire : (1:1)			

La stoechiométrie privilégiée des espèces formées avec ces polypeptides est toujours la stoechiométrie (1:1) comme dans le cas des acides aminés. Les constantes conditionnelles de formation mesurées sont un peu plus élevées mais restent faibles. Le nombre de molécules d'eau en sphère interne de coordination indique une complexation bidente *via* les groupements carboxylate.

Comme dans le cas de la cystéine, à pH 6, avec le GSH, le temps de vie mesuré est inférieur au temps de vie de l'euporium libre. Cette observation suggère une influence de la fonction thiol, en deuxième sphère de coordination par exemple.

La constante de quenching U-GSH a été déterminée. Là encore ce phénomène, déjà observé dans des conditions similaires avec la cystéine souligne le rôle éventuel de la fonction thiol dans ce phénomène.

3. Caractérisation d'échantillons concentrés en RN et en ligand

Afin de compléter les études menées par SLRT et ES-SM, des études structurales ont été menées. Pour cela, des techniques comme : la spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), la spectrophotométrie UV-Visible, la spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier en mode Réflexion Totale Atténuée (ATR-IRTF) ainsi que la Spectroscopie d'Absorption des rayons X (SAX) ont été mises à profit. Ces techniques impliquent de travailler à des concentrations élevées, en particulier en métal, ce qui n'était pas le cas des échantillons analysés par SLRT et ES-SM.

3.1. Données structurales RN-Ligands biologiques dans la littérature

Les données structurales disponibles dans la littérature et utiles pour nos travaux sont issues d'études avec les AA.

3.1.1. Données structurales « Ln-AA »

Dans la littérature, un grand nombre de structures cristallographiques Ln-AA sont disponibles (Kremer *et al.*, 2005). Les remarques générales qui vont suivre concernent issues des complexes dont la synthèse a eu lieu à pH < 5 afin d'éviter l'hydrolyse (et donc l'apparition de complexes mixtes). Dans tous les cas, la fonction amine $-NH_3^+$ ne participe pas directement à la coordination mais peut stabiliser les structures *via* la formation de liaisons hydrogène. En effet, la coordination se fait toujours par la ou les fonctions carboxylate. Il n'existe pas de structure répertoriée de Eu avec la glycine, la cystéine, l'acide aspartique ou l'histidine. Les données disponibles sur Eu avec d'autres acides aminés, montrent qu'il forme préférentiellement des dimères isolés de stoechiométrie 1 Eu pour 2 AA. Cette tendance n'est pas retrouvée avec les Ln directement voisins de Eu : Sm et Gd. L'acide glutamique présente un comportement particulier avec les Ln, du fait de la présence d'une fonction carboxylate supplémentaire. Quelque soit le Ln considéré (Ln = Pr, Sm, Dy, Ho ou Er), le nombre de coordination du Ln vaut 9 et l'incorporation de la seconde fonction carboxylate conduit à la formation de plans infinis en 2D de stoechiométrie (1:1) puisque chaque molécule d'acide glutamique coordonne 2 atomes de Ln (Figure 82).

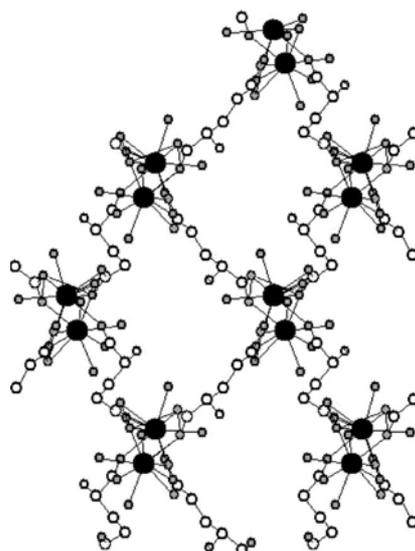


Figure 82 : Disposition des atomes dans le solide $[\text{Pr}_2(\text{Glu})_2(\text{ClO}_4)(\text{H}_2\text{O})_7](\text{ClO}_4)_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Pour plus de clarté, les atomes d'hydrogène ne sont pas représentés. Les molécules d'eau et de contre-ions sont également omises. Légende : Pr : noir ; O : gris ; C : blanc et N : rayé (Csoregh *et al.*, 1987)

Dans le cas de la cystéine ou de l'histidine par exemple, aucune structure n'est publiée.

3.1.2. Données structurales « Uranyl-AA »

Les valeurs généralement faibles des constantes thermodynamiques de formation des espèces « uranyle-carboxylate » et la prépondérance de l'hydrolyse de l'uranium semblent être des inconvénients majeurs pour la détermination de la structure des complexes mettant en jeu les AA avec U. En effet, parmi les 20 AA les plus courants, il n'existe que deux AA avec lesquels des structures sont répertoriées : la glycine et la proline (Alcock *et al.*, 1985; Keramidas *et al.*, 2002; Shchelokov *et al.*, 1982). Les deux structures avec la glycine montrent la coexistence de coordination mono- et bidente *via* les fonctions carboxylate (Figure 83).

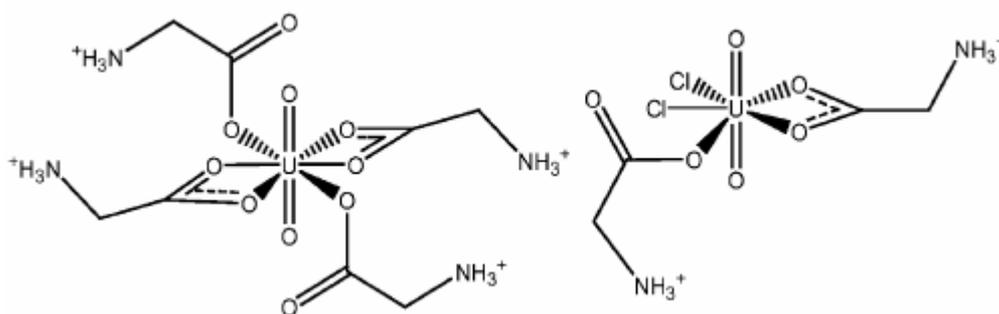


Figure 83 : Structures « uranyl-glycine »

Structure de gauche (Alcock *et al.*, 1985) et structure de droite Keramidas (Keramidas *et al.*, 2002)

La coordination des fonctions carboxylate bidentes n'est pas symétrique, une différence de 0,03Å est observée (2,516(5)Å contre 2,487(5)Å (Keramidas *et al.*, 2002)). Cette asymétrie est couramment observée dans les structures impliquant des interactions « uranyl-carboxylate » (Van Horn et Huang, 2006).

3.2. Echantillons analysés

La composition des solutions « concentrées » analysées dépend de la technique d'analyse mise en œuvre. Toutefois, dans tous les cas la préparation des échantillons analysés a été faite de sorte que le RN se trouve sous forme libre initialement (Eu^{3+} ou UO_2^{2+}) ; le ligand en très large excès est ajouté ensuite.

Dans le cas de l'uranium, le pH d'étude est uniquement le pH acide pour éviter la précipitation des hydroxydes ainsi que la formation d'espèces polynucléaires.

Les ligands choisis sont le GSH et le GSSG dont il n'existe pas de structure disponible avec les RN. La comparaison du comportement des RN avec le GSH et le GSSG permet d'étudier l'influence de la fonction thiol.

3.3. RMN du ^1H et du ^{13}C

Les études de RMN en ^1H et en ^{13}C ont été réalisées sur un Spectromètre Concordia 500 MHz (Bruker) à (298,0±0,1)K (Sonde Nalorac BB, $P_{90} \text{ } ^1\text{H} = 10\mu\text{s}$ à 0 dB, $P_{90} \text{ } ^{13}\text{C} = 28\mu\text{s}$ à 0dB).

Les études réalisées par RMN sont regroupées dans le Tableau 22.

Tableau 22 : Composition des échantillons analysés par RMN

Ligand (concentration en M)	Métal (concentration en M)	pH	solvant	Analyse réalisée
GSH (0,1)		3	D ₂ O	¹ H et ¹³ C (ref)
GSH (0,1)	Eu (0,05)	3	H ₂ O/D ₂ O 90/10 (v/v)	¹³ C
GSH (0,1)	U (0,004)	2,8	H ₂ O/D ₂ O 90/10 (v/v)	¹³ C
GSSG (0,1)		3	D ₂ O	¹ H et ¹³ C (ref)
GSSG (0,1)	Eu (0,05)	3	H ₂ O/D ₂ O 90/10 (v/v)	¹³ C
GSSG (0,1)	U (0,004)	2,8	H ₂ O/D ₂ O 90/10 (v/v)	¹³ C

3.3.1. Cas du GSH pH 3

La structure du glutathion réduit qui a été présentée Figure 57, a été annotée pour tabuler les déplacements chimiques des atomes d'hydrogène (lettre verte) et de carbone (chiffre bleu).

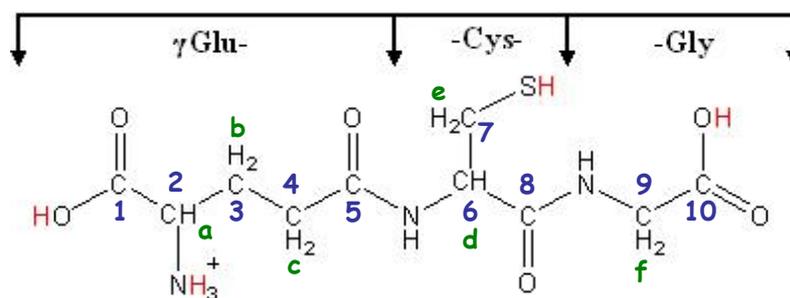


Figure 84 : Molécule de GSH (annotée)

Le Tableau 23 regroupe les déplacements chimiques des atomes d'hydrogène pour la référence de GSH à pH 3 :

Tableau 23 : Récapitulatif des déplacements chimiques en RMN ¹H (GSH libre pH 3) (Kato *et al.*, 1999; Keramidas *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004; Mehta *et al.*, 2003)

Hydrogène	Identification	GSH 0,1M pH 3 (D ₂ O) δ (ppm)
a	CH (Glu)	3,9
b	CH-CH ₂ -CH ₂ (Glu)	2,1
c	CH ₂ -CH ₂ -CO (Glu)	2,6
d	CH (Cys)	4,6
e	CH ₂ (Cys)	2,9
f	CH ₂ (Gly)	4,0

Les déplacements chimiques observés sont en accord avec les données de la littérature (Kato *et al.*, 1999; Keramidas *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004; Mehta *et al.*, 2003).

Le Tableau 24 regroupe les déplacements chimiques des atomes de carbone pour la référence de GSH à pH 3 et les solutions avec ajout de Eu ou U :

Tableau 24 : Récapitulatif des déplacements chimiques en RMN ¹³C (GSH libre, Eu-GSH pH 3) (Keramidas *et al.*, 2002; Mehta *et al.*, 2003)

C	Identification	GSH 0,1M pH 3 (D ₂ O) δ (ppm)	Eu 0,05M GSH 0,1M pH 3 H ₂ O/D ₂ O 90/10 (v/v) δ (ppm)	U 0,004M GSH 0,1M pH 2,8 H ₂ O/D ₂ O 90/10 (v/v) δ (ppm)
1	COOH (Glu)	178	187	175 ?
2	CH (Glu)	57	49	
3	CH-CH ₂ -CH ₂ (Glu)	34,5	33	
4	CH ₂ -CH ₂ -CO (Glu)	43	34,5	45 ?
5	CONH (Glu)	177	177,5	175 ?
6	CH (Cys)	58,5	58,5	
7	CH ₂ (Cys)	28	28	
8	CONH (Cys)	177	175	
9	CH ₂ (Gly)	29	29	
10	COOH (Gly)	175	180	190 ?

Les déplacements chimiques observés pour le GSH seul sont en accord avec les données de la littérature (Keramidas *et al.*, 2002; Mehta *et al.*, 2003).

Une extinction quasi-totale du signal a été observée sur l'échantillon U-GSH pH 2,8. Seuls quatre signaux restent visibles. Les attribuer par « analogie » n'est pas faisable.

Pour l'échantillon contenant Eu, les fonctions carboxylate terminales sont celles qui subissent le déplacement chimique le plus important suite à l'ajout de Eu ; ce qui confirme une interaction *via* ses fonctions (Mehta *et al.*, 2003; Ren *et al.*, 1994). Les atomes de carbone proches de la fonction

thiol ne semblent pas perturbés. Cette fonction n'intervient donc pas dans la complexation dans ces conditions.

3.3.2. Cas du GSSG pH 3

La structure du glutathion oxydé qui a été présentée Figure 60, a été annotée pour tabuler les déplacements chimiques des atomes d'hydrogène (lettre verte) et de carbone (chiffre bleu) :

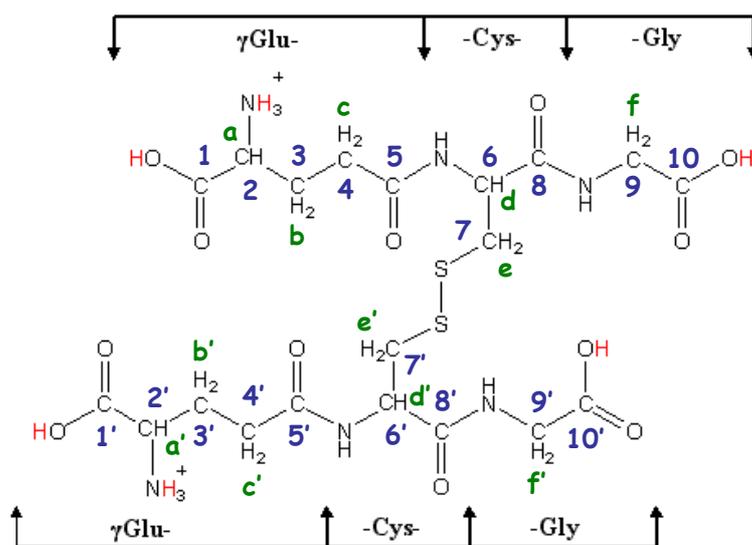


Figure 85 : Molécule de GSSG (annotée)

Le Tableau 25 regroupe les déplacements chimiques des atomes d'hydrogène pour la référence de GSSG à pH 3 :

Tableau 25 : Récapitulatif des déplacements chimiques en RMN ^1H (GSSG libre, pH 3) (Kato *et al.*, 1999; Rabenstein et Millis, 1995)

Hydrogène	Identification	GSSG 0,1M pH 3 (D ₂ O) δ (ppm)
a et a'	CH (Glu)	3,9
b et b'	CH-CH ₂ -CH ₂ (Glu)	2,2
c et c'	CH ₂ -CH ₂ -CO (Glu)	2,6
d et d'	CH (Cys)	4,8
e et e'	CH ₂ (Cys)	3,1 et 3,3
f et f'	CH ₂ (Gly)	4,0

Les déplacements chimiques observés sont en accord avec les données de la littérature (Kato *et al.*, 1999; Rabenstein et Millis, 1995).

Le Tableau 26 regroupe les déplacements chimiques des atomes de carbone pour la référence de GSH à pH 3 et les solutions en présence de Eu ou de U :

Tableau 26 : Récapitulatif des déplacements chimiques en RMN ¹³C (GSSG libre, Eu-GSSG pH 3)

Carbone	Identification	GSSG 0,1M pH 3 (D ₂ O) δ (ppm)	Eu 0,05M GSSG 0,1M pH 3 H ₂ O/D ₂ O 90/10 (v/v) δ (ppm)	U 0,004M GSSG 0,1M pH 3 H ₂ O/D ₂ O 90/10 (v/v) δ (ppm)
1 et 1'	COOH (Glu)	177,5	182	178
2 et 2'	CH (Glu)	55	49,5	57
3 et 3'	CH-CH ₂ -CH ₂ (Glu)	34	34	35
4 et 4'	CH ₂ -CH ₂ -CO (Glu)	41,5	39	43
5 et 5'	CONH (Glu)	176	175	175,5
6 et 6'	CH (Cys)	57	56	56
7 et 7'	CH ₂ (Cys)	44	42	46
8 et 8'	CONH (Cys)	176	177,5	175
9 et 9'	CH ₂ (Gly)	28	29	28
10 et 10'	COOH (Gly)	175	180	177,5

Le signal du spectre en présence de U n'est pas éteint cette fois. Les déplacements chimiques observés sont très proches de ceux de la référence, exception faite de la fonction carboxy-terminale des résidus glycine. Ce site est moins encombré stériquement par les fonctions de la chaîne latérale des résidus glycine (un simple atome d'H). Il est donc plus logique que la molécule UO₂²⁺ « volumineuse » interagisse préférentiellement avec ce site.

Dans le cas de Eu, le déplacement carboxy-terminal du signal des résidus glycine est plus important. Un déplacement moindre mais significatif est observé pour les résidus acide glutamique. Les positions des carbones des résidus cystéine ne varient presque pas, le pont disulfure ne semble donc pas jouer de rôle ni dans la complexation, ni en matière de stabilisation. Ces informations suggèrent une complexation par les résidus glycine et acide glutamique uniquement, comme pour le GSH.

3.4. Apport des mesures de spectrophotométrie UV-Visible

Juste après la préparation, les échantillons destinés à l'EXAFS sont analysés en spectrophotométrie UV-Vis afin de déterminer s'il existe des différences qualitatives de complexation entre le GSH et le GSSG puisque les phénomènes de quenching décrits précédemment n'affectent pas les transitions observées par spectrophotométrie UV-Visible. Leur composition est rappelée dans le Tableau 27.

Tableau 27 : Composition des échantillons analysés par spectrophotométrie UV-Visible

Ligand (concentration en M)	Métal (concentration en M)	pH	Référence
	U (0,004)	~0	HClO ₄ 1M pH~0
GSH (0,1)	U (0,004)	2,8	HClO ₄ pH~3
GSSG (0,1)	U (0,004)	2,8	HClO ₄ pH~3

L'appareil utilisé est un spectrophotomètre UV-Vis-NIR modèle UV-3150 de chez Shimadzu. Les spectres ont été acquis en mode double faisceau, avec soustraction du solvant en utilisant une référence. Ils sont enregistrés entre 350 et 500 nm et ont été normalisés par rapport à la concentration en U des solutions. Le maximum des spectres a été relevé pour comparer les déplacements des spectres (Figure 86).

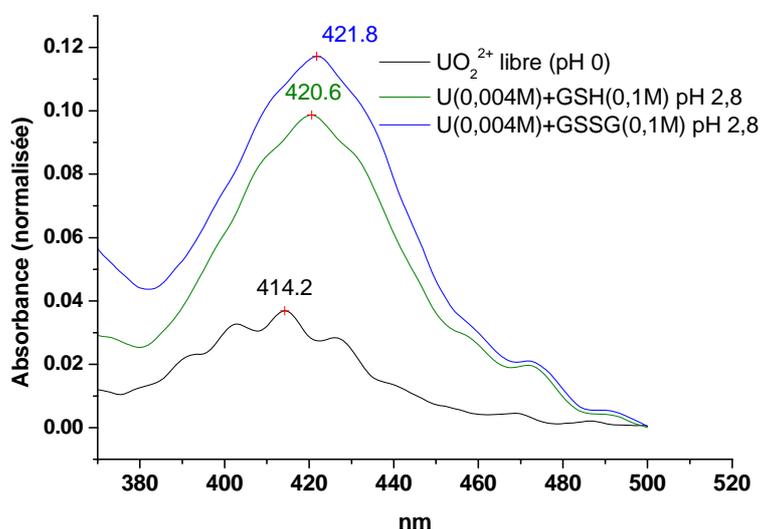


Figure 86 : Spectres d'absorption UV-Vis des solutions contenant de l'uranium concentré

En présence de ligand, le spectre d'absorption de U(VI) (en noir) est fortement décalé (d'environ 6 nm) vers les grandes longueurs d'onde avec un maximum à 420,6 et à 421,8 nm pour le GSH et le GSSG respectivement (Figure 86). La structure fine du spectre observable à pH 0 est moins bien définie en présence de ligand. L'intensité globale est en revanche fortement augmentée (d'un facteur 3 ou 4). A pH 2,8, les légères différences sur les spectres mesurés entre les solutions de GSH et de GSSG ne permettent pas de conclure quant à une éventuelle différence de pouvoir complexant de ces ligands vis-à-vis de U(VI). De plus, il est probable que l'environnement global de UO_2^{2+} dans les complexes soit similaire, ce qui suggère que les mêmes fonctions complexantes soient impliquées. Puisque la fonction thiol n'est pas disponible dans le GSSG, il paraît vraisemblable que ce soit la fonction carbonylate qui soit la fonction complexante dans les deux cas.

3.5. ATR-IRTF

Il est possible de suivre les interactions des métaux avec les fonctions d'une molécule par Spectrométrie Infra Rouge. En effet, les groupements oscillent de différemment en fonction de leur état de protonation, d'une part, et de leur participation à un complexe d'autre part.

Les échantillons suivants ont été analysés par cette technique :

Tableau 28 : Composition des échantillons analysés par ATR-IRTF

Ligand (concentration en M)	Métal (concentration en M)	pH	Référence utilisée
GSH (0,1)		3	H ₂ O
GSH (0,1)		5	H ₂ O
GSH (0,1)	Eu (0,05)	3	GSH (0,1) pH 3
GSH (0,1)	Eu (0,05)	5	GSH (0,1) pH 5
GSH (0,25)	Eu (0,05)	5	GSH (0,1) pH 5
GSH (0,1)	U (0,004)	2,8	GSH (0,1) pH 3
GSSG (0,1)		3	H ₂ O
GSSG (0,1)		5	H ₂ O
GSSG (0,1)	Eu (0,05)	3	GSSG (0,1) pH 3
GSSG (0,1)	Eu (0,05)	5	GSSG (0,1) pH 5
GSSG (0,1)	U (0,004)	2,8	GSSG (0,1) pH 3

Les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre Vector 22 (Bruker), équipé du logiciel OPUS. Quelques gouttes de l'échantillon sont déposées sur une fenêtre ZnSe. Chaque spectre a été moyenné sur 20 acquisitions dans la région 400 à 4 000 cm⁻¹, avec une résolution de 4 cm⁻¹.

Pour chaque échantillon, une référence (correspondant au solvant de l'échantillon) est analysée préalablement et soustraite lors de l'acquisition de l'échantillon. Certaines bandes de contaminants peuvent néanmoins subsister, en particulier celles provoquées par l'eau et par le dioxyde de carbone. Ces substances sont présentes dans l'air et donc dans le compartiment de l'échantillon lors de l'analyse (le compartiment n'est pas équipé d'un système permettant de le purger à l'azote sec par exemple, qui ne permettrait toutefois pas de s'affranchir des bandes dues au CO₂). Ces bandes parasites ne se trouvent pas dans la zone du spectre que nous étudions.

La zone d'étude d'intérêt en solution aqueuse est la zone : **1 300-1 800 cm⁻¹**. En effet, c'est dans cette région du spectre que les vibrations des liaisons des fonctions carboxylate (protonées ou non) ou amine apparaissent.

3.5.1. Etude du GSH

L'évolution du spectre transmis du GSH en fonction du pH est présentée :

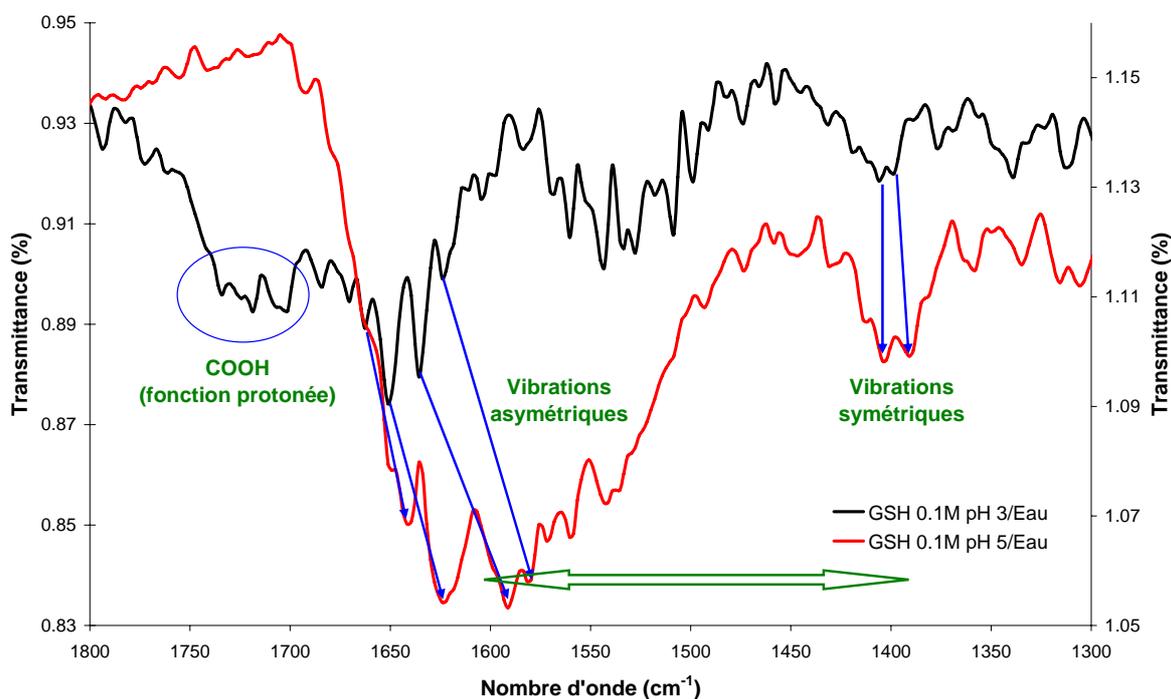


Figure 87 : Spectre ATR-IR du GSH à pH 3 et à pH 5

L'ensemble des fonctions de la molécule est représenté. Toutefois, nous nous intéressons surtout aux déplacements des fonctions carboxylate, qui renseignent sur l'existence d'interactions avec des hétéroatomes et sur le mode de liaison (monodente ou bidente).

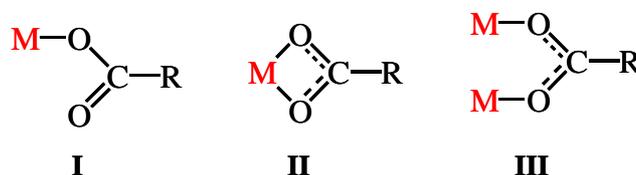
Lorsque les fonctions carboxylate sont protonées, un massif est observé entre 1700 et 1730 cm^{-1} . Nous noterons qu'à pH 3, il y a un équilibre entre le carboxylate de l'acide glutamique qui est totalement déprotoné et celui du résidu glycine qui est en cours de déprotonation. Ce massif a totalement disparu à pH 5. Pour les mêmes raisons, les bandes de vibration des fonctions carboxylate déprotonées sont plus présentes à pH 5. Un déplacement des bandes de vibration symétriques (vers 1400 cm^{-1}) et asymétriques (autour de 1650 cm^{-1} à pH 3 et vers 1600 cm^{-1} à pH 5) est observé par rapport à pH 3.

Le Tableau 29 regroupe les attributions des bandes de vibrations observées pour tous les échantillons contenant du GSH.

Tableau 29 : Attribution des bandes de vibration en ATR-IR pour le GSH et les complexes à pH 3 et pH 5 (Bieri et Burgi, 2005; Nakamoto, 1997; Popovic *et al.*, 1999)

Echantillons et bandes observées (cm ⁻¹)	GSH 0,1M pH 3	GSH 0,1M pH 5
$\nu(\text{COOH})$	1 700-1 730	/
$\nu_a(\text{COO}^-)$	1 630 (en β de NH_3^+) 1 620 (en β de NH)	1 590 (en β de NH_3^+) 1 575 (en β de NH)
$\nu_s(\text{COO}^-)$	1 400	1 395-1 405
Amide I	1 660	1 640
Amide II	1 540	1 540
Carbonyle (CO)	1 650	1 640

De nombreuses études sur les interactions des métaux avec les acides carboxyliques ont été faites dans la littérature. Il est possible d'identifier 3 modes principaux de liaisons entre le métal et la fonction carboxyle : monodente, pontante et bidente (Nakamoto, 1997). Selon le mode de coordination des espèces, la différence entre les vibrations symétriques et asymétriques des fonctions carboxylate déprotonées varie ($\Delta_M = \nu_{\nu_a(\text{COO}^-)}^M - \nu_{\nu_s(\text{COO}^-)}^M$). Si l'on compare cet écart, avec l'écart observé dans le cas du ligand libre ($\Delta_L = \nu_{\nu_a(\text{COO}^-)}^L - \nu_{\nu_s(\text{COO}^-)}^L$), il est possible de conclure quant au mode de coordination du métal :


Figure 88 : Modes de coordination possibles

- si $\Delta_M \gg \Delta_L$, la coordination est de type monodente (Figure 88, I),
- si $\Delta_M \ll \Delta_L$, la coordination est bidente (Figure 88, II),
- si $\Delta_M \leq \Delta_L$, le métal est pontant (Figure 88, III).

A pH 5, la forme déprotonée deux fois du GSH (H_2L^-) est largement majoritaire : la bande de vibration des fonctions carboxyle protonée a disparu (1 700-1 730 cm⁻¹) (Figure 89).

En présence de Eu, l'écart entre les bandes de vibrations (symétriques et asymétriques) des carboxyles se réduit sensiblement, nous sommes dans le cas où $\Delta_M \leq \Delta_L$.

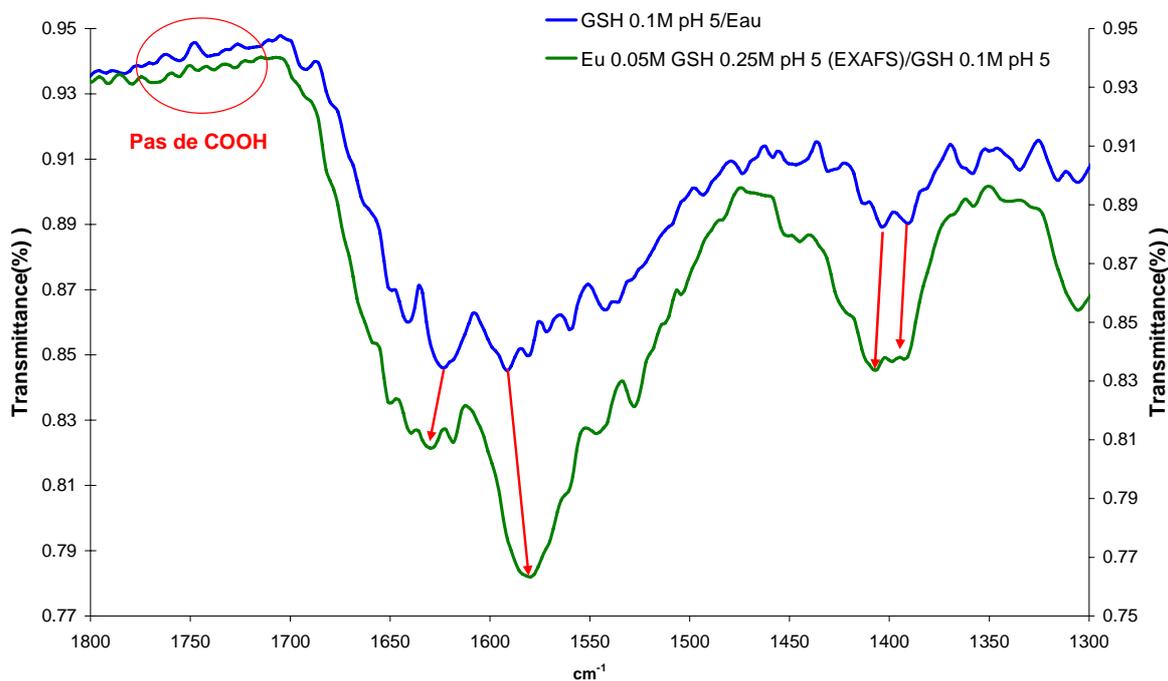


Figure 89 : Spectres ATR-IR du GSH et de Eu+GSH à pH 5

Le métal serait donc « pontant ». La structure que nous proposons est donc :

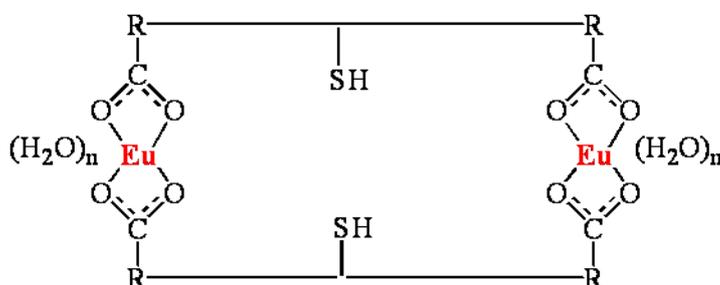


Figure 90 : Coordination proposée pour Eu-GSH à pH 5 (2 Eu-2 GSH)

Cette structure est en accord avec la stoechiométrie (1:1) observée en SLRT à pH 6. Un effet des fonctions thiol protonées à ce pH est possible. Compte-tenu de la taille de la molécule de GSH, cette interaction (qui pourrait être la cause de la baisse du temps de vie mesuré) se situerait en deuxième sphère de coordination de l'euprium.

A pH 3, en présence de Eu, l'écart entre les bandes de vibrations des carboxyles se réduit sensiblement, nous sommes dans le cas où $\Delta_M \leq \Delta_L$ (Figure 91).

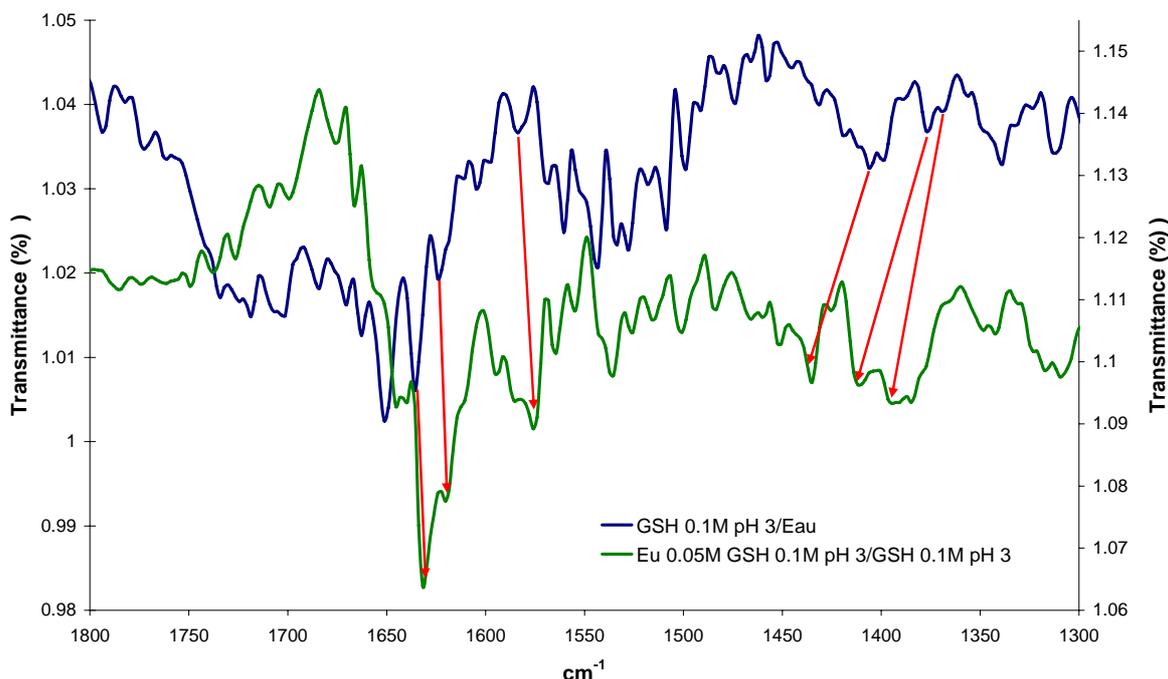


Figure 91 : Spectres ATR-IR du GSH et de Eu+GSH à pH 3

Le métal serait donc là encore « pontant ». Cependant, il est difficile de l'affirmer dans ces conditions car d'une part la diminution de Δ_M par rapport à Δ_L est vraiment faible (20 cm^{-1} environ) et d'autre part, à pH 3, nous sommes en présence d'un mélange de formes plus ou moins protonées du GSH (Figure 59). Or nous avons vu que l'effet de la déprotonation du ligand conduisait aussi à une diminution de l'écart entre les bandes symétriques et les asymétriques. Nous ne pouvons donc pas statuer en faveur d'un mode de coordination privilégié à ce pH.

Les résultats obtenus avec l'uranium à pH 2,8 (solution étudiée en EXAFS) sont similaires donc non interprétables de cette façon.

3.5.2. Etude du GSSG

Les spectres obtenus sont très proches de ceux du GSH. A pH 3, il n'est pas possible de conclure sur un mode de coordination privilégié, que ce soit avec l'euporium ou l'uranium.

A pH 5, en présence d'euporium, une coordination similaire à celle présentée pour le GSH (Figure 90) est possible, mais l'édifice serait « rigidifié » par la présence du pont disulfure. La stoechiométrie (2 Eu pour 1 GSSG) d'un tel édifice n'est pas en accord avec les résultats de SLRT, toutefois, la concentration en Eu est au moins 5 000 fois plus grande dans le cas des expériences en ATR-IRTF, il n'est donc pas aberrant d'observer une stoechiométrie différente, plus élevée en Eu.

3.6. Spectroscopie d'Absorption des rayons X (EXAFS)

Les expériences ont été réalisées à l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) sur la ligne CRG FAME (BM30b) pour Eu et BM20 (ROBL) pour U. Dans le cas de U et de Eu, le ligand des composés de référence utilisés est l'acétate car il dispose d'une fonction carboxylate et des structures cristallographiques sont disponibles dans la littérature (Yansheng et Lubin, 1988).

La composition des échantillons étudiés est rappelée dans le Tableau 30 : Composition des échantillons analysés par spectrométrie d'absorption des rayons X (EXAFS).

Tableau 30 : Composition des échantillons analysés par spectrométrie d'absorption des rayons X (EXAFS)

Ligand (concentration en M)	Métal (concentration en M)	pH
GSH (0,1)	U (0,004)	2,8
GSSG (0,1)	U (0,004)	2,8
GSH (0,25)	Eu (0,05)	5,0

Les ajustements des spectres sont basés sur la détermination de paramètres grâce à des composés de référence. Ensuite, le nombre de coordination maximal pour un élément est choisi et fixé (9 dans le cas de Eu et 6 pour U).

Le tracé de la transformée de Fourier des oscillations EXAFS permet de « visualiser » les distances des atomes du ligand ou du solvant par rapport à l'élément sondé. Les spectres obtenus pour l'échantillon contenant Eu sont présentés Figure 92.

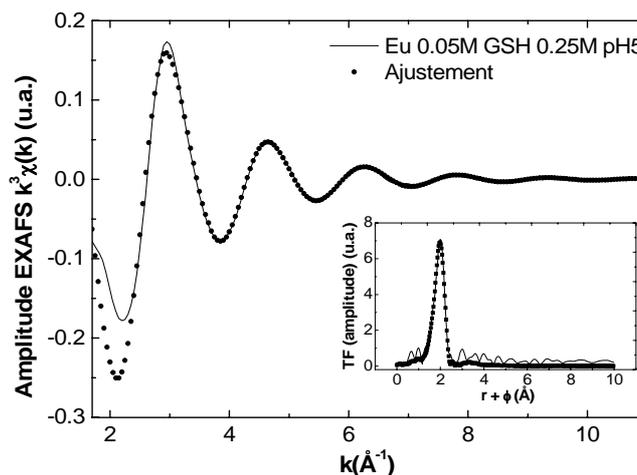


Figure 92 : Spectres EXAFS de l'échantillon [Eu]=0,05M [GSH]=0,25M pH 5 (amplitude et transformée de Fourier en insert)

Les ajustements réalisés conduisent aux résultats suivants :

Pour Eu, la structure proposée est formée de 2 fonctions carboxylate bidentes à 2,34 Å (probablement apportées par deux molécules de GSH distinctes, du fait des contraintes stériques) et complétée par 5 molécules d'eau, dont les atomes d'oxygène se situent à 2,46 Å. Aucune influence d'atome de soufre (très volumineux) n'a été observée. La fonction thiol ne participe donc pas à la complexation, pas même en sphère externe.

Pour U, avec le GSH et le GSSG, les résultats sont très similaires entre eux et délicats à interpréter. L'hypothèse faite lors des ajustements est la présence de 3 fonctions carboxylate bidentes autour de UO_2 à entre 2,40 et 2,42 Å. Ces distances sont en accord avec des distances U-O de systèmes U-Citrate bidente (Bailey *et al.*, 2005). Toutefois, les atomes d'oxygène des molécules d'eau du solvant de l'ion uranyle aquo sont à 2,42 Å. Ces résultats ne permettent pas de conclure avec certitude sur le mode de coordination des molécules de GSH et GSSG par ces seules données d'EXAFS.

3.7. Conclusion

Le Tableau 31 résume l'ensemble des observations faites dans cette partie sur l'étude des échantillons concentrés.

Tableau 31 : Résumé des résultats obtenus partie 3 (Chapitre 4)

Technique	Système	Observations
RMN	Eu + GSH pH 3	Complexation par les 2 COO^- (Glu et Gly) Pas d'effet de la fonction thiol
	Eu + GSSG pH 3	Complexation par les 2 COO^- (Glu et Gly) Pas d'effet de la fonction thiol
	U + GSSG pH 2,8	Complexation par les COO^- (Gly)
UV-Vis	U + GSH pH 2,8	U n'est pas libre : complexation
	U + GSSG pH 2,8	
ATR-IRTF	Eu + GSH pH 5	Complexation par 2 COO^- bidentes pour chaque Eu, stoechiométrie (1:1)
EXAFS	Eu + GSH pH 5	Complexation par 2 COO^- bidentes + 5 H_2O
	U + GSH pH 2,8	Complexation par des COO^- bidente + présence de molécules

L'influence éventuelle de la fonction thiol lors de la complexation Eu-GSH à pH 5 a été écartée par la RMN. L'EXAFS suggère une complexation proche des résultats observés à pH 5 avec le GSSG, par SLRT sur des solutions plus diluées en RN. En revanche l'EXAFS ne permet pas de caractériser le mode de coordination de U avec le GSH et le GSSG. Les autres méthodes suggèrent cependant l'existence d'une complexation.

4. Interactions avec les phytochélatines

4.1. Présentation des molécules étudiées

Les PC sont une famille de polypeptides constitués de la répétition du motif $\gamma\text{Glu} - \text{Cys}$ suivi d'un résidu terminal Gly : $(\gamma\text{Glu} - \text{Cys})_n - \text{Gly}$ où n peut varier de 2 à 11 (mais le plus souvent de 2 à 5). De plus, il existe un certain nombre de variantes structurales de ces peptides, telles : $(\gamma\text{Glu} - \text{Cys})_n - \text{Ala}$, $(\gamma\text{Glu} - \text{Cys})_n - \text{Ser}$ ou $(\gamma\text{Glu} - \text{Cys})_n - \text{Glu}$ (Cobbett, 2000; Rauser, 1995; Rauser, 1999; Zenk, 1996).

Le rôle et la synthèse des PC ont déjà été abordés (cf. Chapitre 1 §4.2.3.). Les propriétés chimiques de ces protéines vont être développées ici afin de mieux comprendre leurs interactions avec les cations.

Les propriétés acido-basiques des PC ont fait l'objet d'une récente étude (Spain et Rabenstein, 2003). Afin de caractériser la chimie de coordination des PC avec les métaux lourds, plusieurs analogues permettant l'étude des fonctions thiol ont été synthétisés :

$\text{Ac} - (\gamma\text{Glu} - \text{Cys})_n - \text{Gly} - \text{NH}_2$ où n varie entre 2 et 6, notés PC'_n .

Les pKa des fonctions thiol de ces molécules ont été mesurés par RMN, ils se situent entre 9 et 10 ; la fonction thiol la plus proche de l'extrémité carboxy-terminale a un pKa plus faible que les autres ; environ 0,5 unité de moins.

Remarque : la formation de liaisons disulfure entre deux groupements thiol de résidus cystéines voisins dans une chaîne polypeptidique sert souvent à stabiliser la structure tridimensionnelle de la molécule : la Figure 93 illustre la formation d'une telle liaison.

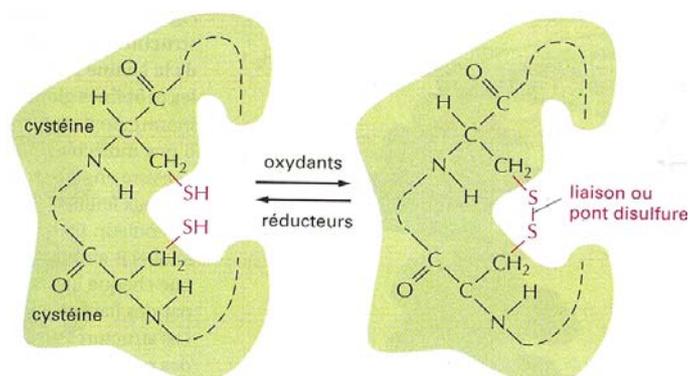


Figure 93 : Formation d'un pont disulfure

Attention : la présence d'agents réducteurs empêche la formation des ponts S-S, c'est pourquoi la formation des ponts disulfure ne se produit que rarement dans le cytosol où la forte concentration en agents réducteurs des groupements –SH, les rompt.

4.2. Echantillons

Contrairement aux études avec les AA ou le GSH et le GSSG, les études sur les phytochélatines (PC_n) sont surtout qualitatives. En effet, d'une part elles ne sont pas disponibles commercialement, nous ne disposons donc pour nos études que de faibles quantités de PC synthétiques. Afin de faire des comparaisons qualitatives d'un échantillon à l'autre, il convient d'autre part de vérifier les distributions en masse des espèces présentes dans chacun des échantillons, ceci sera réalisé par ES-SM.

Le Tableau 32 présente la composition des solutions de PC_n dont nous disposons :

Tableau 32 : Concentration des solutions de PC_n

	Concentration (mM)	pH
PC ₂	0,988	1,5
PC ₃	1,138	1,5
PC ₄	6,534	3,5

Aux solutions de ligands, sont ajoutées des quantités fixes de Eu pour atteindre une concentration molaire de $5 \cdot 10^{-6} M$ puis, à l'issue d'un nouvel ajout, de $5 \cdot 10^{-5} M$. Les échantillons sont conservés au réfrigérateur dans des tubes stériles.

L'ensemble des solutions analysées en SLRT a un pH proche de 3.

4.3. Etude des PC_n par SLRT

En présence de PC_n , le spectre de Eu montre deux levées de dégénérescence à la fois sur les transitions ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ et ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$: plusieurs maxima sont observés, à 579, 589, 594, 615 et 622 nm ce qui est généralement observé en cas de forte complexation.

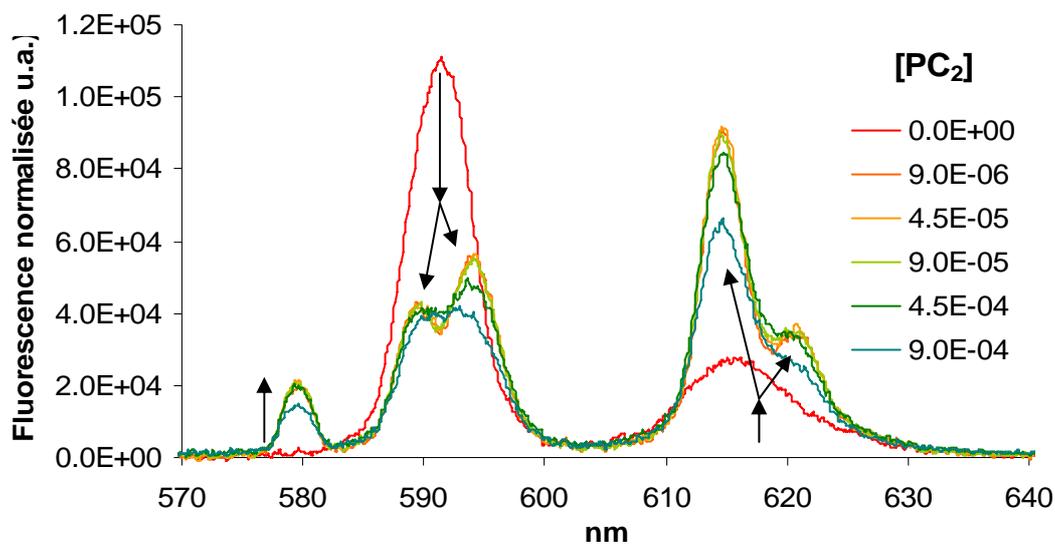


Figure 94 : Evolution de la fluorescence de Eu ($5.10^{-5}M$)-PC₂ (de 0 à $10^{-3}M$) à pH 3 par SLRT ($\lambda_{exc}=394,6$ nm ; $E_{laser}=0,4mJ$; $D=10\mu s$; $L=800\mu s$)

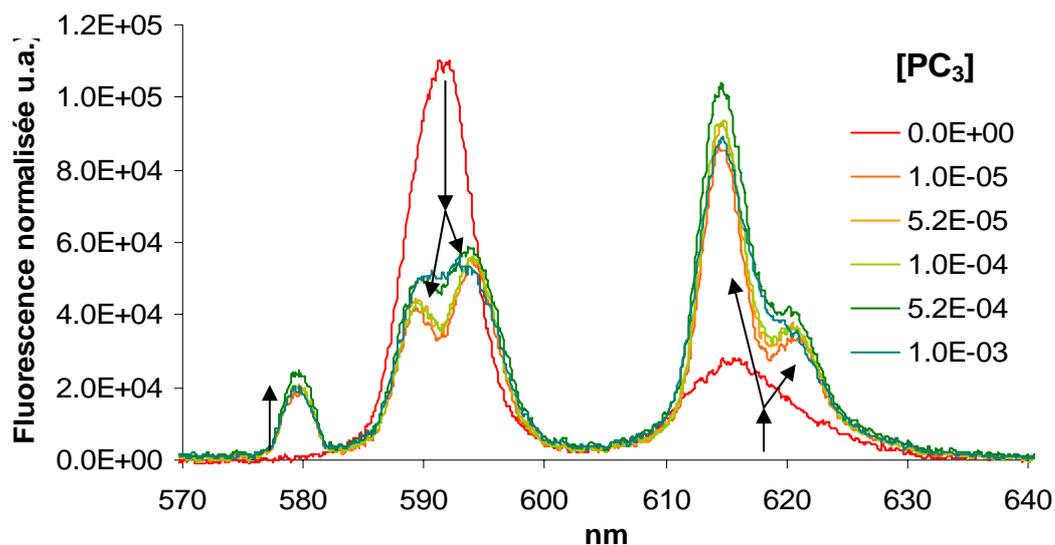


Figure 95 : Evolution de la fluorescence de Eu ($5.10^{-5}M$)-PC₃ (de 0 à $10^{-3}M$) à pH 3 par SLRT ($\lambda_{exc}=394,6$ nm ; $E_{laser}=0,4mJ$; $D=10\mu s$; $L=800\mu s$)

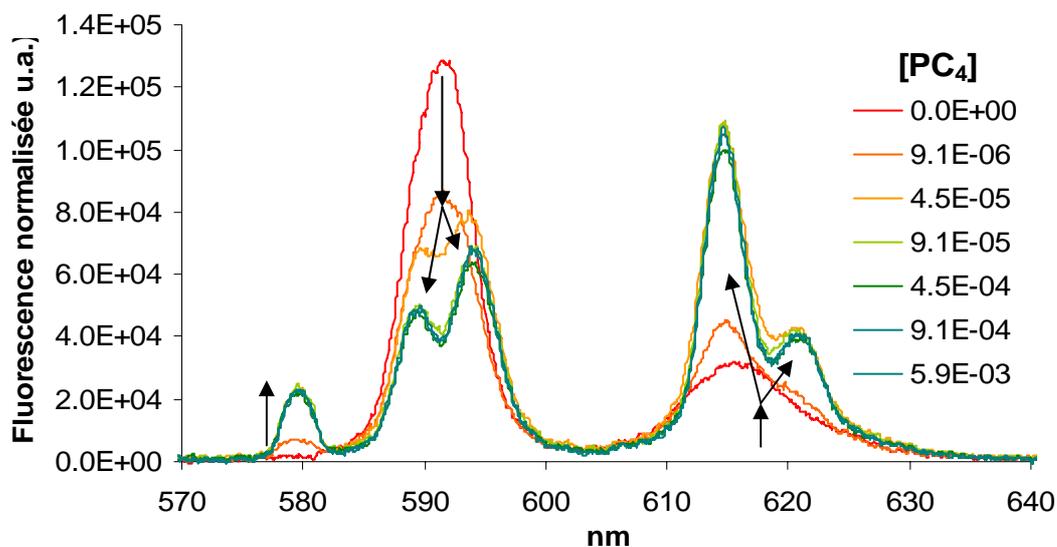


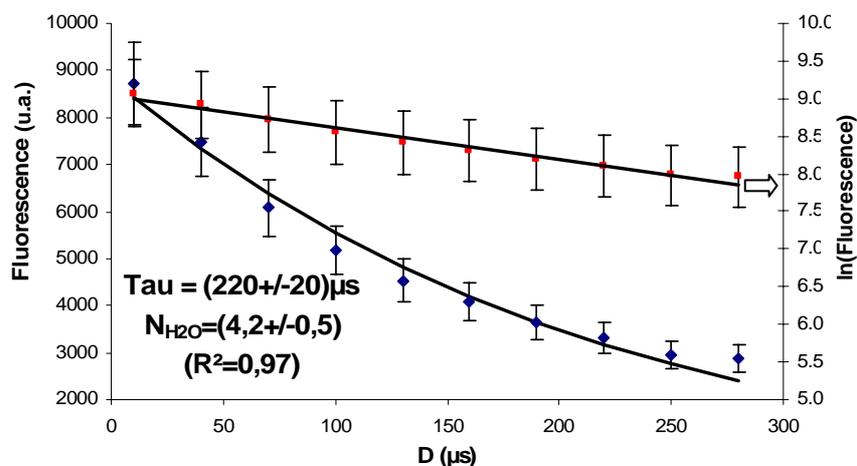
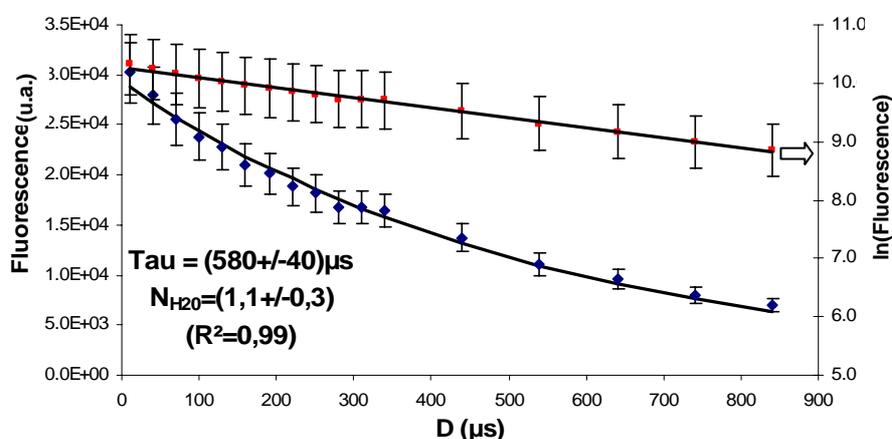
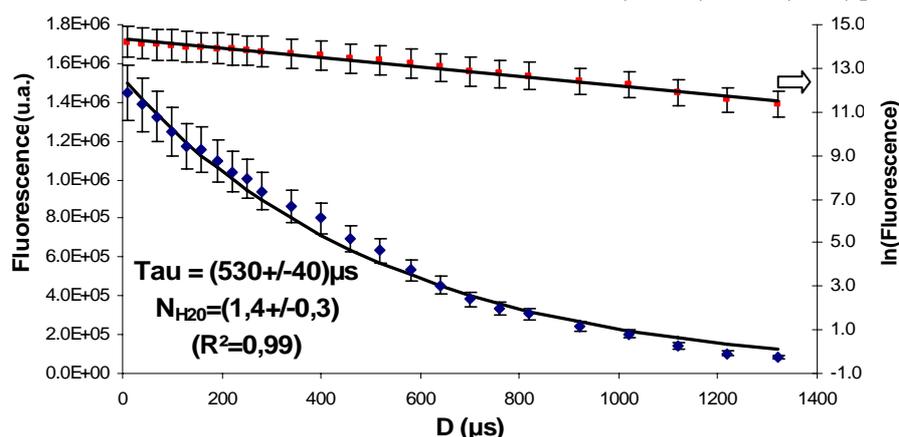
Figure 96 : Evolution de la fluorescence de Eu (5.10^{-5}M)-PC₄ (de 0 à 6.10^{-3}M) à pH 3 par SLRT ($\lambda_{\text{exc}}=394,6\text{nm}$; $E_{\text{laser}}=0,4\text{mJ}$; $D=10\mu\text{s}$; $L=800\mu\text{s}$)

Pour les dosages avec PC₂ et PC₃, dès le plus faible ajout on peut considérer que l'ensemble de l'europlum est complexé car les spectres n'évoluent plus à la suite des ajouts en PC_n.

A titre de comparaison, la molécule de GSSG dont la masse molaire est proche de celle des PC₂, mais dont la structure est différente (présence d'une liaison disulfure), ne présentait pas du tout la même complexation avec Eu : pas de levée de dégénérescence et un pouvoir complexant plus faible puisqu'avec le GSSG la complexation de Eu était quasi inexistante pour $[\text{GSSG}]=10^{-5}\text{M}$ (soit l'équivalent du premier ajout de PC₂).

Toutefois, dans le cas des PC₄, tout Eu n'est complexé qu'à partir du deuxième ajout, soit une concentration en PC₄ de l'ordre de 5.10^{-5}M : la complexation est donc un peu moins forte qu'avec les PC₂ ou les PC₃.

L'ajustement du temps de vie à 615 nm, longueur d'onde de fluorescence maximale du spectre des espèces complexées, est tracé (Figure 97, Figure 98 et Figure 99). Le même ajustement a été fait pour chacune des longueurs d'onde correspondant aux maxima des levées de dégénérescence observées. Dans chaque cas, le temps de vie déterminé est similaire, aux incertitudes près (liées au rendement de fluorescence de chaque transition).


 Figure 97 : Décroissance de la fluorescence d'une solution de Eu ($5.10^{-5}M$) + PC₂ ($10^{-3}M$) pH 3

 Figure 98 : Décroissance de la fluorescence d'une solution de Eu ($5.10^{-5}M$) + PC₃ ($10^{-3}M$) pH 3

 Figure 99 : Décroissance de la fluorescence d'une solution de Eu ($5.10^{-5}M$) + PC₄ ($6.10^{-3}M$) pH 3

L'ensemble des courbes de décroissance temporelle de la fluorescence à 615 nm est ajustable à l'aide de fonctions monoexponentielles, suggérant l'existence d'un mode privilégié de complexation en solution, pour chaque échantillon. Les temps de vie ajustés valent :

$$\tau_{Eu-PC_2} = (220 \pm 20) \mu s \text{ en présence de PC}_2,$$

$\tau_{Eu-PC_3} = (580 \pm 40) \mu s$ en présence de PC_3 ,

et $\tau_{Eu-PC_4} = (530 \pm 40) \mu s$ en présence de PC_4 .

Selon l'Équation 11, en présence de PC_2 , il reste environ 4 molécules d'eau en sphère interne de coordination, ce qui est compatible avec la valeur de temps de vie mesurée avec le GSSG, dimère de GSH *via* un pont disulfure. Cependant, la complexation est beaucoup plus forte en présence de PC_2 . D'autre part, les spectres enregistrés lors de cette acquisition étaient très bruités : c'est probablement un manque de sensibilité de la technique lors de cette mesure qui a introduit un biais sur l'ajustement du temps de vie, en effet, celui-ci n'est pas visuellement satisfaisant en particulier les points en fin d'acquisition. Le temps de vie en présence de PC_2 est donc vraisemblablement sous-estimé (il n'a pas été possible de refaire la mesure dans des conditions plus favorables).

Avec les PC_3 et les PC_4 , il ne reste qu'une molécule d'eau en sphère interne de coordination. Ceci suggère soit la présence de plusieurs molécules de PC_3 ou de PC_4 autour de Eu ou bien que Eu est lié à plusieurs fonctions d'une même molécule de PC_3 ou de PC_4 . Les spectres mesurés par spectrométrie de masse permettront peut être de lever cette ambiguïté.

4.4. Etude des PC_n par ES-SM

Les études des PC_n par spectrométrie de masse sont nombreuses, leur structure est donc bien connue (Mounicou *et al.*, 2001; Yen *et al.*, 1999). L'identification de ces molécules se fait par SM/SM : leur structure est recomposée à partir des fragments identifiés.

En effet, les peptides se fragmentent préférentiellement au niveau des liaisons aminées pour produire une série de fragments typiques (Yates Iii *et al.*, 1996). Prenons l'exemple de la molécule PC_4 , dont la structure est rappelée Figure 100. Selon la localisation de la charge, les fragments de type b ou de type y sont observés en SM/SM. En plus de ces fragments directs, il est très fréquent d'observer ces mêmes fragments deshydratés : ils seront annotés d'un astérisque.

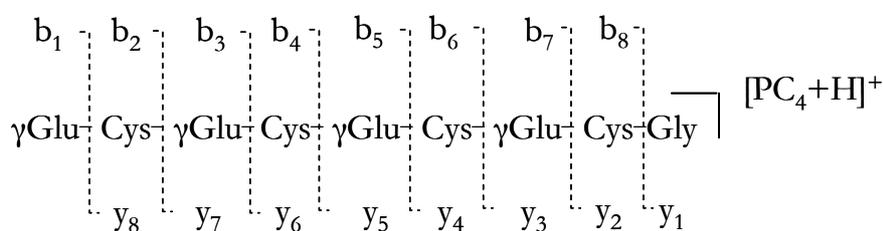


Figure 100 : Molécule de PC_4 et description de ses principaux fragments de type b et y.

Pour faciliter l'identification des espèces, nous avons regroupé les valeurs des masses de l'ensemble des fragments possibles dans le Tableau 33.

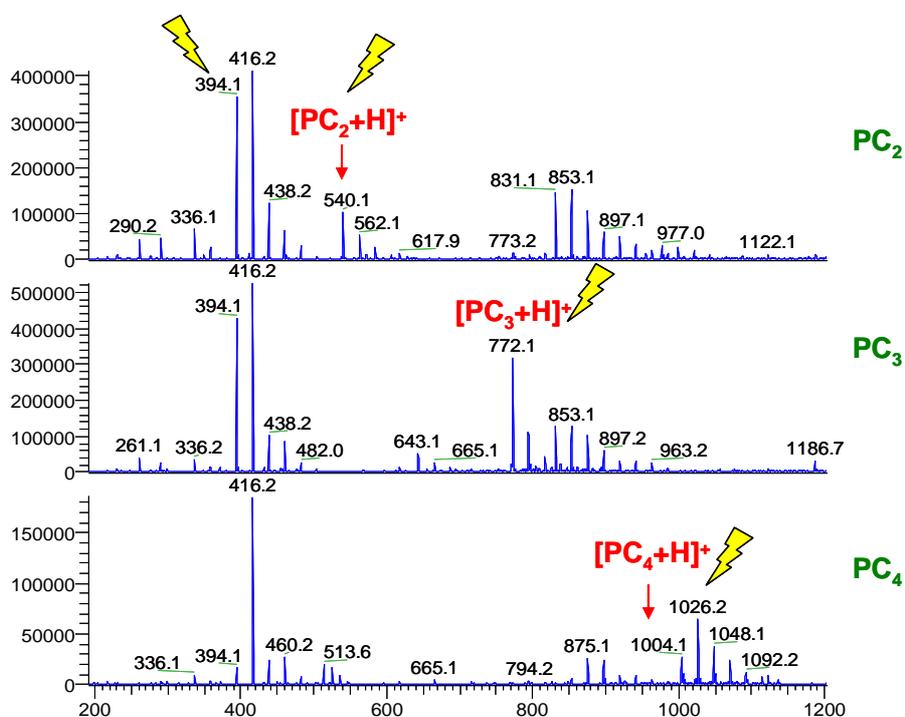
Tableau 33 : Récapitulatif des ions moléculaires des fragments de PC₄

n	m/z b _n	m/z b _n [*] = b _n - H ₂ O	m/z y _n	m/z y _n [*] = y _n - H ₂ O
1	130,05	112,04	76,04	58,03
2	233,06	215,05	179,05	161,04
3	362,10	344,09	308,09	290,08
4	465,11	447,10	411,10	393,09
5	594,15	576,14	540,14	522,13
6	697,16	679,15	643,15	625,14
7	826,20	808,19	772,19	754,18
8	929,21	911,20	875,19	857,18

4.4.1. Caractérisation des solutions de PC (sans Eu)

Afin de faire des comparaisons qualitatives d'un échantillon à l'autre, il convient de vérifier les distributions en masse des espèces présentes dans chacun des échantillons par ES-SM. Cependant, notre objectif étant d'observer les complexes formés avec Eu, l'optimisation des paramètres de la source ES a été faite pour favoriser l'observation d'un complexe, à m/z 542-4, présent dans les trois solutions de PC. Ces conditions ne sont ensuite plus modifiées quelque soit l'échantillon passé afin de pouvoir faire des comparaisons entre les différentes solutions de PC.

La distribution des espèces présentes dans les 3 solutions de PC est illustrée Figure 101.


 Figure 101 : Distribution des espèces dans les solutions de PC ([PC₂]=[PC₃]=[PC₄]=10⁻⁴M, mode ES⁺, pH~3)

Comme attendu, les solutions ne contiennent pas la molécule de PC_n « seule ». Elle n'est d'ailleurs jamais l'espèce majoritaire des spectres. Dans les trois échantillons, les espèces majoritaires sont les ions moléculaires qui apparaissent à m/z 394,1 et m/z 416,2.

Les PC_n ont été synthétisées en 2002, il est très probable qu'une certaine dégradation des échantillons ait eu lieu. Afin de vérifier si ces espèces majoritaires sont des fragments de PC_n , des analyses SM/SM ont été réalisées sur les ions marqués d'un éclair (Figure 101).

Des analyses SM/SM ont été faites sur les 3 types de PC. Les résultats obtenus avec PC_2 sont présentés Figure 102.

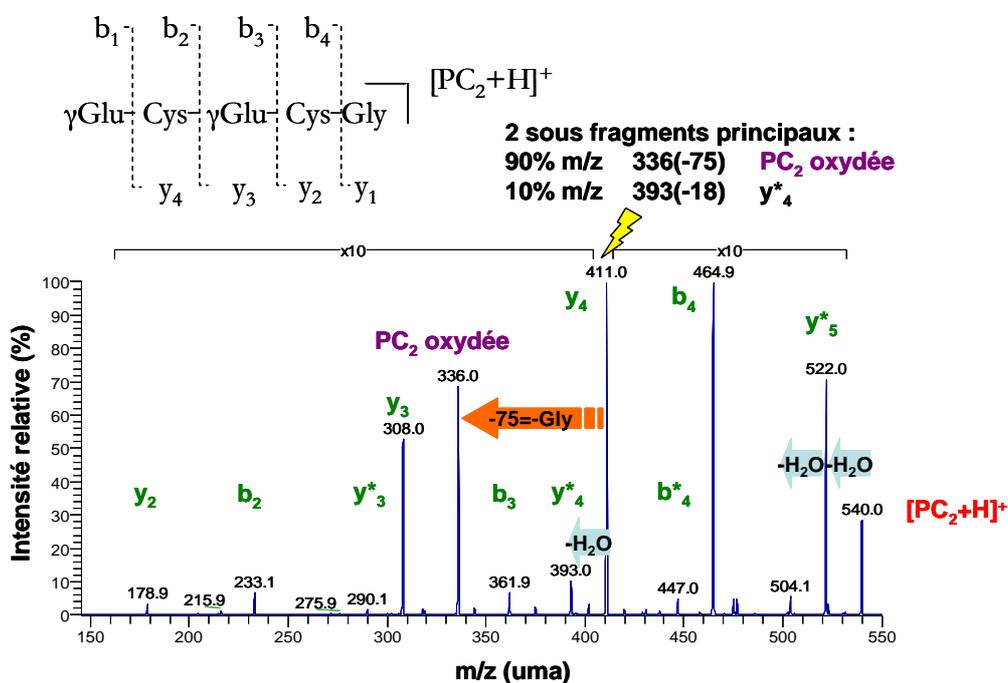


Figure 102 : Fragmentation MS/MS de PC_2 (et MS^3 de y_4 (m/z 411))

4.4.2. Caractérisation des solutions de PC (avec Eu)

Dans chaque solution de PC_n , un ajout de Eu à $10^{-4}M$ est effectué. Les solutions sont analysées de la même manière que précédemment. Les modifications des spectres des PC_n seules pour PC_3 et PC_4 sont illustrées Figure 103.

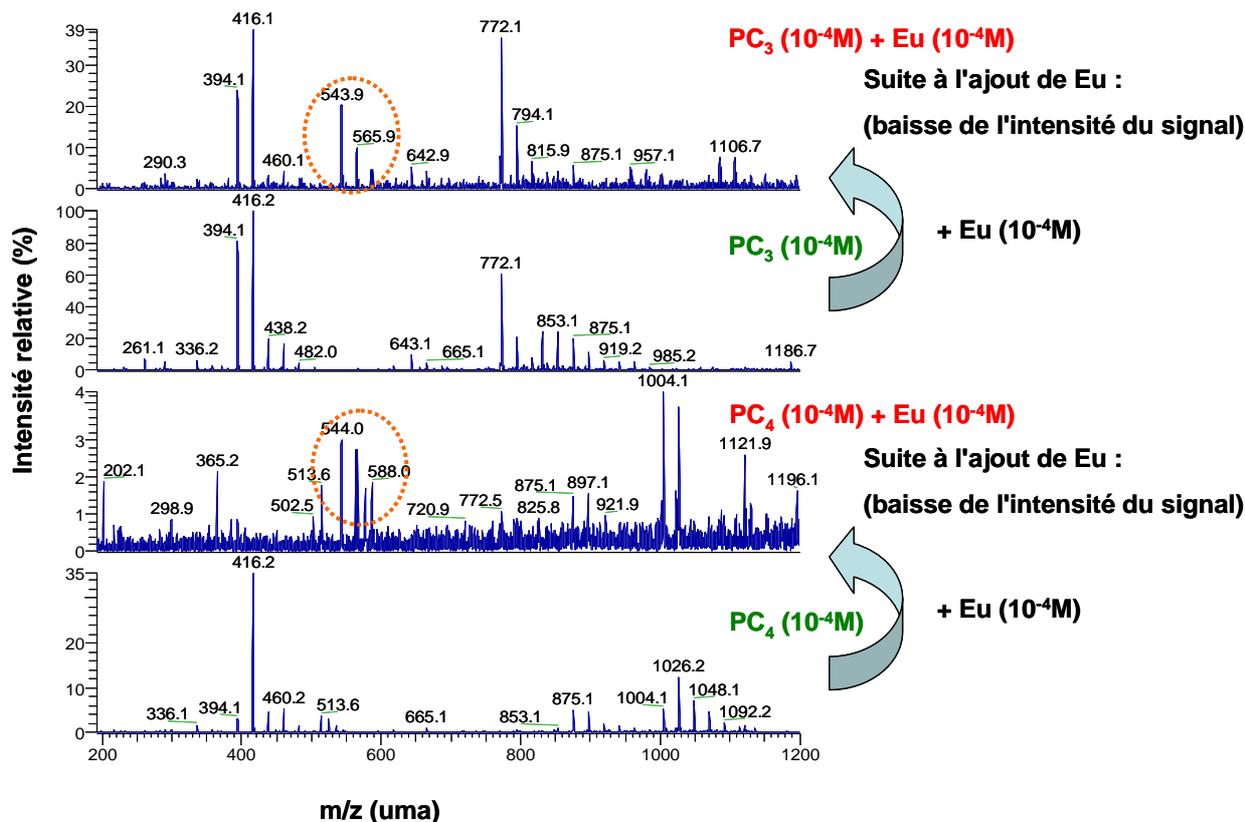


Figure 103 : Spectres ES-SM de PC₃(10⁻⁴M)+Eu(10⁻⁴M) pH 3 et PC₄(10⁻⁴M)+Eu(10⁻⁴M) pH 3

Suite à l'ajout de Eu, une baisse globale de l'intensité des spectres est observée, ainsi que l'apparition de pics moléculaires en plus. La même observation peut être faite pour la solution PC₂+Eu : quelque soit la solution de PC_n considérée, les espèces qui apparaissent sont les mêmes.

Afin de les identifier, un zoom est fait dans la gamme m/z 200-600 pour les spectres obtenus à partir des solutions PC₂ et PC₂+Eu (Figure 104).

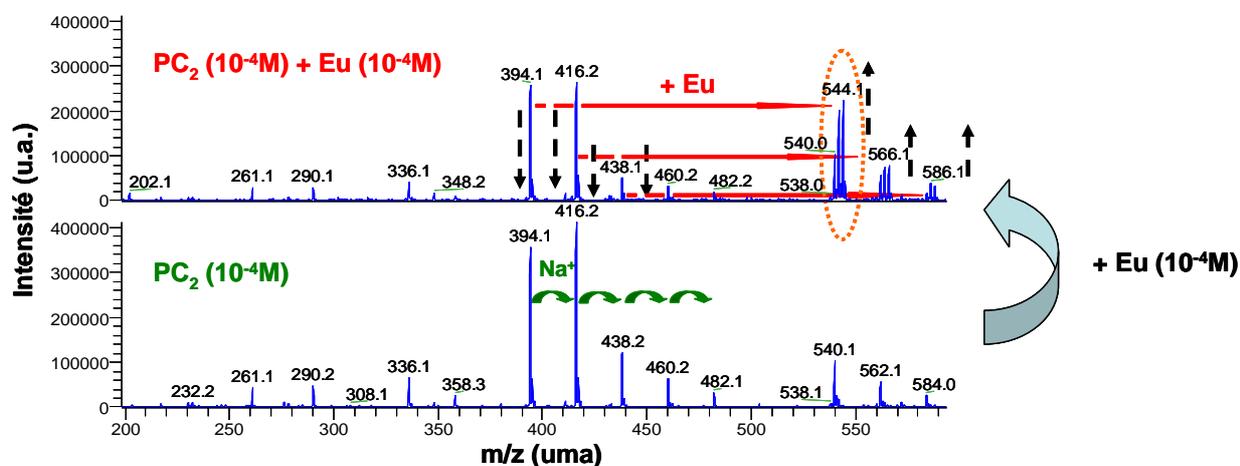


Figure 104 : Spectres ES-SM de PC₂(10⁻⁴M)+Eu(10⁻⁴M) pH 3 zoom sur m/z 200-600

L'intensité des fragments m/z 394,1 et 416,2 diminue suite à l'ajout de Eu, ce qui suggère leur « consommation ». Ceci est confirmé par l'apparition d'espèces nouvelles contenant le motif isotopique caractéristique de Eu. La Figure 105 permet de mieux visualiser les espèces formées.

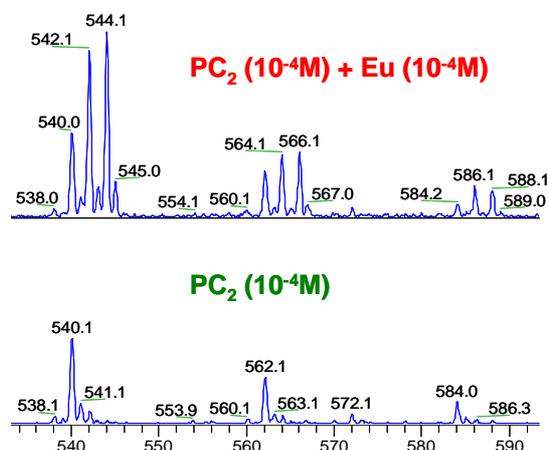


Figure 105 : Spectres ES-SM de $PC_2(10^{-4}M)+Eu(10^{-4}M)$ pH 3 zoom sur m/z 535-590

L'écart entre les 3 espèces formées vaut 22, ce qui indique que deux adduits sodium sont formés en solution (Figure 104). Il est à noter que pour éviter l'apport d'ions Na^+ , nous n'avons utilisé aucun récipient en verre au cours des analyses.

Une vérification de l'identification du complexe à m/z 542-4 est réalisée par modélisation isotopique (Figure 106).

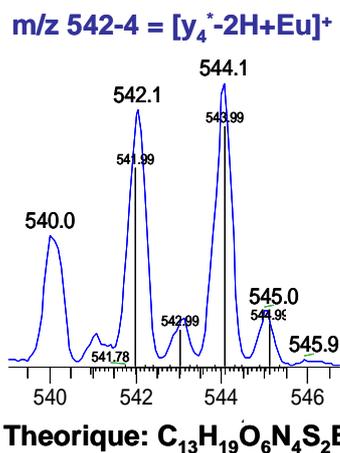


Figure 106 : Identification du complexe

4.5. Conclusion

Les analyses réalisées conjointement par SLRT et ES-SM sur les solutions de PC_n en présence de Eu convergent. Par SLRT, quelque soit la solution de PC_n , la complexation observée était supposée de même nature car (i) les spectres de fluorescence des espèces complexées présentent

tous les mêmes levées de dégénérescence et (ii) les temps de vie mesurés sont du même ordre de grandeur (pour la solution concentrée en PC₂, la valeur plus basse est due à un biais expérimental). Les spectres ES-SM ont permis de mettre en évidence la formation d'une espèce nouvelle, suite à l'ajout de Eu, présente dans les 3 solutions de PC. La complexation un peu plus faible observée dans le cas de PC₄ par SLRT est expliquée par la plus faible proportion de l'espèce complexante dans la solution de PC₄ « seule » (Figure 101).

D'après la littérature, les études menées pour identifier les complexes « métaux lourds-PC » à partir d'échantillons biologiques mis en contact avec des solutions de contaminant, montrent, après séparation par des techniques couplées, que les métaux lourds ne sont pas systématiquement retrouvés liés aux PC, mais même au contraire, quasi-exclusivement associés à des composés de plus petits poids moléculaires (Leopold *et al.*, 1998; Mounicou *et al.*, 2001; Yen *et al.*, 1999).

Ces résultats montrent que finalement la molécule de GSH, bien que maillon indispensable de la formation des PC, n'est pas un bon modèle pour la complexation des PC. Il conviendrait d'ailleurs de vérifier que la synthèse des PC peut être induite par Eu. En effet, il a été montré précédemment (Chapitre 1), que c'est l'interaction de la PCS avec l'édifice « GSH-métal » qui est une étape clé de la synthèse des PC. Il serait donc intéressant d'étudier les interactions PCS-GSH-RN.

L'étude des interactions avec les MT, édifices moins fragmentables, surtout lorsqu'ils sont stabilisés par des atomes de Zn, va permettre de montrer si leur structure plus importante permet d'atteindre un pouvoir plus complexant vis-à-vis de Eu.

5. Interactions avec les métallothionéines

Tout comme les études sur les PC, les études sur les métallothionéines sont qualitatives.

Nous disposons de MT-2 commerciales (Sigma-Aldrich), obtenues par purification de MT d'origine animale (de foie de lapin dans notre cas). Ceci implique donc la présence au moins à l'état de traces de métaux biologiques naturellement présents avec ces édifices : en particulier Cd et Zn. En effet, ce n'est qu'en présence de Zn lié (ou Cd, ou Cu) que les MT s'ordonnent pour former l'édifice constitué de deux domaines, correspondant à deux types de clusters métalliques : M₃ et M₄ constitués par des tétraèdres de fonctions thiolates (Figure 15). La conformation des MT n'est pas la même selon qu'elles ont fixé Zn, Cd ou Cu, mais la structure globale est similaire. Les MT ne sont pas très sélectives vis-à-vis du Zn, elles séquestrent les métaux en adaptant leur structure (Frausto Da Silva et Williams, 2001).

Par conséquent, l'éventuelle complexation que nous observerons ne sera pas directe, mais issue de la compétition avec ces éléments, d'autant plus forte que l'euporium est capable de déplacer les équilibres. De plus, ces MT-2 commerciales sont au moins composées de deux sous-isoformes

(c'est-à-dire au moins deux variantes ne différant par leur structure que de quelques AA). L'étude de ces molécules nécessite le couplage d'une technique de séparation (le plus souvent l'HPLC, Chromatographie Liquide Haute Performance) et d'une technique d'identification : l'ICP-SM ou l'ES-SM (Chassaigne *et al.*, 2000).

Sans séparation préalable, l'analyse par ES-SM serait trop complexe. Les échantillons ont donc uniquement été étudiés par SLRT, en présence de Eu.

En présence de MT, le spectre de Eu montre une faible augmentation de la fluorescence des transitions $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ et $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$:

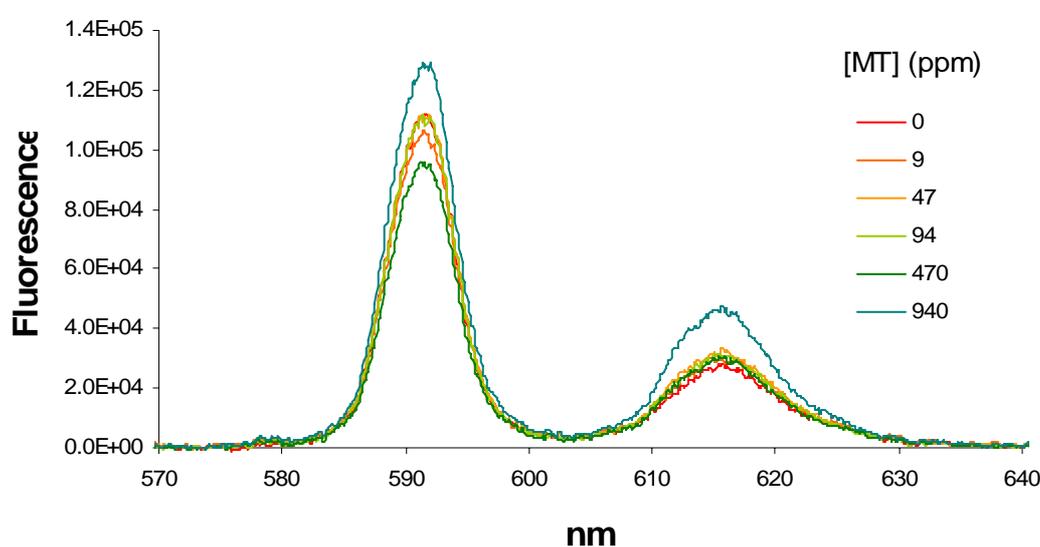


Figure 107 : Dosage Eu ($5.10^{-5}M$)-MT (de 0 à 940ppm) à pH 4 par SLRT ($\lambda_{exc}=394,6nm$; $E_{laser}=0,4mJ$; $D=10\mu s$; $L=800\mu s$)

Les concentrations en MT sont exprimées en ppm car leur masse molaire n'est pas connue avec précision. Pour faire une correspondance indicative avec les concentrations molaires, il est toutefois envisageable de choisir une masse molaire de l'ordre de 5 000 g/mol. Le dernier ajout de MT correspond donc à une concentration de $2.10^{-4}M$.

Cette fois, à l'issue du dernier ajout de MT, seule une faible proportion de Eu est complexée. Le spectre de Eu complexé par les MT ne montre pas de levées de dégénérescence sur les transitions principale de fluorescence, comme c'était le cas avec les PC. L'apparition de la transition à 579 nm pour le dernier ajout, indique toutefois une faible complexation par les MT. Une mesure de temps de vie a donc été faite pour détailler cette observation (Figure 108).

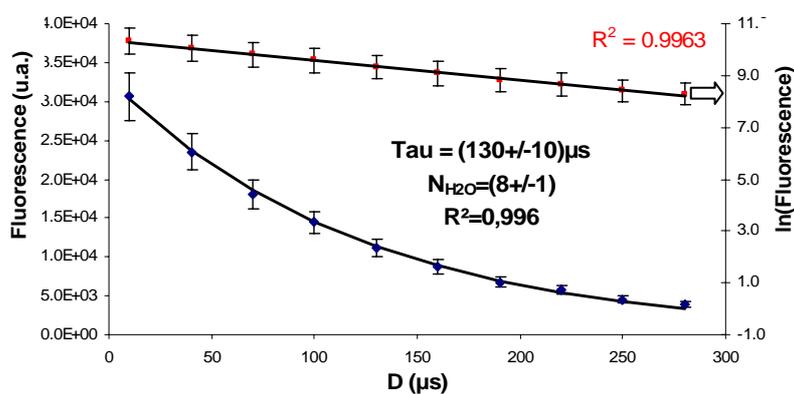


Figure 108 : Evaluation du temps de vie de Eu + MT ($\sim 2.10^{-4}M$) pH 4

Seule une molécule d'eau a été exclue de la première sphère de coordination de Eu. Ceci confirme que la complexation par les MT est faible à cette concentration là ($\sim 2.10^{-4}M$). Ceci est probablement dû au fait que dans ces conditions (pH acidifié) Eu n'est pas capable de déplacer les ions Zn^{2+} liés aux MT. La valeur de la constante Zn-MT n'est pas connue.

Chapitre 5

ETUDE DE L'IMPACT DE L'EUROPIUM SUR LES KERATINOCYTES *HaCaT*

1. Objectifs des études de contamination

Le but de ces études est dans un premier temps d'établir la spéciation, au sens premier, d'un Ln : Eu, au sein de cellules, c'est-à-dire définir sa répartition au sein des différents compartiments cellulaires. Nous souhaitons donc déterminer la concentration intracellulaire en Eu dans les cellules, données très peu disponibles pour les Ln dans les milieux vivants.

Ceci nous permettra de déterminer si les cellules sont capables d'intégrer significativement Eu. En effet, nous avons vu dans le chapitre précédent que cet élément était fortement complexé par les phytochélatines (PC) et de façon moins significative par les métallothionéines (MT).

Nous chercherons dans un deuxième temps à définir l'effet de la concentration en Eu sur la croissance des cellules.

1.1. Bibliographie

Bien que les Ln soient capables de se lier aux protéines membranaires (glycoprotéines), voire aux bicouches de phospholipides, les sites récepteurs potentiels des Ln sont encore mal connus. Des études physiologiques suggèrent que la surface externe des canaux calciques pourrait constituer un site privilégié de fixation des Ln (les $\log_{10} K$ sont de l'ordre de 6). En plus de cette affinité, l'entrée des Ln dans les cellules n'est pas exclue. Lorsqu'ils forment des agrégats, ils peuvent même être phagocytés par des cellules spécifiques (Evans, 1990).

L'influence des Ln et du Ca est surtout étudiée dans le cadre des études de phytoremédiation. Ces études montrent que les Ln sont majoritairement retenus par les membranes cellulaires. C'est notamment le cas de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, qui est capable d'adsorber sélectivement La^{3+} , Eu^{3+} , and Yb^{3+} à partir de solutions aqueuses (Texier *et al.*, 2002; Texier *et al.*, 2000; Texier *et al.*, 1999). En effet, la majorité des Ln : 90 ± 5 % est facilement désorbée par ajout d'une solution d'EDTA 0,1M. Des études complémentaires montrent que les fonctions mises en jeu sont les fonctions carboxylate et phosphate. L'influence des Ln et de Ca sur l'accumulation des métaux lourds (Cd notamment) est également étudiée (He *et al.*, 2005). Ces études montrent que Ca permet d'augmenter la quantité de Cd accumulé, alors que La permet également d'améliorer la tolérance au Cd, mais en diminuant son absorption chez *Lactuca sativa*.

1.2. Choix des cellules

La lignée cellulaire choisie est la lignée des kératinocytes HaCaT³⁴, ce sont des cellules épithéliales humaines représentant la couche basale de l'épiderme, première barrière contre les toxiques chez les animaux. Ce tissu est en effet particulièrement exposé aux atteintes physiques, chimiques ou microbienne et assure pour l'organisme une barrière protectrice grâce à l'élimination progressive de ses parties les plus superficielles, perte compensée par un renouvellement cellulaire continu à partir de cellules souches. Des cellules du type des kératinocytes seraient donc directement exposées en cas de contamination cutanée avec un RN. On sait de plus qu'elles sont capables de concentrer les ions métalliques comme le Ni ou le Co (Ermolli *et al.*, 2001). Des études *in vitro* sur les kératinocytes soumis à des radiations ionisantes ou directement sur la peau de personnes irradiées, existent (Benderitter *et al.*, 2007; Franco *et al.*, 2005; Jagetia *et al.*, 2003). Elles ont pour but de comprendre les mécanismes physiopathologiques de la guérison des lésions de la peau et montrent que ces mécanismes sont étroitement liés avec l'activité des gènes des enzymes « antioxydantes » comme la SOD (SuperOxydeDismutase) et la GPX (GlutathionPeroXydase).

De plus, nous avons vu précédemment que les Ln présentaient des propriétés similaires à celles du Ca, or, les ions calcium jouent un rôle déterminant dans le développement et la différenciation des cellules basales de l'épiderme (Koegel et Alzheimer, 2001). En particulier, il a été montré que l'augmentation de la concentration en calcium dans le milieu de culture des kératinocytes freine leur prolifération. Cet effet est observé dès 500 μM en Ca^{2+} (Bordat *et al.*, 2003; Wohlrab et Markwardt, 1999). Il est donc intéressant d'étudier la pénétration éventuelle de Eu dans les kératinocytes, cellules qui mettent considérablement à profit les voies d'entrée et sortie du calcium.

1.3. Choix des concentrations de contamination

Les études en milieu biologique sur les Ln sont rares : nous ne pouvons donc pas nous baser sur des données comme les EC_{50} ³⁵ pour choisir les concentrations des solutions de contamination. C'est donc par analogie avec les concentrations utilisées pour des métaux toxiques comme le Co que nous avons défini ces concentrations.

Co est un élément « essentiel », dont l' EC_{50} vaut entre 620 et 860 μM (selon les tests de cytotoxicité utilisés) avec les kératinocytes (Bresson *et al.*, 2006). Pour Eu, qui n'est pas un élément essentiel, on choisit donc de se placer à des concentrations inférieures. Les trois concentrations de contamination envisagées sont : 5 ; 50 et 500 μM .

³⁴ Ce sigle rappelle que les kératinocytes de cette lignée sont d'origine Humaine, proviennent d'un adulte et que leur culture est sensible à la concentration en Calcium et à la Température.

³⁵ Concentration Efficace 50 : concentration qui réduit l'activité métabolique des cellules de 50%. Cette concentration peut être déterminée à partir de différents tests comme le test WST-1 ou le test au rouge neutre.

2. Méthodologie

2.1. Solution mère de contamination

La solution mère de Eu est préparée dans l'eau ultrapure (non stérile), acidifiée à pH 3 par de l'acide nitrique, pour éviter la précipitation de Eu sous forme d'hydroxydes à la concentration de 50 mM (voir diagramme de spéciation, Figure 109). Afin d'éliminer les micro-organismes éventuels, cette solution est filtrée (la rétention bactérienne par filtration sur membrane est efficace à partir d'une porosité 0,45 μM).

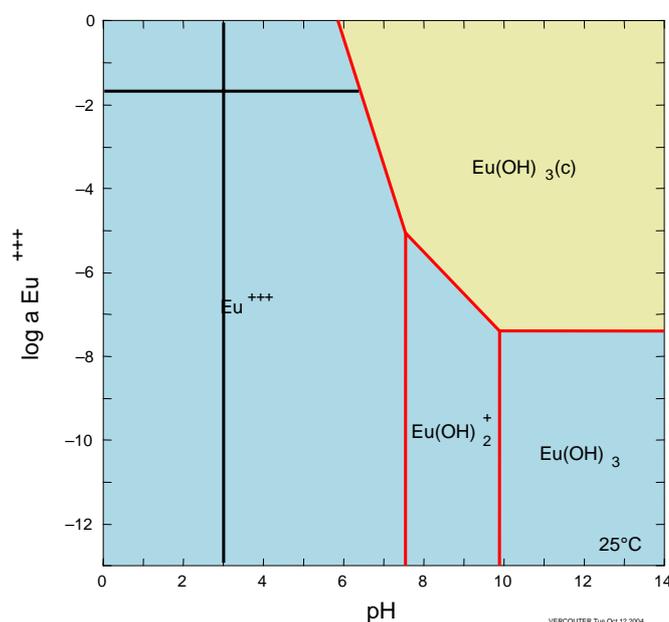


Figure 109 : Diagramme de spéciation de Eu en fonction du pH (25°C ; p_{atm})
Représentation de l'activité de Eu en fonction du pH : les zones bleues représentent les zones de stabilité des différentes espèces aqueuses, la zone jaune correspond au domaine de précipitation de l'hydroxyde.

2.2. Milieux de culture contaminés

Les milieux de culture cellulaire contaminés sont préparés par de faibles ajouts de solution mère de Eu, dans un milieu de culture classique (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium) afin d'obtenir les concentrations de contamination voulues : 5 ; 50 et 500 μM .

Ce milieu de culture, dont la composition exacte figure en Annexe 5, est constitué de nombreuses espèces (acides aminés essentiels et non essentiels, bases azotées, etc.) auxquelles des antibiotiques (pénicilline, streptomycine) ont été ajoutés ainsi que du Sérum de Veau Fœtal (ou SVF) à 10%. Ce dernier est un cocktail de protéines : il apporte en particulier des facteurs de croissance cellulaire (interleukines) qui vont provoquer l'activation des mitoses des cellules repiquées. Il contient également de l'insuline et de la fibrinolectine (qui permet l'ancrage des cellules aux parois des récipients de culture), du cholestérol, des vitamines, etc. Malheureusement, nous ne connaissons

pas la composition exacte du SVF, il est donc difficile de prédire son impact exact sur la spéciation de Eu dans le milieu de culture.

Néanmoins, en utilisant la composition du milieu décrit en Annexe 5, le diagramme de spéciation de Eu en fonction du pH, a été établi. La condition la plus pénalisante est obtenue dans le cas où $[Eu]=500 \mu M$ (Figure 110).

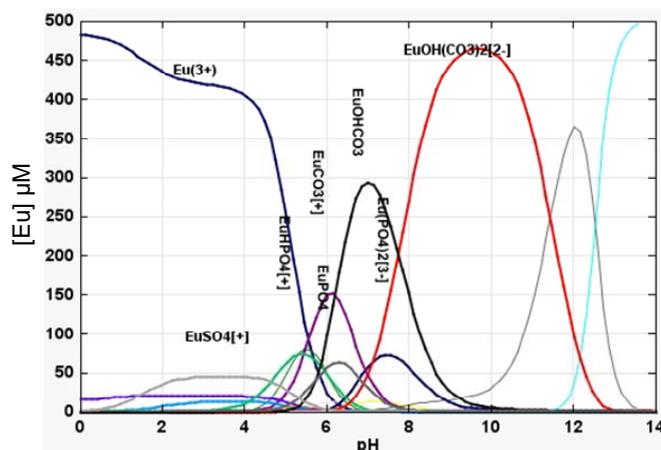


Figure 110 : Diagramme de spéciation de Eu ($[Eu(NO_3)_3]=500 \mu M$) dans le milieu de culture des cellules (composition en Annexe 5). Diagramme réalisé avec le logiciel J-CHESS (Van Der Lee et De Windt, 2002), les données thermodynamiques proviennent de la base de données de l'IUPAC (Powell, 2004).

Eu s'y trouve majoritairement sous forme complexée par les carbonates et les phosphates. Une espèce à base de phosphate ($EuPO_4 \cdot 10H_2O$) est toutefois susceptible de précipiter dans ces conditions, cependant, cette constante n'a pas été retenue par la base de donnée Nagra/PSI, la plus fiable concernant les données sur les Ln. Eu est donc bien mobilisable par les cellules dans le milieu de culture.

2.3. Culture des cellules

Les cellules sont cultivées dans des plaques 6 puits (chacun de 2 mL), à une température de $37^\circ C$ et dans une atmosphère très humide à teneur en CO_2 contrôlée. La moitié des lots est analysée au bout de 24h de contact avec les milieux contaminés, l'autre après 48h. Ceci permettra d'obtenir des informations concernant une éventuelle « cinétique » de la contamination d'une part, l'influence de la concentration en Eu d'autre part. Un lot de cellules sert de « témoin » : les cellules se développent dans un milieu de culture sans Eu.

Les différentes étapes de traitement des échantillons cellulaires sont résumées Figure 111.

Deux plaques 6 puits sont utilisées pour les études à 24h de contamination, autant pour celles à 48h de contamination. Chaque « puit » (3 par concentration de contamination) subit ensuite le même traitement :

1/ Un comptage des cellules (mortes et vivantes) est tout d'abord effectué (dénombrement au bleu Trypan). Il permet de calculer le pourcentage de mort cellulaire.

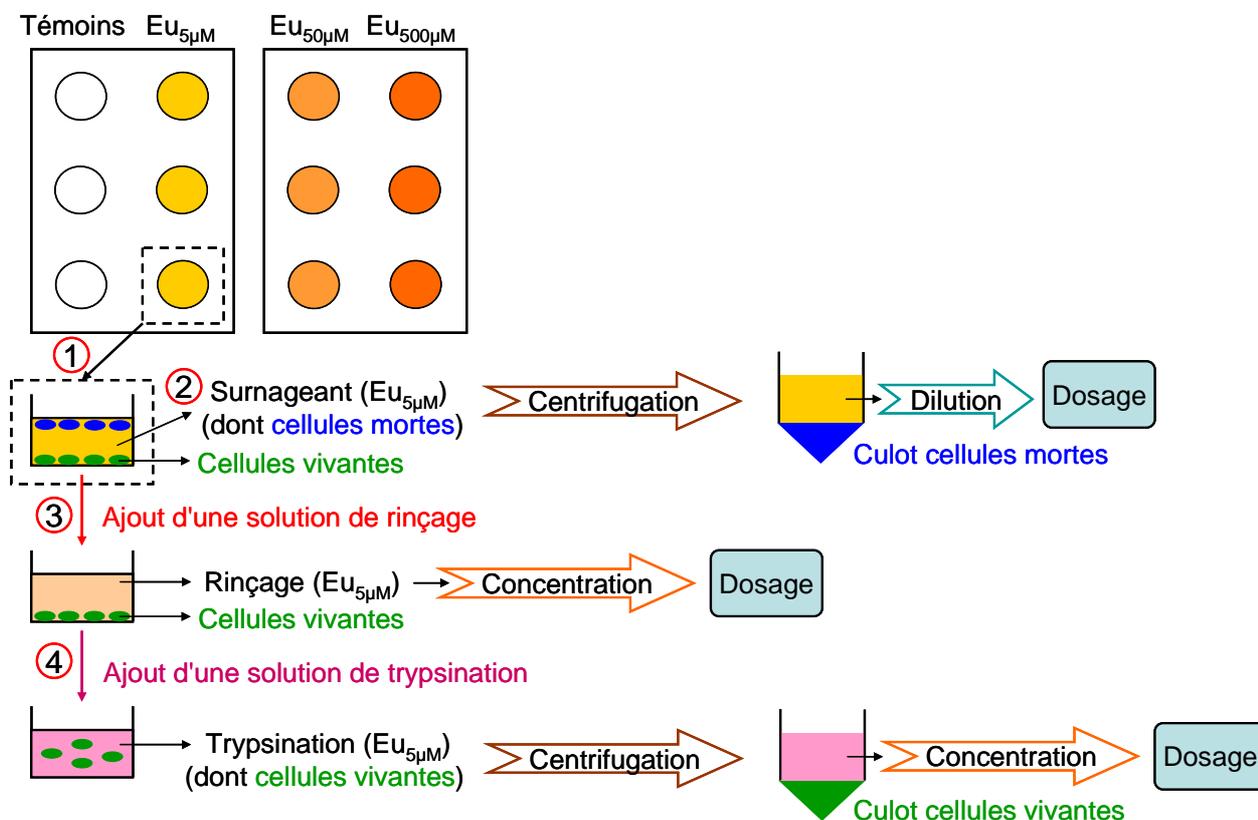


Figure 111 : Présentation des différents échantillons à analyser, issus des expérimentations de contamination cellulaire (Echantillons à « 24h » de contamination)

Une représentation identique pourrait être faite pour les échantillons laissés en contact 48h avec les solutions de contamination.

2/ Le surnageant, qui contient les cellules mortes, est prélevé et centrifugé. Un premier culot³⁶ cellulaire dit « culot cellules mortes » est isolé ; le surnageant liquide sera dosé pour mesurer la quantité de Eu consommé par les cellules.

3/ Les cellules « vivantes », qui adhèrent au récipient de culture, sont rincées afin d'éliminer un maximum du milieu de contamination qui pourrait rester adsorbé autour des cellules vivantes. Cette solution de rinçage est un milieu standard HBSS (dont la composition figure en Annexe 5, Tableau 38). La solution de rinçage est prélevée, concentrée (par évaporation) et dosée.

4/ Pour décoller les cellules « vivantes » du récipient de culture, une solution de trypsination³⁷ est ajoutée. Cette solution contient notamment de l'EDTA qui va donc complexer fortement

³⁶ Matière ayant sédimenté lors d'une centrifugation.

l'euporium fixé sur les parois cellulaires. La solution de trypsination contenant les cellules « vivantes » est prélevée et centrifugée. Un second culot cellulaire dit « culot cellules vivantes » est isolé ; le surnageant liquide sera dosé pour mesurer la quantité de Eu fixé sur les parois cellulaires.

5/ Les deux culots cellulaires sont rassemblés (Figure 112). En effet, nous estimons qu'une partie des cellules mortes, recueillies dans le surnageant, est morte à cause de la toxicité du contaminant, il convient donc de mesurer aussi la quantité de Eu qu'elles ont intégrée.

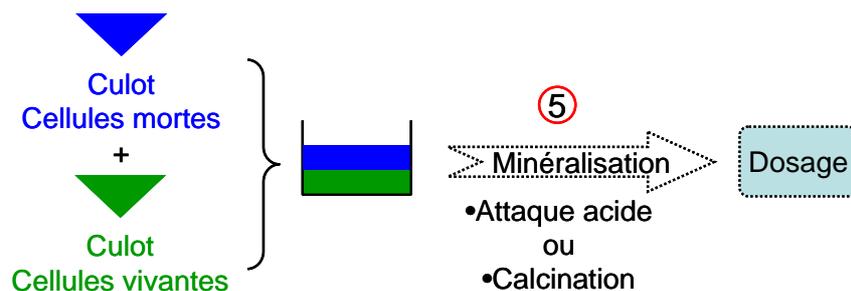


Figure 112 : Traitements des culots cellulaires

3. Analyses effectuées

Divers échantillons dans lesquels nous souhaitons connaître la concentration en Eu ont été recueillis : les culots cellulaires, les milieux de contamination, les surnageants de contamination, les solutions de rinçage et de trypsination.

La méthode de dosage élémentaire utilisée est la spectrométrie d'émission optique à plasma induit (ICP-SEO). C'est une technique multi-élémentaire et spécifique de l'élément dosé. En effet, l'échantillon analysé est transféré à l'intérieur de la source à plasma et transformé en vapeur atomique ou ionique excitée par collisions avec les différents constituants du plasma et entraînant l'émission de photons lors de la désexcitation de l'élément. L'intensité de chaque raie d'émission d'un élément donné est directement proportionnelle à sa concentration en solution, la relation étant linéaire dès les faibles concentrations. Pour l'élément euporium, les analyses sont réalisées à deux longueurs d'onde correspondant à deux raies ioniques très sensibles et ne présentant pas d'interférence avec d'autres éléments : 381,967 et 412,970 nm. Pour chaque longueur d'onde, le signal est moyenné sur 6 répliques de la mesure.

Le milieu de référence pour les échantillons est, autant que possible, proche de l'acide nitrique 0,5 M. Tous les échantillons sont « liquides » à l'exception des culots cellulaires, qui devront subir une étape de mise en solution (ou minéralisation) avant d'être analysés.

³⁷ La trypsine est utilisée pour séparer les cellules de leur boîte de culture car cette protéase a la propriété de supprimer les liaisons intercellulaires. A la solution de trypsination, du TNS est également ajouté (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, NaOH 0,1 M, SDS 0,5%), toujours pour lyser les protéines membranaires.

3.1. Les culots cellulaires

Ils sont recueillis afin de mesurer la quantité de contaminant incorporé, par million de cellules, au bout de 24h et 48h, en fonction de la concentration en Eu de la solution de contamination. Ces échantillons ont une teneur en Eu et un volume très faible (environ 200 μL). Pour les analyser, il faut donc mettre ces 24 échantillons en solution tout en les diluant le moins possible et mettre en œuvre une introduction « manuelle » et lente dans l'ICP-SEO (au moyen d'une seringue avec un débit du pousse-seringue à 50 $\mu\text{L}/\text{min}$).

Sur les échantillons recueillis après 24h de contamination, deux voies de minéralisation ont été testées : l'attaque acide et la calcination.

3.1.1. Minéralisation par attaque acide

Un mélange de 200 μL d'acide chlorhydrique et nitrique ultrapurs³⁸ (Annexe 7) et non dilués, est ajouté aux culots cellulaires. Ce milieu très oxydant permet de détruire les parois cellulaires et les organites internes. Au bout de quelques heures, les culots ont été solubilisés. Cependant, ce milieu est beaucoup trop agressif pour les analyses par ICP-SEO (seringue, capillaires, effets de matrice, etc.). Il est donc nécessaire d'évaporer les acides : 8 h à 80°C. Les culots cellulaires ramenés à sec sont enfin repris dans le milieu d'analyse adéquat et passés quelques minutes aux ultrasons pour homogénéiser les solutions avant analyse.

3.1.2. Minéralisation par calcination

Cette fois la destruction des parois cellulaires et des organites est obtenue par chauffage. Les culots cellulaires ne sont pas placés directement dans le four, mais sont mis pendant 1h dans une étuve à 120°C afin d'évaporer lentement le surplus de liquide. Les creusets sont ensuite placés dans le four, initialement froid, et laissés à 650°C pour une nuit. Le lendemain, les culots cellulaires ramenés à sec sont enfin repris dans le milieu d'analyse adéquat et passés quelques minutes aux ultrasons pour homogénéiser les solutions avant analyse.

3.1.3. Autre voie de minéralisation envisagée : la lyophilisation

Une troisième voie de minéralisation a également été envisagée mais non testée : la lyophilisation. En effet, nous ne disposons que de 3 échantillons par concentration de contamination en Eu (Figure 111) : nous avons souhaité conserver la 3^{ème} réplique comme échantillon témoin.

³⁸ Les acides de pureté courante contiennent une faible quantité de RN, or les culots cellulaires contiennent une quantité très faible de Eu, l'utilisation d'acides ultrapurs permet donc une mesure plus juste de la quantité de Eu incorporée par les cellules.

3.2. Les échantillons « liquides »

Les échantillons « liquides » sont très nombreux (1 solution mère, 4 milieux de culture, 24 surnageants de contamination, 24 solutions de rinçage et 24 solutions de trypsination), ils ont donc été analysés en utilisant un passeur automatique d'échantillons. Pour ce faire, il faut disposer d'échantillons de 10 mL. Chaque échantillon (de 1 mL) a donc au moins été dilué 10 fois. Cependant, ces échantillons liquides sont beaucoup plus concentrés en Eu que les culots cellulaires, les dilutions adéquates permettant de se trouver dans la gamme d'étalonnage de l'ICP-SEO ont donc été faites.

L'Eu est bien détecté par ICP-SEO : sa limite de détection est inférieure au ppb. Une gamme d'étalonnage de 10 à 1000 ppb a été faite (10 ; 50 ; 100 et 1000 ppb, plus le blanc d'analyse). Un étalon de plus (200 ppb) est également préparé, indépendamment des autres. La stabilité des mesures par ICP-SEO a été vérifiée en passant à intervalles réguliers des solutions de référence : un « blanc » (HNO_3 0,5 M) et l'étalon à 200 ppb.

3.2.1. Solutions de contamination

La concentration exacte de la solution mère en Eu, après filtration, a été mesurée et la concentration des différentes solutions de contamination en Eu a été également vérifiée.

La connaissance des concentrations exactes de ces solutions permettra d'établir un bilan de matière de Eu à partir des quantités réellement introduites dans les puits de culture.

3.2.2. Surnageants de contamination

Les surnageants de contamination (une fois les culots de cellules mortes séparés par centrifugation, Figure 111) ont été analysés. *A priori*, leur concentration devrait être proche de la concentration des solutions de contamination, les cellules n'ayant prélevé qu'un faible pourcentage de contaminant. Les dilutions pour se trouver dans la gamme d'étalonnage sont donc identiques à celles des solutions de contamination.

3.2.3. Solutions de rinçage

A l'issue d'un rinçage, nous souhaitons connaître le pourcentage de contaminant qu'il reste en solution. Assez arbitrairement, nous estimons qu'il peut rester environ 5 à 10% de la concentration en contaminant, il faut donc éviter de trop diluer ces échantillons, ils n'ont donc subi qu'une dilution par 10.

3.2.4. Solutions de trypsination

Ces solutions contiennent *a priori* encore moins de contaminant que les précédentes, mais, le cocktail de trypsination contient de l'EDTA, il est donc possible que ce dernier « rinçage » « concentre » Eu restant sur les parois des cellules « vivantes », en le complexant sélectivement. Ces solutions sont donc préparées exactement comme les solutions de rinçage (dilution par 10).

3.2.5. Témoins

Tous les échantillons dits « témoins », c'est-à-dire exempts d'Eu (solution de contamination témoin, surnageant témoin, rinçage témoin et trypsine témoin) subiront le même traitement car il faut les diluer le moins possible pour vérifier qu'ils ne contiennent pas de contaminant, ils servent également de « blancs » au sens « effet de matrice ».

4. Résultats

4.1. Bilan de matière

L'ensemble des analyses effectuées permet de dresser un bilan de matière de Eu au cours des diverses étapes des tests de contamination. Ces études ayant été menées en incubateur à 37°C, une variation non négligeable du volume des échantillons a été observée (-6% du volume du milieu de culture au bout de 24h, et -11% après 48h). Les résultats ne sont donc pas présentés en concentration volumique mais en quantité de matière (microgramme de Eu).

Dans tous les cas, les concentrations en Eu mesurées dans les « blancs » sont de l'ordre de la limite de détection de l'appareil (notées « < LD » dans les tableaux de résultats), pour faciliter la lecture des résultats, ces données ne sont pas mentionnées dans les tableaux de résultats.

Les bilans de matière pour les trois concentrations de contamination sont regroupés dans le Tableau 34.

Pour chaque « puit », la quantité de Eu introduite est connue : elle figure en haut à gauche de chaque tableau ($m_{Eu\ tot}$). Les quantités mesurées dans chaque autre solution sont donc rapportées à cette quantité afin de déterminer la répartition de Eu au cours des différentes étapes.

Les résultats présentés sont issus de la moyenne des quantités mesurées sur trois échantillons (cf. Figure 111 : 3 puits par concentration) Les incertitudes sur chaque quantité de matière mesurée sont importantes : ceci n'est pas dû à un manque de précision de la technique de mesure, mais reflète une variabilité importante des quantités mesurées dans chacun des 3 échantillons.

Tableau 34 : Répartition de Eu entre les différents types d'échantillons dosés par ICP-SEO (bilan de matière)

[Eu]_{contam} = 5 µM m _{Eu tot} = 1,66 µg	24h			48h		
	m _{Eu} (µg)	incertitude	%(/m _{Eu tot})	m _{Eu} (µg)	incertitude	%(/m _{Eu tot})
Surnageant	1,4	0,2	83%	1,55	0,07	93%
Rinçage	0,11	0,03	7%	0,029	0,003	2%
Trypsination	0,094	0,006	6%	0,134	0,008	8%
Culots cellulaires	0,03	0,01	2%	0,024	0,001	2%
Bilan			96%			104%

[Eu]_{contam} = 50 µM m _{Eu tot} = 15,35 µg	24h			48h		
	m _{Eu} (µg)	incertitude	%(/m _{Eu tot})	m _{Eu} (µg)	incertitude	%(/m _{Eu tot})
Surnageant	11,0	0,2	71%	12	1	81%
Rinçage	0,8	0,1	5%	0,24	0,02	2%
Trypsination	2,06	0,04	13%	2,1	0,2	14%
Culots cellulaires	0,7	0,4	5%	0,89	0,01	6%
Bilan			94%			103%

[Eu]_{contam} = 500 µM m _{Eu tot} = 140,00 µg	24h			48h		
	m _{Eu} (µg)	incertitude	%(/m _{Eu tot})	m _{Eu} (µg)	incertitude	%(/m _{Eu tot})
Surnageant	130	10	92%	138	6	99%
Rinçage	5	2	4%	2,4	0,2	2%
Trypsination	9	1	6%	14,1	0,2	10%
Culots cellulaires	2,7	0,4	2%	0,97	0,01	1%
Bilan			104%			112%

Comme attendu, la majorité de Eu est dans le surnageant (entre 70 et 99%). Toutefois, nous constatons que le prélèvement de cette fraction n'est pas total car entre 10 et 20% de Eu sont récupérés par la suite lors des étapes de rinçage et de trypsination.

La fraction de Eu récupérée dans les surnageants est dans tous les cas plus importante à 48h qu'à 24h, ceci est confirmé par la fraction présente dans l'étape de rinçage : à 48h elle est toujours plus faible qu'à 24h. Comme supposé, l'étape de rinçage permet de récupérer environ 5% de Eu restant à 24h, plutôt 2% à 48h, cette baisse est peut être due au nombre total de cellules. Il est en général moindre au bout de 48h, « facilitant » un prélèvement plus optimal du surnageant.

L'étape de trypsination permet de récupérer environ deux fois plus de contaminant que lors du rinçage, voire plus encore à 48h. Comme nous l'avons déjà évoqué : la trypsine lyse les protéines membranaires et le mélange de trypsination contient de l'EDTA, capable de lier sélectivement Eu ($\log_{10}K_{11}=17,52$ (Wu et Horrocks, 1997)). Cette étape, en plus d'être un second « rinçage », permet de récupérer Eu lié aux membranes des cellules : en effet, si $\log_{10} K > 12$, le ligand déplace l'équilibre avec la membrane (Bingham et Dobrota, 1995). Si on estime à 2% la quantité probable de Eu qu'un second rinçage permettrait de récupérer, il apparaît qu'environ 6% de Eu était lié aux

protéines membranaires au bout de 24h, et 9% à l'issue de 48h, augmentation probablement liée au plus grand temps de contact avec la solution de contamination.

Enfin, la quantité de Eu mesurée dans les culots cellulaires représente plusieurs pourcents de la quantité initialement mise en solution. Toutefois, il n'est pas possible de discuter les quantités de Eu incorporé à partir de ces résultats car un paramètre important n'est pas ici pris en compte : le nombre total de cellules qui a intégré le contaminant (qui est différent dans chaque puit). Il convient donc de normaliser ces quantités par million de cellules, ce qui fait l'objet du paragraphe suivant.

4.2. Mesure des quantités de Eu intégrées par les cellules

4.2.1. Quelques remarques

La quantité de Eu intégrée est ramenée au nombre de cellules présentes dans chaque culot cellulaire minéralisé. Les quantités de Eu intégrées sont donc exprimées en nanogrammes par million de cellules.

La minéralisation par calcination donne des concentrations en Eu plutôt inférieures à celles mesurées dans les échantillons équivalents suite à l'attaque acide. Cette différence provient probablement de la difficulté de récupérer tout Eu au fond des creusets qui servent à la calcination. C'est pourquoi le protocole d'attaque acide a été choisi pour minéraliser le culot cellulaire restant (à 24 h) et les 3 culots cellulaires issus des contaminations à 48 h.

4.2.2. Analyses des concentrations dans les culots cellulaires

Les pourcentages de mort cellulaire et les résultats des dosages de Eu dans les culots cellulaires figurent dans le Tableau 35 :

Tableau 35 : Récapitulatif des données disponibles suite aux analyses des culots cellulaires : croissance des cellules, mort cellulaire et quantité intracellulaire de Eu

[Eu] _{contam} μM	Nb total de cellules (t=24h)	Nb total de cellules (t=48h)	Variation*
0	600 000 ± 100 000	600 000 ± 100 000	-8%
5	900 000 ± 200 000	440 000 ± 90 000	-49%
50	400 000 ± 100 000	540 000 ± 90 000	+24%
500	400 000 ± 30 000	270 000 ± 80 000	-33%

* La variation entre les lots à 48h et ceux à 24h est calculée à partir des nombres de cellules non arrondis suite à l'expression des incertitudes.

[Eu] _{contam} μM	% Cellules mortes (t=24h)	% Cellules mortes (t=48h)	Variation*
0	0,7%	3,3%	+404%
5	9,2%	10,1%	+9%
50	8,9%	12,4%	+40%
500	20,1%	22,3%	+11%

[Eu] _{contam} μM	Eu (t=24h ; ng/million)	Eu (t=48h ; ng/million)	Variation*
0	< LD	< LD	
5	30 ± 20	60 ± 20	+89%
50	1 800 ± 500	1 700 ± 500	-5%
500	6 800 ± 500	3 700 ± 500	-46%

4.2.2.1. Effet du temps de contamination (24h ou 48h)

Il est délicat de comparer le nombre total de cellules à 24h et à 48h car ils ne sont pas issus d'un même « puits ». En général, au bout d'un certain temps, même dans un milieu de culture non contaminé, les cellules commencent à mourir car elles sont « trop » nombreuses et ont moins de place pour se développer : c'est la confluence des cellules.

En fonction du temps, la mortalité cellulaire pour une concentration de contamination donnée est stable (entre 1 et 3% de cellules meurent, ce qui est comparable à la mortalité « naturelle » des cellules, dans le milieu de culture non contaminé). L'effet de Eu semble s'ajouter à cette mortalité « naturelle ».

4.2.2.2. Effet de la concentration de contamination en Eu

La mortalité cellulaire observée pour les différentes concentrations de contamination en Eu augmente. Cependant, pour 5 et 50 μM en Eu, cette mortalité additionnelle est similaire : de l'ordre de 10%.

Trois comportements sont observés en fonction de la concentration de contamination en europium.

En effet, pour 5 μM , la concentration en Eu double si le temps de contact avec la solution de contamination est doublé. Ainsi, même si les cellules meurent significativement de l'intégration de Eu (10% de mortalité cellulaire en plus par rapports aux témoins), elles sont encore capables de concentrer Eu. Il semble donc qu'une concentration inférieure à la centaine de nanogrammes par million de cellules ne semble pas être une dose qui altère énormément la viabilité des cellules.

Pour 50 μM , la quantité de Eu intégré au bout de 48h est plus faible qu'à l'issue des 24h de contamination. La mortalité cellulaire n'augmente pas très significativement par rapport à 5 μM . Cependant, si nous nous intéressons au nombre de cellules totales dans le milieu contaminé à 50 μM , par rapport à 5 μM , nous observons que les cellules se sont deux fois moins développées à l'issue des 24 h de contamination. Cette observation n'est pas vérifiée pour les échantillons à 48h, où la quantité de cellules est même similaire à celles des témoins. Le pourcentage de cellules mortes n'augmente pas beaucoup à l'issue des 48 h, car les cellules ayant survécu jusque là sont peut être déjà celles qui présentaient la meilleure tolérance à l'euprotium. Nous supposons donc que l'euprotium à 50 μM est responsable de l'excès de mort cellulaire. La quantité de Eu par million de cellules n'augmente cependant pas significativement, il est probable que les cellules mortes suite à l'intégration de l'euprotium aient relargué tout ou partie de l'euprotium qu'elles avaient intégré. Pour confirmer cette hypothèse, il conviendrait de faire des tests permettant de déterminer si les cellules sont mortes par nécrose : c'est-à-dire d'une mort rapide, avec destruction potentielle des parois cellulaires.

Pour 500 μM , nous observons des tendances très similaires à 50 μM : (i) une forte baisse du nombre total de cellules qui sont parvenues à se développer dans le milieu contaminé, et d'autant plus si elles sont laissées en contact avec la solution de contamination pendant 48h ; (ii) un doublement du pourcentage de mort cellulaire, que ce soit à 24h ou à 48h de contamination. Le comptage (approximatif) nous indique que nous ne sommes *a priori* qu'à 20% de mort cellulaire : des tests de toxicologie permettraient de confirmer si une concentration de contamination de 500 μM en Eu est une concentration bien inférieure à l' EC_{50} de Eu pour ces cellules. Pour expliquer la baisse de la quantité d'euprotium incorporé à l'issue des 48h de contamination, la même hypothèse que pour les cellules contaminées à 50 μM est formulée : les cellules qui meurent relarguent dans le milieu de culture l'euprotium qu'elles ont intégré, il est récupéré dans le surnageant et lors de l'étape de rinçage.

5. Conclusion

Les expériences menées ont montré que Eu s'associait aux protéines membranaires de cellules animales (les kératinocytes HaCaT) et que les cellules étaient aussi capables de l'intégrer significativement. Pour préciser ces proportions, il serait intéressant de refaire ces tests sur un plus grand nombre de lots de cellules, les incertitudes sur les 3 lots étudiés étant importantes.

Les concentrations d'étude (5 μM , 50 μM et 500 μM) semblent causer au maximum 25 % de mort cellulaire, au bout de 48h de contact. Toutefois, ce pourcentage, déterminé par simple comptage sur une faible proportion du milieu de culture n'a pas valeur de test de viabilité cellulaire, comme ceux utilisés pour déterminer les EC_{50} . Il serait intéressant de mesurer l' EC_{50} de Eu pour ces cellules : des études à des concentrations de contamination plus élevées, associées aux tests de toxicologie adaptés seront nécessaires pour la déterminer.

Nous avons observé deux comportements en fonction de la concentration en contaminant dans le milieu de culture :

- Pour une concentration de contamination de 5 μM , la quantité de Eu intracellulaire augmente avec le temps de contact. Même si les cellules meurent significativement de l'ingestion de l'euporium (10% de mortalité cellulaire en plus par rapport aux témoins), elles sont encore capables d'ingérer de l'euporium. Une concentration inférieure à la centaine de ng par million de cellules ne semble pas être une dose qui altère énormément la viabilité des cellules, mais diminue leur capacité à proliférer, en particulier au bout de 48h.

- A 50 et 500 μM , nous observons (i) une forte baisse du nombre total de cellules qui sont parvenues à se développer dans le milieu contaminé, et ce encore plus si elles sont laissées en contact avec la solution de contamination pendant 48 h, (ii) un doublement du pourcentage de mort cellulaire, que ce soit à 24h ou à 48h de contamination. Pour expliquer la baisse de la quantité de Eu intégré à l'issue des 48h de contamination, l'hypothèse selon laquelle les cellules qui meurent relarguent dans le milieu de culture l'euporium qu'elles ont précédemment intégré, est formulée.

Pour confirmer cette hypothèse, il conviendrait de faire des tests permettant de déterminer la voie de mort cellulaire (notamment si les cellules sont mortes par nécrose : c'est-à-dire d'une mort rapide, avec destruction potentielle des parois cellulaires).

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Au cours de ce travail, nous avons étudié les interactions entre les radionucléides et les molécules biologiques d'intérêt. Nous avons choisi d'étudier un actinide : l'uranium(VI) ainsi que l'euporium(III) en tant qu'analogue des actinides trivalents.

Les molécules biologiques choisies sont les phytochélatines, dont le rôle est de protéger les cellules contre les intrusions de métaux lourds non essentiels (donc toxiques). Ces protéines sont donc susceptibles d'être impliquées dans les mécanismes de séquestration des radionucléides chez le vivant. Elles ont toutefois une structure complexe, c'est pourquoi, afin de mieux comprendre leur réactivité, nous avons étendu nos études aux sous entités qui les constituent (acides aminés : acide glutamique et cystéine (ainsi que l'histidine) ; polypeptides : glutathion réduit et oxydé).

Nous avons en particulier déterminé la spéciation en solution (stoechiométrie, structure) ainsi que les constantes d'équilibre associées à la formation de ces espèces. Ces études ont été menées par Spectrofluorimétrie Laser à Résolution Temporelle (SLRT), ElectroSpray-Spectrométrie de Masse (ES-SM), Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IRTF) et Spectroscopie d'Absorption X (EXAFS). La détermination des constantes d'équilibre nous a permis de conclure que le pouvoir complexant de ces molécules vis-à-vis des radionucléides était modéré ($\log_{10}K_1 < 3$, à pH 3 ou 6), les espèces formées sont mononucléaires avec une seule molécule de ligand (1:1). L'interaction se fait *via* les groupements durs (oxygénés).

La complexation directe de l'euporium par des molécules de phytochélatines à pH acide a été étudiée conjointement par SLRT et ES-SM. Le pouvoir complexant de ces molécules est bien supérieur à celui du GSH dont elles sont pourtant issues. L'interaction de l'euporium avec les métallothionéines n'est pas plus forte qu'avec les phytochélatines, au contraire. Cependant, les études sur des édifices de taille plus importante : les phytochélatines (PC₂ à PC₄) montrent un accroissement significatif de la complexation de l'euporium. L'étude des métallothionéines, édifices similaires aux phytochélatines mais de taille plus importante, n'a pas confirmé l'augmentation du pouvoir complexant avec la taille de la molécule. Néanmoins, les métallothionéines étudiées étaient très riches en un métal essentiel, compétiteur : Zn²⁺. Nous avons donc montré que le déplacement de cet équilibre n'était pas atteint avec les faibles concentrations en radionucléides ajoutées.

Les kératinocytes HaCaT sont capables d'incorporer significativement de l'euporium. Les concentrations d'étude (5 μ M, 50 μ M et 500 μ M) semblent causer une mortalité maximale de l'ordre de 25% au bout de 48h de contamination mais l'EC₅₀ n'a pas été déterminée pour ces cellules. A partir d'une concentration en contaminant de 50 μ M dans le milieu de culture, nous observons des effets significatifs sur les cellules : (i) une forte baisse du nombre total de cellules qui sont parvenues à se développer dans le milieu contaminé, (ii) un doublement du pourcentage

de mort cellulaire, que ce soit à 24h ou à 48h de contamination. Pour expliquer la baisse de l'euporium incorporé à l'issue des 48h de contamination, nous formulons l'hypothèse que les cellules qui meurent relarguent l'euporium qu'elles ont intégré dans le milieu de culture.

Les perspectives de ce travail sont nombreuses.

Il serait tout d'abord intéressant de travailler sur des solutions synthétiques contenant des PC et des cations biologiques compétiteurs comme Mg ou Ca, afin de se rapprocher des conditions biologiques, plus complexes.

Des études de contamination cellulaires à des concentrations plus fortes en euporium permettraient de déterminer l' EC_{50} de ce radionucléide avec les cellules de peau. Ceci permettrait de se placer à une concentration de contamination significative tout en assurant une bonne viabilité cellulaire afin d'étudier plus précisément la localisation de l'euporium dans les cellules viables. Pour cela, il conviendrait de séparer les organites cellulaires (par centrifugation différentielle, protocole permettant de séparer les fractions nucléaires, membranaires et cytosoliques des cellules contaminées) afin de déterminer dans quel compartiment Eu est stocké préférentiellement. Ces études sont à mettre en parallèle avec des études d'imagerie des cellules comme les analyses par microsonde à faisceaux d'ions ou les analyses PIXE (Emission X induite par des particules chargées). En effet, connaître précisément la localisation des RN permettrait aussi d'obtenir des informations sur leurs voies de toxicité, dans le cas de Eu par exemple, existe-t'il une compétition entre les lanthanides et le métabolisme du calcium au sein des cellules ?

Nous avons montré le fort pouvoir complexant des phytochélatines ainsi que l'incorporation significative de l'euporium dans les keratinocytes, ceci suggère une corrélation entre la tolérance de l'euporium et la présence de molécules de types phytochélatines, ou de petites métallothionéines chez les cellules animales. Ainsi, il serait intéressant d'analyser plus précisément le contenu du cytosol des cellules contaminées, par séparation des protéines cytosolique par taille (par chromatographie d'exclusion stérique associée à un détecteur UV-Vis : SEC/UV-Vis) puis couplage avec l'ICP-SEO pour mesurer la concentration en Eu, ce qui permet d'identifier les fractions de protéines ayant complexées Eu (identification par taille) voire de déterminer la stoechiométrie métal-protéine par un dosage simultané du métal et du soufre par exemple.

Afin de mieux comprendre les mécanismes de synthèse des molécules complexantes des radionucléides dans ces cellules, il serait intéressant de faire des tests de contamination cellulaire *a posteriori*, sur des compartiments cytosoliques. Ceci nous permettrait de déterminer la présence d'espèces induites dans le cytosol (petits peptides, protéines) pendant les 24 ou 48h de contamination. Le choix des concentrations de contamination pour ces études doit se faire judicieusement car la barrière membranaire n'a pas à être traversée.

Enfin, il serait intéressant de passer à un autre radionucléide d'intérêt : le curium, ceci permettrait d'étudier les effets radioinduits, en plus de la toxicité chimique, étudiée *via* l'euporium et déterminer si ces effets sont additifs ou non.

ANNEXES

Liste des abréviations

AA : Acide Aminé

AF : Acide Fulvique

AH : Acide Humique

Ala : Alanine

An : Actinide

ATR-IRTF : Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier en mode Réflexion Totale Atténuée

BAG : Boîte A Gants

CN : Nombre de Coordination

Cys : Cystéine

Da : Dalton (unité de masse atomique utilisée en biochimie, un dalton est défini comme 1/16 de la masse d'un atome de ^{16}O)

DL : Dose Létale

Eu : Europium

ES-SM : ElectroSpray Spectrométrie de Masse

Glu : Acide glutamique

Gly : Glycine

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance

ICP-SEO : Spectrométrie d'Emission Optique à plasma induit (ICP=Inductively Coupled Plasma)

ICP-SM : Spectrométrie de Masse à plasma induit (ICP=Inductively Coupled Plasma)

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

Ln : Lanthanide

m : mol/kg_{solv} (concentrations molales : pour l'expression de certaines forces ioniques)

M : mol/L (concentrations molaires)

MPG : Mercapto-Propionyl-Glycine

MT : MétalloThionéines

NEA : Nuclear Energy Agency

PC : PhytoChélatines

PCS : PhytoChélatine Synthase

PIXE : Emission X induite par des particules chargées

PL : PhosphoLipides

ppb : partie par milliard (part *per* billion) \sim ng/g = μ g/L

ppm : partie par million (part *per* million) \sim μ g/g = mg/L

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RN : RadioNucléide

RPE : Résonance Paramagnétique Electronique

Ser : Sérine

SLRT : Spectrofluorimétrie Laser à Résolution Temporelle

SAX : Spectrométrie d'Absorption des rayons X

SEC : Chromatographie d'Exclusion Stérique

SH : Substances Humiques (comprend les AH : Acides Humiques ; et les AF : Acides Fulviques)

SVF : Serum de Veau Foetal

U : Uranium

u.a. : unité arbitraire (suite à diverses normalisations du signal brut)

uma : unité de masse atomique unifiée (n'est pas une unité de mesure du Système International (SI), elle est définie comme 1/12 de la masse d'un atome de ^{12}C)

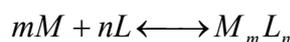
UV-Vis : Spectrophotométrie Ultra Violet Visible

Annexe 1 : Notions de chimie des solutions et formalisme

L'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) n'a pas explicitement défini le formalisme des constantes d'équilibre des réactions en solutions aqueuses. De ce fait, la NEA (Nuclear Energy Agency) a choisi d'adopter les conventions définies dans « Stability constants of metal ion complexes » de Sillén et Martell (Sillen et Martell, 1971; Sillen et Martell, 1964). Nous nous sommes inspirés de ce formalisme pour définir les notations qui suivront (Grenthe *et al.*, 1992).

Equilibres de complexation : loi d'action de masse

En chimie, tous les calculs de concentrations à l'équilibre sont basés sur la loi d'action de masse (Ringbom, 1963). Cette loi implique que pour une réaction de complexation de la forme :



M : cation métallique

L : ligand

$M_m L_n$: complexe formé

m et n : coefficients stœchiométriques du métal et du ligand respectivement

Équation 20

L'expression de la constante thermodynamique associée à l'équilibre est la suivante :

$$K_{mn}^O = K_{mn}^{I=0} = \frac{a_{M_m L_n}}{a_M^m \cdot a_L^n}$$

a_i : activité de l'espèce i

Équation 21

En effet, une solution idéale est une solution où les ions interagissent entre eux de façon identique. Cependant les électrolytes réels ne suivent qu'imparfaitement les relations établies pour les solutions idéales et ceci d'autant moins que les concentrations sont élevées. Cet écart à l'idéalité est lié aux interactions d'origine électriques entre les ions. Ainsi on introduit des coefficients d'activité γ_i , inférieurs à 1, qui corrigent les concentrations. L'activité est ainsi définie par :

$$a_i = \gamma_i \cdot (i)$$

γ_i : coefficient d'activité de l'espèce i, il dépend de la charge de l'ion i (notée z_i) et de la force ionique de la solution (notée I)

(i) : les termes entre parenthèses désignent les concentrations molales (en $\text{mol.kg}_{\text{solvant}}^{-1}$)

Équation 22

I représente la force ionique de la solution, définie par : $I = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 \cdot (i)$

En pratique, nous ne travaillons jamais dans les conditions d'idéalité, c'est-à-dire en solution infiniment diluée, par conséquent, les coefficients d'activité des espèces présentes ne sont plus égaux à 1 et la « constante » thermodynamique va donc « dépendre » des conditions

expérimentales. C'est pourquoi, les « constantes » que nous allons déterminer seront les constantes « apparentes », définies à partir des concentrations molaires des espèces à l'équilibre, en effet :

$$K_{mn}^O = K_{mn}^{I=0} = \frac{\gamma_{M_m L_n}}{\gamma_M^m \cdot \gamma_L^n} \cdot \frac{(M_m L_n)}{(M)^m \cdot (L)^n} = \frac{\gamma_{M_m L_n}}{\gamma_M^m \cdot \gamma_L^n} \cdot K_{mn}^{app} \quad \text{Équation 23}$$

K_{mn}^{app} : constante apparente de formation du complexe

Corrections de force ionique

Les facteurs qui affectent l'activité d'un ion sont la taille effective de l'ion, les autres ions, le solvant et la température. Le champ électrique exercé sur l'ion considéré est décrit par la force ionique I .

L'estimation des coefficients d'activité pourra ensuite se faire à partir de différents modèles, selon la force ionique du milieu :

- (i) le modèle de Debye-Hückel (pour $I < 0,01M$),
- (ii) le modèle de Davies (jusqu'à $I < 0,3M$),
- (iii) la Théorie de l'Interaction Spécifique (TIS) pour les forces ioniques supérieures (Guggenheim, 1966).

(i) Modèle de Debye-Hückel

Le modèle de Debye-Hückel tient compte des interactions électrostatiques à distance entre les espèces de charges opposées :

$$\log_{10} \gamma_i = -z_i^2 \frac{A\sqrt{I}}{1 + r_i B\sqrt{I}}$$

A, B : paramètres dépendants de la température

r_i : rayon ionique de l'ion i

Équation 24

A et $r_i B$ peuvent être considérés comme des constantes (à 25°C, les valeurs utilisées sont

$$A = 0,5091 \text{ et } r_i B = 1,5)$$

Cependant ce modèle n'est valable que pour $I < 0,01M$.

(ii) Modèle de Davies

Le modèle de Davies est un modèle empirique défini par :

$$\log_{10} \gamma_i = -A \cdot z_i^2 \left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} - 0,3 \cdot I \right) \quad \text{Équation 25}$$

A : même constante que précédemment, donc environ égal à 0,5091

(iii) Théorie de l'Interaction Spécifique (SIT)

La Théorie de l'Interaction Spécifique tient compte de l'interaction non électrostatique à courte distance, elle étend donc le domaine de validité de l'expression de Debye-Hückel, elle fait intervenir plusieurs paramètres ajustés :

$$\log_{10} \gamma_i = -z_i^2 \cdot D + \sum_k \mathcal{E}_{(i,k,I)} \cdot (k)$$

γ_i : coefficient d'activité de l'ion i de charge z_i dans la solution de force ionique I

(k) : molalité de l'ion k présent en solution (en $\text{mol} \cdot \text{kg}_{\text{solvant}}^{-1}$)

$$D : \text{terme de Debye-Hückel défini par } D = \frac{A\sqrt{I}}{1 + r_i \cdot B\sqrt{I}} \quad \text{Équation 26}$$

A et r_i B : voir modèle de Debye-Hückel

$\mathcal{E}_{(i,k,I)}$: coefficient d'interaction spécifique

Les coefficients d'interaction spécifiques d'ions simples sont donnés dans la littérature (Grenthe *et al.*, 1992; Guillaumont *et al.*, 2003; Lemire *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 1995). Ceux des ions complexes peuvent être estimés en connaissant la charge et la taille de l'ion en question par le calcul d'un coefficient d'interaction spécifique moyen.

Ces relations nous permettront selon les cas d'être en mesure de comparer plusieurs constantes thermodynamiques obtenues à des forces ioniques diverses en extrapolant ces constantes à force ionique nulle.

Annexe 2 : Rappels sur les phénomènes d'inhibition de fluorescence

Il existe de nombreux processus qui impliquent l'interaction d'une molécule excitée M^* avec une autre molécule Q comme décrit sur la Figure 113 :

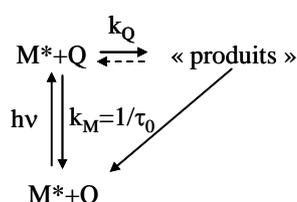


Figure 113 : Interaction d'une molécule Q avec M^*

Où k_q est la constante cinétique du processus bimoléculaire.

Les caractéristiques de fluorescence de M^* (temps de vie et/ou rendement de fluorescence) sont affectées par la présence du quencher Q du fait de la compétition possible entre sa désexcitation intrinsèque et les divers processus intermoléculaires impliquant Q :

- Après l'excitation par une impulsion de lumière, la population de l'état excité M^* , et donc l'intensité de fluorescence, diminue plus vite en présence de Q , reflétant des interactions entre M^* et Q .

- Le rendement de fluorescence est diminué. La perte d'intensité de fluorescence est qualifiée de « quenching » (ou inhibition), quelle que soit la nature du processus intermoléculaire impliqué même lorsque la réaction produit une autre espèce fluorescente (le terme de « quenching » s'applique uniquement à l'espèce excitée initialement).

L'analyse des phénomènes observés peut fournir de nombreuses informations sur l'environnement de l'espèce fluorescente, aussi bien quantitativement (dans le cas des analyses cinétiques par exemple) que qualitativement. Il existe plusieurs processus intermoléculaires impliquant M^* et un quencher Q , entrant en compétition avec la désexcitation intrinsèque de M^* : on distingue le quenching dynamique et le quenching statique :

- Quenching dynamique : perte d'énergie due aux collisions entre le cation fluorescent et les molécules de ligand : $M^*+Q \rightarrow M+Q^*$, le temps de vie évolue et suit la relation de Stern-Volmer (établie plus loin)

- Quenching statique : le cation fluorescent forme une nouvelle espèce, pas ou moins fluorescente que le cation libre, une baisse du rendement global de fluorescence est donc observée : $M^*+Q \rightarrow MQ^{(*)}$.

Quenching dynamique : Mesure de la cinétique de Stern-Volmer par SLRT

Nous cherchons à appliquer la relation de Stern-Volmer aux mesures de fluorescence.

Si la décroissance de fluorescence suit une loi monoexponentielle de constante :

$$\tau_Q = \frac{1}{\frac{1}{\tau_0} + k_Q[Q]} = \frac{\tau_0}{1 + k_Q\tau_0[Q]} \quad \text{Équation 27}$$

la relation de Stern-Volmer s'écrit :

$$\frac{\tau_0}{\tau_Q} = 1 + k_Q\tau_0[Q] = 1 + K_{SV}[Q] \quad \text{Équation 28}$$

où $K_{SV} = k_Q \tau_0$ est la constante de Stern-Volmer.

Il est possible de mesurer les valeurs de τ_0 et τ_Q par des mesures de fluorescence résolue en temps en présence et en l'absence de quencher, pour en déduire la valeur de la constante k_Q .

Remarque : unité de $k_Q = M^{-1}s^{-1}$ (de l'ordre de $10^9 M^{-1}s^{-1}$ pour les quenchers organiques courants).

Etablissons la relation de Stern-Volmer à partir des données de fluorescence (mesurées par SLRT) : en absence de quencher, l'expression du rendement quantique de fluorescence est : $\Phi_0 = k_r \tau_0$. En présence de quencher, le rendement quantique de fluorescence devient :

$$\Phi_Q = \frac{k_r}{k_r + k_{nr} + k_Q[Q]} = \frac{k_r}{\frac{1}{\tau_0} + k_Q[Q]} \quad \text{Équation 29}$$

où k_r est la constante cinétique des processus radiatifs relatifs à M^* et k_{nr} la constante associée aux processus non radiatifs.

Si le signal de fluorescence totale est noté F. La combinaison de l'Équation 28 et de l'Équation 29 conduit à la relation de Stern-Volmer :

$$\frac{\Phi_0}{\Phi_Q} = \frac{F_0}{F_Q} = 1 + k_Q\tau_0[Q] = 1 + K_{SV}[Q] \quad \text{Équation 30}$$

Pour faire apparaître la relation de Stern-Volmer, il convient de faire le rapport des fluorescences mesurées initialement (F_0^{SLRT}) et en présence de quencher (F_Q^{SLRT}), ainsi :

$$\frac{F_0^{SLRT}}{F_Q^{SLRT}} = \frac{F_0^0 \times \tau_0 \times \exp\left(-\frac{D}{\tau_0}\right)}{F_Q^0 \times \tau_Q \times \exp\left(-\frac{D}{\tau_Q}\right)} = \frac{F_0^0}{F_Q^0} \times \frac{\tau_0}{\tau_Q} \times \exp\left(-\frac{D}{\tau_0} \left(1 - \frac{\tau_0}{\tau_Q}\right)\right) \quad \text{Équation 31}$$

Quenching statique (Valeur, 2002)

Le terme de quenching statique suppose soit l'existence d'une sphère de quenching efficace (Perrin et Perrin, 1924) soit la formation d'un complexe avec l'état fondamental de M, donc non fluorescent (Figure 114).

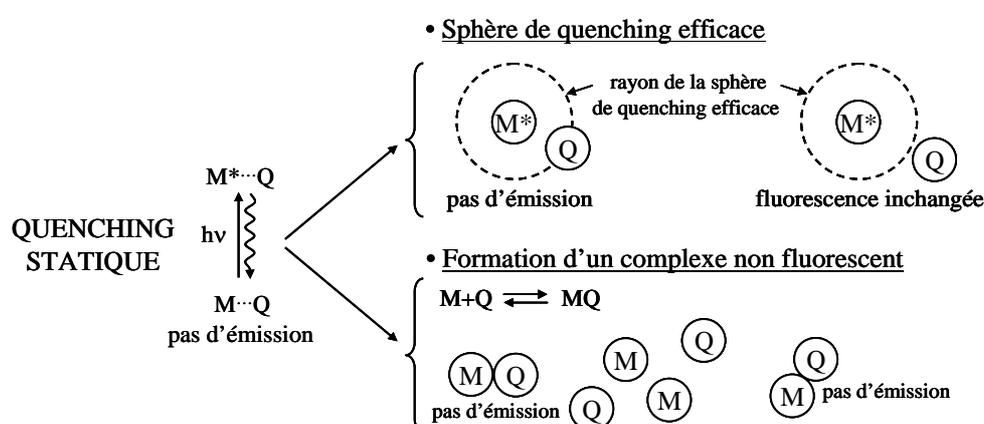


Figure 114 : Quenching statique

La formation d'un complexe (1:1) non fluorescent avec M à l'état fondamental s'écrit : $M + Q \rightarrow MQ$. Contrairement au quenching dynamique, le temps de vie de M^* n'est pas modifié. C'est l'intensité de fluorescence qui décroît globalement suite aux ajouts de Q. La constante de complexation associée à l'équilibre précédent est :

$$K_{Statique} = \frac{[MQ]}{[M][Q]} \quad \text{Équation 32}$$

Le bilan de matière par rapport à M s'écrit : $[M]_0 = [M] + [MQ]$, ainsi la fraction de M non complexée vaut :

$$\frac{[M]}{[M]_0} = \frac{1}{1 + K_{Statique}[Q]} = \frac{F}{F_0} \quad \text{Équation 33}$$

En pratique, puisque les intensités de fluorescence mesurées sont proportionnelles à la concentration de M en solution, le même rapport peut s'écrire avec les intensités de fluorescence.

Une relation du même type que celle de Stern-Volmer est donc obtenue mais cette fois le temps de vie varie donc le ratio de F sur F_0 (le ratio de τ_Q sur τ_0 n'intervient plus).

Dans les cas où nous serions confrontés à l'observation de phénomènes d'inhibition de la fluorescence, nous chercherons donc à identifier s'il s'agit de phénomènes d'inhibition dynamique ou bien statique. Nous déterminerons également les valeurs des constantes associées à ces phénomènes.

Annexe 3 : Exploitation du signal de fluorescence en SLRT

Expression du signal de fluorescence mesuré en SLRT

Rappels sur la signification des paramètres temporels :

Un laser permet d'obtenir une excitation pulsée en envoyant un faisceau de longueur d'onde fixée avec des tirs d'une durée de quelques ns à une fréquence donnée. Afin de s'affranchir de l'intensité de la lumière excitatrice incidente, la mesure de la fluorescence s'effectue à partir d'un temps origine t_0 déterminé par la fin d'un tir laser. Une porte de mesure caractérisée par un délai D (par rapport à t_0) et une largeur L permet de définir un domaine de temps pendant lequel est intégré le signal de fluorescence (partie hachurée de la Figure 115). Les paramètres D et L sont ajustables afin de sélectionner le signal de fluorescence de chacune des espèces.

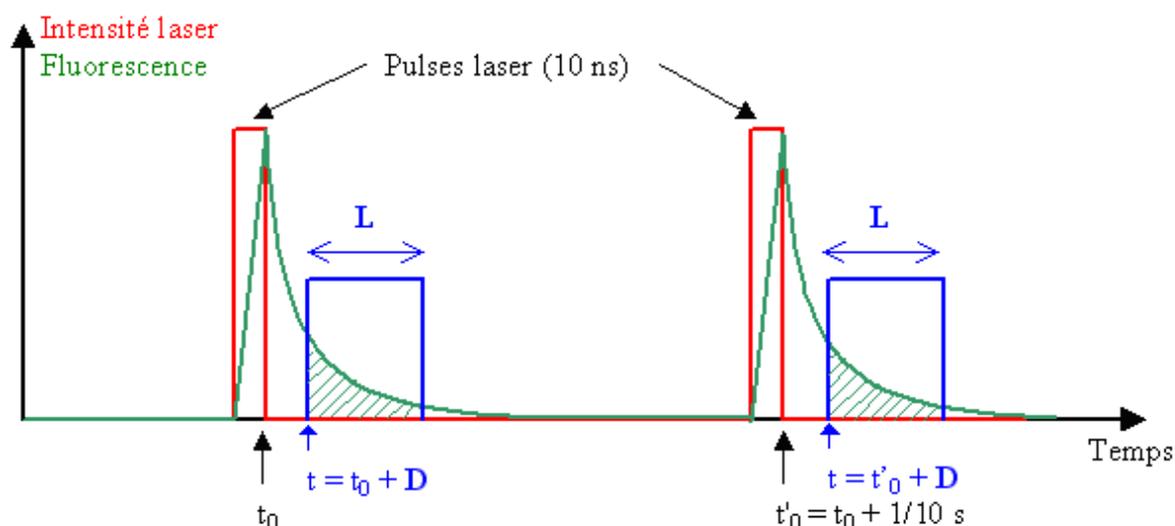


Figure 115 : Variations au cours du temps de l'intensité de fluorescence lors d'une excitation pulsée

Le signal de fluorescence mesuré $F_\lambda(t)$, à la longueur d'onde λ correspond à la somme de la fluorescence de plusieurs espèces i , à cette même longueur d'onde, ainsi :

$$F_\lambda(t) = \sum_i F_{\lambda,i}(t) = \sum_i F_{\lambda,i}^0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \quad \text{Équation 34}$$

En SLRT, le signal mesuré correspond à la somme du signal entre $t_{ini} = D$ et $t_{fin} = D + L$. Il convient donc d'intégrer le signal de fluorescence entre ces deux bornes, selon :

$$F_{\lambda}^{SLRT}(t) = \int_{t=D}^{t=D+L} \sum_i F_{\lambda,i}(t) dt \quad \text{avec} \quad \int_{t=D}^{t=D+L} F_{\lambda,i}(t) dt = F_{\lambda,i}^0 \left[-\tau_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \right]_D^{D+L} \quad \text{Équation 35}$$

Pour une seule espèce i , l'intégration du signal de fluorescence donne :

$$F_{\lambda,i}^{SLRT}(t) = F_{\lambda,i}^0 \times \tau_i \times \exp\left(-\frac{D}{\tau_i}\right) \times \left(1 - \exp\left(-\frac{L}{\tau_i}\right)\right) \quad \text{Équation 36}$$

Ainsi le signal mesuré en SLRT correspond à :

$$F_{\lambda}^{SLRT}(t) = \sum_i F_{\lambda,i}^0 \times \tau_i \times \exp\left(-\frac{D}{\tau_i}\right) \times \left(1 - \exp\left(-\frac{L}{\tau_i}\right)\right) \quad \text{Équation 37}$$

Exploitation des résultats

L'ensemble des expérimentations faites par SLRT a été traité de la même façon. Nous allons détailler ce mode opératoire en prenant l'exemple du dosage Eu + GSH à pH 3.

Etape 1 : Identification du spectre de l'espèce complexée

Parmi l'ensemble des spectres acquis, nous nous intéressons en particulier aux spectres obtenus dans les conditions les plus favorables de formation de l'espèce complexée, c'est-à-dire ceux des échantillons les plus concentrés en ligand. D'autre part, on vérifiera que les paramètres temporels d'acquisition (délai, largeur de porte) ont une influence sur l'observation privilégiée de l'espèce complexée, par rapport à l'Eu libre.

Etape 2 : Décomposition du spectre du complexe

En spectrométrie d'émission ou d'absorption, une raie correspond à l'énergie de transition entre deux niveaux électroniques. Le spectre devrait donc présenter une bande de fréquence (ou d'énergie) indéfiniment mince (signal monochromatique). Dans les faits, cette raie a une certaine largeur. L'élargissement spectral observé expérimentalement sur une raie dépend de plusieurs facteurs :

- la largeur naturelle Lorentzienne associée aux collisions entre atomes,
- la largeur Doppler gaussienne liée à la distribution des vitesses des atomes émetteurs.

C'est pourquoi, pour modéliser les raies observées, la fonction choisie est une composition d'une fonction Lorentzienne et d'une fonction Gaussienne, selon l'équation suivante :

$$K_s = \frac{[MQ]}{[M][Q]} F = (1-p) \times Gauss + p \times Lorentz$$

$$F = (1-p) \times \frac{A}{w\sqrt{\pi/2}} \times e^{\left(-2 \times \frac{(x-x_c)^2}{w^2}\right)} + p \times 2 \times \frac{A}{\pi} \times \frac{w}{4 \times ((x-x_c) + w^2)}$$

Équation 38

- p : forme de la raie
- A : aire de la raie
- w : largeur à mi hauteur
- x_c : barycentre de la raie

Le nombre de raies permettant la décomposition du spectre du complexe a été défini selon :

- les transitions ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ et ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ sont chacune modélisées par une seule fonction,
- la transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$, hypersensible, et qui reflète parfois des levées de dégénérescence, est modélisée par 2 fonctions (même si elle est physiquement composée de 5 raies), ce qui suffit pour la décrire, en limitant le nombre de paramètres à ajuster.

Cette modélisation convient bien au système, comme le montre la Figure 116 :

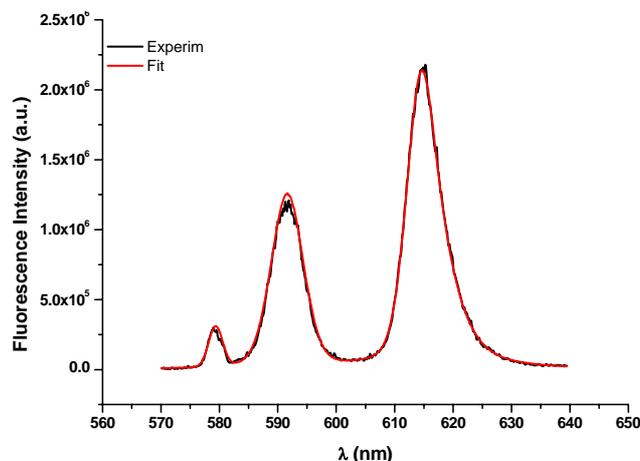


Figure 116 : Adéquation entre le spectre expérimental et l'ajustement issu de notre modélisation

A l'issue de ces ajustements, l'ensemble des paramètres de chaque fonction est déterminé. Un exemple de ces valeurs est présenté Tableau 36.

Tableau 36 : Récapitulatif des valeurs des paramètres ajustés

Fonction	Paramètre	Valeur	Erreur	Dépendance	Interv. de confiance (95%)
Constante	Y0	0	0	0	0
Lorentzienne-Gaussienne	xc_1	579,35	0,03	0,02	0,05
	A_1	8,7.10 ⁵	4.10 ⁴	0,91	8.10 ⁴
	w_1	2,83	0,08	0,52	0,14
	p_1	0	0,2	0,92	0,3
Lorentzienne-Gaussienne	xc_2	591,62	0,01	0,03	0,02
	A_2	9,40.10 ⁶	7.10 ⁴	0,92	14.10 ⁴
	w_2	6,52	0,03	0,60	0,06
	p_2	0,26	0,03	0,94	0,05
Lorentzienne-Gaussienne	xc_3	614,49	0,03	0,97	0,06
	A_3	1,26.10 ⁷	3.10 ⁵	0,99	6.10 ⁵
	w_3	5,83	0,05	0,96	0,1
	p_3	0,24	0,02	0,96	0,04
Lorentzienne-Gaussienne	xc_4	618,9	0,2	0,98	0,4
	A_4	6,7.10 ⁶	3.10 ⁵	0,99	6.10 ⁵
	w_4	8,2	0,2	0,95	0,4
	p_4	0,88	0,04	0,96	0,08

Ces paramètres, caractéristiques du complexe, sont utilisés pour recomposer chaque spectre du dosage considéré.

Etape 3 : Ajustement de la constante de complexation

Les paramètres de ce spectre modélisé sont pris comme paramètres initiaux pour l'ajustement des équations (Annexes 4) sous le logiciel Origin®, cela permet de déduire les proportions en complexe et en europium libre dans chacune des solutions analysées. Lors de l'ajustement, le spectre « expérimental » de l'Eu libre (sans ajout de ligand) est un paramètre fixe. L'ajustement se fait sur l'ensemble des spectres enregistrés au cours du dosage. Un seul spectre de complexe est « autorisé » (tous les paramètres décrivant l'allure du spectre du complexe sont partagés).

La proportion d'Eu libre (notée « a ») est ajustée. Si l'ajustement n'est pas satisfaisant pour tous les spectres du dosage, les caractéristiques spectrales du complexe sont alors laissées libres (une par une pour éviter que l'ajustement ne diverge).

Le tracé de $\log_{10} \left(\frac{[Cplx]}{[Eu]} \right)_{\text{exp}} = f(\log_{10} C_L)$ permet de déterminer la stoechiométrie de l'espèce

formée (s'il n'y en a qu'une en solution) grâce à la pente de la droite, ainsi que la constante de formation de cette espèce à partir de l'ordonnée à l'origine.

Annexe 4 : Evaluation des constantes de complexation (SLRT)

Détermination de la constante de complexation à partir du rapport des intensités des pics de fluorescence :

La constante thermodynamique associée à l'équation de formation du complexe : $Eu + iL \Leftrightarrow EuL_i$ s'écrit :

$$\beta_{ii} = \frac{[EuL_i]}{[Eu][L]^i} = \frac{[Cplx]}{[Eu][L]^i} \quad \text{Équation 39}$$

Pour un complexe (1:1), la fluorescence mesurée à la longueur d'onde λ , vaut :

$$F_\lambda = F_{\lambda_Eu} \times [Eu] + F_{\lambda_Cplx} \times [Cplx] \quad \text{Équation 40}$$

Lorsque la concentration en ligand est très grande devant la concentration en métal, l'approximation $[L] = C_L - [Cplx] \approx C_L$ peut être faite, ainsi :

$$F_\lambda = [Eu] \times (F_{\lambda_Eu} + F_{\lambda_Cplx} \times K_{11} \times C_L) \quad \text{Équation 41}$$

Dans la mesure où le rapport des intensités de fluorescence des transitions ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ et ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ de Eu est caractéristique de chaque espèce de Eu, il est intéressant de déterminer les constantes de formation des espèces à partir de l'évolution de ce rapport (Nagaishi *et al.*, 2003).

$$R_{théo} = \frac{F_{615}}{F_{592}} = \frac{F_{615_Eu} + F_{615_Cplx} \times K_{11} \times C_L}{F_{592_Eu} + F_{592_Cplx} \times K_{11} \times C_L} \quad \text{Équation 42}$$

Les paramètres du type F_{λ_Eu} et F_{λ_Cplx} sont calculés à partir des spectres expérimentaux. Si les paramètres liés au complexe ne sont pas connus, ils devront alors être ajustés et seront alors corrélés à la valeur de la constante.

Remarque : travailler avec les rapports d'intensités de fluorescence présente un autre avantage important : cela permet de s'affranchir de la fluctuation de l'énergie du laser, d'un point à l'autre du dosage et d'un dosage à un autre.

La courbe de dosage $R = f(C_L)$ est alors tracée, à partir des points expérimentaux et à partir de l'ajustement réalisé grâce à l'équation qui définit $R_{théo}$.

Une vérification de l'hypothèse faite sur la stœchiométrie (1:1) du complexe peut être rapidement réalisée, à partir des données expérimentales. En effet, dans le cas de la formation d'une espèce (1:i), la constante de formation associée serait :

$$\lg K_{1i} = \log_{10} \left(\frac{[Cplx]}{[Eu]} \right) - i \log_{10}[L] \quad \text{Équation 43}$$

ainsi, le tracé de :

$$\log_{10} \left(\frac{[Cplx]}{[Eu]} \right) = f(\log_{10}[L]) = \log_{10} K_{1i} + i \log_{10}[L] \quad \text{Équation 44}$$

Si une droite est bien obtenue, la stœchiométrie de l'espèce formée (*i.e.* le nombre de molécules de ligand associé au métal) est donné par la pente de la droite et la constante de formation de cette espèce est égale à l'ordonnée à l'origine (en \log_{10}).

Détermination de la constante de complexation d'une espèce (1:1) à partir de l'évolution de l'intensité d'une longueur d'onde de fluorescence :

La constante thermodynamique associée à l'équation de formation du complexe : $M + L \Leftrightarrow ML$ s'écrit :

$$K_{11} = \frac{[ML]}{[M][L]} \quad \text{Équation 45}$$

Au début du dosage, nous obtenons l'intensité de fluorescence du métal libre : $Y_0 = a \times C_M$ puis, une fois que le ligand est excédentaire, de sorte que tout le métal est complexé, alors : $Y_{\text{lim}} = b \times C_M$. Suite à l'addition d'une concentration C_L de ligand, l'expression de la fluorescence est : $Y = a[M] + b[ML]$. La loi d'action de masse pour le métal et pour le ligand s'écrit :

$$C_M = [M] + [ML] \text{ et } C_L = [L] + [ML] \quad \text{Équation 46}$$

A partir de l'équation de la constante K_{11} , de l'expression de la fluorescence et des bilans de matière (Équation 45 et Équation 46), il vient : $\frac{Y - Y_0}{Y_{\text{lim}} - Y} = K_{11}[L]$. Il ne reste plus qu'à tracer

$\frac{Y - Y_0}{Y_{\text{lim}} - Y} = f(C_L)$. L'approximation $[L] \approx C_L$ est alors faite. La valeur de K_{11} est donc déduite de la valeur de la pente mesurée.

Remarque : Dans le cas où Y_{lim} n'est pas atteint ou mesurable, mieux vaut utiliser la relation de Benesi-Hildebrand :

$$\frac{Y_0}{Y - Y_0} = \frac{\alpha}{K_{11}[L]} + \alpha \quad \text{avec} \quad \alpha = \frac{a}{b - a} \quad \text{Équation 47}$$

On trace $\frac{Y_0}{Y - Y_0} = f\left(\frac{1}{C_L}\right)$ (toujours en supposant que $[L] \approx C_L$) et on obtient ainsi :
 $K_{11} = \frac{\text{ordonnée à l'origine}}{\text{pente}}$.

L'approximation $[L] \approx C_L$ est souvent faite mais elle n'est pas toujours valable (lorsque $K_{11}C_M \gg 1$). Il est cependant possible d'établir une relation, du second ordre, qui ne fait pas cette approximation :

$$C_M \times x^2 - \left(C_M + C_L + \frac{1}{K_{11}}\right) \times x + C_L = 0 \quad \text{avec} \quad x = \frac{Y - Y_0}{Y_{\text{lim}} - Y_0}, \text{ ainsi :} \quad \text{Équation 48}$$

$$Y = Y_0 + \frac{Y_{\text{lim}} - Y_0}{2} \times \left(1 + \frac{C_L}{C_M} + \frac{1}{K_{11}C_M} - \sqrt{\left(1 + \frac{C_L}{C_M} + \frac{1}{K_{11}C_M}\right)^2 - 4 \frac{C_L}{C_M}}\right)$$

Il est donc aisé d'obtenir K_{11} par minimisation des moindres carrés entre l'expression de la fluorescence théorique et les valeurs expérimentales. On peut soit tracer $Y = f\left(\frac{C_L}{C_M}\right)$, soit $Y = f(C_L)$.

L'ensemble des données issues des mesures de SLRT ont été traitées en suivant au moins deux méthodes d'ajustement de la constante. Ceci nous permet de vérifier les valeurs et d'estimer les intervalles de confiance des données présentées.

Annexe 5 : Composition du milieu de culture DMEM des cellules HaCaT

Les concentrations en chacune des espèces ont été évaluées, le Tableau 37 les récapitule.

Tableau 37 : Composition du milieu de culture DMEM des cellules HaCaT

Espèce	Concentrations
CaCl ₂ , 2H ₂ O	246,92 mg/L (1,7 mM)
Fe(NO ₃) ₃ , 9H ₂ O	0,1 mg/L (2,5 10 ⁻⁷ M)
KCl	400 mg/L (5,4 10 ⁻³ M)
MgSO ₄ , 7H ₂ O	200 mg/L (8 10 ⁻⁴ M)
NaCl	6,4 g/L (0,109 M)
NaHCO ₃	3,7 g/L (4,4 10 ⁻² M)
NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O	125 mg/L (9,06 10 ⁻⁴ M)
Glucose	1g/L (5,05 10 ⁻³ M)
Rouge de Phénol	15 mg/L (4,2 10 ⁻⁵ M)
Pyruvate de sodium	110 mg/L (9,99 10 ⁻⁴ M)
L-Arginine HCl	84 mg/L (4,8.10 ⁻⁴ M)
L-Cystine	48 mg/L (2 10 ⁻⁴ M)
L-Glutamine	0,3 mg/L (2,05.10 ⁻³ M)
Glycine	30 mg/L (4 10 ⁻⁴ M)
L-Histidine, HCl, H ₂ O	42 mg/L (2,7 10 ⁻⁴ M)
L-Isoleucine	105 mg/L (7,9.10 ⁻⁴ M)
L-Leucine	105 mg/L (7,9.10 ⁻⁴ M)
L-Lysine HCl	146 mg/L (9,8.10 ⁻⁴ M)
L-Méthionine	30 mg/L (2,5.10 ⁻⁴ M)
L-Phénylalanine	66 mg/L (4.10 ⁻⁴ M)
L-Sérine	42 mg/L (3,9.10 ⁻⁴ M)
L-Thréonine	95 mg/L (7,9.10 ⁻⁴ M)
L-Tryptophane	16 mg/L (8.10 ⁻⁵ M)
L-Tyrosine	72 mg/L (3,9.10 ⁻⁴ M)
L-Valine	94 mg/L (9.10 ⁻⁴ M)
D-Pantothénate de calcium	4 mg/L (1,7 10 ⁻⁵ M)
Chlorure de choline	4 mg/L (2,8 10 ⁻⁵ M)
Acide folique	4 mg/L (9,06 10 ⁻⁶ M)
i-inositol	7,2 mg/L (4 10 ⁻⁵ M)
Nicotinamide	4 mg/L (3,3 10 ⁻⁵ M)
Pyridoxate HCl	4 mg/L
Riboflavine	0,4 mg/L (1,06 10 ⁻⁶ M)
Thiamine HCl	4 mg/L (1,2 10 ⁻⁵ M)

Hepes : 10 mM (4,2 10⁻⁵ M) ; Pénicilline : 50 U/mL ; Streptomycine : 50 µg/mL (3,4 10⁻⁵ M) ; Serum de Veau Fœtal : 10% (malheureusement on n'a pas accès à la composition de ce SVF, qui

est en fait un cocktail de protéines et dont on ne connaît pas l'impact sur la spéciation finalement). Le pH est de 7,4.

Composition de la solution de rinçage : milieu HBSS standard (Tableau 38).

Tableau 38 : Composition du milieu standard HBSS

Espèce	Concentration (mM)
NaCl	136,9
KCl	5,4
CaCl ₂	2,0
MgCl ₂	2,0
MgSO ₄	0,9
NaHCO ₃	4,2
NaH ₂ PO ₄	0,17
KH ₂ PO ₄	0,22
HEPES	10,0
Glucose	5,6

Annexe 6 : Estimation des incertitudesCas des mesures de fluorescence :

En général, c'est la loi de propagation des erreurs qui est appliquée afin d'estimer les incertitudes expérimentales (Gem, 1996).

Soit X une fonction de N variables Y_i entachées d'erreurs statistiques définies par leur écart-type σ_{Y_i} : $X = f(Y_1, Y_2, \dots, Y_i, \dots, Y_N)$. Si les erreurs sur les différentes variables sont indépendantes les unes des autres, l'écart-type σ_X , sur la fonction X, se calculera selon la loi de propagation des erreurs :

$$\sigma_X^2 = \sum_{i=1}^N \left(\frac{\partial X}{\partial Y_i} \sigma_{Y_i} \right)^2 \quad \text{Équation 49}$$

Cependant, afin d'évaluer les constantes de complexation, nous sommes souvent amenés à calculer des rapports d'intensité de fluorescence, intensités qui proviennent donc d'une même acquisition expérimentale, ces données sont donc corrélées entre elles. Ainsi, il convient de développer :

$$\begin{aligned} \text{Si : } R = \frac{F_1}{F_2} \text{ alors il vient :} \\ \sigma_R^2 = \frac{\partial R}{\partial F_1} \sigma_{F_1} + \frac{\partial R}{\partial F_2} \sigma_{F_2} + 2 \times \frac{\partial R}{\partial F_1} \times \sigma_{F_1} \times \frac{\partial R}{\partial F_2} \times \sigma_{F_2} \times r(\sigma_{F_1}, \sigma_{F_2}) \end{aligned} \quad \text{Équation 50}$$

Or le coefficient de corrélation entre les incertitudes de F_1 et de F_2 : $r(\sigma_{F_1}, \sigma_{F_2})$ est difficile à calculer.

Ainsi, l'évaluation de notre incertitude de mesures sera basée sur une estimation statistique de la variation de chaque paramètre, suite à un grand nombre de répétition des mesures (l'échantillon, la température, le jour de mesure, etc.. ont changé).

Le choix retenu pour l'évaluation des incertitudes est le suivant, on prend : $u(F) = k \times \sigma_F$ avec k, le facteur d'élargissement, égal à 2 et σ_F , l'écart-type sur la grandeur mesurée.

Pour M = Eu et U : il en ressort que pour les mesures de fluorescence « brute » :

$$\text{si } [M] > 10^{-6} \text{M, } \frac{u(F)}{F} = \frac{2 \times \sigma_F}{F} \approx 8\% \text{ , et si } [M] \leq 10^{-6} \text{M, } \frac{u(F)}{F} \approx 10\% .$$

De la même manière, l'incertitude sur le rapport des florescences, R, vaut :

pour $[M] > 10^{-6}M$, $\frac{u(R)}{R} = \frac{2 \times \sigma_R}{R} \approx 15\%$, et pour $[M] \leq 10^{-6}M$, $\frac{u(R)}{R} \approx 20\%$.

Cas des constantes de complexation $\log_{10}K$:

A partir des valeurs expérimentales des valeurs des rapports de fluorescence : R. Nous calculons, en appliquant la variation de 15 ou 20%, les valeurs de R_{\min} et R_{\max} point par point, à partir desquelles les valeurs de K_{\min} et K_{\max} sont calculées et permettent d'encadrer la valeur de $\log_{10}K$. Visuellement, la valeur moyenne de $\log_{10}K_{\text{moy}}$ est tracée, encadrée des 2 droites issues du calcul de $(\log_{10}K_{\text{moy}} \pm 2 \times \text{écart-type sur les } \log_{10}K)$.

Cas des mesures de temps de vie :

Le temps de vie est évalué à partir des données de décroissance de la fluorescence en fonction du délai, pour une longueur d'onde fixée. Nous traçons à la fois la décroissance exponentielle caractérisée par le temps de vie de l'espèce, ainsi que la représentation de cette décroissance en unité logarithmique, ceci nous renseigne sur le nombre d'espèces fluorescentes en solution, en particulier celles dont le temps de vie est éloigné.

L'évaluation de l'incertitude sur ces mesures dépend de paramètres tels que : la concentration totale en radionucléide, le nombre d'acquisition sur lesquelles le spectre est moyenné, la largeur de la porte de mesure, le nombre de points disponibles pour décrire la décroissance. Tout ceci conduit à évaluer l'incertitude sur le temps de vie à environ 10% de la valeur trouvée. Toutefois, lorsque les solutions sont bien concentrées (ex : $[Eu] > 10^{-5}M$) il est possible d'accorder une plus grande justesse à la valeur trouvée et ainsi l'encadrer d'un intervalle de confiance plus restreint.

Estimation des incertitudes sur les valeurs des concentrations molaires :

La préparation des solutions stock de ligand et de métal s'est faite par pesée sur des balances de précision (au dixième ou au centième de mg). L'incertitude sur la concentration de ces solutions dépend donc du nombre de pesées nécessaires à leur préparation. Nous avons pris soin de peser des masses bien supérieures à l'erreur de la balance, en pratique supérieures à quelques mg. Dans ce cas, l'incertitude sur une pesée sur ce type de balance est estimée à 0,1%

Dans le cas d'échantillons de petits volumes, leur préparation s'est faite à l'aide de micropipettes à volume variable. Les incertitudes associées à chacune d'elle ont été évaluées (par des statistiques sur 5 pesées de 3 volumes différents). Dans chacun des cas, l'incertitude la plus pénalisante est retenue. Les valeurs obtenues sont récapitulées dans le Tableau 39 :

Tableau 39 : Erreurs sur les volumes prélevés avec les micropipettes à volume variable

Micropipette Volume variable (μL)	$\Delta V/V$
500-2500	0,75%
100-1000	0,75%
10-100	1,0%
0,5-10	4,0%

Le dimensionnement des expériences a été fait de sorte de minimiser les erreurs sur la préparation des échantillons, en particulier, nous pouvons considérer que les incertitudes sur les concentrations des échantillons sont comprises dans l'épaisseur des points des graphes.

Annexe 7 : Produits chimiques

Les produits chimiques utilisés pour réaliser les différentes expériences de ce travail proviennent de différents fournisseurs (Merck, Sigma-Aldrich, etc.) et sont de qualité analytique.

Toutes les solutions ont été préparées avec de l'eau déionisée à $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ (Millipore).

Pour les attaques acides lors des expériences de contaminations cellulaires :

- HCl 30 % NormatomTM ultrapur de chez VWR (soit environ 9,5 M)
- HNO₃ 65 % NormatomTM ultrapur de chez VWR (soit environ 14,5 M)

*Annexe 8 : Communications scientifiques***COMMUNICATIONS ECRITES**

V. Lourenço, E. Ansoborlo, G. Cote, C. Moulin « Speciation of radionuclides with bioligands using TRLIF and ES-MS », **Recent Advances in Actinide Science** (edited by Alvarez, Bryan and May, published by The Royal Society of Chemistry, 2006), pp 785-787

« Spéciation des radionucléides avec les molécules d'intérêt biologique », V. Lourenço, Note technique interne CEA, NT DPC/SECR 05-049, 2005

COMMUNICATIONS ECRITES (EN COURS DE REDACTION)

V. Lourenço *et al.* « Speciation of heavy metals with reduced and oxidized glutathione », *New Journal of Chemistry* (en cours)

V. Lourenço *et al.* « Speciation of radionuclides with cytoplasmic amino acids », *New Journal of Chemistry* (en préparation)

COMMUNICATIONS ORALES

V. Lourenço, E. Ansoborlo, G. Cote, C. Moulin « Study of the interactions between radionuclides and cysteine-rich bioligands by spectrometric techniques », **36^{èmes} Journées des Actinides 2006 International Conference**, 1-4 avril 2006, Oxford, Royaume-Uni.

V. Lourenço, E. Ansoborlo, G. Cote, C. Moulin « Speciation of radionuclides (U, Eu) with bioligands (Amino acids, peptides) using TRLIF and ES-MS », **MIGRATION 2005 International Conference**, 18-23 septembre 2005, Avignon (France)

COMMUNICATION PAR AFFICHE

V. Lourenço, E. Ansoborlo, G. Cote, C. Moulin « Speciation of radionuclides with bioligands using TRLIF and ES-MS : the case of Eu with cysteine », **ACTINIDES 2005 International Conference**, 4-8 juillet 2005, Manchester, Royaume-Uni

BIBLIOGRAPHIE

- Aas W., Szabo Z. and Grenthe I. (1999) Equilibria and dynamics in binary and ternary uranyl oxalate and acetate/fluoride complexes. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*(8), 1311-7.
- Ahmed I. T., El-Roudi O. M., Boraei A. A. A. and Ibrahim S. A. (1996) Equilibrium studies of the ternary complex systems : Mn^{++} , dipicolinic acid and N-(2-Acetamido)iminodiacetic acid or amino acids. *Journal of Chemical and Engineering Data* **41**(3), 386-90.
- Ahuja R. and Dwivedi K. (1995) Mixed-ligand complexes of dioxoUranium(VI). *Journal of the Indian Chemical Society* **72**(2), 119-22.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter P. (2002) *Molecular Biology of the Cell, IV Edition*. Garland Science, New York, pp. 1463.
- Alcock N. W., Flanders D. J., Kemp T. J. and Shand M. A. (1985) Glycine complexation with uranyl-ion - Absorptiometric, luminescence, and X-ray structural studies of tetrakis(glycine)dioxouranium(VI) nitrate. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **3**, 517-21.
- Andrew R. S. R., Ikonomou M. G., Thompson J. A. J. and Orians K. J. (1998) *Analytical Chemistry* **70**, 2225-2235.
- Ansoborlo E., Amekraz B., Moulin C., Moulin V., Taran F., Bailly T., Burgada R., *et al.* (2007) Review of actinide decorporation with chelating agents (in press). *C. R. Chimie* **xx**, 1-10.
- Ansoborlo E., Prat O., Moisy P., Den Auwer C., Guilbaud P., Carriere M., Gouget B., *et al.* (2006) Actinide speciation in relation to biological processes. *Biochimie* **88**.
- Artinger R., Schuessler W., Schaefer T. and Kim J. I. (2002) A kinetic study of Am(III)/humic colloid interactions. *Environmental Science & Technology* **36**(20), 4358-4363.
- Aziz A. and Lyle S. J. (1971) Americium(III) and europium(III) complexes with lactate, pyruvate, and α -alaninate in aqueous solutions. Comparison of equilibrium constants. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry* **33**(10), 3407-8.
- Baehr G. and Wessler H. (1909) The use of cerium oxalate for the relief of vomiting : an experimental study of the effects of some salts of cerium, lanthanum, praseodymium, neodymium and thorium. *Archives of Internal Medicine* **2**, 517-531.
- Bailey E. H., Mosselmans J. F. W. and Schofield P. F. (2005) Uranyl-citrate speciation in acidic aqueous solutions. An XAS study between 25 and 200°C. *Chemical Geology* **216**, 1-16.
- Barry C. D., North A. C., Glasel J. A., Williams R. J. and Xavier A. V. (1971) Quantitative determination of mononucleotide conformations in solution using lanthanide ion shift and broadening NMR probes. *Nature* **232**(5308), 236-45.

- Beck A., Lenzian K., Oven M., Christmann A. and Grill E. (2003) Phytochelatin synthase catalyzes key step in turnover of glutathione conjugates. *Phytochemistry* **62**(3), 423-431.
- Benderitter M., Isoir M., Buard V., Durand V., Linard C., Vozenin-Brotons M. C., Staffanazi J., *et al.* (2007) Collapse of skin antioxidant status during the subacute period of cutaneous radiation syndrome: a case report. *Radiation Research* **167**, 43-50.
- Bieri M. and Burgi T. (2005) L-Glutathione chemisorption on gold and acid/base induced structural changes: A PM-IRRAS and time-resolved in situ ATR-IR spectroscopic study. *Langmuir* **21**(4), 1354-1363.
- Bingham D. and Dobrota M. (1995) Binding of lanthanides to cell membranes in the presence of ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry* **59**, 39-52.
- Bion L. (2003) BASSIST: an applied thermodynamic database for radionuclide chemistry. *Radiochimica Acta* **91**(11), 633-637.
- Bismondo A. and Rizzo L. (1992) Thermodynamics of the complex formation between uranyl(VI) and some polypeptides in aqueous solution. *Thermochimica Acta* **196**(1), 131-6.
- Bismondo A., Rizzo L., Tomat G., Curto D., Di Bernardo P. and Cassol A. (1983) Thermodynamic properties of actinide complexes. Uranyl(VI)- and thorium(IV)-glycine systems. *Inorganica Chimica Acta* **74**, 21-4.
- Blades A. T., Jayaweera P., Ikonomou M. G. and Kebarle P. (1990) First studies of the gas-phase ion chemistry of M^{3+} metal-ion ligands. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **101**(2-3), 325-336.
- Blaquiere C. and Berthon G. (1987) Speciation studies in relation to magnesium bioavailability. Formation of magnesium(II) complexes with glutamate, aspartate, glycinate, lactate, pyroglutamate, pyridoxine and citrate, and appraisal of their potential significance towards magnesium gastrointestinal absorption. *Inorganica Chimica Acta* **135**(3), 179-89.
- Bordat P., Toulmé E., Savignan F., Neuzil E. and Dufy B. (2003) Régulation du calcium intracellulaire dans le kératinocyte. Influence de l'eau thermale d'Avène. *Bulletin de la Société de Pharmacologie de Bordeaux* **142**, 7-24.
- Bresson C., Colin C., Chartier F. and Moulin C. (2005) Cobalt speciation study in the cobalt-cysteine system by electrospray-ionization mass spectrometry and anion-exchange chromatography inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Applied Spectroscopy* **59**(5), 696-705.
- Bresson C., Lamouroux C., Sandre C., Tabarant M., Gault N., Poncy J. L., Lefaix J. L., *et al.* (2006) An interdisciplinary approach to investigate the impact of cobalt in a human keratinocyte cell line. *Biochimie* **88**, 1619-1629.
- Briat J. F. and Lebrun M. (1999) Plant responses to metal toxicity. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Série III - Sciences de la Vie - Life Sciences* **322**(1), 43-54.

- Cefola M., Taylor R. C., Gentile P. S. and Celiano A. V. (1962) Coordination compounds. III. Chelate compounds of the uranyl ion with hydroxy, mercapto, and amino acids. *Journal of Physical Chemistry* **66**, 790-1.
- Chan J. N., Huang Z. Y., Merrifield M. E., Salgado M. T. and Stillman M. J. (2002) Studies of metal binding reactions in metallothioneins by spectroscopic, molecular biology, and molecular modeling techniques. *Coordination Chemistry Reviews* **233**, 319-339.
- Chang C. A., Liu Y. L., Chen C. Y. and Chou X. M. (2001) Ligand preorganization in metal ion complexation: Molecular mechanics/dynamics, kinetics, and laser-excited luminescence studies of trivalent lanthanide complex formation with macrocyclic ligands TETA and DOTA. *Inorganic Chemistry* **40**(14), 3448-3455.
- Chassaigne H., Vacchina V. and Lobinski R. (2000) Elemental speciation analysis in biochemistry by electrospray mass spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry* **19**(5), 300-13.
- Chaudhari B. S., Kelkar S. S. and Nemade B. I. (1982) A polarographic study of uranyl complexes of amino acids and carboxylic acids. *Journal of the Electrochemical Society of India* **31**(4), 143-7.
- Chevari S. and Likhner D. (1968) Complex formation of natural uranium in the blood. *Med. Radiol.* **13**, 53-57.
- Choppin G. R. (1997) Factors in Ln(III) complexation. *Journal of Alloys and Compounds* **249**(1-2), 1-8.
- Choppin G. R. (2003) Actinide speciation in the environment. *Radiochimica Acta* **91**(11), 645-649.
- Clefs Cea N°48. (2003) *Toxicologie radiologique et chimique*.
- Clemens S., Kim E. J., Neumann D. and Schroeder J. I. (1999) Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO Journal* **18**(12), 3325-33.
- Cobbett C. and Goldsbrough P. (2002) Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 159-182.
- Cobbett C. S. (2000) Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiology* **123**(3), 825-832.
- Colette S., Amekraz B., Madic C., Berthon L., Cote G. and Moulin C. (2002) Use of electrospray mass spectrometry (ESI-MS) for the study of europium(III) complexation with bis(dialkyltriazinyl)pyridines and its implications in the design of new extracting agents. *Inorganic Chemistry* **41**(26), 7031-7041.
- Colette S., Amekraz B., Madic C., Berthon L., Cote G. and Moulin C. (2003) Trivalent lanthanide interactions with a terdentate bis(dialkyltriazinyl)pyridine ligand studied by electrospray ionization mass spectrometry. *Inorganic Chemistry* **42**(7), 2215-2226.
- Collette C., Drahos L., De Pauw E. and Vekey K. (1998) Comparison of the internal energy distributions of ions produced by different electrospray sources *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **12**(22), 1673-8.

- Costa Pessoa J., Tomaz I., Kiss T. and Buglyo P. (2001) The system VO_2^+ + oxidized glutathione: a potentiometric and spectroscopic study. *Journal of Inorganic Biochemistry* **84**(3-4), 259-270.
- Csoregh I., Kierkegaard P., Legendziewicz J. and Huskowska E. (1987) Crystal-structure of a praseodymium glutamate perchlorate hydrate, $\text{Pr}_2(\text{L-Glu})_2(\text{ClO}_4)_4 \cdot 11\text{H}_2\text{O}$. *Acta Chemica Scandinavica Series A-Physical and Inorganic Chemistry* **41**(8), 453-60.
- De La Fuente J. M., Ramirez-Rodriguez V., Cabrera-Ponce J. L. and Herera-Estrella L. (1997) Aluminium tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* **276**, 1566-8.
- Delangle P., Husson C., Lebrun C., Pecaut J. and Vottero P. J. A. (2001) Solid state and solution studies of lanthanide(III) complexes of cyclohexanetriols, models of the coordination sites found in sugars. *Inorganic Chemistry* **40**(13), 2953-2962.
- Deng R., Wu J. and Zhu Y. (1991) *Chemical journal of the Chinese Universities* **12**, 853.
- Dessi A., Micera G. and Sanna D. (1993) EPR investigation of the oxovanadium(IV) complexes formed by the tripeptide glutathione and some related ligands in aqueous solution. *Journal of Inorganic Biochemistry* **52**(4), 275-86.
- Diamond G. L. (1989) Biological consequences of exposure to soluble forms of natural uranium. *Radiation Protection Dosimetry* **26**(1-4), 23-33.
- Dole M., Hines R. L., Mack R. C., Mobley R. C., Ferguson L. D. and Alice M. B. (1968) *Journal of Chemical Physics* **49**, 2240.
- El'khilyali A. E., Martynenko L. I. and Spitsyn V. I. (1967) Stability constants of α -alaninates of rare-earth elements. *Doklady Akademii Nauk SSSR* **176**(4), 855-7.
- Ermolli M., Menne C., Pozzi G., Serra M. A. and Clerici L. A. (2001) Nickel, cobalt and chromium-induced cytotoxicity and intracellular accumulation in human haca keratinocytes. *Toxicology* **159**(1-2), 23-31.
- Evans C. H. (1990) *Vol. 8: Biochemistry of the Lanthanides*. Plenum Press New York, pp. 444.
- Faulkner S., Pope S. J. A. and Burton-Pye B. P. (2005) Lanthanide complexes for luminescence imaging applications. *Applied Spectroscopy Reviews* **40**(1), 1-31.
- Feldman I. and Koval L. (1963) Reaction on the uranyl ion with amino acids. Bidentate carboxylate chelation. *Inorg. Chem.* **2**, 145-50.
- Fenn J. B., Mann M., Meng C. K., Wong S. F. and Whitehouse C. M. (1989) Electrospray ionization for mass-spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**(4926), 64-71.
- Ferrer E. G., Williams P. A. M. and Baran E. J. (1993) The interaction of the vanadyl cation with oxidized glutathione. *Journal of Inorganic Biochemistry* **50**(4), 253-62.

- Finneran K. T., Anderson R. T., Nevin K. P. and Lovley D. R. (2002) Potential for bioremediation of uranium-contaminated aquifers with microbial U(VI) reduction. *Soil and Sediment Contamination* **11**(3), 339-357.
- Francis A. J., Gillow J. B., Dodge C. J., Dunn M., Mantione K., Strietelmeier B. A., Pansoy-Hjelvik M. E., *et al.* (1998) Role of bacteria as biocolloids in the transport of actinides from a deep underground radioactive waste repository. *Radiochimica Acta* **82**, 347-354.
- Franco N., Lamartine J., Frouin V., Le Minter P., Petat C., Leplat J. J., Libert F., *et al.* (2005) Low-dose exposure to gamma rays induces specific gene regulations in normal human keratinocytes. *Radiation Research* **163**, 623-35.
- Frausto Da Silva J. J. R. and Williams R. J. P. (2001) *The Biological Chemistry of the Elements, II Edition*, pp. 650.
- Fujikawa Y., Zheng J., Cayer I., Sugahara M., Takigami H. and Kudo A. (1999) Strong association of fallout plutonium with humic and fulvic acid as compared to uranium and Cs-137 in Nishiyama soils from Nagasaki, Japan. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **240**(1), 69-74.
- Gem. (1996) *Norme expérimentale AFNOR XP X 07-020 : Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure (tirée de : Guide to the expression of Uncertainty in Measurement (GUM), 1995)*.
- Ghandour M. A., Azab H. A., Hassan A. and Ali A. M. (1989) Potentiometric studies on the mixed ligand complexes in solution: MII-tetracycline-glycine systems. *Polyhedron* **8**(2), 189-95.
- Girdhar H. L., Parveen S. and Puri M. K. (1976) Stability constants of glutamic acid complexes with some metal ions. *Indian Journal of Chemistry, Section A: Inorganic, Physical, Theoretical and Analytical* **14A**(12), 1021-2.
- Gorden A. E. V., Xu J. D., Raymond K. N. and Durbin P. (2003) Rational design of sequestering agents for plutonium and other actinides. *Chemical Reviews* **103**(11), 4207-4282.
- Gowda R. R. and Venkatappa M. P. (1981) Interaction of acidic amino acids with bivalent metal ions. *Journal of the Electrochemical Society of India* **30**(4), 336-40.
- Grenthe I., Fuger J., Konings R. J. M., Lemire R. J., Muller A. B., Nguyen-Trung C. and Wanner H. (1992) *Chemical Thermodynamics of Uranium*. (NEA, OECD, H. Wanner and I. Forest eds.).
- Grill E., Löffler S., Winnacker E. L. and Zenk M. H. (1989) Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**(18), 6838-42.
- Guggenheim E. A. (1966) *Applications of Statistical Mechanics*, pp. 211.

- Guillaumont R., Fanghänel T., Fuger J., Grenthe I., Neck V., Palmer D. A. and Rand M. H. (2003) *Update on the Chemical Thermodynamics of Uranium, Neptunium, Plutonium, Americium and Technetium*. Elsevier B.V., pp. 919.
- Günther A., Geipel G. and Bernhard G. (2007) Complex formation of uranium(VI) with the amino acids L-glycine and L-cystéine: A fluorescence emission and UV-Vis absorption study. *Polyhedron* **26**, 59-65.
- Hamer D. H. (1986) Metallothionein. *Annual Review of Biochemistry* **55**, 913-51.
- He Z. Y., Li J. C., Zhang H. Y. and Ma M. (2005) Different effects of calcium and lanthanum on the expression of phytochelatin synthase gene and cadmium absorption in *Lactuca sativa*. *Plant Science* **168**(2), 309-318.
- Henge-Napoli M. H., Stradling G. N. and Taylor D. M. (2000) Decorporation of radionuclides from the human body. *Radiation Protection Dosimetry* **87**(1), 3-56.
- Horrocks D. W. J. and Sudnick D. R. (1979) Time-resolved europium(III) excitation spectroscopy: a luminescence probe of metal ion binding sites. *Science* **206**(4423), 1194-6.
- Huang H., Chaudhary S. and Van Horn J. D. (2005) Uranyl-peptide interactions in carbonate solution with DAHK and derivatives. *Inorganic Chemistry* **44**(4), 813-5.
- Hummel W., Berner U., Curti E., Pearson F. J. and Thoenen T. (2002) Nagra/PSI chemical thermodynamic data base 01/01. *Radiochimica Acta* **90**(9-11), 805-813.
- Iftekhhar S. and Dubey K. P. (1984) Studies on L-2-aminomercaptopropionic acid metal complex equilibria. *Journal of the Indian Chemical Society* **61**(8), 702-3.
- Ircp. (1995) Age-dependent doses to members of the public from intake of radionuclides. Part 3 : Ingestion dose coefficients (publication 69). *Annals of the ICRP* **25**(1).
- Jagetia G. C., Rajanikant G. K., Rao S. K. and Baliga M. S. (2003) Alteration in the glutathione, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and lipid peroxidation by ascorbic acid in the skin of mice exposed to fractionated gamma radiation. *Clinical Chimica Acta* **332**, 111-121.
- Jones A. and Williams D. (1970) Thermodynamic considerations in co-ordination .8. A calorimetric and potentiometric study of complex formation between some lanthanide(III) ions and histidine. *Journal of the Chemical Society A - Inorganic Physical Theoretical* **18**, 3138.
- Jones A. and Williams D. (1971) Thermodynamic considerations in co-ordination .9. Heat capacity investigations into complex formation between some lanthanide(III) ions and histidine. *Journal of the Chemical Society A - Inorganic Physical Theoretical* **20**, 3159.
- Jorgensen T. J. D., Roepstorff P. and Heck A. J. R. (1998) Direct determination of solution binding constants for noncovalent complexes between bacterial cell wall peptide analogues and vancomycin group antibiotics by electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **70**(20), 4427-4432.

- Kato N., Nakamura M. and Uchiyama T. (1999) H-1 NMR studies of the reactions of copper(I) and copper(II) with D-penicillamine and glutathione. *Journal of Inorganic Biochemistry* **75**(2), 117-121.
- Kebarle P. (2000) A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **35**(7), 804-817.
- Kebarle P. and Tang L. (1993) From ions in solution to ions in the gas-phase - the mechanism of electrospray mass-spectrometry. *Analytical Chemistry* **65**(22), A972-A986.
- Kempen E. C. and Brodbelt J. S. (2000) A method for the determination of binding constants by electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **72**(21), 5411-5416.
- Keramidas A. D., Rikkou M. P., Drouza C., Raptopoulou C. P., Terzis A. and Pashalidis I. (2002) Investigation on uranyl interaction with bioactive ligands. Synthesis and structural studies of the uranyl complexes with glycine and N-(2-mercaptopropionyl)glycine. *Radiochimica Acta* **90**(9-11), 549-554.
- Khalil M. M. and Attia A. E. (2000) Potentiometric studies on the formation equilibria of binary and ternary complexes of some metal ions with dipicolinic acid and amino acids. *Journal of Chemical and Engineering Data* **45**(6), 1108-1111.
- Kim J. I. (1994) Actinide colloids in natural aquifer systems. *MRS Bulletin* **19**(12), 47-53.
- Kimura T., Kato Y., Takeishi H. and Choppin G. R. (1998) Comparative study on the hydration states of Cm(III) and Eu(III) in solution and in cation exchange resin. *Journal of Alloys and Compounds* **271**, 719-722.
- Koegel H. and Alzheimer C. (2001) Expression and biological significance of Ca²⁺-activated ion channels in human keratinocytes. *FASEB Journal* **15**(1), 145-154.
- Kramer U., Cotter-Howells J. D., Baker A. J. M. and Smith J. A. C. (1996) Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* **379**, 635-8.
- Kremer C., Torres J., Dominguez S. and Mederos A. (2005) Structure and thermodynamic stability of lanthanide complexes with amino acids and peptides. *Coordination Chemistry Reviews* **249**(5-6), 567-590.
- Krezel A. and Bal W. (2004) Studies of zinc(II) and nickel(II) complexes of GSH, GSSG and their analogs shed more light on their biological relevance. *Bioinorganic Chemistry And Applications* **2**(3-4), 293-305.
- Lafaye A., Junot C., Pereira Y., Lagniel G., Tabet J.-C., Ezan E. and Labarre J. (2005) Combined Proteome and Metabolite-profiling Analyses Reveal Surprising Insights into Yeast Sulfur Metabolism *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 24723-30.
- Lagrange P., Schneider M., Zare K. and Lagrange J. (1994) Determination and comparison of stability constants of uranium(VI) and vanadium(V) glycine complexes. *Polyhedron* **13**(6-7), 861-7.

- Lemire R. J., Fuger J., Nitsche H., Potter P., Rand M. H., Rydberg J., Spahiu K., *et al.* (2001) *Chemical Thermodynamics of Neptunium and Plutonium*. (OECD NEA eds.). Elsevier Science B. V., pp. 845.
- Leopold I., Gunter D. and Neumann D. (1998) Application of high performance liquid chromatography - inductively coupled plasma mass spectrometry to the investigation of phytochelatin complexes and their role in heavy metal detoxification in plants. *Analysis* **26**(6), M28-M32.
- Limaye S. N. and Saxena M. C. (1990) Formation constants of some ternary lanthanide complexes with o-phenanthroline and aliphatic amino acids. *Journal of the Indian Chemical Society* **67**(2), 162-4.
- Liu N., Luo S. H., Yang Y. Y., Zhang T. M., Jin J. N. and Liao J. L. (2002) Biosorption of americium-241 by *Saccharomyces Cerevisiae*. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **252**(1), 187-191.
- Liu Q., Wei H. Y., Lin J., Zhu L. G. and Guo Z. J. (2004) Novel polynuclear platinum adducts detected during the reactions of [Pt(Met-S,N)Cl-2] with gamma-glutathione and L-cysteine. *Journal of Inorganic Biochemistry* **98**(5), 702-712.
- Loo J. A. (2000) Electrospray ionization mass spectrometry: a technology for studying noncovalent macromolecular complexes. *International Journal Of Mass Spectrometry* **200**, 175-86.
- Lovley D. R., Giovannoni S. J., White D. C., Champine J. E., Phillips E. J., Gorby Y. A. and Goodwin S. (1993a) *Geobacter metallireducens*, a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Archives of microbiology* **159**(4), 336-44.
- Lovley D. R., Phillips E. J. and Caccavo F., Jr. (1992) Acetate oxidation by dissimilatory Fe(III) reducers. *Applied and environmental microbiology* **58**(9), 3205-8.
- Lovley D. R., Phillips E. J. P., Gorby Y. A. and Landa E. R. (1991) Microbial reduction of uranium. *Nature (London, United Kingdom)* **350**(6317), 413-16.
- Lovley D. R., Widman P. K., Woodward J. C. and Phillips E. J. (1993b) Reduction of uranium by cytochrome c3 of *Desulfovibrio vulgaris*. *Applied and environmental microbiology* **59**(11), 3572-6.
- Macaskie L. E., Bonthron K. M., Yong P. and 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-Uk* **146**, 1855-1867.
- Maier T., Yu C., Kullertz G. and Clemens S. (2003) Localization and functional characterization of metal-binding sites in phytochelatin synthases. *Planta* **218**(2), 300-8.
- Mar G. N. L., Horrocks W. D. and Holm R. H. (1973) *NMR of Paramagnetic Molecules*. (Academic Press eds.).

- Mathis G. (1995) Probing molecular-interactions with homogeneous techniques based on rare-earth cryptates and fluorescence energy-transfer. *Clinical Chemistry* **41**(9), 1391-1397.
- Mboulou M. O., Hurtgen C., Hofkens K. and Vandecasteele C. (1998) Vertical distributions in the Kapachi soil of the plutonium isotopes (Pu-238, Pu-239, Pu-240, Pu-241), of Am-241, and of Cm-243, Cm-244, eight years after the Chernobyl accident. *Journal of Environmental Radioactivity* **39**(3), 231-237.
- Meece D. E. and Benninger L. K. (1993) The coprecipitation of Pu and other radionuclides with CaCO₃. *Geochimica Cosmochimica Acta* **57**(7), 1447-1458.
- Mehta J. P., Bhatt P. N. and Misra S. N. (2003) An absorption, spectral study of Nd(III) with glutathione (reduced), GSH in aqueous and aquated organic solvent in presence and absence of Zn(II). *Journal of Solid State Chemistry* **171**(1-2), 175-182.
- Meyer A. J., May M. J. and Fricker M. (2001) Quantitative *in vivo* measurement of glutathione in *Arabidopsis* cells. *The Plant Journal* **27**(1), 67-78.
- Michel H., Barci-Funel G., Barci V. and Ardisson G. (2002) Input contribution and vertical migration of plutonium, americium and cesium in lake sediments (Belham Tarn, Cumbria, UK). *Radiochimica Acta* **90**(9-11), 747-752.
- Montavon G. and Grambow B. (2003) Study of the reversibility of the interaction between Eu(III) and polyacrylic acids. *New Journal of Chemistry* **27**(9), 1344-1352.
- Moulin C., Amekraz B., Hubert S. and Moulin V. (2001) Study of thorium hydrolysis species by electrospray-ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **441**(2), 269-279.
- Moulin C., Charron N., Plancque G. and Virelizier H. (2000) Speciation of uranium by electrospray ionization mass spectrometry: Comparison with time-resolved laser-induced fluorescence. *Applied Spectroscopy* **54**(6), 843-848.
- Mounicou S., Vacchina V., Szpunar J., Potin-Gautier M. and Lobinski R. (2001) Determination of phytochelatin by capillary zone electrophoresis with electrospray tandem mass spectrometry detection (CZE-ES MS/MS). *Analyst* **126**(5), 624-632.
- Muller G., Bunzli J. C. G., Schenk K. J., Piguet C. and Hopfgartner G. (2001) Influence of bulky N-substituents on the formation of lanthanide triple helical complexes with a ligand derived from bis(benzimidazole)pyridine: Structural and thermodynamic evidence. *Inorganic Chemistry* **40**(12), 2642-2651.
- Nagaishi R., Kimura T. and Sinha S. P. (2003) Luminescence properties of lanthanide(III) ions in concentrated carbonate solution. *Molecular Physics* **101**(7), 1007-1014.
- Nakamoto K. (1997) Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, part B.
- Nierengarten H., Leize E., Breuning E., Garcia A., Romero-Salguero F., Rojo J., Lehn J. M., *et al.* (2002) Characterization of multimetallic grid-type complexes by electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **37**(1), 56-62.

- Nourmand M. and Meissami N. (1982) Complex formation between uranium(VI) ion and some α -amino acids. *Polyhedron* **1**(6), 537-8.
- Pearson R. G. (1963) Hard and soft acids and bases. *Journal of the American Chemical Society* **85**, 3533-3539
- Peltier A., Elcabache J. M. and Guillemain C. (1992) *Exposition professionnelle aux poussières de terres rares.*, pp. pages 227 à 239.
- Perrin F. and Perrin J. (1924) *C. R. Acad. Sci. Paris*, **10**, 1978.
- Petit-Ramel M. M. and Mosoni L. (1982) Stability and visible absorption of glutamic acid complexes with uranyl and neodymium ions. *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie* **313**(7), 544-7.
- Phan G., Le Gall B., Deverre J. R., Fattal E. and Benech H. (2006a) Predicting plutonium decorporation efficacy after intravenous administration of DTPA formulations: Study of pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships in rats. *Pharmaceutical Research* **23**(9), 2030-2035.
- Phan G., Le Gall B., Grillon G., Rouit E., Fouillit M., Benech H., Fattal E., *et al.* (2006b) Enhanced decorporation of plutonium by DTPA encapsulated in small PEG-coated liposomes. *Biochimie* **88**(11), 1843-1849.
- Plancque G., Amekraz B., Moulin V., Toulhoat P. and Moulin C. (2001) Molecular structure of fulvic acids by electrospray with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **15**(10), 827-835.
- Plancque G., Moulin V., Toulhoat P. and Moulin C. (2003) Europium speciation by time-resolved laser-induced fluorescence. *Analytica Chimica Acta* **478**, 11-22.
- Popovic Z., Matkovic-Calogovic D., Hasic J., Sikirica M. and Vikić-Topić D. (1999) Binding of mercury(II) by N-(2-mercaptopropionyl) glycine. Synthesis, IR and NMR characterization. crystal structure of the 1 : 2 solvate of bis[N-(propionyl-2-thiolato)glycine]mercury(II) with 4-methylpyridine. *Croatica Chemica Acta* **72**(2-3), 279-294.
- Powell K. J. (2004) *The IUPAC Stability Constants Database*. Academic Software, Yorks, UK.
- Rabenstein D. L., Guevremont R. and Evans C. A. (1979) Glutathione and its metal complexes. *Metal Ions in Biological Systems* **9**, 103-41.
- Rabenstein D. L. and Millis K. K. (1995) Nuclear-magnetic-resonance study of the thioltransferase-catalyzed glutathione/glutathione disulfide interchange reaction. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1249**(1), 29-36.
- Raghavan A. and Santappa M. (1973) Complexes of uranyl ion with amino and mercapto acids. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry* **35**(9), 3363-5.
- Ramamoorthy S. and Santappa M. (1970) Stability constants in aqueous solution of complexes of uranyl ion with mixed dibasic acids. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry* **32**(5), 1623-9.

- Ramanujam V. V. and Rengaraj K. (1980) Studies on uranyl complexes. Part III. Potentiometric investigation of uranyl-amino acid complexes. *Indian Journal of Chemistry, Section A: Inorganic, Physical, Theoretical and Analytical* **19A**(4), 382-4.
- Ramanujam V. V., Rengaraj K. and Sivasankar B. (1979) Studies on uranyl complexes. II. Unidentate carboxylate coordination in uranyl complexes of α -, β -, and γ -amino acids: a polarographic study. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **52**(9), 2713-16.
- Rangaraj K. and Ramanujam V. V. (1977) Stability constants of some uranyl complexes. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry* **39**(3), 489-91.
- Rausser W. E. (1995) Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis and function. *Plant Physiology* **109**(4), 1141-49.
- Rausser W. E. (1999) Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cell Biochemistry and Biophysics* **31**(1), 19-48.
- Rea P. A., Vatamaniuk O. K. and Rigden D. J. (2004) Weeds, worms, and more. Papain's long-lost cousin, phytochelatin synthase. *Plant Physiology* **136**(1), 2463-74.
- Reddy P. and Rao V. (1986) Rare-earth metal-complexes of cytidine. *Inorganica Chimica Acta* **125**(4), 191-5.
- Reddy P. R. and Reddy M. H. (1985) Influence of secondary ligands on the stability of metal-xanthosine complexes in solution. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions: Inorganic Chemistry (1972-1999)*(2), 239-42.
- Reddy P. R. and Venkatadri E. (1997) Interaction of thorium(IV) and dioxouranium(VI) with histidine, cysteine and guanosine-binary and ternary complexes in solution. *Indian Journal of Chemistry, Section A: Inorganic, Bio-inorganic, Physical, Theoretical and Analytical Chemistry* **36A**(7), 608-610.
- Reiller P., Moulin V., Casanova F. and Dautel C. (2002) Retention behaviour of humic substances onto mineral surfaces and consequences upon thorium (IV) mobility: case of iron oxides. *Applied Geochemistry* **17**(12), 1551-1562.
- Reiller P., Moulin V., Casanova F. and Dautel C. (2003) On the study of Th(IV)-humic acid interactions by competition sorption studies with silica and determination of global interaction constants. *Radiochimica Acta* **91**(9), 513-524.
- Ren J., Jing F., Pei F. and Wang W. (1994) ^{13}C NMR study of interaction between glutathione and lanthanide ions. *Huaxue Xuebao* **52**(7), 711-15.
- Renaud F., Piguet C., Bernardinelli G., Hopfgartner G. and Bunzli J. C. G. (1999) C-3-symmetrical lanthanide podates organized by intramolecular trifurcated hydrogen bonds. *Chemical Communications*(5), 457-458.
- Rey F., Antelo J. M., Arce F. and Penedo F. J. (1990) Equilibrium constants of metal amino acid complexes. *Polyhedron* **9**(5), 665-8.

- Ringbom A. (1963) *Complexation in analytical chemistry. A guide for the critical selection of analytical methods based on complexation reactions*. Interscience Publishers.
- Robinson N. J., Tommey A. M., Kuske C. and Jackson P. J. (1993) Plant metallothioneins. *Biochemistry Journal* **295**, 1-10.
- Rogozina E. M., Konkina L. F. and Popov D. K. (1974) Reaction of americium with amino acids. *Radiokhimiya* **16**(3), 383-6.
- Saito S., Hoshino H. and Yotsuyanagi T. (2001) Entropy-controlled solvolytic dissociation kinetics of lanthanide(III) complexes with polyaminocarboxylates in aqueous solutions. *Inorganic Chemistry* **40**(15), 3819-3823.
- Salt D. E. and Rauser W. E. (1995) Mg ATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiology* **107**(4), 1293-1301.
- Saxena R. S. and Khandelwal G. L. (1980) Determination of dissociation constant (pK) and stability constant of lead(2+), cadmium(2+), uranyl(2+) complexes of monosodium L-glutamic acid. *Journal of the Indian Chemical Society* **57**(2), 116-19.
- Schubert J. (1947) Treatment of plutonium poisoning by metal displacement. *Science* **105**.
- Seguin G., Galea J. and Ferroni G. (1978) The stability of L- α -alaninate anion [MeCH(NH₂)CO₂⁻] complexes with europium(III) and samarium(III), at 25 DegC. *Journal of Chemical Research, Synopses*(8), 280.
- Selvaraj P. V. and Santappa M. (1977) Equilibrium studies of mixed-ligand complexes of uranyl ion with amino acids and carboxylic acids in aqueous solution. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry* **39**(1), 119-22.
- Sergeev G. M. and Korshunov I. A. (1973) Interaction of uranyl ion with amino acids and complexons. *Radiokhimiya* **15**(4), 621-3.
- Sharma C. L. and De T. K. (1980) Thermodynamics for the formation of cysteinate complexes of lanthanide(III) ions. *Journal of the Less-Common Metals* **70**(1), 63-8.
- Shchelokov R. N., Mikhailov Y. N., Loboanova G. M., Kanischeva A. S., Orlova I. M., Generalova N. B. and Podnesbesnova G. V. (1982) Coordination of uranyl compounds with L-Prolines. *Russian Journal of Inorganic Chemistry* **27**(9), 2348-54.
- Shelke D. N. and Jahagirdar D. V. (1978a) Study of equilibrium constants of uranyl(2+)-malonic acid complexes at various ionic strengths and in dioxane-water mixtures. *Journal of the Indian Chemical Society* **55**(6), 545-7.
- Shelke D. N. and Jahagirdar D. V. (1978b) Ternary complexes: equilibrium studies of mixed-ligand chelates of uranyl ion with aspartic and glutamic acids as primary ligands and some dicarboxylic acids as secondary ligands. *Indian Journal of Chemistry, Section A: Inorganic, Physical, Theoretical and Analytical* **16A**(1), 60-2.

- Sillen L. G. and Martell A. E. (1971) *Stability Constants of Metal-Ion Complexes, Supplement No. 1, Pts. 1 and 2: Inorganic Ligands. Organic Including Macromolecule Ligands, Special Publication No. 25*. (Chemical Society eds.), pp. 865.
- Sillen L. G. and Martell E. A. (1964) *Stability Constants of Metal-Ion Complexes. Special Publication No. 17 (II Ed.)*. (Chemical Society eds.), pp. 754.
- Silva R. J., Bidoglio G., Rand M. H., Robouch P. B., Wanner H. and Puigdomenech I. (1995) *Chemical Thermodynamics Series, Vol. 2: Chemical Thermodynamics of Americium*. . (NEA Data Bank, NEA, OECD eds.), pp. 926.
- Simoni E. and Den Auwer C. (2005) Spéciation des actinides au moyen du rayonnement synchrotron. *Techniques de l'ingénieur AFP4*.
- Singh R. K. and Saxena M. C. (1992) Stability constants of mixed ligand complexes of dioxouranium(II) and thorium(IV) with complexones and isomeric alanines. *Journal of the Indian Chemical Society* **69**(4), 222-3.
- Smith R. M. and Martell A. E. (1997) *Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Database, Version 3.0*.
- Spain S. M. and Rabenstein D. L. (2003) Characterization of the acid/base and redox chemistry of phytochelatin analogue peptides. *Analytical Chemistry* **75**(15), 3712-3719.
- Szilagyi E. and Brucher E. (2000) Kinetics and mechanisms of formation of the lanthanide(III)-trans-1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetate complexes. *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions*(13), 2229-2233.
- Tanner S. P. and Choppin G. R. (1968) Lanthanide and actinide complexes of glycine. Determination of stability constants and thermodynamic parameters by a solvent extraction method. *Inorganic Chemistry* **7**(10), 2046-8.
- Taylor D. M. (1981) The biochemistry of the actinide elements. *KFK-Nachrichten* **13**(1-2), 99-101.
- Taylor D. M., Stradling G. N. and Henge-Napoli M. H. (2000) The scientific background to decorporation. *Radiation Protection Dosimetry* **87**(1), 11-17.
- Texier A. C., Andres Y., Faur-Brasquet C. and Le Cloirec P. (2002) Fixed-bed study for lanthanide (La, Eu, Yb) ions removal from aqueous solutions by immobilized *Pseudomonas aeruginosa*: experimental data and modelization. *Chemosphere* **47**(3), 333-342.
- Texier A. C., Andres Y., Illemassene M. and Le Cloirec P. (2000) Characterization of lanthanide ions binding sites in the cell wall of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Science & Technology* **34**(4), 610-615.
- Texier A. C., Andres Y. and Le Cloirec P. (1999) Selective biosorption of lanthanide (La, Eu, Yb) ions by *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Science & Technology* **33**(3), 489-495.
- Tian Z., Pawlow A., Poutsma J. C. and Kass S. R. (2007) Are carboxyl groups the most acidic sites in amino acids? Gas-phase acidity, H/D exchange experiments, and computations on cysteine and its conjugate base. *Journal of the American Chemical Society* **29**, 5403-7.

- Tomsett A. B. and Thurman D. A. (1988) Molecular biology of metal tolerances of plants. *Plant Cell and Environment* **11**(5), 383-94.
- Torres J., Kremer C., Kremer E., Pardo H., Suescun L., Mombru A., Dominguez S., *et al.* (2002) Sm(III) complexation with amino acids. Crystal structures of [Sm-2(Pro)₆(H₂O)₆](ClO₄)₆ and [Sm(Asp)(H₂O)₄]Cl-2 *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **21**, 4035-41.
- Toth E., Brucher E., Lazar I. and Toth I. (1994) Kinetics of formation and dissociation of lanthanide(III)-DOTA complexes. *Inorganic Chemistry* **33**(18), 4070-4076.
- Touche M. L. D. and Williams D. R. (1976) Thermodynamic considerations in coordination. Part XXV. Formation of ternary complexes containing two dissimilar metal ions and the implication for metal-metal stimulation phenomena *in vivo*. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions: Inorganic Chemistry (1972-1999)*(14), 1355-9.
- Tracqui P. and Demongeot J. (2003) *Éléments de biologie à l'usage d'autres disciplines*. (E.D.P. Sciences eds.), pp. 328.
- Tuovinen O. H. and Bhatti T. M. (1999) Microbiological leaching of uranium ores. *Minerals & Metallurgical Processing* **16**(4), 51-60.
- Valeur B. (2002) *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. (Wiley-VCH Verlag GmbH eds.), pp. 402.
- Vallee B. L. and Ulmer D. D. (1972) Biochemical Effects of Mercury, Cadmium, and Lead. *Annual Review of Biochemistry* **41**, 91-128.
- Van Berkel G. J., Zhou F. M. and Aronson J. T. (1997) Changes in bulk solution pH caused by the inherent controlled-current electrolytic process of an electrospray ion source. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **162**(1-3), 55-67.
- Van Der Lee J. and De Windt L. (2002) *CHESS Tutorial and Cookbook Updated for Version 3.0, Users Manual LHM/RD/02/13*. Ecole des Mines de Paris, Fontainebleau.
- Van Horn J. D. and Huang H. (2006) Uranium(VI) bio-coordination chemistry from biochemical, solution and protein structural data. *Coordination Chemistry Reviews* **250**, 765-75.
- Vanberkel G. J., Zhou F. M. and Aronson J. T. (1997) Changes in bulk solution pH caused by the inherent controlled-current electrolytic process of an electrospray ion source. *International Journal Of Mass Spectrometry And Ion Processes* **162**(1-3), 55-67.
- Varnagy K., Sovago I. and Kozlowski H. (1988) Transition-Metal Complexes of Amino-Acids and Derivatives Containing Disulfide Bridges. *Inorganica Chimica Acta-Bioinorganic Chemistry* **151**(2), 117-123.
- Vatamaniuk O. K., Mari S., Lang A., Chalasani S., Demkiv L. O. and Rea P. A. (2004) Phytochelatin synthase, a dipeptidyltransferase that undergoes multisite acylation with gamma-glutamylcysteine during catalysis - Stoichiometric and site-directed mutagenic analysis of *Arabidopsis thaliana* PCS1-catalyzed phytochelatin synthesis. *Journal of Biological Chemistry* **279**(21), 22449-60.

- Vatamaniuk O. K., Mari S., Lu Y. P. and Rea P. A. (1999) AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: Isolation and *in vitro* reconstitution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(12), 7110-7115.
- Vatamaniuk O. K., Mari S., Lu Y. P. and Rea P. A. (2000) Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase - Blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. *Journal of Biological Chemistry* **275**(40), 31451-31459.
- Vekey K. (1996) Internal energy effects in mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **31**, 445.
- Vercouter T. (2005) Complexes aqueux de lanthanides(III) et actinides(III) avec les ions carbonate et sulfate. Etude thermodynamique par spectrofluorimétrie laser résolue en temps et spectrométrie de masse à ionisation électrospray, Université d'Evry Val d'Essonne.
- Vercouter T., Amekraz B., Moulin C., Giffaut E. and Vitorge P. (2005) Sulfate complexation of trivalent lanthanides probed by nanoelectrospray mass spectrometry and time-resolved laser-induced luminescence. *Inorganic Chemistry* **44**(21), 7570-7581.
- Viarengo A., Burlando B., Ceratto N. and Panfoli I. (2000) Antioxidant role of metallothioneins: A comparative overview. *Cellular and Molecular Biology* **46**(2), 407-417.
- Vitorge P. and Capdevila H. (2003) Thermodynamic data for modelling actinide speciation in environmental waters. *Radiochimica Acta* **91**(11), 623-631.
- Vivares D., Arnoux P. and Pignol D. (2005) A papain-like enzyme at work: Native and acyl-enzyme intermediate structures in phytochelatin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(52), 18848-18853.
- Volesky B. and Holan Z. R. (1995) Biosorption Of Heavy-Metals. *Biotechnology Progress* **11**(3), 235-250.
- Wang H. and Agnes G. R. (1999a) Evaluation of electrospray mass spectrometry as a technique for quantitative analysis of kinetically labile solution species. *Analytical Chemistry* **71**(17), 3785-92.
- Wang H. and Agnes G. R. (1999b) Kinetically labile equilibrium shifts induced by the electrospray process. *Analytical Chemistry* **71**(19), 4166-72.
- Whittal R. M., Ball H. L., Cohen F. E., Burlingame A. L., Prusiner S. B. and Baldwin M. A. (2000) Copper binding to octarepeat peptides of the prion protein monitored by mass spectrometry. *Protein Science* **9**(2), 332-343.
- Williams R. J. P. (1979) Cation and proton interactions with proteins and membranes. *Biochemical Society Transactions* **7**(3), 481-509.
- Wink M. (1993) The plant vacuole: a multifunctional compartment. *Journal of Experimental Botany* **44 Suppl.**, 231-46.

- Wohlrab D. and Markwardt F. (1999) Influence of ion channel blockers on proliferation and free intracellular Ca²⁺ concentration of human keratinocytes. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology* **12**(5), 257-265.
- Wu S. L. and Horrocks D. W. J. (1997) Direct determination of stability constants of lanthanide ion chelates by laser-excited europium(III) luminescence spectroscopy: Application to cyclic and acyclic aminocarboxylate complexes. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **9**, 1497-1502.
- Yamashita M. and Fenn J. B. (1984a) Electrospray ion-source - Another variation on the free-jet theme. *Journal of Physical Chemistry* **88**(20), 4451-4459.
- Yamashita M. and Fenn J. B. (1984b) Negative-ion production with the electrospray ion-source. *Journal of Physical Chemistry* **88**(20), 4671-4675.
- Yansheng Y. and Lubin L. (1988) Crystal structure of [Eu(μ -CH₃COO-O)(CH₃COO)₂(H₂O)₂]₂·4H₂O. *Jiegou Huaxue (Journal of Structural Chemistry)* **7**(1), 1-5.
- Yates J. R., McCormack A. L., Link A. J., Schieltz D., Eng J. and Hays L. (1996) *Analyst* **121**, 65R.
- Yen T. Y., Villa J. A. and Dewitt J. G. (1999) Analysis of phytochelatin-cadmium complexes from plant tissue culture using nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry and capillary liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **34**(9), 930-941.
- Zenk M. H. (1996) Heavy metal detoxification in higher plants - A review. *Gene* **179**(1), 21-30.
- Zhao S.-F., Wang Z.-L., Liu Q.-M., Niu C.-J. and Ni J.-Z. (1995) Studies on the coordination of Tb(III) and Ca(II) with amino acid under the physiological condition. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao* **16**(6), 847-9.
- Zucconi T. D., Janauer G. E., Donahe S. and Lewkowicz C. (1979) Acid dissociation and metal complex formation constants of penicillamine, cysteine, and antiarthritic gold complexes at simulated biological conditions. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **68**(4), 426-32.

Résumé

Les mécanismes de complexation et d'accumulation des radionucléides au niveau cellulaire et moléculaire sont complexes et mal connus car les études sur ces sujets sont peu nombreuses. Dans le cadre de cette thèse, nous avons étudié les interactions de ces cations avec des molécules biologiques d'intérêt. Nous avons choisi d'étudier un actinide : l'uranium (VI) ainsi que l'euporium en tant qu'analogue des actinides trivalents.

Les molécules biologiques choisies sont les phytochélatines, dont le rôle est de protéger les cellules contre les intrusions de métaux lourds non essentiels (donc toxiques). Ces protéines sont donc susceptibles d'être impliquées dans les mécanismes de séquestration des radionucléides chez le vivant. Elles ont toutefois une structure complexe, c'est pourquoi, afin de mieux comprendre leur réactivité, nous avons étendu nos études aux sous entités qui les constituent (acides aminés : glycine, acide glutamique et cystéine ; polypeptides : glutathion réduit et oxydé).

Nous avons en particulier déterminé la spéciation en solution (stoechiométrie, structure) ainsi que les constantes d'équilibre associées à la formation de ces espèces. Ces études ont été menées par Spectrofluorimétrie Laser à Résolution Temporelle (SLRT), ElectroSpray-Spectrométrie de Masse (ES-SM), Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IRTF) et Spectroscopie d'Absorption X (EXAFS). La détermination des constantes d'équilibre nous a permis de conclure que le pouvoir complexant de ces molécules vis-à-vis des radionucléides était modéré ($\log_{10}K_1 < 3$, à pH 3 ou 6), les espèces formées sont mononucléaires avec une seule molécule de ligand (1:1). L'interaction se fait *via* les groupements durs (oxygénés).

La complexation directe de l'euporium par des molécules de phytochélatines à pH acide a été étudiée conjointement par SLRT et ES-SM. Le pouvoir complexant de ces molécules est bien supérieur à celui du GSH dont elles sont pourtant issues. L'interaction de l'euporium avec les métallothionéines n'est pas plus forte qu'avec les phytochélatines, au contraire.

Outre les travaux menés sur des solutions synthétiques reproduisant les conditions « biologiques » (pH proche de la neutralité, force ionique 0,1 mol/L, etc.), des tests de contamination cellulaire ont été réalisés. Nous avons fait pousser des cellules dans des milieux de cultures comportant différentes concentrations en euporium. La quantification de l'euporium intégré (par million de cellules) a montré que celles-ci sont capables d'incorporer significativement l'euporium.

Mots clés : Spéciation, radionucléide, acides aminés, glutathion, phytochélatines, métallothionéines, SLRT, ES-SM, EXAFS

Summary

Mechanisms of complexation and accumulation of the radionuclides at the cellular and molecular level are complex and poorly known because the studies on these subjects are scarce. Within the framework of this thesis, we studied the interactions of these cations with biological molecules of interest. We chose to focus on an actinide: uranium (VI) as well as europium as an analogue of trivalent actinides.

The selected biological molecules are the phytochelatins: their role is to protect cells against intrusions from nonessential heavy metals (thus toxic). These proteins are likely to be implied in the mechanisms of sequestration of radionuclides in living organisms. However, their structure is complex, this is why, in order to better include/understand their reactivity, we extended our studies to lower entities which constitute them (amino acid: glycine, glutamic acid and cysteine; polypeptides: glutathion reduced and oxidized forms).

In particular, we determined solution speciation (stoichiometry, structure) as well as the complexing constants associated with the formation with these species. These studies were undertaken by Time Resolved Laser induced Fluorescence (TRLIF), ElectroSpray-Mass Spectrometry (ES-MS), Nuclear Magnetic Resonance (NMR), Fourier Transform Infra-Rouge spectroscopy (FTIR) and Extended X-ray Absorption Fine Structure Spectroscopy (EXAFS). The determination of the complexation constants enabled us to conclude that the complexing capacity of these molecules with respect to radionuclides was moderate ($\log_{10}K_1 < 3$, pH 3 or 6), the formed species are mononuclear with only one ligand molecule (1:1). The interaction is performed *via* oxygenated (hard) groups.

The direct complexation of europium with phytochelatins at acidic pH was studied jointly by TRLIF and ES-MS. The complexing capacity of these molecules is much higher than that of GSH from which they result. The interaction of europium with metallothioneins is, on the contrary, lower than with phytochelatins.

In addition to studies undertaken on synthetic solutions reproducing the "biological" conditions (pH close to neutrality, ionic strength 0,1 mol/L, etc), tests of cellular contamination were realized. We let cells grow in culture media comprising various europium concentrations. The quantification of integrated europium (by million cells) showed that those are able to incorporate europium significantly.

Keywords : speciation, radionuclide, amino acids, phytochelatins, metallothioneins, TRLIF, ES-MS, EXAFS