



Universidad de Oviedo



IPREM
Institut des sciences analytiques
et de physico-chimie
pour l'environnement et les matériaux

**Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas
UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

**Master en Sciences Analytiques pour le Vivant et l'Environnement
UNIVERSITÉ DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR**

Trabajo Fin de Máster

**OPTIMIZATION OF SAMPLE PREPARATION
CONDITIONS FOR ELEMENTAL SELENIUM
DETERMINATION**

ENRIQUE GONZÁLEZ GIRALDA

Tuteurs:

Maïté Bueno

David Amouroux

Laurent Lanceleur

Julio 2016, Oviedo

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, merci à Florence PANNIER, coordinatrice du *Master Sciences Analytiques pour le Vivant et de l'Environnement (SAVE)* de l'UPPA, et Jorge RUIZ ENCINAR, coordinateur du *Máster Ciencias Analíticas y Bioanalíticas* de la Universidad de Oviedo, de m'avoir donné l'opportunité de faire mon stage à l'Université de Pau et des Pays de l'Adour, en m'aidant à grandir personnellement et à niveau d'études.

Je tiens à remercier Maïté BUENO, David AMOUROUX et Laurent LANCELEUR d'avoir été disponibles toujours que j'ai eu un problème ou un doute, et de m'avoir formé et conseillé.

Je souhaite aussi remercier à tous les personnes de l'IPREM que m'aient pu aider quand j'ai eu besoin d'aide et pour son agréable accueil, ainsi comment aux copains de bureau Juan, Bastien et Víctor avec lesquels les jours à l'IPREM ont été plus amusants.

Je remercie également à tous les amis Erasmus que j'ai fait pendant ce semestre à Pau pour tout le temps qu'on a vécu ensemble.

Enfin, remercier à toute ma famille, remercier à tous mes amis de Valladolid tout le support que vous m'avez donné pendant la durée de ce stage et merci beaucoup, Julia, pour ton soutien depuis le premier jour.

Sommaire

1. Introduction	1
2. Revue bibliographique	2
2.1 Le sélénium: caractéristiques, fonctions et toxicité.....	2
2.2 Transformations microbiennes du sélénium.....	4
2.3 Extraction du sélénium élémentaire	8
2.4 Méthodes d'analyse du sélénium.....	9
2.4.1 Principe de la spectrométrie de masse à plasma induit (ICP-MS)	9
2.4.2 Traçage isotopique et dilution isotopique inverse.....	11
3. Objectifs et démarche	16
4. Matériels et méthodes	18
4.1 Matériels et réactifs.....	18
4.2 Méthodes.....	19
4.2.1 Protocole analytique pour l'extraction du sélénium élémentaire	19
4.2.2 Préparation des échantillons de spiruline et levure dopées avec $^{77}\text{Se}^0$	21
4.2.3 Quantification du sélénium	21
5. Résultats et discussions	24
5.1 Concentration du traceur dans les échantillons dopés.....	24
5.2 Sélection de la solution de rinçage (étape 1)	24
5.3 Hydrolyse de l'échantillon (étape 2)	26
5.3.1 Hydrolyse basique à 65 °C.....	27
5.3.2 Hydrolyse basique à température ambiante.....	27
5.4 Bilans de matière avec les conditions choisies.....	28
5.5 Application à des échantillons de cultures bactériennes.....	29
6. Conclusions	32
7. Bibliographie	33
8. Annexes	38

1. Introduction

Le sélénium est un oligoélément pour l'Homme qui devient toxique dans un intervalle étroit de concentrations dépendant de l'espèce séléniée. L'exposition au sélénium est liée à son origine naturelle mais également aux activités anthropiques. Les transformations microbiennes de Se affectent la biodisponibilité de cet élément. Certaines bactéries (anaérobies et aérobies) utilisent les ions sélénite et séléniate comme accepteur final d'électrons lors de la respiration, réduisant ces espèces en Se^0 et/ou, en séléniures méthylés volatils comme par exemple diméthylséléniure (DMSe), diméthyldiséléniure (DMDS_e) ou diméthylsélénylsulfure (DMSeS). De cette manière, l'activité de nombreux microorganismes intervient dans le cycle du sélénium et dans les procédures de bioremédiation des sols qui ont une haute concentration en sélénium.

L'objectif de ce travail est de caractériser les modifications de la spéciation du sélénium liées à l'activité des microorganismes, en particulier la formation de sélénium élémentaire. Tout d'abord, une recherche bibliographique sera présentée exposant les propriétés générales de Se et sa toxicité et, une synthèse des connaissances concernant l'utilisation de Se par les microorganismes. Pour suivre la mise au point du protocole de préparation d'échantillon, la méthodologie analytique du traçage isotopique a été mise en œuvre. Les résultats obtenus suite aux différentes conditions de préparation testées seront exposés et discutés. Enfin, l'application du protocole retenu à des échantillons issus de cultures bactériennes en milieu enrichi en sélénite sera présentée.

2. Revue bibliographique

2.1 Le sélénium: caractéristiques, fonctions et toxicité

Le sélénium (Se) est un élément qui appartient au groupe des chalcogènes ou groupe 16 du tableau périodique. Son numéro et masse atomique sont 34 et 78,96 g mol⁻¹ respectivement. Cet élément possède six isotopes stables (⁷⁴Se (0,89 %), ⁷⁶Se (9,36 %), ⁷⁷Se (7,63 %), ⁷⁸Se (23,78 %), ⁸⁰Se (49,61 %) et ⁸²Se (8,73 %)) [1]. Le sélénium peut exister sous formes d'oxyanions solubles dans l'eau comme les ions séléniate (SeO_4^{2-} , +VI) et sélénite (SeO_3^{2-} , +IV), de sélénium élémentaire (Se^0) insoluble dans l'eau et, de séléniure ($Se - II$) formant des séléniures métalliques ou différents composés organiques comme par exemple les acides aminés sélénométhionine et la sélénocystéine qui représentent les formes d'incorporation de Se dans les protéines séléniées et les sélénoprotéines respectivement [2]. La sélénocystéine est considérée comme le 21^{ème} acide aminé et constitue le centre actif de différentes enzymes peroxydases et réductases. La sélénocystéine a un potentiel de réduction plus haut et un pKa plus bas que son homologue soufré, la cystéine, étant plus recommandable pour les protéines qui ont une fonction antioxydante [3].

Le sélénium est un élément très peu abondant (concentrations dans l'écorce terrestre de 0,03 à 0,8 mg kg⁻¹) mais cependant largement répandu dans tous les compartiments de l'environnement. Il joue de plus un rôle très important dans l'industrie électronique grâce à ses propriétés électriques et semi-conductrices [4,5]; dans l'agriculture comme fertilisant [6,7]; ou dans l'industrie alimentaire étant utilisé comme complément nutritionnel.

Le sélénium est un oligoélément essentiel pour l'Homme et la frontière entre les concentrations physiologiquement essentielle et toxique est très étroite. La dose minimale requise par jour pour l'Homme est de 30-55 µg tandis que le sélénium devient toxique à partir de valeur > 400 µg [8,9].

Une carence en Sélénium peut induire des troubles physiologiques (défenses immunitaires, reproduction) et psychologiques (humeur, dépression). Au contraire, une consommation excessive de sélénium provoque une sélénose dont les symptômes peuvent être: perte de cheveux, ongles cassants, éruptions cutanées, douleurs, irritation des yeux et finalement provoque la mort en cas d'intoxication aiguë [10,11].

Par le passé, de fortes concentrations environnementales ont eu des effets néfastes sur les êtres vivants. La contamination des eaux de la réserve nationale de Kesterson en Californie (États Unis) à la concentration de $350 \mu\text{g L}^{-1}$ a provoqué des déformations embryonnaires et la mort des oiseaux aquatiques [12]. Des cas d'intoxication humaine ont aussi été reportés en Chine et liés aux teneurs élevées de Se dans les sols (montagne de Daba) [13].

Le sélénium est apporté aux animaux et aux êtres humains via la chaîne alimentaire, notamment les végétaux qui peuvent être riches ou pauvres en sélénium en fonction du sol dans lequel la plante a été cultivée. Les activités anthropiques telles que les industries du charbon, les industries minières et l'activité agricole sont des sources de Se auxquelles s'ajoutent les apports naturels liés au cycle biogéochimique de cet élément dans la croûte terrestre (Figure 1).

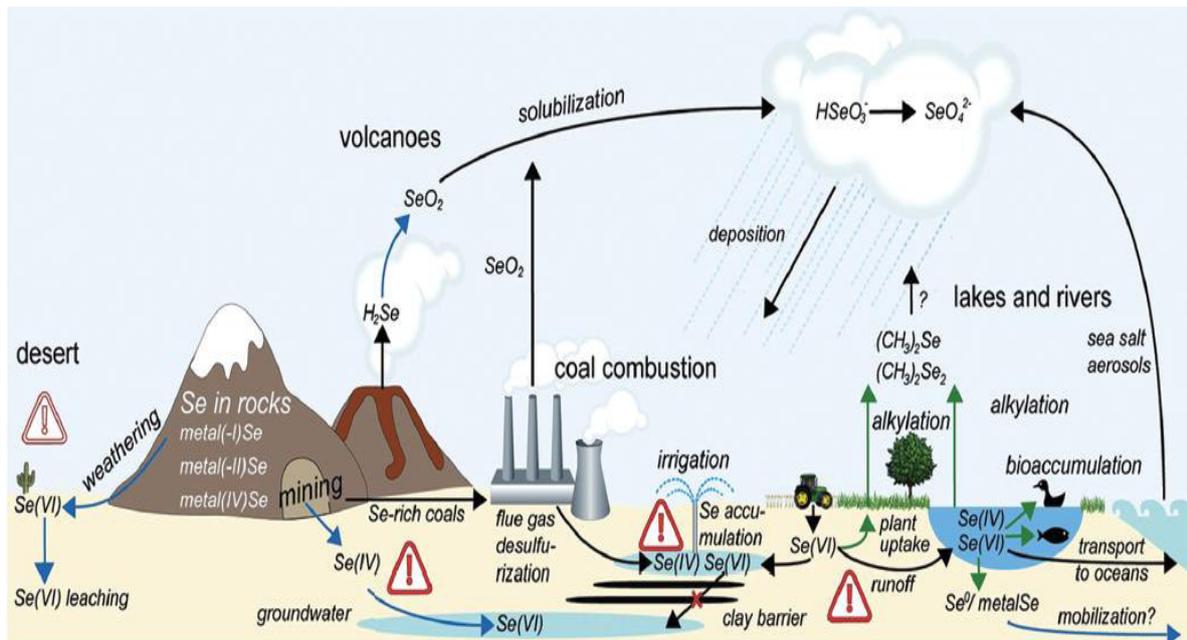


Figure 1. Cycle schématique du transport de sélénium dans un environnement terrestre [9].

De nombreux microorganismes présents dans les différents compartiments de l'environnement, aérobies [14] et anaérobies [15,16], sont capables de réduire les ions sélénite et séléniate en Se^0 et/ou, en séléniures méthylés volatils. Ces réactions provoquent ainsi des modifications de la spéciation du sélénium dans l'environnement. Ce type de réduction biologique donne lieu à la formation de nanoparticules cristallines de Se élémentaire (souvent notées BioSeNPs dans la littérature) de couleur rouge et de forme sphérique, dont la taille est de l'ordre des 300 nm de diamètre, pouvant se trouver dans

l'espace intra- ou extracellulaire des microorganismes. Ces particules formées par réduction biologique sont différentes des particules de Se de couleur noir et de forme vitreuse obtenues par réduction chimique avec différents réactifs comme par exemple l'acide ascorbique [17].

La production de BioSeNPs par les microorganismes est une méthode alternative économique couramment utilisée aujourd'hui.

2.2 Transformations microbiennes du sélénium

De nombreux microorganismes présentent une haute tolérance au sélénium et peuvent modifier sa spéciation. Ces modifications sont liées à des réactions de réduction assimilatrice consommatrice d'énergie, ou dissimilatrice productrice d'énergie. La plupart des procédures de détoxification qui ont lieu sont des réactions d'oxydation-réduction au cours desquelles les ions sélénite et séléniate sont réduits en Se^0 . La transformation des espèces inorganiques sélénite et séléniate en organiques par réduction et méthylation conduit aux espèces volatiles : le diméthylséléniure (DMSe), le diméthyldiséléniure (DMDS_e) et le diméthylsélénylsulfure (DMSeS).

La réduction des oxyanions séléniate et sélénite en Se^0 , composé insoluble dans l'eau, réduit la toxicité de cet élément en limitant sa biodisponibilité biologique. La formation de séléniures méthylés résulte également en une diminution de la toxicité du sélénium du fait du caractère volatil de ces composés.

a) Réduction des ions sélénite en Se^0

Silverberg et al. [18] ont montré que les bactéries *Escherichia coli* et des espèces de *Pseudomonas*, isolées à partir des sédiments d'un lac, sont capables de réduire les ions sélénite en Se^0 sous forme de particules rouges à l'intérieur du cytoplasme. Pour connaître la localisation du sélénium élémentaire formé, un spectromètre d'énergie dispersive combiné avec un microscope de transmission électronique (TEM) a été utilisé.

Garbisu et al. [14] ont également mis en évidence la réduction des ions sélénite en Se^0 par *Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus subtilis*, bactéries aérobies Gram négatives et positives respectivement, tandis que les ions séléniate ne sont pas réduits. Les granules rouges formés sont localisés à l'extérieur des cellules pour *Pseudomonas fluorescens* et, entre la paroi

cellulaire et la membrane plasmique pour *Bacillus subtilis*. Dans cette étude, le sélénium total a été déterminé par ICP-MS et les cellules ont été vues par microscopie électronique, en observant la formation des granules rouges de Se^0 .

Kessi et al. [19] ont étudié le comportement de *Rhodospirillum rubrum*, bactérie phototrophe capable de réduire les ions sélénite en Se^0 , cette réaction étant favorisée dans un milieu de culture désaéré. En effet, une concentration de 1,5 mM de sélénite est totalement réduite en absence d'oxygène tandis qu'en présence d'oxygène seulement 75 % du sélénite, à une concentration de 0,5 mM, est réduite. Ce fait montre qu'en présence d'oxygène le sélénium élémentaire se ré-oxyde en sélénite. Le sélénium élémentaire formé est ensuite excrété par les cellules. La concentration en sélénite est déterminée par spectrophotométrie, en mesurant à 377 nm la concentration en sélénium-2,3-diaminonaphtalène obtenu par une réaction de dérivation. La présence de sélénium élémentaire est vérifiée en utilisant la microscopie électronique avec analyse à rayons X à dispersion d'énergie (EDX).

Ces faits nous montrent que la réduction de sélénite en Se^0 par différentes bactéries donne lieu à la formation de particules de sélénium élémentaire intra- et/ou extra- cellulaire.

b) Réduction des ions séléniate en Se^0

Fujita et al. [20] ont mis en évidence pour la première fois en 1997 la capacité d'une bactérie Gram positive, *Bacillus sp. SF 1*, à réduire les ions séléniate successivement en Se^{IV} puis Se^0 . Avant cette étude, seule la capacité des bactéries Gram négative pour la réduction de Se^{VI} en Se^0 était connue. *Bacillus sp. SF 1* avait précédemment été isolée par *Garbisu et al.* [14] mais seule la réduction de Se^{IV} en Se^0 avait été étudiée. *Fujita et al.* ont montré que pour la réduction des ions sélénates, la bactérie utilise le lactate comme donneur d'électrons dans le métabolisme énergétique et, en présence d'ions nitrate la réduction ne peut avoir lieu, les ions nitrate jouant le rôle d'accepteur final d'électrons à la place des ions séléniate. Le sélénium élémentaire formé est intra- et extra- cellulaire, et a été détecté par microscopie électronique à balayage (SEM).

Zhang et al. [21] ont montré que la mélasse peut-être utilisée par différents types de bactéries Gram négatives, les ions séléniate jouant le rôle d'accepteur pour former Se^0 , les

ions sélénite étant détectés comme intermédiaires. Dans cet article, les auteurs ont étudié le comportement de cinq bactéries différentes (*Enterobacter taylorae*, *Pantoea sp. SSS2*, *Klebsiella sp. WRS2*, *Citerobacter freundii* et *Shigella sp. DW2*) dans les eaux de drainage de sols, dans l'objectif d'éliminer l'oxyanion toxique séléniatée présent. Les auteurs indiquent l'ordre d'efficacité suivant pour l'élimination du séléniatée par ces bactéries: *Enterobacter taylorae* > *Pantoea sp. SSS2* > *Klebsiella sp. WRS2* > *Citerobacter freundii* > *Shigella sp. DW2*. La concentration en sélénium a été analysée par spectrométrie d'absorption atomique couplée à la génération d'hydrures (HGAAS).

c) Méthylation du sélénium

Reamer et Zoller [22] ont détecté la formation de composés volatils méthylés du sélénium dans des sols ou des boues de stations d'épuration par les microorganismes à partir d'espèces inorganiques du sélénium comme par exemple les ions sélénite ou le sélénium élémentaire. Les espèces volatiles qui ont été analysées et détectées par GC-MS sont le diméthylséléniure (DMSe), diméthyldiséléniure (DMDSé) et le diméthylsélénylsulfure (DMSeS). Le taux de formation de composés volatils est plus élevé lorsque du sélénite est ajouté aux sols ou aux boues d'épuration en comparaison avec l'ajout de sélénium élémentaire ce que les auteurs attribuent à la plus grande disponibilité du sélénite.

Fan et al. [23] ont démontré qu'une culture d'espèces cyanophytes filamenteuses du groupe des bactéries LPP (*Lyngbya*, *Phormidium* et *Plectonema*) est capable de transformer et volatiliser des espèces inorganiques du sélénium en diméthylséléniure (DMSe), diméthyldiséléniure (DMDSé) et diméthylsélénylsulfure (DMSeS) via des intermédiaires tels que la méthylsélénométhionine et le méthylsélénocystéine. Ils ont détecté ces espèces par GC-MS.

Chasteen et al. [24] ont également mis en évidence la formation de ces composés volatils par trois types de microorganismes: *Penicillium citrinum*, *Acremonium falciforme* et *Pseudomonas fluorescens* K27. La détection de ces composés a été faite par chromatographie gazeuse avec détection par chimioluminescence induite.

Chasteen et Bentley [25] ont synthétisé dans un article de revue bibliographique une liste d'algues, bactéries et champignons qui sont capables de transformer le sélénium inorganique en espèces volatiles DMSe, DMDS_e et DMSeS (Tableau 1).

Tableau 1. Biotransformations du sélénium en espèces volatiles [25].

Organismes	Substrat ^a	Produits		
		DMSe	DMDS _e	DMSeS
Algues				
<i>Chorella sp</i>	IV	+	+	+
<i>Cyanophyte-dominated Mat</i>	IV	+	+	+
Bactéries				
<i>Aeromonas sp. VS6</i>	VI	+	+	+
<i>Critobacter freundii KS8</i>	VI	+	+	+
<i>Clostridium sp.</i>	IV	+	+	
<i>Desulfovibrio gigas</i>	IV	+	+	
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	IV	+	+	
<i>Enterobacter cloacae SLS 1a-1</i>	IV	+		
<i>Methanobacterium formicicum</i>	IV	+	+	
<i>Methanosarcina barkeri</i>	IV	+	+	
<i>Pseudomonas aeruginosa VS7</i>	VI	+	+	+
<i>Pseudomonas fluorescens K27</i>	VI	+	+	+
<i>Pseudomonas sp VW1</i>	VI	+	+	+
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	IV, VI, Se ⁰	+	+	+
<i>Rhodocyclus tenuis</i>	IV, VI, Se ⁰	+	+	
<i>Corynebacterium sp.</i>	IV	+	+	
Champignons				
<i>Acremonium falciforme</i>	IV	+	+	
<i>Alternaria alternata</i>	VI	+		
<i>Cephalosporium sp.</i>	IV, VI	+		
<i>Fusarium sp.</i>	IV, VI	+		
<i>Penicillium citrinum</i>	IV	+	+	
<i>Penicillium sp.</i>	IV	+		
<i>Penicillium sp.</i>	IV	+		
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	IV	+		

a : IV = sélénite ; VI = sélénate ; Se⁰ = sélénium élémentaire ; + = détecté

En conséquence, ces mécanismes de détoxification par réduction des espèces inorganiques et biométhylation, attestent que les microorganismes sont une voie importante de transformation de Se dans l'environnement et aussi de bioremédiation dans des zones contaminées.

2.3 Extraction du sélénium élémentaire

Différentes méthodes ont été publiées pour séparer le sélénium élémentaire formé par des cultures de microorganismes, cette méthode de production de Se^0 présentant un fort intérêt du fait de ses applications dans l'industrie électronique en particulier [4,5]. D'autres protocoles ont également été publiés pour des applications à des échantillons naturels.

Un organigramme résumant les différentes méthodes utilisées dans la littérature pour isoler le sélénium élémentaire (BioSe^0) formé par des cultures de microorganismes est présenté dans la Figure 2. Toutes ces méthodes font appel à une première étape de rinçage extracellulaire suivie d'une étape de lyse et d'élimination de la biomasse (a). Cette seconde étape est réalisée par filtrations successives (b) dans la procédure décrite par *Hnain et al.* [26].

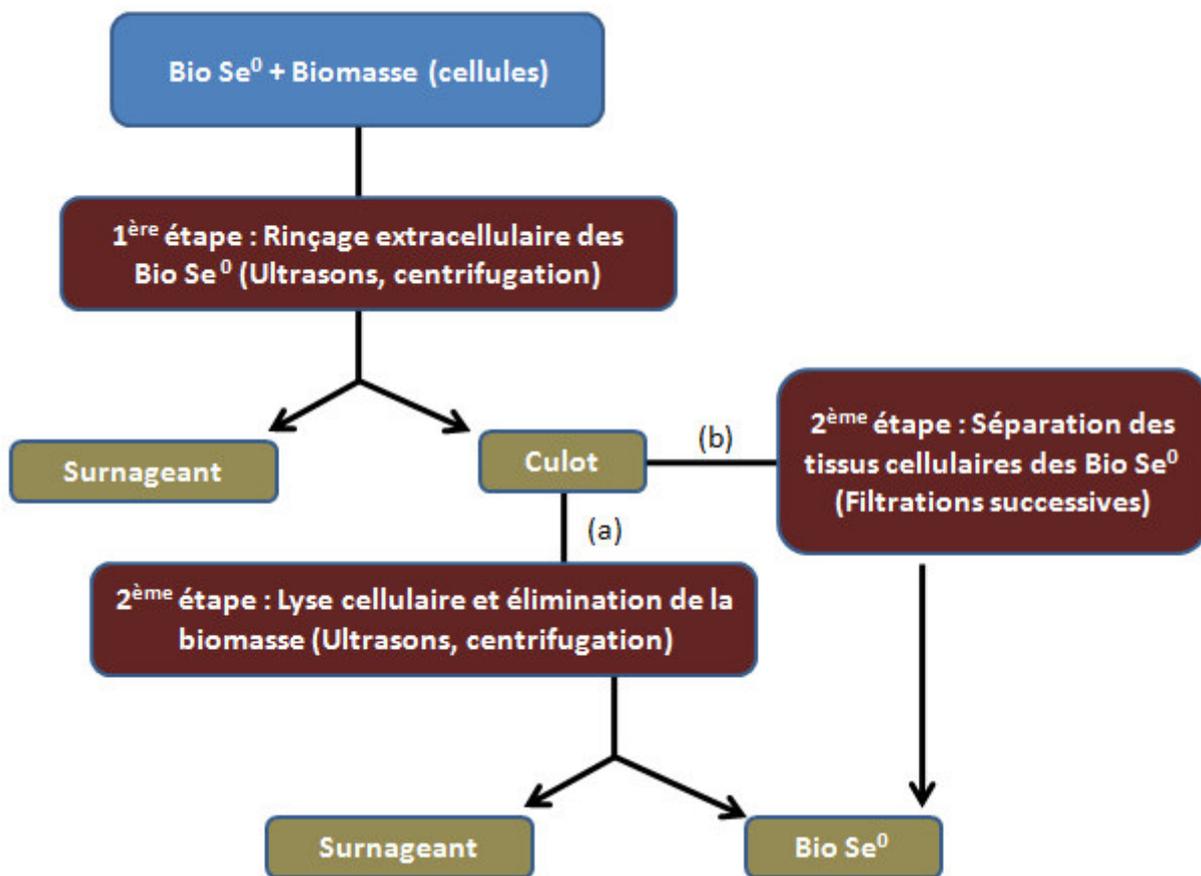


Figure 2. Protocole général des différentes méthodes utilisées pour isoler Se^0 [14,26-32].

La première étape a pour objectif d'éliminer les oxyanions de sélénium présents dans les membranes extracellulaires par échange anionique réalisé par rinçages avec des solutions de

NaCl [27,14], de tampon phosphate [28]; de l'eau déionisé [26], ou avec le tensioactif SDS permettant la solubilisation des lipides membranaires [29]. Cette étape de rinçage est généralement assistée par sonication, le surnageant étant ensuite séparé par centrifugation.

La deuxième étape a pour but de libérer le Se⁰ intracellulaire par hydrolyse acide avec HCl [30,31], basique avec Na₂S ou NaOH [27,29] ou enzymatique avec le lysozyme de blanc d'œuf [14] qui lyse les cellules bactériennes en catalysant l'hydrolyse des liaisons β 1,4 entre les résidus d'acide N-acétylmuramique et N-acétyl-D-glucosamine des peptidoglycanes.

Le culot restant après ces deux étapes est sensé contenir uniquement du sélénium élémentaire, les autres formes séléniées ayant été solubilisées.

2.4 Méthodes d'analyse du sélénium

La détermination des espèces du sélénium présentes dans différentes matrices peut se faire par différentes techniques telles que la spectrophotométrie UV-Visible (L.D. : 10-100 µg L⁻¹), des techniques spectrofluorimétriques, la spectroscopie de fluorescence atomique (AFS) (L.D. : 0,1 µg L⁻¹), la spectroscopie d'absorption atomique de flamme (FAAS) (L.D. : 0,1 µg L⁻¹), l'électrochimie, la spectrométrie d'émission atomique à plasma induit (ICP-AES) ou la spectrométrie de masse à plasma induit (ICP-MS) (L.D. : 0,01 µg L⁻¹) [32]. Toutes ces techniques nécessitent que l'échantillon soit introduit sous forme liquide.

Pendant ce stage, la technique utilisée pour l'analyse du sélénium a été la spectrométrie de masse à plasma induit (ICP-MS) du fait de sa sélectivité, sa sensibilité et sa capacité multi-isotopique. Pour toutes ces raisons, l'ICP-MS est actuellement la technique la plus performante pour analyser le sélénium à l'état de traces dans l'environnement.

2.4.1 Principe de la spectrométrie de masse à plasma induit (ICP-MS)

La spectrométrie de masse est une technique qui offre une haute sensibilité et donc des limites de détection basses de l'ordre de la dizaine de ng L⁻¹ pour l'analyse du sélénium. Cette technique est basée sur la séparation des ions dans un analyseur de masses en fonction de leur rapport m/z et permet donc de quantifier les différents isotopes d'un même élément. Ces ions sont formés dans une source d'ionisation et détectés dans un détecteur de masse qui est un analyseur destructif. Le schéma de l'appareil ICP-MS Agilent 7500ce

équipé d'une cellule de réaction/collision, utilisé dans ce travail, est représenté dans la Figure 3.

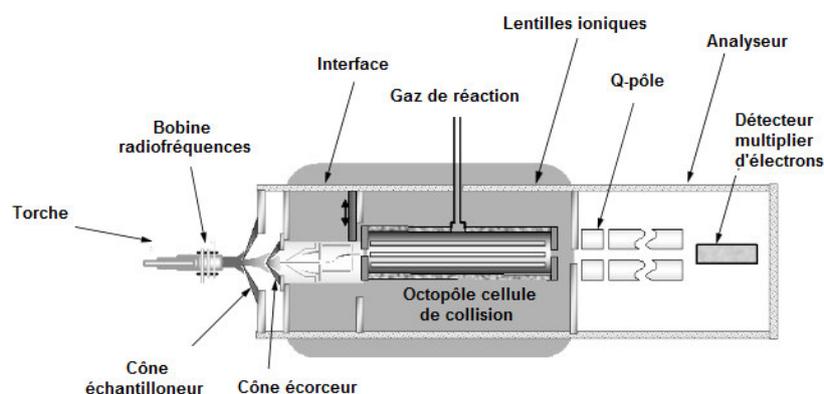


Figure 3. Schéma d'un appareil ICP-MS 7500ce Agilent [33].

L'analyse d'un échantillon liquide par spectrométrie de masse à plasma induit suit quatre étapes: l'introduction et la nébulisation de l'échantillon en formant un aérosol, l'ionisation des espèces présentes dans l'échantillon, la séparation des ions selon leur rapport m/z dans l'analyseur de masse et la détection.

Premièrement, une pompe péristaltique amène l'échantillon liquide jusqu'au nébuliseur où un flux d'argon transforme l'échantillon en un aérosol, transporté vers le plasma. Dans le cas de l'ICP-MS, le plasma est formé à partir du gaz argon. L'argon traverse une torche en quartz formée par trois tubes concentriques qui sont entourés par une bobine de radiofréquences, produisant un champ magnétique qui permet de trouver un mélange d'ions d'argon, atomes d'argon excités et électrons à une température entre 5000-10000 K. Lorsque l'aérosol arrive au centre du plasma, les composés de l'échantillon sont désolvatés, vaporisés et atomisés avant d'être ionisés. Les ions formés, à pression atmosphérique dans le plasma, doivent arriver à l'analyseur de masses où la pression est de 10^{-6} mbar. Le changement de pression se fait par une interface d'extraction d'ions composée de deux cônes (Ni ou Pt), appelés cône échantillonneur au-delà duquel la pression est de 10 mbar, et cône écorceur au-delà duquel la pression est de 10^{-3} mbar. Les ions sont ensuite séparés selon leur rapport m/z dans l'analyseur de masses. Le filtre de masse quadripolaire consiste en quatre électrodes parallèles reliées électriquement par paires opposées. En fonction du potentiel appliqué entre les électrodes, seulement la trajectoire des ions avec un rapport m/z déterminé sera stable et seulement ces ions arriveront au détecteur tandis que les autres ions avec une

valeur de m/z différente seront rejetés. En changeant les valeurs de potentiel appliqué, l'ensemble des ions à analyser de rapports m/z différents est mesuré séquentiellement en quelques millisecondes. Finalement les ions séparés en fonction de leur rapport m/z arrivent au détecteur générant un signal mesurable qui est lié à la concentration des éléments qui forment l'échantillon.

L'inconvénient principal lors de la mesure de Se par ICP-MS est lié aux interférences spectrales aux rapports m/z des isotopes de Se. L'utilisation d'une cellule de collision/réaction permet d'éliminer différentes interférences polyatomiques (Tableau 2, [34]).

Tableau 2. Interférences spectrales pour la détection du sélénium par ICP-MS [34].

Isotopes	Abondances	Interférences spectrales
^{74}Se	0,89 %	$^{37}\text{Cl}_2$, $^{40}\text{Ar}^{34}\text{S}^+$
^{76}Se	9,36 %	$^{36}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$, $^{38}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+$, $^{40}\text{Ar}^{36}\text{S}^+$, $^{31}\text{P}_2^{14}\text{N}$
^{77}Se	7,63 %	$^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$, $^{40}\text{Ar}^{36}\text{Ar}^1\text{H}^+$
^{78}Se	23,78 %	$^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$, $^{31}\text{P}_2^{16}\text{O}^+$
^{80}Se	49,61 %	$^{40}\text{Ar}_2$
^{82}Se	8,73 %	$^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}_2$, $^{34}\text{S}^{16}\text{O}^{3+}$, $^{82}\text{Kr}^+$, $^{40}\text{Ar}_2\text{H}^{2+}$, $^1\text{H}^{81}\text{Br}^+$

Les gaz généralement utilisés dans le cas de Se sont le dihydrogène ou l'hélium, seuls ou en mélange, le choix du gaz pressurant la cellule de collision/réaction étant fonction du type de technologie utilisée et donc du constructeur. L'utilisation d'hydrogène conduit à la formation de nouvelles interférences polyatomiques (par exemple SeH^+ , BrH^+) qu'il est possible de corriger mathématiquement.

2.4.2 Traçage isotopique et dilution isotopique inverse

Le traçage isotopique est un outil analytique qui permet de suivre le comportement d'un élément dans l'environnement ou lors de l'optimisation d'un protocole de préparation d'échantillon. Le traceur, est un composé enrichi avec un des isotopes de l'élément de manière à obtenir une empreinte isotopique différente de l'abondance naturelle. Le suivi

des espèces naturellement présentes et du traceur isotopique est réalisé en parallèle grâce à la capacité multi-isotopique de l'ICP-MS.

L'utilisation de traceurs enrichis en isotopes stables permet d'ajouter le traceur à des niveaux de concentrations proches des niveaux naturels, permettant de reproduire les conditions réelles. Du fait de leur non dangerosité pour l'environnement, les isotopes stables, à la différence des radio-isotopes, peuvent être utilisés dans tout type d'expérimentation au laboratoire.

La dilution isotopique (IDMS) consiste à faire varier volontairement la composition isotopique d'un élément présent dans un échantillon par ajout d'une quantité connue d'un isotope enrichi de cet élément (spike, Figure 4) et, à mesurer les rapports isotopiques dans l'échantillon avant et après ajout, de l'isotope enrichi pour quantifier l'élément dans l'échantillon.

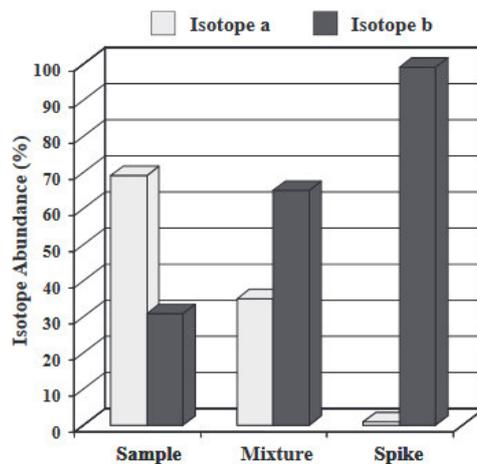


Figure 4. Variation des abondances isotopiques de l'échantillon, du spike et du mélange pendant l'utilisation de la dilution isotopique [35].

Dans le cas du traçage isotopique, la composition isotopique du sélénium dans l'échantillon a été modifiée du fait du dopage avec un traceur isotopiquement enrichi. La quantification du sélénium (de composition isotopique modifiée) dans l'échantillon est alors obtenue par dilution isotopique inverse (RID) en mesurant les rapports isotopiques du sélénium avant et après ajout d'un étalon de sélénium de composition isotopique naturelle. La concentration totale en sélénium dans l'échantillon se calcule selon l'Équation 1 :

$$[\text{Se}]_s = [\text{Se}]_{sp} \frac{m_{sp} \cdot M_s \cdot (R_m \cdot {}^{77}\text{A}_{sp} - {}^{78}\text{A}_{sp})}{m_s \cdot M_{sp} \cdot ({}^{78}\text{A}_s - R_m \cdot {}^{77}\text{A}_s)} \quad (\text{Éq. 1})$$

$[\text{Se}]_s$ et $[\text{Se}]_{sp}$: Concentrations en sélénium dans l'échantillon et dans l'étalon ajouté

m_s et m_{sp} : Masses de l'échantillon et de l'ajout

M_s et M_{sp} : Masses atomiques de Se dans l'échantillon et dans l'ajout ($M_{sp} = 78,96$)

R_m : Rapport ${}^{78}\text{Se} / {}^{77}\text{Se}$ mesuré après ajout

${}^{78,77}\text{A}_{sp}$: Abondances des isotopes 78 et 77 dans l'étalon utilisé pour l'ajout (${}^{78}\text{A}_{sp} = 23,78\%$ et ${}^{77}\text{A}_{sp} = 7,63\%$)

${}^{78,77}\text{A}_s$: Abondances des isotopes 78 et 77 dans l'échantillon avant l'ajout

Une fois que la concentration totale de sélénium dans l'échantillon a été calculée, les concentrations individuelles de sélénium naturel ($\text{Se}_{\text{naturel}}$) et isotopiquement enrichis ($\text{Se}_{\text{traceur}}$) peuvent être calculées à partir des Équations 2 et 3.

$$[\text{Se}]_{\text{naturel}} = \frac{[\text{Se}]_s \cdot {}^{78}\text{A}_s}{{}^{78}\text{A}_{sp}} \quad (\text{Éq. 2})$$

$$[\text{Se}]_{\text{traceur}} = \frac{[\text{Se}]_s \cdot {}^{78}\text{A}_s - \left[\left(\frac{{}^{78}\text{A}_{sp}}{{}^{77}\text{A}_{sp}} \right) \cdot [\text{Se}]_s \cdot {}^{77}\text{A}_s \right]}{\left(\frac{{}^{78}\text{A}_{\text{traceur}}}{{}^{77}\text{A}_{\text{traceur}}} \right) - \left(\frac{{}^{78}\text{A}_{sp}}{{}^{77}\text{A}_{sp}} \right)} \quad (\text{Éq. 3})$$

Avec :

$[\text{Se}]_{\text{naturel}}$: Concentration en Se naturel dans l'échantillon

$[\text{Se}]_{\text{traceur}}$: Concentration du traceur ${}^{77}\text{Se}$ dans l'échantillon

${}^{78,77}\text{A}_{\text{traceur}}$: Abondances des isotopes 78 et 77 dans le traceur isotopiquement enrichi (${}^{78}\text{A}_{sp} = 0,1\%$ et ${}^{77}\text{A}_{sp} = 99,9\%$)

Pour minimiser la propagation d'erreur lors de l'analyse par dilution isotopique inverse, la quantité d'étalon de Se naturel à ajouter est calculée pour obtenir un rapport isotopique modifié optimal après ajout (Équation 4).

$$R_{optimal} = (R_{sp} \times R_s)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{Éq. 4})$$

Avec :

R_{sp} : Rapport $^{78}\text{Se} / ^{77}\text{Se}$ de l'étalon du sélénium naturel utilisé pour l'ajout ($R_{sp} = 3,12$)

R_s : Rapport $^{78}\text{Se} / ^{77}\text{Se}$ de l'échantillon avant ajout

Les intensités mesurées sont corrigées mathématiquement de la formation des ions SeH^+ et BrH^+ [36]. Pour mener à bien cette correction, des solutions étalons de sélénium et de brome ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) ont été analysées de manière régulière (tous les trois échantillons). Les facteurs d'hydruration sont calculés à l'aide des Équations 5 et 6.

$$f_{Se} = {}^{83}\text{I} / {}^{82}\text{I} \quad (\text{Éq. 5})$$

$$f_{Br} = {}^{82}\text{I} / {}^{81}\text{I} \quad (\text{Éq. 6})$$

Les signaux peuvent être corrigés en utilisant les Équations 7-12 et les facteurs d'hydruration f_{Se} et f_{Br} déjà calculés.

$${}^{77}\text{Se} = {}^{77}\text{I} - f_{Se}({}^{76}\text{Se}) \quad (\text{Éq. 7})$$

$${}^{78}\text{Se} = {}^{78}\text{I} - f_{Se}({}^{77}\text{Se}) \quad (\text{Éq. 8})$$

$${}^{79}\text{Br} = {}^{79}\text{I} - f_{Se}({}^{78}\text{Se}) \quad (\text{Éq. 9})$$

$${}^{80}\text{Se} = {}^{80}\text{I} - f_{Br}({}^{79}\text{Br}) \quad (\text{Éq. 10})$$

$${}^{81}\text{Br} = {}^{81}\text{I} - f_{Se}({}^{80}\text{Se}) \quad (\text{Éq. 11})$$

$${}^{82}\text{Se} = {}^{82}\text{I} - f_{Br}({}^{81}\text{Br}) \quad (\text{Éq. 12})$$

Avec :

${}^X\text{I}$: Intensité du signal au rapport m/z X

${}^Y\text{Se}$: Intensité du signal de l'isotope Y de Se

${}^Z\text{Br}$: Intensité du signal de l'isotope Z de Br

Il est important aussi de faire la correction du biais de masse dû à des efficacités différentes de transmission, extraction et détection des isotopes en fonction de leur masse. Cette correction est faite en utilisant un modèle exponentiel [37] (Équation 13).

$$R_{corr} = R_{exp} e^{-(K\Delta M)} \quad (\text{Éq. 13})$$

Avec :

K : biais de masse obtenu par la pente de la régression linéaire entre l'erreur relative $\ln(R_{\text{mesuré}}/R_{\text{théorique}})$ et la différence de masse (ΔM) entre l'isotope de référence pour le calcul des rapports R (ici m/z 80) et les autres isotopes (m/z 76, 77, 78, 82).

3. Objectifs et démarche

L'objectif de ce travail est d'optimiser une méthode de préparation d'échantillon biologique, permettant de séparer le Se^0 des autres formes de Se pour application à des culots bactériens (*Desulfovibrio sp*) cultivés en milieu enrichi en sélénite précédemment obtenus au laboratoire (Projet ANR ArticMetals) (Figure 5). La détermination du sélénium élémentaire dans ces échantillons permettra de compléter le bilan de la composition (nombres d'oxydation, isotopique) du sélénium dans ces cultures. Dans ce but nous avons utilisé deux modèles de matrices biologiques différentes. Pour suivre l'influence des étapes de préparation testées nous avons utilisé la méthode du traçage isotopique en dopant ces matrices avec $^{77}\text{Se}^0$.

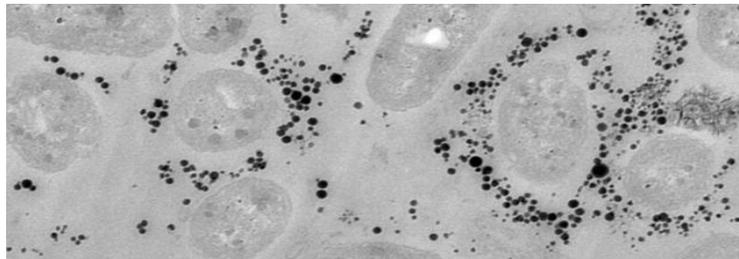


Figure 5. Particules du sélénium élémentaire formées par réduction du sélénite dans les cellules des microorganismes [38].

Les échantillons utilisés comme modèles dans ce travail sont:

- Une levure enrichie en sélénium ($2919 \pm 85 \text{ mg Se kg}^{-1}$).
- Une spiruline commerciale ($200 \pm 8 \text{ } \mu\text{g Se kg}^{-1}$).

D'une part, la levure (*Saccharomyces Cerevisae*) est un organisme unicellulaire eucaryote qui a une membrane nucléaire entourant le matériel génétique et une membrane plasmique et une paroi cellulaire constituée de polysaccharides de glucanes et mannanes [39] qui protègent les organites. D'autre part, la spiruline est une cyanobactérie filamenteuse Gram-négative du genre *Arthrospira*, qui est procaryote et par conséquent a son matériel génétique libre dans le cytoplasme [11]. Elle se caractérise aussi par une paroi cellulaire formée de trois couches: la membrane cytoplasmique, sur laquelle repose une fine couche de peptidoglycanes, entourée par une membrane externe.

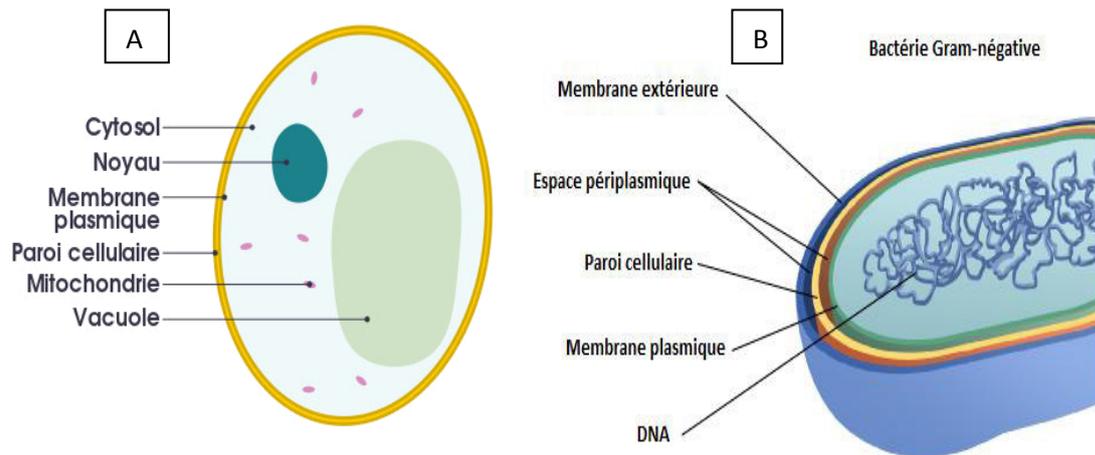


Figure 6. A : structure d'une cellule de levure. B : structure d'une bactérie Gram-négative.

Ces deux microorganismes présentent donc à la fois des teneurs en sélénium naturel variées et des compositions de parois cellulaires différentes dont les comportements peuvent être différents lors des étapes de traitement mises en œuvre pour isoler le sélénium élémentaire.

4. Matériels et méthodes

4.1 Matériels et réactifs

Le matériel utilisé dans le laboratoire a été le suivant :

- ICP-MS 7500ce Agilent (Tokyo, Japon).
- Balance analytique de précision Mettler Toledo (Courtaboeuf, France).
- Bain d'Ultrasons Transsonic Digital D Elma (Singen, Allemagne).
- Micropipettes Thermo Scientific (Courtaboeuf, France).
- DigiPREP MS – SCP Science (Courtaboeuf, France).
- Centrifugeuse Eppendorf 5415 R (Montesson, France).
- Lyophilisateur LP3 de Jouan (France).
- Vortex de Fisher Scientific (Illkirch, France).
- Agitateur/Incubateur de Grant (France).
- Broyeur à billes de Retsch.
- Agitateur rotatif de Stuart (Villepinte, France).
- Matériel d'usage général dans un laboratoire.

Les réactifs utilisés dans ce travail ont été les suivants :

a) Échantillons:

- Spiruline commerciale de Flamant Vert (Bourges, France).
- Levure enrichie en sélénium (non commerciale).

b) Étalons Se:

- Solution étalon de sélénium naturel à 1000 mg L⁻¹ de PlasmaCAL Standard, SPC Science (Quebec, Canada).
- Se élémentaire enrichi en ⁷⁷Se de Isoflex (Moscou, Russie).

c) Enzymes:

- Lysozyme de blanc d'œuf d'Affymetrix (Cleveland, USA).
- Trypsine de pancréas bovin de Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne).
- Protéase type XIV de Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne).

d) Réactifs chimiques:

I. Acides:

- HNO₃ 69% Intra-Analyzed reagent de J. T. Baker (Center Valley, PA, USA).
- HCl 36,5-38 % Intra-Analyzed reagent de J. T. Baker (Center Valley, PA, USA).

II. Bases:

- Solution d'hydroxyde de tétraméthylammonium (TMAH) 25% de Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne).
- NaOH·H₂O Suprapur de Merck (Darmstadt, Allemagne).

III. Sels:

- NaCl pureté > 99,0 % de Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne).
- Acétate d'ammonium pureté > 98,0 % de Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne).
- SDS ultrapur de Panreac (Barcelone, Espagne).

IV. Autres:

- H₂O qualité Milli-Q (18,2 MΩ, Millipore S.A. St. Quentin-en-Yvelines, France).
- Peroxyde d'hydrogène 30 % reagent grade de Scharlab (Barcelone, Espagne).

4.2 Méthodes

Les méthodes choisies pour isoler le sélénium élémentaire sont basées sur celles décrites dans les travaux de Biswas *et al.* [27], Torres *et al.* [29] et Oremland *et al.* [14] (cf. Bibliographie, 2.3).

4.2.1 Protocole analytique pour l'extraction du sélénium élémentaire

Dans un échantillon de culture bactérienne enrichie en sélénium, différentes espèces peuvent co-exister et en particulier, des ions sélénite (SeO_4^{2-}) utilisés dans le milieu de culture. La première étape doit donc permettre d'éliminer ces espèces ioniques de la membrane extracellulaire voire altérer la membrane externe. D'après Biswas *et al.* [27] et Torres *et al.* [29] des solutions de NaCl 1M et SDS 0,1 % ont été utilisées pour cette première étape.

Le sélénium élémentaire formé par les bactéries pouvant être intra- et/ou extra- cellulaire [14, 18-21], une lyse de la paroi et de la membrane plasmique est nécessaire pour libérer les particules du sélénium élémentaire se trouvant à l'intérieur de la cellule et libérer les autres formes de sélénium associées à ces tissus. Pour faire cette rupture cellulaire nous avons testé différents réactifs sur la base des travaux de *Torres et al.* [29], *Domokos-Szabolcsy et al.* [31] et *Oremland et al.* [14]. Des hydrolyses chimiques et enzymatiques ont été testées en utilisant les réactifs suivants:

- Chimique : NaOH 1M, HCl 1M et hydroxyde de tétraméthylammonium 10 %.
- Enzymatique : Lysozyme, protéase type XIV et trypsine. [Enzyme] = 10 mg mL⁻¹.

Pour suivre l'influence de ces traitements, le protocole schématisé dans la Figure 7 a été appliqué aux échantillons (trois répétitions/échantillon).

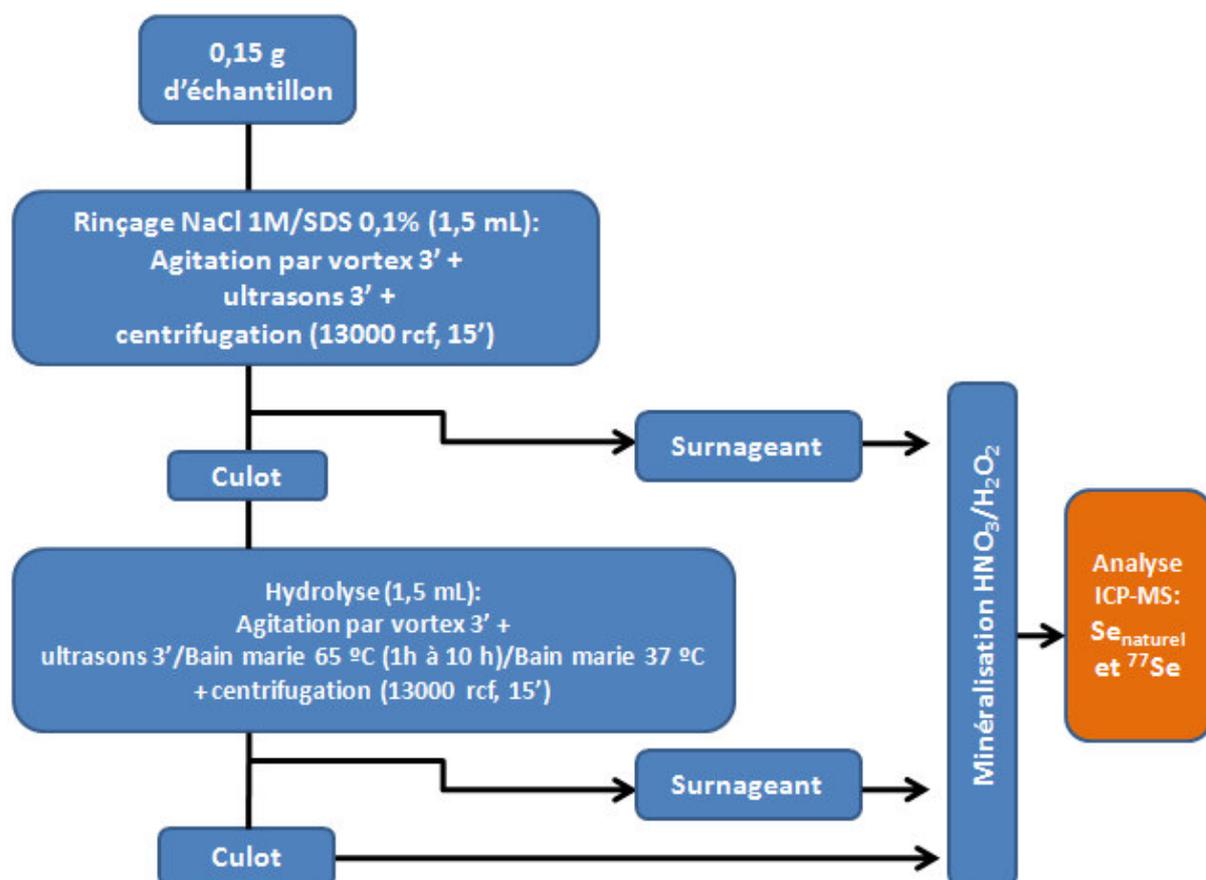


Figure 7. Protocole de préparation des échantillons.

L'échantillon est mis en solution avec 1,5 mL de solution de rinçage. Le mélange subit une agitation vortex puis un bain d'ultrasons (3', puissance 120 %) et une centrifugation (15',

13000 rcf). Le culot obtenu après centrifugation est ensuite soumis à l'étape d'hydrolyse. Les hydrolyses enzymatiques ont été réalisées à 37°C pendant 18h (avec un tampon 20 mM d'acétate d'ammonium). Les hydrolyses chimiques ont été réalisées soit au bain ultrasons à température ambiante soit au bain-marie à 65 °C. Les surnageants issus de ces étapes ainsi que le culot final sont digérés avec HNO₃/H₂O₂ (2:1) en utilisant le DigiPREP MS – SCP Science à une température de 90 °C pendant 3h. Les échantillons sont ensuite dilués jusqu'à un volume final de 50 mL et filtrés (0,45 µm, membrane acétate de cellulose) avant d'être analysés par ICP-MS

4.2.2 Préparation des échantillons de spiruline et levure dopées avec ⁷⁷Se⁰

Le traceur ⁷⁷Se⁰ a été ajouté aux échantillons à une concentration de l'ordre du tiers de celle de Se naturellement présent. Le contrôle de la concentration de dopage a été obtenu par dilution isotopique inverse.

Dans un premier temps, une suspension de ⁷⁷Se⁰ est préparée (6,931 mg de ⁷⁷Se⁰ dans 35 mL d'eau Milli-Q) et homogénéisée par sonication (2 min). Cette solution de concentration théorique proche de 200 mg ⁷⁷Se⁰ L⁻¹ est utilisée directement pour le dopage de la levure et après dilution jusqu'à une concentration proche de 20 µg ⁷⁷Se⁰ L⁻¹ pour le dopage de la spiruline.

Le dopage est réalisé dans des flacons en polypropylène, l'échantillon (préalablement broyé) et la solution contenant le traceur étant apportés dans un rapport 6/35 (g/mL). Le mélange a été homogénéisé pendant 22h par agitation mécanique par retournement, congelé puis lyophilisé.

4.2.3 Quantification du sélénium

L'analyse du sélénium, est réalisée avec l'appareil ICP-MS Agilent 7500ce (Figure 3) [33] équipé d'une cellule de réaction/collision. Les paramètres de fonctionnement sont résumés dans le Tableau 3 (*Tolu et al.* [40]).

Tableau 3. Paramètres utilisés avec l'ICP-MS Agilent 7500ce [40].

Introduction d'échantillon	
Type de nébuliseur	Nébuliseur Concentrique
Chambre de pulvérisation	Scott double pass chamber cooled to 2°C
Paramètres du plasma	
Puissance RF	1500 W
Débit d'Ar gaz plasma	15 L min ⁻¹
Débit d'Ar gaz auxiliaire	1,5 L min ⁻¹
Débit de gaz de nébulisation	0,15 L min ⁻¹
Cône échantillonneur et cône écorceur	Nickel
Lentilles ioniques	Optimisé tous les jours pour une meilleure sensibilité
Paramètres de la cellule de collision/réaction	
Débit d'H ₂	3,8 mL min ⁻¹
Débit d'He	1,0 mL min ⁻¹
Octopôle biais	-18,0 V
Quadripôle biais	-16,0 V
Paramètres d'acquisition de données	
Isotopes suivis	76, 77, 78, 79, 80, 81, 82 et 83
Temps d'acquisition par point (analyse totale)	1 s (3 s/isotope)

Les quantifications du sélénium naturel et du traceur $^{77}\text{Se}^0$ ont été obtenues par dilution isotopique inverse (RID) (c.f Bibliographie, 2.4.2) lorsque les rapports isotopiques mesurés dans les échantillons étaient suffisamment éloignés des rapports naturels (> 10-15 % de différence). Dans les autres cas, les concentrations ont été calculées par étalonnage externe.

Les droites d'étalonnage sont construites à partir des intensités corrigées (Éq 7-12) des solutions étalons de sélénium naturel dans la gamme 0,5-10 $\mu\text{g Se L}^{-1}$. La concentration du sélénium naturel est obtenue à l'aide des pentes des droites d'étalonnage des isotopes 78 et 80 en fonction de la concentration totale en sélénium (Équation 14).

$$[\text{Se}]_{\text{naturel}} = \frac{{}^{78,80}\text{Se}}{{}^{78,80}\text{Pente}} \quad (\text{Éq. 14})$$

Avec :

$[Se]_{naturel}$: Concentration en sélénium naturel dans l'échantillon

$^{78,80}Se$: Intensité des signaux des isotopes 78 ou 80 (Éq 8 et 10)

$^{78,80}Pente$: Pentes des droites d'étalonnages des intensités des isotopes ^{78}Se ou ^{80}Se en fonction de la concentration totale en sélénium ($^{78,80}Se = f([Se])$).

La concentration du traceur ^{77}Se dans l'échantillon est ensuite calculée à partir de la concentration totale en ^{77}Se (Équation 15) corrigée de la participation de la teneur en sélénium naturel en ^{77}Se (Équation 16).

$$[^{77}Se]_s = \frac{^{77}Se}{^{77}Pente^*} \quad (\text{Éq. 15})$$

Avec :

$[^{77}Se]_s$: Concentration totale en ^{77}Se dans l'échantillon

^{77}Se : Intensité du signal de l'isotope 77 (Éq 7)

$^{77}Pente^*$: Pente de la droite d'étalonnage des intensités de l'isotope 77 en fonction de la concentration en ^{77}Se dans les solutions étalons ($^{77}Se = f[^{77}Se]$ concentration calculée avec l'abondance isotopique expérimentale (pas de correction du biais de masse)).

$$[Se]_{traceur} = [^{77}Se]_s - [Se]_{naturel} \cdot ^{77}A_{exp} \quad (\text{Éq. 16})$$

Avec :

$[Se]_{traceur}$: Concentration du traceur ^{77}Se dans l'échantillon

$[Se]_{naturel}$: Concentration en Se naturel dans l'échantillon

$^{77}A_{exp}$: Abondance expérimentale de l'isotope 77

Les incertitudes analytiques sont calculées en tenant compte des incertitudes sur les facteurs de corrections (f_{Se} ; f_{Br} et biais de masse) et les formules mathématiques de la dilution isotopique selon la loi de propagations des erreurs [41] (détaillé en Annexe 1). Ces incertitudes analytiques sont ensuite combinées aux incertitudes associées à la variabilité entre réplicats.

5. Résultats et discussions

Dans cette partie les résultats seront exprimés en quantité de sélénium naturel ou $^{77}\text{Se}^0$ présentes dans les différents surnageants et culots (ng pour la spiruline ou μg pour la levure) et en pourcentage par rapport à leurs quantités totales dans les échantillons dopés.

5.1 Concentration du traceur dans les échantillons dopés

Les concentrations en Se naturel et $^{77}\text{Se}^0$ dans la spiruline et la levure dopées ont été quantifiées par RID après digestion avec le système DigiPREP (0,4 g d'échantillon, cf. protocole digestion 4.2.1). Les valeurs obtenues sont présentés dans le Tableau 4, les incertitudes obtenues entre les réplicats de digestion ($\leq 6\%$) indiquent un dopage homogène des échantillons.

Tableau 4. Concentrations en Se naturel et $^{77}\text{Se}^0$ dans les échantillons dopés.

	$[\text{Se}_{\text{nat.}}] \text{ ng g}^{-1} \pm \text{ng g}^{-1}$	$[^{77}\text{Se}] \text{ ng g}^{-1} \pm \text{ng g}^{-1}$
Spiruline	200 \pm 8	66 \pm 4
	$[\text{Se}_{\text{nat.}}] \mu\text{g g}^{-1} \pm \mu\text{g g}^{-1}$	$[^{77}\text{Se}] \mu\text{g g}^{-1} \pm \mu\text{g g}^{-1}$
Levure	2919 \pm 85	1066 \pm 13

5.2 Sélection de la solution de rinçage (étape 1)

Les essais sur les solutions de rinçage sélectionnées d'après la revue bibliographique (NaCl 1M et SDS 0,1 %, cf 4.2.1) ont été réalisés en triplicats.

Dans un premier temps, trois rinçages successifs avec chacune des solutions ont été appliqués aux échantillons (0,3 g de spiruline et 0,4 g de levure). Les valeurs moyennes obtenues sont rassemblées dans le Tableau 5. Pour la spiruline les résultats indiquent que l'utilisation de NaCl 1 M donne lieu à une récupération du $^{77}\text{Se}^0$ dans le surnageant plus haute ($7 \pm 2 \%$) en comparaison avec l'utilisation du SDS 0,1 % ($4 \pm 2 \%$).

Pour la levure l'utilisation de NaCl 1 M ($0,07 \pm 0,06 \%$) ou SDS 0,1 % ($0,16 \pm 0,13 \%$) donne lieu à des résultats similaires pour la récupération du $^{77}\text{Se}^0$ dans les surnageants.

Tableau 5. Quantité de sélénium récupéré dans les surnageants NaCl 1M et SDS 0,1 % (somme des rinçages successifs).

	Masses initiales		Masses et pourcentages dans les surnageants	
Surnageants NaCl				
	Se _{naturel}	⁷⁷ Se	Se _{naturel}	⁷⁷ Se
Spiruline (ng Se)	50 ± 2	17 ± 1	22 ± 7	1,2 ± 0,4
			44 ± 14 %	7 ± 2 %
Levure (µg Se)	874 ± 25	319 ± 4	128 ± 4	0,2 ± 0,2
			14,7 ± 0,6 %	0,07 ± 0,06 %
Surnageants SDS				
	Se _{naturel}	⁷⁷ Se	Se _{naturel}	⁷⁷ Se
Spiruline (ng Se)	53 ± 3	18 ± 1	16 ± 5	0,6 ± 0,3
			30 ± 10 %	4 ± 2 %
Levure (µg Se)	884 ± 32	323 ± 8	117 ± 7	0,5 ± 0,4
			13,3 ± 0,7 %	0,16 ± 0,13 %

D'après ces résultats, le SDS 0,1 % est choisi comme solution de rinçage car il entraîne moins de pertes de ⁷⁷Se⁰ en comparaison avec NaCl 1 M. De plus, l'utilisation de la solution de NaCl 1 M entraîne des signaux d'intensité plus élevée dans les blancs en comparaison avec le SDS, ce qui dégrade la détection et la quantification du sélénium.

L'utilisation de trois rinçages successifs avec SDS 0,1 % permet de solubiliser de 13 % (levure) à 30 % (spiruline) de sélénium naturel. La plus grande part du sélénium naturel étant éliminée lors du premier rinçage (62 % pour la spiruline et 74 % pour la levure), un seul rinçage avec la solution de SDS 0,1 % est retenu pour la suite afin d'éviter des manipulations supplémentaires d'échantillons et d'éventuelles pertes ou contaminations.

Par ailleurs, la prise d'essai d'échantillon utilisée pour ces premiers essais (0,3 g - 0,4 g) a rendu difficile la mise en suspension dans la solution de rinçage. Pour vérifier si la mise en contact de l'échantillon avec la solution a été efficace nous avons répété la procédure (un

seul rinçage avec 1,5 mL de solution de SDS 0,1 %, 3 min bain ultrasons) avec une prise d'essai de 0,15 g d'échantillon. Les pourcentages de solubilisation du sélénium naturel sont alors de $20 \pm 5\%$ et $11 \pm 2\%$ pour la spiruline et la levure respectivement. Pour le traceur, les pourcentages sont de $5 \pm 2\%$ et $0,23 \pm 0,21\%$. Ces valeurs sont donc tout à fait comparables avec celles précédemment obtenues.

5.3 Hydrolyse de l'échantillon (étape 2)

L'efficacité de différents réactifs (chimiques ou enzymatiques) pour l'hydrolyse des échantillons de levure et de spiruline a été évaluée dans un premier temps en se basant sur la perte en masse de l'échantillon (Tableau 6).

Tableau 6. Perte en masse des échantillons en fonction des conditions d'hydrolyse.

	Solution	Conditions			% échantillon restant
		T ^a (°C)	Temps	Autres	
	NaOH 1M	22	3'	Bain Ultrasons	92 %
	NaOH 1M	65	1h	DigiPrep-Bain marie	50 %
	NaOH 1M	65	2*1h	DigiPrep-Bain marie	44 %
	NaOH 1M	65	10h	DigiPrep-Bain marie	41 %
Hydrolyse chimique					
	TMAH 10 %	22	20'	Bain Ultrasons	87 %
	TMAH 10 %	65	1h	DigiPrep-Bain marie	61 %
	TMAH 10 %	65	2h	DigiPrep-Bain marie	59 %
	HCl 1M	22	13h		117 %
	Trypsine	37	18h	Bain marie agité	84 %
Hydrolyse enzymatique					
	Protease type XIV	37	12h	Bain marie agité	65 %
	Lysozyme	37	20 h	Bain marie agité	101 %

Les pertes en masse les plus importantes sont ainsi observées après utilisation de la soude à 1M à une température de 65 °C pendant 10 h ou après deux étapes successives de 1 h. Ces conditions sont donc retenues dans un premier temps.

5.3.1 Hydrolyse basique à 65 °C

L'hydrolyse est réalisée avec 1,5 mL de NaOH 1M sur le culot récupéré après rinçage avec la solution de SDS. Ce protocole a été appliqué à l'échantillon de levure à une température de 65 °C et deux durées d'hydrolyse : 10 h et 2 fois 1 h.

Les résultats présentés dans la Tableau 7 montrent que l'hydrolyse basique à 65 °C donne lieu à une extraction comprise entre 70 et 100 % pour le sélénium naturel. Ces valeurs indiquent donc une hydrolyse efficace de l'échantillon, mais également une mise en solution du traceur $^{77}\text{Se}^0$ comprise entre 60 et 100 % dans le surnageant, ce qui ne correspond pas à notre objectif. L'hydrolyse basique est donc conservée pour la suite des essais mais sans chauffage.

Tableau 7. Quantité de sélénium mise en solution par NaOH 1M à 65 °C.

	Masses initiales de Se_{nat} et ^{77}Se		Masse et pourcentage de Se_{nat} et ^{77}Se dans le surnageant	
10 h – 65° C				
	$\text{Se}_{\text{naturel}}$	^{77}Se	$\text{Se}_{\text{naturel}}$	^{77}Se
Levure ($\mu\text{g Se}$)	447 ± 23	163 ± 7	310 ± 15	98 ± 4
			$70 \pm 2 \%$	$60 \pm 1 \%$
1 h - 65 °C (2 hydrolyses successives)				
	$\text{Se}_{\text{naturel}}$	^{77}Se	$\text{Se}_{\text{naturel}}$	^{77}Se
Levure ($\mu\text{g Se}$)	440 ± 15	161 ± 4	443 ± 50	163 ± 10
			$101 \pm 10 \%$	$102 \pm 5 \%$

5.3.2 Hydrolyse basique à température ambiante

L'hydrolyse basique est mise en œuvre à température ambiante (bain ultrasons, 3 min). Les résultats obtenus après une seule étape, deux ou cinq étapes successives sont rassemblés dans la Figure 8. Les résultats détaillés complets sont présentés dans l'Annexe 2.

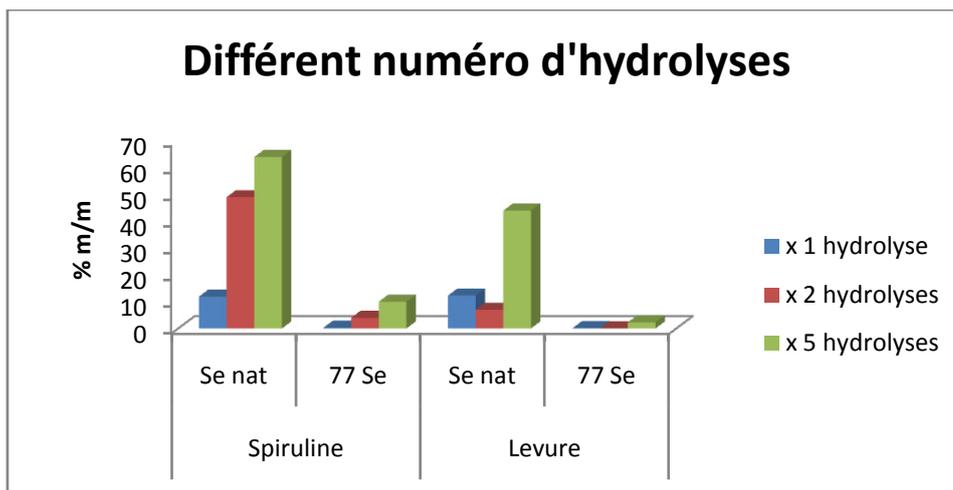


Figure 8. Quantité totale de sélénium mise en solution par NaOH 1M à température ambiante.

Ces résultats indiquent que des hydrolyses successives à température ambiante donnent lieu à une solubilisation élevée du sélénium naturel avec des pertes relativement basses de $^{77}\text{Se}^0$. Les valeurs obtenues pour la spiruline sont : $64 \pm 9\%$ de Se naturel et $10 \pm 2\%$ de $^{77}\text{Se}^0$ dans les surnageants après 5 hydrolyses successives. Les valeurs obtenues pour la levure après 5 hydrolyses sont : $44 \pm 2\%$ de Se naturel et $2,3 \pm 0,7\%$ de $^{77}\text{Se}^0$ dans les surnageants.

5.4 Bilans de matière avec les conditions choisies

Suite à ces étapes de traitement (SDS 0,1 % puis 5 hydrolyses successives NaOH 1 M), le bilan de masse est contrôlé par analyse des culots de la spiruline et de la levure. Avant hydrolyse, les culots sont rincés deux fois à l'eau (ultrasons, 3 minutes) pour éliminer la solution résiduelle de NaOH. Les résultats sont présentés dans le Tableau 8.

Les résultats montrent que le protocole choisi permet de solubiliser une grande quantité du sélénium naturel présente dans les échantillons. La quantité de Se naturel restante dans le culot est de $15 \pm 2\%$ pour la spiruline. Cette quantité du sélénium naturel est éliminée avec une perte très basse de $^{77}\text{Se}^0$, la quantité restante dans le culot étant de $95 \pm 6\%$. Le bilan de matière indique de plus qu'il n'y a pas eu de contamination ni perte de matière. La quantité de sélénium naturel restante dans le culot pourrait être du sélénium élémentaire naturel présent dans la spiruline.

Tableau 8. Bilan de matière du protocole complet: 1,5 mL SDS 0,1 % ; 5*1,5 mL NaOH 1M et 2 rinçages *1,5 mL H₂O.

	Masses initiales		Masses et pourcentages dans le culot		Bilan (SDS + NaOH + H ₂ O + Culot)	
	Se _{naturel}	⁷⁷ Se	Se _{naturel}	⁷⁷ Se	Se _{naturel}	⁷⁷ Se
Spiruline (ng Se)	30 ± 1	10,0 ± 0,6	4,6 ± 0,7	9,5 ± 0,1	110 ± 6 %	108 ± 9 %
			15 ± 2 %	95 ± 6 %		
Levure (µg Se)	448 ± 13	164 ± 2	71 ± 1	123 ± 4	77 ± 3 %	78 ± 4 %
			16,0 ± 0,6 %	77 ± 1 %		

De la même manière, les résultats obtenus pour la levure indiquent qu'une grande quantité du sélénium naturel présente dans l'échantillon n'est pas mise en solution (pouvant être également sous forme de Se (0) (forte concentration)) avec une valeur de 16,0 ± 0,6 % pour le sélénium naturel restant dans le culot. Une quantité importante de sélénium naturel peut être éliminée avec une perte plus élevée de ⁷⁷Se⁰. Seulement 77 ± 1 % du ⁷⁷Se⁰ est récupéré dans le culot de la levure tandis que dans le culot de spiruline ce taux est de 95 ± 6 %. Les bilans de matière dans le cas de la levure sont ainsi de 78 ± 4% pour le traceur et de 77 ± 3 % pour le sélénium naturel. Ces valeurs inférieures à 100% sont indicatives de pertes de matière pendant les manipulations et ne nous permettent pas de conclure aussi clairement que dans le cas de la spiruline.

5.5 Application à des échantillons de cultures bactériennes

Le protocole a ensuite été appliqué à trois échantillons issus de cultures bactériennes (*Desulfovibrio sp.*) en anaérobiose et en présence de sélénite, précédemment réalisées au laboratoire. Ces trois échantillons ont été obtenus après centrifugation des cultures induisant deux types de métabolisme (respiration des sulfates (SRL-1) ou des fumarates (FRR1-nr et FRR1-r)). Les échantillons FRR1-nr et FRR1-r proviennent de la même culture, l'un ayant été rincé avec du milieu de culture sans sélénite (FRR1-r).

Desulfovibrio sp. est une bactérie Gram-négative et procaryote comme la bactérie du genre *Arthrospira* qui se trouve dans la spiruline. Elles ont donc la même structure et l'application du protocole développé devrait fonctionner pour isoler le sélénium élémentaire produit lors des incubations de la bactérie *Desulfovibrio sp.*

Les résultats obtenus suite à l'application du protocole sont présentés dans le Tableau 9, qui donne un bilan de matière en % du sélénium récupéré dans chaque étape de la procédure.

Tableau 9. Bilan de matière (%) du sélénium total pour la méthode d'isolation du sélénium élémentaire dans les trois types de cultures.

	SRL-1	FRR1-nr	FRR1-r
Quantité initiale $\mu\text{g} \pm \mu\text{g Se}$	1881 \pm 65	1017 \pm 29	1787 \pm 71
Quantité surnageant SDS	0,12 \pm 0,01 %	1,8 \pm 0,1 %	0,59 \pm 0,05 %
Quantité surnageants NaOH	1,2 \pm 0,1 %	2,5 \pm 0,2 %	1,2 \pm 0,1 %
Quantité surnageants H₂O	0,09 \pm 0,01 %	2,4 \pm 0,1 %	0,9 \pm 0,1 %
Fraction de Se (0) estimée	60 \pm 3 %	61 \pm 4 %	30 \pm 2 %
Bilan	62 \pm 3 %	68 \pm 4 %	33 \pm 2 %

Les bilans de matière obtenus (< 100 %) indiquent soit une perte de matière soit un manque d'homogénéité des échantillons. Pour les différentes conditions testées les recouvrements de Se total sont en moyenne de 62 \pm 3 %, 68 \pm 4 % et 33 \pm 2 % de récupération pour la culture SRL-1, FRR1-nr et FRR1-r respectivement.

L'application de ce protocole aux cultures bactériennes de type *Desulfovibrio sp.* fait apparaître des résultats très différents de ceux obtenus pour la spiruline, ce qui est indicatif d'une spéciation très différentes du sélénium dans ces deux échantillons. Ceci pouvant être attribué au fait que la spiruline n'était pas issue d'une culture enrichie en Se à l'inverse des culots de type *Desulfovibrio sp.* cultivées dans un milieu contenant 0,1 mM d'ions sélénite.

Par contre, nous pouvons conclure que la production de Se^0 est indépendante du métabolisme car la quantité de Se^0 obtenu par respiration des sulfates (SRL1, $60 \pm 3 \%$) ou par respiration des fumarates (FRR1-nr, $61 \pm 4 \%$) a été presque la même. D'autre part, la moitié de Se^0 a été retrouvé dans le culot lorsque la culture bactérienne a été rincée avec le milieu de culture (FRR1-r, $30 \pm 2 \%$). Ce pourcentage plus faible obtenu pour le culot rincé est difficile à expliquer mais pourrait en partie être du à une quantification erronée de la teneur du culot en sélénium total, celle-ci étant supérieure à celle mesurée dans le culot bactérien non rincé.

6. Conclusions

L'objectif de ce travail était d'optimiser une méthode de préparation d'échantillon, permettant de séparer le Se^0 des autres formes de Se pour application à des culots bactériens (*Desulfovibrio sp*) cultivés en milieu enrichi en sélénite. Deux modèles d'échantillon (spiruline et levure) ont été utilisés pour tester différents réactifs pour faire une première étape de nettoyage extracellulaire et une deuxième étape de lyse cellulaire.

Pour la première étape, les meilleurs résultats sont obtenus lorsque 0,15 g d'échantillon sont rincés avec 1,5 mL de SDS 0,1 %. Ce rinçage permet d'éliminer les espèces ioniques du sélénium extracellulaires ainsi qu'une désorganisation des membranes par solubilisation des lipides membranaires.

Pour la deuxième étape, les meilleurs résultats sont obtenus en faisant cinq hydrolyses avec 1,5 mL de NaOH 1M, suivis de trois rinçages à l'eau à température ambiante. L'application de chaleur lors de l'hydrolyse provoque une mise en solution très efficace de l'échantillon, mais également celle du traceur $^{77}\text{Se}^0$.

Le protocole optimisé avec les deux modèles d'échantillon permet d'éliminer la plupart du sélénium naturel (15 ± 2 % pour la spiruline et $17,0 \pm 0,9$ % pour la levure sont quantifiés dans les culots), la plupart du $^{77}\text{Se}^0$ restant dans le culot (95 ± 6 % pour la spiruline et 77 ± 1 % pour la levure).

Après application du protocole aux cultures bactériennes de *Desulfovibrio sp*. la quantité estimée de Se^0 récupéré est : 60 ± 3 % pour la culture de respiration des sulfates (SRL-1), 61 ± 4 % pour la culture de respiration des fumarates non rincé (FRR1-nr) et 30 ± 2 % pour la culture de respiration des fumarates rincé (FRR1-r). Les résultats permettent de conclure que la formation de particules de Se^0 est indépendante du métabolisme car la production est similaire lorsque la respiration de sulfates ou fumarates est utilisé dans le milieu de culture.

7. Bibliographie

- [1] M. Berglund, M. E. Wieser : "Isotopic compositions of the elements 2009 (IUPAC technical report)". Pure and Applied Chemistry. Vol 83 (2011) 397-410.
- [2] Y. Chen, L. Li, A. D'Ulivo, N. Belzile: "Extraction and determination of elemental selenium in sediments – A comparative study". Analytica Chimica Acta. Vol 577 (2006) 126-133.
- [3] D. Fenyő; R. C. Beavis: "Selenocysteine: Wherefore are you?". Journal of Proteome Research. Vol 15 (2016) 677-678.
- [4] A. M. Patil, V. S. Kumbhar, N. R. Chodankar, A. C. Lokhande, C. D. Lokhande: "Electrochemical behaviour of chemically synthesized selenium thin film". Journal of Colloid and Interface Science. Vol 469 (2016) 257-262.
- [5] P. Mukherjee, S. Konar, B. C. Gupta: "Structural and electrical properties of selenium nanotubes". Physics Letters A. Vol 380 (2016) 238-241.
- [6] S. Kaur, H. Nayyar: "Selenium fertilization to salt-stressed mungbean (*Vigna Radiata* L. Wilczek) plants reduces sodium uptake, improves reproductive function, pod set and seed yield". Scientia Horticulturae. Vol 197 (2015) 304-317.
- [7] J. A. Hall, R. J. Van Saun, T. Nichols, W. Mosher, G. Pirelli : "Comparison of selenium status in sheep after short-term exposure to high-selenium-fertilized forage or mineral supplement". Small Ruminant Research. Vol 82 (2009) 40-45.
- [8] World Health Organization and Food and Agricultural Organization of the United Nations: "Vitamin and mineral requirements in human nutrition". ISBN 92 4 154612 3 (2004) 194-216.
- [9] L. H. E. Winkel, C. A. Johnson, M. Lenz, T. Grundl, O. X. Leupin, M. Amini, L. Charlet: "Environmental selenium research: From microscopic processes to global understanding". Environmental Science & Technology. Vol 46 (2012) 571-579.
- [10] M. P. Rayman: "The importance of selenium for human health". The Lancet. Vol 356 (2000) 233-241.
- [11] C. Girardin-Andreani: "Spiruline: système sanguin, système immunitaire et cancer". Phytothérapie. Vol 4 (2005) 158-161.

- [12] A. M. Fan; S. A. Book; R. R. Neutra; D. M. Epstein: "Selenium and human health implications in California's San Joaquin valley". *Journal of Toxicological and Environmental Health*. Vol 23 (1988) 539-559.
- [13] L. Yonghua; W. Wuyi; L. Kunli; L. Hairong: " Environmental behaviors of selenium in soil of typical selenosis area, China". *Journal of Environmental Science*. Vol 20 (2008) 859-864.
- [14] C. Garbisu; T. Ishii; T. Leighton; B. B. Buchanan: "Bacterial reduction of selenite to elemental selenium". *Chemical Geology*. Vol 132 (1996) 199-204.
- [15] N. A. Steinberg; R. S. Oremland: "Dissimilatory selenate reduction potentials in a diversity of sediment types". *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 56 (1990) 3550-3557.
- [16] R.S. Oremland; J. T. Hollibaugh; A. S. Maest; T. S. Presser; L. G. Miller; C. W. Culbertson: "Selenate reduction to elemental selenium by anaerobic bacteria in sediments and culture: Biogeochemical significance of a novel, sulfate-independent respiration". *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 55 (1989) 2333-2343.
- [17] R.S. Oremland; M.J. Herbel ; J. S. Blum ; S. Langley ; T. J. Beveridge ; P. M. Ajayan ; T. Sutto ; A. V. Ellis ; S. Curran : "Structural and spectral features of selenium nanospheres produced by Se-respiring bacteria". *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 70 (2004) 52-60.
- [18] B. A. Silverberg; P. T. S. Wong; Y. K. Chau: "Localization of selenium in bacterial cells using TEM and energy dispersive X-ray analyse". *Arch. Microbiol*. Vol 107 (1976) 1-6.
- [19] J. Kessi; M. Ramuz; E. Wehrli; M. Spycher; R. Bachofen: "Reduction of selenite and detoxification of elemental selenium by the photoreophic bacterium *rhodospirillum rubrum*". *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 65 (1999) 4734-4740.
- [20] M. Fujita; M. Ike; S. Nishimoto; K. Takahashi; M. Kashiwa: "Isolation and characterization of a novel selenate-reducing bacterium, *Bacillus sp.SF-1*". *Journal of Fermentation and Bioengineering*. Vol 83 (1997) 517-522.

- [21] Y. Zhang; B. C. Okeke; W. T. Frankenberger: "Bacterial reduction of selenate to elemental selenium utilizing molasses as a carbon source". *Bioresource Technology*. Vol 99 (2008) 1267-1273.
- [22] D. C. Reamer; W. H. Zoeller: "Selenium biomethylation products from soil and sewage sludge". *Science*. Vol 208 (1980) 500-502.
- [23] T. W. –M. Fan; R. M. Higashi; A. N. Lane: "Biotransformations of selenium oxyanion by filamentous cyanophyte-dominated mat cultured from agricultural drainage waters". *Environmental Science & Technology*. Vol 32 (1998) 3185-3193.
- [24] T. G. Chasteen; G. M. Silver; J. W. Birks; R. Fall: "Fluorine-induced chemiluminescence detection of biologically methylated tellurium, selenium, and sulfur compounds". *Chromatographia*. Vol 30 (1990) 181-185.
- [25] T. G. Chasteen; R. Bentley: "Biomethylation of selenium and tellurium: Microorganisms and plants". *Chemical Reviews*. Vol 103 (2003) 1-22.
- [26] A. Hnain, J. Brooks, D. D. Lefebvre : "The synthesis of elemental selenium nanoparticles by *Synechococcus Leopoliensis*". *Application of Microbiology and Biotechnology*. Vol 97 (2013) 10511-10519.
- [27] K. C. Biswas; L. L. Barton; W. L. Tsui; K. Shuman; J. Gillespie: "A novel method for the measurement of elemental selenium produced by bacterial". *Journal of Microbiological Methods*. Vol 86 (2011) 140-144.
- [28] P. R. Dowdle ; R. S. Oremland: "Microbial oxidation of elemental selenium in soil slurries and bacterial cultures". *Environmental Sciences and technology*. Vol 32 (1998) 3749-3755.
- [29] S. K. Torres; V. L. Campos; C. G. León; S. M. Rodríguez-Llamazares; S. M. Rojas; M. González; C. Smith; M. A. Mondaca: "Biosynthesis of selenium nanoparticles by *Pantoea Agglomerans* and their antioxidant activity". *Journal of Nanoparticle Research*. Vol 14 (2012) 1236-1244.

- [30] P. Eszenyi; A. Sztrik ; B. Babka ; J. Prokisch: "Elemental, nano-sized (100-500 nm) selenium production by probiotic lactic acid bacteria". International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics. Vol 1 (2011) 148-152.
- [31] E. Domokos-Szabolcsy ; L. Marton ; A. Sztrik ; B. Babka ; J. Prokisch ; M. Fari: "Accumulation of red elemental selenium nanoparticles and their biological effects in *Nicotinia Tabacum*". Plant Growth Regulation. Vol 68 (2012) 525-531.
- [32] M. Pettine; T. J. McDonald; M. Sohn; G. A. K. Anquandah; R. Zboril; V. K. Sharma : "A critical review of selenium analyse in natural water samples". Trends in Environmental Analytical Chemistry. Vol 5 (2015) 1-7.
- [33] Agilent Technologies. Inc: "Agilent 7500 Series ICP-MS. Hardware Manual". Edition September 2008.
- [34] J.Darrouzèz; M. Bueno; G. Lespès; M. Potin-Gautier: "Operational optimization of ICP-octopole collision/reaction cell-MS for application to ultratrace selenium total and speciation determination". Journal of Analytical Atomic Spectrometry. Vol 20 (2005) 88-94.
- [35] P. Rodríguez-González; J. M. Marchante-Gayón; J. I. García-Alonso; A. Sanz-Medel: "Isotope dilution analysis for elemental speciation: A tutorial review". Spectrochimica Acta Part B. Vol 60 (2005) 151–207.
- [36] L. Hinojosa Reyes; J. M. Marchante Gayón; J.I. García Alonso; A. Sanz-Medel: "Determination of selenium in biological materials by isotope dilution analyse with an octopole reaction system ICP-MS". Journal of Analytical Atomic Spectrometry. Vol 18 (2003) 11-16.
- [37] J. Ruiz-Encinar; J. I. García Alonso; A. Sanz-Medel; S. Main; P. J. Turner: "A comparison between quadrupole, double focusing and multicollector ICP-MS instruments". Journal of Analytical Atomic Spectrometry. Vol 16 (2001) 315-321.
- [38] L. Lancelleur; E. Tessier; M. Bueno; S. Berail; F. Hakil; R. Guyoneaud; D. Amouroux: "Se bio-volatilization and isotopic fractionation induced by micro-organisms during respiratory reduction of sulphate and fumarate". Goldschmidt 2015. Prague, République Tchèque (Communication par affiche).

[39] M. Rodríguez Oliva; M. Perez Quintana; R. Bocourt Salabarría: "Componentes de la pared de las levaduras: Actividad probiótica". Cd de Monografías 2008. Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos" 1-9.

[40] J. Tolu; P. Di Tullo; I. Le Hécho; Y. Thiry; F. Pannier; M. Potin-Gautier; M. Bueno: "A new methodology involving stable isotope tracer to compare simultaneously short- and long-term selenium mobility in soils". Analytical and Bioanalytical Chemistry. Vol 406 (2014) 1221-1231.

[41] P. Di Tullo: "Dynamique du cycle biogéochimique du sélénium en écosystèmes terrestres: réactivité dans les sols, role de la végétation". Thèse de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour. (2015).

8. Annexes

Annexe 1 : Calcul des incertitudes

Dans un premier temps, l'incertitude ($\Delta^X I_{\text{corrigé}}$) sur l'intensité du signal corrigé des facteurs d'hydruration de Se et Br (Équations 7-12) est calculée:

$$\Delta^X I_{\text{corrigé}} = \sqrt{(\Delta^X I)^2 + (I^{X-1} \times \Delta f)^2 + (f \times \Delta^{X-1} I_{\text{corrigé}})^2} \quad (\text{a})$$

Avec:

$\Delta^X I$: incertitude sur l'intensité du signal de l'isotope X mesuré dans l'échantillon (écart-type sur trois mesures pour l'analyse totale)

f: facteurs d'hydruration de Se ou Br

Δf : incertitude sur f_{Se} ou f_{Br}

Les incertitudes sur les rapports isotopiques sont déterminées à partir de celles des intensités des isotopes de Se considérés dans le rapport:

$$\Delta \left(\frac{{}^X \text{Se}}{{}^Y \text{Se}} \right) = \frac{{}^X \text{Se}}{{}^Y \text{Se}} \times \sqrt{\left(\frac{\Delta^X \text{Se}}{{}^X \text{Se}} \right)^2 + \left(\frac{\Delta^Y \text{Se}}{{}^Y \text{Se}} \right)^2} \quad (\text{b})$$

Avec :

${}^X \text{Se}$ et ${}^Y \text{Se}$ déterminés selon les Équations 7-12

$\Delta^X \text{Se}$ et $\Delta^Y \text{Se}$ déterminés selon (a)

L'incertitude de la correction du biais de masse ($K \pm \Delta K$) est:

$$\Delta \left(\frac{{}^X \text{Se}}{{}^Y \text{Se}} \right)_{\text{corrigé } K} = {}^{x/y} R \sqrt{\left[e^{K \times M} \times \left(\frac{\Delta^X \text{Se}}{{}^X \text{Se}} \right) \right]^2 + 2 \left[\left(\frac{{}^X \text{Se}}{{}^Y \text{Se}} \right) \times e^{K \times M} \times M \times \Delta K \right]^2} \quad (\text{c})$$

Avec :

${}^{x/y} R$: rapport des isotopes x et y mesuré après correction d'hydruration

M : différence entre les masses des isotopes X et Y

K : biais de masse

ΔK : incertitude sur K

Les incertitudes sur les abondances isotopiques de Se dans l'échantillon ainsi que sur sa masse atomique sont ensuite calculées:

$$\Delta \sum \text{rapports} = \sqrt{\Delta \left(\frac{{}^{76}\text{Se}}{{}^{80}\text{Se}} \right)^2 + \Delta \left(\frac{{}^{77}\text{Se}}{{}^{80}\text{Se}} \right)^2 + \Delta \left(\frac{{}^{78}\text{Se}}{{}^{80}\text{Se}} \right)^2 + \Delta \left(\frac{{}^{82}\text{Se}}{{}^{80}\text{Se}} \right)^2} \quad (\text{d})$$

Avec:

$\Delta \left(\frac{{}^X\text{Se}}{{}^{80}\text{Se}} \right)$ déterminés selon (c)

$$\Delta {}^X A_s = \sqrt{\left[\left(\frac{{}^X\text{Se}}{{}^{80}\text{Se}} \right) \times \Delta {}^{80} A_s \right]^2 + \left[{}^{80} A_s \times \Delta \left(\frac{{}^X\text{Se}}{{}^{80}\text{Se}} \right) \right]^2} \quad (\text{e})$$

Avec : X : isotopes 76, 77, 78 ou 82

Les incertitudes analytiques sur les concentrations de $\text{Se}_{\text{naturel}}$ et $\text{Se}_{\text{traceur}}$ (Éq. 2 et 3) sont finalement calculées à l'aide de (f) et (g):

$$\Delta [\text{Se}]_{\text{naturel}} = \frac{\sqrt{[C \times \Delta {}^{78} A_s]^2 + [\Delta C \times {}^{78} A_s]^2}}{{}^{78} A_{\text{naturel}}} \quad (\text{f})$$

$$\Delta [\text{Se}]_{\text{traceur}} = \frac{\sqrt{[C \times \Delta {}^{78} A_s]^2 + [\Delta C \times {}^{78} A_s]^2 + [C \times \Delta {}^{77} A_s]^2 + [\Delta C \times {}^{77} A_s]^2}}{\left(\frac{{}^{78} A_{\text{traceur}}}{{}^{77} A_{\text{traceur}}} \right) - \left(\frac{{}^{78} A_{\text{naturel}}}{{}^{77} A_{\text{naturel}}} \right)} \quad (\text{g})$$

Avec :

${}^{77,78} A_s$: abondances des isotopes 77 et 78 dans l'échantillon

$\Delta {}^{77,78} A_s$: incertitudes sur les abondances des isotopes 77 et 78 dans l'échantillon

${}^{77,78} A_{\text{naturel}}$: abondances des isotopes 77 et 78 dans l'étalon de Se de composition isotopique naturelle ajouté pour la dilution isotopique inverse

$[\text{Se}]_s$ et $\Delta [\text{Se}]_s$: concentration de Se total dans l'échantillon et son incertitude

Annexe 2 : Hydrolyse basique à température ambiante

Tableau. Quantité totale de sélénium mise en solution par NaOH 1M à T^a ambiante.

	Masses initiales		Masses et pourcentages dans les surnageants	
1 hydrolyse				
	Se _{naturel}	⁷⁷ Se	Se _{naturel}	⁷⁷ Se
Spiruline (ng Se)	30 ± 1	10,1 ± 0,6	3,6 ± 0,9	0,08 ± 0,07
			12 ± 3 %	0,8 ± 0,7 %
Levure (µg Se)	453 ± 21	166 ± 6	56 ± 4	0,2 ± 0,1
			12,3 ± 0,6 %	0,11 ± 0,07 %
2 hydrolyses successives				
	Se _{naturel}	⁷⁷ Se	Se _{naturel}	⁷⁷ Se
Spiruline (ng Se)	53 ± 3	18 ± 1	26 ± 3	0,5 ± 0,2
			49 ± 7 %	3 ± 1 %
Levure (µg Se)	885 ± 33	323 ± 9	64 ± 38	0,2 ± 0,1
			7 ± 4 %	0,06 ± 0,03 %
5 hydrolyses successives				
	Se _{naturel}	⁷⁷ Se	Se _{naturel}	⁷⁷ Se
Spiruline (ng Se)	30 ± 1	10,0 ± 0,6	19 ± 3	1,0 ± 0,2
			64 ± 9 %	10 ± 2 %
Levure (µg Se)	448 ± 13	164 ± 2	195 ± 8	4 ± 1
			44 ± 2 %	2,3 ± 0,7 %