

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

Pamela DI TULLO

pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Spécialité: Chimie Analytique et Environnement

Dynamique du cycle biogéochimique du sélénium en écosystèmes terrestres: réactivité dans les sols, rôle de la végétation

Soutenue le 3 Mars 2015

Directrice de thèse:

Florence PANNIER, Professeur (Université de Pau et Pays de l'Adour)

Co-directrice de thèse:

Isabelle LE HECHO, Maître de conférences (Université de Pau et des Pays de l'Adour)

Co-encadrante de thèse:

Maité BUENO, Maître de conférences (Université de Pau et des Pays de l'Adour)

Commission d'examen

Yolanda MADRID (Rapporteur)

Professeur (Universidad Complutense de Madrid)

Marie Thérèse MENAGER (Rapporteur)

Expert Sénior (CEA- Fontenay-aux-Roses)

David AMOUROUX (Examineur)

Directeur de recherche (CNRS – Pau)

Maryse CASTREC-ROUELLE (Examineur)

Maître de conférences (Université Paris VI)

Yves THIRY (Examineur)

Chercheur (ANDRA – Châtenaux Malabry)

Marie-Pierre TURPAULT (Invité)

Directeur de recherche (INRA- Champenoux)

Un grand découvreur à qui l'on demandait comment il s'y prenait pour avoir tant d'idées neuves répondit: en ne cessant d'y penser. On peut bien dire, en effet, que les idées inattendues ne se présentent à nous que parce que nous les attendons.
(Musil)

A ma famille

REMERCIEMENTS

Plus de trois ans sont passés (j'ai l'impression que c'était hier), j'ai passé de si bons moments, j'ai appris tant de choses et je suis devenue quelqu'un de plus mature. Au terme de ce travail, c'est avec émotion et beaucoup de sincérité que je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin ont contribué à cette aventure. Il me sera très difficile de remercier tout le monde car c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme.

J'aimerais tout d'abord remercier énormément une de mes directrices de thèse **Mme Florence Pannier**. Je la remercie pour la liberté d'action que tu m'a donnée et surtout pour ta bonne humeur. J'espère avoir été digne de la confiance que tu m'as accordée et que ce travail soit à l' hauteur de tes espérances. Quoi qu'il en soit, j'ai beaucoup appris à tes côtés et je suis très honorée de t'avoir eu comme directrice.

Mes sincères remerciements vont ensuite à ma co-directrice de thèse **Mme Isabelle Le Hecho**, qui malgré le fait qu'elle a rejoint l'équipe des encadrant un peu plus tard, une bonne entente a tout de suite eu lieu. Je suis ravie d'avoir pu travailler avec toi dans la dernière ligne droite, car outre ton appui scientifique, tu as été là pour me soutenir et me rassurer au cours de la rédaction.

Un grand merci à **Mme Maïté Bueno** qui a été une encadrante exceptionnelle, qui a consacré beaucoup de temps à corriger ce mémoire (je l'imagine s'arracher les cheveux pour essayer de comprendre le sens un peu tortueux de mes phrases en 'italo-français'). Merci beaucoup pour ta gentillesse, ton aide et tes précieux conseils qui m'ont accompagnée tout au long de ma thèse.

Je remercie également mon encadrant **Andra, Yves Thiry**. Les discussions qu'on a eues m'ont beaucoup apporté et ont fait avancer ma réflexion, en me permettant de mieux comprendre ce que j'observais et d'avoir un certain recul.

J'adresse mes remerciements **aux rapporteurs** qui ont examiné avec attention ce mémoire **et aux membres du jury** d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie l'**Andra** (Agence Nationale pour la gestion des déchets radioactifs) pour avoir financé ce travail ; l'équipe **BIOEMPCO** (Université Pierre et Marie Curie) et **INRA-BEF** (Champenoux) pour leur collaboration dans des parties de ce projet.

Je tiens aussi à mentionner le plaisir que j'ai eu à travailler au sein de **LCABIE**, et j'en remercie ici tous les membres. Une pensée toute particulière à mon fan numéro 1: **Magali**, merci d'avoir été le meilleur co-bureau que je pouvais rêver et une amie hors pair sur qui je pourrai toujours compter. Un gros merci à **Ariane** ('Dodo'), les années de thèse n'auraient pas été si drôles si tu n'avais pas été là, merci pour ton soutien dans les périodes de doutes et je te souhaite tout le courage que tu m'as apporté.

*Merci aux autres co- bureaux: **Simon, Lolo, Hind et Charlene** (pour moi c'est ici ton bureau) pour la bonne ambiance, l'aide et pour m'avoir donné la possibilité de rédiger au calme (malgré que ce n'était pas toujours facile). Merci à tous les autres collègues avec qui j'ai partagé ces années pour les très bons moments passés dans et hors du labo et qui ont supporté ma petite folie ; en particulier: **Lulu** (pour nos discussions sur la mode), **Alain** (tu as toujours été là quand il fallait), **Julek** (pour m'avoir fait partager tes secrets sur l'ICP autour d'un café et pour m'avoir tenu compagnie le week-end au labo), **Guigui, Julien, Georgia, Vanessa, Angela, Laurent post-doc...etc.***

*Je remercie également toutes les personnes hors du labo qui ont été là pour me changer les idées et m'ont permis d'oublier momentanément le travail dans des soirées, repas, ou autre: **Renaud** (pour tes efforts pour comprendre le sujet de ma thèse et ton précieux soutien), **Christophe et Axelle** (pour m'avoir préparé à manger quand je n'avais pas le temps), **Mica** (pour notre rituel du Garage dominical), **Séverine** (pour m'avoir fait découvrir chez « Laurette »), **Cécile** (toujours à l'écoute), **Juju** (pour nos sessions musicales) etc.*

*Merci également à mes amis de toujours **Alessandro, Simone, Andrea, Fabiola, Giulia, Giuliana** et **Vane**, il y a des personnes que les distances n'éloignent pas .*

*Pour finir, j'adresse toute mon affection à **mon père, ma mère et ma sœur**, malgré mon éloignement depuis de nombreuses années, leur confiance, tendresse et amour me portent et me guident tous les jours. Merci pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. C'est à eux que je dédicace cette thèse.*

RESUME

Dynamique du cycle biogéochimique du sélénium en écosystèmes terrestres: rétention et réactivité dans le sol, rôle de la végétation.

Ce travail s'inscrit dans la problématique d'évaluation de sûreté préalable au possible stockage de déchets radioactifs HAVL en couches géologiques profondes. Afin de consolider les modèles de prédiction à long terme des risques associés à une contamination potentielle de la biosphère par le ^{79}Se , la biogéochimie du sélénium stable a été explorée, en visant dans un premier temps un éclairage sur la dynamique du cycle global de Se dans un écosystème forestier en terme de stock et flux annuels. Suite aux résultats de la première partie, qui suggèrent l'importance du sol et son pool organique dans le cycle global de Se, deux études basées sur l'utilisation des traceurs isotopiques stables ont été ensuite menées afin de clarifier les processus impliqués (i) dans la rétention et la réactivité de Se dans les sols et (ii) dans la bio-incorporation de Se inorganique dans la biomasse des plantes au sein d'une fraction organique.

Mots clés: sélénium, cycle biogéochimique, spéciation, réactivité, rétention, sols, traceurs isotopiques, plantes, bio-incorporation.

ABSTRACT

Dynamic of biogeochemical selenium cycle in terrestrial ecosystems: retention and reactivity in soil; role of vegetation.

This work was performed in the frame of the safety assessment program prior to the possible construction of an underground repository for nuclear waste (HAVL). To consolidate risk assessment models associated to a potential ^{79}Se biosphere contamination, biogeochemistry of stable selenium was investigated, aiming firstly to highlight the dynamics of Se cycling in a forest ecosystem, in terms of inventories and annual fluxes. Consequently to these first results, which suggest a key role of soil and its organic pool in the global Se cycle, two studies based on the use of isotopically enriched tracers were further carried out in order to clarify the processes involved in (i) Se retention and reactivity in soils and (ii) incorporation of inorganic Se within organic pool of vegetal biomass.

Keywords: selenium, biogeochemical cycle, speciation, reactivity, retention, soil, isotope tracers, plants, bio-incorporation.

SOMMAIRE

Remerciments	I
Résumé	III
Sommaire	V
Liste des Figures	XI
Liste des Tableaux	XIII
Glossaire	XV
<u>INTRODUCTION GENERALE</u>	1
CHAPITRE A: <i>Synthèse Bibliographique</i>	4
1. GENERALITES SUR LE SELENIUM	7
1.1 Chimie du sélénium	7
1.2 Le rôle biologique du sélénium	8
1.2.1 Sélénium et santé humaine	8
1.2.2 Formes biologiquement actives	11
1.3 Le sélénium dans l'environnement	17
1.3.1 Sources et utilisations du sélénium	17
1.3.2 Répartition de Se dans les compartiments environnementaux	19
2 SELENIUM ET SOL	27
2.1 Le système sol	27
2.2 Réactivité du sélénium dans les sols	31
2.2.1 Processus d'oxydo-réduction	32
2.2.2 Sorption de Se sur les phases minérales	35
2.2.3 Interaction Se et matière organique du sol (SOM)	38
2.2.4 Méthylation et volatilisation	41
2.5. Coefficient de distribution solide/liquide (Kd)	44
3. SELENIUM ET VEGETAUX	47
3.1. Importance des végétaux	47
3.2. Effet du sélénium chez les plantes	49
3.3. Les voies métaboliques	51

3.4. Mécanismes de prélèvement de Se par la plante	54
3.5. Accumulation et métabolisation	55
3.5.1. Taux de prélèvement et accumulation dans la plante entière	56
3.5.2. Distribution dans les différents organes	59
3.5.3. Spéciation et taux de métabolisation	60
3.5.4. Volatilisation	65
4. OUTILS ANALYTIQUES	66
4.1. Spectrométrie de masse	66
4.1.1. Source d'ionisation : spectrométrie à plasma induit (ICP-MS)	67
4.1.3. Les limitations pour la détection de Se par ICP-MS	70
4.2. Techniques séparatives	73
4.2.1. Chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC)	73
4.2.2. Séparation des espèces sélénées	74
4.2.2. Couplage	75
5. PROBLEMATIQUE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS VISES	78

CHAPITRE B: *Cycle Biogéochimique de Se dans un écosystème forestier* _____ **81**

1. INSTRUMENTATION DU SITE FORESTIER DE MONTIERS	85
1.1 Description du site	85
1.2 Installations permanentes	80
2 MODELE D'ETUDE DU CYCLE BIOGEOCHIMIQUE DE Se EN ECOSYSTEME FORESTIER	90
2.1 Présentation générale	90
2.2 Le modèle conceptuel à compartiments et à flux	91
2.2.1 Concepts	91
2.2.2 Evaluation des stocks, des flux et des bilans entrées/sorties de sélénium	92

Article I: *Dynamic of selenium cycling in Fagusa sylvatica forest of Meuse/Haute-Marne region* _____ **103**

CHAPITRE C: *Etude de la réactivité de Se dans les compartiments sols et végétaux par traçage isotopique* _____ **131**

Partie I

1. LES TRACEURS ISOTOPIQUES STABLES: UN OUTIL ROBUSTE POUR L'ETUDE DU DEVENIR DE Se DANS L'ENVIRONNENT	135
1.1. Avantages	135
1.2. Etat de l'art des applications des traceurs isotopiques stables du sélénium	137
2 PRINCIPE ET PROCEDURE	138
2.1 Préparation des espèces séléniées isotopiquement enrichies	138
2.2. Détermination de la concentration en sélénium	140
2.2.1. Principe d'utilisation de traceurs isotopiques	140
2.2.2. Optimisation pour une mesure précise de rapports isotopiques pour le Se	142
2.2.3. Calculs des incertitudes	148
<u>Partie II</u>	
1. MISE EN PLACE DES ESSAIS IN SITU	153
1.1. Echantillonnage et dopage des sols	153
1.2. Elaboration des sachets sol-test	154
1.3. Positionnement des sachets	154
Article II: <i>In situ study of selenium retention using isotopically enriched stable selenite tracer</i>	159
<u>Partie III</u>	
1. CULTURES HYDROPONIQUES	193
1.1 Solutions nutritive	193
1.2 Chambre de culture: RUBIC I	194
1.3 Modalités expérimentales	194
Article III: <i>Stable isotope tracing: a powerful tool for Se speciation and metabolic studies in not hyperaccumulator plants (ryegrass Lolium Perenne)</i>	197
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	233
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	240
ANNEXE I	273
ANNEXE II	285

LISTE DES FIGURES

Chapitre A

Figure A. 1. Représentation schématique de l'incorporation de Se dans les protéines (adapté de Dumont, 2006)	13
Figure A. 2. Représentation schématique du cycle environnemental de Se (adapté de Tolu, 2012)	17
Figure A. 3. Répartition approximative des usages de Se et de ces composés par secteur (d'après George et al., 2010)	18
Figure A. 4. Le sol: interface de l'environnement (adapté de Marcic, 2005)	27
Figure A. 5. Cycle biogéochimique du sélénium dans les sols (adapté de Tolu et al., 2012)	32
Figure A. 6. Diagramme potentiel (Eh)-pH du sélénium (25 °C et P=1 bar), en milieux aqueux pour une activité de 10^{-7} mol L ⁻¹	33
Figure A. 7. Cycle rédox du sélénium contrôlé par les micro-organismes. L'épaisseur des flèches correspond aux taux de réaction (plus élevés pour la réduction de Se(IV) et Se(VI) que pour l'oxydation de Se(0).	34
Figure A. 8. Voies métaboliques alternatives de réduction de APSe au séléniure a) via des réactions non-enzymatiques et glutathion réductase ; b) via APS réductase et sulfite réductase	51
Figure A. 9. Représentation schématique simplifiée du métabolisme de Se chez les plantes (d'après Pilon Smits et Quinn, 2010)	52
Figure A. 10. a) Volatilisation de SeMet en DMSe dans les plantes; b) Volatilisation de SeCys en DMDSé et métabolisme de la SeCys dans les plantes accumulatrices	53
Figure A. 11. Tendances saisonnières des concentrations de Se dans des végétaux de prairie (Gissel-Nielsen 1975)	58
Figure A. 12. Diagramme schématique d'un spectromètre de masse (d'après Dumont, 2006)	67
Figure A. 13. Représentation schématique d'un système standard d'introduction de l'échantillon dans la source ICP. Dans l'insert une photo du plasma est fournie (Dumont, 2006)	68
Figure A. 14. a) cône échantillonneur; b) cône écorceur (www.chem.agilent.com)	69
Figure A. 15. Analyseur de masse quadripolaire (Hoffman et Stroobant, 2007)	70
Figure A. 16. Représentation schématique du système de couplage LC-ICP-MS (www.chem.agilent.com)	76

Chapitre B

Figure B. 1. Localisation des 3 stations de mesures du site expérimental forestier de Montiers (Turpault et Calvaruso, 2013; plaquette de présentation du site de Montiers)	85
Figure B. 2. Bac à litière	87
Figure B. 3. Gouttières	87
Figure B. 4. Récupération des eaux de ruissellement de tronc	88
Figure B. 5. Récolte de l'eau libre	88
Figure B. 6. a) Tour à flux; b) Pluviomètre	89
Figure B. 7. Terminologie des différents sous-cycles constituant le cycle biogéochimique.	90
Figure B. 8. Représentation schématique des principaux compartiments () et sous-compartiments () dans l'écosystème forestier considéré	92
Figure B. 9. Schéma récapitulatif des principaux flux annuels considérés	96

Chapitre C

Figure C. 1. Principe de l'utilisation des traceurs isotopique stables: modification du profil isotopique de Se suite à l'ajout des traceurs	140
Figure C. 2. Justesse et précision des rapports isotopiques de Se (n = 12) dans les extraits de sol (tampon phosphate et NaOH) en fonction des conditions de C/RC. Pour les extraits au tampon phosphate, la précision des rapports $^{77}\text{Se}/^{78}\text{Se}$ et $^{80}\text{Se}/^{78}\text{Se}$ figure sur l'axe y principal (gauche) et pour le rapport $^{82}\text{Se}/^{78}\text{Se}$ sur l'axe y secondaire (droite)	145
Figure C. 3. Rapports $^{80}\text{Se}/^{78}\text{Se}$ et $^{82}\text{Se}/^{78}\text{Se}$ déterminés pour six différents extraits de sol (3 extraits/sol chacun en triplicat) analysés en série après correction des interférences due à l'hydruration de Br en utilisant: (i) la valeur de f_{Br} mesurée au début de la série d'analyses, (ii) la valeur de f_{Br} déterminée juste avant l'analyse d'un échantillon en triplicat.	147
Figure C. 4. Photos illustrant l'enfouissement des saches sol-test dans le site forestier	155
Figure C. 5. Photos illustrant les étapes d'enfouissement des saches sol-test dans la prairie	155
Figure C. 6. Photos illustrant les étapes d'enfouissement des saches sol-test dans la culture	155
Figure C. 7. Photos de la culture de ray-grass enrichi en ^{77}Se et ^{82}Se	194

Article I

Figure 1. Molar ratios of total Se (■) and Se_{org} (▲) to total organic carbon as a function of depth.	110
--	-----

Article II

Figure 1. Distribution of ambient Se in soil fractions ($\% \text{Se}_{\text{extracted}}/\text{Se}_{\text{total}}$) in forest, grassland and agricultural soils.	173
Figure 2. Time trend of added total Se (square symbols) and Se(IV) (triangle symbols). in water soluble fraction in: a) forest soil; b) grassland soil; c) agricultural soil. Two-years average of ambient total Se and Se(IV) are represented by a straight line, black and gray respectively.	175
Figure 3. Time trend of added total Se (square symbols) and Se(IV) (triangle symbols) in exchangeable fraction in: a) forest soil; b) grassland soil; c) agricultural soil. Two years average of ambient total Se and Se(IV) are represented by a straight line, black and gray respectively.	176
Figure 4. Time trend of added total Se (square symbols) and Se(IV) (triangle symbols) in OM fraction in: a) forest soil; b) grassland soil; c) agricultural soil. Two years average of ambient total Se and Se(IV) are represented by a straight line, black and gray respectively.	178
Figure 5. Comparaison of experimental proportion of total extracted $^{77}\text{Se(IV)}$ with model predictions using best fitted models; diffusion model (---) and Elovich model (—) in (a) soluble fraction; (b) exchangeable fraction and (c) OM fraction	181
Figure 6. Comparaison of experimental proportion of extracted $^{77}\text{Se(IV)}$ with model predictions using best fitted models; diffusion model (---) and Elovich model (—) in (a) soluble fraction; (b) exchangeable fraction and (c) OM fraction	182
Figure 7. Time course of K_d values over two-years in field experiment in a) agricultural b) forest soil and c) grassland soil. Straight line indicates the avarage K_d values of ambient Se.	184

Article III

Figure 1. Proportion of Se extracted ($\% \text{ Se}_{\text{extracted}} / \text{Se}_{\text{total}}$) under tested conditions used for **(a)** water extraction; **(b)** driselase extraction. Error bars represent SD for triplicate extractions of two-samples/plant compartment _____ 208

Figure 2. PGC HPLC ICP-MS chromatograms of driselase extracts diluted 2.5 times **(a)** roots, **(b)** leaves. The y-scale of figure (b) is expanded as the high amount of SeMet would not allow showing the smaller peaks. _____ 214

Figure 3. PGC- HPLC-ICP MS chromatograms of protease extracts **(a)** roots; **(b)** leaves. The y-scale of both figures is expanded as the high amount of SeMet would not allow showing the smaller peaks _____ 215

Figure 4. SEC-ICP MS profile of ^{77}Se tracer in water extracts of: **(a)** roots; **(b)** leaves (arrows indicate the retention time of calibration molecules (myoglobine 17 kDa; insulin 5.8 kDa and vitamin B₁₂ 1.35 kDa)). **(c)** Proportion of ^{77}Se in defined molecular weight fractions _____ 217

Figure 5. Schematic overview of proposed metabolism pathway after supplementation of **(a)** $^{82}\text{Se(VI)}$; **(b)** $^{77}\text{Se(IV)}$. Font size is proportional to the relative concentration of the species and thickness of arrows is proportional to transport rate _____ 220

Figure S1. PGC- HPLC-ICP MS example chromatograms of water extracts **(a)** roots (for ^{77}Se and ^{82}Se tracer; diluted 10 times); **(b1)** leaves (for ^{82}Se ; diluted 10 times); **(b2)** leaves (for ^{77}Se ; not diluted). The y-scale of figure (a) is expanded in order to underline the absence of others peaks. _____ 229

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre A

Tableau A. 1. Masses exactes et abondances isotopiques des isotopes de Se (Rosman et al., 1997) _	8
Tableau A. 2. Composés organiques et inorganiques de Se identifiés chez divers organismes _____	12
Tableau A. 3. Sélénoprotéines connues et leurs fonctions (d'après Bianga, 2013) _____	14
Tableau A. 4. Gamme de concentrations en Se dans les différents types de roches. La concentration moyenne mondiale est donnée entre parenthèses. _____	22
Tableau A. 5. Concentration de Se dans les fourrages de différents pays ($\mu\text{g kg}^{-1}$: DW) (Kabata-Pendias, 2001). _____	25
Tableau A. 6. Bactéries et champignons capables de biométyler Se (Azaizeh et al., 1997; Chasteen et Bentley, 2003) _____	43
Tableau A. 7. Valeurs de K_d pour Se classées dans la littérature selon la texture et la teneur en matière organique des sols. (Adapté de Tolu et al., 2012) _____	45
Tableau A. 8. Distribution des espèces sélénées dans des végétaux (d'après Pyrzynska et al., 2009)	62
Tableau A. 9. Principales interférences spectrales pour les différents isotopes du sélénium (Darrouzès, 2005) _____	71

Chapitre B

Tableau B. 1. Instrumentations de la station de suivi biogéochimique _____	89
Tableau B. 2. Paramètres spécifiques des sous-compartiments de l'arbre, appliqués dans l'équation 1 pour estimer la biomasse sur pied (Genet et al., 2011) _____	94

Chapitre C

Tableau C. 1. Protocole de préparation de Se(IV) et Se(VI) à partir de Se(0) _____	139
Tableau C. 2. Composition de la solution nutritive d'Hoagland modifiée _____	193

Article I

Table 1. Average values of major characteristics of the calci-brunisol soil at the experimental site, as measured in eight sampling points for each sub-plot _____	108
Table 2. ICP mass spectrometer operating conditions and data acquisition parameters _____	111
Table 3. Vessel washing and mineralization procedures _____	112
Table 4. Equations used to calculate the main fluxes of the biological cycle _____	115
Table 5. Means and standard deviation of Se ($\mu\text{g kg}^{-1}$) measured in total soil (Se_{total}); in water soluble fraction ($\text{Se}_{\text{soluble}}$), exchangeable fraction ($\text{Se}_{\text{exchangeable}}$) and organic matter fraction (Se_{OM}); extracted proportion (% of Se_{total} in soils) is given between brackets. Selenium inventories (g ha^{-1}) in total soil and in operationally defined fractions _____	115

Table 6. Stand biomass, Se concentrations and Se storage in the different compartments. Error is given between brackets. _____	118
Table 7. Annual water fluxes and Se hydrological fluxes measured in the period Mai 2012-Mai 2013 in bulk precipitation (1), throughfall (2), stemflow (3), below canopy (BCF), net below canopy fluxes (NBCF) and input-output budget. Uncertainties associated to environmental replicates (3 sub-plots) are given between brackets _____	120
Table 8. Mean values of the annual fluxes involved in the Se biological cycle. Error is given between brackets. _____	122

Article II

Table 1. Experimental conditions for ICP –MS and chromatographic separations _____	166
Table 2. Concentrations ($\mu\text{g kg}^{-1}$) of ambient and added Se in total soil and extracts and corresponding proportions (expressed in % of soil total Se) for each incubation time and for the three soils _____	170
Table 3. Ambient and added Se(IV) concentrations ($\mu\text{g kg}^{-1}$) and corresponding proportions in soils extracts (expressed in % of soil total Se) for each incubation time and for the three soils. _____	171
Table 4. Kinetics parameters and correlation coefficients obtained from the linear regression analysis of experimental data (proportion extracted ^{77}Se and extracted $^{77}\text{Se(IV)}$ related to total ^{77}Se) with Parabolic diffusion and Elovich kinetic expressions _____	180
Table 5. Estimated time required for ^{77}Se to reach ambient Se and Se(IV) distribution _____	185

Article III

Table 1. Total and species concentrations of ^{77}Se tracer in leaves and roots. Corresponding proportions in extracts (expressed as % of total ^{77}Se in plant compartment) are given between brackets. Values are mean \pm SD from triplicate digestions or sequential extractions of two samples/plant compartment. _____	210
Table 2. Total and species concentrations of ^{82}Se tracer in leaves and roots. Corresponding proportions in extracts (expressed as % of total Se in in plant compartment) are given between brackets. Values are mean \pm SD from triplicate digestions or sequential extractions of two samples/plant compartment _____	211
Table 3. Proportion of Se species related to total Se tracer content in whole plant and plant compartments _____	219
Table S1. Instrumental conditions in this study _____	230
Table S2. Total and species concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$) of two tracers (^{77}Se and ^{82}Se) in growing media replaced every two weeks. _____	231

GLOSSAIRE

Composés séléniés

DMDSe:	diméthyldiséléniure
DMSe :	diméthylséléniure
DMSEP	diméthylséléniure
MeSeCys:	méthylsélénocystéine
MeSeOOH:	acide méthaneséléninique
Se:	sélénium
Se(0)	sélénium élémentaire
SeIV:	sélénite
SeVI:	séléniate
Se(-II)	séléniure
SeCys ₂ :	sélénocystine
SeCys:	sélénocystéine
SeMet:	sélenométhionine
TMSe ⁺ :	ion triméthylsélénonium

Méthodes analytiques

AAS:	spectrométrie d'absorption atomique
AE:	échange d'anions
AAF:	spectrométrie de fluorescence atomique
CCR:	cellule de collision/réaction
DPCSV:	voltamétrie de redissolution cathodique pulsée
ESI-MS/MS:	spectrométrie de masse tandem à source d'ionisation électrospray
FAAS:	spectrométrie d'absorption atomique de flamme
HG:	générations d'hydrures
HPLC:	chromatographie liquide à haute performance
GC:	chromatographie gaz
GPx:	glutathione peroxydase
GSH:	glutathion
ICP-MS:	spectrométrie de masse à plasma induit
ICP-AES:	spectrométrie d'émission atomique à plasma induit
PGC:	carbone graphitique poreux
RP:	phase inverse
SEC:	chromatographie d'exclusion stérique
UV:	ultraviolet

Constituants des sols

AF:	acide fulvique
AH:	acide Humique
CO:	carbone organique
DOC:	carbone organique dissous
MO:	matière organique
MOF:	matière organique fraîche
MOL:	matière organique labile
MOS:	matière organique stable
SH:	substance humiques
SOM:	matière organique du sol

Organismes

Andra:	Agence nationale pour la gestion des déchets radioactifs
IAEA:	Agence international de l'Energie Atomique
IUPAC:	Union international de Chimie Pure et Appliqué
INRA:	Institut National de la Recherche Agronomique
IPREM:	Institut Pluridisciplinaire de Recherche sur l'Environnement et les Matériaux
OPE:	Observatoire Pérenne de l'Environnement

Autres abréviations

AD:	dépôts atmosphériques
AF:	flux annuel
CEC:	Capacité d'Echange Cationique
CSE:	Complexe de Sphère Externe
CSI:	Complexe de Sphère Interne
DM:	biomasse sur pied
DR:	sortie par drainage profond
Ft:	facteur de translocation racines/parties aériennes
HAVL:	Déchets radioactifs à Haute Activité et à Vie Longue
HMW:	molécule à haut poids moléculaire
IM:	incrément annuel de la biomasse
K_d :	coefficient de distribution solide/liquide
L.D:	Limite de Détection
LMW:	molécule à bas poids moléculaire
n.d:	non déterminé
pH_{pzc} :	point isoélectrique
TF:	facteur de transfert sol/plante d'un élément

Introduction générale

Le sélénium (Se) est aujourd'hui reconnu en tant qu'oligo-élément indispensable à la réalisation de nombreux processus biologiques des organismes vivants (microorganismes, animaux et Homme). Par exemple, Se est incorporé sous forme de sélénocystéine dans de nombreuses enzymes ayant un rôle antioxydant, et impliqué dans la maturation des hormones thyroïdiennes (Rayman, 2000). De plus, des observations cliniques ont suggéré une action préventive dans certains cancers (Rayman *et al.*, 2005). Pour autant Se est un élément ambivalent et il devient toxique dans un intervalle étroit de concentrations.

Bien que le sélénium soit peu abondant dans l'écorce terrestre, il est ubiquiste dans l'environnement. En plus des sources naturelles, des sources anthropiques sont également responsables de son émission dans l'environnement. Le sélénium peut exister sous diverses formes physico-chimiques et différents états d'oxydation dont la répartition qualitative et quantitative détermine la réactivité environnementale de Se ainsi que ses aspects bénéfiques ou toxiques. A titre d'exemple, dans la province de Zhangjiakou (Chine), les habitants présentant des maladies associées à des carences en sélénium vivaient pourtant à proximité des sols les plus riches en Se de la région (Johnson *et al.*, 2000).

Par ailleurs, le sélénium est un élément qui doit également être pris en compte dans le contexte de l'évaluation du risque radiologique associé aux déchets nucléaires. En effet, son isotope radioactif ^{79}Se (émetteur β ; $T = 3.3 \cdot 10^5$ ans) (Jörg *et al.*, 2010) est un produit de fission de l'uranium-235 (production 0.049%; Nichols *et al.*, 2008). Il est donc présent dans le combustible usagé ainsi que dans les déchets nucléaires provenant du retraitement de ce combustible, relevant de la catégorie des déchets à Haute Activité et à Vie longue (HAVL). La loi Bataille du 30 décembre 1991, reprise dans l'article L.542 du Code de l'environnement, amendée par la loi du 26 Juin 2006 sur la Gestion durable des déchets et matières radioactifs a confié à l'Andra (Agence Nationale pour la gestion de déchets radioactifs) la mission d'évaluer la sûreté d'un stockage des déchets radioactifs HA-MAVL en formation géologique profonde. Les caractéristiques géologiques du site de Bure (Meuse/Haute-Marne), de formation argileuse (Callovo-Oxfordien), ont conduit à la construction des laboratoires souterrains en 1999 (Andra, 2005). En complément, l'Andra a mis en place en 2007 un Observatoire Pérenne de l'Environnement (OPE) au voisinage de l'implantation du laboratoire souterrain. Cet observatoire a pour objectif d'établir l'état initial de l'environnement du futur stockage mais également de suivre son évolution pendant la construction et pour toute la durée d'exploitation (100 ans) du centre. Ce dispositif inclut des outils d'observation et des zones d'expérimentation.

De nombreuses problématiques environnementales et de santé publique, notamment dans les contextes de l'analyse de sûreté du stockage des déchets radioactifs, de la décontamination des sols sélénifères ou de l'utilisation des fertilisants enrichis en Se dans les sites pauvres en Se nécessitent de bien comprendre les processus qui régissent sa mobilité et son temps de résidence dans les écosystèmes. A l'heure actuelle, la prédiction du devenir de Se sur une longue échelle de temps (10 000 ans) est basée sur des modèles mathématiques (simples) utilisant des coefficients de transfert (TF) ou de distribution (K_d) pour rendre compte de sa distribution aux interfaces sol/plante et sol/solution de sol respectivement. L'utilisation de ces coefficients globaux présente de nombreuses imperfections vis-à-vis du sélénium, sa réactivité étant directement reliée à sa spéciation, elle-même contrôlée par différents processus biotiques et abiotiques. La prise en compte de la réactivité de Se dans les compartiments clés de la biosphère (sols et végétaux) demeure un des points faibles de ces modèles. Les données de la littérature à ce sujet restent encore fragmentaires et les expérimentations reportées s'effectuent généralement en présence de concentrations très supérieures à celles présentes en milieu naturel.

Ce travail de thèse s'inscrit dans ce contexte d'amélioration des modèles de prévision des risques radio-écotoxicologiques à long terme et s'intègre aux actions menées par l'Andra pour la surveillance et la sûreté du stockage en profondeur.

Dans le **chapitre A**, une synthèse bibliographique est présentée, exposant d'abord les propriétés chimiques et biologiques de Se, son impact sur la santé humaine et sa présence dans l'environnement. Un bilan des connaissances concernant sa dynamique dans les deux compartiments de l'écosystème qui sont au cœur de la problématique traitée, les sols et les végétaux, y est ensuite présenté. Enfin, les outils analytiques permettant la détermination de Se et de sa spéciation sont également détaillés. A la fin de ce chapitre, les objectifs et axes de recherche développés dans ce travail seront présentés.

Le **chapitre B** présente pour la première fois la caractérisation du cycle global de Se naturellement présent dans un écosystème forestier et la quantification des stocks et flux entre les principaux compartiments (sol, végétation, eaux). Une approche classique telle que généralement employée pour la caractérisation du cycle biogéochimique des éléments majeurs (modèle conceptuel multi-boîtes) a été utilisée. Une présentation détaillée de ces modèles est fournie en première partie de ce chapitre après la description du site expérimental forestier de Montiers

Le Chapitre C est consacré aux compartiments sol et végétaux dans lesquels la réactivité de Se a été étudiée à l'aide de traceurs isotopiques stables. La précision et la justesse de la mesure des rapports isotopiques étant essentielles pour une détermination précise des concentrations respectives du traceur et du sélénium natif, la correction et le contrôle des interférences au niveau des faibles concentrations étudiées doivent être maîtrisés. La méthodologie du traçage isotopique ainsi que son optimisation sont décrites dans une première partie (**Chapitre C.I**).

La deuxième partie (**Chapitre C.II**) vise à une meilleure compréhension des processus impliqués dans la rétention de Se dans le sol. Dans ce but, la méthodologie choisie a permis de suivre simultanément l'évolution temporelle de la distribution de Se et de sa spéciation dans trois types de sol (culture, prairie et forêt) tout en distinguant le comportement de Se naturellement présent de celui de Se fraîchement apporté. Cette étude a été menée *in situ* sur une durée de 2 ans afin de se placer en conditions climatiques et environnementales réelles. Ce suivi de terrain a été rendu possible du fait de l'utilisation d'un traceur isotopique stable ($^{77}\text{SeIV}$) ajouté aux sols à l'état de trace (ajout équivalent à la teneur de Se naturellement présente) afin de simuler une contamination récente.

Dans la troisième partie (**Chapitre C.III**), les traceurs isotopiques ont été employés pour distinguer l'incorporation spécifique des deux formes inorganiques de Se par un modèle de plante simple à croissance rapide et non accumulatrice telle que le ray-grass (*Lolium Perenne* L.). En effet, l'utilisation de deux traceurs mono-spécifiques et quasiment mono-isotopiques ($^{77}\text{SeIV}$ et $^{82}\text{SeVI}$) permet de comparer les différences en termes de taux d'absorption, translocation et spéciation après une exposition simultanée aux deux formes inorganiques sélénées tout en intégrant les potentiels effets compétiteurs entre les deux espèces ajoutées.

Enfin, le dernier chapitre établit une synthèse des principaux résultats présentés dans la partie expérimentale et une conclusion générale en ouvrant des nouvelles perspectives.

Chapitre A

*Synthèse
bibliographique*

Ce travail de thèse est à l'interface de plusieurs disciplines (i.e biogéochimie, chimie du sol et de la plante, chimie analytique) comme en témoignent la variété de méthodologies et sujets abordés pendant les travaux de recherche.

Une première difficulté liée à la pluridisciplinarité du sujet est de constituer une bibliographie couvrant les différents domaines tout en restant pertinente. Le but de ce chapitre est donc de présenter un état de l'art le plus exhaustif possible, sur les études menées jusqu'à présent traitant des différents aspects de la biogéochimie du sélénium. Cette synthèse met en évidence les aspects encore mal connus ou non pris en compte.

La première partie est constituée d'une présentation générale sur le sélénium, ses propriétés physico-chimiques ainsi que son rôle biologique. Afin de situer Se dans un contexte plus global, l'étude bibliographique se poursuit avec un bilan sur l'allocation de Se, en terme de concentrations et spéciation, dans les différents compartiments de l'environnement.

Ensuite, la synthèse bibliographique se consacre aux différents processus de transfert, accumulation et transformations auxquels Se est soumis dans l'environnement et notamment dans le sol et les végétaux qui constituent les principaux supports d'étude de ce travail. Cette partie fait le point sur les paramètres importants contrôlant ces processus.

Enfin, la dernière partie de ce chapitre présente les principes des méthodes analytiques utilisées pendant cette étude (techniques de séparations chromatographiques et systèmes de détection), ainsi que les problèmes spécifiques liés à l'analyse de Se et comment les maîtriser.

1. GENERALITES SUR LE SELENIUM

Le sélénium (Se) a été découvert en 1817 par Jacob Berzelius et Gahn lors de l'étude de la méthode de préparation de l'acide sulfurique à partir de roche soufrée (pyrite). Du fait de la ressemblance avec le tellure (du mot latin «tellus», la terre), ils ont donné à ce nouvel élément le nom de sélénium, du mot grec «selene», la lune.

Cet élément trace a été considéré comme un élément strictement toxique jusqu'en 1935 date à laquelle son essentialité a été mise en évidence (Oldfield, 1999).

1.1 Chimie du sélénium

Le sélénium, de numéro atomique 34 et de masse atomique 78.96, fait partie de la famille des non-métaux, situé entre le soufre et le tellure dans le groupe 16 et, entre l'arsenic et le brome dans la période 4 du tableau périodique des éléments.

Dans l'environnement le sélénium, comme le soufre, peut exister sous quatre degrés d'oxydation: le séléniate (Se(VI)), le sélénite (Se(IV)), le sélénium élémentaire (Se(0)) et le séléniure (Se(-II)).

A l'état naturel, Se possède 6 isotopes stables: ^{74}Se , ^{76}Se , ^{77}Se , ^{78}Se , ^{80}Se et ^{82}Se dont l'isotope majoritaire est ^{80}Se . Il possède aussi 2 isotopes non stables qui n'existent pas à l'état naturel; ^{75}Se avec un temps de demi-vie d'environ 120 jours, et ^{79}Se ayant un temps de demi-vie de $3.3 \cdot 10^5$ ans (Jörg *et al.*, 2010). Ce dernier fait partie de la liste des radionucléides à haute activité et à vie longue (HAVL) susceptibles de perdurer dans la biosphère. Les masses atomiques des isotopes de Se ainsi que leurs abondances naturelles sont données dans le tableau A.1.

Tableau A. 1. Masses exactes et abondances isotopiques des isotopes de Se (Rosman *et al.*, 1997)

Isotope	Masse monoisotopique (g/mol)	Abondances isotopiques (%)	Période radioactive
⁷⁴ Se	73.922	0.89	-
⁷⁵ Se	74.923	0.00	119,78 j
⁷⁶ Se	75.919	9.37	-
⁷⁷ Se	76.920	7.63	-
⁷⁸ Se	77.917	23.77	-
⁷⁹ Se	78.960	0.00	3.3 10 ⁵ a
⁸⁰ Se	79.917	49.61	-
⁸² Se	81.917	8.73	-

1.2 Le rôle biologique du sélénium

Le sélénium est un oligoélément essentiel pour les organismes vivants (Homme; animaux et microorganismes) étant indispensable à la réalisation de nombreux processus biologiques via divers composés organiques et protéines séléniés.

1.2.1 Sélénium et santé humaine

La frontière entre les concentrations de sélénium physiologiquement essentielle et toxique est très étroite. La dose minimale requise par jour chez l'Homme est de 55 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (RDA: Recommended Dietary Allowance) (National Research Council, 2000) et la dose maximale acceptable est de 350 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (UL: tolerable Upper intake Level) (Goldhber *et al.*, 2003). Cette ambivalence a fait du sélénium un élément de grand intérêt pour la communauté scientifique.

1.2.1.1 Carence en sélénium

Deux maladies endémiques liées à une déficience en Se dans l'alimentation ont été détectées dans des régions séléniprives en Chine dans les années 70-80 (teneurs en Se total dans les sols entre 123-178 $\mu\text{g kg}^{-1}$) (Tan *et al.*, 2002).

La maladie de Keshan est une forme endémique de cardiomyopathie dilatée qui affecte surtout les enfants et les jeunes femmes. Les études ont montré que la supplémentation alimentaire en Se réduit l'incidence de cette maladie (Chen *et al.*, 2002).

La maladie de Kashin-Beck est une maladie ostéoarticulaire permanente et invalidante touchant le cartilage de croissance et articulaire des os longs. Les zones les plus à risque sont la Chine, la Corée du Nord et certaines régions de la Russie. L'étiologie de cette maladie reste controversée, mais des études ont suggéré comme facteurs responsables: la carence en sélénium, la contamination fongique de céréales et des concentrations importantes (50 mg kg⁻¹) d'acides fulviques dans l'eau potable (Peng *et al.*, 1992).

1.2.1.2 Sélénium et prévention de maladies

Hormis les maladies précédemment citées et qui sont associées directement à une carence en Se, des données récentes suggèrent le rôle majeur de cet élément dans de nombreuses situations physiopathologiques souvent associées à sa fonction biologique antioxydante.

Une relation entre la carence en sélénium et des taux plus élevés de mortalité causée par le virus HIV a été montrée (Holben *et al.*, 1999). En fait, le sélénium semble être un nutriment capital chez les sujets infectés par le virus du sida, et la séléniémie serait même un facteur prédictif de l'évolution de l'infection au virus.

Les teneurs les plus basses de Se ont aussi été observées chez les personnes affectées par des maladies du foie (cirrhose, hépatite) (Navarro Alcalaron *et al.*, 2002) et dans les états inflammatoires chroniques, comme les polyarthrites rhumatoïdes et l'ostéoartrite (Aeseth *et al.*, 1998).

D'autres effets bénéfiques pour la santé humaine sont hypothétiquement associés à la présence du sélénium dans l'organisme, par exemple: (i) maintien des fonctions cognitives (Akbaraly *et al.*, 2007) et longévité (Akbaraly *et al.*, 2005; Ray *et al.*, 2006) (ii) essentialité pour la reproduction, plus précisément dans la synthèse de testostérone dans les spermatozoïdes (Rayman *et al.*, 2000); (iii) limitation de troubles, comme la dépression et l'anxiété et, (iiii) protection contre le risque cardiovasculaire (Rayman *et al.*, 2000).

L'implication du sélénium dans la prévention du risque de cancer est documentée par différentes études, dont la plupart rapportent une forte corrélation entre les niveaux plasmatiques en sélénium apporté par le régime alimentaire, et la diminution de l'incidence de certains cancers comme le cancer du poumon, gastro-intestinal, du sein et de l'ovaire (Rayman *et al.*, 2005; Clark *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2006; Reid *et al.*, 2008; Wallace *et al.*,

2009). L'effet anticarcinogène passerait non seulement par un rôle des sélénoprotéines dans la protection antioxydante, la régulation redox et hormonale, mais également par celui de certains métabolites anticancéreux (méthylsélénol, sélénodiglutathion) (Combs *et al.*, 1998) qui semblent inhiber la prolifération cellulaire en stimulant l'apoptose et en inhibant l'angiogénèse, bien que ces mécanismes d'action ne soient pas encore entièrement élucidés. Toutes les molécules incorporant Se et pouvant facilement libérer du méthylsélénol via leurs intermédiaires métaboliques, peuvent donc être considérées comme potentiellement anticancérogènes.

Bien qu'une supplémentation en Se sous formes organiques (Sélénométhionine et Se-méthylsélénocystéine) à des concentrations plus élevées que les besoins journaliers ait montré une réduction d'incidence de tumeurs chez des animaux modèles (Combs *et al.*, 1998) il reste une forte controverse autour des propriétés anticarcinogènes potentielles de cette supplémentation sélénée à doses supra nutritionnelles. En effet d'autres études indiquent, au contraire, des risques de cancers et d'autres maladies induits par des doses élevées de sélénium (Stranges *et al.*, 2006; Bleys *et al.*, 2007). Il semblerait donc que le nombre d'évidences épidémiologiques et cliniques soit encore insuffisant afin de conclure sur le bénéfice éventuel d'un sur-dosage en Se sur la chimio prévention d'un cancer, quel qu'il soit.

1.2.1.3 Toxicité

Une consommation excessive peut également provoquer une intoxication ou sélérose (Ellis et Salt, 2003; Sager, 2006). Ces cas sont détectés dans les régions dites sélénifères dans lesquelles le sol contient du sélénium à des concentrations supérieures aux teneurs moyennes (USA, Chine, Venezuela) (Li *et al.*, 2011). D'autres cas de sélérose ont été observés chez des humains exposés à des niveaux dangereux de Se présent dans des aérosols (i.e travailleurs d'usines métallurgiques) (ATSDR, 2003) ou suite à une consommation excessive de suppléments alimentaires (Hathcock, 1997). En général les symptômes observés dans les cas de séléroses sont: perte de cheveux, ongles endommagés, déformation du système nerveux, éruption cutanée. Dans le cas d'une absorption de sélénium à forte dose, celui-ci est stocké dans les protéines sous forme de résidus sélénométhionyls à défaut de pouvoir être excrété via l'urine ou la respiration (Dumont *et al.*, 2006). Un niveau de substitution trop important de la méthionine par la SeMet pourrait en partie expliquer les effets toxiques du sélénium chez les mammifères dans le cas d'une surdose.

1.2.2. Formes biologiquement actives

1.2.2.1. Composés organo-séléniés

Les composés organo-séléniés jouent des rôles essentiels dans la biochimie de la cellule et en science de la nutrition. Le sélénium montre des propriétés similaires à celles du soufre et peut être facilement incorporé dans les biomolécules à sa place (Plant *et al.*, 2004).

Des différences existent entre la chimie du soufre et celle du sélénium, notamment entre les potentiels d'oxydoréduction ou d'ionisation des composés homologues. Par exemple, les composés séléniés ont tendance à être beaucoup plus nucléophiles que les composés soufrés (Arteel *et al.*, 2001). Le remplacement de S par Se dans la cystéine permet la formation de la sélénocystéine, dont les valeurs de pKa, différentes de la cystéine, indiquent son existence sous forme anionique au pH physiologique, ce qui facilite le rôle catalytique du sélénium incorporé dans les sélénoprotéines (Johansson *et al.*, 2005). De la même manière, Se présent sous forme de séléniol (RSeH) est chargé négativement au pH physiologique, ce qui est important pour son rôle catalytique (Tinggi *et al.*, 2008), alors que son homologue soufré est principalement neutre dans ces conditions. Par ailleurs, la force des liaisons C–Se dans les composés organo-séléniés est plus faible que dans les homologues soufrés résultant en une diminution de la stabilité des composés séléniés. Malgré leur similarité avec les composés soufrés, les homologues séléniés ne sont donc pas complètement interchangeables dans les systèmes biologiques.

De nombreux composés organiques contenant Se ont été mis en évidence chez divers organismes vivants (Lobinsky *et al.*, 2000; McScheehy *et al.*, 2003; Yamashita *et al.*, 2010; Klein *et al.*, 2011), quelques exemples sont présentés dans le tableau A.2.

Tableau A. 2. Composés organiques et inorganiques de Se identifiés chez divers organismes

CH ₃ -Se-CH ₃	DMSe	Diméthylséléniure
CH ₃ -Se-Se-CH ₃	DMDSe	Diméthyldiséléniure
HSeO ₄ ⁻ /SeO ₄ ²⁻	Se(VI)	Séléniate
H ₂ SeO ₃ /HSeO ₃ ⁻ /SeO ₃ ²⁻	Se(IV)	Sélénite
(CH ₃) ₃ -Se ⁺	TMSe ⁺	Ion Triméthylsélénonium
C ₃ H ₇ NO ₂ Se	Se-Cys	Sélénocystéine
CH ₃ SeO ₂ H	MSA	Acide méthaneséléinique
C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄ Se ₂	(Se-Cys) ₂	Sélénocystine
C ₅ H ₁₁ NO ₂ Se	Se-Met	Sélénométhionine
C ₆ H ₁₃ NO ₂ Se	Se-Et	Sélénoéthionine
C ₄ H ₉ NO ₂ Se	MeSeCys	Se-méthylséléno-cystéine
C ₆ H ₁₅ NO ₂ Se	MeSeMet	Se-méthylséléno-méthionine
C ₉ H ₁₅ N ₃ O ₂ Se		Sélénonéine
C ₁₀ H ₁₈ N ₃ O ₂ Se		Méthyl-sélénonéine
C ₄ H ₉ NO ₂ Se	Se-Hcy	Sélénohomocystéine
C ₄ H ₁₂ N ₂ Se ₂	SeCya	Sélénocystamine
C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₄ S		Sélénocystathione
C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₄ Se		Sélénocystathionine
C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄ Se		Sélénoanthionine
C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₅ Se	γ-glu-MeSeCys	γ-glutamyl-Se-méthylcystéine
C ₁₄ H ₂₀ N ₆ O ₅ Se		Se-adénosylséléno-homocystéine
CH ₄ N ₂ Se		Sélénourée

1.2.2.2. Se dans les protéines

Le sélénium peut être incorporé dans les peptides et protéines. Ces composés sont présents dans tous les tissus humains (principalement dans le foie et les reins) (Reilly *et al.*, 1993). Au contraire des protéines complexant des métaux, Se est lié de façon covalente dans la protéine par une liaison C–Se. On peut distinguer deux catégories de protéines sélénées: les protéines contenant Se (protéines sélénées) et les sélénoprotéines. Dans le premier groupe, le sélénium est incorporé de façon non spécifique sous forme de SeMet au niveau du codon méthionine par mimétisme chimique. Dans le second groupe, Se est incorporé de manière spécifique en tant que sélénocystéine (SeCys), actuellement considérée comme le 21^{ème} acide aminé, et n'est pas incorporé par un codon spécifique mais via le codon UGA, qui joue également le rôle de codon stop. Ce mécanisme d'incorporation spécifique de la sélénocystéine est présent dans les trois domaines du vivant (bactéries, archées et eucaryotes) avec des exceptions. Il

semble que les végétaux supérieurs et les levures dont *Saccharomyces cerevisiae* n'ont pas cette capacité (Hatfield *et al.*, 2009). Une représentation schématique des deux types de protéines est fournie par la figure A.1.

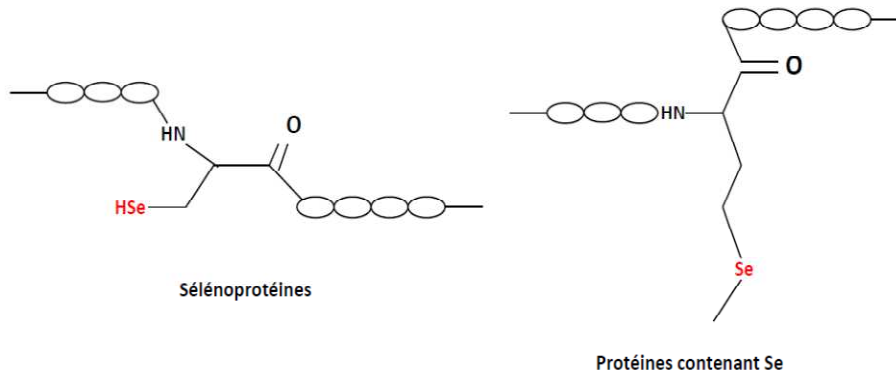


Figure A. 1. Représentation schématique de l'incorporation de Se dans les protéines (adapté de Dumont, 2006)

La synthèse des sélénoprotéines dépend de la disponibilité de Se: quand la consommation alimentaire de cet élément est insuffisante, la synthèse est réduite.

Se est essentiel pour le fonctionnement d'enzymes anti-oxydantes, notamment la glutathion peroxydase (GPx) qui contient SeCys dans son site actif.

La sélénoprotéine P est une glycoprotéine, qui contient plus de dix molécules de SeCys dans sa chaîne polypeptidique. Il est reconnu que cette protéine est une importante source de Se, 60-70 % de la quantité de Se présente dans le plasma étant liée à cette protéine. Cette protéine possède une activité antioxydante (Saito *et al.*, 1999). Sa fonction précise reste encore inconnue, mais il semble qu'elle soit impliquée dans le transport de Se et dans la défense oxydante (Raymond *et al.*, 2009).

A ce jour, 35 sélénoprotéines sont connues, soit isolées et purifiées, soit mises en évidence par les outils bio-informatiques. Leurs fonctions sont résumées dans le tableau A.3.

Tableau A. 3. Sélénoprotéines connues et leurs fonctions (d'après Bianga, 2013)

Nom de la protéine	Localisation	Fonction	Phénotype
<i>Enzymes antioxydantes</i>			
Glutathion peroxydase 1 (GPx1)	Cytosol, Abondant dans les érythrocytes et dans le foie	réduction de H ₂ O ₂ et des quelques peroxydes organiques	cardiomyopathie dans le cas de manque d'expression du gène codant
Glutathion peroxydase 2 (GPx2)	cytosol, abondant dans le foie et système gastro- intestinal	Réduction des peroxydes organiques acides (e.g. t- butylhydroperoxyde, acide linoléique cumène hydroperoxydes)	-expression élevée dans quelques tumeurs
Glutathion peroxydase 3 (GPx3)	plasma, extracellulaire	Réduction des acides gras et hydroperoxydes phospholipidiques	-sa déficience entraine des thromboses et provoques des attaques d'apoplexie
Glutathion peroxydase 4 (GPx4, PHGPx)	cytosol, mitochondrie, noyau	-Réduction des phospholipides et hydroperoxydes - détoxification des molécules intégrées dans la membrane Il peut utiliser le groupe thiol des protéines comme donneur d'électrons - rôle majeur dans la prévention du dommage oxydatif dans la mitochondrie	- son manque d'expression au stade embryonnaire est létal
Glutathion peroxydase 6 (GPx6)	cytosol – épithélium olfactif et tissus embryonnaires		
Méthionine- R-sulfoxyde réductase 1 (MrsB1)	cytosol, noyau abondant dans le foie et les reins	Réduction de l'oxyde de méthionine	
Sélénoprotéine W (SepW1)	cytosol, muscles	-forte affinité pour le glutathion	- résistance au stress oxydatif dans le cas de sur expression
Sélénoprotéine H (SelH)	noyau	- Prévention du stress oxydatif, - régulation de la synthèse de glutathion et cytochrome C	

Sélénoprotéine O (SeIO)	mitochondrie		
Sélénoprotéine T (SeIT)	réticulum endoplasmique (ER) et Golgi	homéostasies de réactions redox dans la cellule	- son manque d'expression se traduit par une augmentation de l'expression des protéines oxydoréductases
Sélénoprotéine K (SeIK)	membrane de ER, squelette muscle, coeur pancreas, foie, placenta	-prévention du stress oxydatif	-son manque d'expression se traduit par une suppression de la réponse immunitaire et un désordre de l'homéostasie du Ca ²⁺
Sélénoprotéine M (SeIM)	ER	-neuroprotective, prévention du stress oxydatif	-sa surexpression diminue les ROS et l'entrée intracellulaire de Ca ²⁺ - Son manque d'expression se traduit par une apoptose cellulaire et un incrément de Ca ²⁺
Sélénoprotéine N (SeIN)	ER membrane; Muscle squelette, Coeur, poumon, placenta	- contrôle de la chaîne de transport intracellulaire Ca ²⁺	
Sélénoprotéine V (SeIV)	cytosol, spermatides		
activité réductrice			
Thioredoxine reductase1 (TRxR1 , TR1, Txnrd1)	cytosol, plasma,	- activité réductrice en combinaison avec la protéine thiorédoxine disulfure. -impliqué dans la synthèse de déoxyribonucléotide	problème dans le contrôle du mécanisme d'apoptose avec une augmentation du risque de cancer associé à une diminution de son activité enzymatique
Thioredoxin reductase 2 (TRxR2 , TR3, Txnrd2)	mitochondries	- activité réductrice	-son manque d'expression cause la mort de l'embryon, apoptose des cellules du foie, et anomalies cardiaques - Syndromes de la maladie de Keshan
Thioredoxin reductase 3 (TRxR3 , TGR, TR2, Txnrd3) P	plasma, testicules	-réduction de thiorédoxine et glutathion -Impliqué dans la maturation du sperme - catalyses l'isomérisation des protéines en formant des liaisons disulfures	
Régulation hormones thyroïdiennes			
Thyroid hormone deiodinase 1 (DIO1 , DI1)	plasma membrane	Impliqué dans la régulation des hormones thyroïdiennes	-son manque d'expression se traduit par une augmentation de l'excrétion d'iode
Thyroid hormone deiodinase 2 (DIO2 , DI2)	ER, dominant dans le cerveau, Muscle squelette, coeur système nerveux	Impliqué dans la régulation des hormones thyroïdiennes	son manque d'expression se traduit par une faible tolérance au glucose et un désordre du système nerveux

	central ; glandes thyroïdiennes		
Thyroid hormone deiodinase 3 (DIO3, DI3)	ER, dominant dans le cerveau, placenta et utérus	Impliqué dans la régulation des hormones thyroïdiennes	-son manque d'expression se traduit par une réduction de la circulation de T3 et T4. développement retardé
Synthèse de sélénophosphate			
Selenophosphate synthase 2 (SPS2)	Cytosol	Catalyse la synthèse de monosélénophosphate à partir d'ATP et séléniure	
Sélénoprotéine P (SeIP)	Plasma, foie	Décelée dans le plasma et associée aux cellules endothéliales. Semble protéger celles-ci contre les lésions dues au peroxy-nitrite	son manque d'expression se traduit par une dégénération neuronale, diminution de l'expression de Se-protéines dans les tissus endothéliaux, infertilité masculine
Pliage de protéines			
Sélénoprotéine S (SeIS, SEPS1, Tanis, VIMP, SELENOS)	ER	Impliqué dans la dégradation des protéines associées à l'ER	surexprimé en condition d'inflammation
15kDa sélénoprotéine (Sep 15)	ER	impliqué dans le pliage de protéines (folding)	son manque d'expression se traduit par une cataracte congénitale
Sélénoprotéine I Ethanolaminephosphotranspherase	Membrane	Catalyse la synthèse de la phosphoéthanolamine	

1.3 Le sélénium dans l'environnement

Le sélénium est un élément très peu abondant (élément trace), mais cependant largement répandu avec des concentrations dans l'écorce terrestre allant de 0.03 à 0.8 mg kg⁻¹ (Tamari,1998). Il se retrouve dans tous les principaux compartiments environnementaux via divers transferts schématisés dans la figure A.2.

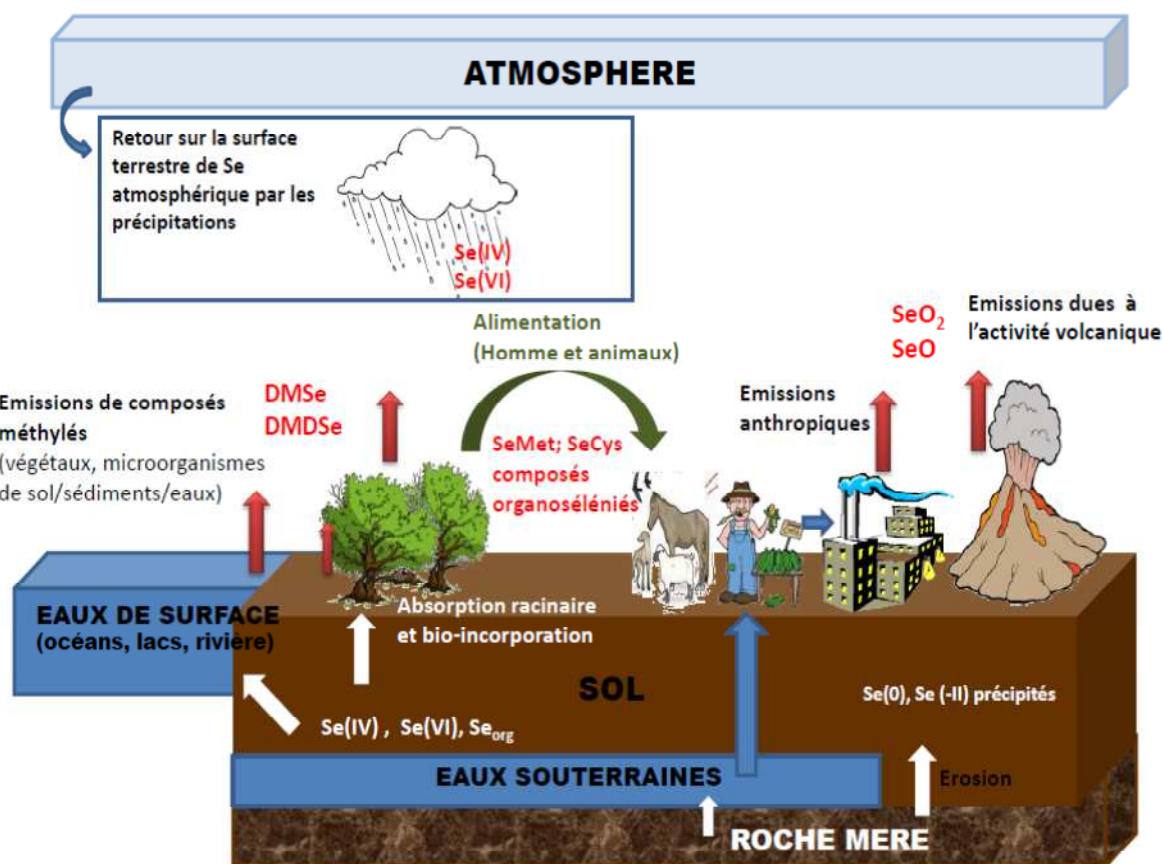


Figure A. 2. Représentation schématique du cycle environnemental de Se (adapté de Tolu, 2012)

1.3.1 Sources et utilisations du sélénium

Comme pour beaucoup d'autres éléments, la présence de Se dans l'environnement n'est pas uniquement d'origine naturelle mais également liée aux activités anthropiques. En effet, le sélénium est un élément largement utilisé par l'Homme à des fins industrielles et médicales avec une production mondiale de l'ordre de 2700 tonnes par an (Labbé et Christmann, 2011).

Les utilisations de Se et de ses composés peuvent être divisées en diverses catégories comme résumé dans la figure A.3 (George *et al.*, 2010).

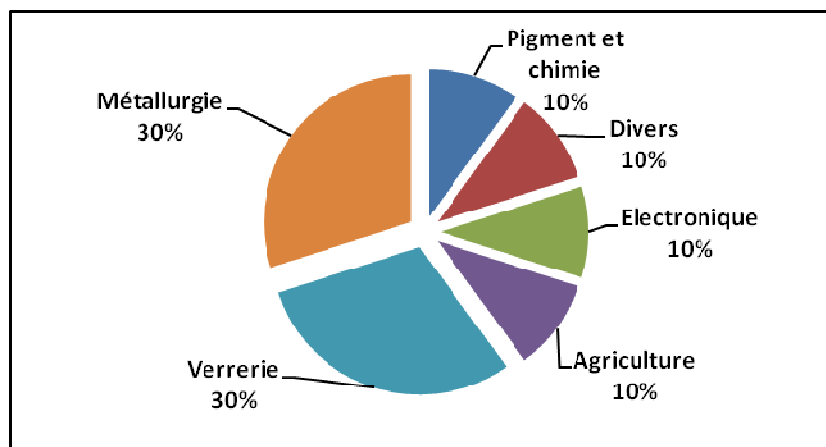


Figure A. 3. Répartition approximative des usages de Se et de ses composés par secteur (d'après George *et al.*, 2010)

Au vu de ses propriétés photosensible et semi-conductrice, Se est utilisé dans l'industrie électrique et électronique pour la fabrication de redresseurs de courant, de tambours de photocopieurs et de cellules photoélectriques. Il est aussi employé dans l'industrie du verre et de la céramique pour la décoloration et la pigmentation. D'autre part, le sélénium est utilisé en métallurgie afin de préparer des alliages facilement usinables et résistants à la corrosion. La métallurgie et la verrerie représentent les activités les plus consommatrices de Se. Dans le domaine alimentaire et pharmaceutique, Se est utilisé comme complément alimentaire et comme fongicide pour le traitement des pellicules et d'autres maladies de la peau (George, 2003). Enfin, Se est utilisé en agriculture, pour la fertilisation des sols pauvres en Se (Gissel – Nielsen *et al.*, 1984; Eurola et Hietaniemi, 2000; Premarathna *et al.*, 2010), dans la fabrication des insecticides et fongicides et pour l'alimentation des animaux.

La distribution de Se dans l'environnement terrestre reste encore mal comprise. L'érosion des roches mères a été présentée comme la première source de Se dans le sol (Fernandez-Martinez et Charlet, 2009). Néanmoins, ce seul facteur ne peut expliquer la distribution de Se qu'à une échelle localisée, dans une région ayant une quantité très élevée de sélénium dans la roche mère. Par exemple des teneurs élevées en Se (entre 100 et 1000 mg kg⁻¹) ont été observées dans des sols dérivés de schistes carbonatés (Enshi, Hubei Province, Chine) (Fordyce *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2001) et de schistes sédimentaires du Crétacé et du Tertiaire (Vallée de San Joaquin, Californie, USA) (Tokunaga *et al.*, 1991; Martens et Suarez, 1997a).

Le cycle global de Se est également fortement influencé par l'atmosphère qui peut agir comme source de Se terrestre via des apports par voies sèche (dépôts de particules) ou humide (précipitations), cette dernière étant la principale voie de dépôt de Se (Haygarth *et al.*, 1991). Haygarth *et al.* (1994) ont reporté que les dépôts humides peuvent contribuer à environ 15% de la teneur en sélénium dans les sols, et entre 33 et 82 % du prélèvement foliaire par les plantes. Les apports atmosphériques sont à la fois d'origines naturelle et anthropique.

Le milieu marin a été identifié comme représentant la première source d'émission atmosphérique d'origine naturelle avec 60 à 80 % de Se atmosphérique émis naturellement (Wen et Carignan, 2007). Les émissions naturelles peuvent également provenir des continents via la volatilisation de Se à partir des sols, sédiments, eaux douces et plantes (Terry *et al.*, 1992; Amouroux *et al.*, 2000; 2001; Bañuelos *et al.*, 2007; Vriens *et al.*, 2014) à travers le processus de biométhylation (Chasteen and Bentey, 2003). De plus, les éruptions volcaniques engendrent une quantité importante de poussières et de gaz qui apportent entre 100 et 1800 tonnes de sélénium par an (Haygarth *et al.*, 1994; Floor et Roman-Ross, 2012).

Environ 40 % du sélénium atmosphérique est d'origine anthropique. Les sources anthropiques les plus importantes sont la combustion du charbon (Yudovich *et al.*, 2006) ainsi que les activités industrielles de raffinage des métaux par traitement thermique (Mosher *et al.*, 1987). D'autres sources anthropiques sont dans une moindre mesure responsables des émissions de Se dans l'environnement, par exemple: les exploitations minières, les pratiques agricoles (fertilisants, insecticides et fongicides contenant Se) et certains processus industriels (Lemly, 2004).

Le taux de déposition de Se par voie humide et/ou sèche est donc fortement affecté par la proximité géographique des sources d'émission. Il est donc plus important dans les régions industrielles et côtières (Haygarth *et al.*, 1993).

1.3.2. Répartition de Se dans les compartiments environnementaux

1.3.2.1. Atmosphère

En dehors des zones volcaniques, la teneur moyenne en Se observée dans l'atmosphère est estimée à 0.04 ng m^{-3} , mais peut atteindre une dizaine de ng m^{-3} dans la plupart des zones industrielles (Fordyce, 2005).

Le sélénium atmosphérique peut être d'origine naturelle (60 %), issu de l'activité volcanique et l'érosion éolienne (Nriagu *et al.*, 1991) et, essentiellement de la biométhylation de Se par les micro-organismes dans les océans (Amouroux *et al.*, 2001), les eaux douces, les sédiments (Bañuelos *et al.*, 2007) et les sols, ainsi que par des organismes majeurs comme les plantes (Terry *et al.*, 2000). Une partie de Se atmosphérique (40%) est également d'origine anthropique (i.e combustion de charbon et raffinage des métaux (cf. § 1.3.1).

Les formes volatiles de Se incluent: oxyde et dioxyde de sélénium, diméthylséléniure (DMSe) et diméthylsélénure (DMDS). Ces composés sont liés aux particules de faible diamètre (< 1 µm). Le sélénium particulaire est solubilisé et oxydé en Se(IV) et Se(VI) lors d'épisodes de précipitations qui représentent donc la voie principale de retour à la surface de la Terre (sols et eaux de surface) du sélénium atmosphérique (Haygarth *et al.*, 1994).

1.3.2.2. Eaux

Dans l'écosystème aquatique, le sélénium est issu du lessivage des sols. Les teneurs moyennes de Se dans les eaux naturelles sont généralement très faibles, de l'ordre de 0.1 à 1 µg L⁻¹. La concentration moyenne dans les eaux de mer varie communément entre 0.1 et 0.35 µg L⁻¹ et les océans présentent une teneur moyenne autour de 0.1-0.2 µg L⁻¹ (Reimann et de Caritat, 1998; ATSDR, 2003; Kabata-Pendias et Mukherjee, 2007).

En ce qui concerne les eaux de rivières, les concentrations en Se varient entre 0.02-0.5 µg L⁻¹, avec une moyenne de 0.07 µg L⁻¹ (Gaillardet *et al.*, 2003). Ces valeurs peuvent être nettement supérieures si les rivières longent des zones agricoles.

La gamme de concentration de Se dans les eaux de pluie se situe entre 0.04 et 1.4 µg L⁻¹ et pour l'eau des banquises polaires la teneur en Se est autour de 0.02 µg L⁻¹ (Plant *et al.*, 2004). Les eaux de nappes phréatiques sont plus riches en Se que les eaux de surface. Cependant, comme observé pour les sols, les concentrations peuvent être très variables, et atteindre des valeurs beaucoup plus élevées, parfois supérieures au seuil de potabilité en Se (10 µg L⁻¹) fixé par l'US EPA (Environmental Protection Agency en 1992). C'est le cas de certaines régions de Chine, où la concentration dans les aquifères peut dépasser 1 mg L⁻¹ (Plant *et al.*, 2004) ainsi que des sites de Kesterson (Vallée de San Joaquin, Californie, USA) et de Kendrick (Wyoming USA) (Ramirez et Rogers, 2000). Généralement, dans la majorité des sols, le sélénium le plus labile est celui apporté sur la surface de sol par les dépôts atmosphériques qui est rapidement lessivé vers les nappes phréatiques (Haygarth *et al.*, 1994). Wang *et al.* (1994a),

ont reporté une augmentation des quantités de Se détectés dans les ruisseaux et les rivières en Finlande (jusqu'à une teneur moyenne de $180 \mu\text{g L}^{-1}$) suite au programme d'utilisation de fertilisant enrichi en Se.

Le sélénium est essentiellement présent dans les eaux sous forme inorganique aux états d'oxydation IV et VI. La répartition de ces deux espèces dépend du type d'eau, de la profondeur, de l'aération, des conditions d'oxydoréduction et du pH du milieu. Les formes plus réduites, Se(-II) et Se(0), sont généralement présentes dans les eaux anoxiques (Robberecht *et al.*, 1982). Le sélénium dissous peut se trouver libre en solution, être absorbé par un organisme (micro-organismes, plantes et algues) ou associé à la matière colloïdale organique/et ou inorganique. Suite à son incorporation par les organismes aquatiques, le sélénium inorganique peut être converti en composés organo-séléniés (TMS e^+ ; DMSe; DMDSe; SeCys) qui sont donc libérés dans le milieu. Ces composés, bien que présents en très faible quantité ($< 0.08 \mu\text{g L}^{-1}$), ont été détectés dans des eaux de rivières et souterraines (Cutter et Bruland, 1984). Des études ont également permis de détecter des composés méthylés volatils à la surface des océans, notamment le DMSe provenant de la biométhylation des séléniures organiques (Cooke et Bruland, 1987; Amouroux *et al.*, 1996; 2001).

1.3.2.3. Formations géologiques

Les roches représentent la première source de sélénium dans l'écosystème terrestre (Fernandez-Martinez et Charlet, 2009). La quantité totale de Se contenue dans les roches représente environ 40 % de la quantité totale présente dans l'écorce terrestre. Dans la croûte terrestre, la teneur moyenne en sélénium est de 0.05 mg kg^{-1} (Fernandez-Martinez et Charlet, 2009), cependant les concentrations en Se peuvent varier selon le type de roche et son origine (Tableau A.4.).

Les roches plutoniques sont plutôt pauvres en sélénium ($< 0.1 \text{ mg kg}^{-1}$). Par contre, les argiles, les schistes, les roches phosphatées, charbons et les dépôts riches en matière organiques contiennent généralement des concentrations plus élevées.

Tableau A. 4. Gamme de concentrations en Se dans les différents types de roches. La concentration moyenne mondiale est donnée entre parenthèses.

Types de roche	mg (Se) kg ⁻¹	Ref
Roches magmatiques		
ROCHES PLUTONIQUES (ultrabasique, gabbro, intermédiaire, granite)	0.01-0.11	Kaljonen, 1973a, Seby 1994, Malisa, 2001
ROCHES VOLCANIQUES (basalte, andésite, rhyolite)	0.16-0.55 (0.35)	Kaljonen, 1973a, Malisa, 2001, Fernandez-Martinez et Charlet 2009
Roches sédimentaires		
ARGILES	0.3-0.6	Kabata-Pendias, 2007
GRES	0.01-0.08	Kabata-Pendias, 2007
CALCAIRE	0.03-0.08	Fernandez-Martinez et Charlet 2009
CALCAIRE CARBONATE (Chine)	30	Simonoff et Simonoff, 1991
CHARBON	0.2-75 (1.3)	Ydovich et Ketris, 2005
Roches métamorphiques		
SHISTES	0.05-0.06	Fernandez-Martinez et Charlet 2009
SHISTES CARBONATES (Chine)	206-280	Fernandez-Martinez et Charlet 2009
SHISTES (Usa)	1-675	Fernandez-Martinez et Charlet 2009
Roches phosphatées	1-300 (1)	Fernandez-Martinez et Charlet 2009

Dans les roches sédimentaires, Se est associé à la fraction des argiles et donc ses teneurs dans les sédiments argileux (0.3-0.6 mg kg⁻¹) sont significativement supérieures par rapport à celles présentes dans les grès et le calcaire.

Il existe approximativement 50 minéraux de Se dont les plus abondants sont: la klockmannite (CuSe); la ferroselite (FeSe₂); la clausthalite (PbSe), la naumannite (Ag₂Se) et la tiemmanite (HgSe) (Kabata-Pendias, 2001). De plus, Se peut se trouver sous forme réduite (Se(-II)) se substituant au soufre dans les sulfures métalliques, tels que la pyrite (FeS₂), la galène (PbS) et la chalcopyrite (CuFeS₂) (Masscheleyn *et al.*, 1991; Simonoff et Simonoff, 1991). Dans le charbon à faible teneur en soufre, le sélénium est associé à la matière organique et/ou aux minéraux argileux (Bai *et al.*, 2003). Dans les roches phosphatées, Se peut se trouver également associé à la matière organique (Kulp et Pratt, 2004).

L'altération des roches conduit à une libération de sélénium dans les sols via principalement l'oxydation de Se présent dans les minéraux pour former des oxyanions séléniés (SeIV et SeVI) mobiles dans les eaux de ruissellement et d'infiltration (Kulp et Pratt, 2004; Metamoros-Velozza *et al.*, 2011).

1.3.2.4. Sols

L'occurrence de Se dans les sols, liée à l'érosion de la roche mère et aux apports atmosphériques d'origine naturelle et/ou anthropique (c.f § 1.3.1), peut être affectée par les eaux de percolation et de surface. La concentration moyenne en sélénium dans les sols est d'environ 0.4 mg kg^{-1} (Plant *et al.*, 2004; Kabata-Pendias et Mukherjee, 2007;) mais une forte hétérogénéité spatiale est observée. Par exemple, il existe des zones géographiques dites sélénifères avec des teneurs en Se supérieures au mg kg^{-1} (i.e Canada, Chine, Irlande, Mexique, Amérique du Nord) et d'autres dites séléniprives, qui présentent de très faibles concentrations de Se, entre 0.1 et 0.2 mg kg^{-1} (i.e Nouvelle Zélande, les pays Scandinaves, et la région de Keeshan en Chine) (Combs *et al.*, 2001; Lenz et Lens, 2009).

Les teneurs en Se dans le sol sont principalement déterminées par des processus géochimiques, et peuvent être contrôlées par de nombreux facteurs. Par exemple, la présence d'une quantité importante de matière organique peut se traduire par une concentration plus importante de Se comme observé pour les sols développés à partir de roches sédimentaires qui sont plus riches en Se en comparaison aux sols d'origine volcanique ou granitique.

Le sélénium peut se trouver dans le sol sous quatre degrés d'oxydation et sous différentes formes inorganiques et organiques. Par ailleurs, il est susceptible de réagir avec les phases minérales solides, se complexer avec des ligands organiques ou inorganiques, participer à des réactions redox ou bien être transformé par des micro-organismes. Ces différentes réactions seront traitées plus en détail dans le paragraphe suivant (cf § 1.4.2).

1.3.2.4. Chaîne trophique terrestre

Du fait de sa présence dans l'environnement, le sélénium participe à la chaîne alimentaire de l'écosystème terrestre et est présent dans ses différents maillons (végétaux et animaux).

❖ Végétaux

Se est introduit dans la chaîne alimentaire via son incorporation dans les plantes, premier maillon de l'assimilation de Se bio-disponible des sols par les animaux et l'Homme.

La quantité de sélénium qui peut être prélevée par la plante dépend non seulement de la concentration totale de sélénium, mais également de sa spéciation dans les sols, elle-même

influencée à la fois par les paramètres physico-chimique (pH, potentiel rédox, composition minéralogique et organique) et par l'activité microbienne (transformation biotique).

Il existe différentes catégories de plantes selon leur capacité à accumuler Se. Certaines plantes sont capables d'hyper accumulation quand elles sont cultivées sur un sol riche en sélénium. Ces plantes, dites hyper-accumulatrices, incluent des espèces des genres *Astragalus*, *Stanleya*, *Morinda*, *Neptunia*, *Oonopsis* et *Xylorhiza*. Elles peuvent accumuler jusqu'à quelques g (Se) kg^{-1} (poids sec) dans leurs tissus (Zhu *et al.*, 2009).

La deuxième catégorie de plantes est définie comme accumulatrice secondaire ou accumulatrice, ces plantes peuvent accumuler jusqu'à 1 g(Se) kg^{-1} lorsqu'elles sont cultivées sur des sols présentant des teneurs variables en Se (Brown *et al.*, 1982). Des exemples de plantes appartenant à ce groupe sont certaines espèces des genres *Aster*, *Astragalus*, *Brassica*, *Atriplex*, *Castilleja*, *Grayia*, *Grindelia*, *Guitierrezia* et *Machaerathera*.

Enfin, les plantes non accumulatrices lorsqu'elles sont cultivées sur des sols non sélénifères peuvent contenir 0.01 à 1.0 mg(Se) kg^{-1} , ces teneurs peuvent atteindre 100 mg(Se) kg^{-1} si elles sont cultivées sur des sols sélénifères (Marchner *et al.*, 1999).

Les données relatives aux teneurs de Se dans les végétaux concernent essentiellement les végétaux alimentaires et les fourrages animaux. Les céréales, source la plus commune de Se dans le régime alimentaire humain font l'objet de nombreuses études. La gamme des teneurs de Se dans les céréales est estimée entre 100 et 800 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (poids frais) (Fordyce *et al.*, 2005).

La compilation des valeurs actuellement disponibles sur les teneurs en Se dans le fourrage montre que les concentrations de Se dans le ray-grass varient entre 2 et 174 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (poids sec; moyenne : 33 $\mu\text{g kg}^{-1}$), pour le trèfle et la luzerne entre 5 et 880 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (poids sec; moyenne 99 $\mu\text{g kg}^{-1}$) et pour les autres types de plantes de fourrage entre 4 et 870 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (poids sec; moyenne 66 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Les teneurs les plus élevées ont été retrouvées en Inde, Japon et Allemagne (Tableau A.5).

Tableau A. 5. Concentration de Se dans les fourrages de différents pays ($\mu\text{g kg}^{-1}$: DW) (Kabata-Pendias, 2001).

Pays	Ray-Grass		Trèfle ou luzerne		Foin ou autre plante	
	Gamme	Moyenne	Gamme	Moyenne	Gamme	Moyenne
Canada	5-23	13	5-31	15	-	-
Danemark	-	32	-	35	-	44
Allemagne	30-210	11	50-130	90	-	-
Finlande	1-54	11	-	-	2-48	14
	120-240 ^b	-	-	-	-	-
France	19-134	47	36-39	38	29-35	31
Inde	200-450	352	440-870	672	200-870	-
Japon	5-174	43	6-287	33	-	-
Suède	11-64	30	18-40	-	4-46	10
USA	10-40	32	30-880	320	28-360	98

^b Gamme de concentrations moyennes après le programme de fertilisations avec Se

Aux USA, les plantes non céréalières destinées à l'alimentation présentent des quantités en Se similaires, qui n'excèdent pas $100 \mu\text{g}(\text{Se}) \text{ kg}^{-1}$. Les concentrations moyennes sont plus élevées dans les racines et les tubercules ($13 \mu\text{g kg}^{-1}$ pour les pommes de terre et $17 \mu\text{g kg}^{-1}$ pour les carottes; poids frais) que dans les fruits (de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ dans les oranges à $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ dans les pommes; poids frais) (ATDSR 2003).

L'ail enrichi en Se (genre *Allium*) a été proposé comme un important supplément alimentaire (Ip et Lisk, 1993; Ip *et al.*, 2000c) ainsi que la noix du Brésil qui peut contenir jusqu' à $36 \text{ mg}(\text{Se}) \text{ kg}^{-1}$ si elle est cultivée sur un sol sélénifère et, 3.1 mg kg^{-1} si le sol présente des concentrations moyennes en Se (Chang *et al.*, 1995).

La spéciation du sélénium lors de son transfert dans les réseaux trophiques est essentielle. Il est donc nécessaire de tenir compte non seulement de la quantité de sélénium accumulée mais aussi de sa bio-incorporation (formation de composés organiques dont certains ont une potentielle activité anti-cancérogène). La spéciation de Se influence son assimilation par les consommateurs. Le devenir de Se dans les végétaux (i.e prélèvement, accumulation, translocation et métabolisme) sera traité en détail dans le paragraphe 3.

❖ Les animaux

Les animaux domestiques nécessitent des quantités de Se de 3 à 6 fois supérieures à celles essentielles pour l'Homme (Kabata-Pendias et Mukherjee, 2007). La quantité de sélénium requise par le bétail selon les National Academy of Science et National Research Council est de $0.3 \text{ mg(Se) kg}^{-1}$. Comme déjà vu pour l'Homme (c.f § 1.2.1.3), des risques de toxicité aigüe ou chronique liés au sélénium de même que des cas de carence peuvent être observés chez les animaux. Par exemple, un apport faible en Se dans l'alimentation peut provoquer plusieurs symptômes: apoptose hépatique, diathèse exsudative, fibrose du pancréas, faiblesse et dystrophie musculaire exc. Pour répondre aux cas de déficience en Se, différentes voies de supplémentation sont pratiquées: directe via l'administration par voie orale de compléments alimentaires enrichis en Se et/ou indirectement par l'utilisation de fertilisants contenant Se afin d'augmenter la teneur en Se des pâturages et cultures destinées à l'alimentation animale (Oldfield, 1992).

Des études ont montré que la supplémentation de l'alimentation animale semble avoir des effets positifs sur les hommes qui se nourrissent ensuite de ces animaux (Hartikainen, 2005).

Après ces généralités sur le sélénium dans les divers compartiments environnementaux en termes de concentration totale et spéciation, les parties suivantes se focalisent sur les compartiments qui sont au cœur de ces travaux de thèse: le sol et les végétaux en faisant un état de l'art des connaissances de la réactivité de Se dans ces compartiments.

2 SELENIUM ET SOL

2.1 Le système sol

Le compartiment "sol" joue un rôle clé dans le cycle des éléments trace. Il est une interface importante des échanges entre l'atmosphère, la biosphère, la lithosphère et l'hydrosphère terrestre. Il est un milieu vivant complexe et hétérogène dans lequel différentes interactions entre ses constituants et les acteurs de l'écosystème ont lieu (Figure A.4).

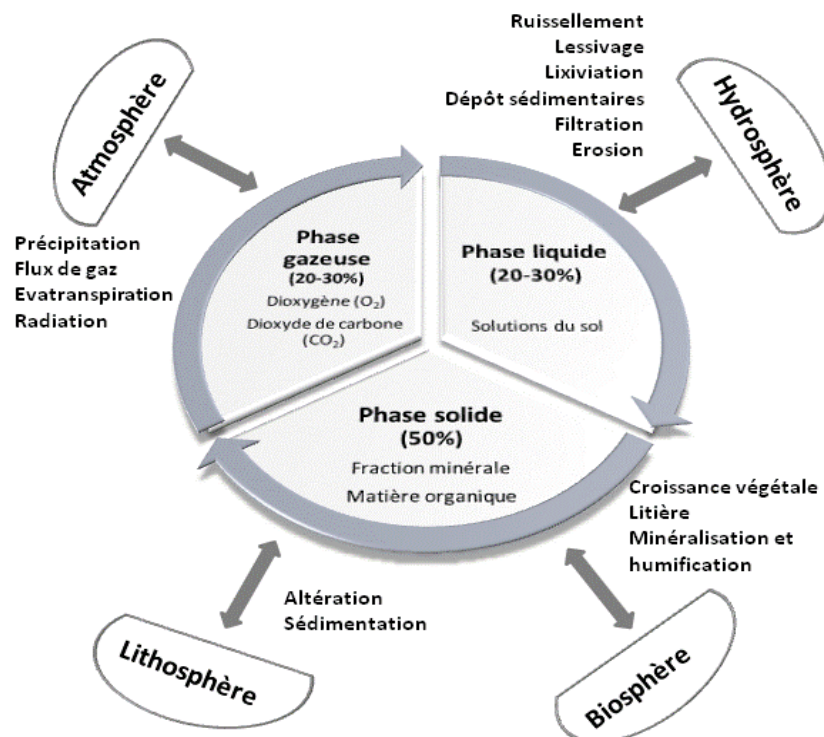


Figure A. 4. Le sol: interface de l'environnement (adapté de Marcic, 2005)

De façon simplifiée, le sol peut être considéré comme une matrice triphasée comprenant donc (i) une phase solide; (ii) une phase liquide; et (iii) une phase gazeuse.

2.1.1 Phase solide

La phase solide du sol est constituée des minéraux et de matière organique. Les minéraux des sols sont hérités de la roche mère (minéraux primaires; i.e quartz) ou sont formés dans les sols (minéraux secondaires; oxydes, hydroxydes et phyllosilicates).

Communément, les constituants de la fraction minérale sont classés selon leur taille granulométrique en trois catégories: (i) les sables (entre 2 mm et 50 μm); (ii) les limons (entre 50 μm et 2 μm) et les argiles (< 2 μm).

Les argiles sont généralement chargées négativement (Sposito, 1989) et offrent donc une forte réactivité de sorption vis-à-vis des cations présents dans la solution de sol. Inversement elles possèdent une faible capacité de rétention des espèces anioniques (Duc *et al.*, 2003). Cependant les argiles présentent localement des sites amphotères qui peuvent donc être chargés négativement ou positivement en fonction du pH (charges négatives en milieu alcalin; charges positives en milieu acide).

Les oxydes et les hydroxydes de fer, d'aluminium et de manganèse sont des composants clés de la réactivité du sol vis-à-vis des phénomènes de sorption des métaux et métalloïdes, en raison de la présence à leur surface de sites amphotères. Les oxydes et hydroxydes les plus abondants dans les sols sont la goethite ($\text{FeO}(\text{OH})$), l'hématite (Fe_2O_3), la gibbsite ($\text{Al}(\text{OH})_3$) et la magnétite (Fe_3O_4). Ils sont connus pour être des sites privilégiés de sorption des anions (Sposito, 1989). Les oxydes de Mn (vernadite (MnO_2), birnessite ($\text{K}_4\text{Mn}_{14}\text{O}_{27}9\text{H}_2\text{O}$)) sont présents dans une moindre mesure dans le sol et possèdent surtout une bonne capacité de sorption vis-à-vis des cations (Lenoble *et al.*, 2004b).

La fraction organique se trouve sous différentes formes qui se répartissent en quatre groupes (USDA, 1999):

- La *matière organique vivante* (MOV) qui englobe la totalité de la biomasse en activité (animale, végétale, fongique et microbienne).
- La *matière organique fraîche* (MOF) qui inclut les débris d'origine végétale, animale, fongique et microbienne.
- La *matière organique labile* (MOL) qui résulte de la décomposition de la MOF. Elle représente une source d'éléments nutritifs à court terme issus de sa minéralisation.
- La *matière organique stable* (MOS) qui provient de l'assemblage de certains produits transitoires et de matière minérale, produisant de nouvelles molécules de plus en plus complexes. Elle assure un réservoir des nutriments à moyen et long terme.

La MOF du sol évolue essentiellement par les processus de dégradation (minéralisation) et de recombinaison (humification). Les molécules les plus simples (i.e sucres) de la MOF sont facilement décomposées par les microorganismes et souvent complètement converties en composés minéraux solubles ou gazeux comme le CO₂. Les constituants plus complexes de la MOF (i.e lignine) sont en partie décomposés en molécules plus simples qui sont métabolisables. Le reste est utilisé pour la formation de molécules de plus en plus complexes (humification). Ces composés, les substances humiques (SH), peuvent être minéralisés à leur tour plus lentement que les molécules de la MOF (Duchaufour *et al.*, 2001). Cette minéralisation lente fournit une quantité d'éléments nutritifs régulière qui n'est pas influencée par la nature et la quantité des apports récents de MO au sol (i.e résidus de culture, chute de litière et engrais organiques)

Les SH, qui représentent autour de 80-90% de la MO des sols, sont classées en trois familles de composés selon leur degré de solubilité définis par des extractions chimiques spécifiques : (i) les acides fulviques (AF) solubles à pH acide, (ii) les acides humiques (AH) solubilisés en milieu alcalin et, (iii) les humines qui sont insolubles quelque soit le pH. Les substances humiques possèdent globalement des charges négatives conduisant à des sites de sorption potentiels pour de nombreux cations (Duchaufour *et al.*, 2001).

Les diverses substances organiques rencontrées dans le sol peuvent être présentes sous des formes libres ou à l'état de complexes, dans lesquels les molécules organiques (généralement AH et AF) peuvent s'associer par l'intermédiaire de cations bi ou trivalents (Ca²⁺, Al³⁺, Fe³⁺) formant des "ponts" électrostatiques. Des complexes organo-minéraux peuvent également être présents dans le sol, représentant une fraction importante des composés organiques du sol; l'évaluation de ces agrégats organo-minéraux reste encore assez délicate. Les complexes organo-minéraux sont essentiellement représentés par l'association de substances organiques et de minéraux argileux (micro-agrégats d'environ 2 µm) via l'établissement d'un ou plusieurs types de liaisons (électrostatiques, covalentes et hydrogène). Des macro-agrégats (> 250 µm) peuvent se former suite à l'interaction entre micro-agrégats ainsi que par association de ces complexes argilo-humiques autour de la MO particulaire (MOV et MOF) (débris végétaux et microorganismes). Bien que ces mécanismes soient très peu étudiés, ces complexes organo-minéraux semblent jouer un rôle important dans la rétention de métaux et métalloïdes tels que Se, qui peuvent ainsi être immobilisés par sorption via les groupes fonctionnels des fractions minérale et/ou organique ou, être séquestrés sous forme stable au sein des agrégats.

2.1.2 Phase liquide

Le cycle de l'eau du sol est alimenté par les précipitations et/ou par les irrigations. Les pertes se font par drainage et évapotranspiration. Les eaux du sol, en entrant en contact avec les phases solide et gazeuse, se chargent en substances minérales et organiques dissoutes et en gaz dissous. Elles transportent les substances nutritives nécessaires aux organismes vivants, mais également les polluants au sein du système sol et vers les nappes phréatiques.

Toute l'eau du sol n'est pas totalement disponible pour les plantes ou pour les aquifères. En effet, l'eau entretient avec les différents matériaux composant les sols, des relations particulières qui la rendent plus ou moins durablement indisponible. Ainsi, dans le sol, l'eau est présente sous diverses formes (Hillel, 1971):

- *L'eau de constitution* qui est considérée comme faisant partie de la structure chimique du sol, au sein des cristaux et des molécules minérales et organiques du sol. Elle n'est donc pas accessible au prélèvement racinaire et elle ne disparaît qu'après un séchage du sol à 105 °C.
- *L'eau de recueillement superficielle* ou "*hypodermique*" qui circule dans les horizons supérieurs parallèlement à la surface.
- *L'eau de rétention capillaire* qui malgré la gravité se maintient dans les pores fins (<10 µm), du fait de sa grande tension superficielle et de forces d'adhésion liquide-solide. Les plantes sont capables de mobiliser cette eau au niveau de leurs racines.
- *L'eau de gravité* ou *libre*, du fait de sa pesanteur, s'écoule verticalement dans le profil de sol en passant par les pores moyens et grossiers (> 10 µm). Les forces qui lient cette eau aux minéraux du sol sont trop faibles pour s'opposer à l'action de la gravité; elle percole jusqu'à ce qu'elle rencontre un niveau de roches plus imperméables. Par conséquent, l'eau va s'accumuler en saturant le niveau de roches sous-jacent en constituant une nappe phréatique qui représente une réserve hydrologique du sol.

- 2.1.3 Phase gazeuse

L'atmosphère des sols est constituée essentiellement de deux gaz à l'état libre ou dissous: (i) l'oxygène (O₂) qui contrôle la respiration des racines et de la flore microbienne, il est utilisé dans les réactions d'oxydation; (ii) le dioxyde de carbone (CO₂) formé suite à la respiration cellulaire, il est utilisé par les organismes autotrophes pour la synthèse de leurs constituants chimiques à partir de composés inorganiques simples.

De plus, la phase gazeuse du sol contient d'autres gaz qui sont produits et/ou consommés par les organismes vivants (tels que NO, N₂O, NH₃ et CH₄) ou encore de la vapeur d'eau (Duchaufour *et al.*, 2001).

2.2 Réactivité du sélénium dans les sols

Le sol est un milieu complexe et dynamique en constante évolution dans lequel les éléments trace tels que le sélénium sont sujets à des transformations chimiques (spéciation) et des transferts de phases (solide-liquide-gazeuse). Il est important de préciser qu'il n'existe pas de corrélation directement proportionnelle entre les teneurs en sélénium total dans le sol et les effets sur la santé de l'Homme et des animaux (carence et toxicité) décrits précédemment. (Bitterli *et al.*, 2010). Par exemple, il a été observé dans le district de Zhangjiakou (Hebei, Chine), qu'une partie de la population était affectée par la maladie de Keshan malgré des teneurs en Se dans les sols non critiques (Johnson *et al.*, 2000). Cela peut être expliqué par le fait que la mobilité ainsi que la bio-disponibilité de Se dépendent fortement de sa spéciation qui contrôle sa réactivité avec les différents composants du sol. Il est donc nécessaire de mieux comprendre la réactivité de Se dans les sols afin de pouvoir estimer son transfert vers d'autres compartiments de l'environnement.

Les transformations chimiques et les associations Se/composants des sols sont résumées dans la Figure A.5. Tous ces processus sont dépendants de nombreux paramètres bio-physico-chimiques du sol.

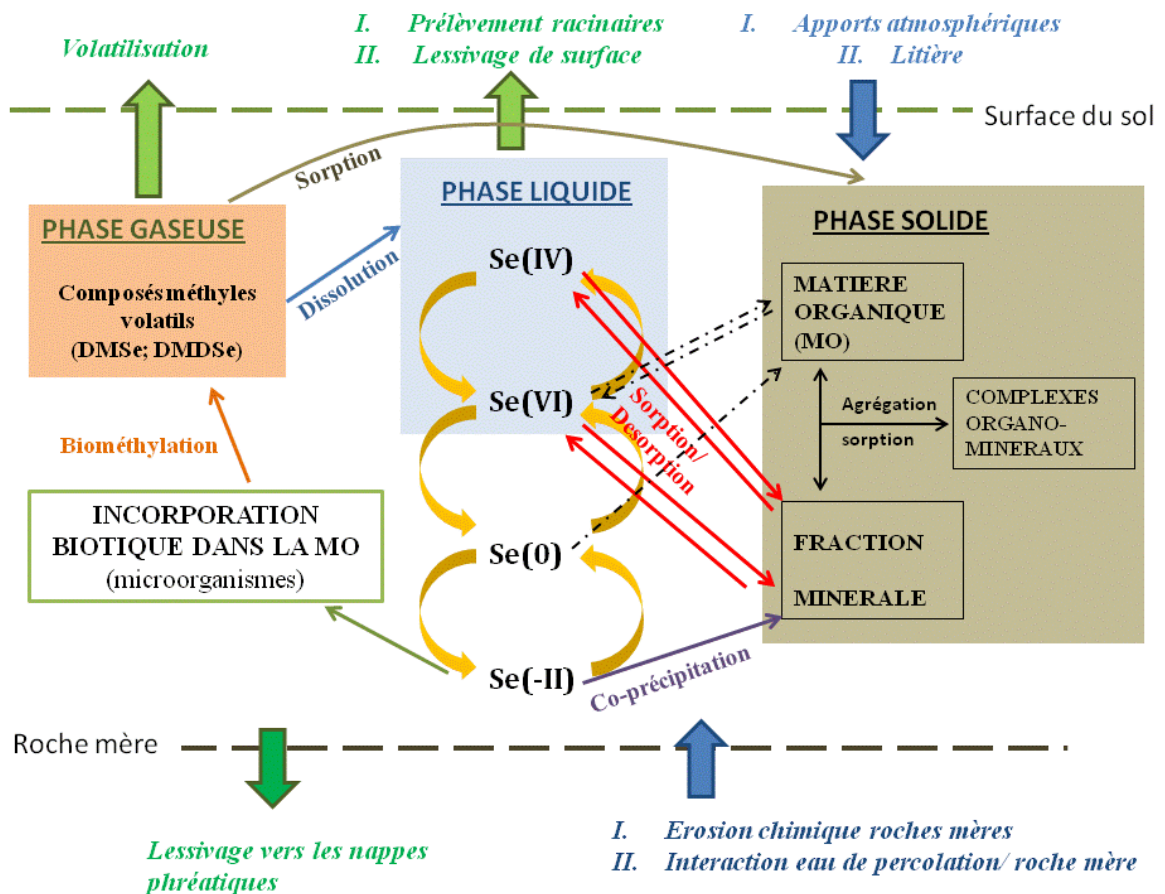


Figure A. 5. Cycle biogéochimique du sélénium dans les sols (adapté de Tolu *et al.*, 2012)

2.2.1 Processus d'oxydo-réduction

Le sélénium peut être présent dans le sol sous quatre degrés d'oxydation et sous différentes formes qui déterminent sa mobilité et sa biodisponibilité.

Sous ses formes oxydées, sélénite et séléniate, Se est fortement soluble dans une large gamme de conditions géochimiques, alors que le sélénium élémentaire et les séléniures sont très peu solubles (Seby *et al.*, 1998; 2001). Il est donc évident que les réactions d'oxydo-réduction jouent un rôle très important dans les processus de précipitation ou de dissolution qui affectent sa migration dans l'environnement. C'est notamment le cas de la réduction des oxyanions sélénite et séléniate, qui peut conduire à l'immobilisation de Se du fait de la très faible solubilité des formes réduites.

La répartition des quatre états d'oxydation de Se en fonction des conditions de pH et de potentiel (Eh) est illustrée par le diagramme Eh-pH (figure A.6) (Seby *et al.*, 1998; 2001).

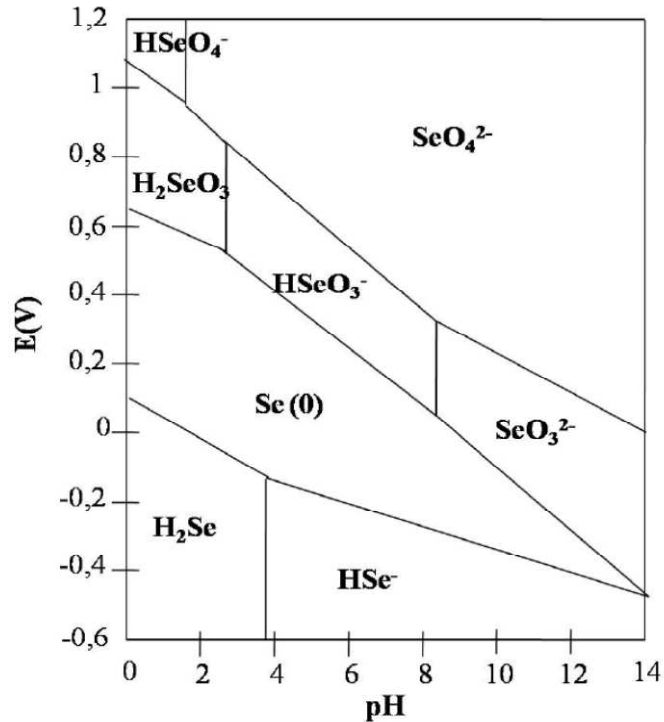


Figure A. 6. Diagramme potentiel (Eh)-pH du sélénium (25 °C et P=1 bar), en milieu aqueux pour une activité de 10^{-7} mol L⁻¹ (Séby *et al.*, 1998)

Ces prédictions thermodynamiques conduites en milieu aqueux, complètent les études de Masscheleyn *et al.* (1991) sur l'influence des facteurs pH et Eh dans des suspensions de sol contaminé en sélénium et permettent d'obtenir quelques indications sur la présence de certaines espèces séléniées en fonction de ces deux paramètres. Sous des conditions très réductrices, Se(-II) et Se(0) sont les seules espèces détectables et représentent 80 à 100 % de Se total. A partir de Eh=0 V en conditions alcalins, l'oxydation des formes réduites de Se en Se(IV) peut avoir lieu. Pour des potentiels très élevés les séléniates sont les espèces majoritaires représentant 95% du sélénium total pour la gamme de pH 8.5 à 9 et seulement 75% pour des pH compris entre 6.5 et 7.5.

Toutefois, ces prédictions thermodynamiques sont donc à considérer avec précaution dans le cas des échantillons réels. Par exemple l'activité microbologique ne peut pas être négligée car elle influence fortement les réactions d'oxydo-réduction de Se, les micro-organismes se comportant comme des médiateurs cinétiques. Losi et Frankenberger (1998) ont supposé un processus d'oxydation similaire à celui du soufre, avec par conséquent le rôle de bactéries telles que *Thiobacillus*.

Une large variété de bactéries, qu'elles soient Gram (-) ou Gram (+), sont capables de réduire les oxyanions de Se en sélénium élémentaire en conditions aérobies ou anaérobies. Les

bactéries anaérobies peuvent utiliser Se(IV) et Se(VI) comme accepteurs finaux d'électrons pendant la respiration et les précipiter sous forme de granules insolubles de sélénium élémentaire (Oremland *et al.*, 1989; 2004). Par ailleurs, la réduction des oxyanions avec gain énergétique en milieu anoxique est un autre mécanisme identifié. Le troisième mécanisme correspond à une réduction sans gain énergétique en conditions oxiques et anoxiques en présence d'un donneur d'électrons, ceci correspondrait à un mécanisme de détoxification qui permet aux bactéries de résister à de fortes teneurs de Se (Watts *et al.*, 2003).

Dowdle *et al.* (1998) ont proposé un cycle redox du sélénium, présenté figure A.7, dans lequel les micro-organismes jouent un rôle important.

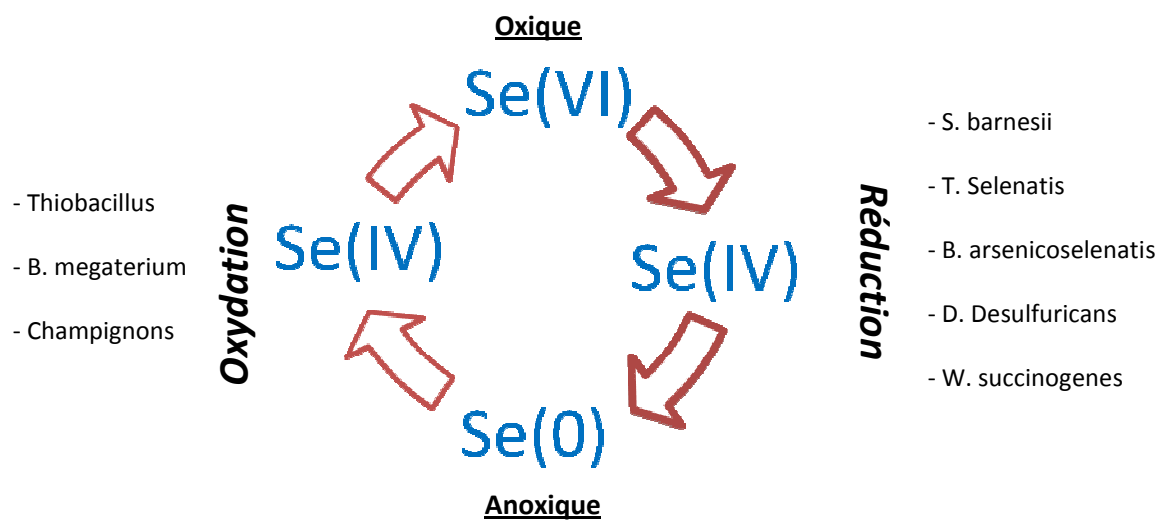


Figure A. 7. Cycle redox du sélénium connue par les micro-organismes. L'épaisseur des flèches correspond aux taux de réaction (plus élevés pour la réduction de Se(IV) et Se(VI) que pour l'oxydation de Se(0)).

L'oxydation microbienne de Se dans les sols semble être un phénomène relativement lent avec une cinétique inférieure environ d'un facteur 10^3 par rapport à celle de la bio-réduction. L'oxydation du sélénite en séléniate est probablement limitée par la rétention de Se(IV) dans le sol, il serait ainsi moins disponible pour les micro-organismes. Dans le cas d'une arrivée d'eau contaminée en Se(VI) ou Se(IV) dans un sol, riche en matière organique, des conditions anoxiques se traduiraient selon Dowdle *et al.* (1998) par une immobilisation rapide sous forme de Se élémentaire.

Cependant, ce cycle (figure A.7) ignore la conversion de Se(IV) en composés intracellulaires (e.g acides aminés) et la formation de composés volatils comme le DMSe (cf. § 2.2.4) dans lesquels Se est au degré d'oxydation (-II). En effet, la similarité chimique existant entre le soufre et le sélénium rend possible la substitution du soufre par Se dans les acides aminés (cf. § 1.2.2.2) à travers des processus d'assimilation (Fordyce, 2005). Ces acides aminés sont

généralement retrouvés plus tard dans la fraction humique de la matière organique du sol (Kang *et al.*, 1991). Certains micro-organismes peuvent métaboliser ces acides aminés en produisant H_2Se , qui est ensuite oxydé en sélénium élémentaire (Herbel *et al.*, 2003; Wessjohann *et al.*, 2007).

En tenant compte de cette capacité des microorganismes à réduire les oxyanions en espèces non solubles (Se élémentaire amorphe et Se(-II) lié à des phases cristallines), l'utilisation de biofilm bactérien a été envisagée pour la biorémediation d'eaux contaminées (Fujita *et al.*, 2002; Lenz *et al.*, 2008c).

Outre ces phénomènes biotiques, certaines phases solides du sol peuvent intervenir dans les processus d'oxydo-réduction des oxyanions de Se. La réactivité de Se(IV) vis-à-vis de la surface de minéraux contenant Fe(-II), a été évaluée dans différentes études (Bruggeman *et al.*, 2005; Sheinost et Charlet, 2008; Scheinost *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2013) qui ont mis en évidence un mécanisme de rétention par une adsorption de surface, suivie d'une réduction puis d'une précipitation. La spéciation finale du sélénium dépend de la nature du minéral utilisé. Par exemple, en présence de pyrite (Bruggeman *et al.*, 2005) et de sidérite (Sheinost et Charlet, 2008), Se élémentaire est le produit final, tandis que la troïlite, mackinawite et la magnétite réduiraient le sélénium à un état d'oxydation (-II), Se(0) n'étant alors qu'un produit intermédiaire (Sheinost et Charlet, 2008). Par ailleurs, Se(VI) ne semble pas se réduire à la surface de la pyrite même après une période de contact de 60 jours (Bruggeman *et al.*, 2007). Il a été également montré que Se(IV) et Se(VI) peuvent être réduits par Fe(0) suite à leur sorption sur cette phase solide (Zhang *et al.*, 2005).

2.2.2. Sorption de Se sur les phases minérales

Le terme sorption est généralement utilisé pour indiquer le transfert d'un soluté d'une phase liquide vers une phase solide quel que soit le mécanisme impliqué. Il inclut (i) les phénomènes de précipitation/co-précipitation, (ii) l'adsorption sur la surface du solide par complexation de surface ou échange d'ion et (iii) l'absorption ou la diffusion dans un solide (Monteil-Rivera *et al.*, 2000).

Le sélénium peut réagir avec des cations minéraux pour donner des phases solides plus ou moins complexes qui peuvent être responsables de son immobilisation. Ces réactions dépendent essentiellement de la composition globale de la solution, du pH, du potentiel et de la température. Etant donné que la mobilité d'un ion est largement influencée par les

mécanismes de sorption, il est important d'associer des mécanismes à la rétention de Se sur les minéraux.

2.2.2.1. Précipitation/co-précipitation

Elrashidi *et al.* (1987) ont calculé les constantes thermodynamiques associées aux mécanismes de précipitation/dissolution de 83 composés minéraux. En tenant compte de ces données, ces auteurs montrent que les précipités métalliques de Se(VI) et Se(IV) sont trop solubles pour perdurer dans les sols aérés, à l'exception de MnSeO_3 qui peut se former dans des sols fortement acides ($\text{pH} < 4$). Au contraire, les solubilités des sélénures semblent très faibles dans les sols en conditions très réductrices, à l'exception des sélénures de sodium, calcium, strontium et baryum dont les solubilités sont très élevées. Cu_2Se (s) est le plus stable pour les sols acides, alors que PbSe (s) et ZnSe (s) sont les plus stables en conditions neutres et alcalines. Il est généralement admis que les mécanismes de précipitation gouvernent la solubilité de Se uniquement en conditions anoxiques. Par contre, en milieu oxydant à modérément réducteur, correspondant à la majorité des sols de surface, l'immobilisation des oxyanions solubles de Se est donc contrôlée par d'autres mécanismes de sorption, par exemple la complexation de surface.

2.2.2.2. Echange anionique

Le sélénium est adsorbé sur la surface de l'hydroxyapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)(\text{OH})$) et de la calcite par un mécanisme d'échange de ligand anionique. Plus précisément, dans le cas de l'hydroxyapatite, de nombreuses observations ont mis en évidence un processus d'échange entre les ions phosphate et sélénite (Cheng *et al.*, 1997; Monteil-Rivera *et al.*, 1999; 2000). La sorption du sélénite sur l'hydroxyapatite augmente avec le pH jusqu'à atteindre un plateau pour pH 7 à 8.5 et diminue pour des valeurs supérieures pour lesquelles la surface de l'hydroxyapatite ($\text{pH}_{\text{zpc}} = 8.15$) devient négative (Monteil-Rivera *et al.*, 2000). Pour la calcite, l'adsorption de surface résulte de l'échange de Se(IV) avec les ions carbonates (Duc *et al.*, 2003). Cependant, ce mécanisme d'échange anionique n'a été observé que pour Se(IV) (Cheng *et al.*, 1997; Monteil-Rivera *et al.*, 2000; Duc *et al.*, 2003).

2.2.2.3 La complexation de surface

Les deux oxyanions, Se(IV) et Se(VI) peuvent se complexer à la surface des oxydes/hydroxydes métalliques (Fe, Al et Mn) et des argiles. Deux types de complexes de surface peuvent se former entre Se et les groupes fonctionnels de surface du composant du sol, définis selon le type de liaison mise en jeu:

- (i) *la complexation de surface de sphère externe* (CSE) caractérisée par des interactions électrostatiques de type Van der Waals,
- (ii) *la complexation de surface de sphère interne* (CSI) (monodentate ou bidentate) correspondant à la formation de liaisons covalentes; Se étant alors plus difficilement désorbé, ce phénomène est responsable d'une rétention à plus long terme (Sposito, 2004). La stabilité de ces complexes n'est pas ou très peu affectée par la force ionique de la solution.

La formation de l'un ou l'autre de ces complexes dépend du degré d'oxydation du sélénium et du type de phase minérale considérée.

- *Influence de la forme chimique*

L'efficacité de l'adsorption dépend des espèces chimiques de Se présentes: ainsi les sélénites présentent généralement une plus forte affinité de sorption sur les phases minérales pures, les sols et les sédiments en comparaison avec les séléniates (Neal et Sposito, 1989; Balistreri et Chao, 1990, Fernandez-Martinez et Charlet, 2009). Ceci est dû à la formation de complexes de sphère interne bidentate entre les sélénites et les oxydes de fer, aluminium et manganèse généralement observée dans les sols (Hayes *et al.*, 1987; Su et Suarez, 2000; Peak *et al.*, 2006). Au contraire, des complexes de sphère externe sont formés avec les séléniates (Manceau et Charlet, 1994; Su et Suarez, 2000). Toutefois, des observations par EXAFS ont montré une faible formation de complexes de sphère interne monodentates entre le séléniate et des oxydes de fer et aluminium (Manceau et Charlet, 1994; Wijnja et Shulthess, 2000; Peak *et al.*, 2006).

La désorption des ions sélénites est donc généralement plus difficile que celle des ions séléniates.

- *Influence des paramètres physico-chimiques*

Les sites de surfaces de phases minérales étant amphotères, le pH affecte fortement l'adsorption de Se. Des valeurs alcalines de pH ($\text{pH} > \text{pH}_{\text{zpc}} \approx 8$) entraînent une diminution de l'immobilisation des oxyanions de Se en raison de la perte de charge positive à la surface des oxydes et hydroxydes (Sposito, 1989) et par conséquent de la perte des sites de liaison de Se(IV). Cependant, pour des valeurs de pH égales ou supérieures au pH_{zpc} correspondant à une charge globale de surface nulle ou négative, la sorption de Se(IV) peut encore avoir lieu du fait de l'existence de charges locales positives (Duc *et al.*, 2003).

De plus, la sorption de Se par complexation de surface est affectée par la présence d'autres anions compétiteurs vis à vis des sites d'adsorption, par ordre croissant : $\text{SO}_4^{2-} < \text{NO}_3^- < \text{H}_2\text{PO}_4^-$. Ces anions peuvent être ajoutés aux sols suite à l'application de fertilisants et peuvent donc représenter un risque dans le cas de sols riches en Se du fait de la remobilisation des ions sélénites retenus dans la phase solide du sol (Neal *et al.*, 1987; Dhillon *et Dhillon*, 2000; Nakamaru 2006).

Un autre facteur contrôlant la sorption de Se aux minéraux du sol est la teneur et la qualité de la MO qui fait l'objet du paragraphe suivant.

2.2.3. Interaction Se et matière organique du sol (SOM)

La matière organique du sol (SOM) influence fortement le comportement de Se dans le sol par rétention ou complexation (Coppin *et al.*, 2006). Les processus de rétention de Se dans un sol via la matière organique restent encore non clairement définis en raison de l'hétérogénéité des composés organiques composant la fraction organique, impliquant donc de nombreuses possibilités de réactions et d'interactions avec les métaux et métalloïdes (Koch-Steindl *et Pröl*, 2001). Par ailleurs, la matière organique peut agir indirectement sur la rétention de Se, par exemple l'amendement organique favorisant la prolifération de la flore microbienne augmente l'immobilisation de Se (cf. § 2.2.1).

Plusieurs études suggèrent différents types d'interactions entre le sélénium et la matière organique du sol:

- Gustafsson *et Johnsson* (1994), suggèrent que l'incorporation de Se par les substances humiques (SH) se fait via une réduction biotique de Se(IV) en Se(-II) et/ou Se(0), qui

serai(en)t préférentiellement incorporé(s) dans les fractions organiques de poids moléculaires relativement faibles (acide humiques et fulviques ; 2-200 kDa). Deux mécanismes sont proposés: (i) incorporation sous forme de composés organiques, comme les acides aminés, qui s'ajoutent au réservoir des substances humiques; et/ou (ii) interaction directe via les groupements hydroxyles périphériques des SH comme déjà observé pour les sulfures. L'implication d'une activité microbienne dans le mécanisme d'interaction Se/SOM a également été suggérée par d'autres études (Abrams *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1996).

- Les ions sélénites pourraient être incorporés dans la matière organique via des complexes ternaires organo-minéraux (complexes SH-Fe et SH-Al) (Bruggeman *et al.*, 2007; Coppin *et al.*, 2009), comme préalablement observé pour les ions phosphates (Jones *et al.*, 1988) et l'arsenic inorganique (Redman *et al.*, 2002). D'ailleurs, la sorption du sélénite sur un oxyhydroxyde de Fe amorphe a été reportée comme étant augmentée quand cet oxyde était recouvert d'AH (Tam *et al.*, 1995). Le fait de ne pas extraire de grandes quantités de Se en utilisant des solutions de pyrophosphate (réactif communément utilisé pour l'extraction des oxydes de Fe et Al amorphes organiques) indique que ce mécanisme n'explique pas à lui seul la rétention de Se dans la fraction organique du sol (Gustafsson et Johnsson, 1994). Il semble que la formation de ces complexes soit un mécanisme important d'immobilisation de Se par la matière organique du sol, bien que très peu de données concernant leurs structures et stabilité soient connues.
- Kamei-Ishikawa *et al.* (2007) ont observé une interaction directe de Se(IV) sur les acides humiques par sorption *via* les groupes fonctionnels carboxyle et phénol. Les associations entre le sélénite et des polysaccharides de différents poids moléculaires ont été étudiées par Ferri et Sangiorgio (2001) qui ont montré que le rapport volume/surface des molécules de AH semble être un paramètre crucial dans l'incorporation de Se. En effet la structure plus condensée des molécules de taille moléculaire élevée se traduit par une diminution des sites accessibles pour la sorption de Se.

La matière organique dissoute (MOD) peut être un facteur important du transport des contaminants dans le sol. Bien que Wang et Liu (2005) rapportent que la MOD joue un rôle important dans la mobilité de Se dans les sols, les interactions Se/MOD sont actuellement toujours peu connues. Il a été suggéré que Se peut s'associer à la matière organique du sol dans l'horizon superficiel et que l'association Se/MO peut migrer vers des horizons plus

profonds. Ceci signifierait que la matière organique joue un rôle de transporteur (Kamei-Ishikawa *et al.*, 2008). De plus, cette interaction Se/MOD peut affecter la biodisponibilité de Se présent dans les solutions du sol, ces complexes étant probablement moins disponibles que les oxyanions libres pour le prélèvement par la plante.

Tolu *et al.* (2014) ont confirmé le rôle de la MO dans des sols ne présentant pas de caractère organique marqué, la MO étant capable d'influencer la spéciation de Se. En effet, pour la collection de 26 sols étudiés, contenant des teneurs en MO intermédiaires (1-32%), une quantité importante de Se extrait correspond à des espèces non identifiées, probablement des composés de haut poids moléculaire. Ces composés sélénés peuvent représenter jusqu'à 100% du Se extrait par les trois réactifs utilisés (eau, tampon phosphate et soude). Leurs concentrations, déterminées par le bilan massique entre le sélénium total extrait et la somme des espèces identifiées, apparaissent corrélées positivement au contenu en carbone organique total dans le sol et au carbone organique mesuré dans chacun des extraits, indiquant un caractère organique de ce pool de Se non identifié. Selon les auteurs leur formation est probablement liée aux interactions Se/MO. La MO semble en effet entraîner la formation de composés de type substances humiques-Se (dissous et/ou colloïdaux), suggérant donc un rôle important de la MO sur le contrôle de la remobilisation de Se, ces espèces ayant probablement un comportement en terme de mobilité et de biodisponibilité différent de celui des oxyanions, du fait de propriétés physico-chimiques différentes (i.e groupes fonctionnels; hydrophobicité; taille). Ces résultats sont en accord avec les observations d'autres études mettant en évidence la présence de Se incorporé dans des colloïdes purement organiques et/ou organo-minéraux extraits au CaCl_2 (Weng *et al.*, 2011) ou à l'eau ultra-pure et au NaOH (FFF-MALLS / UV-ICP-MS, Le Hecho *et al.*, 2012).

La matière organique est une phase relativement réactive envers les phases minérales, en particulier les oxydes/hydroxydes d'aluminium (Kaiser *et al.*, 2003; Borggard *et al.*, 1990; 2005). La présence de matière organique peut donc induire des effets antagonistes par rapport à la mobilité de Se(IV) et Se(VI). D'une part, la présence de MO peut augmenter la mobilité de Se, à travers le phénomène de "coating" des phases minérales pouvant potentiellement masquer les sites de surfaces disponibles pour Se(IV) et Se(VI) (Kleber *et al.*, 2007). D'autre part, la formation de complexes ternaires relativement stables (Fe/Al-OM-Se) va avoir tendance à diminuer la mobilité de sélénium (Bruggeman *et al.*, 2007; Coppin *et al.*, 2009).

2.2.4. Méthylation et volatilisation

La biométhylation du sélénium est un phénomène qui se produit dans tous les systèmes naturels (eau, sol, végétaux). Dans les sols, ce procédé a lieu via des bactéries et/ou des champignons avec formation de composés volatils à partir de toutes les formes séléniées notamment les formes organiques. Ce processus a même été proposé comme une technique naturelle possible de biorémediation des sols pollués en Se (Zieve et Peterson, 1981; Chasteen et Bentey, 2003; Bañuelos et Lin, 2007;). En général la méthylation de Se bio-incorporé sous forme organique suivi par sa volatilisation est vue comme un mécanisme de détoxification développé par les microorganismes pour éviter l'accumulation de Se (Hansen *et al.*, 1998).

Les taux de volatilisation dépendent de la forme sous laquelle le sélénium est initialement présent, de sa biodisponibilité, de l'activité microbienne ainsi que des conditions du sol comme la température, l'aération, le pH ou encore la teneur en eau qui représentent des facteurs contrôlant directement l'activité microbienne (Zieve et Peterson, 1981; Tan *et al.*, 1991; Haygart *et al.*, 1994) La qualité et la quantité de matière organique dans le sol jouent également un rôle dans le processus de biométhylation et volatilisation. Ainsi, des études ont montré que l'apport de MO stimule la prolifération bactérienne (Chander *et al.*, 2007; Wiseman *et al.*, 2012) en augmentant le taux de volatilisation (Doran et Alexander, 1977a; Karlson et Frankeberger, 1988; 1989; Stork *et al.*, 1999). L'importance de la biodisponibilité du carbone sur la volatilisation de Se a également été démontrée: les composés organiques les moins complexes sont les plus facilement biodégradables et les composés riches en groupements méthyl (pectine) sont de meilleures sources pour la méthylation biotique de Se (Calderone *et al.*, 1990; Stork *et al.*, 1999).

La biométhylation du sélénium implique plusieurs étapes dont la réduction de Se(VI) et Se(IV) en Se(-II) suivie de réactions de méthylation pour former des composés volatils ; les plus abondants étant le diméthylsélénure (DMSe) et le diméthyldisélénure (DMDS₂). D'autres formes méthylées peuvent également être formées, comme la diméthylsélénone (DMSeO₂), le méthane-sélénol (MeSeH) et le diméthylsélénosulfure (DMSeS) (Chau *et al.*, 1976; Reamer *et al.*, 1990; Chasteen et Bentey, 2003). Ainsi, la spéciation de Se présent dans le sol affecte les taux de volatilisation. En effet, l'énergie nécessaire pour la réduction de Se(VI) en Se(-II) étant supérieure à celle demandée pour la réduction de Se(IV), le taux de volatilisation sera plus élevé lorsque Se est présent sous forme de sélénite (Thompson-Eagle et Frankenberger Jr, 1990).

Des études récentes à l'aide de Se radioactif (^{75}Se) montrent que la volatilisation peut avoir lieu dans des sols non sélénifères recevant des apports exogènes en Se inférieurs au bruit de fond géochimique. Pour ces sols dans lesquels le sélénium est présent à l'état de traces, les taux de volatilisation sont inférieurs à 0.2 % de Se total (Chabroulet *et al.*, 2007). La bio-volatilisation de Se à partir du sol peut donc devenir un phénomène quantitativement non négligeable suite à une contamination récente de Se, celui-ci étant plus disponible pour les micro-organismes et donc plus facilement volatilisé.

Des exemples de micro-organismes capables de biométyler le sélénium inorganique sont rassemblés dans le tableau A.6. Des micro-organismes rhizosphériques (champignons et bactéries) sont donc également capables de produire des formes volatiles séléniées. Des auteurs ont observé une augmentation du taux de volatilisation de Se par la plante en présence de micro-organismes rhizosphériques, ceux-ci pouvant agir à l'extérieur de la plante ainsi que favoriser le prélèvement racinaire de Se puis sa volatilisation par la plante (De Souza *et al.*, 1998; Terry *et al.*, 2000).

Tableau A. 6. Bactéries et champignons capables de biométyler Se (Azaizeh *et al.*, 1997; Chasteen et Bentley, 2003)

Organismes	Substrat	Produits		
		DMSe	DMDSe	DMS _{SeS}
Algues				
Chorella sp	SeIV	+	+	+
Cyanophyte-dominated Mat	SeIV	+	+	+
Bactéries				
Aeromonas sp. VS6	SeVI	+	+	+
Critobacter freundii KS8	SeVI	+	+	+
Clostridium sp.	SeIV	+	+	-
Desulfovibrio gigas	SeIV	+	+	-
Desulfovibrio vulgaris	SeIV	+	+	-
Enterobacter cloacae SLS 1a-1	SeIV	+		-
Methanobacterium formicicum	SeIV	+	+	-
Methanosarcina barkeri	SeIV	+	+	-
Pseudomonas aeruginosa VS7	SeVI	+	+	+
Pseudomonas fluorescens K27	SeVI	+	+	+
Pseudomonas sp VW1	SeVI	+	+	+
Rhodobacter sphaeroides	SeIV, SeVI, Se ⁰	+	+	+
Rhodocyclus tenuis	SeIV, SeVI, Se ⁰	+	+	-
Corynebacterium sp.	SeIV	+	+	-
Champignons				
Acremonium falciforme	SeIV	+	+	-
Alternaria alternata	SeVI	+	-	-
Cephalosporium sp.	SeIV, Se VI	+	-	-
Fusarium sp.	SeIV, SeVI	+	-	-
Penicillium citrinum	SeIV	+	+	-
Penicillium sp.	SeIV	+	-	-
Penicillium sp.	SeIV	+	-	-
Scopulariopsis brevicaulis	IV	+	-	-

Une fois formées, les espèces volatiles peuvent être évacuées dans l'atmosphère du sol puis dans l'atmosphère terrestre ou être solubilisées dans la solution de sol (Zhang et Frankenberger Jr, 2002; Azaizeh *et al.*, 2003). Le DMDSe peut aussi être sorbé sur le sol, converti en espèces non volatiles ainsi qu'en DMSe (Martens et Suarez, 1999; Zhang et Frankenberger Jr, 2002). A l'inverse, le DMSe est très peu voire non sorbé sur les constituants du sol (Guo *et al.*, 1999).

2.5. Coefficient de distribution solide/liquide (K_d)

La connaissance de la répartition de Se entre phases solide et liquide, et par conséquent l'estimation de sa mobilité potentielle, est importante vis-à-vis du stockage en formation géologique profonde de déchets contenant le radio-isotope ^{79}Se . Cette répartition est généralement estimée par le coefficient de distribution solide/liquide ou coefficient de partage, K_d (équation A.1), qui s'exprime usuellement en L kg^{-1} :

$$K_d = \frac{C_s}{C_L} \quad (\text{A.1})$$

où C_s est la concentration massique dans le sol sec exprimée en mol kg^{-1} ; C_L est la concentration volumique dans la solution du sol exprimée en mol L^{-1} .

Dans un tel modèle, il est implicitement assumé que:

- la distribution de l'élément entre les phases liquide et solide atteint l'équilibre
- les processus d'immobilisation (sorption) sont instantanés et totalement réversibles
- il y a une relation linéaire entre la concentration de Se sorbé sur la phase solide et celle dans la phase liquide.

Ce coefficient est une grandeur macroscopique, qui permet une estimation globale de la distribution d'un élément entre les phases solide et liquide du sol, quelque(s) soi(en)t le(s) processus impliqué(s) et il représente un paramètre clé dans des modèles numériques étudiant le compartiment des contaminants (radionucléides) dans le système sol (Gil-Garcia *et al.*, 2009). Plus sa valeur est élevée, plus l'élément considéré est immobilisé dans la phase solide du sol ce qui se traduit par un moindre risque de transfert et de diffusion dans la biosphère.

A l'heure actuelle, il existe une compilation de valeurs de K_d pour Se, classées selon des caractères de texture de sol et de composition en termes de matière organique. Les valeurs de K_d résumées dans le tableau A.7. issues de différents travaux (Sheppard et Tibault, 1990; Ashworth *et al.*, 2008; Gil-Garcia *et al.*, 2009) sont établies pour 5 catégories de sol: sableux (> 70% de sables); limoneux (> 80% de limons), organiques (> 30% de matière organique) et ceux avec une texture intermédiaire (29% de sables, 19% d'argiles, 47% limons et 2.6% de MO) qui sont plus représentatifs des sols "moyens" français.

Tableau A. 7. Valeurs de K_d pour Se classées dans la littérature selon la texture et la teneur en matière organique des sols. (Adapté de Tolu *et al.*, 2012)

	Sableux	Limoneux	Argileux	Organiques	Texture intermédiaire	Ref.
MG	150	490	740	1800	n.d	Sheppard et Thibault, 1990 IAEA, 1994
MG	55	150	115	179	n.d	Yu <i>et al.</i> , 2001
MG ± EG (n) Min-Max	56 ± 3 (15) 4-1616	220 ± 5 (101) 12-1606	240 ± 3 (33) 2-2130	(2) 230-1800	230 ± 2 (21) 20-618	Gil Garcia <i>et al.</i> (2009)
MG± EG (n) Min-Max	56 ± 5 (15) 4-1600	220 ± 3 12-2130		1000 (2) 230-1800	n.d	IAEA, 2010

MG : Moyenne géométrique ; EG : écart-type géométrique ; n : nombre d'échantillons de sol

Ces valeurs varient dans une gamme 4-2130 L kg⁻¹, avec une moyenne géométrique de 200 L kg⁻¹. La forte hétérogénéité des valeurs de K_d illustre différents degrés de rétention de Se en fonction des types de sols ce qui indique la nécessité d'améliorer leur classification en ne se basant pas seulement sur les caractères de texture et de teneur en MO. En effet des études ont montré que K_d peut dépendre également de nombreux facteurs environnementaux et/ou conditions expérimentales (pH, Eh, temps d'équilibre, composition du sol/solution, activité microbienne) (Roussel *et al.*, 2005).

Ashworth *et al.* (2008) ont montré que les valeurs de K_d augmentent en même temps que la teneur en MO. Ces observations satisfont l'hypothèse selon laquelle la MO du sol se comporte comme la fraction du sol majoritairement responsable de la sorption de Se. Les pH faibles généralement rencontrés dans les sols riches en MO favorisent l'immobilisation de Se en accord avec la réduction de la charge négative de surface (pH < pH_{ZPC}). Cependant le fait qu'un sol argileux de pH 7.7 présente un K_d plus élevé qu'un sol sableux de pH 4.3 suggère que l'effet du pH est secondaire par rapport à l'influence de la minéralogie et de la teneur et qualité de la MO.

Les valeurs de K_d pour les sols sableux augmentent fortement lorsque les sols sont saturés en eau, ceci n'est pas observé pour les sols argileux ou riches en matière organique. En conditions de saturation, le potentiel redox du sol sableux étudié diminue fortement, ce qui laisse suggérer que des conditions fortement réductrices entraînent l'immobilisation de Se, sous formes Se(-II) et/ou Se(0).

En comparaison avec d'autres radionucléides étudiés (i.e iode, chlore et technétium), les valeurs de K_d obtenues pour le sélénium sont relativement élevées, suggérant un faible degré de mobilité de Se dans l'environnement et donc un risque radiotoxicologique mineur. Ceci est confirmé par l'étude d'Ashwort et Shaw (2006) dans laquelle la migration de ^{75}Se vers la surface du sol depuis la zone saturée (expérience en colonne) a été fortement réduite par l'immobilisation de Se suite à sa sorption sur les phases solides du sol. Malgré sa rétention dans le sol, Se est également détecté dans les racines des plantes (ray-grass) présentes en surface.

Nakamaru *et al.* (2005) ont reporté des valeurs de K_d pour les sols de culture japonais, dans une gamme 12-1060 L kg⁻¹, montrant une corrélation significative avec l'aluminium extrait à l'oxalate (Al amorphe) et, suggérant donc que les hydroxydes amorphes de Al et Fe sont des paramètres clés contrôlant l'adsorption de Se dans ces sols.

Février *et al.* (2007) ont montré que l'activité microbiologique influençait la distribution solide/liquide par une augmentation de la valeur de K_d . Ce comportement est généralement expliqué par la précipitation de Se(0) suite à la réduction biotique de Se(IV) et/ou son incorporation au sein des micro-organismes (cf § 2.2.1).

Le coefficient K_d a également été utilisé afin de mettre en évidence les paramètres qui contrôlent la rétention de Se par la fraction minérale des sols. Par exemple, pour les phases pures d'oxydes de fer, K_d augmente quand le pH diminue. Pour la goethite, la valeur de K_d est de l'ordre de 10 L kg⁻¹ à pH 12 et atteint 200 L kg⁻¹ à pH 3 (Ashworth *et al.*, 2008). Ce comportement est typique de la sorption d'anions sur les oxy-hydroxydes et généralement interprété par la formation de sites de surface chargés positivement (cf.§ 2.2.2.3).

Les valeurs données dans la littérature, ont été déterminées par expérimentations en batch après dopage du sol généralement avec du sélénium radioactif (^{75}Se). Soit le sol est mis en contact avec un volume de solution contenant le sélénium à une concentration connue, généralement supérieure aux faibles concentrations (traces) présentes réellement dans l'environnement ($K_{d \text{ sorption}}$), soit le sol préalablement dopé est désorbé avec de l'eau ultrapure ($K_{d \text{ désorption}}$). Dans les deux cas, le temps de contact (équilibre) est relativement court, dans la plupart des cas < 60 h. Cette méthode évaluant la mobilité du sélénium dans le sol via la détermination du coefficient de partage K_d présente des limites qui résident essentiellement dans les conditions de l'essai batch. Il est donc évident que ces valeurs doivent être utilisées avec beaucoup de prudence. Le coefficient de partage K_d est censé refléter la partition du

soluté entre phase solide et aqueuse à l'équilibre thermodynamique, et donc le temps de contact doit être adéquat afin de garantir l'équilibre du système.

En outre, différents mécanismes étant impliqués dans les processus d'immobilisation de Se (i.e sorption, réduction de Se(IV) en formes insolubles, incorporation de Se au sein des micro-organismes), l'évaluation de K_d reste une approximation acceptable indiquant uniquement le degré de rétention sans différencier les processus mis en jeu. Des études récentes suggèrent que les données provenant des études classiquement réalisées avec un apport de Se et des temps de contact courts surestiment considérablement la mobilité des éléments. Pour l'évaluation des risques à long terme, la modélisation pourrait donc être plus robuste en se basant sur des valeurs de K_d calculées à partir des éléments présents naturellement dans le sol (Sheppard *et al.*, 2011; Tolu *et al.*, 2014a; 2014b). Ceci pourrait donc permettre de mieux appréhender les processus impliqués à long terme dans l'accumulation, la remobilisation en solution suite à une contamination des sols.

3. SELENIUM ET VÉGÉTAUX

3.1. Importance des végétaux

Les végétaux constituent une voie d'entrée essentielle de Se dans le réseau trophique comme source indispensable aussi bien dans l'alimentation humaine qu'animale. Les plantes qui accumulent Se peuvent donc être utiles comme supplément alimentaire dans les régions où les sols sont carencés en sélénium (Lyons *et al.*, 2003; Braodley *et al.*, 2006; Rayman *et al.*, 2008). Considérant la santé humaine, le rôle des plantes est essentiel du fait de leur capacité à métaboliser les formes inorganiques de Se en formant des molécules bioactives (telles que MeSeO₂H, MeSeCys) ayant des propriétés anti-cancérogènes (Rayman *et al.*, 2005; 2008).

Par ailleurs, les plantes peuvent être exploitées pour traiter des cas de contamination environnementale (i.e Vallée de San Joachim, Californie) en raison de leurs capacités à (i) prélever et séquestrer Se dans la biomasse (phytoextraction) (Zhao et McGrath, 2009) et (ii) convertir les formes inorganiques présentes dans le sol et/ou eaux en formes volatiles (majoritairement DMSe), un processus appelé phytovolatilisation (Terry *et al.*, 2000). Le

principal problème de la stratégie de phytoextraction est lié au risque potentiel de toxicité pour la faune pouvant consommer ces végétaux enrichis, les plantes doivent donc être récoltées. En général pour les essais de phytoremédiation (phytoextraction et phytovolatilisation) les plantes les plus utilisées sont les plantes hyper-accumulatrices (i.e *Brassica*, *Astragalus*). Certaines des ces plantes (i.e *Brassica juncea*) ont été modifiées génétiquement afin d'incrémenter leur capacité d'accumulation et/ou de volatilisation du sélénium (Pilon-Smits *et al.*, 1999; Bañuelos *et al.*, 2007; Pilon-Smits et Quinn, 2010).

Considérant le risque d'exposition aux radionucléides, les plantes représentent un compartiment clé de la biosphère. En effet, en internalisant le radionucléide, la plante, consommée par les animaux, assure le passage et l'accumulation potentielle de ^{79}Se dans la chaîne trophique, induisant un risque radio-chimio-toxique pour les organismes vivants. La connaissance de l'efficacité de prélèvement par les racines et de l'accumulation dans les parties aériennes est donc essentielle. Ce transfert est déterminé à l'aide de nombreux facteurs, dépendant de la nature de l'apport en Se (spéciation), de la composition du sol et de la physiologie des espèces végétales. De plus, ces facteurs sont parfois reliés entre eux.

Dans les modèles mathématiques d'évaluation des risques, la capacité des plantes à prélever et accumuler le sélénium est souvent quantifiée par les deux facteurs:

- **le facteur de transfert (TF)** qui est défini comme le rapport des concentrations de Se dans la plante (ou partie de la plante) et dans le sol environnant à l'équilibre (équation A.2) (Bitterli *et al.*, 2010) et qui traduit la capacité des plantes à prélever Se présent dans le sol.

$$\text{TF} = \frac{[\text{Se}]_{\text{plante (poids frais)}}}{[\text{Se}]_{\text{sol (poids sec)}}} \quad (\text{A.2})$$

- **le facteur de translocation (Ft)** indiquant le risque d'accumulation dans les parties comestibles de la plante. Il est calculé comme le rapport entre les concentrations de Se dans les parties aériennes et dans les racines (équation A.3) (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

$$\text{Ft} = \frac{[\text{Se}]_{\text{pousse}}}{[\text{Se}]_{\text{racines}}} \quad (\text{A.3})$$

Le risque de contamination de la chaîne alimentaire par des polluants qu'ils soient radioactifs ou non sera plus important lorsque ces deux paramètres sont élevés.

Cependant, ces paramètres globaux permettent de comparer globalement des éléments ou des systèmes sol-plante, mais n'apportent aucun critère de compréhension ou de prévision de la biodisponibilité de l'élément dans un système.

3.2. Effet du sélénium chez les plantes

Bien que Se soit nécessaire à la croissance des algues (Cutter *et al.*, 1984; Price *et al.*, 1987; Imai *et al.*, 1996), l'essentialité de Se comme micronutriment pour les plantes n'a pas encore été démontrée et la question reste à ce jour très controversée (Terry *et al.*, 2000; Sors *et al.*, 2005). Aucune étude n'a pu mettre réellement en évidence le besoin de Se pour la croissance des plantes supérieures.

Trelease et Trelease (1939) ont observé un incrément de la biomasse pour l'espèce hyper accumulatrice *Astragalus pectinatus* lorsqu'elle est exposée à $0.38 \text{ mmol(Se) L}^{-1}$, suggérant donc que Se pourrait être nécessaire pour la croissance des plantes hyper accumulatrices coutumières des sols sélénifères. Cependant, cette hypothèse a été réfutée par Broyer *et al.* (1972) pour lesquels la stimulation de la croissance résulte de la capacité de Se présent dans la solution nutritive à neutraliser l'effet toxique des ions phosphates, en effet pour des concentrations faibles en phosphates aucune stimulation de la croissance de la plante n'a été observée.

Dans le but d'évaluer l'essentialité de Se pour les plantes supérieures, des essais ont été menés pour déterminer si les plantes présentent des sélénoprotéines essentielles comme c'est le cas chez les mammifères et les microorganismes. Grâce à des essais enzymatiques conduits avec des extraits protéiques de différentes plantes, une activité similaire à celle des GSH peroxydase (GPx) des animaux a été mise en évidence (Sabeh *et al.*, 1993; Eshadat *et al.*, 1997). Cependant, suite à des analyses moléculaires (analyse de séquence ADN et des protéines purifiées) il a été montré que malgré la présence d'enzymes ayant une activité similaire à celle des animaux, il ne s'agit pas de sélénoprotéines du fait de l'absence de codon spécifique pour SeCys (UGA) dans le site actif ainsi que de la présence de Cys à la place de SeCys (Eshadat *et al.*, 1997; Faltin *et al.*, 1998).

Suite à ces diverses études, le sélénium ne semblerait donc pas être un micronutriment indispensable pour les plantes. Pour certaines espèces de plantes (ray-grass (*Lolium perenne*), laitue (*Lactuca Sativa*)), un effet bénéfique (augmentation de la biomasse, retard de la sénescence) a été observé après apport de concentrations appropriées de Se (0.1 mg kg^{-1}) au sol (Hartikainen *et al.*, 1997; Xue *et al.*, 2001).

Par ailleurs, des études ont suggéré le rôle protecteur du sélénium contre le stress oxydatif induit par les radiations UV, une température élevée, le dessèchement des grains et des concentrations élevées de Al et Cd (Hartikainen and Xue, 1999; Pedrero *et al.*, 2008; Cartes *et al.*, 2010; Djanaguiraman *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2010; Pukacka *et al.*, 2011). Ces effets protecteurs sont probablement associés à l'amélioration du système antioxydant par une augmentation de l'activité de la GSH-Px et une diminution de la réaction de peroxydation des lipides (Hartikainen et Xue, 1999; Hartikainen *et al.*, 2000; Xue et Hartikainen, 2000; Xue *et al.*, 2001).

Toutefois, des concentrations élevées en Se peuvent entraîner une toxicité dont les symptômes les plus communs sont une diminution de la biomasse et l'apparition de nécroses. Les teneurs qui s'avèrent toxiques varient en fonction du type de plantes ainsi que de la forme chimique sous laquelle Se est apporté. Par exemple, Hopper et Parker (1999) ont observé une diminution de la biomasse de ray-grass de 25% lorsque la concentration en sélénite dans la solution nutritive augmente de 150 à $800 \mu\text{g L}^{-1}$ et, de 50% si la concentration en séléniate augmente de 400 à $2000 \mu\text{g L}^{-1}$. Un stress oxydatif conduisant à une perte de biomasse a été observé pour le ray-grass suite à l'ajout de Se au sol à une concentration supérieure à 10 mg kg^{-1} . La toxicité a été attribuée à un effet pro-oxydatif ainsi qu'à une altération du métabolisme (Hartikainen *et al.*, 2000). Une dose importante en Se (1 mg kg^{-1}) apparaît également toxique pour la laitue, surtout pour les jeunes pousses (Xue *et al.*, 2001). A l'inverse, du fait de leur capacité à accumuler des quantités importantes de Se, la croissance des plantes accumulatrices (moutarde indienne) est moins affectée que celle de plantes non-accumulatrices (tournesol) exposées aux mêmes concentrations de sélénite et séléniate (1 et 5 mg L^{-1}) (Ximenez-Embun *et al.*, 2004).

3.3. Les voies métaboliques

Le métabolisme de Se dans les végétaux suit des voies similaires à celles du soufre par l'utilisation des mêmes enzymes en raison de leur ressemblance chimique (Leustek et Saito, 1999). Les voies métaboliques potentielles ont été identifiées lors d'expérimentations réalisées principalement en utilisant des plantes transgéniques ou des bactéries.

Tout d'abord le séléniate incorporé est activé par l'ATP sulfurylase (ATPS) pour former le 5-adénosine phosphoséléniate (APSe) avant sa réduction en sélénite (Shaw et Andreson, 1972; 1974). Grâce à une étude menée sur des moutardes indiennes transgéniques (suppression du gène codifiant pour l'ATPS), il a été montré que cette étape est limitante dans la voie de métabolisation du séléniate (Pilon-Smith *et al.*, 1999).

L'APSe est ensuite réduit en sélénite puis en séléniure à travers deux voies métaboliques possibles: (i) une réduction non-enzymatique impliquant le glutathion (GSH) réductase via la formation d'un intermédiaire sélénite-glutathion (GS-SeO_3^{2-}) (Terry *et al.*, 2000); (ii) une réduction enzymatique par l'APSe réductase et le sulfite réductase (Sors *et al.*, 2005b) (Figure A.8).

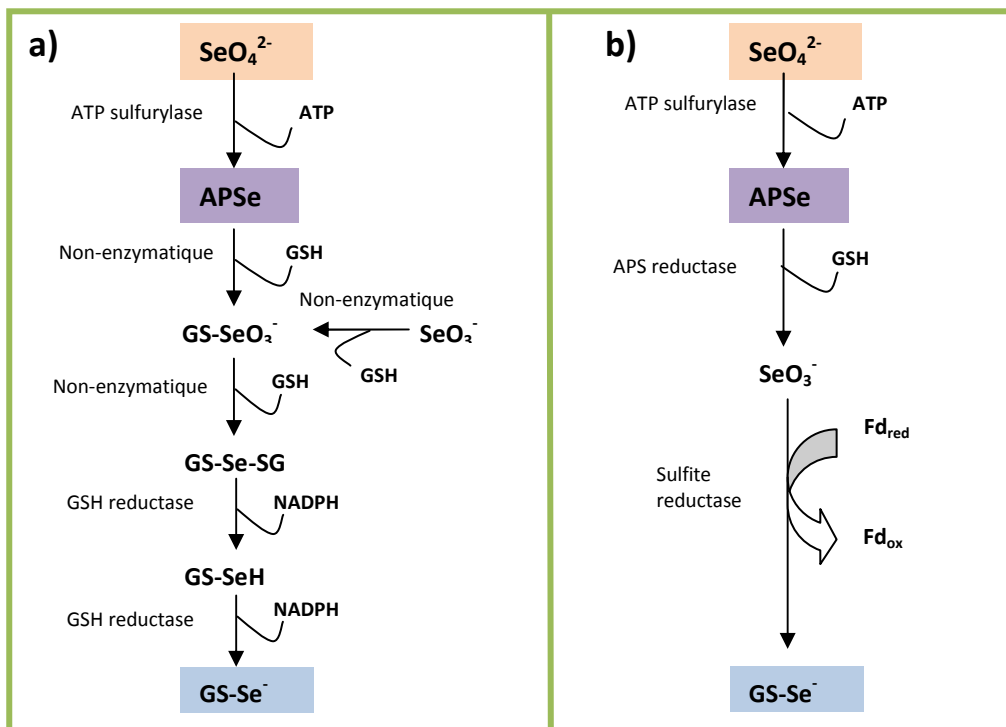


Figure A. 8. Voies métaboliques alternatives de réduction de APSe au séléniure *a)* via des réactions non-enzymatiques et glutathion réductase ; *b)* via APS réductase et sulfite réductase

Le sélénure est ensuite transformé en sélénocystéine (SeCys) de la même façon que pour son homologue soufré, par action de l'enzyme cystéine synthase. SeCys peut être convertie en sélénométhionine via la séléno-cystathionine (SeCysth) et l'homocystéine (SehomoCys). Les deux acides aminés sélénés (SeCys et SeMet) sont ensuite incorporés dans les protéines de manière non spécifique à la place des homologues soufrés (Brown et Shrift, 1982).

La sélénométhionine (SeMet) peut être métabolisée en Se-adénosyl-SeMet et Se-méthyl-SeMet qui sont respectivement converties en Se-méthyl-SeCys puis γ -glutamyl-Se-méthyl-sélénocystéine (Pilon-Smits et Quinn, 2010). Pour des teneurs élevées de Se, Se-méthyl-SeCys est le composé prédominant. Une représentation schématique de ce métabolisme est illustrée dans la Figure A.9.

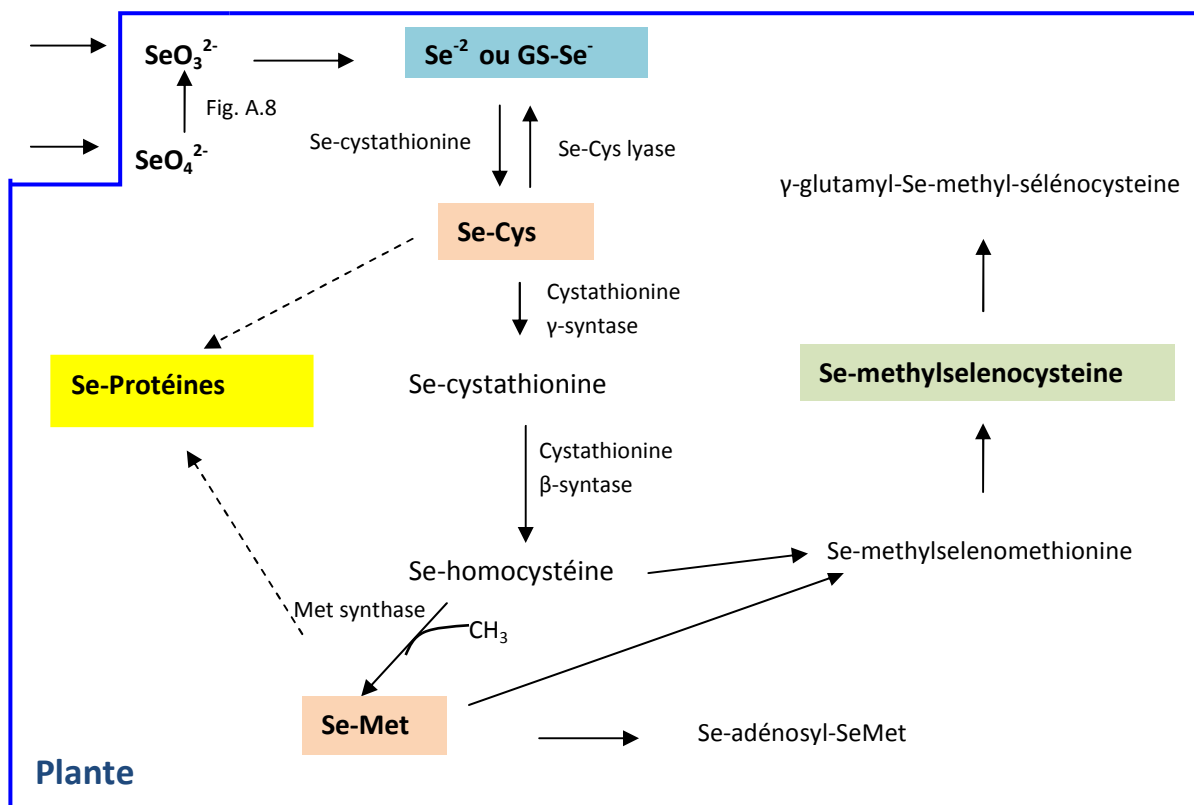


Figure A. 9. Représentation schématique simplifiée du métabolisme de Se chez les plantes (d'après Pilon Smits et Quinn, 2010)

Suite à une série d'étapes biochimiques, une partie du sélénium peut être transformée en espèces méthylées volatiles, en particulier chez les plantes accumulatrices. La volatilisation du sélénium à partir des tissus de la plante constitue un mécanisme de détoxification. La

transformation du sélénium en composés volatils non toxiques a été identifiée dans le monde animal depuis 1984. Il a fallu attendre une décennie pour mettre en évidence pour la première fois un mécanisme similaire chez les végétaux. Ce résultat a ensuite été confirmé par différents auteurs (Chasteen et Bentley, 2003; Terry *et al.*, 2000; Pilon-Smits et Quinn, 2010). Le produit principal de la phytovolatilisation est le diméthylséléniure (DMSe) qui peut être formé à partir de la méthyl-sélénométhionine (Se-méthyl-SeMet) ou à partir du diméthyl-sélénopropionate (DMSeP), comme cela est illustré dans la figure A.10a (Lewis *et al.*, 1974; Ansele *et al.*, 1999).

Dans les plantes accumulatrices SeCys peut être méthyliée pour former la séléno-méthyl-sélénocystéine. Cette forme peut être accumulée dans les tissus sans aucun risque car elle n'est pas incorporée dans les protéines (Neuhierl *et al.*, 1996; 1999). Elle peut aussi agir comme précurseur pour la production d'une autre forme volatile, le diméthyldiséléniure (Figure A.10b) (Meija *et al.*, 2002).

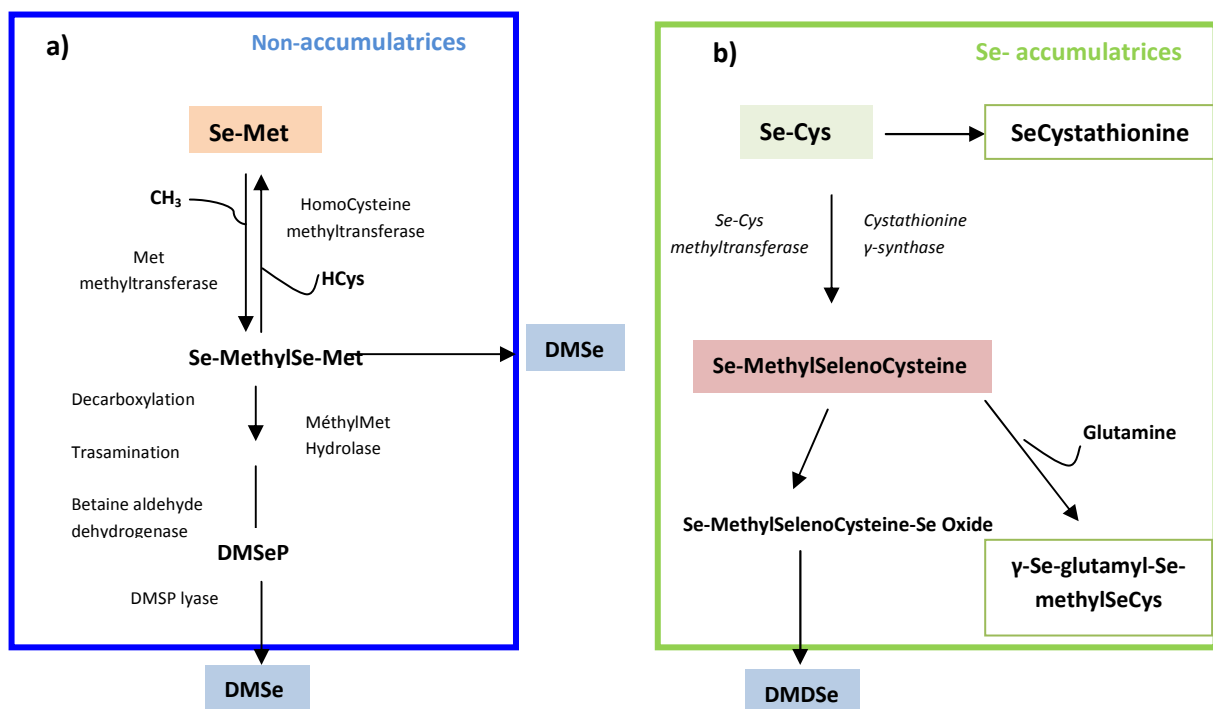


Figure A. 10. a) Volatilisation de SeMet en DMSe dans les plantes; **b)** Volatilisation de SeCys en DMDS et métabolisme de la SeCys dans les plantes accumulatrices

3.4. Mécanismes de prélèvement de Se par la plante

Une voie d'entrée du sélénium dans la plante s'effectue par les racines. Le mécanisme de prélèvement des ions séléniate par les plantes est connu comme utilisant les transporteurs des sulfates. Ce mécanisme d'absorption racinaire est documenté par plusieurs études (Arvy *et al.*, 1993; Zayed *et al.*, 1998; Hopper et Parker, 1999; Terry *et al.*, 2000; Sors *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008) conduites sur différentes espèces de plantes. Ainsi, il a pu être mis en évidence des sélectivités différentes pour Se(VI) en fonction de la teneur en sulfates du milieu suggérant une inhibition du prélèvement de Se(VI) du fait de la compétition avec les ions sulfates pour l'accès aux sites des transporteurs. Cette compétition entre les ions séléniate et sulfate pour le même transporteur peut expliquer pourquoi l'ajout de gypse dans le sol se traduit par une réduction du prélèvement de Se par les végétaux. (Dhillon et Dhillon, 2000). Le séléniate a été utilisé comme agent sélectif pour isoler les mutants d'*Arabidopsis Thaliana* qui présentent une altération du gène codant pour les transporteurs de sulfates (AtSultr1:2). Ces travaux indiquent que ce gène est fortement exprimé dans le cortex des racines, à l'extrémité et sur le pourtour des racines (Shibagaki *et al.*, 2002).

Les transporteurs cellulaires peuvent être distingués sur la base de leur affinité pour le substrat, qui est définie par la constante de Mickaelis-Menten (K_m) correspondant à la valeur de concentration du substrat pour laquelle la vitesse d'une réaction enzymatique est égale à la moitié de la vitesse maximale. Ainsi, des études cinétiques ont montré la présence des deux catégories de transporteurs de sulfates (i) transporteurs à haute affinité, présents dans les racines et dont l'expression est régulée par la concentration des ions sulfates dans le milieu (K_m autour de 7-10 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (ii) transporteurs à basse affinité ($K_m = 100 \mu\text{mol L}^{-1}$) présents dans les racines et dans les feuilles, qui pourraient être impliqués dans les transports intercellulaires (Smith *et al.*, 1995). L'expression du gène codant pour les transporteurs à haute affinité est régulée par le niveau de sulfate dans la plante ainsi que par des régulateurs tels que le glutathion (GSH) et l'O-acétylsérine (OAS) (Hirai *et al.*, 2003). Des teneurs élevées en sulfates et GSH réduisent la transcription des gènes, alors que des concentrations élevées de O-acétylsérine augmentent la transcription et par conséquent l'absorption racinaire des ions sulfate et séléniate.

En ce qui concerne le mécanisme mis en jeu lors du prélèvement des ions sélénites par les plantes, il reste encore mal connu. Des études ont suggéré que Se(IV) est prélevé par les racines des plantes par diffusion passive via des co-transporteurs H^+ hexose. (Arvy *et al.*,

1993) ou/et via des aquaporines (Zhang *et al.*, 2006). Cependant, Li *et al.* (2008) ont remis en question cette diffusion passive de Se(IV) et proposé le rôle de transporteurs des ions phosphates dans le prélèvement de Se(IV) suite à l'observation de l'inhibition du prélèvement de Se(IV) provoquée par les ions phosphates.

Les plantes peuvent également prélever Se sous forme organique telle que la sélénométhionine grâce à un transport intracellulaire actif, régulé négativement par des inhibiteurs du métabolisme (i.e dinitrophénol) et par des conditions anaérobies (Abrams *et al.*, 1990).

Le taux de prélèvement de Se apparaît donc dépendant de sa concentration et des formes chimiques présentes dans la solution de sol, ainsi que des conditions rhizosphériques (pH, présence de sulfates et phosphates, redox).

L'absorption foliaire représente également une voie d'entrée possible de Se dans la plante. Des études ont montré la capacité de certaines espèces à absorber Se par application foliaire de solutions enrichies en Se sous formes inorganiques (Se(IV) ou Se(VI)) (Hu *et al.*, 2002, Kapolna *et al.*, 2009; Hurtevent *et al.*, 2013). Se reste alors essentiellement dans les feuilles, néanmoins il peut être métabolisé en partie puis transporté jusqu'aux racines.

Les plantes peuvent également absorber des formes volatiles de Se via la surface des feuilles. Zieve et Peterson (1984) ont montré que l'agrostis, (*Agrostis tenuis*), l'orge commune (*Hordeum vulgare*), la tomate (*Lycopersicon esculentum*) et le radis (*Raphanus sativus*) accumulent ⁷⁵Se après fumigation avec (⁷⁵Se)-DMSe en système fermé. Ils observent une accumulation de Se absorbé via les feuilles dans les racines sous formes de sélénium inorganique, sélénogluthation (SeGHS), SeMet et de protéines contenant Se détectées après séparation électrophorétique de la fraction soluble à l'éthanol (contenant 80% de ⁷⁵Se_{total} accumulé).

3.5. Accumulation et métabolisation

A partir des sols, des eaux et dans une moindre mesure, de l'atmosphère, les plantes sont capables d'incorporer le sélénium, majoritairement lorsqu'il est présent sous les formes Se(IV) et Se(VI). A partir de différents mécanismes de prélèvement par les végétaux, les plantes peuvent donc être enrichies selon différentes stratégies: par addition de Se aux sols via

des fertilisants enrichis en Se (généralement sous formes inorganiques ; Se(IV) et Se(VI)) (Euroola et Hietaniemi 2000; Lyons *et al.*, 2003; Hartikainen, 2005; White et Broadley, 2009), par immersion des graines dans une solution enrichie en Se avant germination (Gissel-Nielsen 1975, Smrkolj *et al.* 2007), par des cultures en solution hydroponique (Smolen *et al.*, 2014) et via l'application foliaire (irrigation) avec des solutions contenant du sélénium (Chen *et al.*, 2002; Fang *et al.*, 2008).

Cependant, le taux de prélèvement ainsi que l'accumulation de Se et par conséquent sa spéciation dans la plante dépendent de nombreux facteurs, tels que le type de plante, la concentration de Se et sa forme chimique, les caractéristiques du sol (pH, salinité...), la présence d'ions compétiteurs (i.e sulfates, phosphates).

3.5.1. Taux de prélèvement et accumulation dans la plante entière

3.5.1.1. Cultures hydroponiques

En ce qui concerne l'étude des taux de prélèvement et de translocation de Se par la plante en fonction de sa spéciation, la plupart des expériences ont été conduites en utilisant des solutions nutritives. En effet, les cultures en solutions nutritives permettent de s'affranchir de l'influence des caractéristiques du sol sur le prélèvement de Se par la plante. Dans les cultures en hydroponie, la solution de Hoagland (Hoagland *et al.*, 1950) est communément utilisée avec des forces ioniques de 0.2 ou 0.5.

Six études conduites sur différentes plantes (oignon (*Allium-cepa*), céleri (*Apium graveolens*), chou commun (*Brassica oleracea*), luzerne (*Medicago sativa*) et, deux espèces d'astragales (*Astragalus bisulcatus*; *Astralagus crotolariae*)) ont montré que les teneurs totales en Se mesurées dans la plante sont approximativement du même ordre de grandeur, indépendamment de la forme chimique (Se(IV) et Se(VI)) sous laquelle Se est présent dans la solution nutritive. Généralement, les concentrations de Se mesurées dans la plante sont proportionnelles à celles de la solution nutritive (Bitterli *et al.*, 2010).

Dans une autre étude conduite sur le blé, exposé à 10 $\mu\text{mol}(\text{Se}) \text{L}^{-1}$ en conditions nutritionnelles (S, P) non limitantes (Li *et al.*, 2008), la quantité de Se accumulée dans la plante entière est similaire en présence de séléniate ou de sélénite. A l'inverse, en conditions de culture limitantes en S ou P, l'accumulation de Se est fonction de la forme chimique de Se. Par exemple, le taux de prélèvement des ions séléniate est largement supérieur (9.5 fois) à

celui des ions sélénite dans les plantes privées de S, l'inverse étant observé pour les plantes privées de P. La composition de la solution nutritive, notamment les concentrations des ions compétiteurs (SO_4^{2-} ; PO_4^{3-}) est donc un facteur important lors de la réalisation de cultures en hydroponie (Hopper et Parker, 1999).

Cependant, quelques résultats sont en contradiction; ils montrent des différences dans les taux de prélèvement en fonction des espèces chimiques apportées, même dans des solutions nutritives en condition nutritionnelles non limitantes où les deux espèces (sélénite et séléniate) sont supposées également disponibles pour la plante. Par exemple, les travaux de Zhang *et al.* (2003) et Srivastava *et al.* (2005) montrent que l'accumulation du sélénium, respectivement dans le soja et les fougères, traités avec du sélénite est supérieure à celle des plantes traitées avec du séléniate. A l'inverse, d'autres études ont montré que les cultures réalisées avec Se(VI), peuvent conduire à une accumulation plus élevée en sélénium que celles utilisant Se(IV), pour plusieurs espèces de plantes (i.e, moutarde indienne, tournesol, lupin et maïs) (De Souza *et al.*, 1998, Ximénez- Embun *et al.*, 2004; Longchamp *et al.*, 2013).

2.5.1.2. Cultures sur sol

Dans le cas des cultures sur sol (i.e en pot, en serre ou en champs); une corrélation directe entre les teneurs totales en Se dans le sol et les taux d'accumulation dans la plante n'est pas toujours observée. En effet, contrairement aux cultures hydroponiques dans lesquelles Se est entièrement disponible, seule une fraction de Se présent dans le sol est disponible pour la plante. Cette fraction est variable selon les sols et dépend à la fois des propriétés du sol et de la spéciation chimique de Se et des conditions chimiques (pH, Eh,...).

Le séléniate, généralement soluble, est la forme la plus mobile et la plus biodisponible pour les plantes tandis que le sélénite, plus fortement adsorbé, est moins mobile, et par conséquent moins biodisponible. Les sulfures de sélénium, présents dans les sols aux conditions réductrices sont très peu solubles et ont un potentiel d'oxydation faible, ils ne sont donc pas disponibles pour les végétaux. (cf. § 2.1).

La grande majorité des études montre que la quantité de sélénium accumulée dans la plante est supérieure dans le cas d'ajouts au sol de séléniate par rapport à l'ajout de sélénite. Par exemple, l'accumulation de Se dans le ray-grass apparaît environ 50 fois supérieure pour Se(VI) par rapport à Se(IV) (Cartes *et al.*, 2005). Le prélèvement des ions séléniate a été évalué par Munier-Lamy (2007) pour quatre types de plantes: laitue, maïs, radis et ray-grass.

Entre 2 et 40% de Se présent initialement dans le sol sous forme de Se(VI) sont prélevés par ces plantes, les taux étant nettement supérieurs pour le radis par rapport aux autres plantes. Le ray-grass prélève 17% du sélénium initial (environ $150 \text{ mg(Se) kg}^{-1}$).

Deux études conduites sur des sols naturellement riches en Se ont reporté des taux d'accumulation par les plantes étudiées (Colza (*Brassica napus*), Chanvre de Deccan (*Hibiscus cannabinus L.*) et Fétuque roseau (*Festuca arundinacea*)) comparables à ceux obtenus pour les mêmes plantes cultivées sur des sols enrichis en Se(VI) (Bañuelos *et al.*, 1997; Dhillon et Dhillon, 2000). Cette similitude en ce qui concerne les teneurs de Se retrouvées dans les plantes peut être expliquée par le fait que le séléniate est l'espèce prédominante dans les sols sélénifères alcalins utilisés pour l'étude.

En conditions environnementales réelles, l'accumulation de Se par la plante est affectée par sa phase de croissance, ses conditions physiologiques ainsi que par les conditions climatiques. Gissel-Nielsen (1975) a observé des fluctuations saisonnières du prélèvement de Se. Comme présenté figure A.11, la concentration de sélénium dans les herbes de prairie est fortement réduite après la saison de croissance, ce qui suggère une diminution progressive de Se disponible dans le sol. En parallèle de la phase de dormance de la plante (pas de germination des semences), le prélèvement de Se est fortement réduit, en parallèle le "pool" biodisponible de Se dans le sol peut donc être renouvelé (effritement et décomposition de la matière organique) sans être consommé et sera donc disponible pour la phase de germination suivante. Lors de la phase de croissance, l'extraction de Se dépasse le taux de reconstitution du "pool" biodisponible de Se dans le sol ce qui se traduit par une réduction de l'accumulation de Se par la plante. De plus, l'accumulation de Se est diluée par l'augmentation de la biomasse.

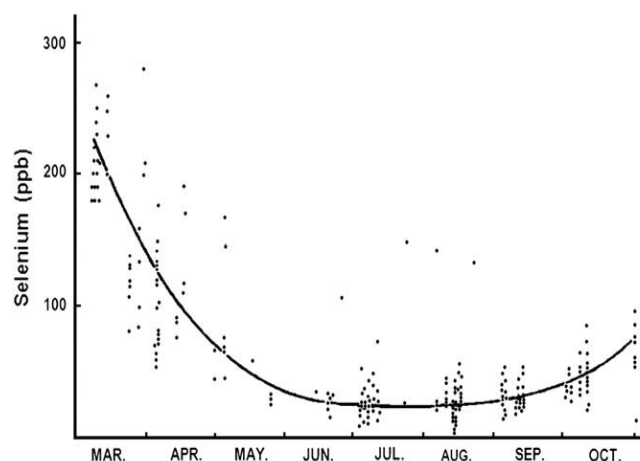


Figure A. 11. Tendence saisonnière des concentrations de Se dans des végétaux de prairie (Gissel-Nielsen 1975)

Les conditions climatiques peuvent aussi avoir une influence sur le taux de prélèvement de Se par la plante; par exemple des précipitations importantes peuvent provoquer une réduction de l'accumulation de Se dans la plante. L'influence des précipitations peut être corrélée à une modification des conditions redox du sol (oxique → anoxique), se traduisant par la réduction des sélénates en formes moins disponibles, i.e sélénite, Se élémentaire et séléniure (Geering *et al.*, 2007). Par contre, dans des conditions où la transpiration est limitée par une faible disponibilité d'eau dans le sol, une augmentation des précipitations peut se traduire par une augmentation de l'accumulation de Se (Johnsson *et al.*, 1991).

3.5.2. Distribution dans les différents organes

Dans la grande majorité des études, l'accumulation du sélénium n'est pas homogène dans l'ensemble de la plante, des différences étant observées entre racines et parties aériennes, et entre organes jeunes et plus vieux. La distribution de Se dans les différentes parties de la plante et par conséquent le facteur de translocation racines-parties aériennes (Ft) varient fortement en fonction de l'espèce chimique sous laquelle Se est fourni à la plante. En général, lors d'un traitement avec des ions sélénate, des concentrations plus élevées sont observées dans les parties aériennes par rapport aux racines (De Souza *et al.*, 1998; Zayed *et al.*, 1998; Terry *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2008). A l'inverse, exposée à des ions sélénite, la plante l'accumule plutôt dans les racines (Arvy *et al.*, 1993; De Souza *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2008, Srivastava *et al.*, 2005; Terry *et al.*, 2000; Ximenez-Embun *et al.*, 2004).

Arvy *et al.* (2003) ont observé que 50% de Se(VI) prélevé par le haricot (*Phaseolus vulgaris*) sont transloqués dans les feuilles via le xylème après trois heures en culture hydroponique, tandis que Se(IV) est essentiellement présent dans les racines.

Zayed *et al.* (1998) ont calculé les facteurs de translocation (Ft) pour quatre plantes (broccoli (*Brassica oleracea*), moutarde (*Brassica juncea*), riz (*Oryza Sativa*) et betterave à sucre (*Beta vulvaris*)) en fonction de la forme chimique séléniée. Ces rapports varient dans une gamme 1.4-17.2 dans le cas de l'exposition à Se(VI), de 0.6-1 pour SeMet, et sont inférieurs à 0.5 pour Se(IV).

Li *et al.* (2008) ont étudié l'interaction entre les ions sélénite et sélénate en termes de translocation racines-parties aériennes dans le blé (*Triticum aestivum*). Les résultats montrent que, bien que l'accumulation de Se par la plante entière ne soit pas affectée par la présence simultanée des deux espèces dans la solution nutritive ; la translocation des ions sélénate lors

d'un traitement mixte séléniate/sélénite est significativement inférieure à celle observée quand le séléniate est présent seul dans la solution hydroponique.

L'âge de l'organe semble également avoir une influence sur l'accumulation du sélénium. Les teneurs en Se mesurées dans différents organes de deux plantes hyper accumulatrices (une astragale (*Astragalus bisulcatus*) et une crucifère (*Stanleya Pinnata*)) suivies *in situ* durant deux saisons de croissance indiquent l'existence d'un cycle saisonnier de l'accumulation de Se. Les auteurs observent que Se est accumulé à des taux extrêmement élevés dans la jeune pousse (première phase de croissance); tandis que les teneurs en Se diminuent fortement dans les feuilles adultes. Cette réduction peut être due à une dilution liée à la croissance de la plante et/ou à un transfert de Se vers les compartiments plus jeunes (nouvelles feuilles et tissus reproducteurs) (Galeas *et al.*, 2006). Ce transport de Se a été suggéré également par une autre étude conduite sur la même astragale traitée avec Se(IV): la présence majoritaire des composés organiques de Se était observée dans les jeunes feuilles, tandis que les vieilles feuilles contenaient essentiellement du séléniate (Pickering *et al.*, 2000).

3.5.3. Spéciation et taux de métabolisation

La spéciation de Se dans les plantes joue un rôle fondamental du fait que les effets nutritionnels peuvent varier en fonction des différentes espèces présentes dans les organes comestibles (Whanger *et al.*, 2002; Rayman *et al.*, 2008). Cependant, la majorité des études de spéciation a été conduite pour les plantes hyper-accumulatrices ou accumulatrices secondaires. Ces types de plantes sont bien adaptés à l'identification des composés séléniés du fait des concentrations accumulées en Se élevées (Montes-Bayon *et al.*, 2002a; Mounicou *et al.*, 2006; Larsen *et al.*, 2006).

Les résultats des analyses de la spéciation de Se dans les plantes (tableau A.8) montrent que la distribution des espèces dépend fortement de la forme chimique sous laquelle le sélénium a été fourni à la plante dans le milieu de culture. Cette différence en terme de spéciation peut ainsi expliquer les différences observées en terme d'accumulation de Se dans les différents tissus (racines et parties aériennes) comme décrit précédemment (cf. § 3.5.2).

Des quantités remarquables de sélénium sous forme inorganique (SeVI) ont été mesurées dans la ciboulette (Kapolna *et al.*, 2007), l'oignon sauvage (Whanger *et al.*, 2000) et l'endive (Pedrero *et al.*, 2006) cultivés en solutions nutritives enrichies en Se(VI). Au contraire, en présence de Se(IV) ou de SeMet, l'incorporation de Se dans la ciboulette se traduit par la

formation de formes organiques (SeMet; SeCys et MeSeCys) (Kapolna *et al.*, 2007). De la même manière, pour des radis cultivés en présence de sélénite, environ 95% de Se est transformé en formes organiques (Pedrero *et al.*, 2006). A l'inverse, ces végétaux cultivés dans un milieu enrichi en Se(VI) ne contiennent que 38% de Se total dans la plante sous des formes organiques. Dans le blé (*Triticum aestivum*) cultivé en solution nutritive enrichie avec des ions sélénite ou séléniate, il est également observé que le sélénite est rapidement transformé en formes organiques (MeSeCys, SeOMet, SeMet et autres composés non identifiés) retenues dans les racines tandis que le séléniate est conduit plus rapidement vers les feuilles restant en majorité sous forme de Se(VI) (Li *et al.*, 2008).

De manière générale, dans les plantes exposées aux ions séléniates, leur concentration représente 50 à 90% du sélénium total accumulé dans la plante, des composés séléniés tels que SeMet, SeCys, SeMeSeCys et sélénite sont également détectés en plus faibles concentrations (De Souza *et al.*, 1998; Zayed *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2008; Mazej *et al.*, 2008). A l'inverse, les ions sélénites sont plus rapidement convertis en composés organiques, représentant 80 à 98% de la teneur totale en sélénium dans la plante. L'accumulation de Se dans les racines est plus importante après exposition à Se(IV) du fait de sa métabolisation en molécules organiques qui inhibent son transfert vers les parties aériennes (Zayed *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2008). Dans le cas des plantes exposées aux ions séléniate, Se est accumulé dans les parties aériennes sous sa forme initiale de séléniate. Etant plus mobile il est rapidement transporté jusqu'aux feuilles *via* le xylème (De Souza *et al.*, 1998; Zayed *et al.*, 1998; Terry *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2008).

Tableau A. 8. Distribution des espèces sélénées dans des végétaux (d'après Pyrzynska *et al.*, 2009)

Plante		[Se] _{tot} ^a	Extraction	Espèces sélénées (%) ^b						Ref.
				Se(IV)	Se(VI)	SeMet	SeCys ₂	MeSeCys	γ-Glu-MeSeCys	
<i>Culture en solution nutritive</i>										
<i>Brocoli (Brassica oleracea)</i>	Na ₂ SeO ₄ (1 mg/l, 40 jours)	27 ^d	enzymatique	7	-	11.7	-	45.6	-	Pedrero <i>et al.</i> (2008)
<i>Endive (Chicorium intybus)</i>	Na ₂ SeO ₄ (7 mg/l, 41 jours)	480	enzymatique /eau	0.1/0.05	63/63	8.1/0	<LOD	0.7/traces	-	Mazej <i>et al.</i> (2006)
<i>Oignon sauvage (Allium tricoccum)</i>	Na ₂ SeO ₄ (30 mg/l)	252	enzymatique /HCl	-	42	-	-	35	1.4	Whanger <i>et al.</i> (2000)
<i>Ciboulette (Allium schoenoprasum)</i>	Na ₂ SeO ₃	222	HClO ₄ - éthanol/ enzymatique	-/3	21-5	-/5	40/42	28/36	-	Kapolna <i>et al.</i> (2007)
	Na ₂ SeO ₄	613		-/-	81/51	-/-	5/2	3/20	-	
	SeMet (10 mg/l, 14 jours)	295		-/1	5/-	-/3	35/37	46/48	-	
<i>Culture en pot</i>										
<i>Ail (Allium sativum)</i>	Na ₂ SeO ₄ + Mychorize (50 mg/kg, 4 semaines)	969	enzymatique /eau	-	-/9 ^c	2/1 ^c	-	3/5 ^c	64/62 ^c	Larsen (2006)
		296		-	2 ^c	13 ^c	0.5 ^c	3 ^c	73 ^c /85 ^c	Ip <i>et al.</i> (2000a)
<i>Oignon (Allium cepa)</i>	Na ₂ SeO ₃	154	HClO ₄ - éthanol	-	-	0.3	0.5	4.0	-	Wroblel <i>et al.</i> (2004)
	Na ₂ SeO ₄ (15mg/kg, 8 jours)	601		-	-	0.2	0.1	1.9	-	
<i>Oignon vert (Allium fistulosum)</i>	Na ₂ SeO ₃ (15mg/kg, 4 mois)	30,3	enzymatique /HCl	+/-	-/-	+/-	-/+	-/+	-/+	Shah <i>et al.</i> (2004)

Ail		68	enzymatique	-	1	18	0,5	2,5	68	Kotrebai <i>et al.</i> (2000)
		235		-	1,5	17	0,5	3	700	
		1355		-	4	13	-	60	8	
Oignon sauvage		48	enzymatique	-	1	21	-	34	3	
		524		-	22	5	-	44	1,5	
Oignon		96	enzymatique	-	10	5	1	1	63	
		140		-	33	10	-	5	35	
Radis (<i>Raphanus satinus</i>)	Na ₂ SeO ₃ (5mg/kg, 40 jours)	112	enzymatique	-	0.9	16.1	5.3	74.1	-	Ogra <i>et al.</i> (2007)
	Na ₂ SeO ₄ (5mg/kg, 40 jours)	120		-	56.7	16.7	15.8	5.8	-	
Citrouille (<i>Cucurbita pepo</i>)	Na ₂ SeO ₄	1.1	Extraction proteolitique	-	85	-	-	-	-	Smrekolj <i>et al.</i> (2005)

+ détecté mais non quantifié

^a $\mu\text{g kg}^{-1}$ poids sec ;

^b relatif à la teneur de Se total dans l'échantillon ;

^c basé sur le Se total élué par la colonne ;

^d poids frais

La caractérisation des formes chimiques sélénées dans les végétaux ne se limite pas à l'analyse des petites molécules (i.e acides aminés, sélénite, séléniate, autres formes organiques de petite taille) mais aussi à celle des macromolécules (i.e peptides et protéines). Wrobel *et al.* (2004) ont montré que la proportion de Se associé à la fraction correspondant aux biomolécules de haut poids moléculaire (HMW) est plus importante quand les plantes sont cultivées en présence de sélénite (33% dans les feuilles, 26% dans les bulbes d'oignon). En présence de séléniate, ces valeurs sont nettement diminuées (3% et 5% respectivement). De la même façon, l'exposition à Se(VI) de plants de ciboulette résulte en l'incorporation majoritaire de Se dans les molécules de bas poids moléculaire (LMW) contrairement à ce qui est observé dans le cas d'un enrichissement en Se(IV) ou SeMet.

Les résultats des études menées sur l'ail enrichi indiquent que Se ne serait pas accumulé sous forme de sélénoprotéines (Larsen *et al.*, 2006). En effet, le traitement enzymatique de l'échantillon ne permet pas d'obtenir un rendement d'extraction supérieur à celui obtenu par digestion acide (0.1 M HCl) ou par de l'acétate d'ammonium à pH 5.6. La Se-méthyl-sélénocystéine représente le principal acide aminé dans les végétaux de genre *Allium* après croissance sur des sols ou solutions hydroponiques enrichis en Se(IV) ou SeMet. Les acides aminés sélénocystine (SeCys₂) et SeMet sont également quantifiés mais en plus petites quantités. L'identification a été effectuée en se basant sur les temps de rétention chromatographiques qui coïncident avec ceux des étalons commercialement disponibles ou synthétisés au laboratoire. La présence de γ -Glu MeSeCys dans les extraits a été confirmée par spectrométrie de masse moléculaire (ESI-MS/MS) en observant le profil isotopique de Se et des ions formés (Larsen *et al.*, 2006; Ip *et al.*, 2000b; Shah *et al.*, 2004; Ogra *et al.*, 2005). La γ -Glu MeSeCys a aussi été identifiée dans des échantillons naturels cultivés sur des sols riches en Se (oignon, *Allium cepa* et ail, *Allium sativa*) (McSheely *et al.*, 2000; Auger *et al.*, 2004).

L'analyse d'échantillons naturels non enrichis en Se a montré la présence de composés tels que Se(VI), SeMet, SeCys₂, MeSeCys et γ -Glu-MeSeCys, également identifiés dans le cas de végétaux enrichis en Se (Kotrebai *et al.*, 2000). La teneur totale en Se dans le végétal influence la distribution de ses formes chimiques. Par exemple, les quantités de SeMet et γ -Glu-MeSeCys augmentent avec la concentration totale de Se dans l'ail, mais au delà d'une concentration totale de 300 mg(Se) kg⁻¹, MeSeCys représente le principal produit de conversion de Se. Il est supposé que γ -Glu-MeSeCys sert de transporteur de MeSeCys qui sera par la suite converti en méthylsélénol par l'enzyme β -lyase (Smrekolj *et al.*, 2005).

3.5.4. Volatilisation

Compte tenu des voies métaboliques précédemment décrites, les plantes sont capables de synthétiser des espèces sélénées volatiles (DMSe, DMDS_e). Les taux de volatilisation varient fortement entre les différentes variétés de plantes: étant plus élevés pour le riz, le chou et le brocoli (200-300 $\mu\text{g m}^{-3} \text{j}^{-1}$) en comparaison avec la canne à sucre, la laitue et l'oignon (15 $\mu\text{g m}^{-3} \text{j}^{-1}$), les cultures d'orge, trèfle, carotte, concombre, tomate et maïs présentant des valeurs intermédiaires (Terry *et al.*, 1992).

La volatilisation est plus efficace à partir des racines qu'à partir des feuilles bien qu'il soit difficile de discriminer la volatilisation provenant du sol de celle effectuée par les végétaux. Le taux de volatilisation plus élevé dans les racines est imputable soit à des facteurs internes à la plante ou bien à la population microbienne rhizosphérique (De Souza *et al.*, 1998; Terry *et al.*, 2000). Des études ont montré que les taux de volatilisation sont corrélés positivement avec les teneurs en Se dans le milieu de culture et dans les tissus des différentes variétés de plantes (De Souza *et al.*, 1998; Zayed *et al.*, 1998).

Des taux différents de volatilisation ont été observés en fonction de la forme chimique sous laquelle Se est apporté à la plante, Se(IV) et SeMet étant plus rapidement volatilisés que Se(VI) (Lewis *et al.*, 1974 ; De Souza *et al.*, 1998, Terry *et al.*, 1992, Zayed et Terry, 1994, Zayed *et al.*, 1998). Cela est probablement dû au fait que la réduction des ions séléniate en sélénite est une étape limitante dans la voie de métabolisation du sélénium (Leustek *et al.*, 1994, Pilon-Smith *et al.*, 1999). Ces observations proviennent d'expériences dans lesquelles les espèces sélénées sont ajoutées individuellement au milieu nutritif et ne permettent donc pas d'évaluer les éventuelles compétitions liées à leur présence simultanée.

La volatilisation de Se est également affectée par la présence d'anions compétiteurs tels que les sulfates, en effet il a été observé que la volatilisation diminue chez les plantes traitées avec des ions séléniate lorsque la concentration en ions sulfates augmente dans le milieu de culture (Zayed et Terry, 1992; Zayed *et al.*, 1994). De plus, la volatilisation est d'autant plus diminuée que le rapport S/Se dans les tissus végétaux est élevé. On suppose donc, que les ions sulfate entrent en compétition avec les ions séléniate pour les sites actifs des transporteurs et des enzymes métaboliques responsables de la conversion du sélénium inorganique en formes volatiles (Terry et Zayed, 1994; Zayed *et al.*, 1994). L'effet inhibiteur des ions sulfate sur la volatilisation est bien moindre lorsque Se est apporté sous forme de sélénite ou SeMet (Zayed et Terry, 1998).

4. OUTILS ANALYTIQUES

Plusieurs méthodes analytiques permettent la détermination du sélénium total et de ses espèces. Les plus utilisées pour les échantillons liquides sont la spectrométrie de fluorescence atomique (AAF), la spectrométrie d'absorption atomique utilisant le couplage avec la génération d'hydrure (HG-AAS) ou le four graphite (GF-AAS), les méthodes électrochimiques (voltamétrie de redissolution cathodique pulsée, DPCSV), la spectrométrie de masse élémentaire et moléculaire (Cambell *et al.*, 1992; Potin-Gautier *et al.*, 1995; Ponce de Léon *et al.*, 2002; Capelo *et al.*, 2006). Cependant, les échantillons environnementaux sont des matrices complexes, susceptibles de générer de nombreuses interférences lors de l'analyse. Parmi les différents outils disponibles la spectrométrie de masse à plasma induit (ICP-MS) a été la technique analytique de choix pour cette étude en raison de sa sélectivité, sa sensibilité et sa capacité multi-élémentaire et multi-isotopique. Elle se présente donc, comme le détecteur le plus adapté à l'analyse de Se présent à l'état de traces dans des échantillons environnementaux.

4.1. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse, depuis les premiers travaux effectués par Thompson en 1912, est devenue un outil puissant et polyvalent en chimie analytique grâce à son incomparable sensibilité, ses limites de détection basses et sa rapidité.

Dans un spectromètre de masse (figure A.12), toutes les molécules subissent les étapes suivantes: l'échantillon est introduit dans l'appareil via un système d'injection, les molécules sont converties en ions dans la source d'ionisation par perte ou gain de charge. Une fois formés, les ions sont dirigés par voie électrostatique dans l'analyseur de masse où ils sont, ensuite, séparés en fonction du rapport masse/charge (m/z), puis détectés. Le signal est ensuite amplifié et traité par une interface informatique pour fournir le spectre de masse. La pression dans l'analyseur de masse et le détecteur est comprise entre 10^{-3} et 10^{-9} torr pour éviter des collisions possibles entre les ions et les molécules.

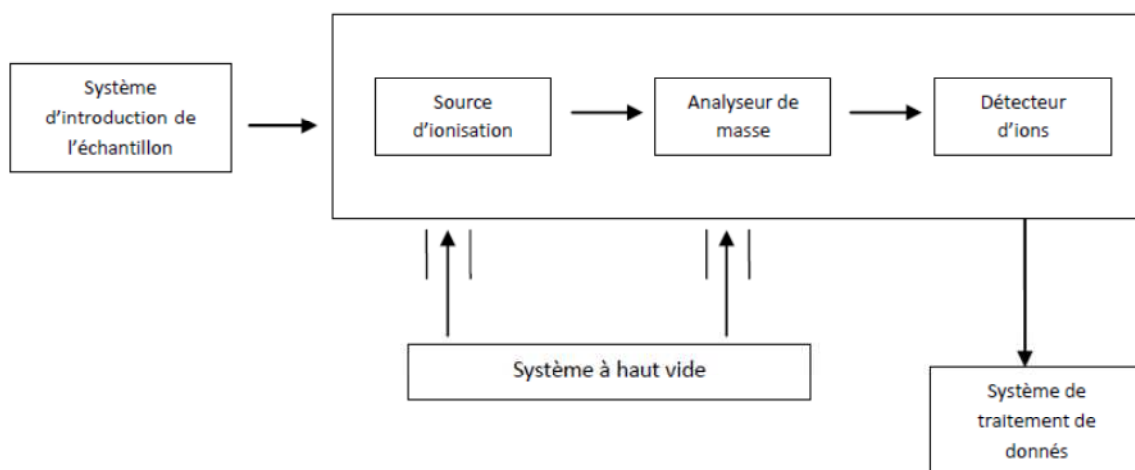


Figure A. 12. Diagramme schématique d'un spectromètre de masse (d'après Dumont, 2006)

4.1.1. Source d'ionisation : spectrométrie à plasma induit (ICP-MS)

La spectrométrie de masse à source d'ionisation par plasma induit a été développée au début des années 80. Les avantages de l'ICP-MS sont des limites de détection très basses (ng L^{-1}) et une capacité d'analyse multi-élémentaire et multi-isotopique. Cette technique peut être également utilisée pour des analyses de spéciation par couplage à une technique de séparation chromatographique. Ses principales limites sont les interférences isobariques et polyatomiques. Les principales interférences pour la détection de Se seront discutées dans le paragraphe § 4.1.3.

4.1.1.1 Principe (Montaser 1998; Broeckart 2002)

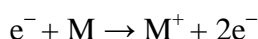
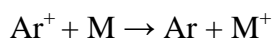
Le plasma est un gaz composé d'électrons et d'ions formant un ensemble électriquement neutre. La température du plasma varie entre 8000 et 10000 K. Dans le cas de l'ICP-MS, le plasma est formé à partir d'argon, un gaz rare dont le potentiel d'ionisation ($E=15.7 \text{ eV}$) permet l'ionisation de nombreux éléments.

Le plasma est produit sous pression atmosphérique à l'aide d'une bobine d'induction qui entoure une torche, généralement en quartz, et formée de 3 tubes concentriques de dimensions spécifiques dans lesquels différents débits d'argon sont introduits. Le canal extérieur refroidit la torche et supporte le plasma, le canal interne en limite sa diffusion et le canal central (injecteur) transporte l'aérosol et permet à ce dernier de pénétrer dans le plasma. Autour de la torche, se trouve une bobine d'induction en cuivre connectée à un générateur de radio

fréquence. En appliquant un courant alternatif à haute fréquence (RF: entre 5 et 100 mHz), un champ magnétique est généré permettant de soutenir le plasma par collision des atomes d'argon après l'ionisation initiale assurée par une décharge électrique au bas de la torche.

L'échantillon liquide est transformé en aérosol par un nébuliseur pneumatique. Afin d'assurer la stabilité du plasma, il faut que l'aérosol transmis soit composé de fines gouttelettes dont la distribution en taille doit être étroite afin que les espèces soient atomisées et ionisées efficacement dans le plasma. Le tri des gouttelettes est effectué dans la chambre de nébulisation qui supprime les plus grosses drainées vers la poubelle. Seules les gouttelettes les plus fines (< 10% de l'aérosol) sont transportées vers le plasma.

Quand les gouttelettes de l'échantillon sont introduites dans le plasma, l'ionisation d'un élément a principalement lieu par impact électronique et transfert de charge avec Ar^+ :



On estime que 51 éléments naturellement présents dans la table périodique sont ionisés à plus de 90% et seulement 9 à moins de 1%.

Une vue d'ensemble schématique du système est représentée figure A.13.

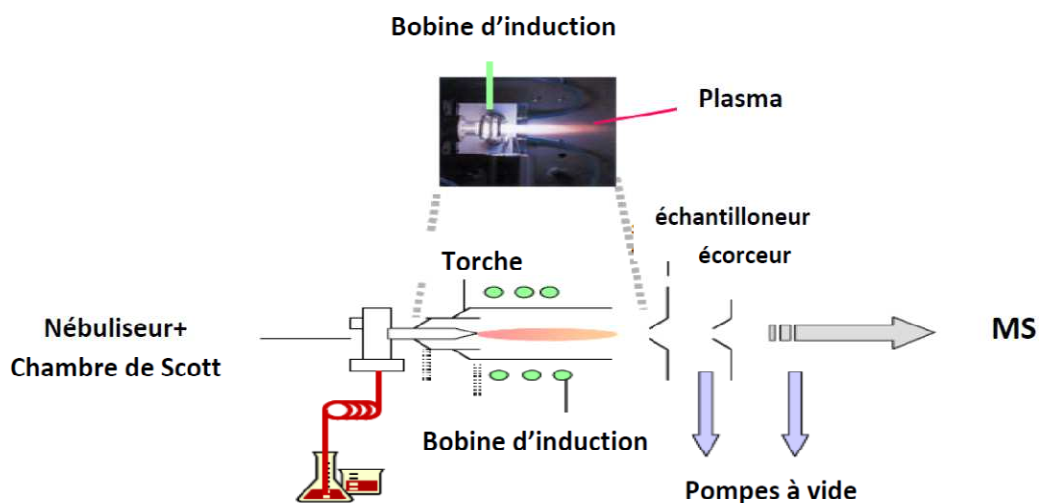


Figure A. 13. Représentation schématique d'un système standard d'introduction de l'échantillon dans la source ICP. Dans l'insert, une photo du plasma est fournie (Dumont, 2006)

Le plasma étant produit à pression atmosphérique, une interface entre celui-ci et le spectromètre de masse fonctionnant sous pression réduite, est donc nécessaire. Cette interface est constituée par l'intermédiaire de deux cônes, le premier cône dit échantillonneur permet le passage des ions du plasma vers un vide de l'ordre de 10^2 Pa au moyen d'une pompe primaire. Le second cône dit écorceur permet d'atteindre une pression réduite, de l'ordre de 0.2 à 4 mPa.

Les deux cônes (Figure A.14) présentent des orifices centraux permettant l'extraction des ions au centre du faisceau ionique; ils sont réalisés dans un matériau évacuant facilement la chaleur et peu actif chimiquement (nickel ou platine) et sont refroidis via un dispositif de circulation d'eau alimentant le support des cônes.



Figure A. 14. a) cône échantillonneur; b) cône écorceur (www.chem.agilent.com)

A la sortie de l'interface, les ions divergent de façon importante. Le faisceau d'ions est alors focalisé par un jeu de lentilles ioniques afin de limiter les pertes avant le filtre de masse. Le système d'optique ionique consiste en un assemblage de plaques ou de cylindres métalliques chacun assujéti à un potentiel. Le réglage de ces potentiels est délicat dans la mesure où les tensions sont dépendantes les unes des autres et qu'il doit permettre d'optimiser l'extraction et la transmission des ions. Outre la focalisation des ions à l'entrée de l'analyseur de masse, le système permet d'éliminer les photons et les atomes neutres afin de réduire les intensités du bruit de fond.

4.1.1.3 Analyseur quadripolaire et détecteur

La séparation des ions selon leur charge et leur masse se réalise dans la cellule quadripolaire qui est l'analyseur de masse le plus répandu en raison surtout de sa souplesse d'utilisation, de sa polyvalence et de son faible coût.

Le filtre de masse quadripolaire est constitué de quatre barreaux parallèles reliés électriquement par paires opposées. Une tension continue, positive ou négative, d'intensité

absolument identique est appliquée à chaque paire, ainsi qu'une tension alternative de haute fréquence à l'ensemble des barreaux. Il en résulte que les barres opposées ont toujours le même potentiel et les barres adjacentes des tensions de signe opposé. Chaque réglage des deux tensions sera caractéristique d'un ion m/z qui adopte une trajectoire hélicoïdale stable le long de l'axe central du quadripôle (Figure A.15) et pourra donc être transmis au détecteur.

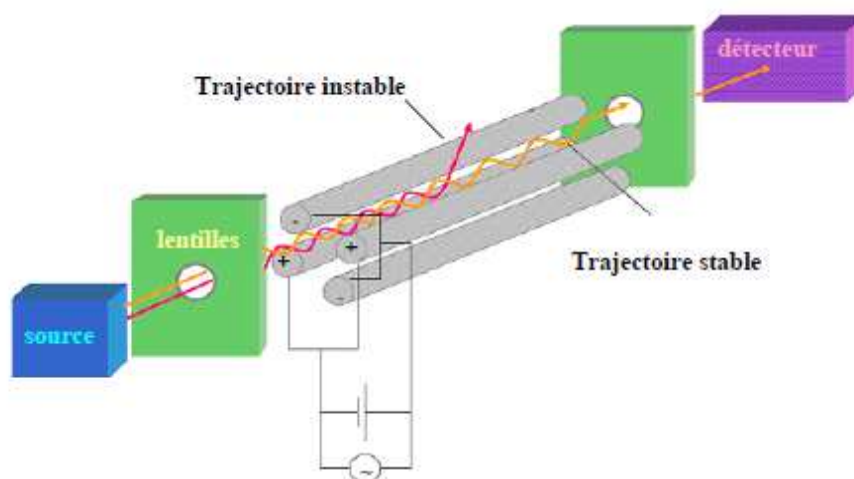


Figure A. 15. Analyseur de masse quadripolaire (Hoffman et Stroobant, 2007)

L'ensemble des ions à analyser, de rapports m/z différents, est donc mesuré séquentiellement en quelques millisecondes, en faisant varier la tension appliquée aux pôles.

La détection s'effectue grâce à un multiplicateur d'électrons à dynodes discrètes qui amplifie le signal par formation d'électrons secondaires. En général, pour un ion qui heurte le détecteur, environ 100 électrons atteignent un collecteur équipé d'un préamplificateur. Le signal se traduit en nombre d'impulsions (nombre de coups) qui est proportionnel à la concentration de l'élément en solution, une interface informatique assure le transfert des données afin qu'elles soient traitées.

4.1.3. Les limitations pour la détection de Se par ICP-MS

La détection par ICP-MS est actuellement la technique analytique privilégiée pour les analyses élémentaire de Se et de sa spéciation, grâce à sa sensibilité, à la possibilité de suivre simultanément les différents isotopes et à la facilité de couplage à la chromatographie liquide (HPLC).

L'inconvénient majeur lors de la mesure de Se par ICP-MS est lié aux interférences spectrales aux rapports m/z des isotopes de Se. Le dimère de l'argon, gaz plasmagène, est la principale interférence pour la détection de ^{80}Se , isotope le plus abondant. Les autres isotopes de Se moins abondants sont également sujets aux interférences polyatomiques (tableau A.9).

Tableau A. 9. Principales interférences spectrales pour les différents isotopes du sélénium (Darrouzès, 2005)

<i>Isotopes</i>	<i>Abondance</i>	<i>Interférences majeures</i>
^{74}Se	0.89%	$^{37}\text{Cl}_2, ^{40}\text{Ar}^{34}\text{S}^+$
^{76}Se	9.36%	$^{36}\text{Ar}, ^{40}\text{Ar}^+, ^{38}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+, ^{40}\text{Ar}^{36}\text{S}^+, ^{31}\text{P}^{214}\text{N}^+$
^{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%	$^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}_2, ^{34}\text{S}^{16}\text{O}^{3+}, ^{82}\text{Kr}^+, ^{40}\text{Ar}_2\text{H}^{2+}, ^1\text{H}^{81}\text{Br}^+$

L'utilisation de cellules de collision/réaction (CCR) dont les dernières générations d'ICP-MS sont équipées, rend possible l'utilisation des ICP-Q-MS en routine avec des limites de détection très satisfaisantes (de l'ordre de quelques ng L^{-1}) (Iglesias *et al.*, 2002) tout en s'affranchissant des interférences polyatomiques.

Cette technique, décrite en détails par Tanner *et al.* (2002), est basée sur la pressurisation d'un filtre de masse multipolaire (de type quadripôle, hexapôle ou octopôle) disposé entre les lentilles électrostatiques et l'analyseur de masse, par un gaz ou un mélange de gaz pour réduire ou éliminer les interférences spectrales à l'aide de réactions et/ou collisions en fonction du gaz utilisé.

La liste des gaz utilisables dans la cellule de collision/réaction est fournie ci-dessous, les plus fréquemment utilisés étant indiqués en gras :

- Gaz de collision : **He**, Ar, Ne, Xe
- Gaz réactif de transfert de charge : **H₂**, NH₃, Xe, CH₄, N₂
- Gaz réactif d'oxydation : **O₂**, **N₂O**, NO, CO₂
- Gaz réactif de réduction : H₂, CO
- Autres gaz de réaction (formation d'adduits) CH₄, C₂H₆, C₂H₄, CH₃F, SF₆, CH₃OH

Dans le cas du sélénium, l'hydrogène (Marchante-Gayon *et al.*, 2000; Mazan *et al.*, 2002; Leonhard *et al.*, 2002; Hinojosa-Reyes *et al.*, 2003;) et le méthane (Sloth *et al.*, 2000) semblent être les gaz les plus efficaces pour éliminer les interférences causées par l'argon.

L'hélium peut également être employé seul (Iglesias *et al.*, 2002) ou mélangé avec H₂ (Feldmann *et al.*, 1999; Boulyga *et al.*, 2001; Darrouzès *et al.*, 2005; O' Brien *et al.*, 2003). Le choix du gaz ajouté dans la cellule dépend généralement du type de technologie utilisée et donc du constructeur et, le débit de gaz est en général adapté à un élément pour une matrice donnée.

Bien qu'efficace, la suppression des interférences à l'aide de la cellule de collision/réaction souffre de certaines limitations, par exemple liées au fait que le gaz appliqué peut réagir avec l'élément cible et les autres éléments de la matrice, en produisant dans la CCR de nouvelles interférences (interférences du second ordre). Par exemple, l'utilisation de H₂, conduit à la formation de nouvelles interférences polyatomiques, comme SeH⁺ (Larsen *et al.*, 2003; Sloth *et al.*, 2003) et BrH⁺ (Wallschlager *et al.*, 2004). Les résultats obtenus peuvent donc être erronés si ces interférences ne sont pas maîtrisées lors de l'analyse. Les corrections mathématiques appliquées pour s'affranchir des interférences liées à l'hydruration, seront expliquées en détail dans le chapitre C.I.

La détermination de Se par ICP-MS souffre également de son potentiel d'ionisation élevé (9.75 eV), l'efficacité de l'ionisation en ICP-MS étant fonction du premier potentiel d'ionisation de l'élément. Les éléments dont les potentiels d'ionisation sont inférieurs à 7-8 eV sont ionisés à 100%. Par contre, pour des éléments de potentiel d'ionisation de valeur plus élevée, comme Se, le degré d'ionisation est sérieusement affecté (33%) ce qui se traduit par des limites de détection plus élevées (Ebdon *et al.*, 1998).

Outre des interférences spectrales, des interférences non spectrales liées à la matrice de l'échantillon peuvent se produire (effet de matrice). Des variations de signal pourront donc être observées, liées à des modifications de l'efficacité de l'ionisation dans le plasma ou l'extraction et le transfert des ions dans la matrice. Ces interférences peuvent se traduire par un incrément ou une suppression du signal.

4.2. Techniques séparatives

4.2.1. Chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC)

La chromatographie en phase liquide est une technique de séparation qui utilise les équilibres de concentration qui apparaissent lorsque les analytes sont mis en présence de deux phases non miscibles, la phase stationnaire et la phase mobile circulant en continu. En fonction de leurs propriétés physico-chimiques, la migration différentielle des analytes permet leur séparation.

Dans le cas de l'HPLC (≈ 100 bar), la granulométrie de la phase stationnaire (3-5 μm) permet une meilleure séparation des composés par rapport à la séparation à faible pression (LC: ≈ 10 bar) pour laquelle la phase stationnaire est constituée de particules de taille plus importante. En effet, pour un même volume de phase stationnaire, la surface d'échange augmente si les particules qui la composent sont de diamètre plus petit (augmentation du rapport surface/volume). Les pics obtenus sont plus étroits et la résolution est donc améliorée.

La Chromatographie Liquide Haute Performance a de nombreuses applications en chimie analytique, en particulier pour les études de spéciation du fait des nombreux modes de séparation disponibles. Elle offre en effet un large éventail de mécanismes de séparation (échange d'ions, phase inverse avec ou sans avec appariement d'ions, exclusion stérique) permettant de séparer des composés non-volatils en fonction de leurs propriétés physico-chimiques (polarité, solubilité, charge ionique, taille, masse moléculaire) (Montes-Bayon *et al.*, 2003).

Plusieurs phases stationnaires sont commercialement disponibles. Les phases mobiles les plus communes sont les solutions tampons, qui permettent un contrôle précis du pH. Selon le type de séparation, ces solutions aqueuses peuvent être mélangées à un solvant organique (méthanol ou acétonitrile généralement) à proportion constante ou en gradient. Les séparations chromatographiques peuvent être réalisées séquentiellement et permettre des séparations multidimensionnelles. Selon le cas, la chromatographie multidimensionnelle peut être réalisée en ligne ou hors ligne.

4.2.2. Séparation des espèces sélénées

Différentes méthodes de séparation peuvent être sélectionnées en tenant compte du type d'échantillons et de la nature des espèces sélénées à séparer. Le choix du mode de séparation et son optimisation sont des étapes importantes afin de détecter le plus grand nombre de composés. Les plus communément utilisées pour l'analyse de spéciation de Se sont: la chromatographie par échange d'anions (IE), la chromatographie de phase inverse (RP) et la chromatographie d'exclusion stérique (SEC).

Les espèces sélénées inorganiques et les acides aminés sélénés (SeMet et SeCys) peuvent se trouver sous forme anionique du fait de leurs propriétés acido-basiques et peuvent ainsi être séparés par **chromatographie d'échange d'anions (AE)**. En effet, cette technique est capable de retenir les composés anioniques en raison de sa phase stationnaire greffée de groupements fonctionnels chargés positivement (ammonium quaternaire ; $R-N(CH_3)_3^+$). Les phases mobiles sont généralement des solutions tampons de sels inorganiques (i.e citrate ; phosphate...). Ce type de chromatographie est peu affecté par les perturbations éventuelles de rétention des analytes liées aux constituants de la matrice des échantillons (Beauchemin *et al.*, 1989), en particulier les extraits de sols et sédiments (Ponce de Léon *et al.*, 2003; Tolu *et al.*, 2011; 2014).

La **chromatographie de phase inverse (RP)** permet de séparer simultanément les espèces ioniques et non ioniques de Se avec une bonne reproductibilité (Ponce de Léon *et al.*, 2002; Uden *et al.*, 2004) et s'applique donc à un plus grand nombre d'espèces organiques de Se, contrairement à la séparation par échange anionique. Le principe de la séparation par chromatographie en phase inverse est basé sur la différence d'affinité de l'analyte, entre une phase stationnaire apolaire et une phase mobile polaire dont la composition est modifiée par un gradient de concentration du solvant organique (méthanol, acétonitrile en général). La majorité des phases stationnaires est constituée de silice greffée de chaînes alkyles de différentes longueurs (C8 et C18). Ce mode chromatographique a été appliqué à la séparation des composés sélénés pour différentes matrices telles que des échantillons biologiques (i.e sang ; urine) ; extraits de végétaux et suppléments nutritionnels (Kotrebai *et al.*, 1999 ; Marchante-Gayon *et al.*, 2001 ; Encinar *et al.*, 2003; Cankur *et al.*, 2006). Des colonnes remplies d'une phase stationnaire en carbone graphitique poreux (PGC) peuvent également être appliquées en chromatographie de phase inverse. Contrairement aux autres phases, il n'existe qu'une phase PGC commercialisée. La surface du PGC ne dispose pas de

groupements silanols et est comparable à une grande molécule polycyclique aromatique, en représentant donc un support idéalement hydrophobe (Michel *et al.*, 2009). Ceci est un avantage car les essais réalisés sur supports hydrophobes classiques ont montré que les phases stationnaires les plus hydrophobes conduisaient aux meilleures performances en termes de sélectivité (Elfakir *et al.*, 1998). Le PGC a montré un comportement chromatographique à la fois simple et complexe car il présente un mécanisme de rétention qui repose à la fois sur des interactions hydrophobes et électroniques où la distribution des charges joue un rôle important (Guenu *et al.*, 1996; Elfakir *et al.*, 1998; Törnkvist, 2003) De plus, du fait de sa stabilité chimique cette phase peut tolérer des pH allant de 0 à 14, des hautes températures ou de fortes concentrations en sels.

La **chromatographie d'exclusion stérique (SEC)** permet une séparation des molécules en fonction de leur volume hydrodynamique. Cette technique est la moins résolutive des chromatographies en phase liquide. Etant d'utilisation simple, robuste et capable de supporter des matrices très chargées elle est fréquemment utilisée en tant que première dimension chromatographique dans le cas d'une analyse multidimensionnelle. (Ruiz-Encinar *et al.*, 2003; Palacios *et al.*, 2006).

4.2.2. Couplage

La complexité des matrices et les faibles teneurs de Se dans les échantillons de cette étude font de l'analyse de spéciation une affaire complexe pour laquelle le couplage entre séparation chromatographique et détecteur ICP-MS a été retenu.

En plus de réduire le temps d'analyse, le couplage direct séparation/détection réduit aussi le risque de contamination et de perte des analytes. Cependant, des compromis sont nécessaires.

Le couplage entre chromatographie liquide et ICP-MS est assez aisé du fait de la compatibilité des débits de la chromatographie et de la nébulisation (entre 0.1 et 1 ml min⁻¹).

Dans le couplage LC-ICP-MS, la sortie de la colonne LC est connectée directement au nébuliseur par un tube en PEEK (Poly-éther-éther-cétone), de longueur et diamètre interne tels que le volume mort soit minimisé afin de maintenir une résolution chromatographique satisfaisante (Caruso *et al.*, 2003). Une représentation schématique du couplage est montrée dans la figure A.16.

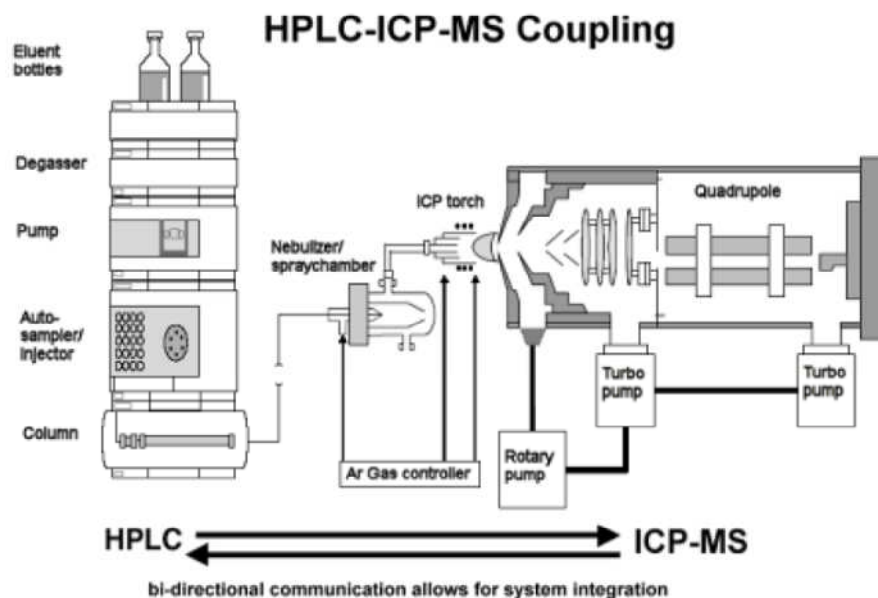


Figure A. 16. Représentation schématique du système de couplage HPLC/ICP-MS (www.chem.agilent.com)

Pour le couplage à l'ICP-MS, la composition de la phase mobile utilisée pour la séparation doit toutefois respecter certaines conditions. L'utilisation d'une phase mobile avec un pourcentage élevé de solvant organique peut conduire à un dépôt de carbone sur les cônes, qui peut se traduire par une réduction du signal et une augmentation du bruit de fond. Dans le cas de séparations utilisant un gradient d'élution, la modification de la composition du solvant peut modifier la température du plasma entraînant une efficacité d'ionisation différente (Michalke *et al.*, 2002). Des teneurs élevées en solvant organique dans la phase mobile circulant en continu peuvent aussi conduire à l'extinction du plasma. Ces problèmes peuvent être surmontés en introduisant de l'oxygène (O₂) dans le gaz du nébuliseur ou en augmentant la puissance RF. Le refroidissement de la chambre de nébulisation permettant de condenser le solvant ou la désolvatation de l'aérosol réduit la quantité de vapeurs du solvant organique arrivant au plasma. Les phases mobiles contenant plus de 2% de sels, ne sont également pas tolérées, la présence de sels engendre une dérive du signal à court terme et affecte la sensibilité. Le sel peut également causer à un bouchage physique du nébuliseur et encrasser les cônes. La modification de l'ouverture d'entrée qui en résulte conduit à une baisse de sensibilité.

Il est donc généralement nécessaire d'optimiser les conditions de séparation chromatographique pour obtenir des limites de détection compatibles avec l'échantillon étudié

(choix du mécanisme de séparation, composition, pH et débit de la phase mobile, type de phase stationnaire et volume d'injection de l'échantillon).

Du fait de sa nature destructrice, les informations sur la structure moléculaire des composés ne sont pas être obtenues avec le détecteur ICP-MS, l'identification des composés est donc effectuée en se basant sur la correspondance des temps de rétention entre l'échantillon et les étalons disponibles, ce qui reste problématique dans le cas de la détection d'espèces pour lesquelles les étalons ne sont pas disponibles.

5. PROBLEMATIQUE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS VISES

De nombreuses problématiques environnementales notamment dans les contextes de l'analyse de sûreté du stockage des déchets radioactifs, des sols sélénifères ou de l'utilisation des fertilisants enrichis en Se dans les sites sélénoprives nécessitent de prévoir sa distribution et sa spéciation dans un compartiment ou suite à son transfert entre deux compartiments (i.e sol-plante). Ainsi, une prédiction correcte à long terme nécessite la compréhension de ces différents processus pour évaluer la migration de Se entre les compartiments de la biosphère et son temps de résidence dans l'écosystème terrestre. Par ailleurs, l'étude du comportement de Se dans l'environnement est assujettie à la maîtrise des méthodes d'analyse mises en œuvre pour apporter des réponses à l'évaluation de sa réactivité dans les différents compartiments de l'écosystème.

Cette synthèse bibliographique a rappelé tout d'abord le rôle important du sélénium en santé animale et humaine ainsi que ses niveaux de présence dans l'atmosphère, les eaux, sols et végétaux. Le sélénium est également pris en compte dans le contexte de l'évaluation du risque radiologique associé au stockage des déchets nucléaires du fait de la présence de l'isotope radioactif ^{79}Se dans les déchets HAVL.

Bien que peu abondant, Se est naturellement présent dans tous les compartiments de l'environnement. Son origine est liée à des processus naturels, notamment l'altération des minéraux et l'activité volcanique, mais également à des sources anthropiques du fait de ses utilisations industrielles et agricoles. Les niveaux de présence de Se dans différents compartiments environnementaux ont été évalués, cependant aucune de ces études ne présente la répartition de Se au sein d'un écosystème complet en quantifiant les flux entre les différents compartiments.

Le sol et les végétaux représentent des compartiments clé de la biosphère à prendre en compte lors de l'étude des risques (carence, toxicité et radioactivité) associés au sélénium. Nous avons vu dans un premier temps que le sol est un ensemble hétérogène et complexe contrôlant la mobilité de Se et par conséquent son transfert vers les végétaux *via* des processus géochimiques et microbiologiques. En effet, la synthèse bibliographique a permis de souligner l'existence d'interactions plus ou moins fortes de Se avec les composants du sol (oxyhydroxydes de fer, d'aluminium et de manganèse, matière organique) et l'importance de processus, tels que bio-méthylation, précipitation/coprécipitation, sur la réactivité de Se dans

les sols. La majorité des études concernant les mécanismes de sorption/désorption de Se vis-à-vis des phases solides du sol a été réalisée avec des concentrations en Se beaucoup plus élevées que celles rencontrées dans les systèmes naturels et sur la base d'expérimentations en laboratoire. Toutefois, les réactions géochimiques ainsi que les processus microbiologiques agissant sur Se peuvent être toutes autres à de plus faibles concentrations et en conditions environnementales réelles.

Enfin, l'étude bibliographique a permis de faire un état des connaissances actuelles concernant le métabolisme de Se par les plantes dont la majorité est obtenue par des expérimentations réalisées après exposition à une unique forme chimique. De plus, à l'exception des plantes hyper-accumulatrices de Se (i.e moutarde indienne) offrant des niveaux de concentrations analytiquement très confortables, très peu de données de spéciation sont disponibles.

Le travail de recherche mené durant cette thèse a donc pour objectif de contribuer à cette prévision à long terme en répondant aux questions suivantes:

- I. *Quelle est la dynamique du cycle biogéochimique du sélénium à long terme?*
- II. *Quelle est la réactivité de Se dans le sol à différentes échelles de temps et quelle est l'influence du type d'occupation du sol?*
- III. *Quel est le rôle des végétaux dans le sous-cycle organique de Se et comment varie sa bio-incorporation en fonction de la spéciation?*

Pour répondre à ces questions et compte tenu du bilan des connaissances actuelles, ce travail s'est articulé selon trois axes de recherche complémentaires.

Le premier (**Chapitre B**) concerne la quantification des stocks et flux qui caractérisent le cycle de Se en écosystème forestier, choisi comme modèle d'étude à long terme.

Le deuxième volet de ces travaux de recherche (**Chapitre C.II**) se concentre sur le compartiment sol et la persistance des différents "pools" de Se en fonction du type d'occupation.

Enfin dans la troisième partie (**Chapitre C.III**), l'incorporation spécifique des deux formes inorganiques de Se par un modèle de plante simple à croissance rapide telle que le ray-grass a été évaluée.

Pour ces deux dernières parties, une méthodologie employant les traceurs isotopiques stables a été utilisée, après optimisation des conditions analytiques, notamment en ce qui concerne le contrôle des interférences (**Chapitre C.I**). Ceci permet d'une part de suivre simultanément l'évolution temporelle de la distribution de Se dans le sol (à l'état de trace) tout en distinguant les comportements de Se présent naturellement et fraîchement apporté, et d'autre part, de s'affranchir des difficultés d'analyse de spéciation liées aux faibles niveaux de concentration lors de l'étude de plantes non accumulatrices, l'enrichissement isotopique proche de 100% permettant un abaissement significatif des limites de détection.

Chapitre B

*Cycle biogéochimique
de Se dans un
écosystème forestier*

Cette partie des travaux de thèse s'intègre au programme d'Observation et de Surveillance de l'Environnement de Surface de l'Andra, visant à caractériser l'état initial de référence de l'environnement qui sera intégré dans le dossier de Demande d'Autorisation de Création du Centre Industriel de stockage GÉologique (CIGEO) des déchets radioactifs HA-MAVL.

Ces données seront utilisées également pour comprendre les interactions entre les différents milieux environnementaux (faune, flore, eaux, air, sols, activités humaines) et suivre leur évolution à long terme au-delà de la phase d'exploitation des installations de stockage.

Afin de mieux comprendre la dynamique du cycle global de Se dans le cadre des analyses de sûreté, l'écosystème forestier se présente comme un modèle idéal pouvant servir de référence pour l'évaluation à long terme des risques radio-écotoxicologiques. C'est en effet un écosystème peu anthropisé ayant une végétation pérenne.

La connaissance et la prévision du cycle biogéochimique de Se dans un écosystème forestier nécessitent une approche systématique directe in situ. A notre connaissance aucun bilan complet tenant compte de l'ensemble d'un écosystème n'est disponible dans la littérature. Ceci s'explique probablement par différentes contraintes techniques liées au prélèvement d'échantillons représentatifs et à leur analyse. En effet ce type d'étude nécessite que le site soit instrumenté pour permettre un échantillonnage temporel représentatif des différents compartiments et se traduit par un nombre d'échantillons important. D'un point de vue analytique, la détermination des concentrations de Se peut être délicate du fait des quantités limitées d'échantillon contenant de faibles concentrations.

La première partie de ce chapitre présente une description du site expérimental et de ses installations. Le traitement des données acquises pour caractériser le cycle biogéochimique de Se est ensuite détaillé avant la présentation des résultats pour le site étudié, rédigée sous forme d'article pour soumission dans le journal «Science of the Total Environment».

1. INSTRUMENTATION DU SITE FORESTIER DE MONTIERS

1.1 Description du site

Le site étudié est situé dans la forêt domaniale de Montiers (99 km²) dans la Meuse (latitude: 48° 31' 54''N, longitude: 5° 16' 08''E). Le site expérimental de Montiers a été mis en place et est suivi par l'Andra OPE (Observatoire Pérenne de l'Environnement) (Responsable scientifique: C. Galy) et l'INRA-BEF (Responsable scientifique: MP Turpault). Ce site fait partie du Système d'Observation et d'Expérimentation au long terme pour la Recherche en Environnement SOERE -OPE mis en place et géré par l'Andra et du SOERE-FORET suivi par l'INRA (www.andra.fr/ope ; www.gip-ecofor.org/f-ore-t ; www.nancy.inra.fr/en/outils-et-ressources/montiers-ecosystem-research).

Le site de Montiers a été mis en place dans le but d'étudier l'effet du sol sur le fonctionnement biogéochimique et biologique toutes autres conditions égales (climat, peuplement). Dans ce but, il comprend trois stations implantées sur trois sols différents au sein la toposéquence d'environ 70 ha (Figure B.1) : *i. Alocrisol* (Station 1) ; *ii. Brunisol/Calcisol* (Station 2) ; *iii. Rendisol* (Station 3).

Pour l'étude du cycle biogéochimique du sélénium, les échantillons sont issus de la station 2 choisie car étant la plus représentative de la région de Meuse/Haute-Marne.

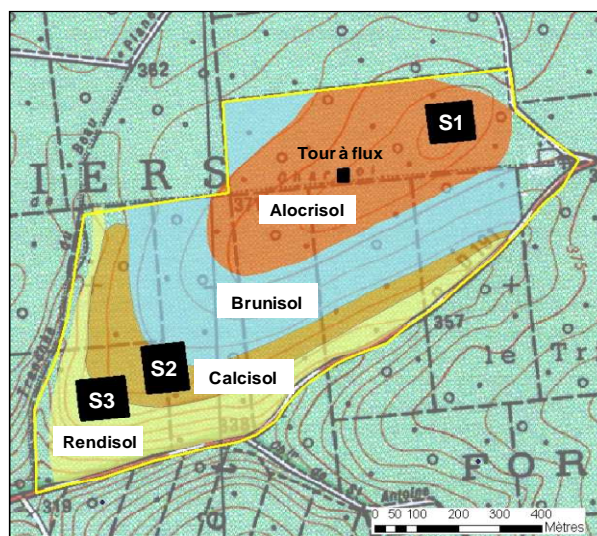


Figure B. 1. Localisation des 3 stations de mesures du site expérimental forestier de Montiers (Turpault et Calvaruso, 2013; plaquette de présentation du site de Montiers)

Selon les études de caractérisation du site de Montiers le substrat géologique est constitué par une couche calcaire du Portlandien inférieur (calcaire Tithonien) à la base surmontée par des sédiments détritiques du crétacé inférieur du Valanginien. Le sol de la station 2 est un calcibrunisol ayant une texture limono-argilo-sableuse en surface et argileuse en profondeur (58% d'argiles à la profondeur de 45-60 cm). Il présente un gradient décroissant de carbone organique avec une teneur de 41 g kg⁻¹ en surface et 6 g kg⁻¹ dans l'horizon 45-60 cm. Le pH_(eau) supérieur à 5 est relativement stable dans les différentes profondeurs (5.22 - 5.44). L'humus est de type mull.

Le peuplement forestier présent sur le site d'étude est âgé d'une cinquantaine d'années. Il est composé d'une dominance de hêtres (88%) en mélange avec des érables, frênes, charmes et, quelques bouleaux, chênes, trembles, merisiers, alisiers, sureaux, saules et noisetiers.

La hauteur de précipitation annuelle est en moyenne de 1100 mm. Le climat est du type continental et océanique avec une température moyenne de 12.6°C (Lequy, 2012)

1.2 Installations permanentes (www.nancy.inra.fr/en/Outils-et-Ressources/montiers-ecosystem-research; Turpault *et al.*, 2008; Turpault, 2015)

Le site expérimental de Montiers a été instrumenté en 2011 par l'Andra OPE pour les infrastructures et les sondes humidité et température et par l'INRA-BEF (Responsables technique et scientifique; S. Didier et MP Turpault) pour les équipements scientifiques dans les stations. L'échantillonnage mensuel des solutions et trimestriel des litières est réalisé conjointement par les deux unités à partir de janvier 2012 sous la responsabilité scientifique et technique de l'INRA.

La station (surface: 1 hectare) est subdivisée en quatre placettes (sous-stations), dont trois ont été instrumentées. La sous-station 4 est une réverse destinée à des études futures. La station est équipée de capteurs d'humidité du sol (sonde TDR (Time Domain Reflectometry)), de température et d'une centrale d'acquisition dont le suivi est sous la responsabilité scientifique de PO Redon de l'Andra-OPE.

Chaque sous-station est équipée de :

- **6 bacs à litière** (Figure B.2) = *Équipement pour la récolte des litières aériennes (feuille, branche, dépôts secs sous le couvert forestier).*

Bacs profonds (environ 40 cm) d'une surface de 0.3364 m² maintenus par des piquets à 30 cm du sol (base du bac) sous le couvert des arbres. Les bacs sont disposés sur la placette suivant un maillage systématique.

- **4 gouttières** (Figure B.3) = *Équipement pour la récolte de la pluie sous couvert (pluvioléssivats)*

Les gouttières sont constituées de plaques en polyéthylène de 2 m de longueur par 18 cm de largeur en forme de V (surface 0.39 m²) et avec une pente permettant l'écoulement de l'eau par un tuyau relié à un fût de 120 litres en polyéthylène placé dans une fosse de réception. Ils sont répartis de façon aléatoire sous le couvert.



Figure B. 2. Bac à litière



Figure B. 3. Gouttières

- **6 ruissellements de tronc** (Figure B.4) = *Équipement pour la récolte de l'eau interceptée par le feuillage et transitant sur les branches et le tronc.*

Ces équipements sont constitués de mousse en polyéthylène entourant le tronc de l'arbre. Ce système est relié par un tuyau à un fût de récupération en polyéthylène (120, 150 ou 350 litres en fonction de la taille de l'arbre) placé au pied de l'arbre. Durant les périodes potentiels de gel (novembre à mars) les bidons sont placés dans les fosses de réception. Les écoulements de tronc sont collectés sur 6 arbres (dont 5 d'hêtre) représentatifs de différentes classes de circonférences présentes sur la placette.



Figure B. 4. Récupération des eaux de ruissellement de tronc

- **24 Fluteaux et 3 plaques lysimétriques par horizon** = *Equipements pour la récolte de l'eau gravitaire.*

L'analyse de l'eau gravitaire permet de déterminer la concentration des éléments dans l'eau qui parvient sous la litière et à différentes profondeurs dans le sol. Le type de collecteur d'eau est fonction des horizons de sol: les fluteaux sont installés sous la litière et à -10 cm de profondeur (0.07 m²; regroupés par 8; 3 répétitions par profondeur); les plaques lysimétriques sans tension (0.12 m²; 3 répétitions par profondeur) sont positionnées plus en profondeur (-30 cm et -60 cm).

Les tuyaux reliant les plaques et les fluteaux sont disposés dans le sol de façon telle que la pente soit suffisante pour un écoulement rapide de l'eau par gravité jusqu'aux fûts (Figure B.5). Les fûts sont situés dans une fosse de réception.



Figure B. 5. Récolte de l'eau libre

Le site expérimental est également équipé d'une **tour à flux** (figure B.7a) de 45 m de hauteur où sont installés des dispositifs d'acquisitions au dessus du couvert forestier :

- Des capteurs météorologiques pour relever les principaux paramètres météorologiques pertinents (température, rayonnement, humidité, vitesse et direction du vent, pression atmosphérique, précipitations) à une échelle semi-horaire.
- Pluviomètre pour la récolte de l'eau de pluie. L'entonnoir, en polyéthylène (PE), a une surface de 0.22 m². Il est relié directement au bidon de collecte. La protection contre la lumière, nécessaire pour éviter la pollution algale, est assurée par un bidon opaque sombre dans lequel le bidon de collecte est placé (figure B.7b).



Figure B. 6. a) Tour à flux; b) Pluviomètre

Les mesures et prélèvements réalisés sur la station de suivi biogéochimique en forêt sont résumés dans le tableau B.1.

Tableau B. 1. Instrumentations de la station de suivi biogéochimique

Végétation
Retombées litières. Récolte des pluviollessivats, eaux d'écoulement de tronc.
Sol
Eau libre (Fluteaux et lysimètres), Eau liée (bougies poreuse), Humidité du sol (Sonde TDR). Température du sol (sondes PT100).
Atmosphère
Analyseur gaz CO ₂ /CH ₄ /H ₂ O, Rayonnement net, Rayonnement global entrant/réfléchi/diffus, Station météo, Dépôts atmosphériques totaux et particuliers

2 MODELE D'ETUDE DU CYCLE BIOGEOCHIMIQUE DE Se EN ECOSYSTEME FORESTIER

2.1 Présentation générale

Les cycles biogéochimiques représentent un ensemble de mécanismes conduisant à la circulation permanente de l'eau et des éléments entre les compartiments d'un écosystème. Ces mécanismes se produisent à différentes échelles spatiales et temporelles (Ranger et Bonneau, 1984).

Selon les spécialistes des écosystèmes forestiers (Switzer et Nelson, 1972; Ulrich *et al.*, 1973; Cole et Rapp, 1981; Ranger et Bonneau, 1984), trois sous-cycles en interaction sont différenciés dans le cycle global des éléments (Figure B.8).

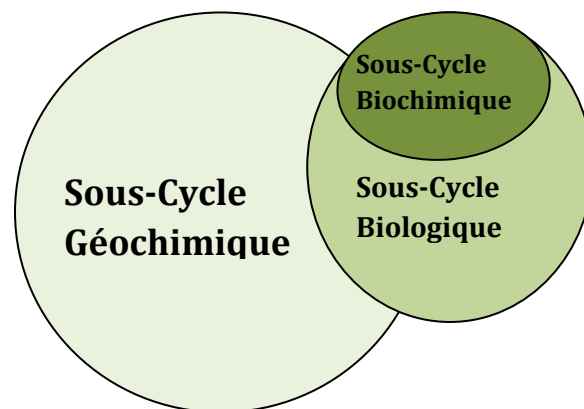


Figure B. 7. Terminologie des différents sous-cycles constituant le cycle biogéochimique.

- le *sous-cycle biologique* correspond à la circulation des éléments entre le sol et la plante, puis entre la plante et le sol. Les éléments prélevés au sol, sont utilisés pour la production de biomasse annuelle, une partie de ces éléments est fixée définitivement dans le compartiment de la végétation pérenne (immobilisation), l'autre est restituée au sol sous formes liquide et solide.
- le *sous-cycle biochimique* recouvre la redistribution des éléments au sein des plantes pérennes; il s'agit des translocations internes des organes sénescents vers les organes en croissance pour soutenir la production de biomasse, cela permet à la plante de développer une certaine autosuffisance en diminuant la demande au sol.

- le *sous-cycle géochimique* correspond à l'ouverture de ces sous-cycles vers le cycle planétaire via les entrées (i.e apports atmosphériques et altération des minéraux) et les sorties (i.e drainage profond et pertes gazeuses).

2.2 Le modèle conceptuel à compartiments et à flux

2.2.1 Concepts

Le fonctionnement général d'un écosystème forestier avec ses trois sous-cycles (biologique, biochimique et géochimique) est décrit par un modèle conceptuel à compartiments et à flux qui permet d'estimer l'évolution de chaque compartiment à partir des différents flux et stocks et, d'établir des bilans entrées-sorties pour des échelles spatiales et temporelles fixées (Ulrich *et al.*, 1973; Ranger *et al.*, 2002). De plus, ce modèle permet d'estimer certains flux actuellement inaccessibles à la mesure (i.e le prélèvement d'éléments par un peuplement d'arbres adulte) à l'aide d'un système d'équations et sur la base d'hypothèses simplificatrices.

Les **compartiments** sont des entités finies supposées de composition et de comportement homogène à une échelle fixée. Leur limite spatiale est établie et leur évolution temporelle peut être estimée par des mesures successives ou à l'aide de modèles mathématiques. Dans un écosystème forestier, les principaux compartiments sont la végétation et le sol, qui peuvent être divisés en sous-compartiments. Ainsi, la végétation se compose de parties souterraines (racines) et aériennes, celles-ci étant divisées en parties pérenne et non-pérenne (feuilles par exemple). Pour le sol, des sous-compartiments solides, organiques et minéraux, et les solutions de sol, libres ou liées, sont généralement identifiés. Ces compartiments représentent, à l'échelle de l'écosystème, des réservoirs.

Ces compartiments échangent, entre eux et avec leur environnement, de la matière et de l'énergie. Ces échanges se traduisent par des **flux** des éléments d'un compartiment d'origine vers un compartiment d'arrivée.

2.2.2 Evaluation des stocks, des flux et des bilans entrées/sorties de sélénium

Un schéma descriptif des compartiments et sous-compartiments pris en compte pour la caractérisation du cycle biogéochimique du sélénium est présenté en figure B.9.

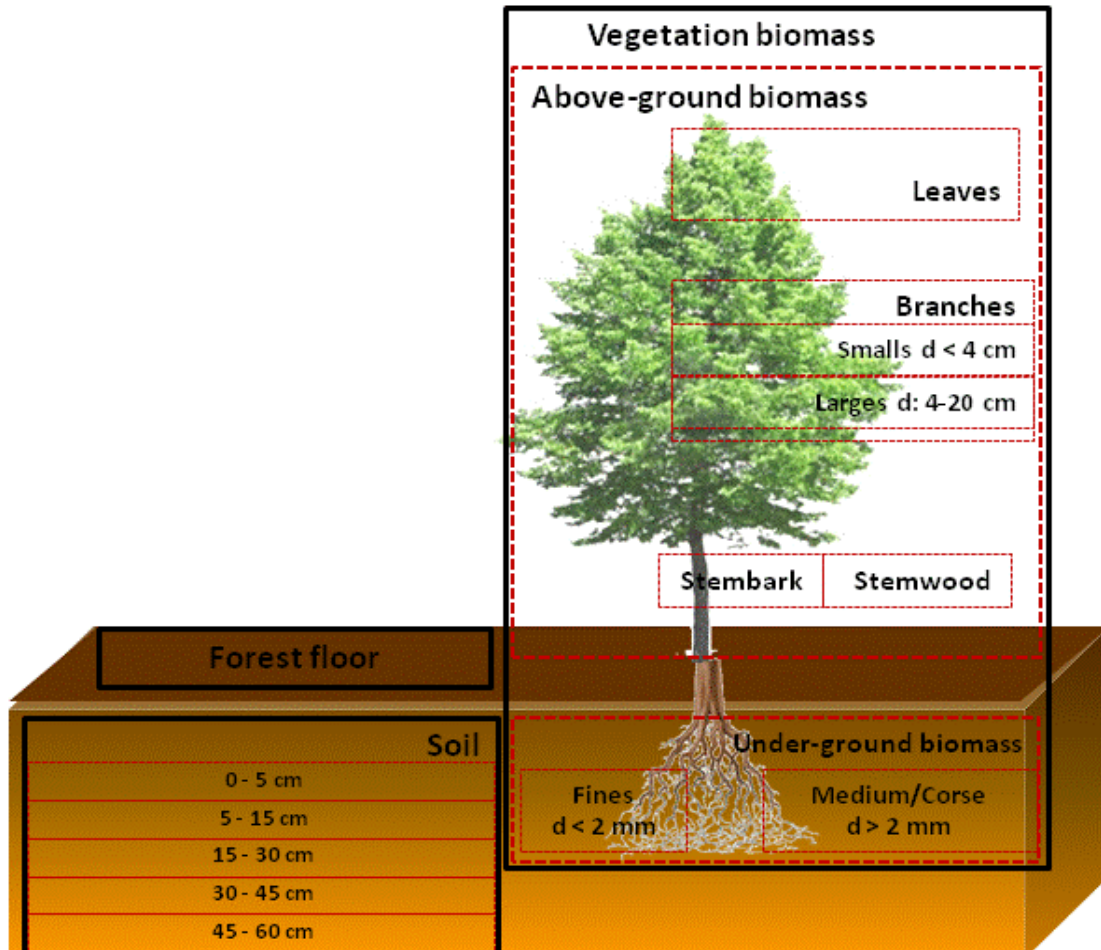


Figure B. 8. Représentation schématique des principaux compartiments (□) et sous-compartiments (▭) dans l'écosystème forestier considéré

2.2.2.1 La biomasse sur pied et la production annuelle

Les paramètres nécessaires aux calculs des stocks et des flux annuels sont la concentration de l'élément dans le sous-compartiment considéré, la biomasse sur pied et sa production annuelle.

La biomasse des arbres est constituée de deux sous-compartiments (Figure B.9) :

$$\text{Biomasse des arbres} = \text{Biomasse racinaire} + \text{Biomasse aérienne}$$

avec: $\text{Biomasse racinaire} = \text{Biomasse racines grossières} + \text{Biomasse racines fines}$

et $\text{Biomasse aérienne} = \text{Biomasse ligneuse (tronc+écorce +branches)} + \text{Biomasse feuilles}$

Deux méthodes existent pour la détermination de la biomasse sur pied des arbres:

- les méthodes directes impliquent la récolte et la pesée de la biomasse d'arbres représentatifs de la parcelle. Cette approche, bien qu'elle soit la plus précise, ne peut être mise en place que pour des petites parcelles, car c'est une technique très lourde, longue et destructive (Kettering *et al.*, 2001).
- les méthodes indirectes impliquent une estimation de la biomasse à l'aide des équations allométriques basées sur des variables facilement accessibles et mesurées habituellement pendant les campagnes d'échantillonnage, telles que la hauteur de l'arbre et son diamètre à 1.30 m de hauteur. Ces modèles sont largement appliqués en sciences forestières (Saint-André *et al.*, 2005; Augusto *et al.*, 2009).

Plusieurs modèles allométriques ont été développés et validés, en tenant compte des caractéristiques du site et/ou de la région objet de l'étude (i.e essence et âge du peuplement, climat, fertilité du sol). Dans notre étude, les valeurs de biomasse sur pied et de production annuelle ont été estimées en utilisant le modèle décrit par Genet *et al.* (2011). Ce modèle est composé d'équations spécifiques du peuplement de hêtres (*Fagus sylvatica*), développées en calibrant plusieurs équations pré-existantes pour le hêtre à trois compilations de données issues de différents sites en France, Allemagne et Belgique. Cette méthode a été choisie pour notre étude car elle a été calibrée en utilisant une base de données issue de sites français représentatifs du site expérimental étudié en termes de gamme de taille et d'âge du peuplement, de conditions climatiques et géographiques.

Plus précisément, la biomasse sur pied de la hêtraie actuelle (âge du peuplement de Montiers 54 ans, donnée acquise par L Saint André, INRA-BEF) a été estimée à partir de l'équation (B.1).

$$DM = \alpha + \left((\beta_1 + \beta_2) \times \text{âge} \times \beta_3 \times e^{\beta_4 \times \text{âge}} \right) + \left(d^2 h \right)^{\gamma_1 + \gamma_2 \times \text{âge}} \quad (\text{B.1})$$

où DM = biomasse sèche (kg) d'un arbre de diamètre d (m) à 1.30 m et de hauteur h (m); $\alpha, \beta_i, \gamma_i$: paramètres allométriques

Les différents paramètres et coefficients appliqués sont résumés dans le tableau B.2.

Tableau B. 2. Paramètres spécifiques des sous-compartiments de l'arbre, appliqués dans l'équation B.1 pour estimer la biomasse sur pied (Genet *et al.*, 2011)

Compartiments	α	β_1	β_2	β_3	β_4	γ_1	γ_2
Large branche (4-20cm)	0.093	12.7	-	-	-	1.61	-
Petite branche (0-4)	-	22.8	-	114	-0.0381	0.979	-
Feuilles vivantes	0.194	4.5	-	-	-	0.5	-
Ecorce	-	11.6	0.075	-	-	0.877	-
Bois de tronc	-	193.4	-	-112.4	-0.0482	0.976	-
Racines fines	-	16.9	-	-	-	0.763	-
Racines intermédiaires	-	10.0	-	-	-	0.656	-
Racines grossiers	0.080	50.4	-	-	-	1.13	-

Une valeur d^2h intégrée de 0.556 a été obtenue pour le site de Montiers à partir des données annuelles d'inventaire et de mesure de croissance (C130 et hauteur) de l'ensemble des arbres pour une période de 5 ans (2009-2013) (communication personnelle MP Turpault, INRA-BEF). L'équation (B.1) permet d'obtenir les valeurs de biomasse par arbre, à partir desquelles une valeur de biomasse par hectare est calculée en considérant le nombre d'arbres présents sur la parcelle (nombre de tiges par ha = 712).

Pour le calcul de la production annuelle de biomasse, la même équation (B.1) est utilisée pour calculer la biomasse après 10 ans en considérant un âge du peuplement de 64 ans. La valeur d^2h intégrée n'étant pas connue pour cet âge, sa valeur a été calculée en tenant compte des valeurs moyennes de diamètre et hauteur des arbres moyens estimées pour cet âge, en se basant sur les accroissements annuels ($\Delta d = 0.33 \text{ cm an}^{-1}$; $\Delta h = 28.4 \text{ cm an}^{-1}$) (communication personnelle, INRA). L'incrément annuel (**IM**) est calculé selon l'équation (B.2) en utilisant une valeur d^2h de 0.763 déterminée pour un âge du peuplement de 64 ans.

$$IM_{\text{annuel}} = \frac{DM_{64} - DM_{54}}{10} \quad (\text{B.2})$$

où IM_{annuel} = incrément annuel ; DM_{54} = Biomasse sur pied du peuplement à l'âge de 54 ans ; DM_{64} = Biomasse sur pied du peuplement à l'âge de 64 ans

2.2.2.2 Les stocks

En combinant les valeurs des concentrations de Se mesurées dans les différents compartiments avec les valeurs de biomasse sur pied, il est possible d'évaluer les stocks de Se (g ha^{-1}) dans chaque sous-compartiment de l'arbre (Equation B.3).

$$(\text{StockSe})_i = DM_i \times [\text{Se}]_i \quad (\text{B.3})$$

avec i: sous-compartiments de la végétation

Les stocks de Se dans le sol (g ha^{-1}) et dans les fractions définies par les extractions spécifiques ont été déterminés pour chaque profondeur, en multipliant la concentration de Se par la densité apparente et l'épaisseur de la couche de sol considérée (Equation B.4).

$$(\text{Stock Se})_j = [\text{Se}]_j \times d \times e \quad (\text{B.4})$$

avec j: couche de sol; d= densité apparente; e= épaisseur de la couche (cm)

2.2.2.3 Les flux annuels

Les flux annuels considérés pour caractériser le recyclage interne de Se à travers la végétation (cycles biologique et biochimique) sont représentés dans la figure B.10.

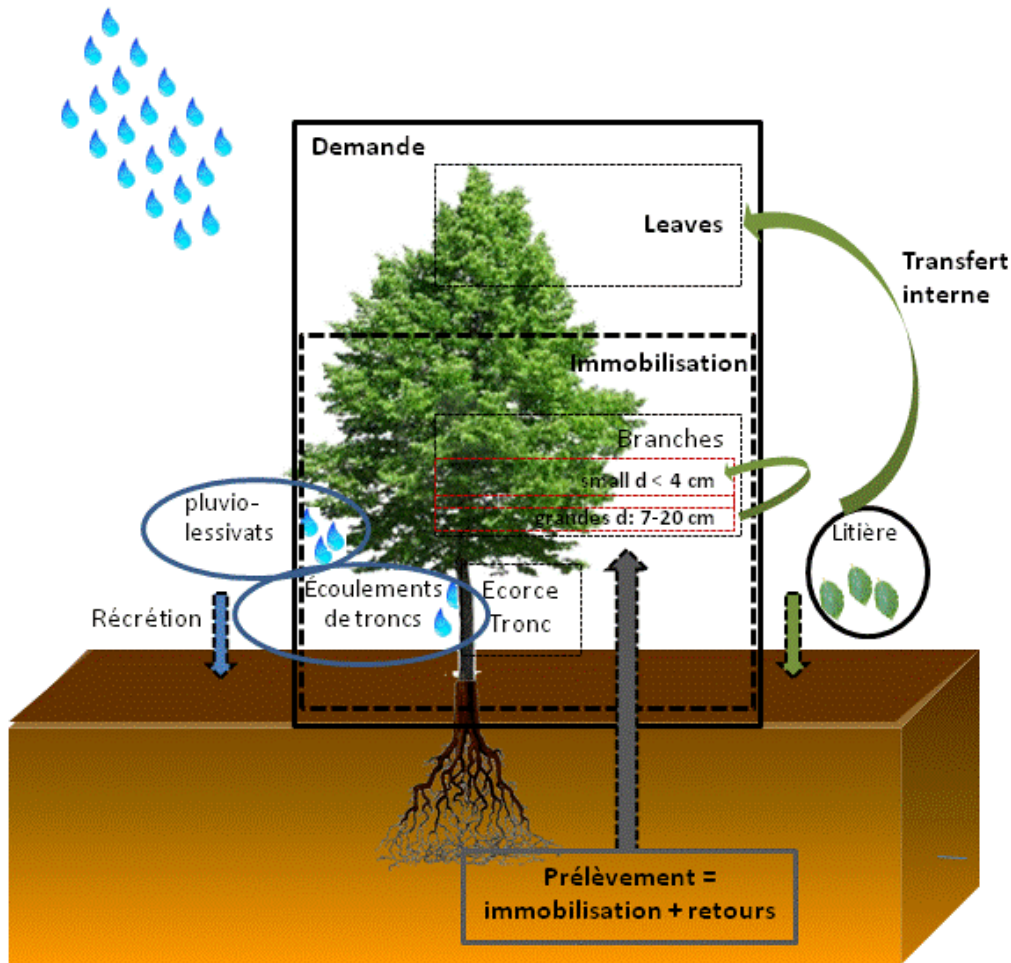


Figure B. 9. Schéma récapitulant les principaux flux annuels considérés

Les sous-cycles biologique et biochimique, sont décrits quantitativement par trois flux annuels, qui peuvent être estimés à travers un système d'équations détaillées ci-après (Ulrich *et al.*, 1973; Ranger et Colin-Belgrand, 1996; Ranger *et al.*, 1997; Goor et Thiry, 2004).

- (i) **la demande (R)** correspond à la quantité de Se ($\text{g ha}^{-1} \text{a}^{-1}$) dans la biomasse (ligneuse et feuilles) produite dans l'année (Eq. B.5):

$$R = \sum_i IM_i \times [Se]_i \quad (\text{B.5})$$

avec i: sous-compartiments biomasse aérienne

- (ii) **le prélèvement (U)** au sol est défini par la somme de Se immobilisé dans les parties ligneuses (U1, Eq. B.6) et Se restitué au sol sous forme solide (litière) ou en solution (récréation) (U2, Eq. B.7). Le recyclage par la restitution au sol de débris végétaux

(litière) est une voie essentielle d'apport au sol d'un flux régulier de carbone, azote et autres éléments nutritifs. L'interaction du couvert forestier avec les apports atmosphériques induit la modification de la composition chimique des pluies sous couvert forestier, i.e les pluviollessivats (Lovett et Lindberg, 1984). Précisément, les flux atmosphériques peuvent être modifiés par le couvert par assimilation et récréation d'éléments par la canopée (Bredemeier, 1988; Mayer, 1993). La récréation correspond à l'interaction entre la pluie et les éléments solubles présents dans les cellules végétales à travers un mécanisme qui s'apparente à l'échange d'ions. De plus, les feuilles et les aiguilles sont recouvertes d'une cuticule qui leur confère des propriétés d'adhésion vis-à-vis des particules atmosphériques (dépôt sec) qui peuvent être solubilisées avec les précipitations suivantes (Muller et Rieder, 2005).

$$U_1 = \sum_i IM_i \times [Se]_i \quad (B.6)$$

avec U_1 : immobilisation; i : sous-compartiments biomasse ligneuse (branches, tronc, écorce)

$$U_2 = \left(\sum_j IM_j \times [Se]_j \right) + (AF(Se)_{PL} + AF(Se)_{ET} - AF(Se)_P) \quad (B.7)$$

avec U_2 : retour au sol; j : sous-compartiments litière (feuilles, branches, reste); $AF(Se)_{PL}$ = flux annuel de Se dans les pluviollessivats; $AF(Se)_{ET}$ = flux annuel de Se dans les eaux d'écoulement de tronc; $AF(Se)_P$ = flux annuel de Se dans les eaux de pluie

Les flux annuels de Se ($AF(Se)$; $g\ ha^{-1}\ a^{-1}$) dans les eaux de pluie, les pluviollessivats et les eaux d'écoulement de tronc ont été calculés en faisant la somme des produits des concentrations de Se des prélèvements mensuels ($ng\ L^{-1}$) par les flux d'eaux mensuels correspondants ($L\ ha^{-1}$). Les données de pluviométries mensuelles sont issues de la station météorologique de Biencourt-sur-Orge située à une distance d'environ 4,3 km du site de Montiers (données Météo France communiquées par l'Andra). Dans le cas des eaux de pluviollessivat, les flux mensuels ont été estimés en divisant le volume d'eau récoltée chaque mois dans les fûts par l'aire correspondant à la surface d'équipement de récolte (m^2). Pour les eaux d'écoulement de tronc les valeurs des flux ont été communiquées par l'INRA (communication personnelle).

(iii) **le transfert interne (TI)** correspond aux flux de Se ($\text{g ha}^{-1} \text{a}^{-1}$) migrant des tissus âgés vers les organes en croissance. Les sous-compartiments feuilles (Eq. B.8) et branches (Eq. 9) de l'arbre sont concernés.

$$TI_{\text{feuilles}} = IM_{\text{feuilles litière}} \times ([\text{Se}]_{\text{feuilles vivantes}} - [\text{Se}]_{\text{feuilles litière}}) \quad (\text{B.8})$$

$$TI_{\text{branches}} = IM_{\text{grandes branches}} \times ([\text{Se}]_{\text{petites branches}} - [\text{Se}]_{\text{grandes branches}}) \quad (\text{B.9})$$

2.2.2.4 Les bilans entrées-sorties

Des bilans entrées-sorties à l'échelle des écosystèmes forestiers ont été établis, notamment pour les éléments majeurs (Bartoli *et al.*, 1986, Probst *et al.*, 1992; Ranger *et al.*, 1997) et, plus rarement pour les éléments trace métalliques (ETM) (Ukonmaanaho *et al.*, 2001; Sevel *et al.*, 2009; Gandois *et al.*, 2010). Ces bilans sont communément utilisés pour étudier la durabilité de la fertilité chimique d'un sol face aux différents changements climatiques et/ou sylvicoles et/ou face à des dépôts atmosphériques (Ranger et Turpault, 1999). Dans le cas des ETM, ces bilans permettent d'étudier les dynamiques d'accumulation (bilan positif) ou de pertes de l'élément (bilan négatif) dans le système sur une période donnée, informations importantes pour la prévision de leur devenir à long terme y compris dans le cas d'un épisode de contamination.

De façon simplifiée, les entrées généralement considérées comprennent les dépôts atmosphériques totaux et le flux d'altération des minéraux du sol. Les dépôts atmosphériques incluent (Ross et Lindberg, 1994; Lequy, 2012):

- i. les dépôts humides: atteignant le sol à l'état dissous via la pluie.
- ii. les dépôts secs: atteignant le sol sous forme de particules (inférieures à $0.45 \mu\text{m}$) ou de gaz pendant les périodes sèches.
- iii. les dépôts occultes atteignant le sol sous forme de gouttelettes (brouillards, dépôts orographiques).
- iv. les dépôts particuliers: atteignant le sol sous forme de particules solides supérieures à $0.45 \mu\text{m}$.

Les apports atmosphériques (voies humide et sèche) peuvent être supérieurs à ceux liés à l'altération des minéraux selon l'élément considéré. Dans notre étude, les dépôts atmosphériques par voie humide (hors couvert) (**AD**) sont considérés comme la seule voie d'entrée de Se, l'altération des minéraux du sol étant très faible. Ceci est en accord avec la littérature, en effet en climat tempéré, les minéraux primaires très altérables ont disparu, les minéraux restant, plus résistants, conduisent à des flux d'altération limités (de Vries *et al.*, 2003).

Par ailleurs, les sorties incluent: le drainage en bas de la colonne du sol et l'exportation de la biomasse. Les sorties par drainage représentent des pertes pour l'écosystème forestier et des gains pour les écosystèmes situés en aval. Dans notre bilan, le drainage à la base du profil de sol a été considéré comme la seule voie de sortie. Ce flux est virtuellement impossible à mesurer directement dans les sols forestiers (Bormann et Likens, 1967), il a donc été estimé via le flux des eaux gravitaires à -60 cm et leurs concentrations en Se. Les flux hydriques mensuels des solutions de sols pour chaque profondeur ont été obtenus en divisant le volume mesuré dans le bidon de collecte par la surface des capteurs.

La caractérisation du cycle biogéochimique de Se fait l'objet de l'article «Dynamics of selenium cycling in a Fagus sylvatica forest of Meuse/Haute-Marne region», en préparation pour soumission dans le journal "Science of the Total Environment" et présenté ci-après.

Résumé

Le sélénium (Se) est un élément potentiellement toxique qui doit être considéré dans la problématique d'évaluation à long terme des risques associés à sa dispersion et accumulation dans la biosphère suite une contamination potentielle. Dans ce contexte, une meilleure compréhension de la dynamique de Se dans les écosystèmes s'avère nécessaire. Malgré tout, la majorité des études se sont focalisées sur l'étude d'un seul processus biogéochimique plutôt que d'examiner la dynamique du cycle global de Se qui représente une information préalable à une modélisation prédictive. A notre connaissance, les données complètes nécessaires à la description du cycle biogéochimique de Se au sein d'un écosystème ne sont pas disponibles dans la littérature. Notre objectif est donc ici de quantifier les processus globaux régissant la dynamique du cycle biogéochimique de Se au sein d'un écosystème forestier, sur la base de données acquises pendant une année de suivi. Dans un premier temps, les stocks de Se dans les principaux compartiments de l'écosystème (sol, végétation) ont été estimés. Les flux annuels communément utilisés pour décrire le cycle biologique et biogéochimique au sein de la végétation ont également été quantifiés. Enfin, les différents flux drainant l'écosystème ont été évalués afin d'établir des bilans à l'échelle du site. Bien que certaines incertitudes demeurent, les principales caractéristiques du cycle global de Se dans l'écosystème étudié peuvent être mises en évidence: (i) le sol se présente comme le principal réservoir de Se (ii) les dépôts atmosphériques représentent une entrée importante en comparaison avec les besoins annuels de la végétation; (iii) les pertes par drainage profond sont faibles, probablement en raison de la volatilisation de Se dans le sol et (iiii) le cycle biologique associé au turnover de la biomasse aérienne apparaît comme marginal par rapport au stock de Se dans le sol. Cette approche holistique permettra de mieux caractériser le comportement de Se et de prévoir les particularités de sa dynamique et de sa répartition entre les compartiments de l'écosystème.

Dynamics of selenium cycling in a *Fagus sylvatica* forest of Meuse/Haute-Marne region

Pamela Di Tullo ^{a, b}, Florence Pannier ^a, Maité Bueno ^a, Isabelle Le Hécho ^a,
Marie-Pierre Turpault^c, Laurent Saint André^c and Yves Thiry ^b

^a Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement (LCABIE), Université de Pau et des Pays de l'Adour/CNRS, UMR 5254, IPREM, Hélioparc, 2 Avenue du Président Angot, 64053 Pau Cedex 9, France (E-mail addresses: pamela.ditullo@univ-pau.fr; florence.pannier@univ-pau.fr; maite.bueno@univ-pau.fr; isabelle.lehecho@univ-pau.fr)

^b Andra, Research and Development Division, Parc de la Croix Blanche, 1-7 rue Jean Monnet, 92298 Châtenay-Malabry Cedex, France (E-mail adress: yves.thiry@andra.fr)

^cINRA, Unité Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers 1138, 54280 Champenoux, France (E-mail addresses: turpault@nancy.inra.fr; st-andre@nancy.inra.fr)

ABSTRACT

Considered as one of emerging toxic element, selenium (Se) is of concern for long-term assessment of the risks of dispersion and accumulation of Se in the biosphere as a consequence of a potential contamination. In that context, there is a need for an appropriate understanding of Se cycling dynamics in the ecosystems. Even though, interest in Se has escalated in the past two decades, the bulk of the research has been generally limited to single biogeochemical process rather than examining a system *in toto* which is a prerequisite to predictive modeling and further management in case of a large-scale pollution. For instance, to date, reasonably complete data for Se cycling within forest ecosystem have not been published.

This paper reported on a quantification of the main processes involved in Se cycling in a temperate forested area by integrating the results of one-year monitoring study. Se contents were determined in the following components: vegetation (trees and understory), soil (forest litter and mineral horizons), litterfall, rainfall, throughfall and percolates at different layers. A mass inventory of Se has been defined for each compartment; main annual fluxes involved in and input-output budget were thus deduced using conceptual model calculations. Although, some uncertainties remain our results highlighted the major features of global Se cycling in the studied ecosystem: (i) soil is an effective reservoir of Se in studied ecosystem (ii) high input atmospheric depositions in comparison with annual stand requirement; (iii) low losses by deep drainage probably as a result of Se volatilization in soil and (iiii) minor role of Se cycle through vegetation (tree uptake and litter turnover) compare to the large contribution of Se stock in soil. Such holistic approach will allow us to better characterize the Se behavior under natural conditions and to forecast the peculiarities of Se dynamic and distribution among the ecosystem compartments.

1 INTRODUCTION

Selenium (Se) is a trace element of great worldwide environmental concern being an essential nutrient for animals including humans in an extremely narrow concentration range (30-55 µg per day for Se intake) (WHO 2003), while outside this range deficiency or toxicity can occur (Ellis and Salt, 2003). Selenium has been recently recognized as an emerging metalloid contaminant with toxicological risk second only to mercury (Hu *et al.*, 2009). The role of Se as essential nutrient to higher plants remains controversial (Terry *et al.*, 2000; Sors *et al.*, 2005), however, there are increasing evidences indicating a protective role of Se against the oxidative stress in plants through both the decrease of lipid peroxidation and the enhancement of GSH-Px activity (Hartikainen *et al.*, 2000; Cartes *et al.*, 2011). Furthermore, among the different radionuclides of interest, selenium is also of environmental concern because of the presence of its radioactive isotope ^{79}Se (T= 3.3 10^5 years; Jörg *et al.*, 2010), a degradation product of ^{235}U , in high level long-lived nuclear waste.

Selenium is one of the most widely distributed elements of the earth's crust having an average concentration that ranges from 0.03 to 0.8 mg kg⁻¹ (Tamari, 1998). Se is introduced in the environment from different sources, both natural and anthropogenic. The global cycling of Se is strongly influenced by the atmosphere, which can function as a source of terrestrial Se when it is returned to the Earth's surface via wet and dry deposition. Natural emission could be generated by volatilization of Se from soils, plants, marine waters and sediments (Terry *et al.*, 1992; Amouroux *et al.*, 2001; Bañuelos *et al.*, 2007; Vriens *et al.*, 2014) brought out by biomethylation processes (Chasteen and Bentey, 2003). Anthropogenic emissions of Se are generated mainly by coal combustion (Yudovich *et al.*, 2006) and primary metal production (Mosher *et al.*, 1987).

Selenium exists in the environment in four oxidation states (-II, 0, IV, VI), distributed into organic and inorganic compounds showing diverse chemical reactivity. Selenium bioavailability is a result of the interplay among prevailing geochemical parameters, i.e pH and redox conditions, soil properties, such as organic carbon, Fe hydroxide and clay contents and Se speciation (Fernandez- Martinez and Charlet, 2009). Many efforts have been devoted to determine the factors that influence solubility, mobility and bioavailability of Se in soils but specific processes are not well understood and a reliable information about Se distribution as function of soil depths remains scarce. Amorphous iron and aluminum oxides are thought to play a significant role in sequestering Se by absorption on solid surface, because of their large surface areas, strong affinity for many elements and their ubiquitous occurrence in soils and

sediments (Balistrieri *et al.*, 1990; Papeilis *et al.*, 1995; Kang *et al.*, 2002). On the other hand, organically associated Se remains poorly characterized, even though there is increasing evidence of the strong interaction between Se and soil organic matter (SOM). For instance, Gustafsson and Johnsson (1994) have shown that in forest soil selenium is associated to a high degree with humic substances. Another study reported that newly introduced selenite over 2-years incubation period under real environmental condition was fixed in different soil type (forest; grassland and agricultural soils) mainly by reduction reactions and subsequent incorporation into humic substances and/or by association with organo-minerals aggregates (Di Tullo *et al.*, unpublished).

With its dual role as an essential micronutrient at physiologically appropriate levels and toxic substance, Se has attracted a great deal of attention from both the scientific community and the public in recent decades (Fordyce, 2013). Regardless of the growing awareness of the importance of this element, a significant number of uncertainties exist on the Se biogeochemistry. Whereas the behavior of Se, generally limited to single biogeochemical pathway, has been often studied at the research-plot scale and in soil laboratory mesocosms, very little is known about diffuse selenium inputs/outputs mass balances at an ecosystem scale. No work on perennial vegetation and forest ecosystem involving an integrated dataset is to our knowledge published. This lack of reliable information is probably induced by the well-known analytical constraints associated with Se measurements at trace levels ($\mu\text{g kg}^{-1}$) and the great amount of samples to be representatively collected and analyzed. We point out that one of the problems with ecosystem-scale modeling of Se is the failure to systematically link its biogeochemistry to its transfer between different levels into an ecosystem by examining the system *in toto*.

The study of element cycling within environmental systems allows determining dominant processes controlling the transport of elements and it is usually a prerequisite to a predictive long-term modeling. In order to describe nutrient cycles in forest ecosystems, a simplified approach was proposed by Ulrich *et al.* (1973), developed by Cole and Rapp (1980) and refined by Ranger and Bonneau (1984). That conceptual model identified three major sub-cycles: first, the geochemical cycle which encompasses import-export relationships (i.e atmospheric deposition, chemical weathering of parental material and drainage losses), second, the biogeological cycle which encompasses the soil-plant relationship (i.e incorporation in tree through root uptake and return to soil by biomass turnover), and third, the biochemical cycle which refers to internal translocations of nutrients within vegetation. A global assessment of the biogeochemical cycles of nutrients includes all the major fluxes

within these sub-cycles linking the dynamics of nutrient fluxes to their availability in the soil (Attiwill and Adams, 1993, Ranger and Turpault, 1999). Comprehensive multi-disciplinary studies have been carried out to assess the biogeochemical cycle of nutrients (i.e Al, Ca, K, Mg, P, S) in temperate forests (Van der Stegen *et al.*, 1991; Ranger *et al.*, 1995; 1996; 1997; Ranger et Turpault, 1999; Likens *et al.*, 1998; Ritcher and Markewitz, 2001) but rarely for trace elements (i.e As, Pb; Cd) (Huang *et al.*, 2007; Gandois *et al.*, 2010).

The purpose of our study was therefore to investigate the dynamics of global Se cycle in a forest ecosystem used as a long-term study model and thereby acquire insights into the processes that control the biogeochemistry of Se in natural environment and thus improve our capacity to predict its long-term behavior, mandatory for the consolidation of ecological and radiological risk assessment models. To achieve this goal the objectives of this study were, (i) to determine Se inventories for major ecosystem compartments (i.e forest floor, soil, wood biomass, leaves and understorey) and concentrations of Se in throughfall, litterfall and soil percolates at different depths, (ii) to characterize the Se status in soil and, (iii) to quantify main annual fluxes commonly used to budgets.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Study site

The investigation was carried out in a temperate forested area (“Montiers” forest, 99 km² size) located on two French departments, the south-west of Meuse and the north-east of Haute-Marne (48° 31’ 54’’N, 5° 16’ 08’’ E). The climate of this region is continental and oceanic with cold and wet winters, and dry and often warm summers. The mean annual rainfall and temperature are 1100 mm and 12.6° C respectively (Lequy, 2012). The experimental site built and managed by Andra and INRA, belongs to two French monitoring networks SOERE- OPE and SOERE F-ORE-T. The monitoring plot, was established in a working forest under normal forest management: it involves a 54 years-old beech (*Fagus sylvatica* L.) stand (712 trees ha⁻¹) (database of Montiers site, Turpault et Redon, 2011), growing on a calci-brunisol, which is one of the most prevalent soils in the region, together with rendosol. The type of humus was classified as a mull (fast litter decomposition and high macro-biological activity) according to French humus classification (Baize and Girard, 2009). The monitoring plot (1 hectare area size) is divided in three sub-plots supported by detailed measurements of a wide range of

variables (volume, biomass and chemistry of atmospheric deposition, throughfall, stemflow, litterfall, soil solution, soil and standing vegetation).

2.2. Sampling procedure and sample treatment

2.3.1. Soil and forest floor sampling

In August 2010, in each sub-plot, soil samples were collected at nine sampling points at the following systematic depths (cm): 0-5; 5-15; 15-30; 30-45; 45-60. The forest floor samples (humus F layer) were taken from the same sampling points.

Soil dry mass was determined by drying at 35 °C for 2 days. Subsamples were oven-dried at 105°C to correct for residual moisture (NF ISO 11465). The major soil characteristics are presented in Table 1 (Buee et al., 2011). A representative composite sample of soils and forest floor was prepared for each sub-plot from the nine sampling points by mixing and homogenizing 50 g of sampled soils per depth or, 4 g of humus samples.

Table 1. Average values of major characteristics of the calci-brunisol soil at the experimental site, as measured in eight sampling points for each sub-plot (Buee *et al.*, 2011)

Depth (cm)	pH (H ₂ O)	Clay g.kg ⁻¹	Fine silt g.kg ⁻¹	Coarse silt g.kg ⁻¹	Fine sand g.kg ⁻¹	Coarse sand g.kg ⁻¹	CEC cmol+. kg ⁻¹	N _{tot} g kg ⁻¹	C _{org} g kg ⁻¹
0-5	5.39	242	242	143	290	83	9.9	2.6	41.3
5-15	5.22	241	246	145	287	82	7.6	1.6	25.9
15-30	5.29	294	234	136	273	64	7.6	1.0	15.5
30-45	5.31	420	188	107	214	71	12.9	0.8	9.7
45-60	5.44	523	154	85	176	63	17.2	0.6	6.2

2.3.2. Bulk precipitation, throughfall, stemflow and soil solution sampling

Samples of bulk precipitation, throughfall, stemflow and soil solutions were collected monthly from May 2012 to May 2013. For every sampling event, the total volume collected by each collector was determined and upscaled on area basis by using information of collector size. Bulk precipitation was collected with four polyethylene collectors (0.22 m² size) placed on a tower of 45 m high situated in the open field close to the monitoring plot.

Throughfall was sampled in each sub-plot with four systematically distributed gutters placed 1.0 m above forest ground. They consisted of a polyethylene funnel (0.39 m² size) connected

to underground 120 L storage containers. Subsamples were taken from each collector per sub-plot, and bulked together giving one composite throughfall sample per sub-plot.

For stemflow sampling, six trees of different sizes were selected in each sub-plot. Stemflow was collected by flexible polyvinylchloride collars attached horizontally to the stem at 1.30 m height and drained to 120 L or 320 L polyethylene storage containers (summer and winter respectively). Subsamples were collected from all containers of each subplot and bulked together giving one composite stemflow sample per sub-plot.

In each forest sub-plot, soil solution from the surface layer (0 and 10 cm depths) was sampled by using four replicates of funnels made of polypropylene. At 30, and 60 cm depths sets of zero tension plate lysimeters were introduced into the soil profile to intercept infiltrating water flowing further into a sampling bottle. Four plate lysimeters were installed per depth and per subplot. During the sampling event samples were bulked in field to one composite sample per depth and per sub-plot. For each sample type described above (bulk precipitation; throughfall; stemflow and soil solutions) a composite sample representative of the entire experimental plot, was made in laboratory taking into account the volumes measured in each storage container. The composite sample was then filtered on 0.45 µm filters (Millipore cellulose acetate) and stored at 4°C before analysis.

2.3.4 Litterfall sampling

Litterfall was collected seasonally from March 2012 to January 2013 by six litter-traps of 0.5 m², distributed among trees in each sub-plot following a systematic networking. Litter-traps were horizontally placed 40 cm above the forest floor. At each sampling event, litterfall was sorted into three fractions: i) leaves; ii) branches (< 2mm diameter) and (iii) miscellaneous (i.e fine components of flowers, bud scales, seeds). After separation, the fractions were dried at 65°C, weighted, grounded and homogenized. Before analysis, samples for each fraction of four sampling events were combined to form one annual composite sample, in order to determine the annual mean concentration.

2.3.5 Vegetation sampling

To sample ligneous organs, trees, characteristics of different diameter categories (DBH = diameter at breast height) were selected and harvested in 2010 (Genet *et al.*, 2010) according to a sampling protocol described by Ranger *et al.* (1995). The major anatomical and functional compartments were then isolated: living branches sorted as function of their

diameter size, stemwood and stembark. For the present study, samples of living branches (small size 0-4 cm and large size 4-20 cm), stembark and stemwood compartments from three categories of trees were used to determine Se total content. In August 2012 and 2013, leaving foliage was sampled at three different canopy levels of five trees in each sub-plot.

Root material ($d < 2\text{mm}$) was sampled at 0-5 cm and 5-15 cm depths, for each subplot. A composite sample from the three sub-plots was prepared and rinsed with distilled water several times to avoid any contamination from the soil. Understorey vegetation samples were collected in 2010 at different places in each sub-plot on a sampling soil area of 0.25 m^2 (9 points/sub-plot).

Vegetation samples were dried at $65\text{ }^\circ\text{C}$ and grounded to a homogeneous powder. Sub-samples were dried at 105°C in an air oven until constant weight for water moisture determination.

2.4. Chemical Analysis

2.4.1. Reagents

All reagents used were of analytical grade. The solutions were prepared with ultrapure water obtained from a Milli-Q System ($18.2\ \Omega\text{cm}$; Elix, Millipore). Nitric and hydrofluoric acids (Ultrex, J.T. Baker, Deventer, The Netherlands), hydrogen peroxide 30% (Fisher Scientific) were used for mineralization procedure. Reagents used for soil extractions were purchased from Sigma-Aldrich: sodium hydroxide ($>98\%$); ammonium dihydrogen phosphate (98%); ammonium phosphate dibasic ($>99.5\%$).

2.4.2. Instrumentation

An Agilent 7500ce ICP-MS (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) equipped with an octopole reaction cell was applied for total selenium determination. A commercial nebulizer (Micromist) and a Scott double pass spray chamber cooled to 2°C , was used for sample introduction under standard plasma conditions. For HF-containing samples a PFA inert kit has been used. It consists of a PFA double pass Scott-type spray chamber, PFA connecting tube and PFA injector holder, fitted to a semi-demountable quartz torch.

Argon-based polyatomic interferences were reduced by using H_2 as cell gas, at a flow rate varying between $4\text{-}5\text{ ml min}^{-1}$. The instrumental operating conditions are summarized in Table

2, according to Darrouzés *et al.* (2005). These parameters were daily optimized using a solution of 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ of gallium, yttrium, thallium and cerium. External calibration in reconstituted matrix was performed. The instrumental detection limits of Se were in the range between 0.004-0.052 $\mu\text{g kg}^{-1}$ as function of sample matrix. Typical analytical precision was lower than 5 % (relative standard deviation, 10 replicates).

Table 2. ICP mass spectrometer operating conditions and data acquisition parameters

<i>Sample introduction</i>	Concentric nebulizer Scott spray chamber (2°C)
<i>Plasma parameters</i>	
RF power	1500 W
Ar plasma gas flow rate	15 L min ⁻¹
Ar auxiliary gas flow rate	0.75-1.15 L min ⁻¹ optimized daily for best sensitivity ^a
<i>Sample and skimmer cones</i>	Nickel
<i>Ions lens setting</i>	Optimized daily for best sensitivity ^a
<i>Reaction/collision parameters</i>	
H ₂ gas flow	4-5 ml min ⁻¹
Octopole bias	-18 V ^b
Quadrupole bias	-17 V ^b
<i>Data acquisition parameters</i>	
Monitored isotopes	77-78
Acquisition time per point (total analysis)	1 s (3 s per isotope)
Replicates (total analysis)	10

^a Using a solution of 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ of gallium, yttrium, thallium and cerium

^b Based on Darrouzés *et al.* (2005)

2.4.3 Mineralization procedure

For total selenium determination by ICP-MS, complete digestion of the samples was performed with a microwave digestion system (Ethos Touch Control, Milestone). Samples digestion was realized in triplicate and a blank was added in each mineralization run (9 samples+ blank /run). To avoid cross-contamination, all microwave vessels (PTFE) were washed according to the procedure described in Table 3. Mineralization procedure, for each type of sample is also presented in Table 3. Digested samples were diluted with ultra-pure water to a final volume of 50 ml and were filtered through a 0.45 μm filter. As the sensitivity can be decreased by acidity of samples, samples were diluted as a function of their acidity, i.e tenfold dilution for digested soils and humus, fivefold dilution for leaves and litterfall, no dilution for woody samples.

Table 3. Vessel washing and mineralization procedures

Reagents	Heating Program
a) Vessel washing Milli-Q water : 5 ml HNO ₃ : 5 ml	<u>Stage 1</u> : 10 min , 1000 W, <u>Stage 2</u> : 10 min, 1000W, 200°C, 10bar
b) Vegetal material Sample : 200 mg HNO ₃ : 2 ml - H ₂ O ₂ : 500 µl - Milli-Q water : 6 ml	<u>Stage 1</u> : 5 min , 1000 W, temperature/pressure ramp untill 180°C /40 bar <u>Stage 2</u> : 10 min, 1000 W, 180°C, 40 bar
c) Soil Sample : 250 mg HNO ₃ : 6 ml - HF : 2 ml - H ₂ O ₂ : 2 ml	<u>Stage 1</u> : 20 min , 1000 W, temperature/pressure ramp untill 200°C /40 bar <u>Stage 2</u> : 20 min, 1000 W, 200°C, 40 bar
d) Forest floor Sample : 200 mg HNO ₃ : 4 ml - HF :1 ml - H ₂ O ₂ : 1 ml - Milli-Q water 2 ml	<u>Stage 1</u> : 20 min , 1000 W, temperature/pressure ramp untill 200°C /40 bar <u>Stage 2</u> : 20 min, 1000 W, 200°C, 40 bar

2.4.4 Soil chemical extractions

Estimates of Se solubility and the nature of predominant solid bearing phases were made with a parallel-extraction methodology previously developed for native Se present in soil at trace levels (Tolu *et al.*, 2011). This methodology allows getting three operationally defined Se soil fractions: i) Se water-soluble; ii) Se exchangeable which represents Se adsorbed onto mineral surface, considering that the primary adsorption mechanism of Se has been regarded to be ligand-exchange; iii) Se associated to the pool of soil organic matter (SOM).

Briefly, three parallel single extractions with ultrapure water, phosphate buffer solution ((NH₄)H₂PO₄/(NH₄)₂HPO₄; 0.1 mol L⁻¹, pH 7) and sodium hydroxide (0.1 mol L⁻¹) were carried out as follows: in a polypropylene centrifuge tube, to 0.9 g of soil sample was added 30 ml of the extraction solution, the mixture was mechanically stirred for 24 h at 250 rpm and room temperature. After centrifugation at 15.000g for 30 min at 4°C, the recovered supernatant was filtered at 0.45 µm and stored at 4°C for further analysis. Each extraction type described above was carried out in triplicate and a blank was subjected to the same procedure. For each soil extract, the residual solid phase was mineralized for the determination of residual Se and mass balance was further calculated in order to control that no contamination or loss occurred during extractions. According to Zhang and Frankenberger (2003), Se distribution among soil fractions was then calculated as follows: Se_{water-soluble} = Se extracted by ultrapure water; Se_{exchangeable} = Se extracted by phosphate buffer from which Se_{water-soluble} was subtracted; Se_{OM} = Se extracted by NaOH from which Se extracted by phosphate buffer was subtracted.

2.5. Budget calculations

2.5.1. Biomass

Allometric methods, based on the measurement of easily accessible tree variables such as the height and the diameter at breast height (DBH: 1.30 m) and thus being less destructive, are commonly applied in forest science for an accurate estimation of tree biomass which is required to determine the nutrient content of stands (Saint-André *et al.*, 2005; Augusto *et al.*, 2009). In our study, biomass and annual productivity of the different tree compartments were estimated by using Equation 1 according to an allometric model previously described by Genet *et al.*, (2011).

$$DM = \alpha + \left((\beta_1 + \beta_2) \times \text{age} \times \beta_3 \times e^{\beta_4 \times \text{age}} \right) + (d^2 h)^{\gamma_1 + \gamma_2 \times \text{age}} \quad (1)$$

Where: DM=dry mass (kg); d=diameter at breast height (m); h= tree height (m); α_i , β_i , γ_i allometric coefficients

The model was calibrated thanks to height and DBH values measured by INRA-BEF in 2009-2013 on about 800 trees of the monitoring plots giving d^2h value for standing biomass of 0.556 and a mean value for height and diameter annual increment of 0.28 m and 0.33 cm y^{-1} respectively. (Turpault MP, personal communication).

2.5.2. Stocks

Stocks of selenium in the vegetation compartments and forest floor were calculated by multiplying measured selenium concentration by the current biomass of the corresponding compartment. Stocks of Se in bulk soil and in the operationally defined fractions for each depth were calculated by multiplying element concentrations by the apparent density and the depth of the soil layer. They are expressed in g per hectare.

2.5.3. Fluxes

In the present study, Se input/output balance in the forest ecosystem was calculated by the difference between atmospheric deposition fluxes (AD) and deep drainage below the rooting zone (DR). According to the low Se content measured in parent rock (approximately $50 \mu\text{g kg}^{-1}$), additional input of Se possibly resulting from chemical weathering of parental material was considered to be negligible in the studied ecosystem. The different terms were derived as follows: AD input fluxes were calculated as the sum of monthly measurements of selenium concentration in bulk precipitation multiplied by water fluxes (Andra communication, Météo France data), DR output fluxes were estimated by multiplying monthly measurements of selenium concentration in soil solution at -60 cm depth with measured soil water fluxes at same depth that may be assumed to represent the losses at the bottom of the root zone.

Stemflow and throughfall fluxes were calculated as the sum of the monthly concentration of Se multiplied with the estimated monthly water fluxes. Net below canopy fluxes (NBCF) were then calculated for selenium (Equation 2).

$$\text{NBCF} = \text{BCF} - \text{BPF} \quad (2)$$

Where: NBCF is the net below canopy flux; BPF is the bulk precipitation flux; and BCF is the below canopy flux, (throughfall+ stemflow).

Similarly, Se fluxes with the soil solutions at different depths were determined by multiplying the measured monthly concentrations of Se with corresponding computed water fluxes permeating the different soil layers.

The Se biological cycle associated to biomass production and recycling was quantitatively described with three main annual fluxes: the requirement, the uptake and the internal translocation. These fluxes were estimated from equations (Table 4) already refined and applied to studies describing various element cycles in forest ecosystems (Ulrich *et al.*, 1973; Ranger and Colin-Belgrand, 1996; Ranger *et al.*, 1997, Goor and Thiry, 2004). In that model, the tree is compartmented into main annual and perennial parts, some components (trunk wood, bark, branches) including both annual and perennial sections.

Table 4. Equations used to calculate the main fluxes of the biological cycle

Annual fluxes	Definition	Equations	Variables
Requirement	Element content in all tissues produced over the current year in the tree.	$R = \sum_i \text{biomass}_i \times [\text{Se}]_i$	$i = \text{leaves; branches, wood and barks}$
Uptake	Amount of the element mobilized from the soil through root adsorption	$U = (1) + (2)$	
(1) Immobilization	Accumulation in perennial tree compartments	$(1) = \sum_j \text{biomass}_j \times [\text{Se}]_j$	$i = \text{branches, wood and barks}$
(2) Returns	Returns to soil via litterfall and crown leaching	$(2) = (a) + (b)$	$i = \text{litter}$
(a)= Litterfall (b)= Crown leaching		$(a) = \sum_i \text{biomass}_i \times [\text{Se}]_i$ $(b) = \text{Throughfall- rainfall}$	
Translocation	Internal translocation from older tissue for using in production of new biomass	$T_{\text{leaves}} = \text{biomass}_i \times ([\text{Se}]_j - [\text{Se}]_i)$ $T_{\text{branches}} = \text{biomass}_i \times ([\text{Se}]_j - [\text{Se}]_i)$	$i = \text{dead leaves } j = \text{green leaves}$ $i = \text{small branches } j = \text{large branches}$

Table 5. Means and standard deviation of Se ($\mu\text{g kg}^{-1}$) measured in total soil (Se_{total}); in water soluble fraction ($\text{Se}_{\text{soluble}}$), exchangeable fraction ($\text{Se}_{\text{exchangeable}}$) and organic matter fraction (Se_{OM}); extracted proportion (% of Se_{total} in soils) is given between brackets. Selenium inventories (g ha^{-1}) in total soil and in operationally defined fractions

Soil layer (cm)	Density g cm^{-3}	Total Se concentration ($\text{Se}_{\text{extracted}} / \text{Se}_{\text{total}}$)				Se inventory			
		$\mu\text{g kg}^{-1}$ (%)	$\mu\text{g kg}^{-1}$ (%)	$\mu\text{g kg}^{-1}$ (%)	$\mu\text{g kg}^{-1}$ (%)	g ha^{-1}	g ha^{-1}	g ha^{-1}	g ha^{-1}
		Se_{total}	$\text{Se}_{\text{soluble}}$	$\text{Se}_{\text{exchangeable}}$	Se_{OM}	Se_{total}	$\text{Se}_{\text{soluble}}$	$\text{Se}_{\text{exchangeable}}$	Se_{OM}
0-5	1.04	465±42	23±2 (5.0±0.9)	59±9 (12±3)	252±54 (54±16)	242 ± 22	12±1	31±5	131±28
5-15	0.92	496±37	19±2 (3.9±1)	75±10 (15±4)	235±54 (47±16)	439 ± 56	18±1	69±9	108±25
15-30	1.35	483±52	13±5 (2.8±1.5)	72±11 (15±5)	188±42 (39±16)	581 ± 128	21±3	96±14	127±29
30-45	1.33	483±47	4.8±2.7 (1.0±0.6)	81±18 (17±5)	173±56 (36±15)	642 ± 63	8±3	107±24	115±37
45-60	1.34	431±44	1.5±0.6 (0.4±0.2)	84±18 (19±6)	150±63 (35±18)	564 ± 53	2±3	113±24	100±42

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Se distribution and mobility in soil column

The evolution with depth of Se concentrations ($\mu\text{g kg}^{-1}$) measured in total soil (Se_{total}) as well as in various soil fractions (soluble, exchangeable and organic), including the related proportions (% of Se_{total} in soils) and inventories (g ha^{-1}) are depicted in Table 5. The average total Se concentration measured in the soil profile was of $472 \pm 66 \mu\text{g kg}^{-1}$ which is in agreement with concentrations reported for European soils in pristine areas (Broadley *et al.*, 2006, Shand *et al.*, 2010, 2012).

Surprisingly, selenium concentrations in soil showed no significant variation as a function of depth (Table 5). In forest ecosystems, leaching and biological cycling are particular processes which may greatly influence the vertical distribution of elements (Jobbagy and Jackson, 2001). A predominant biological cycling usually moves nutrients upwards because of their uptake and recycling to the soil surface via litterfall and throughfall. Conversely, leaching by transferring mobile elements downward can increase their concentration with depth. At experimental site of Montiers, the absence of a particular vertical gradient could thus suggest a small plant uptake and/or other natural removal process such as Se volatilization which can be important in organic soils (Vriens *et al.*, 2014).

Although no significant differences between total Se concentrations as function of depth were observed, a vertical gradient could be noticed considering methodologically defined Se pools. Se water soluble fraction ranged from 23 to $1.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ accounting for 6-1% of total Se content from the surface to 60 cm depth. The amount of exchangeable Se as well as its proportion (% of total Se) slightly increase in deeper layers concomitantly to the decrease of soil organic matter content. The pool of adsorbed selenium (12-19 %) showed to be lower than the one associated with OM fraction accounting for 54-35 % from the surface to deeper layer. This is consistent with a previous study considering the distribution of ambient selenium in a soil collection spanning an extensive range of OM content, soil pH and Fe, Al oxides content which reported that in forest soils enriched in organic matter, Fe-Al oxyhydroxides phases do not act as the unique sink for selenium (Tolu *et al.*, 2014).

The OM-associated Se pool (Se_{org}) decreased with depth in agreement with a greater amount of organic matter in surface layers. That gradient could indicate that enrichment of OM surface layer resulting from recent litter, influences Se_{org} pool proportion, as well as its further

turnover. Moreover the vertical pattern of total Se and Se_{org} combined to those of total organic carbon (OC) rather illustrate that the quality of organic matter have also an impact on Se distribution in soil column. In that case OC measurements were considered as indicative of organic matter. As depicted in Figure 1 Se_{total}:OC_{total} ratio as well as Se_{org}: OC_{total} ratio increase with depth indicating that the smaller amount of OC present in depth shows a stronger affinity for Se compared to the more abundant recent OC in the topsoil.

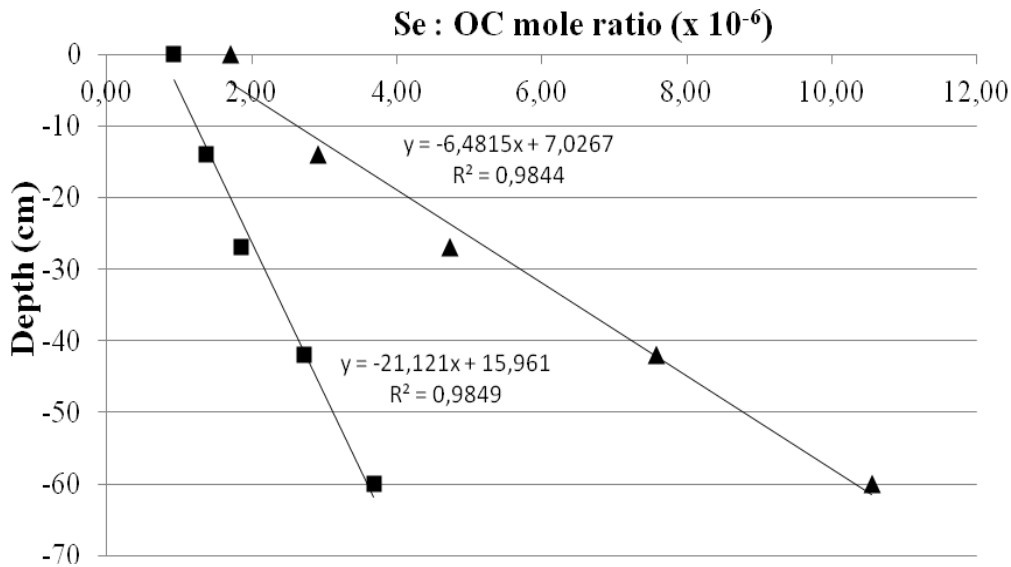


Figure 1. Molar ratios of total Se (■) and Se_{org} (▲) to total organic carbon as a function of depth.

That trend could be ascribed to a stabilization of Se in the soil column depths by close associations between OM and mineral surfaces giving rise to a sorptive protection and thus becoming stronger compared to organic Se on the surface layer (Gustafsson and Johnsson, 1994; Bruggeman *et al.*, 2007; Coppin *et al.*, 2009; Tolu *et al.*, 2014). That specific Se-bearing phase is still partially dissolved by sodium hydroxide, indicating some lability of Se retained by organo-mineral pool and can act as a medium-term reservoir able to recharge soil solution Se after OM mineralization. Furthermore these organo-mineral associations may play a key-role in Se cycling in soil by protecting adsorbed Se onto oxides from leaching and plant uptake and/or, by creating anoxic microzones within soil aggregates promoting Se(IV) and Se(VI) reduction to insoluble Se(0) and/or Se(-II) that may precipitate with metal or substitute sulfur in organic compounds (Kausch *et al.*, 2013).

3.2. Allocation to vegetation compartments

Selenium concentrations vary in the above-ground tree compartments (Table 6), being highest in living leaves and decreasing in the following order: bark > small branches > large branches > stemwood. In our study the bark was not separated into outer bark and inner phloem sections. Therefore, the higher Se concentration measured in this compartment is probably the result of living phloem which is included in bark compartment and, through which most of the mineral nutrients and metabolites are transported.

Table 6. Stand biomass, Se concentrations and Se storage in the different compartments. Error is given between brackets.

	Stand Biomass (kg ha ⁻¹)	Total Se content (µg kg ⁻¹)	Se storage (g ha ⁻¹)
Soil (0-60)		358-510	2469 (323)
Soluble fraction		1.5-23	61 (9)
Exchangeable fraction		59-84	417 (77)
OM fraction		150-252	1033 (253)
Humus	12000	151 (23)	1.8 (0.3)
Tree			3.0 (0.8)
Leaving leaves	2500	30 (1)	0.075 (0.003)
Small branches	14976	13 (3)	0.19(0.05)
Larges branches	7535	7 (5)	0.05 (0.04)
Bark	6659	28 (6)	0.19 (0.04)
Stemwood	74305	5 (2)	0.4 (0.1)
Fine roots (d< 2mm)	7689	264 (59)	2.0 (0.4)
Medium roots	4845	5 (2)	0.02 (0.01)
Coarse roots	18543	5 (2)	0.09 (0.04)
Understorey	150	29 (5)	0.004 (0.001)
Total ecosystem			2474 (323)

The average Se concentration in fine roots was higher (10-fold approximately) than in crown component. This observation agrees with selenium accumulation in roots of plants grown in SeIV enriched media (Zayed *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2003). Selenite incorporation in ryegrass is associated to significant transformations (organo-selenium compounds and high molecular weight Se-molecules) occurring in plant roots. These forms are probably sufficiently stable to preclude selenium translocation to the aerial part of the plant (Di Tullo *et al.*, unpublished). It could be suggested that the roots act as a barrier to the transport of selenium. This is consistent with a tolerance strategy developed by trees to avoid translocation

of elements that can be not essential or toxic (Kahle *et al.*, 1993) as observed for other elements such as Hg (Patra and Sharma, 2000) and U (Thiry *et al.*, 2005).

In litterfall, the average Se_{total} concentration showed to be about two times greater than those of living organs (leaves and small branches), as observed for other nutrients (i.d Ca, Mn, Zn and Fe) (Ukonmaanaho *et al.*, 2008). That difference is indicative of partial translocation from living to senescing organs. Se total content generally followed the pattern: miscellaneous > leaves \approx fine wood, with concentrations accounting for $245 \pm 26 \mu\text{g kg}^{-1}$; $59 \pm 11 \mu\text{g kg}^{-1}$; $51 \pm 6 \mu\text{g kg}^{-1}$; respectively.

3.3. Selenium budget in soil-plant system

A mass inventory of Se has been calculated for each major soil-vegetation compartments of studied ecosystem. Quantitative data are synthesized in Table 6.

Results highlight the important storage of Se in soil accounting for $2469 \pm 322 \text{ g ha}^{-1}$ and thus, it is assumed to act as a sink for selenium in this experimental site. Se concentration in humus (around $150 \mu\text{g kg}^{-1}$) is lower compared to the total soil concentration. Additionally, due to its low biomass (around 10 t ha^{-1}) the humus stock ($1.8 \pm 0.3 \text{ g ha}^{-1}$) was marginal compared to the total soil inventory. However, we found a 2.5 times higher Se concentration in humus relative to litterfall concentration. That enrichment, partially due to a degradation of litterfall, also suggests that humus and/or associated soil microbial communities could play a role in retention of Se coming from atmospheric deposition.

Storage of Se in tree was shown to be mainly dominated by the belowground biomass accounting for approximately 72 % of total Se in tree. Instead, stem wood (perennial woody components) having a large biomass, represents main storage for Se compartment in aboveground biomass corresponding to 43% of Se stored in crown components. However, it is important to note that the amount of Se stored in tree compartments was small compared to the total or soluble soil Se pool, accounting for less than 1% to 6% respectively. Thus, Se inventory in tree organs rather reflect a low capacity of Se recycling by vegetation. This could be explained by the fact that in soil solution Se is present not only in form of oxyanions (selenite and selenate), but mostly in form of organic and mineral colloids that might be not readily available for plant uptake. Similarly, Se pool in the understory ($0.004 \pm 0.001 \text{ g ha}^{-1}$) was negligible relative to the large Se pool in soil. Overall, the Se pool linked to standing biomass, represented mainly by trees does not affect significantly the total Se stock in the catchment.

3.4. Input-output fluxes

Average Se fluxes via atmospheric input and percolation solutions measure for a period of one year are reported in Table 7.

Table 7. Annual water fluxes and Se hydrological fluxes measured in the period Mai 2012-Mai 2013 in bulk precipitation (1), throughfall (2), stemflow (3), below canopy (BCF), net below canopy fluxes (NBCF) and input-output budget. Uncertainties associated to environmental replicates (3 sub-plots) are given between brackets

	Water fluxes (mm y ⁻¹)	Se (g ha ⁻¹ y ⁻¹)
Atmospheric input		
(1) Bulk precipitation	1178	1.11 (0.01)
(2) Throughfall	899	0.67 (0.06)
(3) Stemflow	48	0.098 (0.003)
Soil solution		
Forest floor	480	0.48 (0.04)
-15 cm	208	0.36 (0.02)
-30 cm	156	0.34 (0.02)
-60 cm (runoff)	68	0.081 (0.004)
BCF (2+3)	947	0,77 (0,06)
NBCF (2+3)-(1)	-231	-0,34 (0,07)
Input- output budget		1.03 (0.01)

Mean atmospheric input (wet deposition) accounted for $1.11 \pm 0.01 \text{ g ha}^{-1} \text{ y}^{-1}$. The amounts of Se dissolved in throughfall and stemflow solutions amounted on average to $0.67 \pm 0.06 \text{ g ha}^{-1} \text{ y}^{-1}$ and $0.098 \pm 0.003 \text{ g ha}^{-1} \text{ y}^{-1}$ respectively. Se showed, thus, negative net below canopy fluxes (NBCF) for the studied period ($-0.34 \pm 0.07 \text{ g ha}^{-1} \text{ y}^{-1}$). That phenomenon is assumed to result from foliar uptake that has been demonstrated for Se in several laboratory experiments for different plant species (Hu *et al.*, 2002; Kapolna *et al.*, 2009; Hurtevent *et al.*, 2013). Annual negative net below canopy fluxes were found for other anions, such as NO_3^- and SO_4^{2-} (Capellato and Peters, 1995; Aboal *et al.*, 2002). This is also consistent with the fact that lowest Se fluxes in throughfall were observed mostly during the growing period, when leaves have not fallen down yet.

Mean annual concentrations of Se in soil solutions decreased with depth, from 150 ng L^{-1} at the forest floor depth to 37 ng L^{-1} at -60 cm depth. Similarly, the annual fluxes of Se in soil solutions decreased with increasing depth, from waters draining the forest floor to the deeper mineral soil (-60 cm). A strong positive correlation between Se and DOC concentrations in soil solutions permeating the soil (data not shown) suggested that the vertical transport of Se

towards deep layers of the soil column could be mainly controlled by association with dissolved organic matter, through complexation with organic molecules.

The estimated Se input-output balance which informs about general accumulation or release of selenium in the considered ecosystem was positive accounting for $1.03 \pm 0.01 \text{ g ha}^{-1} \text{ y}^{-1}$. Half of the removal of Se input occurred within the soil column. Overall, about 83% of Se in soil solution was lost during its transport from the forest floor to 60 cm depth. The absence of a vertical gradient in total Se content in the soil column suggests however that Se adsorption and retention in soil is not predominant, thus the observed decreased of Se fluxes in soil solutions may be assumed as a result of volatilization phenomena. However, Se volatilization flux, an important process involved in Se cycling, was not quantified in this study. In his review, Sheppard (2008) recommended a first-order volatilization rate constant for Se in soil of 0.03 year^{-1} . In our conditions, such a rate applied to the stock of soil soluble Se would correspond to the removal of $1.83 \text{ g ha}^{-1} \text{ y}^{-1}$. More recently, volatilization Se fluxes of $0.11\text{-}0.12 \mu\text{g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ have been measured in natural peat bog containing $2.0 \pm 0.4 \text{ mg(Se) kg}^{-1}$, corresponding thus to a volatile Se emission of about $0.4\text{-}0.44 \text{ g ha}^{-1} \text{ y}^{-1}$ (Vriens *et al.* 2014). Those results based on literature illustrate the possible large pool of volatile Se emitted from soil but probably overestimate Se volatilization from studied forest ecosystem containing low levels of endogenous Se. As pointed out by Vriens *et al.* (2014), accurate assessment of trace element emissions requires the quantification of volatilization fluxes in representative ecosystems.

3.5. Se cycling dynamics through vegetation

For a realistic view of the current Se dynamics in the studied ecosystem, the main processes governing Se biological cycling were quantitatively described in terms of annual fluxes, as synthesized in Table 8.

The Se flux associated with annual biomass production (requirement) amounted to $0.10 \pm 0.02 \text{ g ha}^{-1} \text{ y}^{-1}$, for which the foliage represents the tree part mobilizing the largest quantity of Se. The estimated root uptake accounted for about $0.28 \pm 0.07 \text{ g ha}^{-1} \text{ y}^{-1}$.

However, it's important to note that root uptake could be overestimated because a part of Se measured in vegetation come from foliar uptake (Se from precipitation and/or volatile Se from soil). This finding evidence the difficulty in applying classical approach to give a quantitative description of Se cycling, complex phenomena such as foliar uptake and volatilization have thus to be considered.

Table 8. Mean values of the annual fluxes involved in the Se biological cycle. Error is given between brackets.

Processes	Annual Productivity (kg ha ⁻¹ y ⁻¹)	Se (g ha ⁻¹ y ⁻¹)
Requirement		0.10 (0.02)
Leaves	2500	0.075 (0.003)
Small Branches (< 4 cm)	456	0.003 (0.002)
Large Branches (4-20 cm)	291	0.004 (0.001)
Stembark	255	0.007 (0.001)
Stem wood	2863	0.014 (0.006)
Uptake (1)+(2)		0.25 (0.07)
(1) Immobilisation		0.028 (0.01)
Small Branches (< 4)	456	0.003 (0.002)
Large Branches (4-20)	291	0.004 (0.001)
Bark	255	0.007 (0.001)
Stem wood	2863	0.014 (0.006)
(2) Return to the soil (3) + (4)		0,22* (0,05)
(3) Litterfall	3002	0.22 (0.05)
Leaves	2500	0.13 (0.02)
Branches	203	0.013 (0.006)
Miscellaneous	299	0.07 (0.02)
(4) Crown leaching		-0,34 (0,07)*
Internal translocation		
Leaves		-0.05 (0.01)
Branches		0.003 (0.001)

* Observed Se decreased in throughfall compared to atmospheric input excluded crown leaching phenomena. It was thus considered as null value in the calculation of return to the soil (2).

The annual uptake flux of Se exceeded the requirement one in contrast to what is usually observed for most essential elements whose uptake only partially covers the annual demand (Ranger and Bonneau, 1984; Van der Stegen and Myttenaere, 1991). A part of Se taken up by roots was stored within senescing organs as corroborated by the estimated negative internal transfer annual flux with leaves (-0.05 ± 0.01 g ha⁻¹y⁻¹). This negative internal transfer value calculated for Se is coherent with a tolerance strategy developed by trees to neutralize the elements taken up in excess. A similar pattern is common for a major nutrient like Ca (Van der Stegen and Myttenaere 1991) and has been observed for trace and non-essential elements like ⁹⁰Sr (Thiry *et al.*, 2008) or U (Thiry *et al.*, 2005).

The total return of Se to the forest floor through aboveground litterfall averaged 0.22 ± 0.05 g ha⁻¹y⁻¹ which corresponds to 88% of Se annual uptake. Immobilization of Se in perennial organs was small ($\approx 12\%$), the contribution of stemwood being dominant among tree compartments. However, although litterfall was shown to play a major role in Se biological cycling, it contributed only 17% to total deposition on soil (BCF + litterfall). To note, our calculation doesn't take into account neither the annual productivity of fine roots nor the

necromass input to soil which, considering the high Se accumulation observed in roots, could be greater than the one from aboveground litter. Consequently, the role of fine roots in recycling Se might be underestimated.

The uptake of Se also yielded interesting information on the importance of vegetation to the global Se cycle. Root uptake rate was relatively low compared to atmospheric annual input, even though foliar uptake could not be a negligible factor to take into account. Our results showed that Se annual uptake and its further immobilization in ligneous compartments mobilized low amount of Se in comparison to the total soil inventory and its available pool as well. Therefore, considering biological cycle related to above-ground biomass turnover, vegetation seems to be of minor importance in ecosystem Se cycling. But some factors linked to vegetation types may play an important role in global Se cycle at least in two ways: (i) through OM turnover and associated microbial communities in soil, by transforming Se species coming from atmospheric input, and (ii) according to the potential of Se volatilization by plants (Sheppard *et al.*, 2008) forest vegetation is of concern for possible re-emission of Se in the ecosystem.

4. CONCLUSION

In the present study, we determined selenium distribution in soil column and its allocation in compartments of 50-years beech of a forest ecosystem used as long-term study model. The processes controlling the dynamics of Se recycling were identified and further quantified in terms of annual fluxes. Having only one year of experimental monitoring limits the possible generalization about average Se fluxes in considered ecosystem but does not subtract any merit to the study. To the best of our knowledge, this is the first time that Se data set considering complete ecosystem is available. Additionally, the outcomes of the current study, even if they are preliminary, enable gain insights into the long-term processes controlling the biogeochemistry of Se at an environmental scale. The current set of data also represents key information to improve modeling of Se cycle and persistence within forest ecosystem.

Uncertainties remain, mostly with respect to the extent of volatilization, which should be further investigated by experimental measurements in field. However, despite these uncertainties main conclusions can be drawn with respect to the major features of global Se cycling. The soil was shown to be an effective reservoir for Se coming mostly from atmospheric deposition. The results obtained from selective extractions made at different depths of the soil column, highlighted the redistribution of Se with soil depth, leading to

decreasing Se lability from surface layer enriched in SOM to deepness. According to our results, OM greatly influence ambient Se retention through at least two main processes: (i) by acting as a selective sorbent for Se, most probably in association with microbial reductive reactions, (ii) by sustaining the formation of organo-mineral associations, with a high affinity for Se. Both processes promote a certain Se lability, which was shown to be higher in surface layers enriched in OM. The true rate of Se transfer to a more recalcitrant organic pool however requires a more quantitative approach and deeper mechanism understanding.

The low contribution of root uptake to Se cycling was evidenced comparatively to the large available Se stock in soil indicating a minor role of vegetation in recycling Se in the system. Nevertheless, influence of plants for the rainfall interception and for the re-emission of Se in atmosphere via volatilization on the biogeochemical Se cycle could be significant. Output from the system via the drainage water was limited most probably as a result of volatilization and to less extent of plant uptake (root and foliar).

Overall, this study highlighted the apparent minor role of the biological cycle over the global cycle but indicated the prime importance of the production of organic Se pool upon soil organic matter decomposition, a factor strongly linked to vegetation. To conclude, it is reasonable to expect that, although the rate of recycling and annual fluxes could change as function of climatic conditions, forest and soil type and endogenous Se concentration, the processes characterizing the Se global cycle are supposed to be similar. Further improvements of Se budgets can be expected by increasing the period of monitoring to several years and including quantification of Se volatilization fluxes.

REFERENCES

Aboal J R., Jiménez M S., Morales D., Hernandez J M. Net below canopy fluxes in Canarian laurel forest canopies *Journal of Hydrology* **2002**, 264: 201–212

Amoroux D., Liss P S., Tessier E., Hamren-Larsson M., Donard O F X. Role of oceans as biogenic sources of selenium. *Earth and Planetary Science Letters* **2001**, 189: 277-283

ANDRA. Dossier HAVL-Argile. Référentiel du comportement des radionucléides et des toxiques chimiques d'un stockage dans le callavo-oxfordien jusqu'à l'homme, site de Meuse/Haute-Marne. Tome 2/2. C.RP.ASTR.04.0032.A. 2005

Attiwill P M., Adams M A. Nutrient cycling in forests. *New Phytology* **1993**, 124: 561-582

Augusto L., Bakker M R., De Lavaissière C., Jordan-Meille L., Saur E. Estimation of nutrient content of woody plants using allometric relationships: quantifying the difference between concentration values from the literature and actuals *Forestry* **2014**, 82 (4): 463-477

Bañuelos G S., Lin Z-Q. Acceleration of selenium volatilization in seleniferous agricultural drainage sediments amended with methionine and casein *Environmental Pollution* **2007**, 150: 306-312

Baize D., Girard M C. Référentiel pédologique 2008. Association française pour l'étude du sol (Afes), Éditions Quæ, Versailles (2009)

Balistrieri L S., Chao T T. Adsorption of selenium by amorphous iron oxyhydroxide and manganese dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **1990**, 547: 39-751

Broadley M R., White. P.J., Bryson. R.J. Meacham. MC, Bowen. HC, Johnson. SE, Biofortification of UK food crops with selenium fractionation in soils rich in organic matter. *Proceeding of Nutritional Society* **2006**, 65: 169-81

Bruggerman C., Maes A., Vancluysen J. The interaction of dissolved Boom Clay and Gorleben humic substances with selenium oxyanions (selenite and selenate). *Applied Geochemistry* **2007**, 22: 1371-1379

Buee M., Signoret B., Gegout J.C., Calvaruso C. Rapport Scientifique final : Station de suivi des cycles biogéochimiques. Qualification état de référence. Programme observation et surveillance de l'environnement de surface et des installations C.RP.FSOS.11.0048 ANDRA (2011)

Capellato R., Peters N E. Dry deposition and canopy leaching rates in deciduous and coniferous forest of the Georgia Piedmont: an assessment regression model. *Journal of Hydrology* **1995**, 169: 131-150.

Coppin F., Chabroullet C Martin-Garin A. Selenite interactions with some particulate organic and mineral fractions isolate from a natural grassland soil. *European Journal of Soil Science* **2009** 60: 369-376

- Cartes P., Gianfreda L., Paredes C., Mora M L. Selenium uptake and its antioxidant role in ryegrass cultivars as affected by selenite seed pelletization *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* **2011**, *11* (4): 1-14
- Chasteen T G., Bentey R. Biomethylation of selenium and tellurium: microorganisms and plants. *Chemical Reviews* **2003**, *103*: 1-26
- Cole D W., Rapp M. Element cycling in forest ecosystems, in D. E. Reichle (ed.) *Dynamics Properties of Forest Ecosystems, International Biological Programme 23*, Cambridge, Cambridge University Press **1980**, 341-408.
- Darrouzèz J., Bueno M., Lespès G., Potin-Gautier M. Operational optimization of ICP-octopole collision/reaction cell-MS for applications to ultratrace selenium total and speciation determination. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2005**, *20*: 88-94
- Ellis D R., Salt D E. Plants, selenium and human health. *Current Opinion in Plant Biology* **2003**, *6*: 273-279
- Fordyce F. Selenium deficiency and toxicity in the environment. *Essentials of medical geology* **2013**, 373-415.
- Fernandez- Martinez A., Charlet L. Selenium environmental cycling and bioavailability : A structural chemist point of view. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. **2009**, *8*: 81-110
- Gandois L., Nicolas M., VanderHeijden G., Probst A. The importance of biomass net uptake for a trace metal budget in a forest stand in north-eastern France. *Science of the Total Environment* **2010**, *408* (23): 5870-5877.
- Genet A., Wernsdörfer H., Jonard M., Pretzsch H., Rauch M., Ponette Q., Nys C., Legout A., Ranger J., Vallet P., Saint-André L. Ontogeny partly explains the apparent heterogeneity of published biomass equations for *Fagus sylvatica* in central Europe *Forest Ecology and Management* **2011**, (261): 1188-1202
- Goor F., Thiry Y. Processes, dynamics and modelling of radiocaesium cycling in a chronosequences of Chernobyl-contaminated Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) plantations. *Science of the total Environment* **2004**, *325*: 163-180
- Gustafsson J P., Johnsson L. The association between Selenium and Humic substances in forested ecosystems- Laboratory evidence *Applied organometallic chemistry* **1994**, *8*:141-147
- Hartikainen H., Xue T., Piironen V. Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant Soil* **2000**, *225*: 193-200
- Hu Q., Chen L., Xu J., Zhang Y., Pan G. Determination of selenium concentration in rice and the effect of foliar application of Se-enriched fertiliser or sodium selenite on the selenium content of rice. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2002**, *82*: 869-872

- Hu X., Wang F., Hanson M. Selenium concentration, speciation and behaviour in surface waters of the Canadian prairies. *Science of Total Environment* **2009**, 407: 5869-5876
- Jörg G., Bühnemann R., Hollas S., Kivel N., Kossert K., Van Winckel S., Gostomski CL. Preparation of radiochemically pure (⁷⁹Se) and highly precise determination of its half-life. *Applied Radiation and Isotopes* **2010**, 68: 2339-2351
- Jobbagy E., Jackson R B The distribution of soil nutrients with depth: Global patterns and the imprint of plants *Biogeochemistry* **2001**, 53: 51-77
- Kang Y., Inoue N., Rashid M., Sakurai K. Fixation of soluble Selenium in Contaminated Soil by Amorphous Iron (hydr)oxide. *Environmental Science* **2002**, 15(3): 173-182
- Kápolna E., Hillestrøm P R., Laursen K S., Husted S., Larsen E H. Effect of foliar application of selenium on its uptake and speciation in carrot. *Food Chemistry* **2009**, 115:1357-1363
- Khale H. Response of roots of trees to heavy metals. *Environmental Experimental Botany*. **1993**, 33 (1): 99-119
- Likens G E., Driscoll C T., Buso D C., Siccama T G., Johnson C E., Lovett G M., Fahey T J., Reiners W A., Ryan D F., Martin C W., Bailey S W. The biogeochemistry of calcium at Hubbard Brook. *Biogeochemistry* **1998**, 41: 89-173
- Mosher B W., Duce R A. A global atmospheric selenium budget. *Journal of Geophysical Research* **1987**, 92: 13289-13298
- Papelis Ch., Brown G E Jr., Parks G A., Leckie J O. X-ray absorption spectroscopic studies of cadmium and selenite adsorption on aluminium oxides. *Langmuir* **1995**, 11: 2041-2048
- Patra M., Sharma A. Mercury toxicity in plants. *Botanic Review* **2000**, 66: 379-422
- Ranger J., Bonneau M. Effets prévisibles de l'intensification de la production et des récoltes sur la fertilité des sols de forêt. Le cycle biologique en forêt. *Revue Forestier Français* **1984**, 36 (2): 93-111
- Ranger J., Marques M., Colin-Belgrand M., Hammang N., Gelhaye D. The dynamics of biomass and nutrient accumulation in a Douglasfir (*Pseudotsuga menziesii* France) stand studied using achronosequence approach. *Forest Ecology and Management* **1995**, 72: 167-183
- Ranger J., Colin-Belgrand M. Nutrient dynamics of chestnut tree (*Castanea sativa* Mill.) coppice stands. *Forest Ecology Management* **1996**, 86: 259 - 277.
- Ranger J., Marques R, Colin-Belgrand M. Nutrient dynamics during the development of a Douglas-fir (*Pseudotsugamenziesii* Mirb.) stand. *Acta Oecologica* **1997**, 18(2): 73 -90.
- Ranger J., Turpault M. P. Input-output nutrient budgets as a diagnostic tool for sustainable forest management. *Forest Ecology Management* **1999**, 122: 139-154
- Saint-Andre L., M'Bou A T., Mabilia A., Mouvondy., W, Jourdan C., Roupsard O., Deleporte P., Hamel O., Nouellon Y. Age-related equations for above- and below-ground

biomass of a Eucalyptus hybrid in Congo *Forest Ecology and Management* **2005**, 205: 199-214

Shand C A., Balsam M., Hillier S J., Hudson G., Newman G., Arthur J R. Aqua regia extractable selenium concentrations of some Scottish topsoils measured by ICP-MS and the relationship with mineral and organic soil components. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2010**, 90: 972-80

Shand C A., Eiksson J., Dahlin A S., Lumsdon D G., Selenium concentrations in national inventory soils from Scotland and Sweden and their relationship with geochemical factors. *Journal of Geochemical Exploration* **2012**, 121: 4-14

Sheppard M I., Sheppard S C. Volatilization of Selenium: Factors affecting the rate of volatilization *Technical memorandum NWMO* (2008)

Sors T G., Ellis D R., Salt D E. Selenium uptake, translocation, assimilation and metabolic fate in plants. *Photosynthesis Research* **2005**, 86: 373-389

Tamari Y. Methods of analysis for the determination of selenium in biological, geological and water sample. *Environmental Chemistry of Selenium, Marcel Dekker, New York (USA)*. **1998**, 27-46

Terry N., Carlson C, Raab T K., Zayed A M. Rates of selenium volatilization among crop species. *Journal of Environment Quality* **1992**, 21: 341-44

Terry N., Zayed A M., de Souza M P., Tarun A S. Selenium in Higher Plant *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **2000**, 51:401-32

Thiry Y., Schmidt P., Van Hees M., Wannijn J., Van Bree P., Ruffykiri G., Vandenhove H. Uranium distribution cycling in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) growing on a revegetated U-mining heap. *Journal of Environmental Radioactivity* **2005**, 81: 201-219

Thiry Y., Colle C., Yoschenko., Levchuk S., Van Hees M., Hurtevent P., Kashparov V. Impact of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) plantings on long term ¹³⁷Cs and ⁹⁰Sr recycling from a waste burial site in the Chernobyl Red Forest. *Journal of Environmental Radioactivity* **2009**, 100: 1062-1068

Tolu J., Le Hécho I., Bueno M., Thiry Y., Gautier M P. Selenium speciation at trace levels in soil *Analytica Chimica Acta* **2011**, 684: 126-133

Tolu J., Thiry Y., Bueno M., Jolivet C., Potin-Gautier M., Le Hécho I. Distribution and speciation of ambient selenium in contrasted soils from mineral to organic rich *Science of Total Environment* **2014**, 93-101: 479-480

Turpault M P., Redon P O. (2011) Base de données du site SOERE de Montiers. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Centre de Nancy, Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers, et Agence Nationale pour la gestion des déchets radioactifs (Andra)

Ulrich B. Influence de la fertilisation sur le cycle des éléments nutritifs dans les écosystèmes forestiers. IUFRO/FAO Paris **1973**, 23-34

Ukonmaanaho L., Merilä P., Nöjd P., Nieminen T M. Litterfall production and nutrient return to the forest floor in Scots pine and Norway spruce stands in Finland *Boreal Environment Research* **2008**, 13: 67-91

Van der Stegen J., Mytteeaere C. The K and Ca biogeochemical cycles in forest ecosystems: a review. *Trends in Soil Science* **1991**, 1: 271-276

Vriens B., Lenz M., Charlet L., Berg M., Winkel L. Natural wetland emissions of methylated trace elements. *Nature Communications* **2014**, 5:1-8

World Health Organization and Food and Agricultural Organization of the United Nations. Human Vitamin and Mineral Requirements, ISBN **2004**, 92 4 154612 3

Yudovich Y E., Ketris M P. Selenium in coal: A review. *International Journal of Coal Geology* **2006**, 67: 112-126

Zayed A C., Lytle M., Terry N. Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants *Planta* **1998**, 206: 284-292

Zhang Y., Moore J N. Selenium Fractionation and Speciation in a Wetland System *Environmental Science and Technology* **1996**, 30 (8): 2613-2619

Zhang Y., Frankenberger W T. Determination of selenium fractionation and speciation in wetland sediments by parallel extraction. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **2003**, 83: 315-326

Zhang Y., Pan G., Chen J., Hu Q. Uptake and transport of selenite and selenate by soybean seedlings of two genotypes. *Plant Soil* **2003**, 253: 437-443

Conclusion

La distribution du sélénium dans la colonne de sol ainsi que sa répartition dans les différents compartiments d'une hêtraie âgée de 54 ans, faisant partie du site expérimental forestier de Montiers, choisi comme modèle d'étude à long terme, ont été évalués. Les principaux processus qui régissent le cycle global de Se ont été identifiés et quantifiés en terme de flux annuels. Bien que l'extrapolation de ces flux soit limitée du fait d'une seule année de suivi, cette étude présente pour la première fois la quantification du cycle biogéochimique de Se au sein d'un écosystème entier. Les résultats acquis, bien que préliminaires, permettent de mieux comprendre les processus qui contrôlent la biogéochimie de Se à long terme et sa persistance au sein d'un écosystème forestier. Les principales caractéristiques du cycle global de Se dans l'écosystème ont été mises en évidence et une modélisation du cycle de Se peut ainsi être envisagée. Les concentrations de Se mesurées dans les différents compartiments indiquent que le sol apparaît comme le principal réservoir. Les résultats obtenus à partir des extractions sélectives effectuées à différentes profondeurs ont permis de mieux caractériser la distribution de Se dans la colonne de sol, qui se traduit par une diminution de la labilité de Se avec la profondeur. La matière organique du sol semble donc influencer la rétention de Se à travers au moins deux processus principaux: (i) agissant en tant que sorbant sélectif, (ii) en favorisant la formation des associations organo-minérales présentant également une forte affinité pour Se. Les deux mécanismes conduisent à une certaine labilité, plus importante dans les horizons superficiels plus riches en matière organique.

Le flux lié au prélèvement racinaire apparaît très faible en comparaison avec la fraction disponible de Se dans le sol, ce qui indique un rôle mineur du cycle biologique dans le cycle global de Se dans le système. Néanmoins, l'influence de la végétation n'est pas négligeable, le couvert forestier interceptant presque la moitié des apports atmosphériques de Se et pouvant participer à sa réémission dans l'atmosphère par volatilisation. La végétation, à travers la dégradation de la biomasse, peut de plus agir comme un bioréacteur susceptible de modifier la spéciation du sélénium issu des apports atmosphériques. Une amélioration du bilan entrée/sortie pourra être obtenue par la mise en place d'un suivi pluri-annuel et la quantification *in situ* des flux de volatilisation de Se par le couvert forestier et le sol.

Chapitre C

**Etude de la réactivité de Se dans
les compartiments
sols et végétaux
par traçage isotopique**

Ce chapitre présente les travaux ciblés sur deux compartiments jouant un rôle clé dans le cycle biogéochimique de Se : le sol et les végétaux. Pour étudier la réactivité de Se dans ces compartiments, la méthodologie du traçage isotopique a été mise en œuvre. Les modalités de son application aux matrices étudiées et à l'élément Se, ainsi que l'optimisation des conditions instrumentales et opératoires sont détaillées en première partie de ce chapitre.

*Les résultats présentés dans le chapitre B ont montré que le sol représente le principal réservoir de Se dans l'écosystème forestier étudié et joue donc un rôle clé dans le cycle de cet élément trace, à l'interface des échanges avec l'atmosphère, la biosphère, la lithosphère et l'hydrosphère. La synthèse bibliographique nous a permis de faire le point sur les connaissances actuelles des associations entre le sélénium et les différentes composantes du sol. Néanmoins, l'essentiel des travaux publiés concerne des expérimentations en batch, souvent avec des phases pures, après dopage avec de fortes teneurs en Se. Le comportement réel du sélénium peut ainsi être assez éloigné des résultats obtenus avec ce type d'étude du fait de la divergence entre concentrations étudiées et concentrations naturelles, entre conditions expérimentales en laboratoire et conditions environnementales. Du fait de la non dangerosité des traceurs enrichis en isotope stable pour l'environnement et les hommes, une expérimentation sur site a pu être mise en place pour étudier la réactivité de Se en conditions climatiques et environnementales réelles. Les comportements (distribution, spéciation) de Se naturellement présent et fraîchement apporté par dopage du sol avec le traceur $^{77}\text{Se(IV)}$ ont été suivis pendant une période de deux ans. Ce travail fait l'objet de l'article "**In situ study of selenium retention in soils using isotopically enriched stable selenite tracer**" préparé pour soumission au journal *Environmental Science and Technology* et présenté dans la 2^{ème} partie de ce chapitre.*

*La troisième partie de ce chapitre est consacrée à l'étude de la réactivité de Se au sein du compartiment végétal qui a été réalisée en collaboration avec l'Université Pierre et Marie Curie (UMR METIS) dans le cadre du Projet Needs Environnement 2012 BioTriSe (BIOmasse végétale TRIPlement marquée en Se-C-N). Les plantes jouent un rôle essentiel dans le transfert du sélénium dans le réseau trophique en tant qu'interface entre le sol et les consommateurs primaires. L'étude bibliographique (Chapitre A) a mis en exergue que la majorité des conclusions établies sur l'incorporation de Se par les végétaux se base sur des expérimentations réalisées à des concentrations élevées, en présence d'une unique espèce séléniée en solution nutritive et généralement avec des plantes hyper-accumulatrices. Ces conditions expérimentales ont l'avantage de produire du matériel végétal fortement concentré en sélénium (jusqu'à plusieurs centaines de mg kg^{-1}) facilitant l'analyse mais sont non représentatives des végétaux non accumulateurs. En combinant la méthodologie du traçage isotopique à l'analyse de spéciation (HPLC/ICP-MS), les transformations de la spéciation de deux traceurs mono-isotopiques et mono-spécifiques (sélénite enrichi en $m/z=77$ et, séléniat enrichi en $m/z=82$) initialement introduits dans le milieu de culture ont pu être suivies simultanément lors de leur incorporation par le ray-grass (*Lolium perenne*). Ces résultats font l'objet de l'article «**Stable isotope tracing: a powerful tool for selenium speciation and metabolic studies in not-hyperaccumulator plants (rye-grass *Lolium perenne* L.)**» publié dans le journal *Analytical and Bioanalytical Chemistry* présenté dans la troisième partie de ce chapitre après une description rapide des chambres et conditions de culture utilisées.*

1. LES TRACEURS ISOTOPIQUES STABLES: UN OUTIL ROBUSTE POUR L'ETUDE DU DEVENIR DE Se DANS L'ENVIRONNEMENT

1.1. Avantages

Pour comprendre la réactivité de Se il est nécessaire de pouvoir suivre l'évolution de sa distribution et de sa spéciation dans un compartiment de l'environnement ou lors de son transfert entre deux compartiments. L'étude du comportement de Se dans l'environnement est assujettie à la maîtrise des méthodes d'analyse mises en œuvre pour apporter des réponses à l'évaluation de sa réactivité dans les différents compartiments de l'écosystème.

Le développement et la validation d'outils analytiques et expérimentaux sont donc nécessaires afin de pouvoir faire le lien entre spéciation chimique, réactivité et mobilité et, caractériser son cycle biogéochimique et prévoir son impact sur l'environnement et sur la santé. D'un point de vue analytique, l'analyse de spéciation du sélénium dans les échantillons environnementaux reste un challenge analytique en raison, d'une part des très faibles concentrations présentes, et d'autre part de la complexité de matrices étudiées.

L'utilisation des traceurs isotopiques permet de suivre la dynamique de ces processus environnementaux. Les radio-traceurs ont fréquemment été utilisés dans ce but (dans le cas du sélénium : ^{75}Se). Cependant, au danger inhérent aux manipulations d'espèces radioactives, nécessitant un équipement spécifique et des mesures de sécurité strictes, s'ajoute l'impossibilité du suivi simultané de différentes espèces de Se. Par ailleurs, les radio-traceurs rendent également impossibles toute manipulation *in situ*.

La spectrométrie de masse à plasma à couplage induit (ICP-MS) permet l'analyse multi-isotopique, ce qui permet le développement de méthodologies utilisant les isotopes stables enrichis à des fins analytiques ou comme traceurs de processus environnementaux. Le sélénium, possédant six isotopes stables, offre de nombreuses possibilités pour le traçage utilisant les isotopes stables. Ce sont des espèces enrichies artificiellement avec un des isotopes de l'élément, par exemple $^{77}\text{Se(IV)}$, de manière à obtenir une empreinte isotopique différente de l'abondance naturelle (Monperrus *et al.*, 2004).

L'application des isotopes stables comme traceurs présente plusieurs avantages :

- le traceur isotopique stable peut être ajouté à des niveaux de concentrations proches des niveaux naturels afin de s’approcher au mieux des conditions réelles et donc reproduire des processus naturels qui pourraient être biaisés dans des conditions de concentrations trop différentes des conditions environnementales.
- du fait de leur non dangerosité pour l’environnement et les organismes vivants, des études *in situ* peuvent être envisagées ce qui permet un suivi des processus en conditions climatiques et environnementales réelles.
- le suivi des espèces naturellement présentes est réalisé parallèlement à celui du traceur permettant de déduire le comportement de l’élément respectivement en conditions stabilisées ou en mimant une contamination récente (Hintelman et Evans, 1997). Ces deux avantages ont été utilisés dans la partie II de cette chapitre (C.II) pour l’étude *in situ* de la réactivité de Se dans le compartiment sol.
- en utilisant plusieurs espèces du même élément enrichies avec différents isotopes, il est possible de comparer leurs comportements simultanément. Cet avantage a été exploité dans la troisième partie (C.III) pour l’étude de la bio-incorporation de Se par le ray-grass qui a été exposé simultanément aux deux traceurs mono-spécifiques et quasiment mono-isotopiques $^{77}\text{Se(IV)}$ et $^{82}\text{Se(VI)}$. Ceci permet de comparer différents facteurs tels que taux d'absorption, translocation, métabolisme des deux formes chimiques tout en tenant compte des interactions potentielles pour cette espèce végétale dans des conditions de culture strictement identiques (Suzuki *et al.*, 2006 a, b, c, d ; Gonzales-Iglesias *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2008). En outre les produits de la métabolisation de chaque traceur enrichi conservent leur composition quasi mono-isotopique ce qui facilite leur détection en ICP-MS du fait de l’abaissement de la limite de détection.

1.2. Etat de l'art des applications des traceurs isotopiques stables du sélénium

Du fait des avantages offerts, les traceurs isotopiques stables sont actuellement largement utilisés pour étudier la dynamique des processus environnementaux (i.e adsorption/désorption ; méthylation/déméthylation ou assimilation/excrétion) de certains contaminants tels que le mercure, l'étain et le chrome (Hintelman et Evans, 1997; Hintelman et Harris, 2004 ; Monperrus *et al.*, 2004 ; Rodriguez et Gonzales 2005a; Villalobos-Aragon *et al.*, 2012 ; Yin *et al.*, 2014).

En ce qui concerne Se, l'utilisation des traceurs isotopiques stables conjointement à l'analyse de spéciation par HPLC/ICP-MS, a été essentiellement appliquée lors d'expérimentations effectuées chez les souris afin de caractériser le métabolisme des différentes espèces de Se, inorganiques (sélénite et séléniate) ou organiques (i.e SeMet ; SeCys ; MeSeCys ; MeSeO₂H ; sélénosucres), pour mieux comprendre leurs transformations et fonctions biologiques (Suzuki *et al.* 1997; Suzuki *et al.*, 2006 a, b, c, d; e; f; Gonzales-Iglesias *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2008; Ohta *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2013; Sanchez-Martinez *et al.*, 2014).

Cependant, à ce jour, très peu d'études ont utilisé les isotopes stables de Se pour des observations environnementales probablement du fait des difficultés liées à la mesure précise des rapports isotopiques de Se à l'état de trace. Ces difficultés sont liées à la fois aux faibles concentrations de Se, ainsi qu'à l'existence de nombreuses interférences polyatomiques aux rapports m/z des isotopes de Se. Ces interférences sont produites par différents éléments (i.e Br, Fe, Ca et P) qui sont très abondants dans les matrices environnementales (i.e extraits de sols et sédiments). De la même manière, les traceurs isotopiques n'ont pas été mis en œuvre pour étudier l'incorporation de Se par les plantes supérieures.

Dans l'étude de Collins *et al.* (2006), les traceurs sélénite (⁷⁸Se(IV)) et séléniate (⁷⁶Se(VI)) ont été utilisés pour la détermination des coefficients de partitions solide/liquide (K_d) de ces deux espèces introduites simultanément dans les solutions de sols et sédiments. Toutefois, dans cette expérience, pour s'affranchir des interférences potentielles, les concentrations employées sont très élevées (1-25 mg kg⁻¹) pour les deux traceurs et donc éloignées de la majorité des situations environnementales réelles.

Dans une autre étude (Hu *et al.*, 2009) le traceur séléniate (⁸²Se(VI)) a été utilisé pour suivre l'évolution de Se fraîchement ajouté par voie liquide dans un mésocosme (colonne

d'eau+sédiment) à une concentration environ 10 fois supérieure au bruit de fond géologique. Les résultats ont montré une diminution rapide de la concentration de $^{82}\text{Se(VI)}$ fraîchement ajouté dans la colonne d'eau jusqu'à devenir inférieure à la limite de détection ($0.18 \mu\text{g L}^{-1}$) après 50 jours. Selon les auteurs, cette diminution est probablement due à une incorporation du traceur dans les sédiments et/ou à sa volatilisation. L'incorporation de $^{82}\text{Se(VI)}$ et son transfert de la surface en profondeur ont été ensuite confirmés par l'analyse directe des sédiments.

Chilimba *et al.* (2012), ont utilisé *in situ* des fertilisants enrichis en $^{74}\text{Se(IV)}$ pour évaluer simultanément le prélèvement par le maïs de Se naturellement présent dans le sol et apporté via les fertilisants. Après un an de culture les auteurs observent un faible taux de prélèvement du traceur par le maïs (inférieur à 0.1 % de la quantité apportée par les fertilisants) sans pouvoir l'attribuer à l'immobilisation du traceur dans le sol ou à son lessivage vers le système aquatique. En effet, la mesure des concentrations de ^{74}Se dans le sol n'a pu être réalisée du fait des fortes interférences sur cet isotope (^{74}Ge , $^{57}\text{Fe-OH}$, or $^{56}\text{Fe-OH}_2$). Le choix de l'isotope d'enrichissement du traceur n'est pas sans conséquence et doit donc tenir compte des interférences liées à la (aux) matrice(s) d'intérêt.

2 PRINCIPE ET PROCEDURE

2.1 Préparation des espèces sélénées isotopiquement enrichies

Les six isotopes stables de Se sont commercialement disponibles avec des compositions isotopiquement enrichies, tous sous la forme de sélénium élémentaire. La sélénométhionine est également disponible commercialement avec un enrichissement en Se-74. Pour les autres composés, la première étape consiste donc à synthétiser les traceurs isotopiques mono-spécifiques. Des protocoles ont été publiés pour la synthèse des formes inorganiques sélénite et séléniate (Van Deal *et al.*, 2004), ainsi que pour certaines formes organiques (i.e SeMet ; SeCys, MeSeCys ; MeSeO₂H) (Suzuki *et al.*, 2006 b; c ;d). Des procédures biologiques ont également été mises au point, notamment pour la synthèse de $^{77}\text{SeMet}$ et $^{77}\text{MeSeCys}$. Hinojosa-Reyes *et al.* (2004) ont développé la biosynthèse de SeMet enrichie par culture de

levure (*Saccharomyces cerevisiae*) dans un milieu enrichi en Se-77. $^{77}\text{SeMet}$ est ensuite libérée par hydrolyse enzymatique de la levure. Récemment, MeSeCys enrichie a été obtenue par fermentation de choucroute en présence de sélénite-77. Dans ces conditions, $^{77}\text{SeIV}$ est converti à 95% en $^{77}\text{MeSeCys}$ (Sanchez-Martinez *et al.*, 2014).

Pour ce travail, les espèces sélénite et séléniate isotopiquement enrichies ($^{77}\text{Se(IV)}$ et $^{82}\text{Se(VI)}$) ont été préparées à partir des isotopes 77 et 82 sous forme élémentaire Se (0) (^{77}Se : 99.2%, ^{74}Se : <0.02%, ^{76}Se : 0.1%, ^{78}Se : 0.3%, ^{80}Se : 0.2%, ^{82}Se : 0.2% ; ^{82}Se : 98.9%, ^{74}Se : <0.1%, ^{76}Se : 0.1%, ^{77}Se : <0.1%, ^{78}Se : <0.1%, ^{80}Se : 1.1% ; Isoflex, Moscou). La synthèse a été réalisée en suivant la procédure décrite par Van Dael *et al.* (2004) et résumée dans le Tableau C.1. Seules les étapes 1 à 3 sont nécessaires pour la préparation de $^{77}\text{Se(IV)}$. Les étalons préparés sont ensuite caractérisés en termes de concentration, composition isotopique et spéciation.

Tableau C. 1. Protocole de préparation de Se(IV) et Se(VI) à partir de Se(0)

Préparation de Se(IV) à partir de Se(0)
Etape 1: Dissolution de ≈ 5 mg Se(0) dans 1 mL de HNO_3 concentré (70 %)
Etape 2: Chauffage de la solution à 60°C au bain mairie pendant 1h sous flux de N_2
Etape 3: Dilution avec de l'eau ultrapure jusqu'à un volume final de 20 ml puis filtration à $0,22 \mu\text{m}$ (membrane en téflon) et stockage à 4°C
Préparation de Se(VI) à partir de Se(IV)
Etape 4: Evaporation de la solution de SeIV (Etape 3) à sec à 100°C sous flux de N_2 .
Etape 5: Ajout de 5 mL de H_2O_2 (30 % ; ultra-trace) puis chauffage au bain marie à 70°C pendant 1 min, puis ajout de 0.2 ml de KOH à 2 mol L^{-1} . Le volume est réduit à 1 mL à 70°C sous flux de N_2 . Ces opérations sont répétées 3 fois.
Etape 6: Evaporation à sec et dissolution du précipité blanc obtenu dans 10 mL de HNO_3 à 2%. La solution est filtrée à $0,22 \mu\text{m}$ puis stockée à 4°C .

2.2. Détermination de la concentration en sélénium

2.2.1. Principe d'utilisation des traceurs isotopiques

La dilution isotopique est basée sur la mesure des rapports isotopiques de l'élément dans un échantillon avant et après ajout d'un étalon isotopiquement enrichi du même élément. Dans le cas du traçage isotopique, l'échantillon ayant été préalablement dopé avec le traceur isotopiquement enrichi présente une modification de sa composition isotopique naturelle (Figure C.1). La quantification des concentrations naturelles et isotopiquement enrichies de l'élément dans l'échantillon est alors obtenue par dilution isotopique inverse (RID), c'est-à-dire par la mesure des rapports isotopiques avant et après ajout de l'étalon de composition isotopique naturelle.

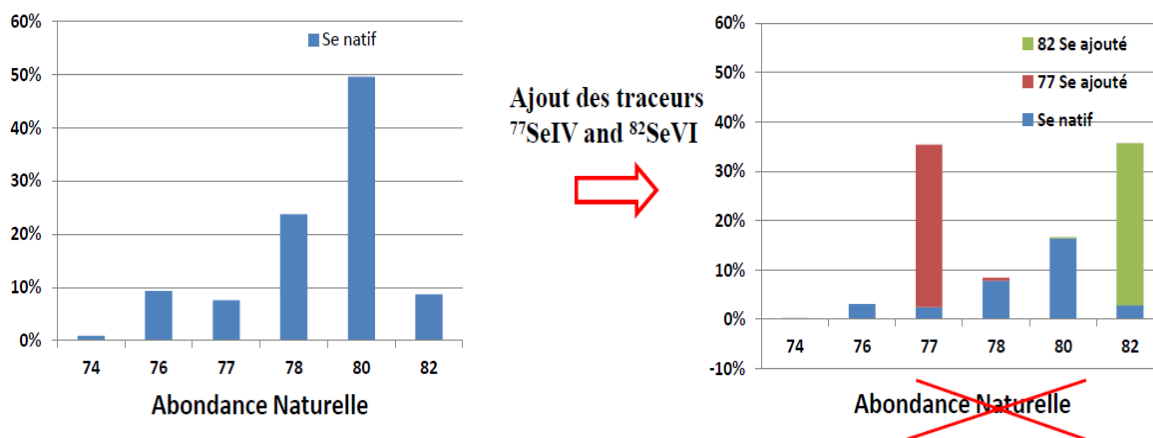


Figure C. 1. Principe de l'utilisation des traceurs isotopiques stables: modification du profil isotopique de Se suite à l'ajout des traceurs

La concentration totale de l'élément dans l'échantillon est calculée selon l'équation (C.1) correspondant au cas d'un échantillon préalablement dopé avec le traceur ^{77}Se :

$$C = \frac{C' \times w' \times W_{\text{at}} \times (R \times A_{\text{naturel}}^{77} - A_{\text{naturel}}^{78})}{w \times W_{\text{at}} \times (A_{\text{éch}}^{78} - R \times A_{\text{éch}}^{77})} \quad (\text{C.1})$$

Avec:

C: concentration de Se dans l'échantillon ;

C': concentration de l'étalon de Se de composition isotopique naturelle ajouté à l'échantillon;

w, w' : masses de l'échantillon et de l'ajout;

$W_{at.}$, masse atomique de Se dans l'échantillon

$W'_{at.}$: masse atomique de Se ajouté (78.96, selon Laeter *et al.*, (2003))

R : rapport $^{78}\text{Se}/^{77}\text{Se}$ mesuré après l'ajout ;

$^{77};^{78}\text{A}_{\text{éch}}$: abondance de l'isotope 77 ou 78 dans l'échantillon avant ajout ;

$^{77};^{78}\text{A}_{\text{naturel}}$: abondance de l'isotope 77 ou 78 dans l'étalon utilisé pour l'ajout.

Pour minimiser la propagation d'erreur lors de l'analyse RID, la quantité de Se naturel ajouté est calculée afin d'obtenir un rapport isotopique modifié optimal selon l'équation C.2 (Webster *et al.*, 1960).

$$R_{\text{optimal}} = \sqrt{R_{\text{naturel}} \times R_{\text{éch}}} \quad (\text{C.2})$$

Avec :

R_{naturel} : rapport $^{78}\text{Se}/^{77}\text{Se}$ de l'étalon de Se de composition isotopique naturelle utilisé pour l'ajout ;

$R_{\text{éch}}$: rapport $^{78}\text{Se}/^{77}\text{Se}$ mesuré dans l'échantillon avant ajout.

A partir de la concentration totale de Se dans l'échantillon les concentrations individuelles de sélénium naturel ($\text{Se}_{\text{naturel}}$) et isotopiquement enrichis ($\text{Se}_{\text{traceur}}$) sont calculées à l'aide des équations (C.3) et (C.4) (Hintelmann and Hevans, 1997).

$$[\text{Se}_{\text{naturel}}] = \frac{C \times ^{78}\text{A}_{\text{éch}}}{^{78}\text{A}_{\text{naturel}}} \quad (\text{C.3})$$

$$[\text{Se}_{\text{traceur}}] = \frac{C \times ^{78}\text{A}_{\text{éch}} - \left[\left(\frac{^{78}\text{A}_{\text{naturel}}}{^{77}\text{A}_{\text{naturel}}} \right) \times C \times ^{77}\text{A}_{\text{éch}} \right]}{\left(\frac{^{78}\text{A}_{\text{traceur}}}{^{77}\text{A}_{\text{traceur}}} \right) - \left(\frac{^{78}\text{A}_{\text{naturel}}}{^{77}\text{A}_{\text{naturel}}} \right)} \quad (\text{C.4})$$

Avec:

$^{77};^{78}\text{A}_{\text{traceur}}$: abondance de l'isotope 77 ou 78 dans le traceur isotopiquement enrichi ($^{77}\text{Se}(\text{IV})$).

Afin d'obtenir une quantification précise de Se par dilution isotopique inverse, il est indispensable de pouvoir mesurer précisément les rapports isotopiques. Nous nous sommes particulièrement attachés dans ce travail à l'optimisation de la mesure des rapports isotopiques dans les matrices analysées dans cette étude (échantillons, solutions d'extraction...).

2.2.2. Optimisation pour une mesure précise des rapports isotopiques de Se

Comme précédemment discuté, la détection de Se par ICP-MS est sujette à de nombreuses interférences aux rapports m/z des isotopes de Se (cf. Chapitre A, 4.1.3). La mise en œuvre du traçage isotopique de Se par ICP-MS nécessite donc de maîtriser ces interférences (Hinojosa Reyes *et al.*, 2002; Darrouzès *et al.*, 2005).

En pressurant la cellule de collision/réaction avec un mélange H₂ + He, on peut réduire fortement les interférences polyatomiques (Darrouzès *et al.*, 2005). Cependant, l'utilisation de la cellule de collision/réaction dans ces conditions est à l'origine de la création de nouvelles interférences de type SeH⁺ et BrH⁺ dues à l'ajout de H₂ dans la cellule. Il est donc nécessaire d'appliquer des corrections mathématiques pour corriger les signaux mesurés de cette hydratation (Hinojosa Reyes *et al.*, 2003 ; Darrouzès *et al.*, 2005).

Pour mener à bien cette correction, des étalons de Se et Br doivent être analysés de manière régulière avec les échantillons pour calculer les facteurs d'hydratation de Se (équation C.5) et de Br (équation C.6):

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

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

Les signaux des autres isotopes peuvent ensuite être corrigés selon les équations C.7 à C.12.

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

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

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

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

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

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

Avec:

f_{Se} , f_{Br} : facteurs d'hydruration de Se et Br ;

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

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

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

La mesure de rapports isotopiques en ICP-MS nécessite également de contrôler le biais de masse. Le biais de masse est défini comme le mécanisme par lequel les isotopes les plus lourds d'un élément sont transmis avec une plus grande transmissivité que les isotopes les plus légers, de telle sorte que la composition isotopique exacte ne peut jamais être mesurée directement. Le biais de masse correspond donc à la différence entre rapports isotopiques théoriques et mesurés une fois toutes les interférences éliminées.

Dans ce travail de thèse, le biais de masse est corrigé en utilisant le modèle exponentiel décrit par Hinojosa-Reyes *et al.* (2003), (Eq. C.13).

$$R = R_{\text{mesuré}} \times e^{-K \times \Delta M} \quad (\text{C.13})$$

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).

Dans la pratique, pour un ICP-MS, ce biais de masse est dépendant du temps et donc le facteur correctif K doit être déterminé périodiquement pendant l'analyse. Il peut être calculé à travers deux méthodes :

- la méthode de l'encadrement (« bracketing ») qui consiste à analyser un échantillon de composition isotopique connue ou certifiée entre les échantillons utilisés (Ruiz-Encinar *et al.*, 2000).
- la méthode simultanée qui consiste en l'ajout d'un étalon interne ayant une composition isotopique certifiée (Rodriguez Martin-Doimeadios *et al.*, 2002; Monperrus *et al.*, 2003).

Dans le cas de Se, la première méthode est préférable, en raison de la difficulté à trouver un élément de masse isotopique proche de Se non interféré et d'énergie d'ionisation équivalente. Dans ce travail, le biais de masse a été déterminé via l'analyse régulière d'un étalon de Se de composition isotopique naturelle tous les 3 échantillons.

Malgré la prise en compte de ces corrections et la réduction des interférences par l'utilisation de la cellule de collision/réaction, les isotopes 74 et 76 de Se restent non mesurables dans les matrices analysées. La composition isotopique et la masse atomique de Se dans les échantillons sont donc calculées en ne tenant compte que des isotopes 77, 78, 80 et 82.

$$\sum \text{rapports} = \frac{{}^{77}\text{Se}}{{}^{80}\text{Se}} + \frac{{}^{78}\text{Se}}{{}^{80}\text{Se}} + \frac{{}^{82}\text{Se}}{{}^{80}\text{Se}} + 1 \quad (\text{C.14})$$

$${}^{80}\text{A}_{\text{éch}} = \frac{100}{\sum \text{rapports}} \quad (\text{C.15})$$

$${}^{\text{X}}\text{A}_{\text{éch}} = \frac{{}^{\text{X}}\text{Se}}{{}^{80}\text{Se}} \times {}^{80}\text{A}_{\text{éch}} \quad (\text{C.16})$$

$$W_{\text{at}} = \sum {}^{\text{X}}\text{A}_{\text{éch}} \times W'_{\text{at}} \quad (\text{C.17})$$

Obtenir une mesure précise de rapport des isotopes de Se est d'autant plus délicat lorsqu'il doit être détecté à l'état de traces dans des matrices complexes. Les paramètres instrumentaux liés à la cellule de collision/réaction ainsi que la fréquence du contrôle du biais de masse et des facteurs d'hydruration ont été optimisés pour les matrices complexes telles que les extraits de sol. Ce travail d'optimisation, exposé dans ce paragraphe, a fait l'objet d'une publication dans le journal *Analytical Bioanalytical Chemistry* en 2014 (***A new methodology involving stable isotope tracer to compare simultaneously short- and long-term selenium mobility in soils*** par Tolu J, Di Tullo P., Le Hécho I., Thiry Y., Pannier G, Potin-Gautier M., Bueno M. disponible en annexe 1).

La nature et les débits de gaz utilisés dans la cellule de collision/réaction de l'instrument Agilent 7500ce ont été testés en considérant les extraits de sol représentant les matrices les plus complexes, i.e tampon phosphate et NaOH. Une première série d'expériences indique que l'utilisation d'un débit de H₂ supérieur à 5.5 ml min⁻¹ se traduit par une diminution trop importante du signal. Par ailleurs, la pressurisation de la cellule de collision/réaction avec de l'hélium seul ne permet pas une élimination efficace des interférences. Les effets des différents débits de gaz, H₂ seul (3.5- 5.5 ml min⁻¹) ou en mélange avec He (H₂/He : 3.5/1.0 et 4.0/1.0 ml min⁻¹), sur la justesse et la précision des rapports isotopiques de Se (n = 12) sont présentés figure C.2.

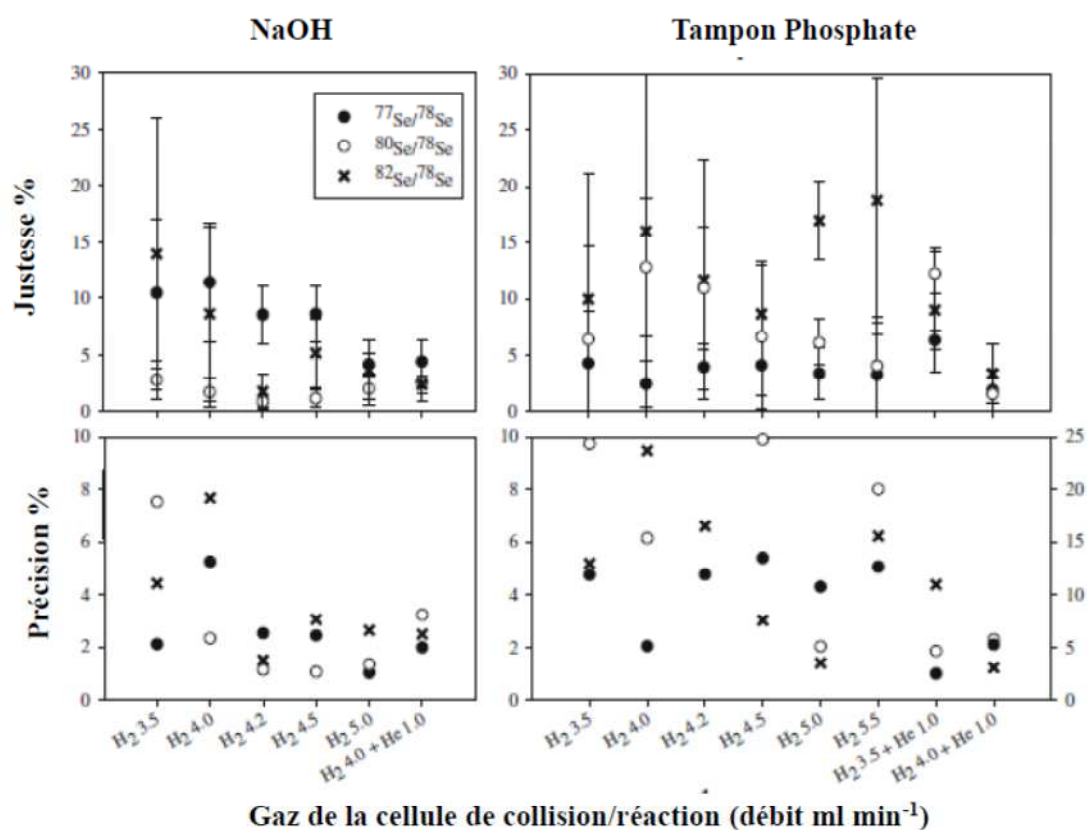


Figure C. 2. Justesse et précision des rapports isotopiques de Se (n = 12) dans les extraits de sol (tampon phosphate et NaOH) en fonction des conditions de C/RC. Pour les extraits au tampon phosphate, la précision des rapports ⁷⁷Se/⁷⁸Se et ⁸⁰Se/⁷⁸Se figure sur l'axe y principal (gauche) et pour le rapport ⁸²Se/⁷⁸Se sur l'axe y secondaire (droite)

Un débit de 5 ml min^{-1} en H_2 apparaît suffisant pour assurer une détermination juste (justesse $\approx 5\%$) et précise ($\text{RSD} \approx 2\%$) des rapports isotopiques de Se dans les extraits NaOH de sol. Dans le cas des extraits au tampon phosphate, l'utilisation d'un mélange de H_2/He aux débits respectifs de 4 et 1 ml min^{-1} est nécessaire pour atteindre les mêmes performances du fait de l'action complémentaire des deux gaz pour l'élimination des interférences polyatomiques (Darrouzès *et al.*, 2005). Les meilleures justesse et précision des rapports $^{80}\text{Se}/^{78}\text{Se}$ et $^{82}\text{Se}/^{78}\text{Se}$ suite à l'ajout de He sont également à associer à une meilleure stabilité dans le temps des signaux des isotopes de Br dans les échantillons et dans les blancs par effet de thermalisation et de focalisation (Yamada *et al.*, 2002; Darrouzès *et al.*, 2005). La détermination précise des isotopes de Br (^{79}Br et ^{81}Br) intervient indirectement sur les signaux des isotopes de Se via les corrections liées à l'hydruration de Br (isotopes ^{80}Se et ^{82}Se , équations C.10 et C.12).

Le mélange H_2/He ($4/1 \text{ ml min}^{-1}$) se révèle aussi efficace dans les extraits à la soude et à l'eau (erreur $< 5\%$; $\text{RSD} < 6\%$) et a donc été choisi pour pressuriser la cellule de collision/réaction (C/RC).

Comme décrit auparavant les interférences dues à la formation de SeH^+ et BrH^+ sont éliminées grâce à des corrections mathématiques (Equations C.7 à C.12) qui nécessitent la détermination des facteurs d'hydruration de Se et Br (f_{Se} et f_{Br} ; Eq. C.5-C.6). Cette mesure est réalisée dans des solutions étalons de Br et de Se de composition isotopique naturelle. Les facteurs f_{Se} et f_{Br} varient légèrement dans le temps et selon la matrice ($f_{\text{Se}}=2-3\%$; $f_{\text{Br}}= 11-14\%$) en accord avec les valeurs reportées dans la littérature pour le même instrument ICP-MS (Darrouzès *et al.*, 2008). La variation de f_{Se} après 4 h d'analyse est inférieure à 3% ce qui n'affecte pas la justesse et la précision des rapports isotopiques. A l'inverse la variation de f_{Br} pourtant du même ordre de grandeur (autour du 3% après 4 h) affecte fortement la correction des isotopes ^{82}Se et ^{80}Se du fait des concentrations importantes de Br dans les échantillons. La méthode du "bracketing" avec une analyse régulière d'un étalon de Br ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) tous les trois échantillons a été testée pour trois types d'extraits (eau; tampon phosphate et soude) et deux sols (culture; forêt). Ceci a permis un incrément de la justesse et précision des rapports impliquant les isotopes 80 et 82 (Figure C.3).

L'impact de la matrice dans le taux de formation des hydrures de Se et Br a également été évalué en comparant les facteurs f_{Se} et f_{Br} ($n = 10$) dans les trois types d'extraits de sol (eau ultra-pure, tampon phosphate et NaOH). Dans les extraits à l'eau et à la soude, les valeurs de f_{Se} et f_{Br} sont très similaires, avec des valeurs moyennes de 2.3 ± 0.1 et $13.2 \pm 0.2 \%$

respectivement. Ces valeurs sont légèrement supérieures dans les extraits au tampon phosphate (2.8 ± 0.1 et 14 ± 1 % pour f_{Se} et f_{Br} , respectivement), ce qui indique qu'il est nécessaire de déterminer les facteurs d'hydruration dans la matrice reconstituée de l'échantillon.

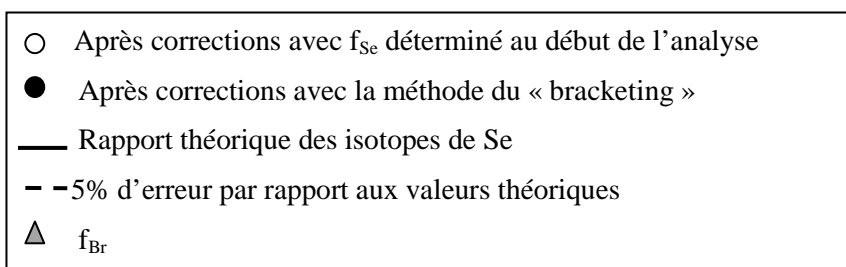
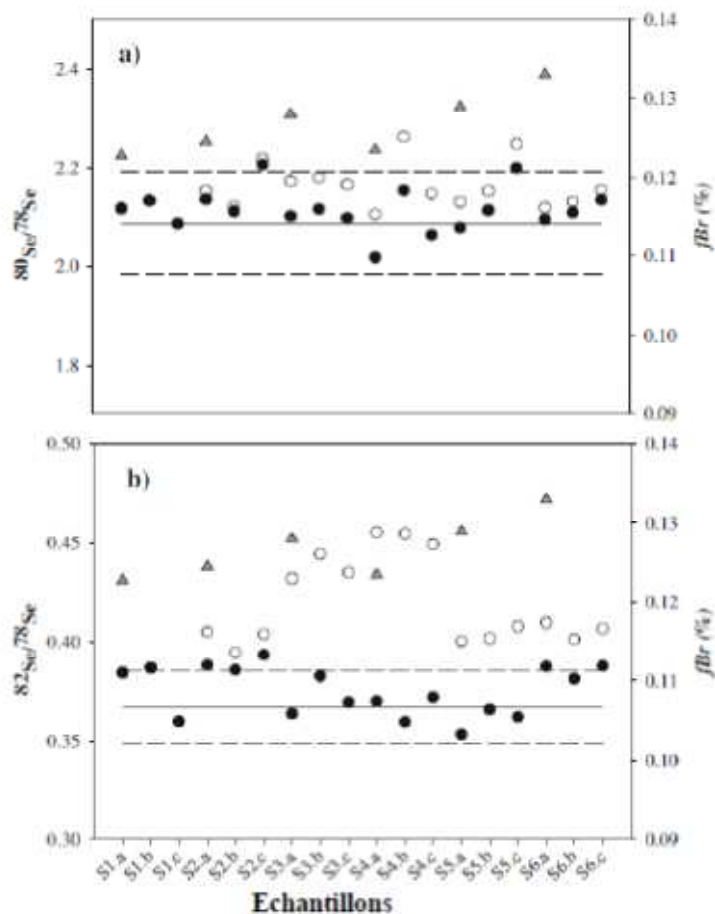


Figure C. 3. Rapports $^{80}Se/^{78}Se$ et $^{82}Se/^{78}Se$ déterminés pour six différents extraits de sol (3 extraits/sol chacun en triplicat) analysés en série après correction des interférences due à l'hydruration de Br en utilisant: (i) la valeur de f_{Br} mesurée au début de la série d'analyses, (ii) la valeur de f_{Br} déterminée juste avant l'analyse d'un échantillon en triplicat.

En ce qui concerne le facteur de correction du biais de masse (K), sa variation pendant 4 h d'analyse est inférieure à 3% ce qui n'affecte pas la détermination des rapports isotopiques. La méthode du "bracketing" n'est donc pas nécessaire pour ce facteur.

Les limites de détection de chaque rapport isotopique ($^{78}\text{Se}/^{77}\text{Se}$; $^{80}\text{Se}/^{77}\text{Se}$ et $^{82}\text{Se}/^{77}\text{Se}$) associées à la méthode optimisée, calculées selon Yu *et al.*, 2002, étant entre 0.01 - 0.9 $\mu\text{g (Se)kg}^{-1}$ en fonction du type d'extraits et des rapports isotopiques apparaissent tout à fait adaptées au suivi environnemental.

Les conditions instrumentales et opératoires décrites ici ont été appliquées pour les deux études de traçage isotopique de Se menées durant cette thèse qui font l'objet des deux parties suivantes (C.II et C.III).

2.2.3. Calculs des incertitudes

Les incertitudes analytiques associées aux mesures élémentaire (ICP-MS) et de spéciation (HPLC/ICP-MS) de Se dans un échantillon sont déterminées 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.

Ces incertitudes analytiques sont ensuite combinées aux incertitudes associées à la variabilité entre les répliques d'incubation (traçage sol) ou d'extraction (traçage ray-grass). La série d'équations appliquées pour le calcul des incertitudes sur chaque mesure et l'incertitude totale sont présentées dans ce paragraphe.

Tout d'abord, l'incertitude ($\Delta^X I_{\text{corrigé}}$) sur l'intensité du signal corrigé des facteurs d'hydruration de Se et Br (Equations C.7 à C.12), est calculée selon l'équation C.18:

$$\Delta^X I_{\text{corrigé}} = \sqrt{\left(\Delta^X I\right)^2 + \left({}^{X-1} I_{\text{corrigé}} \times \Delta f\right)^2 + \left(f \times \Delta {}^{X-1} I_{\text{corrigé}}\right)^2} \quad (\text{C.18})$$

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, répétabilité de 3% pour l'analyse de spéciation)

f: facteurs d'hydruration de Se ou Br ;

Δf : incertitude sur f_{Se} ou f_{Br} (3% de la valeur suite à l'étape d'optimisation (§ 2.2.2))

Les incertitudes sur les rapports isotopiques sont déterminées à partir de celles des intensités des isotopes de Se considérés dans le rapport (équation C.19):

$$\Delta\left(\frac{{}^X\text{Se}}{{}^Y\text{Se}}\right) = \frac{{}^X\text{Se}}{{}^Y\text{Se}} \times \sqrt{\left(\frac{\Delta{}^X\text{Se}}{{}^X\text{Se}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta{}^Y\text{Se}}{{}^Y\text{Se}}\right)^2} \quad (\text{C.19})$$

Avec :

${}^X\text{Se}$ et ${}^Y\text{Se}$ déterminés selon les équations (C.7-C.12)

$\Delta{}^X\text{Se}$ et $\Delta{}^Y\text{Se}$ déterminés selon l'équation C.18

La correction du biais de masse ($K \pm \Delta K$) est prise en compte selon l'équation C.20:

$$\Delta\left(\frac{{}^X\text{Se}}{{}^Y\text{Se}}\right)_{\text{corrigé K}} = \sqrt{\left[e^{K \times M} \times \left(\frac{\Delta{}^X\text{Se}}{{}^X\text{Se}}\right)\right]^2 + 2 \left[\left(\frac{{}^X\text{Se}}{{}^Y\text{Se}}\right) \times e^{K \times M} \times M \times \Delta K\right]^2} \quad (\text{C.20})$$

Avec :

M : différence entre les masses des isotopes X et Y

K : biais de masse

ΔK : incertitude sur K (3% suite à l'étape d'optimisation (§ 3))

Les incertitudes sur les abondances isotopiques de Se dans l'échantillon ainsi que sur sa masse atomique sont ensuite calculées selon Eq. C.21-C.24:

$$\Delta \Sigma \text{rapports} = \sqrt{\Delta\left(\frac{{}^{77}\text{Se}}{{}^{80}\text{Se}}\right)^2 + \Delta\left(\frac{{}^{78}\text{Se}}{{}^{80}\text{Se}}\right)^2 + \Delta\left(\frac{{}^{76}\text{Se}}{{}^{80}\text{Se}}\right)^2} \quad (\text{C.21})$$

Avec: $\Delta\left(\frac{{}^X\text{Se}}{{}^{80}\text{Se}}\right)$ déterminés selon l'équation 20

$$\Delta {}^{80}\text{A}_{\text{éch}} = \frac{100}{\Sigma \text{rapports}} \times \sqrt{\left(\frac{\Delta \Sigma \text{rapports}}{\Sigma \text{rapports}}\right)^2} \quad (\text{C.22})$$

$$\Delta {}^X\text{A}_{\text{éch}} = \sqrt{\left[\left(\frac{{}^X\text{Se}}{{}^{80}\text{Se}}\right) \times \Delta {}^{80}\text{A}_{\text{éch}}\right]^2 + \left[{}^{80}\text{A}_{\text{éch}} \times \Delta\left(\frac{{}^X\text{Se}}{{}^{80}\text{Se}}\right)\right]^2} \quad (\text{C.23})$$

Avec : X : isotopes 77, 78 ou 82

$$\Delta W_{at} = \frac{1}{100} \sqrt{\sum \left(\left(\frac{78}{77} \text{Se} \right)^Y \Delta A_{éch} \times W_{théorique} \right)^2} \quad (C.24)$$

Avec :

Y : isotopes 77, 78, 80 ou 82

$W_{théorique}$: masse atomique théorique de l'isotope Y de Se selon Laeter *et al.* (2003)

Le calcul de la concentration totale en sélénium utilisant toutes ces variables (RID, équation C.1), leurs incertitudes respectives doivent être prises en compte pour le calcul de l'incertitude de la concentration. Pour simplifier l'écriture, l'équation C.1 peut être exprimée selon:

$$C = A \times \frac{\rho}{\tau} \quad (C.25) \quad \text{avec} \quad A = \frac{C' \times w'}{w \times W_{at}} \quad (C.25a)$$

$$\rho = W_{at} \times \left(\frac{78}{77} \text{Se} \times {}^{77}\text{A}_{naturel} - {}^{78}\text{A}_{naturel} \right) \quad (C.25b)$$

$$\tau = \left({}^{78}\text{A}_{éch} - \frac{78}{77} \text{Se} \times {}^{77}\text{A}_{éch} \right) \quad (C.25c)$$

L'incertitude associée peut donc être exprimée selon:

$$\Delta C = A \times C \times \sqrt{\left(\frac{\Delta \rho}{\rho} \right)^2 + \left(\frac{\Delta \tau}{\tau} \right)^2} \quad (C.26)$$

Avec:

$$\Delta \rho = \sqrt{\left[\Delta W_{at} \times \left(\left(\frac{78}{77} \text{Se} \right) \times {}^{77}\text{A}_{naturel} \times {}^{78}\text{A}_{naturel} \right) \right]^2 + \left[W_{at} \times {}^{77}\text{A}_{naturel} \times \Delta \left(\frac{78}{77} \text{Se} \right) \right]^2}$$

$$\Delta \tau = \sqrt{\left[\Delta {}^{78}\text{A}_{éch} \right]^2 + \left[{}^{77}\text{A}_{éch} \times \Delta \left(\frac{78}{77} \text{Se} \right) \right]^2 + \left[\left(\frac{78}{77} \text{Se} \right) \times \Delta {}^{77}\text{A}_{éch} \right]^2}$$

Les incertitudes analytiques sur les concentrations de $Se_{naturel}$ et $Se_{traceur}$ (Eq. C.3 et C.4) sont finalement calculées à l'aide des équations C.27 et C.28:

$$\Delta[Se]_{naturel} = \frac{\sqrt{[C \times \Delta^{78}A_{éch}]^2 + [\Delta C \times ^{78}A_{éch}]^2}}{^{78}A_{naturel}} \quad (C.27)$$

$$\Delta[Se]_{traceur} = \frac{\sqrt{[C \times \Delta^{78}A_{éch}]^2 + [\Delta C \times ^{78}A_{éch}]^2 + [C \times \Delta^{77}A_{éch}]^2 + [\Delta C \times ^{77}A_{éch}]^2}}{\left(\frac{^{78}A_{traceur}}{^{77}A_{traceur}}\right) - \left(\frac{^{78}A_{naturel}}{^{77}A_{naturel}}\right)} \quad (C.28)$$

Avec :

$^{77,78}A_{éch}$: abondances des isotopes 77 et 78 dans l'échantillon (déterminées par l'équation C.17)

$\Delta^{77,78}A_{éch}$: incertitudes sur les abondances des isotopes 77 et 78 dans l'échantillon (déterminées selon l'équation C.24)

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

$C_{éch}$ et $\Delta C_{éch}$: concentration de Se total dans l'échantillon et son incertitude (calculées selon les équations C.1 et C.26 respectivement)

Les concentrations finales pour un échantillon (4 répliques d'incubation ou 3 répliques d'extraction) sont calculées comme la moyenne des concentrations de chaque réplique. L'incertitude totale finale est donc estimée en tenant compte des incertitudes analytiques (équations C.27 et C.28) de chaque réplique, la valeur moyenne des concentrations des répliques et son écart-type:

$$\Delta[Se]_{finale} = \sqrt{\left(\frac{s.d.moyenne}{\sqrt{n}}\right)^2 + \left([Se]_{moyenne} \times \sqrt{\sum_n \left(\frac{s.d._i}{[Se]_i}\right)^2}\right)^2} \quad (C.29)$$

avec:

n: nombre de répliques

$[Se]_i$ et $s.d._i$: concentrations et incertitudes analytiques associées calculées pour chaque réplique d'incubation et extraction

$[Se]_{moyenne}$ et $s.d.moyenne$: concentration moyenne et écart-type calculés pour les répliques d'analyse

Du fait de la non dangerosité des traceurs enrichis en isotope stable pour l'environnement et les hommes, une expérimentation directement sur le terrain a pu être mise en place pour étudier la réactivité de Se apporté par dopage à l'état de trace sous forme de sélénite ($^{77}\text{Se}(\text{IV})$) tout en la comparant à celle de Se naturellement présent en conditions climatiques et environnementales réelles sur une période de deux ans. En pratique ces essais in situ ont été menés sur trois parcelles de l'OPE. Une description rapide de la mise en place de l'essai in-situ est présentée ci-après.

1. MISE EN PLACE DES ESSAIS IN SITU

1.1 Echantillonnage et dopage des sols

Trois types d'occupation de sol présents sur le site OPE (culture, prairie et forêt) ont été étudiés afin de comparer les effets de l'occupation sur le comportement de Se.

Le prélèvement des sols a été réalisé à la pelle, en évitant l'horizon de surface pour les sols de prairie et forêt, soit entre environ 8 et 15 cm de profondeur. Le sol prélevé a été conditionné dans des sachets en polypropylène fermés. Ils ont été séchés sous hotte au laboratoire et tamisés à 2 mm.

Les sols tamisés ont été dopés avec $^{77}\text{Se}(\text{IV})$, préparé selon le protocole précédemment décrit (cf. C.I.1.2). Le traceur a été ajouté à des concentrations proches de celles de Se naturellement présent. Le dopage a été réalisé dans un flacon en polypropylène, préalablement nettoyé à l'acide nitrique (10%) et rincé trois fois à l'eau ultra-pure, le sol et la solution contenant le sélénite enrichi étant apportés dans un rapport solide/liquide de 1/1 (kg/L). Le mélange a été homogénéisé pendant 24 h par agitation mécanique par retournement puis séché sous hotte à température ambiante et broyé.

1.2 Elaboration des sachets sol-test

Les sachets sol-test (taille : 10 ×10 cm) ont été préparés l'aide d'un appareil de thermosoudage et de tissu en nylon de maille 25 µm (toile NYCOM PA 25, Buisine) en laissant un côté du sachet ouvert pour permettre le remplissage. Les sachets ont été remplis avec environ 11 g de sol dopé et le dernier côté fermé à l'aide d'un thermosoudeur ménager avant l'implantation des sachets.

1.3 Positionnement des sachets

16 sachets ont été enfouis pour chaque type de sol étudié: site expérimental forestier de «Montiers» station 2; culture et prairie.

Procédure pour les enfouissements. Dans le **site forestier**, pour chaque sachet, une petite fosse (environ 20×20 cm) a été creusée jusqu'à une profondeur de 15 cm en prenant soin de séparer les trois niveaux : humus, horizons 0-5cm et 5-15cm. Le sachet a été ensuite inséré dans une fente ouverte avec une spatule à 10 cm de profondeur du côté du sol non piétiné. La fosse est ensuite remblayée en restituant dans l'ordre les matériaux des niveaux creusés

En **prairie** la pose des sachets a été faite dans une bande de terrain parallèle à la zone de prélèvement du sol. Les sachets sont enfouis selon le même principe: la fosse est obtenue en retirant à la pelle une motte d'environ 20×20 cm sur une profondeur de 15 cm. Le sachet est inséré dans une fente ouverte à la spatule à 10 cm de profondeur. Pour refermer la fosse, la motte est découpée au couteau pour séparer et restituer dans l'ordre les 2 niveaux : végétation+horizon 0-5cm et, horizon 5-15cm.

En **culture**, la pose des sachets a été faite dans une bande de terrain parallèle à la zone de prélèvement du sol et perpendiculairement au passage des engins pour le travail au champ. Un trou a été creusé jusqu'à une profondeur d'environ 10 cm, le sachet placé au fond et le trou refermé.

Pour faciliter la récupération des sachets dans les trois sites, leur emplacement est repéré à l'aide d'une étiquette plastifiée reliée à un caillou positionné à proximité de la fente d'insertion du sachet. Des piquets ont été placés pour indiquer l'emplacement des 16 petites fosses. La zone occupée par l'installation a été également délimitée. Une séquence photos illustrant les différentes étapes est présentée dans les Figures C.4; C.5 et C.6 pour le site forêt, prairie et culture respectivement.



Figure C. 4. Photos illustrant l'enfouissement des saches sol-test dans le site forestier



Figure C. 5. Photos illustrant les étapes d'enfouissement des saches sol-test dans la prairie



Figure C. 6. Photos illustrant les étapes d'enfouissement des saches sol-test dans la culture

*Les résultats de l'expérimentation in situ font l'objet de l'article «**In situ study of selenium retention in soils using isotopically enriched stable selenite tracer**», préparé pour soumission dans le journal "Environmental Science and Technology" et présenté ci-après.*

Résumé

Une meilleure compréhension du devenir du sélénium (Se) dans les sols, à court et long terme est essentielle afin de consolider les modèles d'évaluation des risques associés à différentes problématiques environnementales, notamment la contamination ou les besoins de fertilisation des sols. Le but de cette étude était donc d'évaluer les processus impliqués dans la rétention de Se et leur cinétique en suivant l'évolution en fonction du temps de la distribution et de la spéciation de Se naturellement présent et fraîchement ajouté sous forme de sélénite-77 pendant deux ans d'expérience sur le terrain. Les résultats illustrent clairement la complexité de la réactivité du sélénium dans les fractions de sols définies par le biais d'extractions dites spécifiques (soluble, échangeable et organique). L'évolution dans le temps de la sorption de Se-77 peut être décrite par une combinaison de processus chimiques et de phénomènes de diffusion. Les données expérimentales et leur modélisation cinétique ont mis en évidence l'existence de processus lents impliqués dans la sorption de Se dans les sols, qui conduisent à une rétention plus forte suite à son transfert vers des phases porteuses moins labiles. Au bout de deux ans d'incubation le sélénium fraîchement ajouté n'a pas atteint un état d'équilibre en terme de distribution entre les fractions du sol et de spéciation; le traceur ⁷⁷Se restant toujours plus mobile que le sélénium naturellement présent. Par conséquent une sous-estimation de la rétention de Se est prévisible lors de la modélisation du comportement de Se sur des temps longs sans prise en compte des cinétiques de sorption limitantes.

In situ study of selenium retention in soils using isotopically enriched stable selenite tracer

Pamela Di Tullo ^{a, b}, Florence Pannier ^a, Yves Thiry ^b, Isabelle Le Hécho ^a and
Maïté Bueno ^a

^a Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement (LCABIE), Université de Pau et des Pays de l'Adour/CNRS, UMR 5254, IPREM, Hélioparc, 2 Avenue du Président Angot, 64053 Pau Cedex 9, France (E-mail addresses: pamela.ditulo@univ-pau.fr; florence.pannier@univ-pau.fr; maite.bueno@univ-pau.fr; isabelle.lehecho@univ-pau.fr)

^b Agence Nationale pour la gestion des Déchets Radioactifs (Andra), Parc de la Croix Blanche, 1/7 rue Jean Monnet, 92298 Châtenay-Malabry Cedex, France (E-mail adresse: yves.thiry@andra.fr)

ABSTRACT

A better understanding of selenium fate in soils, at both short and long time scales is mandatory to consolidate risk assessment models relevant for managing both contamination and soil fertilization issues. The purpose of this study was thus to investigate Se retention processes and their kinetics by monitoring time-dependent distribution/speciation changes of both ambient and freshly added Se, in the form of stable enriched selenite-77, over a 2-years field experiment. This study clearly illustrates the complex reactivity of selenium in soil in methodologically defined fractions (i.e soluble, exchangeable, organic). Time-dependent sorptive uptake of Se-77 could be described as a combination of chemical and diffusion controlled processes. Experimental data and their kinetic modeling evidenced that slow processes control the overall sorption of Se in soils leading to stronger retention by transfer towards less labile bearing phases. After 2-years of incubation, the fractional equilibrium of newly added Se within soil components has not been reached; Se-77 remaining more mobile than ambient Se. Modeling Se in the long-term without taking account slow sorption kinetics would result in underestimation of Se retention. K_d distribution coefficient, when used, should be at least reliant on ambient Se which is supposed to be at equilibrium.

1. INTRODUCTION

Selenium (Se) is a trace element of great ecological significance, due to its dual role as both essential micronutrient for living organisms (Rayman *et al.*, 2000) and environmental contaminant (Fernandez- Martinez *et al.*, 2009), owing to a narrow range between deficiency and toxic concentrations. Se repartition is heterogeneous across terrestrial landscape varying from concentrated hot spots ($> 1 \text{ mg kg}^{-1}$) to Se deficient soils ($0.1\text{-}0.2 \text{ mg kg}^{-1}$), sometimes occurring as close as 20 km from one to another (Combs *et al.*, 2001; Lenz and Lens 2009). In seleniferous areas (e.g Canada, China, Ireland, Mexico, North America) the irrigation of soils containing excessive Se concentrations may lead to Se accumulation at dangerous levels in sub-surface waters causing ecological damage and potential hazard to wildlife and human health (Presser 1994; Lemly, 2004). In other regions where Se is present in lower concentration in soils (e.g New Zeland, Scandinavia, the Keshan area in China) or not readily available for plant (e.g UK), soil fertilization with inorganic Se species could be a successful management strategy to increase the uptake and accumulation of Se in crop and forage (Euroola and Hietaniemi 2000; Lyons *et al.*, 2003; Premarathna *et al.*, 2010). The practise is, however, challenged by the unknown factors controlling mobility of added Se, i.e unknown fate of added Se, in the environment. For instance, previously applied Se retained in soil may become mobile again due to a change in agricultural practices or other environmental changes and may thus, represent a potential environmental and health risk.

Furthermore, selenium is of environmental concern because of its radioisotope ^{79}Se , a long life fission product of ^{235}U considered as one of the most worrisome radionuclides. Therefore, considering nuclear waste management it is needed to assess the radiological and the chemical consequences for the biosphere due to a hypothetical leakage from repositories to soil or a soil surface contamination by mean of irrigation using ^{79}Se contaminated groundwater (Andra, 2005). In that context, to prevent future health hazards both related to Se excess or deficiency in food chain and possible radiological contamination, a question has to be addressed: how can significant risks be accurately evaluated? Finding effective answers to this question hinges on a clear understanding of Se reactivity, referring to chemical transformations and interactions with soil components.

It is generally accepted that bioavailability of Se not only depends on its total content, but it is also closely related to its chemical speciation, which is governed by various physical and chemical factors (e.g pH, oxido-reduction status, mineralogical and organic matter composition) and by microbial activities (Seby *et al.*, 1998). Se occurs naturally in four

oxidation states: (-II); (0); (+IV); (+VI) partitioned into diverse organic and inorganic species with varying chemical reactivity. Selenate (Se(VI)) the most oxidized form of Se, is highly water soluble, bioavailable and highly mobile. Selenite (Se(IV)) generally tends to be sorbed to various solid surfaces such as Fe-Al oxides (Balistreri and Chao, 1987), clays (Bar-Yosef and Meek, 1987) and organic matter (Gustafsson and Johnsson, 1992), its mobility is thereby mainly controlled by sorption/desorption processes. Abiotic reduction of both species into insoluble Se(0) and/or metal-selenide (Se(-II)) precipitates can occur in local anoxic zones (e.g soil aggregates) (Fernandez- Martinez and Charlet, 2009). Moreover, microorganisms can generate elemental Se and organo-Se(-II) compounds by biotically mediated reduction (Stolz and Oremland, 1999). Such organo Se(-II) species, are produced by plants as well and are thus expected to be present in soil given that Se bio-incorporated by plant can be released into the soil via biomass (roots and leaves) turnover or via root exudates. In addition to Se bio-incorporated into organic molecules, organically bound Se may occur as ternary Se-metal-humic complexes and adsorbed onto oxides or clays fixed within the organic matrix (Bruggeman *et al.*, 2007; Coppin *et al.*, 2009). Overall, organically associated Se has been poorly characterized, even though it comprises a marked portion of the soil Se pool, increasing evidence of the strong interaction between selenium and soil organic matter (SOM) (Gustafsson and Johnsson, 1992; Coppin *et al.*, 2006; Darcheville *et al.*, 2008).

To date, selenium interaction with mineral and organic phases has been mainly studied in experiments performed on pure solid phases; even if it is often difficult to simply transfer information on the reactivity of pure phases to models of Se sorption on natural soils. This is generally because the main processes controlling Se reactivity with pure phases can be of minor relevance within natural systems due to the presence of phases that are not totally pure (e.g co-precipitation) or to the superimposition of the soil components.

Many studies rely on an equilibrium approach to predict Se retention and its subsequent migration. The Se species distribution within soil fractions determined by selective extractions and the solid/liquid distribution coefficient (K_d) have been reported for different soil types and were generally evaluated using short-term batch experiments after Se spiking (< 60h mainly and few < 2 months) often with the radioactive ^{75}Se tracer assuming that reaction has reached completion. (Tao *et al.*, 1996; Dong *et al.*, 1999; Dhillon and Dhillon 1999; Nakamaru *et al.*, 2005; Février *et al.*, 2007; Ashworth *et al.*, 2008). However, field soils are far from equilibrium and slow sorption may change the distribution between solid and solution over a period of time. Therefore, some authors suggested recently that trial data

generated from usual short-time spiking studies significantly overstates the element mobility and thus, for long-term risk assessment the modeling is more robust when performed with K_d values calculated for ambient elements (Sheppard *et al.*, 2011; Tolu *et al.*, 2014a; 2014b). Moreover, given that an insufficient sensitivity of detection requires application of higher than environmentally relevant concentration of Se in experimental procedures; most of the published studies on Se reactivity in soil have been carried out at high Se concentrations. In that case there is a potential bias when reporting data to natural system containing lower Se levels as both sorption reactions and biologically mediated redox reactions may be very different.

Therefore, sensitive, specific and precise analytical methods are needed to perform studies at ambient levels. An attractive approach to get reliable investigation of dynamic environmental processes consists in the use of enriched stable isotopes as tracers. The use of stable isotopic tracers in conjunction with ICP-MS detection hyphenated to chromatographic separation techniques shows several merits. Firstly, it enables accurate and precise determination of species concentrations by isotope dilution after spiking at concentrations close to naturally-occurring levels (Monperrus *et al.*, 2004). That method allows the simultaneous monitoring of both added tracer and the endogenous element by isotope ratio determination as well (Hintelmann *et al.*, 1990). In addition, as stable-isotope enriched tracers are not dangerous for ecosystems and human beings (no radioactivity), they can be used in field experiment.

However, the main drawback in employing Se stable isotopes for environmental investigation is induced by analytical constraints associated with precise determination of isotope ratios for Se at natural trace levels because Se isotopes detection by ICP-MS can be strongly interfered by elements (e.g Br; Fe; Ca and P) which are highly concentrated in environmental samples such as soils and sediments (Darrouzès *et al.*, 2005). In our previous work (Tolu *et al.*, 2014a), operating conditions of collision/reaction cell of the ICP-MS instrument and interference mathematical corrections were optimized ensuring the quality and reliability of Se isotopic ratio measurement at trace level (ng L^{-1}) in soil extracts. In the same work, the application of $^{77}\text{Se(IV)}$ to monitor simultaneously the fate of ambient and added Se in two soils incubated for three months in laboratory under ageing simulation confirmed the robustness of the optimized methodology.

The present study aimed (i) to examine the time-dependent changes in the partitioning and lability of added Se, mimicking fertilization practice or potential contamination; (ii) to discuss the kinetics of Se interaction with soil components including the importance of slow reactions

and (iii) to compare its dynamics to that of ambient Se and thereby acquire insight into the slow processes involved in Se retention with soil ageing and possible accumulation, migration to waters or transfer to vegetation. To achieve this goal we applied in field experiments the tracing method previously developed; three soil types (agricultural; forest and grassland) were spiked with isotopically enriched selenite ($^{77}\text{Se(IV)}$) and, time courses of respective K_d , distribution among soil fractions and speciation of ambient and freshly added Se in specific soil extracts were monitored over a two-years incubation period.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Set-up of isotopically labelled field experiments

Isotopically enriched selenite ($^{77}\text{Se(IV)}$) was prepared by conversion of elemental Se enriched in 77 isotope ($^{77}\text{Se(0)}$ from Isoflex, Moscow, Russia) by nitric acid reaction according to Van Dael *et al.* (2004); the product was further stored in the dark at 4°C. The standard solution was characterized in terms of isotopic composition and concentration by isotope dilution. Speciation analysis of the isotopically enriched Se standard was also performed to check complete conversion of elemental selenium into selenite. The results concerning the enriched solution are as follow: [^{77}Se]: $1015 \pm 3 \text{ mg kg}^{-1}$; [$^{77}\text{Se(IV)}$]: $1010 \pm 6 \text{ mg kg}^{-1}$; 98.3 % ^{77}Se and 1.7% ^{78}Se .

Three soil types (agricultural; forest and grassland) were collected (5-15 cm depth) at the monitoring sites managed by Andra and located in the region of Meuse/Haute-Marne (France). The soils were air-dried and passed through a 2 mm sieve. The soils were then, spiked with the isotopically enriched selenite ($^{77}\text{Se(IV)}$) at concentration close to natural levels ($\mu\text{g kg}^{-1}$) measured before spiking. The spiking was performed as follow: soils were mixed with $^{77}\text{Se(IV)}$ solution in polypropylene flasks with a solid:liquid ratio of 1:1 (kg:L). The mixture was rotary stirred during 24 h at room temperature for homogenization and air-dried to reach approximately 5% of water moisture. The soils were analyzed to characterize them before the beginning of the field experiment (noted as T0).

Bags (10 cm x 10 cm) prepared from a nylon tissue (25 μm stitch NYCOM PA, Buisine-France) were filled with approximately 10 g of spiked soils. The bags were buried on May 2012 in each soil type (agricultural; forest and grassland) next to the previous soil sampling site. The bags were collected at four different times of incubation (4 replicates/sampling time)

over a two years period, precisely bags were taken off three; six; twelve and twenty-two months after their burying (noted as T1; T2; T3 and T4 respectively). Bags filled with spiked soils and kept in the laboratory at ambient temperature were used as controls to verify that the time-dependent changes observed were effectively induced by environmental conditions.

2.2. Chemical analysis

2.2.1. Reagents and standards

All reagents used were of analytical grade. Stock standard solutions of 1000 mg (Se) L⁻¹ were prepared with ultra-pure water obtained from a Milli-Q System (18.2 Ωcm; Elix, Millipore) and stored in the dark at 4°C. Working standard solutions were prepared freshly prior to use by diluting the respective stock solutions in ultra-pure water. All reagents used for mobile phases (sodium citrate tribasic dihydrated, citric acid, methanol and ammonia) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Nitric and hydrofluoric acids (Ultrex, J.T. Baker, Deventer, The Netherlands); hydrogen peroxide 30% (Fisher Scientific) were used for mineralization procedure. Reagents used for soil extractions were purchased from Sigma-Aldrich: sodium hydroxide (>98%); ammonium dihydrogen phosphate (98%) and ammonium phosphate dibasic (>99.5%).

2.2.2. Instrumentation

An inductively coupled plasma spectrometer equipped with an octopole collision/reaction cell (Agilent 7500ce ICP-MS instrument by Agilent Technologies; Santa Clara, CA) was used as specific detector for elemental and speciation analysis of Se. High performance liquid chromatography (HPLC, Agilent Technology 1100 series) coupled to ICP-MS was used for selenium speciation analysis. The chromatographic separation was performed with a Hamilton PRP X- 100 anion exchange column (4.1 mm x 250 mm x 10 μm) equipped with a guard column containing the same stationary phase material. A mobile phase containing 5 mmol L⁻¹ ammonium citrate and 2 % of methanol at pH 5.2 adjusted with ammonia, was delivered at a flow rate of 1 ml min⁻¹. The sample injection volumes were of 100-200 μL depending on soil extracts. The experimental conditions for ICP-MS and chromatographic separation are given in Table 1.

Table 1. Experimental conditions for ICP –MS and chromatographic separations

ICP-MS	
<i>Sample introduction</i>	Concentric nebulizer Scott spray chamber (2°C)
<i>Plasma parameters</i>	
RF power	1500 W
Ar plasma gas flow rate	15 L min ⁻¹
Ar auxiliary gas flow rate	0.75-1.15 L min ⁻¹ optimized daily for best sensitivity
<i>Sample and skimmer cones</i>	Nickel
<i>Ions lens setting</i>	Optimized daily for best sensitivity
<i>Reaction/collision parameters</i>	
H ₂ gas flow	4 ml min ^{-1(b)}
He gas flow	1 ml min ^{-1 (b)}
Octopole bias	-18 V ^c
Quadrupole bias	-17 V ^c
Detector dead time	47 ns
<i>Data acquisition parameters</i>	
Monitored isotopes	74, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82 and 83
Acquisition time per point (total analysis)	1 s (3 s per isotopes) ^d
Integration time per point (speciation)	0.2 s ^e
Replicates (total analysis)	3
HPLC	
Column	Hamilton PRP X- 100 anion exchange column (4.1 mm x 250 mm x 10 µm)
Flow rate	1 ml min ⁻¹
Injection volume	100- 200 µl
Mobile phase	5 mmol L ⁻¹ ammonium citrate ; 2 % MeOH (pH 5.2)
Program	Isocratic

^a Using a solution of 1 µg L⁻¹ of gallium, yttrium, thallium and cerium

^b Based on from Tolu *et al.* 2014

^c Based on Darrouzès *et al.*, 2005

^d Based on Hinojosa- Reyes *et al.*, 2003

^e Calculated to give 22 measurement points per chromatographic peak providing an adequate peak profile for peak area integrations (Monperrus *et al.* 2004)

2.2.3. Sample preparation procedure: total digestion and soil chemical extractions

For total selenium determination by ICP-MS, complete digestion of the soil samples was performed as previously described (Tolu *et al.*, 2011). Briefly, approximately 0.25 g of sample was digested with 6 ml of HNO₃, 2 ml of H₂O₂ and 2 ml of HF by using a closed microwave oven (Ethos Touch Control, Milestone). Digested samples were diluted with ultra-pure water to a final volume of 50 ml, filtered at 0.45 µm (cellulose acetate; Millipore) and stored at 4°C before analysis.

A single-parallel extraction methodology was used to evaluate the association of both ambient and added Se with different soil fractions. That procedure, based on extraction protocol

previously developed for native Se present in soil at trace levels (Tolu *et al.*, 2011) allows getting three operationally defined Se soil fractions: i) soluble Se; ii) Se adsorbed onto mineral surface mainly by ligand- exchange mechanism; iii) Se bound to “labile” soil organic matter (SOM).

Briefly, three parallel single extractions with ultra-pure water, phosphate buffer solution ((NH₄)H₂PO₄/(NH₄)₂HPO₄) with pH 7 and, sodium hydroxide (0.1 mol L⁻¹) were carried out as follows: 0.9 g of soil sample were weighted in a 50 ml polypropylene centrifuge tube where 30 ml of extraction solution was added, the mixture was mechanically stirred for 24 h at 250 rpm and room temperature. Then the tubes were centrifuged at 15.000 g for 30 min at 4°C, the recovered supernatant was filtered at 0.45 µm and stored at 4°C for further analysis. According to Zhang and Frankenberger (2003) estimation of the different soil Se pools were obtained using the following relationships:

- Se_{soluble} = Se extracted by ultra-pure water;
- Se_{exchangeable} = Se extracted by phosphate buffer from which Se_{soluble} was subtracted;
- Se_{OM} = Se extracted by NaOH from which Se extracted by phosphate buffer was subtracted.

For each extraction, residual solid phase was mineralized in order to check the mass balance (extracted Se + residual Se = total soil Se). Samples were diluted as a function of their acidity or salt content, i.e tenfold dilution for digested soil and phosphate extracts, fivefold dilution for NaOH extracts and no dilution for water extracts.

2.2.4. Determination of total Se and Se species by reverse isotope dilution

Ambient and freshly added Se concentrations, for total and speciation analyses, were determined by reverse isotope dilution (RID), with natural abundance Se standard used as a spike and ⁷⁸Se/⁷⁷Se ratio selected as measured isotopes pair, by using the following equations (Eq. 1; 2 and 3) based on those developed by Hintelmann and Evans (1997)

$$C = \frac{C' \times w' \times W_{at} \times (R \times {}^{77}A_{natural} - {}^{78}A_{natural})}{w \times W_{at} \times ({}^{78}A_{sample} - R \times {}^{77}A_{sample})} \quad (1)$$

With:

C: Se concentration in the sample;

C': Se concentration of standard (natural abundance) spiked to the sample

w, w' : masses of sample and spike

W_{at}, W_{at}' : atomic masses of Se in the sample and in the spike

R : $^{78}\text{Se}/^{77}\text{Se}$ ratio measured after spiking

$^{77,78}A_{\text{sample}}$: abundance of 77 or 78 isotope in the sample before spiking

$^{77,78}A_{\text{natural}}$: abundance of 77 or 78 isotope in the natural standard used for the spike

$$[\text{Se}_{\text{ambient}}] = \frac{C \times ^{78}A_{\text{sample}}}{^{78}A_{\text{natural}}} \quad (2)$$

$$[\text{Se}_{\text{tracer}}] = \frac{C \times ^{78}A_{\text{sample}} - \left[\left(\frac{^{78}A_{\text{natural}}}{^{77}A_{\text{natural}}} \right) \times C \times ^{77}A_{\text{sample}} \right]}{\left(\frac{^{78}A_{\text{tracer}}}{^{77}A_{\text{tracer}}} \right) - \left(\frac{^{78}A_{\text{natural}}}{^{77}A_{\text{natural}}} \right)} \quad (3)$$

With:

$^{77,78}A_{\text{tracer}}$: abundance of isotope 77 or 78 in the tracer solution

The optimum spike to sample ratio was calculated for each sample to obtain minor error propagation during ID calculation (Weber *et al.*, 1960).

All isotopes intensities were mathematically corrected from interferences due to the formation of SeH^+ and BrH^+ following the determination of Se and Br hydridation factors (f_{Se} and f_{Br}) in Se and Br standard solutions measured each three samples (bracketing method) according to previously optimized method (Tolu *et al.*, 2014) ensuring accuracy and precision of Se isotope ratio measurements at trace levels in soil extracts.

Moreover, all the isotope ratios obtained were further corrected for mass bias using an exponential model after determination of the mass bias factor with natural abundance Se standards (Ruiz-Encinar *et al.*, 2001). Se concentrations were then expressed in micrograms per kilogram based on precise weights of soil material and reagent used for extraction or mineralization, taking into consideration the water moisture determined after drying a sub-sample at 105 °C in an air oven until constant mass. Uncertainties associated to ambient and added Se concentrations were defined by combining experimental uncertainties (4 replicates/sampling time) to analytical ones. These latter were calculated according to random error propagation method along the calculation steps (Tolu *et al.*, 2014).

2.3. Kinetic modeling and determination of solid/liquid distribution coefficient

Different kinetic models commonly used to describe sorption and desorption reactions on soils (Spark, 1989) were tested to fit experimental data acquired during *in situ* soil incubation experiments in order to compare the time-dependent distribution and transformations of added Se between soil types. The kinetic equations applied included ordered reaction (half- to third-order), power function, Elovich and parabolic diffusion. Linear regression analysis was used to establish kinetic parameters for all tested models using the "Linest" function of Excel. Corresponding standard error values (SE) and coefficient of correlation R^2 were obtained and, statistical significance was checked through F test at 95% confidence level.

Total soluble selenium fraction was used to calculate K_d solid/liquid distribution coefficient ($L\ kg^{-1}$) as ratio: $[\text{residual } Se_{\text{soluble}}]/[Se_{\text{soluble}}]$, where $[\text{residual } Se_{\text{soluble}}]$ is total Se concentration in the residual solid phase ($\mu g\ kg^{-1}$) after water extraction and, $[Se_{\text{soluble}}]$ is the total soluble Se concentration ($\mu g\ L^{-1}$).

3. RESULTS AND DISCUSSION

It is generally accepted that selective extraction procedures are operationally defined and corresponding Se pools are not extracted completely and exclusively. Nevertheless, selective extractions provide useful information on Se mobility and retention in soils. They were used as indicators of Se lability in soils in order to compare the differential reactivity of ambient and added Se in soils in term of distribution and speciation. Detailed quantitative data are given in tables 2 and 3.

Table 2. Concentrations ($\mu\text{g kg}^{-1}$) of ambient and added Se in total soil and extracts and corresponding proportions (expressed in % of soil total Se) for each incubation time and for the three soils.

Soil			Total Se in the digest and extract					% Se _{extracted} /Se _{total}				
			T0	T1	T2	T3	T4	T0	T1	T2	T3	T4
Agricultural	⁷⁷ Se	Total	278±26	232±20	214±10	208±14	179±12					
		Water-soluble	41.0±0.5	27±1	17±1	17±1	15±1.0	15±2	12±2	8±1	8±1	8±1
		Exchangeable	206±10	144±6	109±10	95±6	58±3	74±8	62±9	51±6	46±6	33±4
		OM associated	83±7	82±6	99±4	63±5	79±7	30±5	35±6	46±4	30±4	44±7
	Se _{ambient}	Total	342±27	335±24	323±11	348±19	330±21					
		Water-soluble	20.0±0.1	17±1	17.0±0.4	16.0±0.5	17±1	5.8±0.5	5.1±0.6	5.3±0.3	5.0±0.4	5.3±0.7
		Exchangeable	69±3	68±6	64±3	62±3	57±6	20±3	20±3	20±2	18±2	17±3
		OM associated	58±4	59±6	59±5	55±6	54±9	17±3	18±3	18±2	16±2	16±4
Forest	⁷⁷ Se	Total	297 ± 10	287±18	301±18	279±16	247±13					
		Water-soluble	17.0±0.5	7.9±0.9	8.0±0.5	7.3±0.9	6.5±0.4	5.7±0.4	2.8±0.5	2.7±0.3	2.6±0.5	2.7±0.3
		Exchangeable	90±7	82±3	82±5	81±2	63±4	30±2	29±5	27±3	29±5	25±3
		OM associated	206±22	183±9	182±6	164±7	139±11	69±10	64±7	60±6	59±6	56±7
	Se _{ambient}	Total	481±14	465±35	493±36	475±38	459±23					
		Water-soluble	16.0±0.5	12±2	12±1	11±1	10±1	3.3±0.2	2.6±0.6	2.4±0.3	2.3±0.4	2.3±0.4
		Exchangeable	75±4	75±4	70±4	71±2	72±3	16±1	16±2	14±2	15±2	16±1
		OM associated	226±17	214±4	229±2	215±8	217±13	47±5	46±4	46±4	45±5	47±5
Grassland	⁷⁷ Se	Total	305±22	260±6	270±11	275±9	250±6					
		Water-soluble	17.0±0.1	12±1.0	11.1±0.2	10.9±0.4	10.4±0.5	5.6±0.4	4.5±0.5	4.1±0.2	4.0±0.3	4.2±0.3
		Exchangeable	92±2	79±4	80±5	80±5	59±5	30±2	30±3	30±2	29±2	24±2
		OM associated	209±6	171±8	159±9	154±14	155±10	69±7	66±5	55±6	56±7	62±6
	Se _{ambient}	Total	370±27	364±8	347±11	342±5	341±8					
		Water-soluble	14.0±0.1	14±1	12.0±0.3	13.0±0.2	14.0±0.7	3.8±0.1	3.8±0.5	3.5±0.2	3.8±0.2	4.1±0.3
		Exchangeable	66±2	59±7	48±4	59±3	56±4	18±1	16±2	14±2	17±1	16±2
		OM associated	153±6	149±19	136±19	134±11	131±16	41±5	40±6	39±7	39±5	38±6

Table 3. Ambient and added Se(IV) concentrations ($\mu\text{g kg}^{-1}$) and corresponding proportions in soils extracts (expressed in % of soil total Se) for each incubation time and for the three soils.

Soil			Se (IV) concentration in extracts					% Se(IV) _{extracted} / Se _{extracted} (% SeIV /Se _{total})				
			T0	T1	T2	T3	T4	T0	T1	T2	T3	T4
Agricultural	⁷⁷ SeIV	<i>Water-soluble</i>	32±2	18±1	11.4±0.2	10.3±0.6	9.3±0.6	78±6 (12±2)	66±8 (8±1)	68±7 (5.3±0.4)	66±7 (4.9±0.6)	63±8 (5.2±0.7)
		<i>Exchangeable</i>	182±15	105±4	83±1	68±3	34±2	88±11 (66±11)	73±6 (45±6)	76±8 (39±3)	71±7 (33±4)	56±6 (19±2)
		<i>OM associated</i>	68±8	83±3	77±4	47±2	68±3	82±16 (25±5)	101±15 (35±6)	77±7 (35±4)	75±9 (22±3)	86±12(38±5)
	SeIV _{amb}	<i>Water-soluble</i>	4.2±0.6	4.0±0.2	3.2±0.2	4.2±0.8	4.3±0.4	21±3 (1.2±0.3)	24±3 (1.2±0.1)	23±2 (1.2±0.1)	25±3 (1.1±0.2)	25±4 (1.3±0.2)
		<i>Exchangeable</i>	27.8±0.3	27±1	25±2	27±1	25±2	40±3 (8.1±0.7)	40±5 (8.1±0.8)	39±5 (7.8±0.8)	44±3 (7.8±0.7)	43±7 (7.5±0.9)
		<i>OM associated</i>	18±2	18±2	17±4	17±1	16±2	31±5 (5.3±0.9)	31±7 (5.4±1)	30 ±7 (5.5±1.0)	31±6 (4.9±0.6)	30.8 (4.9±0.8)
Forest	⁷⁷ SeIV	<i>Water-soluble</i>	3.0± 0.1	0.12±0.03	nd	nd	nd	17±1 (1±0.1)	1.6±0.6 (0.04±0.01)	nd	nd	nd
		<i>Exchangeable</i>	85±2	58±2	61±4	53±2	40±2	94±9 (28±2)	70±5 (20±2)	74±9 (20±3)	65±5 (19±2)	64±8 (16±2)
		<i>OM associated</i>	189±5	122±6	98±2	86±4	62±6	92±12 (64±4)	67±6 (42±5)	54±3 (32±3)	52±5 (30±3)	45±7 (25±4)
	SeIV _{amb}	<i>Water-soluble</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
		<i>Exchangeable</i>	26.0±0.3	25±2	24±1	24±2	25±3	35±2 (5.4±0.2)	32±3 (5.2±0.6)	34±4 (4.9±0.6)	34±4 (5.1±0.8)	35±5 (5.4±0.9)
		<i>OM associated</i>	42±1	50±3	51±2	50±6	47±6	19±2 (9.4±0.5)	24±3 (11±1)	22±1 (10±1)	23±5 (10±2)	22±4 (10±2)
Grassland	⁷⁷ SeIV	<i>Water-soluble</i>	2.0±0.3	0.11±0.03	nd	nd	nd	12±2 (0.6±0.1)	0.9±0.4 (0.04±0.01)	nd	nd	nd
		<i>Exchangeable</i>	83±3	58±2	58±2	60±3	44±3	90±5 (27±3)	74±7 (22.5±1.4)	72±7 (21±2)	76±9 (22±2)	75±12 (18±2)
		<i>OM associated</i>	210±13	136±3	109±2	73±5	68±5	100±9 (69±9)	80±5 (52±2)	68±5 (40±3)	47±7 (26±3)	44±6 (27±3)
	SeIV _{amb}	<i>Water-soluble</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
		<i>Exchangeable</i>	14±2	12±0.4	13±1	13±2	13±2	21±4 (3.8±0.8)	20±3 (3.3±0.2)	21±4 (3.2±0.4)	22±4 (3.8±0.7)	23±5 (3.8±0.7)
		<i>OM associated</i>	43±9	42±3	39±5	42±9	40±7	28±7 (12±3)	28±6 (10±1)	30±9 (12±2)	31±9 (12±3)	31±9 (12±2)

3.1. Ambient Se distribution and speciation within soil fractions

Ambient $\text{Se}_{\text{soluble}}$ fraction showed a steady state throughout all incubation period accounting for an average value of $2.6 \pm 0.6 \%$; $3.8 \pm 0.4\%$ and $5.2 \pm 0.8\%$ for forest, grassland and agricultural soils respectively. The greater water extractability in agricultural soil might be partially caused by fertilization practice with fertilizers containing phosphate, as phosphate ions were shown to inhibit selenite sorption acting as competitor for the ligand-exchange reaction increasing Se mobility (Nakamura *et al.*, 2006; 2010). Moreover, higher pH value in agricultural soil compared to those of forest and grassland soils could be another reason of observed greater mobility (Neal *et al.*, 1987; Sposito *et al.*, 1989).

Similar to water-soluble fraction, the ambient $\text{Se}_{\text{exchangeable}}$ and Se_{OM} were constant along two years incubation period. The pool of exchangeable selenium is similar between the three soils types, with a mean value of $15 \pm 2\%$; $16 \pm 2\%$ and $19 \pm 3\%$ of total Se for forest, grassland and agricultural soils respectively.

In forest and grassland soils ambient Se_{OM} fraction stood out as the major Se fraction ($47 \pm 5\%$; $40 \pm 6\%$ respectively). On the contrary, in agricultural soil only $17 \pm 3\%$ of total ambient Se are associated to OM, and consequently the dominant pool is represented by refractory selenium ($60 \pm 12\%$) which was not mobilized by the above reagents. In addition to $\text{Se}(0)$ and precipitated metallic $\text{Se}(-\text{II})$, the refractory fraction could also include Se contained in more stable organo-mineral associations. The greater stability of organo-mineral associations in agricultural soils compared to forest ones has been previously reported (Christensen *et al.*, 2001; Tolu *et al.*, 2014b). The average proportions of ambient Se in operationally defined fractions is depicted in figure 1 for the three soil types.

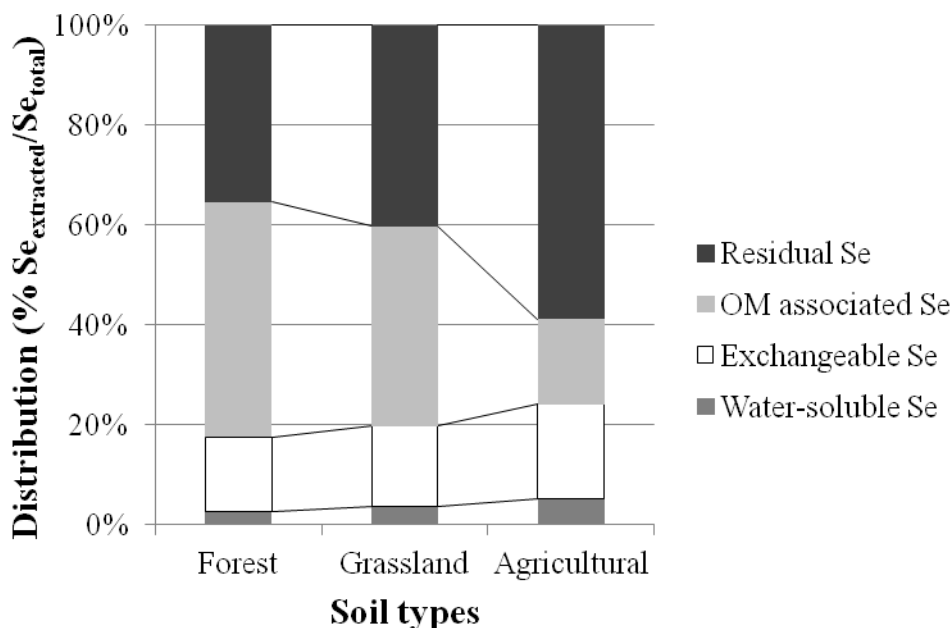


Figure 1. Distribution of ambient Se in soil fractions (%Se_{extracted}/Se_{total}) in forest, grassland and agricultural soils.

As observed for total Se content in soil extracts, the ambient Se speciation for the three soils was found to be stable throughout the incubation period. Selenite was the only Se chemical species detected in the three fractions under applied chromatographic conditions. Similarly to Se distribution within soil fractions, proportion of ambient Se(IV) differed among the soil types. In agricultural soil, proportion of Se(IV) presented average values of $1.2 \pm 0.1\%$, $7.9 \pm 0.2\%$ and $5.2 \pm 0.2\%$, of total ambient Se, respectively in soluble, exchangeable and OM fractions. In forest and grassland soils, no Se(IV) was detected in water extracts, whereas in exchangeable fraction, Se(IV) accounted for $5.2 \pm 0.3\%$ and $3.7 \pm 0.2\%$ for forest and grassland soils respectively. Se(IV) associated with OM fraction showed similar values for the two soils ($10.1 \pm 0.9\%$ and $11.7 \pm 0.4\%$ respectively). Selenite was thus detected in the three soils accounting for about 15% of total Se in soils. Between 27 and 49% of extracted Se remained thus undetected under the used separation conditions.

According to the different organic compositions of the soils induced by different land uses, these results indicate that both quality and quantity of the soil organic matter (SOM), including more or less stable organo-mineral associations seem to play a key role on Se distribution within soil components and thereby on Se migration to soil solution. For instance, SOM can greatly modify the surface reactivity of inorganic minerals by forming organo-

mineral aggregates (Kleber *et al.*, 2007) and interactions of Se with particulate organic matter (Coppin *et al.*, 2006) or humic substances (Gustafsson and Johnsson *et al.*, 1994) could occur.

3.2. Time- dependent changes in Se-77 distribution and speciation within soil fractions

3.2.1. Total soil Se-77 concentration

In the *in situ* experiments total Se-77 concentration in soil was expected to vary substantially along the incubation period. A significant and regular decrease of total selenium-77 was observed for the three soils. At the end of field trials, Se-77 loss in the system was higher in agricultural soil accounting for $36 \pm 9\%$ compared to forest and grassland soils for which tracer total concentrations resulted to be $17 \pm 2\%$ and $18 \pm 3\%$ less than T_0 values, respectively. To integrate this variability, the distribution of Se-77 is discussed with the results expressed as percent of total Se-77 determined at the same sampling time.

3.2.2. Soluble fraction

Results obtained with water extraction readily after the spiking/homogenization step (T_0) showed a relatively low soluble ^{77}Se fraction indicative of an apparent fast immobilization of added selenium. For forest soil (Fig 2a), $^{77}\text{Se}_{\text{soluble}}$ fraction decreased within the first three months of incubation from 5.7 ± 0.3 to $2.8 \pm 0.4\%$ reaching the steady state of ambient Se at T_1 . In grassland soil (Fig 2b), this fraction decreased more slowly reaching after six months of incubation only (T_2) a value close to ambient one (from 5.6 ± 0.2 to $4.1 \pm 0.2\%$) and remaining stable thereafter. In contrast, $^{77}\text{Se}_{\text{soluble}}$ fraction showed a very different pattern in agricultural soil (Fig 2c), clearly drawing down from 15 ± 1 to $8 \pm 1\%$ after 6 months and becoming steady during the rest of incubation period without reaching Se ambient state.

Results obtained from speciation analysis showed that from T_0 , there was a measurable modification of initial tracer speciation in soil soluble fraction, mostly in forest and grassland soils (Fig. 2). For instance, water soluble selenite-77 represents less than 1% of total ^{77}Se in these soils. Therefore, most of initially added $^{77}\text{Se(IV)}$ has already been converted into unidentified Se species and partially oxidized to selenate, accounting for $1.3 \pm 0.1\%$ and $0.7 \pm 0.1\%$ respectively. These modifications may have been promoted during air-drying stage after soils spiking. For both soils after 6 months of incubation, no more Se(IV) could be detected in water extracts. As already observed for total soluble Se, added selenite reaches the

same behavior as ambient selenite as well. $^{77}\text{Se(IV)}$ in the soluble fraction of agricultural soil has also been partially transformed into Se(VI) ($0.8 \pm 0.1\%$ of total Se-^{77}) and into unidentified species but to a lesser extent in comparison to forest and grassland soils. This loss of soluble Se(IV) could be explained by the formation of complexes between selenite and dissolved organic matter, possibility humic substances (Ferri and Sangiorgio 1996, Zhang *et al.*, 1999) assumed to be promote in more acidic soils, and/or reduction to soluble organo-selenide (i.e selenomethionine) (Abrams *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1994).

As shown in figure 2c, the proportion of water soluble $^{77}\text{Se(IV)}$ decreased regularly during the first year of incubation and no additional decrease was observed during the second year of incubation. For the five sampling times of entire incubation period, the ratio between proportions of water-soluble ^{77}Se and $^{77}\text{Se(IV)}$ was quite constant (1.50 ± 0.15) indicating that the decrease of Se-^{77} water leachability was not directly related to selenite transformation. At the end of the experiment water soluble $^{77}\text{Se(IV)}$ proportion in agricultural soil remained four times higher than ambient selenite one.

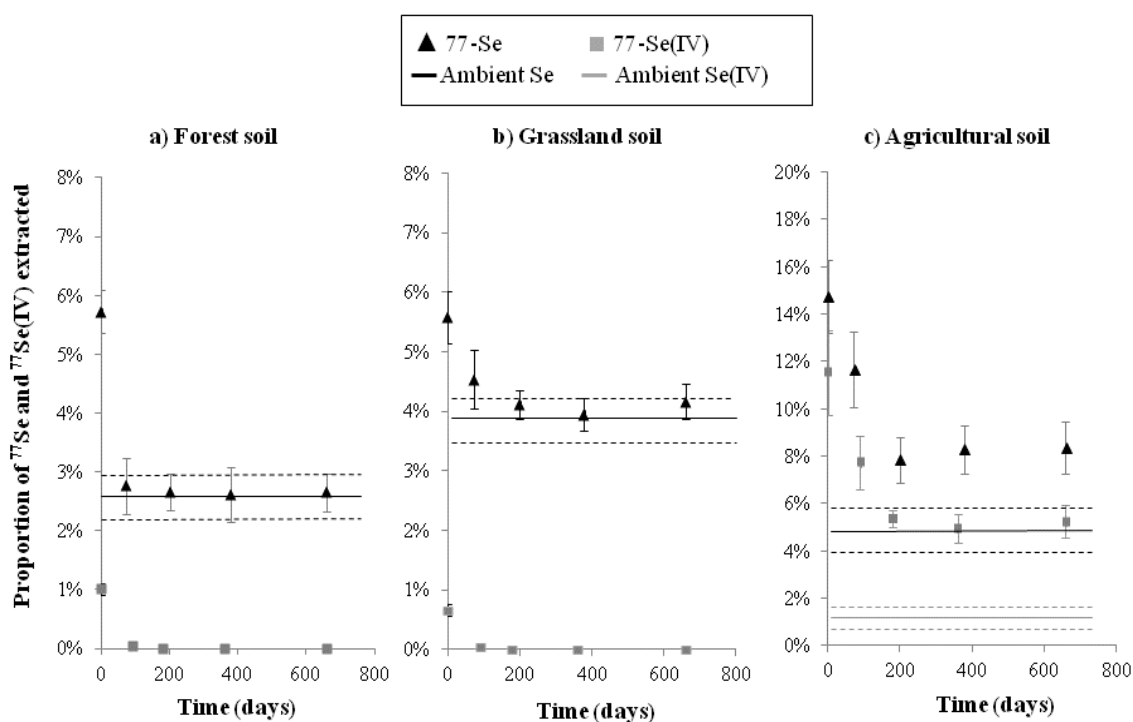


Figure 2. Time trend of added total Se (square symbols) and Se(IV) (triangle symbols). in water soluble fraction in: **a)** forest soil; **b)** grassland soil; **c)** agricultural soil. Two-years average of ambient total Se and Se(IV) are represented by a straight line, black and gray respectively.

3.2.3. Exchangeable fraction

In agricultural soil, along the incubation period the amount of Se-77 recovered in exchangeable fraction decreased exponentially from 74 ± 10 to $33 \pm 4\%$ as shown in figure 3c. Therefore, $^{77}\text{Se}_{\text{exchangeable}}$ proportion tends to equal ambient Se one ($19 \pm 3\%$), but still remained more than twice higher after two years in situ experiment. On the contrary, for forest and grassland soils, while proportion of $^{77}\text{Se}_{\text{soluble}}$ reached ambient $\text{Se}_{\text{soluble}}$ after 3 and 6 months of incubation respectively, the decrease of $^{77}\text{Se}_{\text{exchangeable}}$ was small and very slow (Fig. 3a; b). Precisely, $^{77}\text{Se}_{\text{exchangeable}}$ fraction was rather constant throughout the first year, and was shown to slightly decrease during the second year in grassland (from 30 ± 2 to $24 \pm 2\%$) and forest soils (from 29 ± 3 to $25 \pm 2\%$).

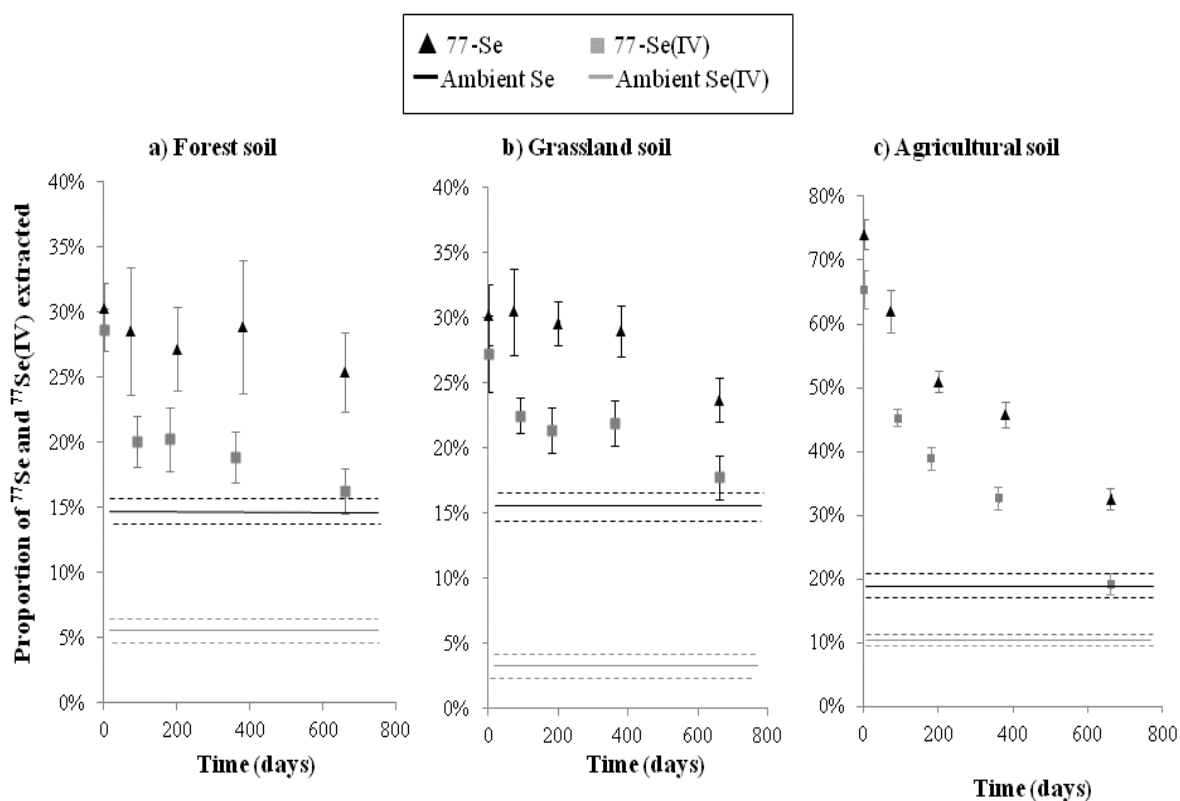


Figure 3. Time trend of added total Se (square symbols) and Se(IV) (triangle symbols) in exchangeable fraction in: **a)** forest soil; **b)** grassland soil; **c)** agricultural soil. Two years average of ambient total Se and Se(IV) are represented by a straight line, black and gray respectively.

With regard to speciation, the proportion of exchangeable $^{77}\text{Se(IV)}$ also declined regularly during the incubation period. At T0, selenite accounted for almost (88-93%) of total exchangeable ^{77}Se for the three soils. Along the first three months this proportion decreased to 70-74% and remained quite stable for the three soils until the end of incubation (Fig 3a, b, c) with little decrease appearing in forest and agricultural soils at last sampling time. Exchangeable selenite-77 decrease was then proportional to total selenium-77 one from T1 to T3 (ratio $^{77}\text{Se}_{\text{exchangeable}}/^{77}\text{Se(IV)}_{\text{exchangeable}}$ of 1.43 ± 0.09 , 1.35 ± 0.03 and 1.36 ± 0.05 for forest, grassland and agricultural soils respectively). While in forest and agricultural soils this ratio increased for the last sampling time T4 (1.56 ± 0.05 for forest soil, 1.70 ± 0.05 for agricultural soil), it remained stable in grassland soil.

After two years incubation period, total exchangeable ^{77}Se fraction was still superior to ambient Se one by a factor 1.5-1.7. Considering exchangeable selenite-77 fraction, this factor was much greater, ranging between 2 and 5, in comparison with natural selenite depending on soil type. These results clearly illustrate the time-dependent reactivity of added Se sorbed onto mineral surface. This time-dependency may include sites with different degrees of accessibility accounting for observed decrease of total exchangeable ^{77}Se due to stronger binding. This process did not lead to major transformations of selenite species, simultaneous changes in the speciation of exchangeable selenium being measured only after two years incubation in forest and agricultural soils.

3.2.4. *Se OM –associated fraction*

In forest and grassland soils $^{77}\text{Se}_{\text{OM}}$ fractions tend to slightly decrease along the two years incubation period (Figure 4a; b) suggesting a tendency of added Se to be transferred to more stable SOM pools therefore more resistant to NaOH extraction. At the end of the in situ experiment $^{77}\text{Se}_{\text{OM}}$ proportions were still higher than corresponding ambient Se_{OM} by 1.2-1.5 factors. It is interesting to note that the proportion of selenite-77 associated to OM fraction dropped more importantly than total $^{77}\text{Se}_{\text{OM}}$. Accounting for whole fraction at T0 it was halved at the end of the incubation in forest and grassland soils as the result of strong Se-77 chemical conversion into undetected compounds (Figure 4a;b). Nevertheless $^{77}\text{Se(IV)}$ associated to OM was still two to five times greater than ambient Se(IV) respectively in forest and grassland soils. Throughout the incubation, selenite ions, initially sorbed with OM surface sites, may have been reduced (biologically and/or chemically) to Se(-II) and subsequently

incorporated into humic substances (i.e fulvic and humic acids) that belongs to “labile” SOM pool, still removable by NaOH extraction. Therefore the decrease of total selenium soil extractable OM fraction is only partly associated to selenium speciation changes. Accordingly, the major observed changes in speciation did not lead to a stronger retention.

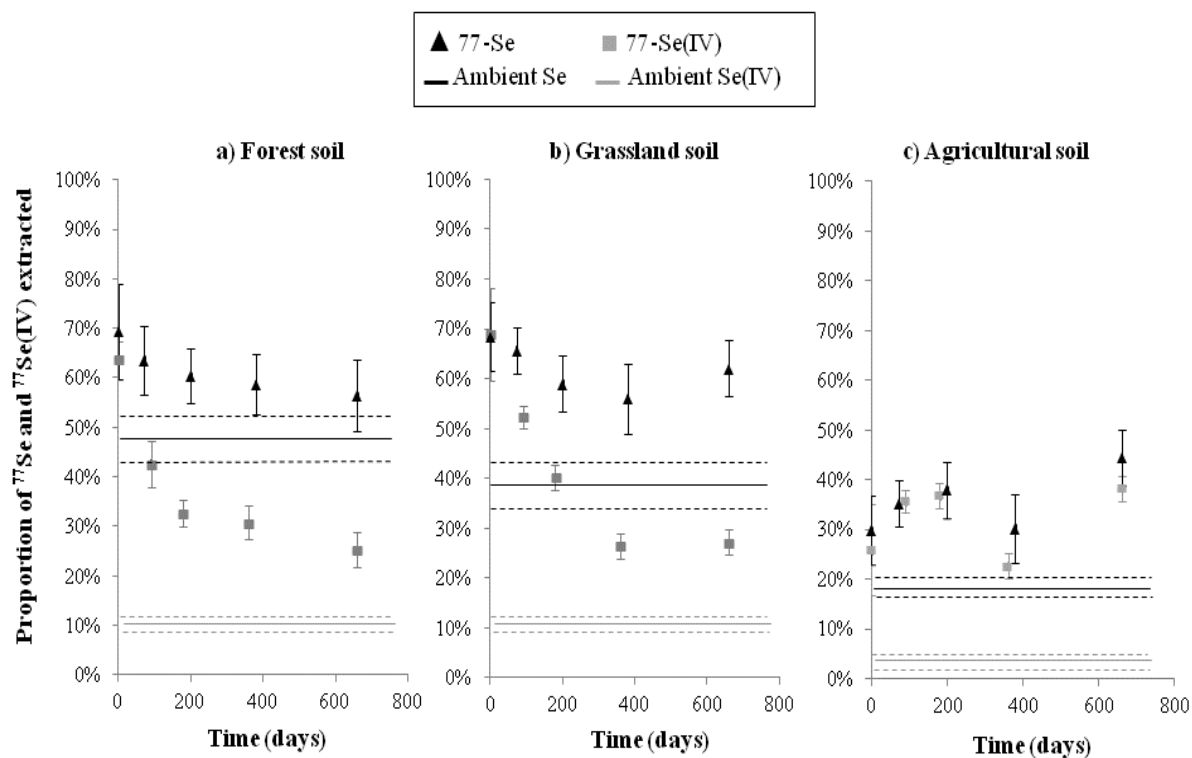


Figure 4. Time trend of added total Se (square symbols) and Se(IV) (triangle symbols) in OM fraction in: **a)** forest soil; **b)** grassland soil; **c)** agricultural soil. Two years average of ambient total Se and Se(IV) are represented by a straight line, black and gray respectively.

In the case of agricultural soil, as shown in figure 4c, no clear time-dependent trend could be observed during the 2 years incubation period, mean $^{77}\text{Se}_{\text{OM}}$ fraction representing $36 \pm 6\%$, i.e about twice ambient Se value. The mean ratio of $^{77}\text{Se}_{\text{OM}}/^{77}\text{Se(IV)}_{\text{OM}}$ was also quite stable during incubation, 1.2 ± 0.1 , and lower than the one calculated considering ambient selenium (2.9 ± 0.1). No measurable selenium speciation changes were thereby remarked in soil OM fraction.

Added selenium associated to OM fraction did not reach ambient selenium level during incubation period for the three soils both quantitatively and qualitatively. Unlike in the exchangeable Se fraction, selenium measurable speciation changes occurred particularly in forest and grassland soils.

3.3. Modeling ^{77}Se distribution and $^{77}\text{Se(IV)}$ transformations

Applied to ^{77}Se and $^{77}\text{Se(IV)}$ data in different soils fractions, ordered reactions and power function equations generally gave lower R^2 and F values indicative of poorer fits compared to Elovich and Parabolic diffusion expressions. The estimated coefficients and related statistical parameters of these latter models are thus reported in tables 4, for ^{77}Se and $^{77}\text{Se(IV)}$ respectively.

Considering soluble total ^{77}Se fraction, time-dependency was better described for the three soils using Elovich model as indicated by R^2 values and SE values. This equation has been successfully used to describe over a wide range of timescale second order kinetics chemisorptions on solid surfaces for inorganic (Juang *et al.*, 1997; Goh *et al.*, 2004; Sheha *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2009) and organic compounds (Wu *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2005) assuming that solid surfaces are energetically heterogeneous. Constant α of the simplified Elovich equation has been used in several works to estimate reaction rates, with α (d^{-1}) defined as the initial adsorption rate (Chien et Clayton, 1980; Goh *et al.*, 2004). Calculated initial rate constants α were similar for forest and agricultural soils (0.0083-0.0078) and, three times higher than that of grassland soil.

In the case of exchangeable total Se fraction, parabolic diffusion equation could describe the best the time-dependent trend of added Se for the three soils. Estimated overall diffusion parameter R_D for agricultural soil (0.021) was 3 times higher than those obtained for forest and grassland soils (0.0062-0.0067). The best fit for total ^{77}Se in OM-associated fraction was also obtained with the parabolic diffusion expression for forest and grassland soils giving similar R_D values (0.0073-0.0062). Concerning the agricultural soil, as no apparent trend brought out from experimental data, none tested equations was able to describe it.

Table 4. Kinetics parameters and correlation coefficients obtained from the linear regression analysis of experimental data (proportion extracted ^{77}Se and extracted $^{77}\text{Se(IV)}$ related to total ^{77}Se) with Parabolic diffusion and Elovich kinetic expressions

	Soil fraction	Soil	Models									
			Parabolic Diffusion: $\% \text{Se}_t = \% \text{Se}_{t=0}(1 - R_D \sqrt{t} + a)$					Elovich: $\% \text{Se}_t = \% \text{Se}_{t=0} - \beta^{-1}(\ln(\alpha\beta) + \ln(t))$				
			R ²	SE	F	R _D	a	R ²	SE	F	α	β
^{77}Se	Water	Forest						0.9121	0.4%	156	$8.27 \cdot 10^{-3}$	$1.93 \cdot 10^2$
		Grassland						0.8259	0.3%	66	$2.40 \cdot 10^{-3}$	$4.02 \cdot 10^2$
		Agricultural						0.8533	1.1%	81	$7.78 \cdot 10^{-3}$	$9.35 \cdot 10^1$
	Exchangeable	Forest	0.9836	0.3%	180	$6.21 \cdot 10^{-3}$	$-4.19 \cdot 10^{-3}$					
		Grassland	0.9541	0.5%	62	$6.73 \cdot 10^{-3}$	$5.32 \cdot 10^{-3}$					
		Agricultural	0.9754	2.4%	634	$2.14 \cdot 10^{-2}$	$7.00 \cdot 10^{-3}$					
	OM-associated	Forest	0.8883	1.4%	111	$6.16 \cdot 10^{-3}$	$8.78 \cdot 10^{-3}$					
		Grassland	0.8270	2.0%	57	$7.30 \cdot 10^{-3}$	$-8.20 \cdot 10^{-3}$					
		Agricultural										
$^{77}\text{Se(IV)}$	Water	Forest						0.9757	0.07%	362	$2.07 \cdot 10^{-3}$	$5.39 \cdot 10^2$
		Grassland						0.9774	0.05%	345	$1.50 \cdot 10^{-3}$	$7.25 \cdot 10^{-2}$
		Agricultural						0.9386	0.6%	244	$9.60 \cdot 10^{-3}$	$9.53 \cdot 10^1$
	Exchangeable	Forest	0.8042	1.8%	70	$1.40 \cdot 10^{-2}$	$-7.81 \cdot 10^{-2}$					
		Grassland	0.8242	1.3%	75	$1.14 \cdot 10^{-2}$	$-3.17 \cdot 10^{-2}$					
		Agricultural	0.9734	2.6%	586	$2.55 \cdot 10^{-2}$	$-3.80 \cdot 10^{-2}$					
	OM-associated	Forest						0.9773	2.0%	732	$4.86 \cdot 10^{-2}$	$1.70 \cdot 10^1$
		Grassland						0.8690	6.1%	106	$3.88 \cdot 10^{-2}$	$1.49 \cdot 10^1$
		Agricultural										

$^{77}\text{Se(IV)}$ kinetics data modeling was also attempted and statistical parameters showed that the application of Elovich model gave satisfactory fit to soluble selenite-77 time evolution in the three soils and organic selenite-77 in forest and grassland ones. For the agricultural soil, the rate constant α obtained for $^{77}\text{Se(IV)}$ data fit was similar to that calculated for total soluble ^{77}Se . The decrease of soluble selenium with ageing may thus be related to chemical sorption processes such as selenite adsorption by oxides and/or clay mineral phases as expected considering the well-known affinity of Se for Al/Fe oxides and clay minerals surfaces (Fernandez-Martinez *et al.*, 2009). For exchangeable selenite-77, transformations kinetics were described satisfactorily by parabolic-diffusion expression.

The predictive capability of the chosen models was tested by predicting data using determined kinetics parameters. Simulations shown in figure 5 and 6 for total ^{77}Se and $^{77}\text{Se(IV)}$ respectively, illustrate that calculated and experimentally measured data were almost superimposable.

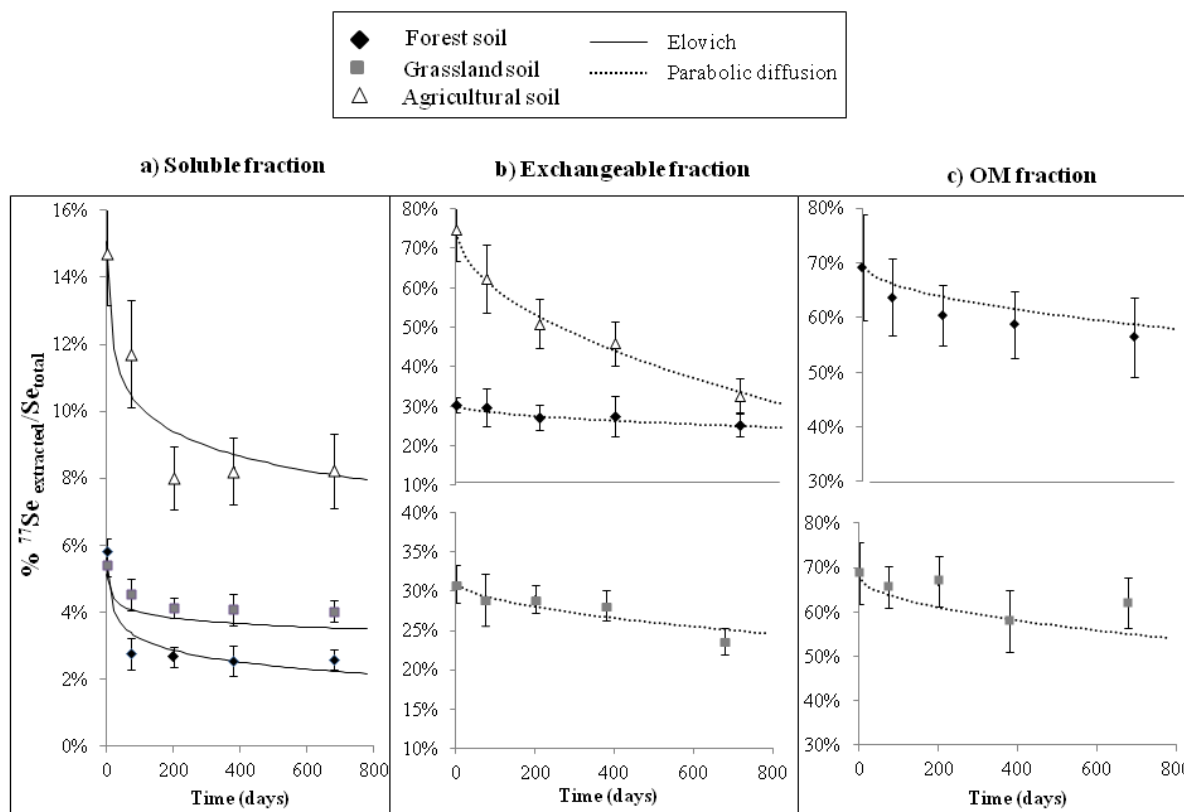


Figure 5. Comparison of experimental proportion of total extracted $^{77}\text{Se(IV)}$ with model predictions using best fitted models; diffusion model (---) and Elovich model (—) in (a) soluble fraction; (b) exchangeable fraction and (c) OM fraction.

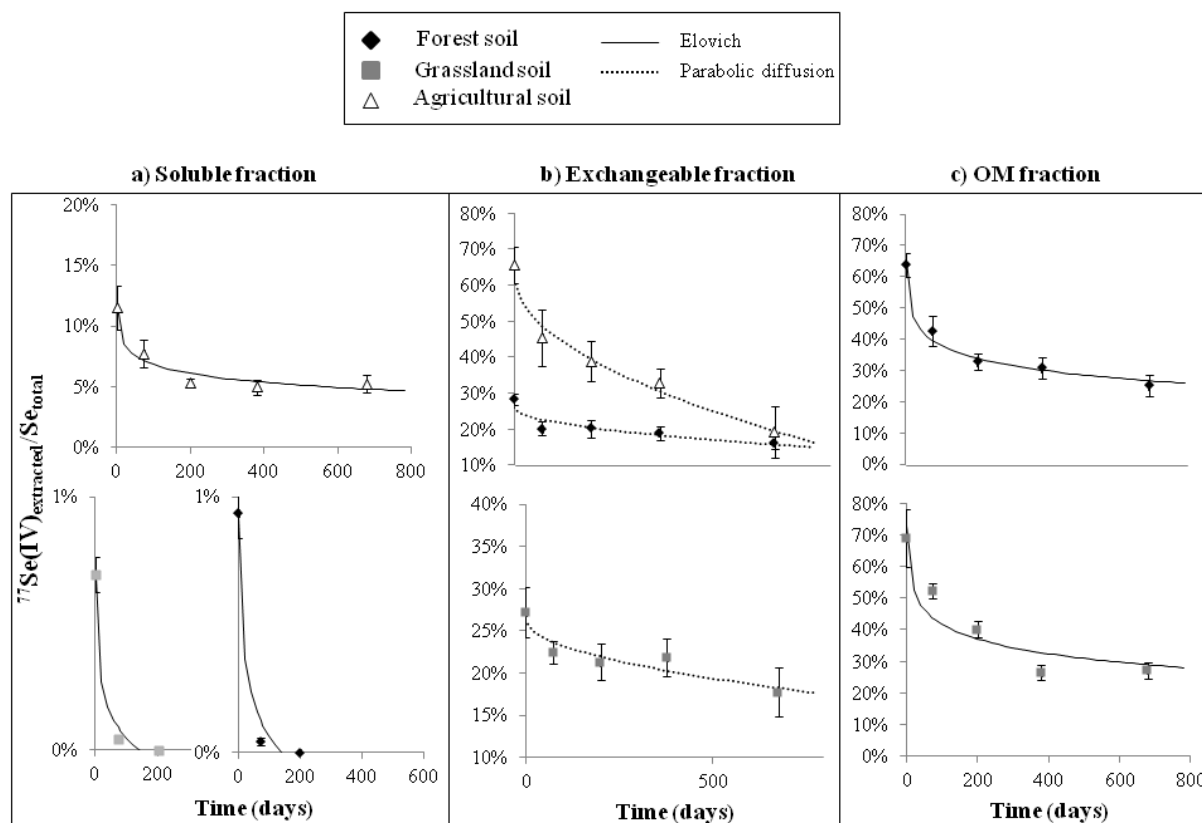


Figure 6. Comparison of experimental proportion of extracted $^{77}\text{Se(IV)}$ with model predictions using best fitted models; diffusion model (---) and Elovich model (—) in (a) soluble fraction; (b) exchangeable fraction and (c) OM fraction.

The parabolic diffusion model could account for Se redistribution in exchangeable and OM-associated fractions suggesting that slow diffusion of Se(IV) into porous mineral and organic particles (intra-particle diffusion) and/or between aggregates (inter-particle diffusion) might be a rate-limiting mechanism involved in Se fixation on soil components. This is in agreement with literature where the application of a diffusion model was shown to be a better choice when describing slow sorption phenomena on a time scale of several weeks up to even years (Pignatello *et al.*, 1993; Pedit et Miller, 1994; Kleineidam *et al.*, 2004).

Although conformity of experimental data to diffusion kinetic expression does not necessarily constitute a proof of single mechanism; diffusion limitations are very likely in heterogeneous systems like soils. For instance, with regard to exchangeable, apart from diffusion from external to internal sites less accessible, stronger binding may have also been expected due to chemical sorption of selenite by formation of inner sphere complexes non-exchangeable with phosphate (Zhang and Sparks, 1990; Darcheville *et al.*, 2008). The overall diffusion rate parameters R_D in the agricultural soil were very similar for total selenium and selenite

evolutions supporting the fact that exchangeable Se equilibrium may be mainly rate limited by processes of diffusive transfer to sorptive sites and inner sphere surface complexation of selenite. Concerning total Se associated to OM, intra- and/or inter-organic matter diffusion that appeared as the rate-limiting step could elucidate the observed progress of total Se in forest and grassland OM fraction but, we cannot exclude that this redistribution is not affected by changes in chemical speciation. Actually, significant chemically and/or biologically induced transformation(s) of selenite species occurred in OM fraction, such speciation changes may include complexation of Se(IV) with purely organic or organo-mineral components, reduction of Se(IV) to Se(-II) with further incorporation into organic matter (Gustafsson and Johnsson *et al.*, 1994; Stolz and Oremland 1999) or production of volatile Se species (Zhang and Frankenberger, 1999) and/or, to insoluble Se(0) (Roux *et al.*, 2001). That “pool” of Se is still not sufficiently characterized but represented at the end of *in situ* experiment more than half of total ^{77}Se in soil OM fraction. The rate of selenite chemical conversion is thus quite fast as indicated by overall rate parameter of $^{77}\text{Se(IV)}_{\text{OM}}$ which was 3.5-4 times higher than those obtained considering total $^{77}\text{Se}_{\text{OM}}$ (forest and grassland soils).

3.4. Implications of ageing studies for long-term assessment of Se fate

Results obtained during these two years of *in situ* incubation experiments clearly show that the processes involved in Se retention on soil components are complex and time-dependent.

Distribution and speciation of ambient and added Se are still very different after two years *in situ* incubation, evidencing that slow processes control Se ageing and fate in soils as confirmed by kinetics studies and lead to stronger retention of Se as a result of its redistribution within soil solid phases having different reactivity and stability.

Generally, T0 characterization of Se-77 distribution and speciation is indicative of interactions between added selenite and soil components occurring on a relatively short time scale (spiking/homogenization step \approx 1 week). At T0, Se-77 distribution within soil phases was already different between the three soils and similar to that of ambient Se in terms of predominant bearing phases. Along the two years incubation, the proportion of Se-77 associated to methodologically defined fractions tend to decrease, with corresponding increase of residual Se fraction. Such time-dependent transfer towards less labile bearing soil phases has been already observed for others metals (i.e Ni; Cu; Zn and Cd added to soils under field conditions (Han *et al.*, 2001). According to our results, that time-dependent redistribution could be described by a combination of chemical and diffusion processes.

Models commonly applied to fate, transport and risk assessment use a macroscopic parameter indicating the extent of Se sorption process, the solid to liquid distribution coefficient (K_d given in $L\ kg^{-1}$). K_d coefficients determined for ^{77}Se at T0 were $200 \pm 26\ L\ kg^{-1}$; $576 \pm 45\ L\ kg^{-1}$ and $678 \pm 61\ L\ kg^{-1}$ for agricultural, forest and grassland soils respectively, being significantly lower than K_d values calculated with ambient Se showing average two years values of: $797 \pm 70\ L\ kg^{-1}$; $1254 \pm 109\ L\ kg^{-1}$ and $1326 \pm 115\ L\ kg^{-1}$ for agricultural, forest and grassland soils respectively.

K_d values calculated at T0 fit well with the extensive K_d compilation (from 4 to 2,130 $L\ kg^{-1}$ with a geometric mean value of $200 \pm 3\ L\ kg^{-1}$) for soils classified on the basis of texture (sand and clay percentage of the mineral matter) and organic matter content (IAEA 1994; Gil-Garcia *et al.*, 2009). Evolution of ^{77}Se K_d coefficients *versus* time is presented in figure 6 for the three soils.

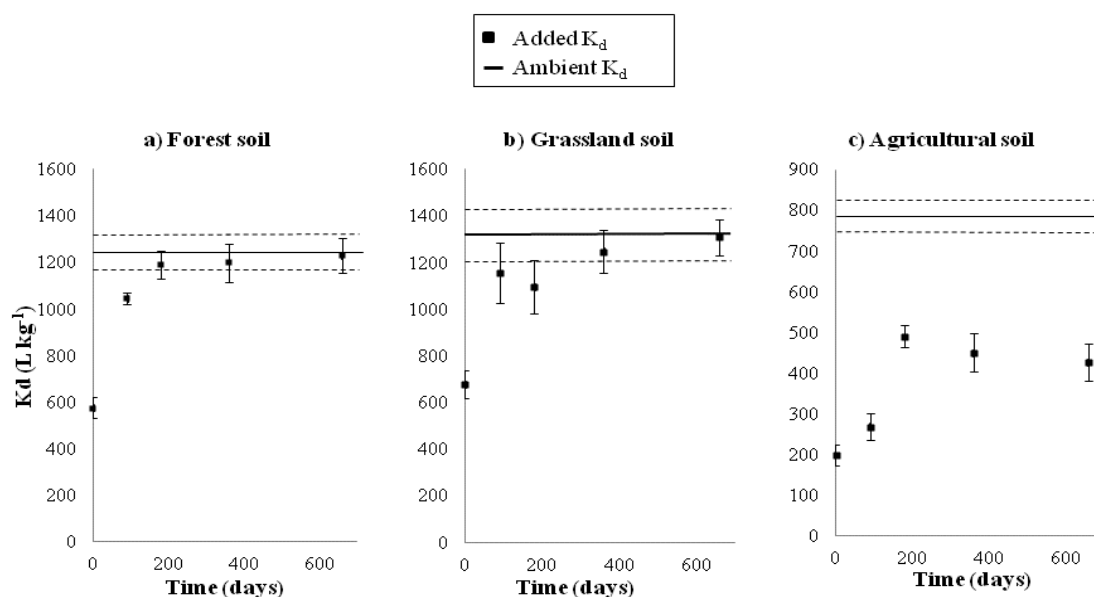


Figure 7. Time course of K_d values over two-years in field experiment in **a)** agricultural **b)** forest soil and **c)** grassland soil. Straight line indicates the average K_d values of ambient Se.

For forest and grassland soils, K_d values seem to have reached equilibrium and values close to those calculated from ambient Se after 6 and 12 months respectively. A different behavior was observed in the case of agricultural soil, although ^{77}Se K_d increased during the first year of incubation, added and ambient Se K_d values remained different by a factor two after 2 years incubation.

Most of the previous works determining K_d values involved batch experiments, with relatively short contact times (from 1 hour to 1 month) in which spiked selenium is reacted with a soil and its transfer between the solid and solution phases monitored. Of necessity, these works assumed that equilibrium has been achieved. On the contrary, our study showed that Se sorption in soil is still evolving for longer periods of time. Precisely, while $^{77}\text{Se}_{\text{soluble}}$ proportion and corresponding K_d values have reached an apparent equilibrium at the latest after one year, (i.e values close to ambient Se ones in forest and grassland soils) the distribution and speciation of ^{77}Se between exchangeable and OM soils components have not. An estimation of times needed for ^{77}Se to reach the same behavior of ambient Se (considered to be at equilibrium) was attempted using kinetics parameters previously obtained. The calculated values (Table 5) account for 0.8-20 years considering total Se distribution and between 0.4-60 years considering selenite proportion as function of considered fraction and soil types. This clearly indicate that although Se retention is often regarded as an instantaneous process for modeling purpose based on the solid-solution distribution coefficient (K_d), it may in fact require much longer time to reach equilibrium.

Table 5. Estimated time required for ^{77}Se to reach ambient Se and Se(IV)distribution

	Forest soil	Grassland soil	Agricultural soil
Time to reach ambient Se distribution(year)			
Soluble Se	0.8	0.8	9.5
Exchangeable Se	19.7	7.8	3.3
Organic Se	8.4	8.5	n.d.
Time to reach ambient Se(IV) distribution(year)			
Soluble Se(IV)	0.4	0.4	59.8
Exchangeable Se(IV)	7.7	14.6	3.0
Organic Se(IV)	31.5	24.3	n.d.

Diverse environmental factors can lead to a remobilization of Se retained in soil by association with soil solid components. It is thus, important to well characterize added Se partitioning within soil solid phases and to monitor its evolution with time in order to better assess its potential remobilization. Therefore, ignoring slow kinetics and using erroneous K_d determined by short-time equilibrium experiment can lead to underestimate the extent of Se sorption and hence overestimate risk associated with its dispersion into the biosphere. As previously proposed for Se and other elements (Tolu *et al.*, 2014; Sheppard, 2011) K_d determined from desorption of ambient Se appears as a better indicator of the potential selenium persistence in the soils (i.e residence time, mobility, retention by solid phases).

REFERENCES

- Abrams M M., Burau R G., et Zasoski R J. Organic selenium distribution in selected California soils. *Soil Science Society of America Journal* **1990**, 54: 979-982
- ANDRA. Dossier HAVL-Argile. Référentiel du comportement des radionucléides et des toxiques chimiques d'un stockage dans le callavo-oxfordien jusqu'à l'homme, site de Meuse/Haute-Marne. Tome 2/2. C.RP.ASTR.04.0032.A. **2005**
- Ashworth D J., Moore J., Shaw G. Effects of soil type, moisture content, redox potential and methyl bromide fumigation on K_d values of radio-selenium in soil. *Journal of Environmental Radioactivity*. **2008**, 97: 189-205
- Balistreri L S., Chao T T. Adsorption of selenium by amorphous iron oxyhydroxide and manganese dioxide *Geochimica et Cosmochimica Acta* **1990**, 547: 39-751
- Bar-Yosef B. Meek D. Selenium adsorption by kaolinite and montmorillonite. *Soil Science* **1987**, 144: 11-19.
- Bruggerman C., Maes A., Vancluysen J. The interaction of dissolved Boom Clay and Gorleben humic substances with selenium oxyanions (selenite and selenate). *Applied Geochemistry* **2007**, 22: 1371-1379
- Chien S H., Clayton W R., Application of Elovich equation to the kinetics of phosphate release and sorption in soils. *Soil Science Society of American Journal* **1980**, 44: 265-268
- Christensen B T. Physical fractionation of soil and structural and functional complexity in organic matter turnover. *European Journal of Soil Science* **2001**, 52:345-353
- Combs G F. Selenium in global food systems. *British Journal of Nutrition* **2001**, 85: 517-547
- Coppin F., Chabroullet C., Martin-Garin A., Balesdent J., Gaudet J P. Methodological approach to assess the effect of soil ageing on selenium behavior: first results concerning mobility and solid fractionation of selenium. *Biology and Fertility of Soils* **2006**, 42: 379-386
- Coppin F., Chabroullet C., Martin-Garin A. Selenite interactions with some particulate organic and mineral fractions isolated from a natural grassland soil. *European Journal of Soil Science* **2009**, 60: 369-376
- Darrouzès J., Bueno M., Lespès G., Potin-Gautier M. Operational optimisation of ICP-octopole collision/reaction cell- MS for applications to ultratrace selenium total and speciation determination. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2005**, 20: 88-94
- Dong W., Wang X., Du J., Wang D C., Tao Z. Sorption and desorption of radioselenium on red earth and its solid components. *Journal of Radiological Nuclear Chemistry*. **1999**, 240: 715-719

Dhillon K S., Dhillon S K. Adsorption-desorption reactions of selenium in some soils of India. *Geoderma* **1999**, 93: 19-31

Darcheville O., Février L., Haichar F Z., Berge O., Martin-Garin A., Renault P. Aqueous, solid and gaseous partitioning of selenium in an oxic sandy soil under different microbiological states. *Journal of Environmental Radioactivity* **2008**, 99: 981-992

Eurola M., Hietaniemi V. Report of the Selenium Monitoring Program 1997-1999. Publications of Agricultural Research centre of Finland. Series B24. Jokoinen, Finland: Agricultural Research Centre of Finland (**2000**)

Ferri T., Sangiorgio P. Selenium speciation in waters: role of dissolved polysaccharides on the mobilization process. *Annali di Chimica* **2001**, 91: 229-38

Février L., Martin- Garin A., Leclerc E. Variation of the distribution coefficient (K_d) of selenium in soils under various microbial states. *Journal of Environmental Radioactivity* **2007**, 97: 189-205

Fernandez- Martinez A., Charlet L. Selenium environmental cycling and bioavailability: A structural chemist point of view. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. **2009**, 8: 81-110

Gil-Garcia C., Tagami K., Uchida S., Rigol A., Vidal M. New best estimates for radionuclide solid-liquid distribution coefficients in soils. Part 3: Miscellany of radionuclides (Cd, Co, Ni, Zn, I, Se, Sb, Pu, Am and others). *Journal of Environmental Radioactivity* **2009**, 100 : 704-715

Goh K H., Lim T T. Geochemistry of inorganic arsenic and selenium in a tropical soil: effect of reaction time, pH competitive anions on arsenic and selenium adsorption. *Chemosphere* **2004**, 55: 849-859

Gustafsson J P., Johnsson L. The association between Selenium and Humic substances in forested ecosystems- Laboratory evidence *Applied organometallic chemistry* **1994**, 8: 141-147

Han F X., Banin A. Long term transformation and redistribution of potentially toxic heavy metals in arid zone soil: I. Under saturated conditions. *Water, Air Soil Pollution* **1997**, 95 (1-4): 399-423

Han F X., Banin A., Triplett G B. Redistribution of heavy metals in arid-zone soils under a wetting-drying soil moisture regime. *Soil Science* **2001**, 166: 18-28.

Hinojosa Reyes L., Marchante-Gayón J M, García Alonso J I., Sanz- Medel A. Determination of selenium in biological materials by isotope dilution analysis with an octopole reaction system ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2003**, 18: 11-16

Hintelmann E., Evans R D. Application of stable isotopes in environmental tracer studies- Measurement of monomethylmercury (CH_3Hg^+) by isotope dilution ICP-MS and detection of species transformation. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1997**, 358: 378-385

Hintelmann H., Harris R. Application of multiple stable mercury isotopes to determine the adsorption and desorption dynamics of Hg(II) and MeHg to sediments. *Marine Chemistry* **2004**, *90*: 165-173.

IAEA. Handbook of parameter values for the prediction of radionuclides transfer in terrestrial and freshwaters environments-technical report series no. 472. **2010** IAEA, Vienna

Jardine P M., Sparks D L. Potassium-calcium exchange in a multireactive soil system. 1 Kinetics. *Soil Science Society of American Journal* **1984**, *48*: 39-45

Juang R S., Chen M L. Application of the Elovich equation to the kinetics of metal sorption with solvent-impregnated resins. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **1997**, *36*: 813-820

Kleber M., Sollins P., Sutton R. A conceptual model of organo-mineral interactions in soils: self-assembly of organic molecular fragments into zone structures on mineral surfaces. *Biogeochemistry* **2007**, *85*: 9-24

Kleineidam S., Rügner J., Grathwohl P. Desorption kinetics of phenanthrene in aquifer material lacks hysteresis. *Environmental Science and Technology* **2004**, *38*: 4169-4175

Lemly A D. Aquatic selenium pollution is a global environmental safety issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2004**, *59*: 44-56

Lenz M., Lens P N L. The essential toxin: the changing perception of selenium in environmental sciences. *Science of Total Environment*. **2009**, *407*: 3620-3633

Lyons G H., Stangoulis J C R., Graham R D. High-selenium wheat: biofortification for better health. *Nutrition Research Reviews* **2003**, *16*: 45-46

Monperrus M., Krupp E., Amouroux D., Donard O F X., Rodriguez Martin-Doimeadios R C. Potential and limits of speciated isotope-dilution analysis for metrology and assessing environmental reactivity. *Trends in Analytical Chemistry* **2004**, *23*: 261-272

Nakamaru Y., Tagami K., Uchiga S. Distribution coefficient of selenium in Japanese agricultural soils. *Chemosphere* **2005**, *58*: 1347-1354

Nakamaru Y., Tagami K., Uchida S. Effect of phosphate addition on the sorption-desorption reaction of selenium in Japanese agricultural soils. *Chemosphere* **2006**, *63*: 109-115

Nakamaru Y., Sekine K. Sorption of selenium and antimony in soils as a function of phosphate ion concentration *Soil Science and Plant Nutrition* **2008**, *54*: 332-341

Neal R H., Sposito G. Selenate adsorption on alluvial soils. *Soil Science Society of America Journal* **1989**, *53*(1): 70-74

Pedit J A., Miller C T. Heterogeneous sorption processes in subsurface systems: 1. Model formulations and applications. *Environmental Science and Technology* **1994**, *28*: 2094-2104

Pignatello J J., Ferrandino F L., Huang L Q. Elution of aged and freshly added herbicides from a soil. *Environmental Science and Technology* **1993**, 27: 1663-1671

Premarathna H L., McLaughlin M J., Kirby J K., Hettiarachchi G M., Beak D., Stacey S. Potential availability of fertilizer selenium in field capacity and submerged soils. *Soil Science Society American Journal*. **2010**, 74: 1589-96

Presser T S. The Kesterson effect. *Environmental Management* **1994**, 18: 437-454

Rayman M P. Selenium and human health *Lancet* **2012**, 379: 1256-1268

Roux M., Sarret G., Pignot-Paintrand I., Fontecave M. Mobilization of selenite by *Ralstonia metallidurans* CH34. *Applied Environmental Microbiology* **2001**, 67: 769- 773

Ruiz-Encinar J., García Alonso J I., Sanz-Medel A., Main S P J. A comparison between quadrupole, double focusing and multicollector ICP-MS instruments. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2001**, 16: 315-321

Séby F., Potin-Gautier M., Giffaut E., Donard O F X. Assessing the speciation on the biogeochemical processes affecting the mobility of selenium from a geological repository of radioactive wastes to the biosphere. *Analisis*, **1998**, 26: 193-198

Sheha R R., El- Zahhar A A. Synthesis of some ferromagnetic composite resins and their metal removal characteristics in aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials* **2008**, 150: 795-803

Sheppard S C., Grant C A., Drury C F. Trace elements in Ontario soils—mobility, concentration profiles, and evidence of non-pointsource pollution. *Canadian Journal of Soil Science* **2009**, 89:489–499

Sparks D.L. (1989) Kinetics of soil chemical processes. San Diego, CA, Academic Press, Inc

Sposito G. (1989) The chemistry of soils. *Oxford University, New York* (USA)

Stolz J F., Oremland R S. Bacterial respiration of arsenic and selenium. *FEMS Microbiology Reviews* **1999**, 23: 615-627

Tao Z., Du J., Dong W., Zheng L. Sorption and desorption of radioselenium on calcareous soil and its soil components. *Journal of Radiological Nuclear Chemistry*. **1996**, 214: 245-254

Tolu J., Le Hécho I., Bueno M., Thiry Y., Gautier M.P. Selenium speciation at trace levels in soil *Analytica Chimica Acta* **2011**, 684: 126-133

Tolu J., Thiry Y., Bueno M., Jolivet C., Potin-Gautier M., Le Hécho I. Distribution and speciation of ambient selenium in contrasted soils from mineral to organic rich *Science of Total Environment* **2014**, 93-101: 479-480

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

Van Dael P., Lewis J., Barclay D. Stable isotope-enriched Selenite and selenate tracers for human metabolic studies: a fast and accurate method for their preparation from elemental selenium and their identification and quantification using hydride generation atomic adsorption spectrometry. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2004**, 18: 75-80

Wang D., Alfthan G., Aro A. The impact of selenium fertilization on the distribution of selenium in rivers in Finland. *Agriculture Ecosystem and Environment* **1994a**, 50:133–149

Wu F-C., Tseng R L., Juang R S. Characteristics of Elovich equation used for the analysis of adsorption kinetics in dye-chitosan systems. *Chemical Engineering Journal* **2009**, 150: 366-373

Zhang P., Sparks D L. Kinetics of selenate and selenite adsorption/desorption at the goethite/water interface. *Environmental Science and Technology* **1990**, 24: 1848-1858

Zhang Y., Frankenberger W T. Determination of selenium fractionation and speciation in wetland sediments by parallel extraction. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **2003**, 83: 315–326

Zhang Y., Moore J., Frankenberger W T. Speciation of soluble selenium in agricultural grainage waters and aqueous soil-sediment extracts using hydride generation atomic adsorption spectrometry. *Environmental Science and Technology* **1999**, 33: 1652-1656

Conclusion

La méthodologie analytique basée sur l'utilisation d'un traceur isotopique stable a permis l'étude des processus impliqués dans la réactivité, à court et long termes, de Se présent dans les sols à l'état de trace. En effet, cette approche rend possible le suivi simultané des cinétiques de redistribution de Se naturellement présent et fraîchement ajouté sous forme de sélénite ($^{77}\text{SeIV}$).

Les résultats obtenus au cours des deux années d'incubation sur le terrain indiquent que les processus impliqués dans la rétention de Se par les composants du sol sont complexes et dépendant du temps. Le comportement du traceur de Se tend vers celui de Se naturellement présent malgré des différences importantes (distribution dans la phase solide, spéciation) après deux ans d'incubation.

Cette étude a mis en évidence l'existence de mécanismes lents qui conduisent à une rétention de Se mettant en jeu des liaisons plus stables avec les phases porteuses du sol. Les données expérimentales ont pu être décrites par les expressions cinétiques d'Elovitch et de diffusion. Les paramètres cinétiques obtenus ont permis d'estimer les temps nécessaires pour que le traceur atteigne la distribution de Se naturellement présent dans le sol. Les valeurs calculées, étant assez élevées (plusieurs années) indiquent que ces cinétiques ne peuvent être ignorées et que l'utilisation de valeurs de coefficients de partage (K_d) déterminés après dopage et avec des temps de contacts courts (généralement inférieurs à 48h) peut mener à une sous-estimation du degré d'immobilisation de Se dans les sols et donc une surestimation de sa dispersion potentielle dans la biosphère.

L'étude de la bioincorporation de Se inorganique au sein de la biomasse végétale en fonction de l'espèce chimique source a été menée à l'aide de cultures hydroponiques d'une plante modèle (ray-grass) en milieux enrichis en sélénite et/ou séléniate isotopiquement marqués ($^{77}\text{SeIV}$ et $^{82}\text{SeVI}$). La méthodologie du double traçage isotopique permet de suivre la réactivité (translocation et spéciation) respective de ces deux espèces. Une description rapide des conditions de culture est présentée ci-après.

1. CULTURES HYDROPONIQUES

1.1. Solution nutritive

La solution nutritive utilisée est une solution d'Hoagland diluée qui apporte aux plantes tous les nutriments nécessaires à leur croissance (Hoagland *et al.*, 1950). Le tableau C.2 présente la composition de la solution nutritive d'Hoagland employée.

Tableau C. 2. Composition de la solution nutritive d'Hoagland modifiée (Longchamp *et al.*, 2013)

Sels	Concentration en $\mu\text{mol L}^{-1}$
KNO_3	3000
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_4\text{H}_2\text{O}$	2720
NH_4NO_3	2000
KH_2PO_4	980
NaCl	200
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	700
FeEDDHA (6%)	48
H_3BO_3	24
MnSO_4	13
ZnSO_4	6
CuSO_4	1.5
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.04

La solution a été renouvelée toutes les deux semaines pour assurer un apport constant de tous les nutriments et éviter l'accumulation des exsudats potentiellement toxiques.

1.2 Chambre de culture: RUBIC I

La culture de ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.) a été réalisée au sein de la chambre de culture, RUBIC I, à l'Institut d'écologie et des sciences de l'environnement de Paris (IEES Paris) situé à Grignon.

RUBIC I (Figure C.7) est une chambre de 0.5 m² entièrement scellée qui permet de contrôler l'ensemble des flux eau-plante et plante-atmosphère. Elle est équipée de sondes de contrôles pour différents paramètres tels que la température, l'éclairage, l'humidité, la concentration en CO₂ et la pression. Ces données sont enregistrées toutes les 10 min à l'aide de périphériques analogiques (6B11).



1.3 Modalités expérimentales

La culture de ray-grass a été réalisée pendant 6 semaines (Juin-Juillet 2013). Les deux traceurs de Se ont été ajoutés à la solution nutritive à des concentrations d'environ 100 µg L⁻¹ deux semaines après le début de la germination. Pendant toute la durée de la culture, la température de l'air a été réglée à 25 °C le jour (photopériode de 10 h) et 23°C la nuit; l'humidité relative à 70%. Une séquence de photos illustrant la culture de ray-grass est présentée dans la Figure C.8.



Figure C. 7. Photos de la culture de ray-grass enrichi en ⁷⁷Se et ⁸²Se

*Seront discutés ci-après les résultats qui font objet de l'article «**Stable isotope tracing : a powerful tool for selenium speciation and metabolic studies in not accumulator plant (rye-grass *Lolium Perenne*)**» accepté dans le journal "Analytical and Bioanalytical Chemistry" (DOI: 10.1007/s00216-015-9069-4).*

Résumé

Le sélénium (Se) est un élément trace à la fois essentiel et toxique pour les mammifères; la frontière entre les deux conditions physiologiques est très étroite et dépend non seulement de la dose mais aussi de l'espèce chimique présente dans les apports alimentaires. Une meilleure compréhension des transformations métaboliques de Se chez les végétaux en fonction de la forme chimique de Se apportée est nécessaire afin de mieux contrôler l'efficacité des procédures de fertilisation dans les régions pauvre en Se.

Cette étude présente pour la première fois l'application de la méthodologie du traçage isotopique chez une plante non accumulatrice afin de suivre simultanément la bio-incorporation des deux espèces inorganiques couramment utilisées comme sources d'enrichissement en Se de végétaux destinés à l'alimentation. La répartition et la spéciation de Se ont été étudiées dans des extraits de racines et feuilles de ray-grass (*Lolium perenne* L.), cultivé en culture hydroponique contenant deux espèces de Se isotopiquement enrichies ($^{77}\text{SeIV}$ et $^{82}\text{SeVI}$). Bien que le taux de prélèvement de Se par la plante entière soit similaire pour les deux espèces, les résultats montrent que la distribution de Se dans les différentes parties de la plante, ainsi que le degré de métabolisation, dépendent fortement de la forme chimique sous laquelle le sélénium est présent dans le milieu de culture. Ainsi, le sélénite est fortement métabolisé en formes organiques constituées essentiellement de composés de hauts poids moléculaires, ce qui semble limiter sa translocation vers les feuilles. A l'inverse, la concentration du séléniate est plus importante dans les parties aériennes que dans le compartiment racinaire et sa spéciation est très peu modifiée. L'utilisation des traceurs isotopiques montre ici tout son intérêt, permettant à la fois le suivi simultané des transformations métaboliques de deux espèces sources en une seule expérience, tout en étudiant des plantes non-hyperaccumulatrices, la sensibilité de la détection par l'ICP-MS étant augmentée grâce à l'utilisation de traceurs quasiment mono-isotopiques.

**Stable isotope tracing: a powerful tool
for selenium speciation and metabolic studies
in non-hyperaccumulator plants
(ryegrass *Lolium perenne* L.)**

Pamela Di Tullio ^{a, b}, Antoine Versini ^c, Maité Bueno ^a, Isabelle Le Hécho ^a, Yves Thiry ^b, Philippe Biron, Maryse Castrec- Rouelle^c and Florence Pannier ^a

^a Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement (LCABIE), Université de Pau et des Pays de l'Adour/CNRS, UMR 5254, IPREM, Hélioparc, 2 Avenue du Président Angot, 64053 Pau Cedex 9, France (E-mail addresses: pamela.ditullo@univ-pau.fr; florence.pannier@univ-pau.fr; maite.bueno@univ-pau.fr; isabelle.lehecho@univ-pau.fr;)

^b Andra, Research and Development Division, Parc de la Croix Blanche, 1-7 rue Jean Monnet, 92298 Châtenay-Malabry Cedex, France (E-mail adress: yves.thiry@andra.fr)

^c Université Pierre et Marie Curie (UPMC- Paris 6) ; 4 Place Jussieu, 75005 Paris (E-mail addresses : (E-mail addresses: antoine.versini@upmc.fr; maryse.rouelle@upmc.fr)

^d UPMC Univ Paris 06, CNRS-iEES, Campus Inra-AgroParisTech, F-78550 Thiverval-Grignon, France (E-mail adress: philippe.biron@grignon.inra.fr)

ABSTRACT

Selenium is both essential and toxic for mammals; the range between the two roles is narrow and not only dose-dependent but also related to the chemical species present in foodstuff. Unraveling metabolism of Se in plant as a function of Se source may thus lead to ways for increasing efficiency of fertilization procedures in selenium deficient region.

In this study, stable-isotope tracing was applied for the first time in plant to simultaneously monitor the bio-incorporation of two inorganic Se species commonly used as foodstuff enrichment sources. Occurrence and speciation of Se coming from different Se sources were investigated in roots and leaves extracts of ryegrass (*Lolium perenne* L.), which had been co-exposed to two labeled Se species ($^{77}\text{SeIV}$ and $^{82}\text{SeVI}$). Although the plant absorbed similar amounts of Se when supplied in the form of selenite or selenate, the results evidenced marked differences in speciation and tissues allocation. Selenite was converted into organic forms incorporated mostly into high molecular weight compounds with limited translocation to leaves, whereas selenate was highly mobile being little assimilated into organic forms. Double spike isotopic tracer methodology makes it possible to compare the metabolism of two species-specific Se sources simultaneously in a single experiment and to analyze Se behavior in not-hyperaccumulator plants, the ICP-MS sensitivity being improved by the use of enriched isotopes.

Keywords: selenium, HPLC-ICP-MS, stable isotope tracer, speciation, plants, metabolism

1. INTRODUCTION

Selenium (Se) is an essential micronutrient required in humans and animals for the function of a number of selenium-dependent enzymes, such as glutathione peroxidase (GPx) and thioredoxin reductase (Rayman *et al.*, 2012). It has been also demonstrated that certain Se-containing compounds (e.g. methylselenocysteine, γ -glutamyl-methyl-selenocysteine) are effective chemoprotective agents, reducing the incidence of certain types of cancer (Rayman *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2006; Clark *et al.*, 2006). However, at high dose, Se may be toxic to mammals (Ellis and Salt, 2003; Sager, 2006). The concentration range between physiological requirement and lethality is very narrow, as consequences both Se deficiency and toxicity are common worldwide problems. Plants can play a pivotal role in this respect: for example, the abilities of plants to absorb, sequester and volatilize selenium can be exploited to manage environmental Se contamination by phytoremediation strategies (Terry *et al.*, 2000; Bañuelos *et al.*, 2007; Zhao and McGrath, 2009). On the other hand, Se enriched plants may be useful as “Se-delivery system” (in forage and crops) to supplement the diets of livestock and humans in Se deficient regions (Lyons *et al.*, 2003; Braoadley *et al.*, 2006; Rayman *et al.*, 2008). Moreover, the ability of some plants to transform selenium into bioactive compounds (e.g. anticarcinogenic compounds) has also important implications for human health (Ip *et al.*, 2000c; McShelly *et al.*, 2000; Auger *et al.*, 2004).

The correlation of bioavailability and toxicity of Se with its chemical form triggered interest in Se speciation in plants. Actually, in plants, Se supplied as inorganic form (low bioavailability, potentially toxic) could be converted to safer highly bioactive species, improving nutritional properties (Ellis and Salt, 2003). Nowadays, to increase Se concentration in crop plants on Se-deficient soils, it has become a widespread agricultural practice in many countries to use Se enriched fertilizers. This form of agronomic biofortification is for example successfully practised over 30 years in Finland, New Zeland and Denmark (Gissel –Nielsen *et al.*, 1984; Eurola and Hietaniemi, 2000; Lyons *et al.*, 2003). Some chemical forms of selenium are more readily available to plant uptake than others, for example, in soil Se(IV) being more retained on solid phases is less bioavailable than selenate (Fernandez-Martinez *et al.*, 2009). Apart from the total Se uptake, different enrichment treatments normally undergo certain metabolic changes leading to several final products showing diverse translocation and accumulation within plant tissues (Arvy *et al.*, 1993; Zayed *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2008). For this reason, it is important to evaluate which form of Se

should be used for plant supplementation to obtain high content of this element in final plant and to know whether inorganic Se is efficiently assimilated into organic forms. Therefore, its distribution in different parts of the plant, as well as characterization and quantification of individual chemical species, including bioactive compounds, becomes an issue. Very few papers have been published so far on speciation analysis of Se in plants and most of the reported works have been performed with Se hyper-accumulator plants (*i.e* *Brassica*; *Allium*) which, being able to accumulate several thousands mgSe kg⁻¹, were shown to be good candidate to investigate the formation of the different Se compounds after plant exposure (Larsen *et al.*, 2006; Montes-Bayon *et al.*, 2002a; Mounicou *et al.*, 2006). However, information available on accumulation and speciation of Se in non-accumulator plants (*i.e* forages and grasses), which could serve as model for general environmental conditions, is still scarce, probably due to the lack of analytical approaches allowing the detection of Se species at very low concentrations. Liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC/ICP-MS) is a widely accepted tool for screening and quantification of elemental species in plant tissue (Pedrero *et al.*, 2006; Pyrzyńska *et al.*, 2009), but the detection and the accurate quantification of the separated Se species is not always possible owing to the fact that species concentrations are below the detection limit. The low sensitivity for Se in ICP-MS is partly due to several interferences on major Se isotopes and the presence of many stable isotopes (⁷⁴Se (0.89%), ⁷⁶Se (9.36%), ⁷⁷Se (7.63%), ⁷⁸Se (23.4%), ⁸⁰Se (49.6%), and ⁸²Se (8.73%)). To overcome this issue, an attractive way to enhance the sensitivity of HPLC/ICP-MS measurement for Se and to get reliable species determination consists in the application of highly enriched stable isotopes as tracers in metabolic studies. Metabolites of a precursor labelled with an enriched stable isotope can be much more easily detected than Se with natural abundances. In addition, several nutritional forms of Se labelled with different isotopes can be simultaneously supplied into the growth media; consequentially metabolites of different precursors can be traced in single experiment. Various factors such as absorption rate, translocation and speciation as well as potential competition mechanisms between the added species can be thus compared using identical host plant under the same growing and detection conditions. However, if this isotopic tracer approach has been successfully applied in rats (Suzuki *et al.*, 2006b; 2006c; 2008; 2013; Gonzales-Iglesias *et al.*, 2007; Ohta *et al.*, 2009; Sanchez-Martinez *et al.*, 2014) and in environmental samples such as soils and sediments (Collins *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2009; Tolu *et al.*, 2014; Di Tullo *et al.*, unpublished), it has, to the best of our knowledge, never been performed in plants.

In this study, a non-hyper-accumulator plant, ryegrass (*Lolium Perenne*), was chosen as model system for being an easy and fast to grow plant. Moreover, ryegrass is one of the most important forage varieties in terms of contribution to pastures composition and an increase of Se accumulation has been previously evidenced, as well as non negative effect on plant yield, when Se was supplied as selenite or selenate forms at low concentration (Cartes *et al.*, 2005). Although there are few studies on the determination of total Se in ryegrass (Hopper *et al.*, 1999; Munier-Lamy *et al.*, 2007), Se speciation in this plant has not been reported to our knowledge. We used two stable isotopes, ^{77}Se and ^{82}Se , to label respectively selenite and selenate sources added to hydroponic growth media (double spike) in order to monitor respective bio-incorporation of these two species in roots and shoot of ryegrass. HPLC/ICP-MS was used for Se species determination after water extraction and enzymatic hydrolysis of freeze-dried samples. The objectives were to determine both the capacity of ryegrass to take up and accumulate the Se inorganic forms and, corresponding metabolic products in different plant tissues.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Instrumentation

Total Se concentration was determined with an Agilent 7500ce ICP-MS instrument (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipped with an octopole collision/reaction cell (C/RC). The setting and acquisition parameters were previously optimized in our laboratory (Tolu *et al.*, 2014q) (Table S1 in ESM). An Agilent 1100 series HPLC pump was coupled to ICP-MS for speciation analyses. Chromatographic separation was carried out on a porous graphitic carbon stationary phase (PGC, Thermo Hypercarb column 10 cm \times 4.6 mm i.d) with a formic acid mobile phase (240 mmol L⁻¹, pH 2.4 adjusted with ammonia), delivered at 1 mL min⁻¹ flow rate and a gradient program with increasing amount of methanol (from 1 to 35%, as detailed in Table S1 in ESM). The column used for Size Exclusion Chromatography (SEC) was a Superdex Peptide 10/300 GL (Tricorn, Amercham Biosciences) with a fractionation range of 0.1-7 kDa and a total volume of 24 mL. The elution phase was a 30 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), at a flow rate of 0.6 mL min⁻¹. The calibration of the column was accomplished with a standard mixture of myoglobin (17 kDa), insuline (5.8 kDa) and vitamin B₁₂ (1.35 kDa), with

UV detection at 254 and 280 nm, giving a calibration curve $\log(\text{MW})=6.291-0.155(t_r)$ where t_r is the retention time in min and MW the molecular weight in Da.

SEC fractions were collected and analyzed off-line for Se total content and its speciation by PGC-HPLC/ICP-MS. For water extracts (roots and leaves) the eluate was collected every 3 minutes between 11 and 32 minutes of elution, leading to 7 fractions for each sample type. For driselase extract of roots, the eluate was collected every 3 minutes between 15-36 min (7 fractions) and for driselase extract of leaves between 21-32 min (4 fractions). The collection of fractions was repeated 6 times and corresponding fractions were pooled (final volume of each fraction about 11 mL). The injection volumes were of 100 μL and 200 μL , for RP and SEC chromatography, respectively.

2.2. Reagents and standards

Selenium stock standard solutions of 1000 mg L⁻¹ were prepared in water and stored in the dark at 4°C. D,L-Selenomethionine (SeMet), L-Selenocystine (SeCys₂), Methylselenic acid (MeSeOOH), sodium selenite (Se(IV)), sodium selenate (Se(VI)), Se-methylselenocysteine (MeSeCys) were obtained from Sigma-Aldrich (SigmaUltra, $\geq 99\%$). Working standard solutions were prepared freshly prior to use by diluting the respective stock solutions in ultrapure water. All reagents used for mobile phases (Formic acid, methanol and ammonia) were of analytical grade and purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Nitric acid (Ultrex, J.T. Baker, Deventer, The Netherlands) and hydrogen peroxide 30% (Fisher Scientific) were used for mineralization procedure. Tris(Hydroxymethyl)aminomethane; Protease type XIV from *Streptomyces griseus* and Driselase from *Basidiomycetes* used in extraction procedures were from Sigma Aldrich. Highly enriched elemental ⁷⁷Se(0) and ⁸²Se(0) powders were purchased from Isoflex (Moscow, Russia).

2.3. Preparation of isotopically enriched Se tracers (⁷⁷Se(IV) and ⁸²Se(VI))

Elemental Se was converted into Se(IV) and Se(VI) respectively by nitric acid and a combined nitric acid/hydrogen peroxide oxidation reaction, according to Van Dael *et al.* 2004. Both standard solutions were characterized in terms of isotopic composition and of concentration by isotope dilution. Speciation analysis of the isotopically enriched Se standards was also performed to check complete conversion of elemental selenium into selenite and selenate. The results concerning the enriched solution are as follow: [⁷⁷Se]: 1015

$\pm 3 \text{ mg kg}^{-1}$; [$^{77}\text{Se(IV)}$]: $1010 \pm 6 \text{ mg kg}^{-1}$; 98.3 % ^{77}Se and 1.7 % ^{78}Se , and [^{82}Se] $947 \pm 4 \text{ mg kg}^{-1}$; [$^{82}\text{Se(VI)}$]: $950 \pm 5 \text{ mg kg}^{-1}$; 99.2 % ^{82}Se and 0.8 % ^{80}Se .

2.4. Plant growth and samples preparation

Ryegrass (*Lolium perenne* L.) plants (two replicates per treatment) were cultivated in a controlled atmosphere growth chamber (1 m² surface area and 1.5 m height) with a 10 h per day period (two 400W metal halide discharge lamps, Growth spectra, MH400W, E40), a temperature of 25:23°C (day: night) and relative humidity of 60-70%. Dried seeds of English ryegrass (30 mg cm⁻²) were planted on mesh screen (mesh diameter of 1 mm) stretched out at the top of white plastic container. The plants were grown in duplicate in two plastic tanks filled with 16 L of hydroponic solution (a modified Hoagland nutrient solution [32]).

After two weeks of plant growth, $^{77}\text{Se(IV)}$ and $^{82}\text{Se(VI)}$ tracers were simultaneously supplied in the medium at an initial concentration of approximately $100 \mu\text{g L}^{-1}$ of Se for each species. This concentration was chosen based on previous work to optimize growth conditions (unpublished data) showing that ryegrass growth is threatened by stunting, chlorosis, withering and necrosis of leaves above $200 \mu\text{g L}^{-1}$. Hydroponic solutions were replaced every two weeks with a fresh nutritive solution containing Se tracers at the same initial concentrations (about $100 \mu\text{g L}^{-1}$). As the ryegrass plants grew up, the evapotranspiration gradually increased (up to 140 ml per hour) and the addition of deionized water was required to ensure stable nutrients concentrations. The water condensates drained out of the growth chamber were measured each day and an equivalent volume of deionized water was therefore added in the plastic tanks.

As consequence of plant uptake the tracers concentrations decreased during plant growth, aliquot of nutrient solutions were therefore analyzed before and after replacement (every two weeks) in term of total Se content and speciation. After six weeks the plants were harvested and the roots were separated from the leaves. Roots were then washed with ultra-pure water to remove all the traces of nutrient solution. Both tissues, from each culture repetition, were freeze-dried, ground with an automatic agate mortar obtaining four powdered homogenized samples (2 samples/plant compartment) and weighted (dry weight, DW).

2.5. Procedures

2.5.1. Total digestion

For the determination of total Se in *Lolium Perenne* L., 0.250 g of powdered homogenized samples were digested with 2 mL of HNO₃ and 0.5 mL of H₂O₂ in a closed vessel microwave digestion system (Ethos Touch Control, Milestone) assisted by a two steps temperature program (5 min up to 180° C and held for 10 min, working with a maximum power of 1000 W). Finally, the digested samples were made up to 30 mL with ultra-pure water and filtered to 0.45 µm and analyzed by ICP-MS. The four samples were digested and analyzed in triplicate. Validation of procedure was performed by digesting a certified reference material (Ryegrass ERM-CD281), measured total Se (0.022 ± 0.001 mg kg⁻¹ DW) being in complete agreement with theoretical value (0.023 ± 0.004 mg kg⁻¹ DW).

2.5.2. Sequential extraction protocol

Selenium species were extracted from the plant tissues using a sequential extraction protocol including the following steps: (1) ultra-pure water, (2) driselase (mixture of cell wall digesting enzymes), (3) protease type XIV. For each step, different extraction conditions were tested and the optimized protocol was defined based on a compromise between extraction yield, species stability and time consuming.

According to the results of the optimization experiments (described below), the retained sequential extraction protocol for further analysis was as follow: about 0.1 g plant material was subjected to:

1. Extraction with 5 mL of ultra-pure water assisted by ultrasonic probe (SONICS VibraCell™) (25% of energy, 20 s pulse,) for 4 min, repeated three times, for extraction of soluble selenium compounds. The supernatants collected at each extraction step were then pooled for analysis.
2. Enzymatic hydrolysis with driselase: the residue from water extraction was extracted twice with 5 mL of Tris-HCl buffer solution (8 mM; pH 7.5) containing 10 mg of driselase. The solution was kept at a constant temperature of 37°C in a thermostat bath and constantly stirred for 24 h. The supernatants were then pooled for analysis.

- Enzymatic hydrolysis with protease: 5 mL of a Tris-HCl buffer solution (8 mM; pH 7.5) containing 1 mM CaCl₂ and 20 mg of protease type XIV was added to the pellet from driselase extraction. The solution was incubated in a digitally controlled immersion thermostat bath for 20 h at 37°C. After centrifugation, the supernatant was digested once again with 1 mL of Tris buffer solution containing 10 mg of protease XIV for 20 h at 37 °C.

For extracts obtained from enzymatic hydrolyses (driselase and protease), an aliquot of the solution was discarded for total analysis and the remaining was cut-off filtered through a 100 kDa pore size membrane to eliminate high weight molecular compounds that might disturb chromatographic separation. Total Se content was determined before (noted as extracted ⁷⁷Se or ⁸²Se) and after cut-off filtration (noted as extracted ⁷⁷Se_{cut-off} and ⁸²Se_{cut-off}).

Samples were sequentially extracted in triplicate and a blank was subjected to the same procedure. Protease residues were mineralized for the determination of non-extracted Se allowing mass balance calculation. These precautions allowed to control that no contamination or loss occurred during extractions.

Extraction efficiencies are calculated as the percentage of total Se content in the freeze-dried plant tissues (DW).

2.5.3. Determination of Se in the digested samples and extracts

Endogenous and tracers (⁷⁷Se and ⁸²Se) Se concentrations, for total and speciation analyses, were determined by reverse isotope dilution (RID), with natural abundance Se standard used as a spike and, ⁷⁸Se/⁷⁷Se and ⁷⁸Se/⁸²Se ratios selected as measured isotopes pairs, by using equations 1 to 3 according to Hintelmann and Evans (1997).

$$C = \frac{C' \times w' \times W_{at} \times (R \times {}^{77-82}A_{natural} - {}^{78}A_{natural})}{w \times W_{at}' \times ({}^{78}A_{sample} - R \times {}^{77-82}A_{sample})} \quad (1)$$

With:

C: Se concentration in the sample

C': Se concentration of standard (natural abundance) spiked to the sample

w, w': masses of sample and spike

W_{at}, W_{at}': atomic masses of sample and spike

R : ⁷⁸Se/⁷⁷Se or ⁷⁸Se/⁸²Se ratio measured after spike addition

^XA_{sample} : abundance of X isotope in the sample before spike addition

^XA_{natural}: abundance of X isotope in the natural standard used as spike

$$[Se_{ambient}] = \frac{C \times {}^{78}A_{sample}}{{}^{78}A_{natural}} \quad (2)$$

$$[Se_{tracer}] = \frac{C \times {}^{78}A_{sample} - \left[\left(\frac{{}^{78}A_{natural}}{{}^{77-82}A_{natural}} \right) \times C \times {}^{77}A_{sample} \right]}{\left(\frac{{}^{78}A_{tracer}}{{}^{77-82}A_{tracer}} \right) - \left(\frac{{}^{78}A_{natural}}{{}^{77-82}A_{natural}} \right)} \quad (3)$$

With:

${}^x A_{tracer}$: abundance of isotopes 78 and, 77 or 82 of tracers (i.e. ${}^{77}SeIV$ or ${}^{82}SeVI$) and natural abundance Se

Optimum spike to sample ratio was calculated for each sample to obtain minor error propagation during ID calculation (Webster *et al.*, 1960).

All isotopes intensities were mathematically corrected from interferences due to the formation of SeH^+ and BrH^+ following the determination of Se and Br hydridation factors (f_{Se} and f_{Br}) in Se and Br standards solutions measured each three samples (bracketing method; Hinojosa Reyes *et al.*, 2003; Tolu *et al.*, 2014a).

All isotope ratios obtained were further corrected for mass bias using an exponential model after determination of the mass bias factor with natural abundance Se standard (Encinar *et al.*, 2001). C/RC conditions and correction method defined in Tolu *et al.* (2014a), were evaluated for reagents used in the present work showing a good accuracy and precision of measured isotopic ratios (error < 4%; RSD < 5%).

Se concentrations were then expressed in micrograms of Se per kilogram based on precise weights of vegetal material (DW) and reagents used for extraction or mineralization.

Total uncertainties associated to concentrations of total Se and Se species were defined by combining analytical uncertainties to those related to the mean and standard deviation of values of extractions replicates (n=3). Analytical uncertainties were calculated according to random error propagation method along the calculation steps (Tolu *et al.*, 2014a).

Values referring to the “whole plant” were calculated from Se tracer concentrations measured in each compartment ($\mu g g^{-1}$ of Se) and corresponding compartment biomass (g).

3. RESULTS and DISCUSSION

3.1. Nutritional solutions

Total concentrations of the two Se tracers were determined in aliquots of freshly prepared nutritional solution and solution after two weeks of growth. At the beginning Se concentrations of both tracers amounted approximately to $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (Table S2 in the ESM). After two weeks of plant growth, initial concentrations of both tracers decreased of about 60-66% as result of plant uptake. Speciation analyses of nutritional solutions were performed as well in order to check eventual transformations of supplied Se species occurred during the considered period. Results resumed in Table S2 in the ESM showed that the tracers were stable in terms of speciation in the growth media remaining after two weeks of culture in the chemical form initially used for Se enrichment.

3.1 Comparative efficiencies of different extraction procedures

In order to monitor respective bio-incorporation of inorganic Se and elucidate possible further metabolism in root and leaf compartments, samples were sequentially extracted by reagent solutions designed to selectively leach different classes of selenium species. In this study a sequential approach was designed consisting of extraction of (1) water soluble Se species; (2) Se bound to plant cell wall and (3) Se-amino acids incorporated into protein structure. Beside the maximum efficiency, the stability of Se species during the procedure should be taken into account when choosing extraction conditions. A preliminary study was thus performed to select appropriate extraction procedures in order to obtain maximum extraction efficiency as well as to ensure integrity of species. The first step of sequential extraction aimed to recover water soluble Se species. Three different water extraction protocols were tested as follow: 0.1 g sample was extracted either once, twice or three times with 5 mL of ultra-pure water in an ice bath using an ultrasonic probe. In the case of repeated extractions, the supernatants were collected after centrifugation before further extraction(s). All supernatants were pooled together before analysis.

Fig. 1a shows the results obtained considering total Se extractabilities (expressed as % $\text{Se}_{\text{extracted}}/\text{Se}_{\text{total}}$). For both samples and both tracers, Se recovery after three successive water

extractions was almost twice higher compared to single extraction; it was thus selected as first step of sequential extraction protocol.

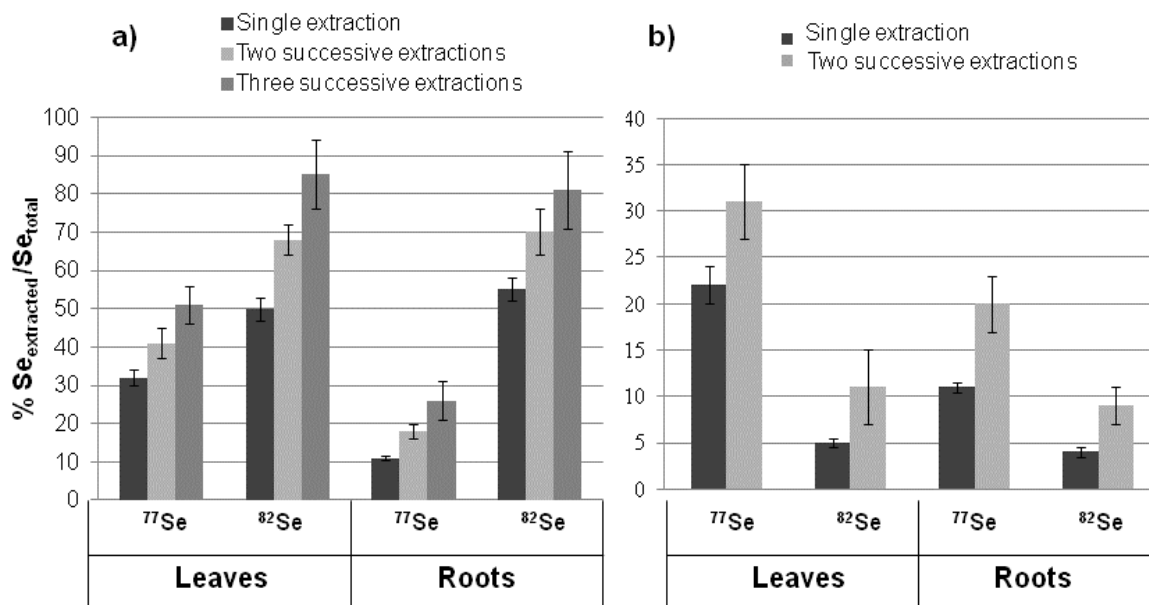


Figure 1. Proportion of extracted Se ($\% Se_{\text{extracted}}/Se_{\text{tot}}$) under tested conditions used for: **a)** water extraction ; **b)** driselase extraction. Error bars represent SD for triplicate extractions of two samples/plant compartment

Comparison of total Se measured in extracts from once and twice repeated digestions with driselase evidenced a significant increase of extractability after two successive extractions with driselase (Fig. 1b) which were therefore retained for the sequential extraction protocol. A proteolytic digestion was performed on driselase residue as last step. Most widely reported conditions used amount of 30 mg protease type XIV for digestion of 0.1 g of plant material performed in 5 mL of Tris-HCl buffer solution (8 mM; pH 7.5) (Shah et al., 2004; Montes-Bayon et al., 2004). We compared three different protocols to bring that amount, each protease addition was incubated 20 h at 37°C; (1) single step digestion with 30 mg of enzyme, (2) first digestion step with 20 mg of enzyme followed by further digestion of supernatant adding 1 mL of buffer solution containing 10 mg of enzyme; (3) first digestion step with 10 mg of enzyme followed by two successive digestions of supernatants obtained by adding 1 mL of buffer solution containing 10 mg of enzyme.

Differences in extracted selenium tracer recoveries were not statistically significant among the three procedures (RSD: 1-5%). However, when the extraction procedure involved successive protease hydrolysis of supernatant, an increase in SeMet concentration was observed (20-60 % higher than one step digestion). A procedure including at least one further proteolytic digestion of supernatant seems thus to provide complete digestion of proteins and consequently release of seleno-aminoacids.

For each step of extraction procedure, integrity of species during treatment (especially when applying successive ultrasonic rounds) was also verified. HPLC-ICPMS analyses of water and enzymatic extracts showed identical Se containing peaks after successive extraction steps, indicating that no species degradation occurred during the treatments. Relative standard deviations obtained for total Se determinations were lower than 4% for the selected procedures. Moreover, HPLC-ICPMS analyses of extracts showed superimposable chromatograms for triplicate treated samples, confirming extractions procedures repeatability (RSD < 5%).

3.3. Allocation of ⁷⁷Se and ⁸²Se tracers in plant tissues

Total concentrations of both tracers and endogenous Se were measured in freeze-dried samples after digestion for each tissue type (roots and leaves). Total Se accumulation in the whole plant is the same for both tracers, accounting for $7.6 \pm 0.8 \text{ mg kg}^{-1}$ and $7.3 \pm 1.2 \text{ mg kg}^{-1}$ for ⁷⁷Se and ⁸²Se respectively. These results indicate that, in used experimental conditions, the total amount of Se taken up by the plant is independent of the chemical species supplied in the grown media in agreement with previous studies performed in hydroponic solutions, both oxyanions being equally available for plant uptake (Bitterli *et al.*, 2010). However, different uptake could be observed in the case of plant cultivation on soil, where Se(IV) resulted to be less bioavailable being more strongly sorbed on soil solid phases compared to Se(VI) (Fernandez-Martinez and Charlet, 2009).

Although total Se uptake was similar, Se allocations and translocations in plant tissues (leaves or roots) strongly depend on supplied Se form used for the enrichment treatment (Tables 1 and 2).

Table 1 Total and identified species concentrations of ^{77}Se tracer in leaves and roots. Corresponding proportions in extracts (expressed as % of total ^{77}Se in plant compartment) are given between brackets. Values are mean \pm SD from triplicate digestions or sequential extractions of two samples/plant compartment.

$\mu\text{g kg}^{-1}$ of Se (% of total content in plant compartment)								
Extract	Total extracted Se	Total extracted Se _{cut-off} ^(a)	Se(IV)	Se(VI)	SeMet	MeSeCys	SeCys ₂	MeSeOOH
LEAVES: $^{77}\text{Se}_{\text{tot}} = 2990 \pm 247$								
Water	1499 \pm 153 (51 \pm 5)	-	12 \pm 2 (0.4 \pm 0.1)	< LOD ^b	14 \pm 1 (0.5 \pm 0.1)	3.1 \pm 0.4 (0.11 \pm 0.02)	< LOD ^b	< LOD ^b
Driselase	922 \pm 111 (31 \pm 4)	517 \pm 88 (18 \pm 4)	19 \pm 2 (0.6 \pm 0.1)	< LOD ^b	176 \pm 18 (6 \pm 0.2)	5 \pm 2 (0.2 \pm 0.1)	2.5 \pm 0.7 (0.09 \pm 0.03)	12 \pm 1 (0.4 \pm 0.1)
Protease	482 \pm 54 (16 \pm 2)	360 \pm 82 (12 \pm 3)	-	< LOD ^b	288 \pm 26 (10 \pm 1)	7.6 \pm 2.1 (0.3 \pm 0.1)	2.6 \pm 0.4 (0.19 \pm 0.04)	3.2 \pm 0.6 (0.11 \pm 0.03)
Residue	176 \pm 68 (6 \pm 2)							
ROOTS: $^{77}\text{Se}_{\text{tot}} = 22500 \pm 1150$								
Water	5816 \pm 621 (25 \pm 1)	-	1630 \pm 40 (7 \pm 1)	< LOD ^b	< LOD ^b	< LOD ^b	< LOD ^b	< LOD ^b
Driselase	4480 \pm 560 (20 \pm 1)	3475 \pm 223 (15 \pm 2)	41 \pm 3 (0.18 \pm 0.03)	< LOD ^b	288 \pm 29 (1.3 \pm 0.3)	115 \pm 17 (0.5 \pm 0.1)	34 \pm 6 (0.2 \pm 0.1)	< LOD ^a
Protease	2709 \pm 543 (12 \pm 1)	2467 \pm 548 (11 \pm 3)	20 \pm 5 (0.09 \pm 0.03)	< LOD ^b	1289 \pm 266 (6 \pm 2)	111 \pm 45 (0.5 \pm 0.3)	33 \pm 6 (0.14 \pm 0.04)	42 \pm 5 (0.15 \pm 0.04)
Residue	10507 \pm 828 (46 \pm 2)							

^a Measured in supernatant after 100 kDa cut-off filtration of driselase and protease extracts

^b Range of LOD for ^{77}Se species = 0.2–3 $\mu\text{g kg}^{-1}$

Table 2 Total and identified species concentrations of ^{82}Se tracer in leaves and roots. Corresponding proportions in extracts (expressed as % of total ^{82}Se in plant compartment) are given between brackets. Values are mean \pm SD from triplicate digestions or sequential extractions of two samples/plant compartment

$\mu\text{g kg}^{-1}$ of Se (% of total content in plant compartment)								
Extract	Total extracted Se	Total extracted Se _{cut-off} ^(a)	Se(IV)	Se(VI)	SeMet	MeSeCys	SeCys ₂	MeSeOOH
LEAVES: $^{82}\text{Se}_{\text{tot}} = 8050 \pm 1775$								
Water	6217 \pm 1390 (77 \pm 8)		< LOD ^b	6021 \pm 1589 (75 \pm 13)	< LOD ^b	< LOD ^b	< LOD ^b	< LOD ^b
Driselase	832 \pm 144 (11 \pm 3)	552 \pm 138 (7 \pm 3)	31 \pm 4 (0.4 \pm 0.1)	< LOD ^b	279 \pm 34 (4 \pm 1)	54 \pm 9 (0.7 \pm 0.2)	7.4 \pm 0.3 (0.09 \pm 0.02)	29 \pm 3 (0.4 \pm 0.1)
Protease	567 \pm 82 (7 \pm 1)	543 \pm 93 (7 \pm 2)	< LOD ^b	< LOD ^b	488 \pm 48 (6 \pm 1)	14 \pm 3 (0.2 \pm 0.1)	5.7 \pm 1.2 (0.07 \pm 0.01)	5.6 \pm 1.3 (0.07 \pm 0.01)
Residue	91 \pm 22 (1.1 \pm 0.1)							
ROOTS: $^{82}\text{Se}_{\text{tot}} = 4950 \pm 490$								
Water	4013 \pm 435 (81 \pm 13)		< LOD ^b	4003 \pm 334 (81 \pm 8)	< LOD ^b	< LOD ^b	< LOD ^b	< LOD ^b
Driselase	465 \pm 70 (10 \pm 1)	379 \pm 78 (8 \pm 2)	44 \pm 9 (0.9 \pm 0.3)	< LOD ^b	56 \pm 13 (1.1 \pm 0.4)	34 \pm 6 (0.7 \pm 0.2)	< LOD ^b	< LOD ^b
Protease	480 \pm 130 (10 \pm 1)	400 \pm 67 (8 \pm 2)	7 \pm 1 (0.3 \pm 0.1)	< LOD ^b	341 \pm 71 (7 \pm 2)	17 \pm 4 (0.15 \pm 0.04)	< LOD ^b	< LOD ^b
Residue	129 \pm 79 (1.6 \pm 0.4)							

^a Measured in supernatant after 100 kDa cut-off filtration of driselase and protease extracts

^b Range of LOD for ^{82}Se species = 0.7–5 $\mu\text{g kg}^{-1}$

Namely, total ^{82}Se in leaves ($8.1 \pm 1.8 \text{ mg kg}^{-1}$) was found higher than that found in roots ($5.1 \pm 0.2 \text{ mg kg}^{-1}$). At contrary for ^{77}Se tracer, highest concentrations were observed in roots ($23 \pm 1 \text{ mg kg}^{-1}$ and $3.0 \pm 0.2 \text{ mg kg}^{-1}$ for the roots and the leaves respectively). The calculated translocation factor defined as the ratio between Se concentrations in leaves and roots is strongly higher for ^{82}Se (1.6 ± 0.4) than that of ^{77}Se (0.13 ± 0.01) suggesting an increased rate of Se translocation from roots to leaves in ryegrass after supplementation with Se(VI) *versus* Se(IV). These results are in agreement with previous studies performed with different plant species (soybean, wheat, broccoli, rice, Indian mustard, sugar beet, maize) clearly demonstrating that Se translocation from roots to leaves is dependent on the form of Se supplied, selenate being much more easily transported than selenite or any organic species, like SeMet (Zayed *et al.*, 1998; Terry *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2008; Longchamp *et al.*, 2013).

Regarding sequential extraction procedure, total Se concentrations measured in the three selective extracts and in digested residual pellet as well as the corresponding extraction efficiencies for leaves and roots samples are presented in Table 1 and 2.

The first extraction step carried out on the plant tissue by mean of ultrapure water assisted by sonication extracted most of ^{82}Se present in roots and leaves samples, accounting for almost 80% of total ^{82}Se present in the compartment. Driselase and protease digestions extracted almost the same amount of ^{82}Se , about 10% in both samples. No significant decrease in ^{82}Se concentrations measured after 100 kDa cut-off filtration of enzymatic extracts was observed.

In roots, water-soluble ^{77}Se accounted for $25 \pm 1\%$ of total ^{77}Se . The digestion with driselase liberated an additional $20 \pm 1\%$ (bound to cell walls) and the proteolytic lysis allowed recovery of an additional $12 \pm 1\%$. Indeed, the remaining $46 \pm 2\%$ (residue) might correspond to ^{77}Se incorporated in more complex structures which could not be released with the above reagents. Different proportions of ^{77}Se were observed in leaves extracts compared to root extracts, accounting for $51 \pm 5\%$, $31 \pm 4\%$ and $16 \pm 2\%$ for water, driselase and protease extracts respectively. Although these results display a near complete extraction (up to 90%) for both tracers in leaves and for ^{82}Se in roots, a large amount of ^{77}Se remained in the unextracted fraction of roots.

Comparison of total content before and after cut-off filter evidenced ^{77}Se losses of about 5 and 15% related to total ^{77}Se in roots and leaves, respectively. It means that the tracer was incorporated into HMW macromolecules ($> 100\text{kDa}$) released after cell wall digestion. At

contrary, no significant decrease of ^{77}Se concentration after cut-off was observed in protease extracts.

3.4 Quantitative speciation of Se

3.4.1. Species determination by RP-HPLC-ICP MS

PGC separation was firstly performed to obtain information on the occurrence of Se metabolites coming from the two precursors ($^{77}\text{Se(IV)}$ and $^{82}\text{Se(VI)}$) and their distribution in the plants. Identification of Se containing chromatographic peaks in extracts was performed by spiking commercially available Se standards. Complete separation and elution of available standards can be achieved within the first 10 min of the separation run. Quantification of identified Se species was then performed by standards addition method based on peak areas.

Quantitative results (concentration and proportion) for identified Se species determined in the different extracts and plant compartments are presented in Tables 1 and 2 for ^{77}Se and ^{82}Se tracers, respectively. Chromatograms of roots water extracts revealed the presence of tracers as inorganic Se forms ($^{77}\text{Se(IV)}$ and $^{82}\text{Se(VI)}$) used for Se enrichment in the growing media (Figure S1a in ESM). $^{82}\text{Se(VI)}$ amounts to 100% of total water extracted ^{82}Se and consequently 81% of total ^{82}Se in roots. At contrary, $^{77}\text{Se(IV)}$ only accounts for 29% of water extracted ^{77}Se and, 8% of total ^{77}Se measured in roots, although no additional chromatographic peaks containing ^{77}Se were detected. Regarding leaves samples (Figure S2b in ESM), for ^{82}Se , similar to that observed in roots water extract, only $^{82}\text{Se(VI)}$ could be detected corresponding to almost 100% of total ^{82}Se extracted with water. For ^{77}Se , two major peaks corresponding to $^{77}\text{Se(IV)}$ and $^{77}\text{SeMet}$ were observed. A smaller peak was also detected with a retention time corresponding to that of $^{77}\text{MeSeCys}$. Calculated extraction efficiencies for $^{82}\text{Se(VI)}$ are in agreement with results obtained for others plants (chicory, dandelion, lamb's lettuce and parsley) that showed water extraction recovery of selenate in leaves of different plants ranging from 45% to 85% (Mazey et al., 2008).

Example chromatograms corresponding to driselase extracts of roots and leaves are shown in Fig. 2.

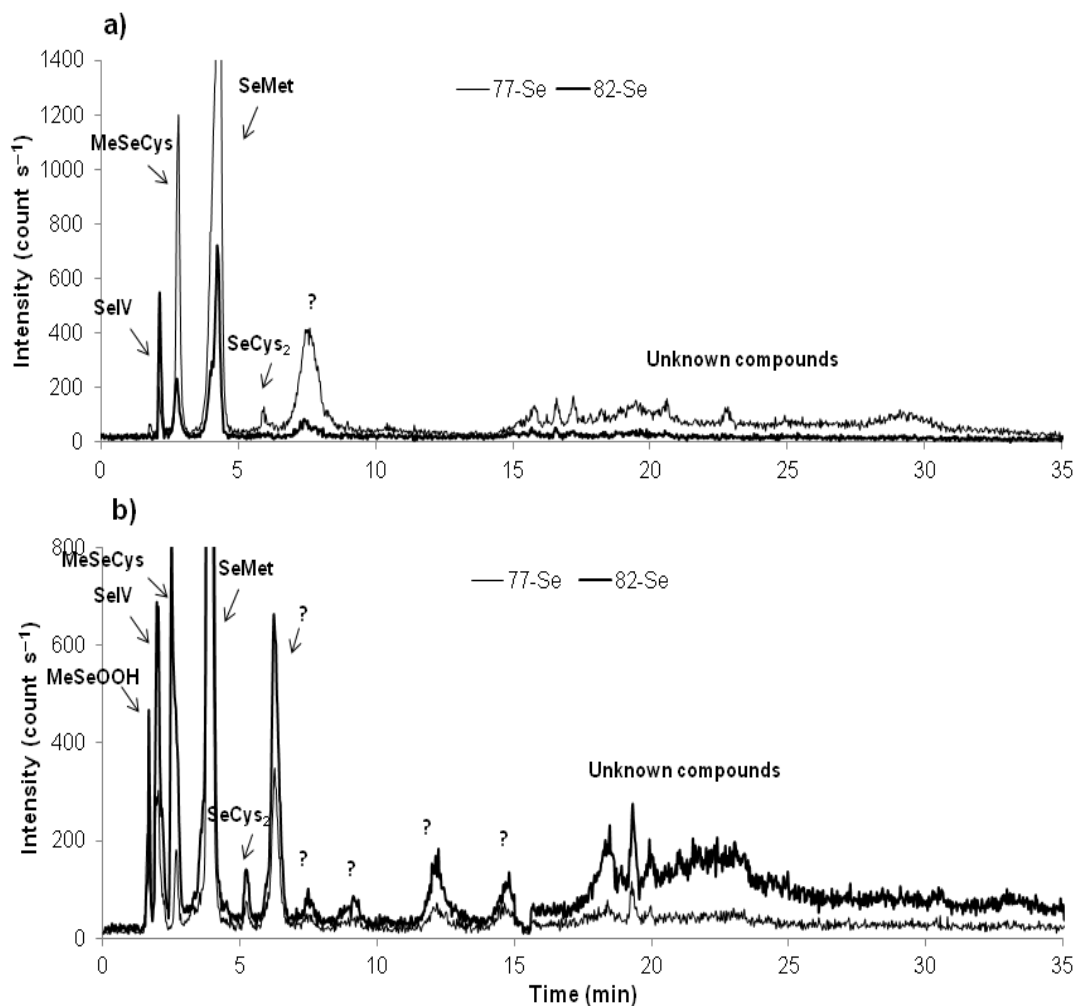


Figure 2. PGC- HPLC ICP-MS example chromatograms of driselase extracts (diluted 2.5 times) of (a) roots; (b) leaves. The y-scale of both figures is expanded as the high amount of SeMet would not allow showing the smaller peaks

For both samples, two major Se peaks matching the retention times of MeSeCys and SeMet, and a minor selenocystine peak were detected. Some Se-containing peaks whose retention times do not match the ones of any Se available standard were also detected. In roots extracts these peaks were more intense for ^{77}Se isotope than for ^{82}Se one. The opposite was observed for leaves. An increase of baseline signal was observed between 15-30 min (methanol gradient) mostly for ^{77}Se tracer, suggesting some elution of Se-compounds or Se-peptides.

Considering quantitative data obtained in the Se fraction released by driselase hydrolysis, it appears that both inorganic Se tracers were metabolized by the plant into species associated with cell wall, actually no more $^{82}\text{Se(VI)}$ could be detected and, $^{77}\text{Se(IV)}$ only accounted between 1.2-3.6% of total extracted ^{77}Se measured after cut-off ($^{77}\text{Se}_{\text{cut-off}}$). SeMet and MeSeCys are the most abundant detected known Se species, their concentrations varying as a

function of plant compartment and Se tracer. SeMet was present at a higher concentration in leaves compared to roots. As already observed in water extracts, most of ^{77}Se was present as unknown compounds, quantified species accounting for 14% and 42% of total extracted $^{77}\text{Se}_{\text{cut-off}}$ in roots and leaves respectively. In roots extract, a large amount of ^{82}Se was also undetected, accounting for almost 64% of total extracted $^{82}\text{Se}_{\text{cut-off}}$.

The chromatographic profiles of protease XIV extracts of roots and leaves are shown in Fig. 3. Two main peaks were detected, corresponding to SeMet and MeSeCys by standards matching retention times. MeSeOOH, Se(IV) and SeCys₂ could be detected at $\mu\text{g kg}^{-1}$ level for ^{77}Se in roots and for ^{82}Se in leaves. Additional peaks corresponding to unknown selenium-containing species were also observed, some of them eluting similarly than those observed in the driselase extract. For the two tracers, similar profiles in terms of detected species were observed, however with different intensities.

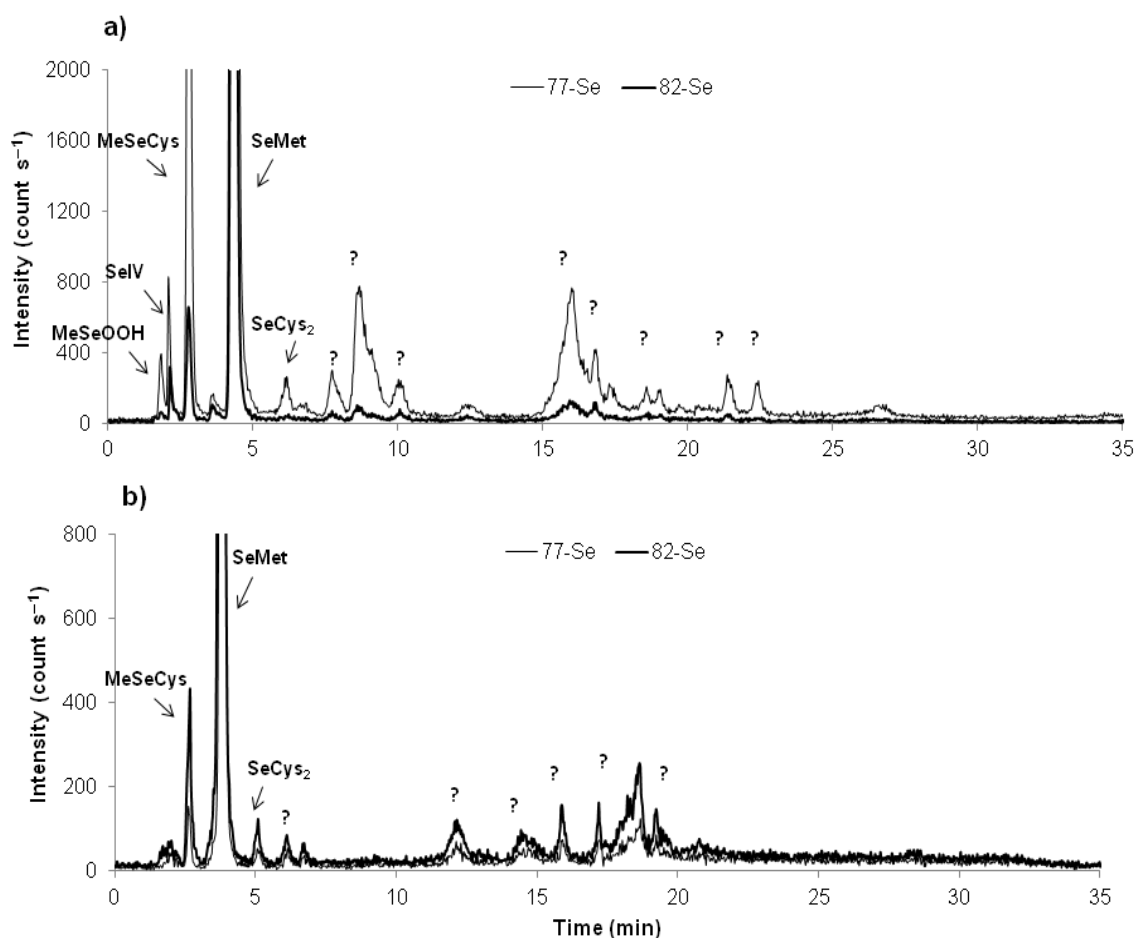


Figure 3. PGC- HPLC-ICP MS example chromatograms of protease extracts (a) roots; (b) leaves. The y-scale of both figures is expanded as the high amount of SeMet would not allow showing the smaller peaks

According to the quantitative speciation data for both tracers in roots and leaves after proteolytic digestion, SeMet represents the main extracted species accounting for 80 and 90% of total extracted Se_{cut-off} in leaves and for 52 and 90% in roots, for ⁷⁷Se and ⁸²Se respectively. Little amount of SeCys₂ could be observed in protease extract which could reflect either the unspecific (SeCys₂ detection) or the specific (SeCys detection) selenium incorporation into the plant proteins. In fact, in these extraction conditions the detection of SeCys is not possible as it is rapidly oxidized to SeCys₂.

3.4.2. Selenium distribution as a function of molecular weight (SEC /ICP-MS)

Considering the large proportion of unknown species in aqueous and driselase extracts an insight into speciation of selenium in these extracts was attempted by analytical scale size-exclusion chromatography that allows obtaining information about the molecular weight of extracted seleno-molecules.

For ⁷⁷Se tracer, water extracts of leaves and roots show similar elution profiles with a peak eluting in the exclusion volume and two peaks in the < 1.3 kDa range, but with important discrepancies in peaks intensity, higher in roots than in leaves, as shown in Fig. 4a;b. The first peak (RT 12 min) corresponding to the exclusion volume probably corresponds to selenium containing proteins. A baseline increase was observed between 14-23 minutes, probably corresponding to elution of Se containing peptides. In the Low Molecular Weight (LMW) region two major peaks were also observed which may correspond to the free seleno-aminoacids, inorganic selenium and small selenium metabolites. In the case of ⁸²Se, the SEC/ICP-MS profiles for leaves and roots water extracts showed only one peak eluting in LMW region corresponding thus to selenate, as previous PGC chromatographic analysis showed that selenate was the only species detected in water extract (100% of extracted ⁸²Se).

Chromatograms of driselase extracts of leaves and roots samples indicate, for both tracers, the presence of selenium species eluting after the 1.3 kDa marker region, corresponding to LMW species. SEC profiles, showing two major peaks at higher elution times, were quite similar for leaves and roots extracts, but differed among the two tracers. In roots extracts peaks intensity at m/z 77 was higher than the one at m/z 82, whereas the contrary was observed in leaves extracts. Moreover, some minor Se species eluting between 14-23 min could be observed only in SEC chromatograms of ⁷⁷Se tracer in roots extracts.

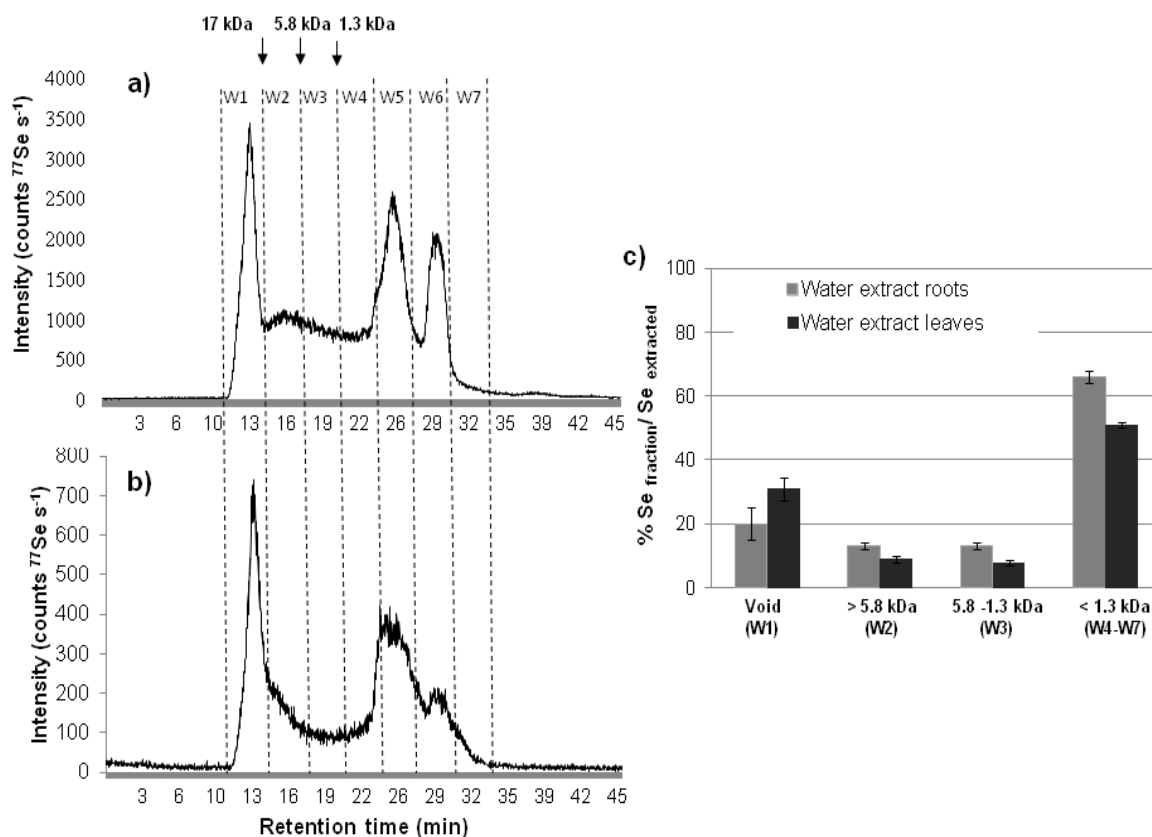


Figure 4. SEC-ICP MS profile of ^{77}Se tracer in water extracts of: **(a)** roots; **(b)** leaves (arrows indicate the retention time of calibration molecules (myoglobin 17 kDa; insulin 5.8 kDa and vitamin B₁₂ 1.35 kDa)). **(c)** Proportion of ^{77}Se in defined molecular weight fractions

Subsequently, in order to analyze Se distribution as a function of the molecular weight, SEC fractions were collected and their selenium content was determined off-line. The sum of Se content measured in all collected fractions was equal to the total selenium amount in extract, evidencing no loss during the chromatographic separation. The proportions of ^{77}Se in each collected fraction of water extracts (% of total extracted ^{77}Se) as a function of calibrated molecular weight fractions are summarized in histogram depicted in Fig. 4c.

In water extracts of roots and leaves respectively, 64% and 50% of total extracted ^{77}Se are associated to the fraction lower than 1.3 kDa, corresponding mainly to inorganic selenium, free amino acids and small peptides. For leaves and roots driselase extracts, about 90% of total extracted ^{77}Se appears in this low molecular weight fraction. These results indicate that ^{77}Se associated with cell wall is mostly in the form of low molecular weight metabolites (less than 1.3 kDa).

Multidimensional chromatography was further applied by PGC–HPLC/ICP-MS analysis of SEC collected fractions. Namely, fractions eluting in the LMW region (< 1.3 kDa) were directly analyzed, while first fractions collected in the HMW area were subjected to enzymatic hydrolysis with Protease type XIV in order to release selenium species bound to proteins. For ^{77}Se tracer, chromatographic profiles of water extract HMW fractions (W1; W2; W3) of roots and leaves after proteolytic digestion, reveal the presence of two major peaks with retention times matching those corresponding to SeMet and SeCys₂ standards. A little amount of ^{77}Se -selenite was detected in fraction W1 of root sample. No additional peak corresponding to unknown species could be observed. In each collected fraction above 1.3 kDa, quantification of seleno-amino acids do not account for the total ^{77}Se measured in the fraction (26-83% of total ^{77}Se in each fraction). This result indicates that all the soluble macromolecules could not be hydrolyzed by the proteolytic digestion suggesting the non protein nature of these compounds and/or an incomplete digestion.

With regard to roots driselase extracts no Se-containing peak could be detected after proteolytic digestion of fractions, suggesting a non-protein nature of Se species eluting in HMW region and indicating that dissolution of the cell walls using a mixture of pectinolytic enzymes does not release any protein. However, a significant amount of low molecular weight compounds could be released only after the destruction of the wall structure.

In the case of LMW fractions obtained from water and driselase extracts of both samples, HPLC/ICP-MS analysis confirmed presence and amount of Se compounds previously determined by direct analysis of extracts but no others species could be detected, probably due to their relatively low concentration in the analyzed samples.

3.5. Metabolism of $^{77}\text{Se(IV)}$ and $^{82}\text{Se(VI)}$ in ryegrass

The comparison of the proportions of Se-species *versus* total Se uptaken by the whole plant indicates strong differences between both tracers suggesting different metabolisms (Table 3). These results demonstrate that applied Se(VI) is less efficiently converted into organo-selenium compounds than Se(IV). Precisely, supplementation with $^{82}\text{Se(VI)}$ leads to an accumulation of Se essentially as selenate, accounting for almost 75% of total Se in whole plant, the rest being converted into organic compounds such as SeMet (9%) and unknown metabolites (14%). This low conversion yield might be due to the energy-demanding reduction step of Se(VI) into Se(IV) which is required for selenate transformation into seleno-

aminoacids in the metabolic pathway of selenium in plants (De Souza *et al.*, 1998; Terry *et al.*, 2000). Opposite to $^{82}\text{Se(VI)}$, added $^{77}\text{Se(IV)}$ is readily metabolized by the plant; actually the remaining amount of inorganic Se(IV) corresponds to only 6% of total Se content in plant. SeMet coming from the ^{77}Se tracer is the most abundant identified organic species, accounting for 19% of total amount and, mostly incorporated into protein structures and to less extent as free soluble amino-acid. However, the major pool of ^{77}Se (about 37%) is represented by unknown compounds and a large amount of the tracer remains un-extracted, (32% of total ^{77}Se in the whole plant).

Table 3. Proportion of Se species related to total Se tracer content in whole plant and plant compartments

Species	^{77}Se			^{82}Se		
	Whole plant	Roots	Leaves	Whole plant	Roots	Leaves
<i>Se(IV)</i>	6%	8%	1%	0.5%	1%	0.4%
<i>Se(VI)</i>	-	-	-	75%	81%	75%
<i>SeMet</i>	19%	12%	36 %	9%	8%	10%
<i>SeCys₂</i>	4%	1%	9%	0.1%	-	-
<i>MeSeCys</i>	2%	1%	3%	1%	1%	0.1%
<i>MeSeOOH</i>	0.3%	0.1%	0.5%	0.1%	-	1%
<i>Unknown compounds^a</i>	37%	31%	50%	14%	-	0.1%
<i>Unextracted compounds</i>	32%	47%	-	-	-	-

^a Difference between total Se and sum of identified species.

Comparing occurrence of Se metabolites and their distribution in the plant obtained by different selective extraction procedures, a possible metabolic pathway as function of the chemical species could be proposed as depicted in Fig. 5a and 5b, for ^{82}Se and ^{77}Se respectively. After $^{82}\text{Se(VI)}$ absorption by root via sulfate transporter (Arvy *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2008) ^{82}Se appears to be mainly translocated to the leaves with little amount remaining in the roots. ^{82}Se tracer is weakly metabolized in roots remaining essentially in form of highly mobile inorganic Se(VI) leading to significant rate of translocation. The little amount of $^{82}\text{Se(IV)}$ observed in roots extracts (1% of total ^{82}Se in roots) suggests small transformation of $^{82}\text{Se(VI)}$ into organic compounds through a reduction pathway *via* selenite. Actually, Se(VI) can be reduced to Se(IV) that can be converted downstream to selenide (Pilon Smith *et al.*, 2010) a part of which is metabolized into organo compounds such as SeMet, SeCys MeSeCys and others LMW metabolites (Fig. 5a).

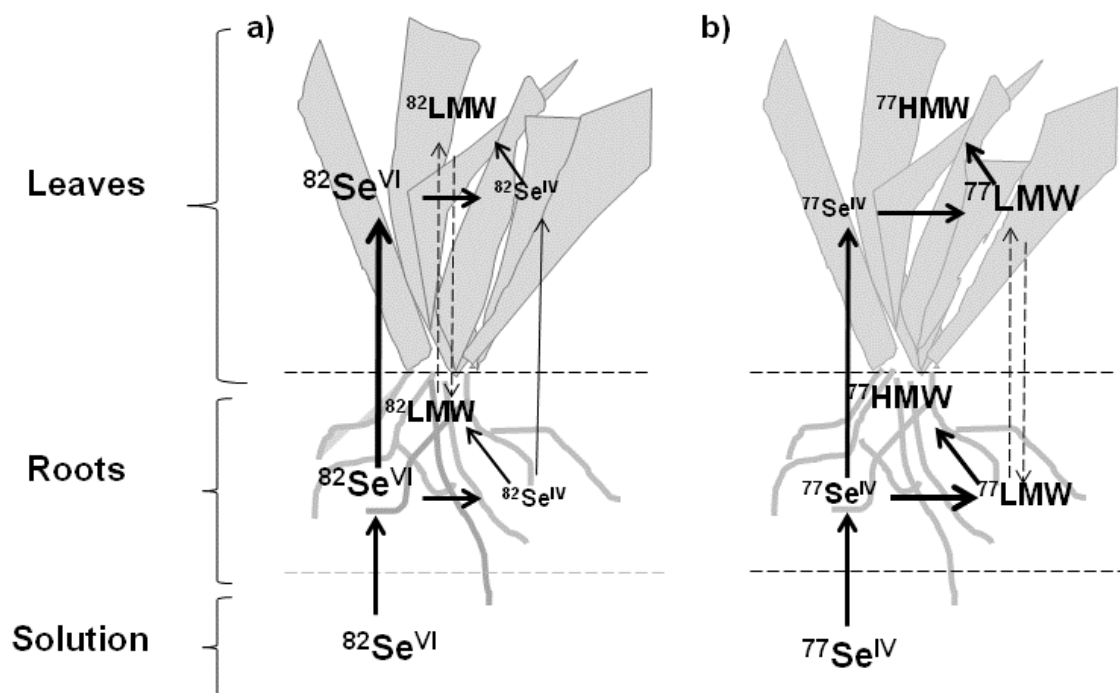


Figure 5. Schematic overview of proposed metabolism pathway following uptake of (a) $^{82}\text{Se}(\text{VI})$; (b) $^{77}\text{Se}(\text{IV})$. Font size is proportional to the relative concentration of the species and thickness of arrows is proportional to transport rate

On the basis of chromatographic profiles and decrease in ^{77}Se abundance from root to leaf, it is suggested that $\text{Se}(\text{IV})$, after absorption through plant roots, is reduced into selenide that in turn is quickly transformed into organic Se before transport to leaves. SEC/ICP-MS profiles of water extracts of roots and leaves suggested incorporation of ^{77}Se tracer supplied in form of selenite to both HMW and LMW compounds. HPLC/ICP-MS analysis of fractions eluting in HMW region after proteolytic digestion indicated the incorporation of ^{77}Se tracer into soluble proteins and peptides mostly as SeMet, and the occurrence of non-protein macromolecules containing Se. The high metabolism rate into high molecular weight compounds probably restricts further translocation to the leaves of the plant which supports the total analysis results. The highest recovery of ^{77}Se tracer obtained after enzymatic hydrolysis of roots compared to water extraction indicates that exposure of the ryegrass to $\text{Se}(\text{IV})$ promotes its transformation into organic compounds and incorporation into proteins or molecules associated with cell wall.

Our findings are consistent with results from previous speciation studies carried out on different accumulator and not accumulator plants species supplied with $\text{Se}(\text{VI})$ or $\text{Se}(\text{IV})$.

These works report that in selenate-treated plants, Se is translocated to leaves predominantly as selenate, whereas in selenite-treated plants Se is quickly converted into organic-Se before transport, only a small amount of selenite being directly transported from root to leaf (Gissel-Nielson et al., 1984; Arvy et al., 2003; De Souza et al., 1998; Whanger et al., 2000; Wroble et al., 2004; Wimenes et al., 2004; Pedrero et al., 2006; 2009; Kopolna et al., 2007). However, some differences are observed if we compare the proportion of selenite-derived compounds obtained in this study with those obtained with accumulator plants. Namely, Se-hyperaccumulator species (*Brassica*, *Astragalus*) and secondary accumulators (*Allium*) metabolize primarily Se into various non-proteogenic Se amino-acids such as γ -glutamyl-selenocysteine, selenocystathione or methylselenocysteine, this latter being the most abundant organo compound (up to 80% of total Se) (Montes-Bayon et al., 2002; Mounicou et al., 2006; Pedrero et al., 2009; Pyrzynska et al., 2009). Selenium tolerance of these plants seems to be related to the synthesis of these compounds, allowing plants to accumulate high amounts of selenium without toxicity symptoms (Neuhierl et al., 1999). Kotrebai et al., reported that proportions of selenium compounds in selenium enriched samples are dependent on the total selenium concentrations, being present mainly as SeMet and γ -glutamyl-selenocysteine in samples with Se contents below 333 mg kg^{-1} and, as MeSeCys in those with higher concentration (Kotrebai et al., 2000). Similarly, Cubadda et al., found an increasing amount of MeSeCys (till 21-68%) with increasing Se supply in wheat (Cubadda et al., 2010). In the present study, the low presence of MeSeCys (< 2%) could thus, indicate that applied concentrations did not require a response from the ryegrass to minimize Se induced toxicity.

CONCLUSION

This work presents for the first time the application of double Se stable isotopes tracing in plant (exposed to $^{77}\text{Se(IV)}$ and $^{82}\text{Se(VI)}$) including determination of tracers distribution and speciation analysis, in order to simultaneously monitor the bio-incorporation of two inorganic species commonly used as plant enrichment sources.

A sequential extraction protocol, targeting different Se fractions in cell plant, and based on combination of various state-of-the-art extraction procedures in plant was optimized in order to reach maximum Se recoveries and to ensure stability of species. Through the use of isotopically enriched tracers, it was shown that inorganic selenium can be taken up and bio-transformed, i.e. converted into organic compounds and/or incorporated into Se-containing

proteins. In general, total selenium measurement showed that supplementation with Se(VI) resulted in similar total Se level in whole plant compared to that enriched with Se(IV). However, allocation in plant compartments and metabolism of Se depends on the nature of initial inorganic species. Selenite was found to be readily metabolized in roots into both HMW and LMW compounds and showed low mobility to leaves, while supplementation with selenate resulted in its accumulation in leaves essentially as original inorganic form. Therefore, at equal bioavailability, the degree of metabolic conversion of Se(IV) into organic species is largely higher than the one of selenate, leading to lower accumulation in leaves. To conclude, the present labeling methodology demonstrates several merits, such as an increase of detection sensitivity allowing speciation study in not accumulator plants, and the possibility of simultaneous monitoring of different species, allowing comparing biological responses to various compounds of the same element. This opens new approaches for its application to others types of plant for a better understanding of their metabolic pathways. Further investigations regarding identification by molecular mass spectrometry of unknown Se-containing peaks detected in the different extracts are required to better substantiate possible Se metabolic pathway.

Acknowledgements

This work was financially supported by the National Radioactive Waste Management Agency (Andra) in the frame of its PhD program 2011 and the program “Needs Environnement 2012” (CNRS-ANDRA-IRSN-EDF).

REFERENCES

- Arvy M P. Selenate and selenite uptake and translocation in bean plants *Phaseolus vulgaris* *Journal of Experimental Botany* **1993**, *44* (263), 1083-1087
- Auger J., Yang W., Arnault I., Pannier F., Potin-Gautier M. High-performance liquid chromatographic-inductively coupled plasma mass spectrometric evidence for Se-“alliins” in garlic and onion grown in Se-rich soil. *Journal of Chromatography A*. **2004**, *1032*: 103-107
- Bañuelos G S., LeDuc Danika L., Pilon-Smits Elizabeth A H. Transgenic Indian mustard overexpressing selenocysteine lyase or selenocysteine methyltransferase exhibit enhanced potential for selenium phytoremediation under field conditions. *Environmental Science and Technology* **2007**, *41*(2):599–605
- Bitterli C., Bañuelos G S., Schulin R. Use of transfer factors to characterize uptake of selenium by plants. *Journal of Geochemical Exploration* **2010**, *107*: 206-216
- Broadley M R., White P J., Bryson R J., Meacham M C., Bowen H C., Johnson S E., Hawkesford M J., McGrath S P., Zhao F J, Breward N, Harriman M., Tucker M. Biofortification of UK food crops with selenium *Proceedings of the Nutrition Society* **2006**, *65*: 169–181
- Cartes P., Gianfreda L , Lora M.L Uptake of Selenium and its Antioxidant Activity in Ryegrass When Applied as Selenate and Selenite Forms. *Plant and soil* **2005**, *276*: 359-367
- Clark L C., Coms G F., Turnbull B W., Slate E H., Chalker D K., Chow J. Effect of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin: A randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association* **1996**, *276*: 1957-1963
- Collins R N., Tran N D., Bakkaus E., Avoscan L., Gouget B. Assessment of isotope exchange methodology to determine the sorption coefficient and isotopically exchangeable concentration of selenium in soils and sediments. *Environmental Science and Technology* **2006**, *40*: 7778–7783
- Cubadda F., Aureli F., Ciardullo S., D’Amato M., Raggi A., Acharya R., Reddy RAV., Prakash NT. Changes in Selenium Speciation Associated with Increasing Tissue Concentrations of Selenium in Wheat Grain. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* **2010**, *58*:2295–2301.
- Darrouzès J., Bueno M., Lespès G., Potin-Gautier M. Operational optimisation of ICP-octopole collision/reaction cell- MS for applications to ultratrace selenium total and speciation determination. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2005**, *20*: 88–94
- De Souza M P., Pilon-Smiths E A H., Lytle C M., Hwang S., Tai J., Honma TSU., Yeh L., Terry N., Rate-Limiting Step in Selenium Assimilation and Volatilization by Indian Mustard. *Plant Physiology* **1998**, *117*: 1487-1494

Ellis D R., Salt D E., Plants, selenium and human health. *Current Opinion Plant Biology* **2003**, 6: 273-279

Encinar J., García Alonso J I., Sanz-Medel A., Main S., Turner P J. A comparison between quadrupole, double focusing and multicollector ICP-MS instruments. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2001**, 16: 315-321

Eurola M., Hietaniemi V. Report of the Selenium Monitoring Programme 1997-1999. Publications of Agricultural Research centre of Finland. Series B24. Jokoinen, Finland: *Agricultural Research Centre of Finland* **2010**

Fernandez- Martinez A., Charlet L. Selenium environmental cycling and bioavailability: A structural chemist point of view. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. **2009**, 8: 81-110

Gissel-Nielsen G., Gupta U C., Lamand M., Westmark T. Selenium in soils and plants and its importance in livestock and human nutrition. *Advance in Agronomy* **1984**, 37: 397-460

González Iglesias H., Fernández Sánchez M.L., García Alonso J.I. and Sanz-Medel A. Use of enriched ⁷⁴Se and ⁷⁷Se in combination with isotope pattern deconvolution to differentiate and determine endogenous and supplemented selenium in lactating rats. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2007**, 389: 707-713.

Hinojosa Reyes L., Marchante-Gayón J M., García Alonso J I., Sanz- Medel A. Determination of selenium in biological materials by isotope dilution analysis with an octopole reaction system ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2003**, 18:11–16

Hopper J L., Parker D R. Plant availability of selenite and selenate as influenced by the competing ions phosphate and sulfate. *Plant and Soil* **1999**, 210: 199–207,

Hintelmann E., Evans R D. Application of stable isotopes in environmental tracer studies- Measurement of monomethylmercury (CH₃Hg⁺) by isotope dilution ICP-MS and detection of species transformation. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1997**, 358: 378-385

Hu X., Wang F., Harris R. Selenium concentration, speciation and behavior in surface waters of the Canadian prairies. *Science of Total Environment* **2009**, 407: 5869-5876

Ip C., Birringer M., Block E., Kotrebai M., Tyson J F., Uden P C., Lisk D J. Chemical speciation influences comparative activity of selenium-enriched garlic and yeast in mammary cancer prevention. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **2000b**; 48: 4452–4459.

Kápolna E., Shah M., Caruso J A., Fedor P. Selenium speciation studies in Se-enriched chives (*Allium schoenoprasum*) by HPLC-ICP-MS. *Food Chemistry* **2007**, 101: 1398-1406

Kotrebai M., Tyson JF., Uden PC., Birringer M., Block E. Selenium speciation in enriched and natural samples by HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS with perfluorinated carboxylic acid ion-pairing agents. *The Analyst* **2000**, 125:71–78.

Larsen E H., Lobinski R., Burger-Mayer K., Hansen M., Ruziuk R., Mazurowska L. Uptake and speciation of selenium in garlic cultivated in soil. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2006**, 385: 1098-1108

Lyons G., Stangoulis J., Graham R. High-selenium wheat: biofortification for better health. *Nutrition Research Reviews*. **2003**, 16: 45-60

Longchamp M., Angeli N., Castrect-Rouelle M. Selenium uptake in Zea mays supplied with selenate or selenite under hydroponic conditions. *Plant Soil* **2013**, 362: 107-117

Li H F., McGrath S P., Zhao F J., Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. *New Phytologist* **2008**, 178 (1), 92-102

Mazej D., Osvald J., Stibily V. Selenium species in leaves of chicory, dandelion, lamb's lettuce and parsley *Food Chemistry* **2008**, 107: 75-83

McSheely S., Yang W., Pannier F., Szpunar J., Lobinski R., Auger J., Potin-Gautier M. Speciation analysis of selenium in garlic by two-dimensional high-performance liquid chromatography with parallel inductively coupled plasma mass spectrometric and electrospray tandem mass spectrometric detection *Analitica Chimica Acta* **2000**, 421: 147-151

Mounicou S., Vonderheide AP., Shann JR and Caruso JA. Comparing a selenium accumulator plant (*Brassica juncea*) to a nonaccumulator plant (*Helianthus annuus*) to investigate selenium-containing proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2006**, 386:1367-78

Montes-Bayón M., Grant T D, Meija J, Caruso J A., Selenium in plants by mass spectrometric techniques: developments in bio-analytical methods *Journal of Analytical Spectrometry* **2002**, 17: 1015-1023

Montes-Bayon M., Diaz Molet M J., Blanco Gonzales E., Sanz-Medel. A. Evaluation of different sample extraction strategies for selenium determination in selenium-enriched plants (*Allium sativum* and *Brassica juncea*) and Se speciation by HPLC-ICP-MS. *Talanta* **2006**, 68: 1287-1293

Monperrus M., Krupp E., Amouroux D., Donard OFX., Rodriguez Martin-Doimeadios R C. Potential and limits of speciated isotope-dilution analysis for metrology and assessing environmental reactivity. *Trends in Analytical Chemistry* **2004**, 23: 261-272

Munier-Lamy C., Deneux-Mustin S., Mustin C., Merlet D., Berthelin J., Leyval C. Selenium bioavailability and uptake as affected by four different plants in a loamy clay soil with particular attention to mycorrhizae inoculated ryegrass. *Journal of Environmental Radioactivity* **2007**, 97(2-3):148-58.

Neuhierl B., Thanbichler M., Lottspeich F., Böck A A family of S-methylmethionine-dependent thiol/selenol methyltransferases. Role in selenium tolerance and evolutionary relation. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, 274: 5407-5414.

Ohta Y., Koboyashi Y., Konishi S., Hirano S. Speciation Analysis of Selenium Metabolites in Urine and Breath by HPLC- and GC-Inductively Coupled Plasma-MS after Administration of

Selenomethionine and Methylselenocysteine to Rats. *Chemical Research in Toxicology* **2009**, 22: 1795-1801

Pedrero Z., Elvira D., Camara C. Selenium species bioaccessibility in enriched radish (*Raphanus sativus*): A potential dietary source of selenium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, 54: 2412-2417

Pedrero Z., Madrid Y. Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: A review. *Analytical Chimica Acta* **2009**, 634: 135–152 3.

Pilon-Smits EAH, Quinn CF Selenium Metabolism in Plants. In: Hell R, Mendel R-R (eds) *Cell Biology of Metal and Nutrients* **2010**, 17: 225–241

Pyrzynska K. Selenium speciation in enriched vegetables. *Food Chemistry* **2009**, 114: 1183-1191

Rayman M P. Selenium and human health *Lancet* **2012**, 379: 1256-1268

Rayman M P. Selenium in cancer prevention: A review of the evidence and mechanism of action. *Proceedings of the Nutrition Society* **2005**, 64: 527-542

Rayman M P. Food-chain Se and human health: emphasis on intake. *British Journal of Nutrition* **2008**, 100: 254-268

Sanchez-Martinez M., Pérez-Corona T., Martinez-Villaluenga C., Frias J., Penas E., Porres J M., Urbano G., Camara C., Madrid Yolanda. Synthesis of [⁷⁷Se]-methylselenocysteine when preparing sauerkraut of [77Se]-selenite. Metabolic transformation of [77Se]-methylselenocysteine in Wistar rats determined by LC-IDA-ICP-MS. *Analytical Bioanalytical Chemistry* **2014**, 406: 7949-7958

Sager M. Selenium in agriculture, food, and nutrition. *Pure Applied Chemistry* **2006**, 78: 111-133

Shah M., Kannamkumarath S S., Wuilloud J C A., Wuilloud R G., Caruso J A. Identification and characterization of selenium species in enriched green onion (*Allium fistulosum*) by HPLC-ICP-MS and ESI-ITMS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2004**, 19: 381-386

Shen S., Kengeri S S., Xu H P., Shilittler D L., Chiang E., Chen Y. Selenium, DNA damage and apoptosis: Defining the optimal selenium dose for prostate cancer prevention. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **2006**, 47: 424-434

Suzuki, K.T., Somekawa, L., Kurasaki, K., Suzuki, N., Simultaneous tracing of ⁷⁶Se-selenite and ⁷⁷Se-selenomethionine by absolute labeling and speciation. *Toxicology Applied Pharmacology* **2006b**, 217: 43–50.

Suzuki K.T., Doi C Suzuki N. Metabolism of ⁷⁶Se-methylselenocysteine compared with of ⁷⁷Se-selenomethionine and ⁸²Se-selenite *Toxicology Applied Pharmacology*. **2006c**, 217: 185-195

Suzuki K T., Doi C Suzuki N. Simultaneous tracing of multiple precursors each labeled with different homo-elemental isotope by speciation analysis: Distribution and metabolism of four parenteral selenium sources *Pure Applied Chemistry* **2008**, *12*: 2699-2713

Suzuki Y., Hashiura Y., Sakai T., Yamamoto T., Matsukawa T., Shinohara A., Furuta N. Selenium metabolism and excretion in mice after injection of ⁸²Se-enriched selenomethionine. *Metallomics* **2013**, *5*: 445-452

Terry N., Zayed A M., de Souza M P., Tarun A S. Selenium in Higher Plant *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **2000**, *51*:401–32

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

Ximenez-Embun P., Alonso I., Madrid-Albarran Y., Camara C. Establishment of selenium uptake and species distribution in lupine, Indian mustard and sunflower plants. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **2004**, *52*: 832-838

Van Dael P., Lewis J., Barclay D. Stable isotope-enriched Selenite and selenate tracers for human metabolic studies: a fast and accurate method for their preparation from elemental selenium and their identification and quantification using hydride generation atomic adsorption spectrometry. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2004**, *18*: 75-80

Webster R K. *Methods of Geochemistry* (eds. A. A. Smales and L. R. Wagner), **1960** : 202–246. Interscience

Whanger P.D., Polan C.E., Uden P.C., Welbaum G. Tumorogenesis metabolism, speciation, bioavailability and tissue deposition of selenium in selenium-enriched ramps *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48*: 5726-5730

Wrobel K., Wrobel K., Kannamkumarath S S., Caruso J A., Wysocka I A., Bulska E. HPLC–ICP-MS speciation of selenium in enriched onion leaves – a potential dietary source of Se-methylselenocysteine. *Food Chemistry*, **2004**, *86*: 617–623.

Zayed A., Terry. N. Selenium volatilization in broccoli as influenced by sulfate supply. *Journal of Plant Physiology* **1994**, *143*: 8-14

Zayed A M., Lytle M., Terry N. Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Planta* **1998**, *206*: 284-292

Zhang Y., Pan G., Chen J., Hu Q. Uptake and transport of selenite and selenate by soybean seedlings of two genotypes. *Plant Soil* **2003**, *253*:437–443

Zhao F J., McGrath S P. Biofortification and phytoremediation. *Current Opinion in Plant Biology* **2009**, *12*: 373-380

Analytical and Bioanalytical Chemistry

Electronic Supplementary Material

Stable isotope tracing: a powerful tool for selenium speciation and metabolic studies in non-hyperaccumulator plants (ryegrass *Lolium Perenne* L.)

Pamela Di Tullo, Antoine Versini, Maïté Bueno, Isabelle Le Hécho, Yves Thiry, Philippe Biron, Maryse Castrec- Rouelleand Florence Pannier

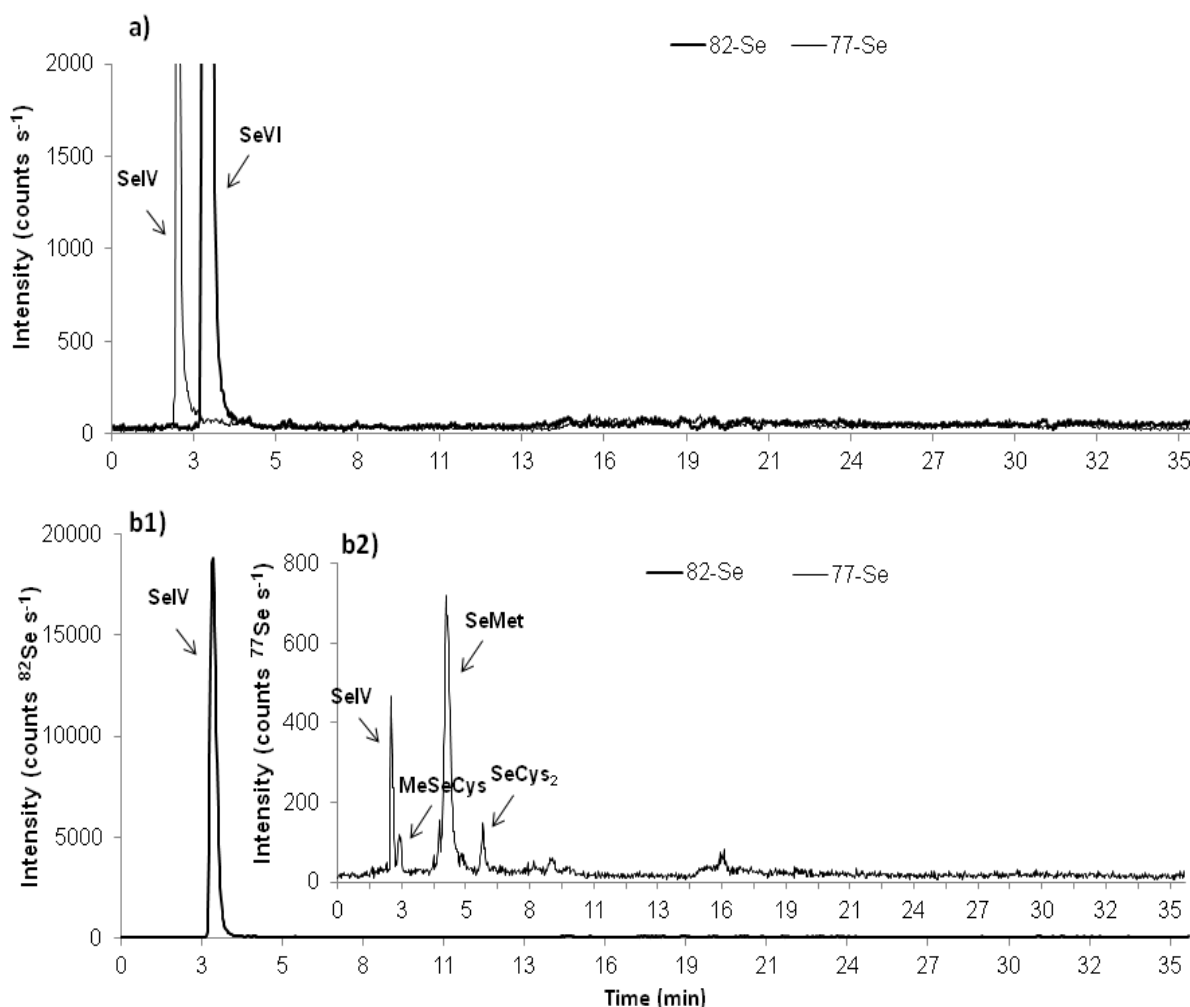


Fig S1 PGC- HPLC-ICP MS example chromatograms of water extracts **(a)** roots (for 77-Se and 82-Se tracer; diluted 10 times); **(b1)** leaves (for 82-Se; diluted 10 times); **(b2)** leaves (for 77-Se; not diluted). The y-scale of figure (a) is expanded in order to underline the absence of others peaks.

Table S1 Instrumental conditions in this study

ICP-MS	
<i>Sample introduction</i>	Concentric nebulizer Scott spray chamber (2°C)
<i>Plasma parameters</i>	
RF power	1500 W
Ar plasma gas flow rate	15 L min ⁻¹
Ar auxiliary gas flow rate	0.75-1.15 L min ⁻¹ optimized daily for best sensitivity ^(a)
<i>Sample and skimmer cones</i>	Platinum
<i>Ions lens setting</i>	Optimized daily for best sensitivity
<i>Reaction/collision parameters</i>	
H ₂ gas flow	4 mL min ^{-1(b)}
He gas flow	1 mL min ^{-1 (b)}
Octopole bias	-18 V ^(c)
Quadrupole bias	-17 V ^(c)
<i>Data acquisition parameters</i>	
Monitored isotopes	74, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82 and 83
Acquisition time per point (total analysis)	1 s (3 s per isotopes) ^(d)
Integration time per point (speciation)	0.2 s ^(e)
Replicates (total analysis)	3
HPLC	
SEC	
Column	Superdex Peptide 10/300 (4.1mm × 250mm × 10µm)
Flow rate	0.6 mL min ⁻¹
Injection volume	200 µL
Mobile phase	30 mM Tris-HCl Buffer, pH 7.5
Program	Isocratic
RP	
Column	Porous graphitic carbon (Thermo Hypercarb)
Flow rate	1 mL min ⁻¹
Injection volume	100 µL
Mobile phase	A: 240mM HCOOH + 1% MeOH + NH ₃ (pH=2.4) B: 240mM HCOOH +35% MeOH + NH ₃ (pH=2.4)
Gradient Program	0-10min: 100% A 10-15min : 100% A → 100% B 15-30min:100% B 30-31min:100% B → 100% A 31-45min: 100% A

^a Using a solution of 1 µg L⁻¹ of gallium, yttrium, thallium and cerium

^b Based on Tolu *et al.* 2014 [1]

^c Based on Darrouzés *et al.* 2005 [2]

^d Based on Hinojosa- Reyes *et al.* 2003 [3]

^e Calculated to give 22 measurement points per chromatographic peak providing an adequate peak profile for peak area integrations (Monperrus *et al.* 2004) [4]

Table S2 Total and species concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$) of two tracers (^{77}Se and ^{82}Se) in growing media replaced every two weeks.

Solutions	Date	$[^{77}\text{Se}]_{\text{tot}}$	$[^{77}\text{SeIV}]$	$[^{82}\text{Se}]_{\text{tot}}$	$[^{82}\text{SeVI}]$
Fresh (first two weeks)	Day 1	95 ± 2	96 ± 1	83 ± 3	79 ± 1
Old (first two weeks)	Day 15	32.0 ± 0.5	31.0 ± 0.2	28 ± 1	27 ± 0.5
Fresh (last two weeks)	Day 15	121 ± 3	119 ± 2	114 ± 4	113 ± 1
Old (last two weeks)	Day 30	50.0 ± 0.5	48 ± 1	44 ± 1	46 ± 1

References

1. Tolu J, Di Tullo P, Le Hécho I, Thiry Y, Pannier F, Potin-Gautier M, Bueno M (2014) A new methodology involving stable isotope tracer to compare simultaneously short- and long-term selenium mobility in soils. *Anal Bioanal Chem* 406:1221–1231. doi: 10.1007/s00216-013-7323-1
2. Darrouzes J, Bueno M, Lespes G, Potin-Gautier M (2005) Operational optimisation of ICP-octopole collision/reaction cell-MS for applications to ultratrace selenium total and speciation determination. *J Anal At Spectrom* 20:88. doi: 10.1039/b410142a
3. Hinojosa Reyes L, Marchante Gayon JM, Garcia Alonso JI, Sanz-Medel A (2003) Determination of selenium in biological materials by isotope dilution analysis with an octapole reaction system ICP-MS. *J Anal At Spectrom* 18:11–16. doi: 10.1039/b209213a
4. Monperrus M, Krupp E, Amouroux D, Donard OF., Rodríguez Martín-Doimeadios R. (2004) Potential and limits of speciated isotope-dilution analysis for metrology and assessing environmental reactivity. *TrAC Trends Anal Chem* 23:261–272. doi: 10.1016/S0165-9936(04)00313-9

Conclusion

Ce travail présente pour la première fois l'application du double traçage isotopique à un végétal, le ray-grass anglais, plante non accumulatrice, exposé en culture hydroponique à deux traceurs mono-spécifiques et quasiment mono-isotopiques ($^{77}\text{Se(IV)}$ et $^{82}\text{Se(VI)}$) afin de suivre simultanément leur bioincorporation. Dans un premier temps, un protocole d'extractions séquentielles permettant d'accéder à différentes fractions de sélénium présent dans les tissus végétaux (racines; feuilles) a été optimisé afin d'atteindre un rendement d'extraction maximal tout en assurant la stabilité des espèces séléniées extraites. Les deux espèces inorganiques de Se sont prélevées par le ray-grass avec des concentrations similaires en fin de culture en considérant la plante entière (racines + feuilles). Cependant, la distribution des traceurs entre les compartiments de la plante ainsi que leurs degrés de métabolisation dépendent de la forme sous laquelle Se est apporté au milieu de culture. En effet, le sélénite suite à son prélèvement, est fortement métabolisé dans les racines, sous forme de composés organiques et/ou, incorporé dans des protéines sous forme d'acides aminés séléniés et/ou, d'autres macromolécules de haut poids moléculaire, ce qui limite sa translocation vers les parties aériennes. Dans le cas du séléniate, il est essentiellement accumulé dans les feuilles essentiellement sous forme inorganique. L'incorporation de sélénite se traduit donc par une moindre accumulation dans les feuilles en comparaison avec celle du séléniate, tout en étant fortement métabolisé sous divers composés organiques dont certains sont bio-actifs (ayant une activité anticarcinogène). La production de végétaux enrichis à partir de sélénite semble donc présenter un intérêt nutritionnel supérieur qui reste à confirmer par l'identification des composés inconnus à l'aide de la spectrométrie de masse moléculaire. La méthodologie de double traçage isotopique mise en œuvre dans cette étude présente plusieurs avantages : un abaissement significatif des limites de détection permettant d'envisager l'analyse de spéciation de Se chez des plantes non accumulatrices, ainsi que la possibilité de suivre simultanément les réponses biologiques à divers composés du même élément. L'application de cette nouvelle approche peut être donc envisagée pour d'autres types de plantes ayant par exemple un intérêt pour l'alimentation humaine.

*Conclusions générales
et
perspectives*

Ce travail de recherche a été réalisé dans le contexte des études de sûreté préalables au futur stockage en couches géologiques profondes des déchets radioactifs dans lesquels est présent le radio-isotope de longue vie ^{79}Se . Une meilleure compréhension de la dynamique du cycle de Se dans les écosystèmes terrestres, et des mécanismes impliqués, est essentielle pour l'amélioration de la prévision des risques pour l'environnement et la santé publique d'une remobilisation potentielle de Se vers la surface. De plus, du fait de son caractère ambivalent, l'étude du comportement de Se dans les différents compartiments de la biosphère reste une préoccupation actuelle dans le cadre des procédures de décontamination des sols sélénifères ou à l'inverse lors de la fertilisation des sols pauvres en Se.

Les différents travaux menés durant cette thèse ont apporté des éléments de réponse autour des trois axes de recherche développés:

- (i) Etude de la dynamique du cycle biogéochimique de Se d'un écosystème forestier choisi comme modèle d'étude à long terme*
- (ii) Etude de la réactivité du sélénium (redistribution et spéciation) dans les sols par traçage isotopique et expérimentation sur le terrain*
- (iii) Etude de la bio-incorporation des deux formes inorganiques de Se dans la biomasse végétale par double traçage isotopique.*

Dans un premier temps, les processus globaux régissant la dynamique du cycle de Se au sein d'un écosystème forestier, une hêtraie, ont été évalués par une approche conventionnelle de modèle conceptuel à compartiments et à flux. Plus précisément, la distribution de Se dans la colonne de sol et sa répartition dans les différents compartiments de la hêtraie du site expérimental instrumenté de Montiers ont été déterminés. Les flux annuels communément utilisés pour décrire le cycle biologique au sein de la végétation ont été quantifiés. Enfin, un bilan "entrées-sorties" a également été établi. Une extrapolation des flux annuels, calculés sur une seule année de suivi, reste limitée, cependant notre travail présente pour la première fois une étude quantitative complète du cycle de Se dans un écosystème considéré *in toto*. Ces premiers résultats, à compléter par un suivi pluri-annuel et une estimation de la volatilisation de Se, sont déjà indicatifs des mécanismes qui contrôlent la biogéochimie du sélénium dans l'écosystème forestier, et permettent de mieux appréhender la modélisation du cycle de Se dans cet écosystème. Les principales caractéristiques du cycle global de Se mises en évidence sont rappelées ci-dessous:

- le sol se présente comme le principal réservoir de Se, sans variation de la concentration de Se total dans le profil (surface à -60 cm). La distribution de Se (extractions spécifiques) dans le profil de sol met en évidence des relations spécifiques entre Se/MO et, une influence de la nature de la MO sur la proportion de Se associée.
- le bilan "entrées-sorties" estimé est positif avec une moyenne annuelle de $1.09 \pm 0.01 \text{ g ha}^{-1}\text{y}^{-1}$. Une partie de Se entrant dans le système par les apports atmosphériques est prélevée par interception du feuillage et dans une moindre mesure par les racines des végétaux. Les pertes en Se par drainage profond sont très faibles (à confirmer avec le modèle hydrique quand il sera disponible), et peuvent indiquer une volatilisation de Se dans le sol.
- le flux annuel au sein des arbres (prélèvement racinaire et immobilisation dans les compartiments ligneux) mobilise une faible quantité de Se par rapport aux apports (pluie) et aux pools disponibles ou mobilisables du sol. Par conséquent, selon l'approche classique de description quantitative, le cycle biologique de Se lié au prélèvement et au turnover de la biomasse végétale semble jouer un rôle marginal dans le cycle global de Se. Néanmoins, la végétation peut avoir un impact sur la dynamique de Se dans l'écosystème; par exemple, à travers le turnover de la MO qui agit comme un bioréacteur à la surface du sol, et qui influence la transformation de Se. Par ailleurs le couvert végétal intercepte une partie de Se atmosphérique et peut participer à la réémission de Se dans l'atmosphère suite aux phénomènes de volatilisation.

Les résultats de cette première partie montrent que le sol représente une réserve importante de Se. L'étude des processus impliqués dans la rétention et la réactivité de Se dans le système sol constitue donc une suite logique et cette étape a été abordée en utilisant la méthodologie performante du traçage isotopique. Cette approche originale a permis d'étudier simultanément les cinétiques des évolutions de la distribution et de la spéciation du sélénium natif et fraîchement ajouté sous forme de sélénite ($^{77}\text{SeIV}$) dans trois sols (culture, forêt et prairie) incubés *in situ* pendant deux ans. Les résultats de cette expérimentation sur site ont clairement mis en évidence l'existence de processus lents impliqués dans la rétention de Se dans les sols. Le comportement du traceur ^{77}Se tend vers celui de Se naturellement présent sans toutefois le rejoindre après deux ans d'expérimentation. Le sélénium fraîchement ajouté reste toujours plus labile que Se natif et donc plus facilement mobilisable. Les données expérimentales

peuvent être correctement décrites par des expressions cinétiques associées à des processus chimiques et de diffusion, ceux-ci conduisant à une rétention de Se mettant en jeu des liaisons plus fortes avec les phases porteuses du sol.

En conséquence, une prévision à long terme à partir de résultats classiquement obtenus après dopage de sol et des temps de contact courts (cas des expériences en batch) peut fortement surestimer la mobilité de Se. Ainsi, les coefficients de partage solide/liquide (K_d) du sélénium fraîchement ajouté évoluent de façon plus ou moins rapide (6 mois à plus de 2 ans, en fonction du type de sol) vers les valeurs calculées en considérant le sélénium naturellement présent et peuvent donc conduire à une sous-estimation de la rétention de Se dans un contexte de prévision des risques à long terme lors d'une contamination.

La dernière partie de ce travail a porté sur l'étude du métabolisme du sélénium chez la plante, les végétaux représentant le premier maillon du transfert trophique terrestre de Se vers l'Homme et les animaux. Afin de distinguer les transformations métaboliques des deux espèces inorganiques couramment utilisées comme sources d'enrichissement en Se de végétaux destinés à l'alimentation, deux traceurs mono-isotopiques ($^{77}\text{Se(IV)}$ et $^{82}\text{Se(VI)}$) ont été utilisés simultanément. Le ray-grass anglais (*Lolium Perenne* L.), plante simple, à croissance rapide et non hyper-accumulatrice, a été cultivé en solution hydroponique dans une chambre de culture à atmosphère contrôlée. Cette approche de culture hors-sol permet de s'assurer de l'exposition simultanée de la plante aux mêmes concentrations des deux espèces de Se, contrairement aux cultures en pot pour lesquelles les biodisponibilités des deux formes sont difficilement contrôlables. Après optimisation d'un protocole d'extractions séquentielles permettant de distinguer différentes fractions du sélénium présent dans les tissus végétaux (racines et feuilles) les résultats montrent que les ions sélénite et séléniate sont prélevés avec des taux similaires au sein de la plante entière (racines + feuilles). La spéciation chimique du sélénium apporté au milieu de culture conditionne en revanche largement sa répartition dans les compartiments racinaires et aériens. Ainsi, le séléniate est rapidement transféré vers les parties aériennes alors que le sélénite est accumulé au niveau des racines. Des différences métaboliques sont également observées entre les deux formes sources de sélénium : près de 90% de Se(VI) prélevé par la plante reste sous forme de séléniate, alors que le sélénite est rapidement métabolisé en formes organiques qui sont en majorité incorporées dans des composés de haut poids moléculaire (i.e protéines contenant SeMet) et/ou dans des structures complexes accumulées dans les racines résistantes aux réactifs utilisés. Le type d'espèce

séléniée apportée lors de la fertilisation de sol va affecter la quantité ainsi que la qualité des apports en sélénium chez les mammifères, la spéciation de Se étant un paramètre déterminant dans son assimilation intestinale, sa toxicité et son caractère anticancérigène. Donc, d'un point de vue de l'alimentation humaine ou animale, bien que la supplémentation en sélénite conduise à une moindre accumulation de Se dans les feuilles, la production de végétaux enrichis à partir de cette espèce pourrait présenter un intérêt nutritionnel du fait de sa transformation en espèces organiques comprenant des composés bioactifs.

L'ensemble des sujets abordés et des résultats acquis au cours de cette thèse, conduit à de nombreuses perspectives de recherche de manière à confirmer certaines hypothèses, et affiner notre compréhension du devenir de Se dans l'environnement terrestre. Tout d'abord il apparaît que la caractérisation complète du cycle biogéochimique de Se dans un écosystème nécessite une *augmentation de la durée de suivi* et la prise en compte *des flux liés à la volatilisation*. En effet, la volatilisation du sélénium semble représenter une voie de sortie non négligeable y compris dans un écosystème non contaminé tel que le site étudié et peut donc représenter en cas de contamination accidentelle, une voie de dispersion atmosphérique de ^{79}Se . De nombreuses constantes ou taux de volatilisation de Se sont disponibles dans la littérature, très variables en général et plutôt mesurés pour des sols contenant des concentrations importantes de Se. Du fait de la complexité du processus de volatilisation, sa quantification précise sur site apparaît nécessaire afin de déterminer sa variabilité saisonnière et de tenir compte d'autres paramètres contrôlant son intensité, ainsi que les situations particulières pouvant les amplifier ou les inhiber.

En ce qui concerne la caractérisation du profil de Se dans le sol, les données acquises nécessitent d'être rapprochées d'une analyse plus fine des constituants du sol, afin de confirmer les hypothèses proposées concernant le rôle de la MO dans la rétention de Se. Il pourrait s'agir notamment d'une *caractérisation de la qualité de la matière organique aux différentes profondeurs* par pyrolyse-GC/MS, technique analytique permettant de préciser la nature de certains composés potentiellement présents (i.e composés aliphatiques, aromatiques, lignine...), leur source (microbienne, végétale) et par conséquent en déterminer la stabilité (Hilli *et al.*, 2011; Meharabian *et al.*, 2013).

L'étude de la réactivité de Se dans le sol (expérimentation de terrain par traçage isotopique et distribution de Se dans le profil de sol) renforce l'hypothèse précédente, déjà proposée dans

d'autres travaux, du rôle important de la matière organique dans la rétention de Se. Pour affiner cette hypothèse et, in fine, identifier les *composés séléniés inconnus dans les extraits de sol*, une caractérisation plus précise de la matière organique du sol est nécessaire. Une première étape pourrait être, par exemple de s'intéresser aux composés organiques labiles et à leur capacité de complexation et/ou oxydo-réduction de Se. Ceci pourrait être envisagé via une méthodologie de séparation chromatographique bidimensionnelle en couplage avec des détecteurs élémentaire et moléculaire. Etant donné les faibles concentrations de Se naturel dans les extraits de sols, les traceurs isotopiques stables pourraient être à nouveau utilisés pour étudier les interactions Se/MO dans les extraits de sol après purification et préconcentration des composés organiques extraits.

Des questions restent également en suspend sur le métabolisme du sélénium chez le ray-grass. Tout d'abord, *l'identification des composés associés aux pics inconnus*, observés dans les extraits enzymatiques, à l'aide de la spectrométrie de masse moléculaire est envisageable. Cependant le manque de sensibilité des détecteurs moléculaires (quelques ppm pour une identification adéquate des espèces,) par rapport à l'ICP-MS rend nécessaire des étapes de purification et pré-concentration qui sont donc à optimiser.

Le double marquage isotopique appliqué pour le ray-grass permet d'envisager le même type d'*études sur d'autres plantes*, présentant par exemple une importance pour l'alimentation humaine, comme le maïs par exemple, ou sur des systèmes de culture sur sol, afin de vérifier comment le type de sol et l'activité racinaire (rhizosphère) influencent la biodisponibilité et par conséquent le taux de prélèvement de différentes formes de sélénium.

Une perspective immédiate faisant suite à la production de biomasse végétale doublement enrichie en Se (^{82}Se majoritairement inorganique et, ^{77}Se majoritairement organique) concerne *l'étude de la remobilisation de Se bio-incorporé lors de sa décomposition*. Cette expérimentation sur site a débuté en décembre 2014 sur une parcelle de prairie de l'OPE et devrait permettre de suivre la libération de Se organique et inorganique à partir de la biomasse végétale ainsi que sa redistribution dans les différentes fractions de sol.

*Références
bibliographiques*

-A-

- Aaseth J., Haugen M., Forre O., Rheumatoid arthritis and metal compounds-perspectives on the role of oxygen radical detoxification. *Analyst* **1998**, *123*: 3-6
- Abrams M M., Burau R G., et Zasoski R J. Organic selenium distribution in selected California soils. *Soil Science Society of America Journal* **1990**, *54*: 979-982
- Aguilar M I., Hearn M T W. High resolution reversed phase high performance liquid chromatography of peptides and proteins. *Methods in Enzymology* **1996**, *270*: 201-234
- Akbarly N T., Arnaud J., Hinger-Favier L., Garlet V., Roussel A M., Ben C. Selenium and mortality in the elderly results from the EVA study. *Clinical Chemistry* **2005**, *51*: 2117-2123
- Akbaraly T N., Hinger-Favier I., Carrière I., Arnaud J., Gourlet V., Roussel A M., Berr C. Plasma selenium over time and cognitive decline in the elderly. *Epidemiology*. **2007**, *18*(1):52-8.
- Amoroux D., Donard O F X. Maritime emission of selenium to the atmosphere in eastern Mediterranean seas. *Geophysical Research Letters* **1996**, *23* (14) : 1777-1780
- Amoroux D., Pecheyran C., Donard O F X. Formation of volatile selenium species in synthetic seawater under light and dark experimental conditions. *Applied Organometallic Chemistry* **2000**; *14*: 236-244
- Amoroux D., Liss P S., Tessier E., Hamren-Larsson M., Donard O F X. Role of oceans as biogenic sources of selenium. *Earth and Planetary Science Letters* **2001**, *189*: 277-283
- Anderson J W. (1993) Selenium interactions in sulfur metabolism. In *Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants: Regulatory Agricultural and Environmental Aspects*
- Ansede J H., Pellechia P J., Yoch D C. Selenium biotransformation by the salt march cordgrass *Spartina alterniflora*: evidence for demethylselenioproprionate formation. *Environment Science Technology* **1999**, *33*: 2064-2069
- Arteel G E., Sies H., The biogeochemistry of selenium and glutathione system *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **2001**, *10*: 153-158
- Arvy M.P. Selenate and selenite uptake and translocation in bean plants *Phaseolus vulgaris* *Journal of Experimental Botany* **1993**, *44* (263): 1083-1087
- Ashworth D.J., Moore J. and Shaw G. Effects of soil type, moisture content, redox potential and methyl bromide fumigation on K_d values of radio-selenium in soil. *Journal of Environmental Radioactivity* **2008**, *99*: 1136-1142.
- Ashworth D J., Shaw G. Soil migration, plant uptake and volatilisation of radioselenium from a contaminated water table. *Science of the Total Environment* **2006**, *370*: 506-514.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2002b) Draft toxicological profile for selenium. U.S. Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2003) Toxicological profile for selenium. U.S. Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA

Auger J., Yang W., Arnault I., Pannier F., Potin-Gautier M. High-performance liquid chromatographic-inductively coupled plasma mass spectrometric evidence for Se-“alliins” in garlic and onion grown in Se-rich soil. *Journal of Chromatography A* **2004**, 1032: 103-107

Augusto L., Bakker M R., De Lavaissière C., Jordan-Meille L., Saur E. Estimation of nutrient content of woody plants using allometric relationships : quantifying the difference between concentration values from the literature and actuals *Forestry* **2014**, 82 (4): 463-477

Azaizeh H A., Gowthaman S. and Terry N. Microbial selenium volatilization in rhizosphere and bulk soils from a constructed wetland. *Journal of Environmental Quality* **1997**, 26: 666-672.

Azaizeh H.A., Salhani N., Sebesvari Z. and Emons H. (2003). The potential of rhizosphere microbes isolated from a constructed wetland to biomethylate selenium. *Journal of Environmental Quality* **2003**, 32: 55-62.

-B-

Bai X F., Li W H., Chen W M. The study on distribution of selenium in Chinese coals and its washability. *Journal of China Coal Society* **2003**, 28: 69-73

Balistreri L S., Chao T T. Adsorption of selenium by amorphous iron oxyhydroxide and manganese dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **1990**, 547: 39-751

Bañuelos G.S., Meek D.W., Wu L., Cook C., Akouhou S., Zambruski S., Evaluation of Different Plant Species Used for Phytoremediation of High Soil Selenium. *Journal of Environmental Quality* **1997**, 26 (3), 639-646.

Bañuelos G S., LeDuc Danika L., Pilon-Smits Elizabeth A H. Transgenic Indian mustard overexpressing selenocysteine lyase or selenocysteine methyltransferase exhibit enhanced potential for selenium phytoremediation under field conditions. *Environmental Science and Technology* **2007**, 41(2):599–605

Bañuelos G S., Lin Z-Q. Acceleration of selenium volatilization in seleniferous agricultural drainage sediments amended with methionine and casein. *Environmental Pollution* **2007**, 150: 306-312

Besser J M., Huckins J N., Little E E., La Point T W. Distribution and bioaccumulation of selenium in aquatic microcosms. *Environmental Pollution* **1989**; 62: 1-12

- Beauchemin D., Siu K W M., McLaren J W, Berman S.S. Determination of arsenic species by high-performance liquid chromatography Inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **1989**, 4: 285-287
- Bianga J. (2013) Développement d'une approche analytique analytique pour la caractérisation du sélénoprotéome in vivo. *Thèse de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour*
- Bitterli C., Bañuelos G S., Shulin R. Use of transfer factors to characterize uptake of selenium by plants. *Journal of Geochemical Exploration* **2010**, 107: 206-216
- Bleys J., Navas-Acien A., Guallar E. Selenium and diabetes: more bad news for supplements. *Annals of Internal Medicine* **2007**, 147: 271-272
- Borggard O K., Jorgensen S S., Moberg J P., Raben-Lange B. Influence of organic matter on phosphate adsorption by aluminium and iron oxides in sandy soils. *Journal of Soil Science* **1990**, 41: 443-449
- Borggard O K., Raben-Lange B., Gimsing A L., Strobel B W. Influence of humic substances on phosphate adsorption by aluminium and iron oxides. *Geoderma* **2005**, 127: 270-279
- Boulyga S F., Becker J S. ICP-MS with Hexapole Collision Cell for Isotope Ratio Measurements of Ca, Fe and Se. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **2001**, 370: 618-623.
- Broadley M R., White P J., Bryson R J., Meacham M C., Bowen H C., Johnson S E., Hawkesford M J., McGrath S P., Zhao F J, Breward N, Harriman M., Tucker M. Biofortification of UK food crops with selenium *Proceedings of the Nutrition Society* **2006**, 65: 169-181
- Broeckaert J A C. (2002) Analytical atomic spectrometry with flames and plasmas *Wiley-VCH, Weinheim, Germany*
- Broyer TC., Lee D C., Asher CJ. Selenium and nutrition of *Astragalus*. I. Effect of selenite or selenate supply on growth and selenium content. *Plant Soil* **1972**; 36: 635-49
- Brown T A. Shrift A. Selenium: toxicity and tolerance in higher plants. *Biological Reviews* **1982**; 57:59-84
- Bruggeman C., Maes A., Vancluysen J. and Vandemussele P. Selenite reduction in Boom clay: Effect of FeS₂, clay minerals and dissolved organic matter. *Environmental Pollution* **2005**, 137: 209-221.
- Bruggerman C., Maes A., Vancluysen J. The interaction of dissolved Boom Clay and Gorleben humic substances with selenium oxyanions (selenite and selenate). *Applied Geochemistry* **2007**, 22: 1371-1379

- Calderone S J., Frankenberger Jr W T., Parker D R., Karlson U. Influence of temperature and organic amendments on the mobilization of selenium in sediments. *Soil Biology & Biochemistry* **1990**, 22: 615-620.
- Campbell A D., A critical survey of hydride generation techniques in atomic spectroscopy, *Pure & Applied Chemistry* **1992**, 64(2): 227-244
- Cankur O., Yathavakilla S. K. V., Caruso J. A. Selenium speciation in dill (*Anethum graveolnes* L.) by ion pairing reversed phase and cation exchange HPLC with ICP-MS detection. *Talanta*, **2006**, 70: 784–790.
- Capelo J L., Fernandez C., Pedras B., Santos P., Vaz P G C, Trends in selenium determination/speciation by hyphenated techniques based on AAS or AFS, *Talanta*, **2006**, 68(5): 1442-1447
- Cartes P., Gianfreda L , Lora M.L Uptake of Selenium and its Antioxidant Activity in Ryegrass When Applied as Selenate and Selenite Forms. *Plant and soil* **2005**, 276: 359-367
- Cartes P., Jara, A A., Pinilla L., Rosas A., Mora M L. Selenium improves the antioxidant ability against aluminium-induced oxidative stress in ryegrass roots. *Annual of Applied Biology* **2010**; 156, 297-307.
- Caruso J A., Montes-Bayon M., Elemental speciation studies: news direction from trace metal analysis. *Ecotoxicology Environmental Safety*, **2003**, 56, 148-163
- Chabrouillet C. (2007) Etude de la rémobilitation d'éléments traces à partir d'un sol de surface contaminé: influence du vieillissement des composés organiques du sol sur la remobilization du selenium. Thèse de l'Université Joseph Fourier-Grenoble I
- Chander K., Goyal S., Nandal D P., Kapoor K K. Soil organic matter, microbial biomass and enzyme activities in a tropical agroforestry system. *Biology and Fertility of Soils* **1998**, 27: 168-172
- Chang J C., Gutenman W H, Reid C. M., and Lisk, D J., Selenium contents of brazil nuts from two geographic locations in Brazil, *Chemosphere*, **1995**, 30 : 801-802
- Chasteen T G, Bentley R. Biomethylation of selenium and tellurium : microorganisms and plants. *Chemical Reviews* **2003**, 103(1): 1-25
- Chau Y K., Wong P T S., Silverberg B A., Luxon P L., Bengert G A. Methylation of selenium in the aquatic environment. *Science* **1976**, 192: 1130-1131.
- Chen L., Yang F., Xu J., Hu Y., Hu Q., Zhang Y., Pan G J Determination of Se concentration of rice in China and effect of fertilization of selenite and selenate on Se content of rice. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* **2002**, 50(18): 5128–5130
- Chen X., Yang G., Chen J. Studies on the relations of selenium and Keshan disease. *Biological Trace Element Research* **1980**, 2: 91-107

- Cheng L., Lyman P F., Sturchio N C., Bedzyk M J. X-ray standing wave investigation of the surface structure of selenite anions adsorbed on calcite. *Surface Science* **1997**, 382: 690-695
- Chilimba A D C., Young S D., Black C R., Meacham MC, Lammel J, Broadley MR., Assessing residual availability of selenium applied to maize crops in Malawi. *Field Crops Research*. **2012**, 134:11–18
- Clark L C., Combs G F., Turnbull B W., Slate E H., Chalker D K., Chow J. Effect of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin: A randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association* **1996**, 276: 1957-1963
- Cole D W., Rapp M. Element cycling in forest ecosystems, in D. E. Reichle (ed.) *Dynamics Properties of Forest Ecosystems, International Biological Programme 23*, Cambridge, Cambridge University Press **1980**, 341-408.
- Collins R N., Tran N D., Bakkaus E., Avoscan L. Gouget B. Assessment of isotope exchange methodology to determine the sorption coefficient and isotopically exchangeable concentration of selenium in soils and sediments. *Environmental Science and Technology*. **2006**, 40: 7778-7783.
- Combs G F. Selenium in global food systems. *British Journal of Nutrition* **2001**, 85: 517-547
- Coppin F., Chabroullet C., Martin-Garin A., Balesdent J., Gaudet J P. Methodological approach to assess the effect of soil ageing on selenium behavior: first results concerning mobility and solid fractionation of selenium. *Biology and Fertility of Soils* **2006**, 42: 379-386
- Coppin F., Chabroullet C. Martin-Garin A. Selenite interactions with some particulate organic and mineral fractions isolate from a natural grassland soil. *European Journal of Soil Science* **2009**, 60: 369-376
- Cooke T D., Bruland K W. Aquatic chemistry of selenium: Evidence of biomethylation. *Environment Science and Technology* **1987**, 21: 1214-1219
- Cutter G.A., Bruland K W. The marine biogeochemistry of selenium: A re-evaluation. *Limnology Oceanography*. **1984**: 29, 1179–1192

-D-

- Darrouzèz J., Bueno M., Lespès G., Potin-Gautier M. Operational optimization of ICP-octopole collision/reaction cell-MS for applications to ultratrace selenium total and speciation determination. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2005**, 20: 88-94
- Darrouzèz J., Bueno M., Lespès G., Potin-Gautier M. Optimization of ICPMS collision/reaction cell conditions for the simultaneous removal of argon based interferences of arsenic and selenium in water samples. *Talanta* **2007**, 71: 2080-2084

- De Souza M P., Pilon-Smiths E A H., Lytle C M., Hwang S., Tai J., Honma T S U., Yeh L., Terry N. Rate-Limiting Step in Selenium Assimilation and Volatilization by Indian Mustard *Plant Physiology* **1998**, *117*: 1487-1494
- Desbrough G., DeWitt E., Desborough G., Jones J., Meier A., Leeker G. Preliminary Mineralogical and Chemical Studies related to the potential Mobility of Selenium and Associated Elements in Phosphoria Formation Strata, Southeastern Idaho. *USGS Open File Report* **1999**, 99-120
- Dhillon K S., Dhillon S K. Selenium accumulation by sequentially grown wheat and rice as influenced by gypsum application in a seleniferous soil. *Plant and Soil* **2000**, *227* (1-2), 243-248
- Djannaguiraman M., Prasad P V V., Seppanen M. Selenium protects sorghum leaves from oxidative damage under high temperature stress by enhancing antioxidant defense system. *Plant Physiology Biochemistry*. **2010**, *48*: 999-1007
- Dowdle P R., Oremland R S. Microbial oxidation of elemental selenium in soil slurries and bacterial cultures. *Environmental Science Technology* **1998**, *32*: 3749-3755
- Doran J W., Alexander M. Microbial formation of volatile selenium compounds in soil. *Soil Science Society of America Journal*, **1977a**, *41*: 70-73
- Duc M., Lefevre G., Fedoroff M., Jeanjean J., Rouchaud J C., Monteil-Rivera F., Dumonceau J., Milonjic S. Sorption of selenium anionic species on apatites and iron oxides from aqueous solutions. *Journal of Environmental Radioactivity*. **2003**, *70*: 61-72
- Duchaufour P. Introduction à la science du sol. Sol, végétation, environnement. 6^{ème} édition de l'abrégé de pédologie. Dunod, Paris (France). **2001**
- Dumont E. (2006) Hypenated techniques for speciation of Se in biological matrices. *Thèse de l'Université de Gent (Belgique)*.
- Dumont E., Vanhaecke F., Cornelis R., Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review *Analytical Bioanalytical Chemistry* **2006**, *385*: 1304-1323
- E-
- Ebdon L., Evans E.H. (Eds.), in: An introduction to analytical atomic spectrometry, J. Wiley and sons, (1998)
- Elfakir C., Chaimbault P., Dreux M. Determination of inorganic anions on porous graphitic carbon using evaporative light scattering detection. Use of carboxylic acids as electronic competitors *Journal of Chromatography A* , **1998**, *829* : 193-199.
- Ellis D R., Salt D E. Plants, selenium and human health. *Current Opinion in Plant Biology* **2003**, *6*: 273-279
- Elrashidi M A., Adriano D C., Workman S M., Lindsay W L. Chemical equilibria of selenium in soils: A theoretical development. *Soil Science* **1987**, *144*: 141-152

Eshadat Y., Holland D., Faltin Z., Ben-Hayyim. Plant glutathione peroxidase. *Physiology of Plant* **1997**, *100*: 234-240

Eurola M., Hietaniemi V. (2000) Report of the Selenium Monitoring Programme 1997-1999. Publications of Agricultural Research centre of Finland. Series B24. Jokoinen, Finland: Agricultural Research Centre of Finland

-F-

Fang Y., Wang L., Xin Z., Zhao L., An X., Hu Q. Effect of foliar application of zinc, selenium, and iron fertilizers on nutrients concentration and yield of rice grain in China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56(6)*:2079–2084

Faltin Z., Camoin L., Ben-Hayyim G., Perl A., Beeor-Tzahar T. Cysteine is the presumed catalytic residue of *Citrus sinensis* phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase over-expressed under salt stress. *Physiology of Plant*. **1998**, *104*: 741-46

Février L., Martin-Garin A., Leclerc E. Variation of the distribution coefficient (K_d) of selenium in soils under various microbial states. *Journal of Environmental Radioactivity* 2007, *97*: 189-205

Feldmann I., Jakubowski N., Stuewer D. Application of a hexapole collision and reaction cell in ICP-MS Part I: Instrumental aspects and operational optimization *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **1999**, *365*: 415-421.

Ferri T., Sangiorgio P. Selenium speciation in waters: role of dissolved polysaccharides on the mobilization process. *Annali di Chimica* **2001**, *91*: 229-38

Fernandez- Martinez A., Charlet L. Selenium environmental cycling and bioavailability: A structural chemist point of view. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. **2009**, *8*: 81-110

Floor G H., Roman-Ross G. Selenium in volcanic environments: A review. *Applied Geochemistry* **2012**, *27*: 517-531

Fordyce F M., Zhang G., Green K., Liu X. Soil, grain and water chemistry in relation to human selenium-responsive diseases in Enshi District, China. *Applied Geochemistry* **2000b**, *15*: 117-132.

Fordyce F. Selenium deficiency and toxicity in the environment. In: Selinus O, Alloway B, Centeno JA, Finkelman RB, Fuge R, Lindh U and Smedley P (ed) *Essentials of medical geology*. Elsevier, Amsterdam **2005**, 373-415

Fujita M., Ike M., Kashiwa M., Hashimoto R., Soda S. Laboratory-scale continuous reactor for soluble selenium removal using selenate-reducing bacterium, *Bacillus* sp. SF-1. *Biotechnology and Bioengineering* **2002**, *80*: 755–761.

-G-

- Gaillardet J., Viers J., Dupré B. (2003) Trace elements in river waters. In: Drever JI (ed) Surface and groundwater, weathering and soils In: Holland HD, Turekian KK (eds) Treatise on geochemistry. Elsevier, Oxford 225–227
- Galeas M L., Zhang L H., Freeman J L., Wagner M. Pilon-Smith E.A.H Seasonal fluctuations of selenium and sulfur accumulation in selenium hyperaccumulators and related nonaccumulators *New Phytologist* **2007**, 173(3): 517-525
- Gandois L., Nicolas M., VanderHeijden G., Probst A. The importance of biomass net uptake for a trace metal budget in a forest stand in north-eastern France. *Science of the Total Environment* **2010**, 408 (23): 5870-5877.
- Geering H R., Cary L E E., Jones L H P., Alloway W H. Solubility and redox criteria for possible forms of selenium in soils. *Soil Science Society of America Proceedings* **1968**, 32 (1) 35-40
- Genet A., Wernsdörfer H., Jonard M., Pretzsch H., Rauch M., Ponette Q., Nys C., Legout A., Ranger J., Vallet P., Saint-André L. Ontogeny partly explains the apparent heterogeneity of published biomass equations for *Fagus sylvatica* in central Europe *Forest Ecology and Management* **2011**, 261: 1188–1202
- George W G. (2003). Selenium and tellurium. In: survey USG (ed) Minerals Yearbook. USGS science for a changing world, Washington
- George MW. (2010) Selenium and tellurium. In: survey USG (ed) Minerals Yearbook. USGS science for a changing world, Washington
- Gil-Garcia C., Tagami K., Uchida S., Rigol A., Vidal M. New best estimates for radionuclide solid-liquid distribution coefficients in soils. Part 3: Miscellany of radionuclides (Cd, Co, Ni, Zn, I, Se, Sb, Pu, Am and others). *Journal of Environmental Radioactivity*. **2009**, 100 : 704-715
- Gissel-Nielsen G. Selenium concentration in Danish forage crops. *Acta Agriculturae Scandinavica* **1975**, 25: 216-220
- Gissel-Nielsen G., Gupta U C., Lamand M., Westmark T., Selenium in soils and plants and its importance in livestock and human nutrition. *Advances in Agronomy* **1984**, 37: 397-460
- Goh K H., Lim T T. Geochemistry of inorganic arsenic and selenium in a tropical soil: effect of reaction time, pH competitive anions on arsenic and selenium adsorption. *Chemosphere* **2004**, 55: 849-859
- Goldhber S B. Trace element risk assessment: Essential vs. toxicity. *Toxicity Regulatory Toxicology and Pharmacology* **2003**, 38: 232-242
- González Iglesias H., Fernández Sánchez M.L., García Alonso J.I. and Sanz-Medel A. Use of enriched ⁷⁴Se and ⁷⁷Se in combination with isotope pattern deconvolution to

- differentiate and determine endogenous and supplemented selenium in lactating rats. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2007**, 389: 707-713.
- Guenu S., Hennion M.C. Evaluation of new polymeric sorbents with high specific surface-area using an online solid-phase extraction liquid-chromatographic system for the trace-level determination of polar pesticides *Journal of Chromatography A* **1996**, 725: 57-66.
- Gustafsson J P., Johnsson L. Selenium retention in organic matter of Swedish forest soils. *Journal of Soil Science* **1992**, 43: 461-472
- Gustafsson J P, Johnsson L. The association between Selenium and Humic substances in forested ecosystems- Laboratory evidence *Applied Organometallic Chemistry* **1994**, 8: 141-147
- Guo L., Frankenberger W T Jr., Jury W A. Adsorption and degradation of dimethyl selenide in soil. *Environmental Science and Technology* **1999**, 33: 2934-2938
- H-
- Hansen D., Duda P J., Zayed A., Terry N. Selenium removal by constructed wetlands: role of biological volatilization. *Environmental Science Technology* **1998**, 32: 591-97
- Hartikainen H. Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. *Journal of Trace Element in Medicine and Biology* **2005**, 18: 309-318.
- Hartikainen H., Ekholm P., Piironen V., Xue T., Koivu T., Yli-Halla M. Quality of ryegrass and lettuce yields as affected by selenium fertilisation. *Agricultural and Food Science* **1997**, 6: 381-387.
- Hartikainen H., Xue T. The promotive effect of selenium on plant growth as triggered by ultraviolet irradiation. *Journal of Environmental Quality*. **1999**, 28: 1372-1375
- Hartikainen H., Xue T., Piironen V. Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant Soil* **2000**, 225: 193-200
- Hatfield D L., Gladyshev V N. The Outcome of Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT) Reveals the Need for Better Understanding of Selenium Biology. *Molecular Intervention* **2009**, 9(1): 18-21
- Hathcock J N. Vitamins and minerals: efficacy and safety. *American Journal of Clinical Nutrition* **1997**, 66: 427-437
- Hayes K F., Roe A L., Brown Jr G E., Hodgson K O., Leckie J O. Parks G.A. (1987). In situ x-ray absorption study of surface complexes: Selenium oxyanions on α -FeOOH. *Science* **1987**, 238: 783-786.
- Haygarth P M., Jones K C., Harrison A F. Selenium cycling through agricultural grasslands in the UK: budgeting the role of the atmosphere. *Science of Total Environment* **1991**, 103: 89-111

- Haygarth P M., Harrison A F., Jones K C. Geographical and Seasonal Variation in Deposition of Selenium to Vegetation. *Environmental Science and Technology* **1993**, 27: 2878-2884
- Haygarth PM. (1994) Global importance and global cycling of selenium. In :W.T. Frankenberger JR SB (ed) *Selenium in the environment*. DEKKER, New York
- Havlin J L., Westfall D G., Olsen S R. Mathematical models for potassium release kinetics in calcareous soils. *Soil Science Society of American Journal* **1985**, 49: 371-376
- Herbel M J., Switzer Blum J., Oremland R S., Borglin S.E. Reduction of elemental selenium to selenide: experiments with anoxic sediments and bacteria that respire Se-oxyanions. *Geomicrobiology Journal* **2003**, 20: 587-602.
- Hillel D. (1971) *Soil and Water: Physical Principles and Processes*. Academic Press, New York
- Hilli S., Stark S., Willfor S., Smeds A., Reunanen M., Hautajarvi R. What is the composition of AIR? Pyrolysis-GC-MS characterization of acid-insoluble residue from fresh litter and organic horizons under boreal forests in southern Finland. *Geoderma* **2012**, 179-180: 63-72
- Hinojosa Reyes L., Marchante-Gayón J.M., García Alonso J.I. and Sanz-Medel A. Determination of selenium in biological materials by isotope dilution analysis with an octopole reaction system ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **2003**, 18: 11-16.
- Hinojosa Reyes L., Moreno Sanz F., Herrero Espiléz P., Marchante-Gayon, Garcia Alonso J.I., Sanz-Medel. Biosynthesis of isotopically enriched selenomethionine: application to its accurate determination in selenium-enriched yeast by isotope dilution analysis-HPLC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2004**, 19: 1230-1235
- Hingston F J., Posner A M., Quirk J P. Adsorption of selenite by goethite. *Advances in Chemistry Series* **1968**, 79: 82-90
- Hintelmann E., Evans R D. Application of stable isotopes in environmental tracer studies- Measurement of monomethylmercury (CH_3Hg^+) by isotope dilution ICP-MS and detection of species transformation. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1997**, 358: 378-385
- Hintelmann H., Harris R. Application of multiple stable mercury isotopes to determine the adsorption and desorption dynamics of Hg(II) and MeHg to sediments. *Marine Chemistry*. **2004**, 90: 165-173.
- Hirai MY., Fujiwara T., Awazuhara M., Kimura T., Noji M., Saito K. *Global expression profiling of sulphur-starved Arabidopsis by DNA microarray reveals the role of O-acetyl-L-serine as a general regulator of gene expression in response to sulphur nutrition*. *The Plant Journal*. **2003a**, 33: 651-663.

- Hoagland D R., Arnon D.I. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* **1950**, 347:1-32.
- Hoffman E., Stroobant V. (2007) Mass spectrometry: principes and applications. Wiley-Interscience
- Holben D.H., Smith A.M., The diverse role of selenium within selenoproteins (A review). *Journal of American Dietetic Association*. **1999**, 99: 836-843
- Hopper J L., Parker D R. Plant availability of selenite and selenate as influenced by the competing ions phosphate and sulfate *Plant and Soil* **1999**, 210: 199–207
- Hu X., Wang F. Harris R. Selenium concentration, speciation and behavior in surface waters of the Canadian prairies. *Science of Total Environment* **2009**, 407: 5869-5876
- Hu Q., Chen L., Xu J., Zhang Y., Pan G. Determination of selenium concentration in rice and the effect of foliar application of Se-enriched fertilizer or sodium selenite on the selenium content of rice. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2002**; 82: 869-872
- Hurtevent P., Thiry Y., Levchuk S., Yoschenko V., Henner P., Madoz-Escande C., Leclerc E., Colle C., Kashparov V. *Journal of Environmental Radioactivity* **2013**, 121: 43-54
- I-
- IAEA (1994) International Atomic Energy Agency *Technical Report Series No. 364*
- IAEA. (2010) Handbook of parameter values for the prediction of radionuclides transfer in terrestrial and freshwaters environments-technical report series no. 472. IAEA, Vienna
- Iglesias M., Gilon N., Poussel E., Mermet J M. Evaluation of an ICP-Collision/Reaction Cell-MS System for the Sensitive Determination of Spectrally Interfered and Non-Interfered Elements Using the Same Gas Conditions. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2002**, 17, 1240-1247
- Imai I., Itakura S., Matsuyama Y. Yamaguchi M. Selenium requirement for growth of a novel red tide flagellate *Chattonella verruculosa* (Raphidophyceae) in culture. *Fisheries Science* **1996**, 62, 834-835.
- Ip C., Lisk D J., Bioavailability of selenium from selenium-enriched garlic. *Nutrition and Cancer*, **1993**, 20: 129-137
- Ip C., Birringer M., Block E., Kotrebai M., Tyson J F., Uden P C., Lisk D J. Chemical speciation influences comparative activity of selenium-enriched garlic and yeast in mammary cancer prevention. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **2000b**, 48: 4452-4459.

-J-

Johansson L. Selenium uptake by plants as a function of soil type, organic matter content and pH *Plant and soil* **1991**, *138* (1) 67-73

Johansson L., Gafvelin Arner E S J. Selenocysteine in proteins—Properties and biotechnological use *Biochimica & Biophysica Acta-General Subjects*. **2005**, *1726*:1-13

Johnson C C., Ge X., Green K A., and Liu X. Selenium distribution in the local environment of selected villages of the Keshan Disease belt, Zhangjiakou District, Hebei Province, Peoples's Republic of China. *Applied Geochemistry* **2000**, *15*: 385-401

Jones R I., Salonen K., De Haan H. Phosphorous transformation in the epilimnion of humic lakes: abiotic interactions between dissolved humic materials and phosphate. *Freshwater Biology* **1988**, *19*: 357-369

Jörg G., Bühnemann R., Hollas S., Kivel N., Kossert K., Van Winckel S., Gostomski CL. Preparation of radiochemically pure (79)Se and highly precise determination of its half-life. *Applied Radiation and Isotopes* **2010**, *68*: 2339-2351

-K-

Kabata-Pendias A. Mukherjee A B (2007) Trace Elements from Soil to Human. Springer

Kabata-Pendias A. Pendias H. (2001) Trace elements in soils and plants. CRC Press, London

Kaiser K., Guggenberger G. Mineral surfaces and soil organic matter. *European Journal of Soil Science* **2003**, *54*: 219-236

Kaljonen T. Selenium in certain igneous rocks. *Bulletin of the Geological Society of Finland*. **1973a**, *45*:9-22

Kamei- Ishikawa N., Tagami K., Uchida S. Sorptions kinetics of selenium on humic acid. *Journal of Radiological and Nuclear Chemistry* **2007**, *274*:555-561

Kamei-Ishikawa N., Nakamaru Y., Tagami K. and Uchida S. (2008). Sorption behavior of selenium on humic acid under ioncreasing selenium concentration or increasing solid/liquid ratio. *Journal of Environmental Radioactivity* **2008**, *99*: 993-1002.

Kang M., Ma B., Bardelli F., Chen Fanrong., Chunli Liu., Zheng Zhong., Wu Shijun., Charlet L. Interaction of aqueous Se(IV)/Se(VI) with FeSe/FeSe₂: Implication to Se redox process. *Journal of Hazardous Materials* **2013**, *248-249*: 20-28

Kang Y., Yamada H., Kyuma K., Hattori T. and Kigasawa S. Selenium in soil humic acid. *Soil Science and Plant Nutrition* **1991**, *37*: 241-248.

Kápolna E., Shah M., Caruso J A., Fedor P. Selenium speciation studies in Se-enriched chives (*Allium schoenoprasum*) by HPLC-ICP-MS. *Food Chemistry* **2007**, *101*: 1398-1406

- Kápolna E., Hillestrøm P R., Laursen K S., Husted S., Larsen E H. Effect of foliar application of selenium on its uptake and speciation in carrot. *Food Chemistry* **2009**, *115*:1357-1363
- Karlson U., Frankenberger Jr W T. Effects of carbon and trace element addition on alkylselenide reduction by soil. *Soil Science Society of America Journal* **1988**, *52*: 1640 -1644.
- Karlson U., Frankenberger W T. Accelerated rates of selenium volatilisation from California soils. *Soil Science Society of America Journal* **1989**, *53*: 749-753
- Ketterings Q M., Coe R., van Noordwijk M., Ambagau Y., Palm C A. Reducing uncertainty in the use of allometric biomass equations for predicting above-ground tree biomass in mixed secondary forests. *Forest Ecology and Management* **2001**; *146* (1-3): 199-209.
- Kleber M., Sollins P., Sutton R. A conceptual model of organo-mineral interactions in soils: self-assembly of organic molecular fragments into zonal structures on mineral surfaces. *Biogeochemistry* **2007**, *85*: 9–24.
- Klein M., Ouerdane L., Bueno M., Pannier F. Identification in human urine and blood of a novel selenium metabolite, Se-methylselenoneine, a potential biomarker of metabolism in mammals of the naturally occurring selenoneine, by HPLC coupled to electrospray hybrid linear ion trap-orbital ion trap MS. *Metallomics* **2011**, *3*(5): 513-520
- Koch-Steindl H., Pröhl G. Considerations on the behaviour of long-lived radionuclides in soil. *Radiation and Environmental Biophysic*, **2001**, *40*: 93–104.
- Kotrebai M., Birringer, M., Tyson, J.F., Block, E., Uden P.C., Selenium speciation in enriched and natural samples by HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS with perfluorinated carboxylic acid ion-pairing acid *Analyst* **2000a**, *125*:71-78
- Kulp T R., Pratt L M. Speciation and weathering of selenium in upper cretaceous chalk and shale from South Dakota and Wyoming, USA. *Geochemica et Cosmochimica Acta* **2004**, *68*: 3687-3701

-L-

- Labbé J F. (2011) Christmann P. Panorama mondial 2010 du marché du sélénium *BRGM/RP - 60202*
- Larsen E H., Sloth J J., Hansen M., Moesgaard S, Selenium speciation and isotope composition in ⁷⁷Se-enriched yeast using gradient elution HPLC separation and ICP-dynamic reaction cell-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2003**, *18* (4): 310-316
- Larsen E H., Lobinski R., Burger-Mayer K., Hansen M., Ruziuk R., Mazurowska L. Uptake and speciation of selenium in garlic cultivated in soil. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2006**, *385*: 1098-1108

- Le Hécho I., Tolu J., Thiry Y., Bueno M., Potin-Gautier M. Influence of selenium speciation and fractionation on its mobility in soils. Chapter 7 In: Selim HM, editor. *Competitive sorption and transport of heavy metals in soils and geological media*. USA:CRC Press; **2012**.
- Lemly A D. Guidelines for evaluating selenium data from aquatic monitoring et assessment studies. *Environmental and Monitoring Assessment* **1993**, 28: 83-100
- Lemly A D. Aquatic selenium pollution is a global environmental safety issue. *Ecotox. Environ. Safe.* **2004**, 59: 44-56
- Lenoble V., Laclautre C., Serpaud B., Deluchat V. and Bollinger J.-C. As(V) retention and As(III) simultaneous oxidation and removal on a MnO₂-loaded polystyrene resin. *Science of the Total Environment* **2004b**, 326(1-3): 197-207
- Lenz M., Hommes G., Corvini Ph F X., van Hullebusch E D. & Lens P N L. Selenate Removal in methanogenic and sulfate reducing upflow anaerobic sludge bed reactors. *Water Research* **2008**, 42(8-9), 2184-2194.
- Lenz M., Lens P N L. The essential toxin: the changing perception of selenium in environmental sciences. *Science of the Total Environment*. **2009**, 407: 3620-3633
- Leonhard P., Pepelnik R., Prange A., Yamada N., Yamada T. Analysis of diluted sea-water at the ng L⁻¹ level using an ICP-MS with an octopole reaction cell *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2002**, 17:189-196.
- Lequy E. (2012) Dépôts atmosphériques particuliers sur les écosystèmes forestiers de la moitié nord de la France: influence sur les cycles biogéochimiques. *Thèse de l'Université de Lorraine*.
- Leustek T., Murillo M. Cervantes M. Cloning of a cDNA encoding ATP sulfurylase from *Arabidopsis thaliana* by functional expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiology* **1994**, 105:897-902
- Leustek T., Saito K. Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiology* **1999** 120: 637-643
- Lewis B G., Johnson C M., Broyer T C. Volatile selenium in higher plants. The production of dimethyl selenide in cabbage leaves by enzymatic cleavage of Se-methyl selenomethionine selenonium salt. *Plant Soil* **1974**, 40 : 107-118
- Li H F., McGrath S P., Zhao F J., Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. *New Phytologist* **2008**, 178 (1), 92-102
- Li S H., Xiao T F., Zheng B S. Medical geology of arsenic, selenium and thallium in China. *Science of Total Environment* **2011**, 421-422: 31-40.
- Lobinski R., Edmonds J.S., Suzuki K.T., Uden P.C., *Pure Appli. Chem.*, **2000**, 72: 447-461

- Lombi E., Hamon R E., McGrath S. P., McLaughlin M. J. Lability of Cd, Cu, and Zn in Polluted Soils Treated with Lime, Beringite, and Red Mud and Identification of a Non-Labile Colloidal Fraction of Metals Using Isotopic Techniques. *Environmental Science and Technology*. **2003**, 37 (5): 979-984.
- Longchamp M., Angeli N., Castrect-Rouelle M. Selenium uptake in Zea mays supplied with selenate or selenite under hydroponic conditions. *Plant Soil* **2013**, 362: 107-117
- Losi M E., Frankenberger Jr W T Microbial oxidation and subilization of precipitated element selenium in soil *Journal of Environmental Quality* **1998**, 27: 836-843
- Lyons G H., Stangoulis J C R., Graham R D. High-selenium wheat: biofortification for better health. *Nutrition Research Reviews* **2003**, 16: 45–46
- M-
- Malisa E P. The behavior of selenium in geological processes. *Environmental Geochemistry and Health*. **2001**, 23: 137-158
- Manceau A., Charlet L. The mechanism of selenate adsorption on goethite and hydrous ferric oxide. *Journal of Colloid Interface Science* **1994**, 168: 87–93.
- Marchante-Gayon, J. M.; Thomas, C.; Feldmann, I.; Jakubowski, N. Comparison of different nebulizers and chromatographic techniques for the speciation of selenium in nutritional commercial supplements by hexapole collision and reaction cell ICP-MS *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2000**, 15: 1093-1102.
- Marchante-Gayon J M., Feldman I., Thomas C., Jakubowski N. Speciation of selenium in human urine by HPLC-ICP-MS with a collision and réaction cell. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2001**, 16: 457-463
- Marcic C. (2005) Evaluation des polluants organostanniques dans le système sol-plante à partir de l'épandage de boue de station d'épuration. *Thèse de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour*.
- Martens, D A., and. Suarez D L. Selenium speciation of marine shales, alluvial soils and evaporation basin soils of California. *Journal of Environmental Quality* **1997b**, 26: 424-432.
- Marschner, H., *Mineral Nutrition of Higher Plants* **1999** Academic Press, London
- Masscheleyn P H., Delaune R D., Patrick W H. Transformation of selenium as affected by sediment oxidation-reduction potential and pH. *Environmental Science and Technology* **1990**, 24: 91-96
- Masscheleyn P H., Dealune R D. Arsenic and Selenium Chemistry as affected by Sediment Redox Potential and pH *Journal of Environmental Science & Health* **1991**, 26: 555-573
- Matamoros-Veloza A., Newton R J., Benning L G. What controls selenium release during shale weathering? *Applied Geochemistry* **2011**, 26: S222-S226

- Mawej D., Falnoga I., Veber M., Stibilj V., Determination of selenium species in plant leaves by HPLC–UV–HG-AFS. *Talanta* **2006**, 68: 558-568
- Mazan, S.; Gilon, N.; Cretier, G.; Rocca, J. L.; Mermet, J. M. Inorganic selenium speciation using HPLC-ICP-hexapole collision/reaction cell-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2002**, 17: 366-370
- McSheely S., Yang W., Panier F., Szpunar J., Lobinski R., Auger J., Potin-Gautier M. Speciation analysis of selenium in garlic by two-dimensional high-performance liquid chromatography with parallel inductively coupled plasma mass spectrometric and electrospray tandem mass spectrometric detection *Analitica Chimica Acta* **2000**, 421: 147-151
- Mc Sheehy S., Mester Z., The speciation of natural tissues by electrospray-mass spectrometry. II: Bioinduced ligands and environmental contaminants. *Trends in Analytical Chemistry*, **2003**, 22, 210-224
- Mehrabanian M. Molecular geochemistry of soil organic matter by pyrolysis gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) technique: A review. *Journal of Soil Science and Environmental Management* **2013**, 4 (2): 11-16
- Meija J, Montes-Bayon M, Le Duc D, Terry N and Caruso J A Simultaneous monitoring of volatile selenium and sulfur species from selenium accumulating plants (wild type and genetically) by GC/MS and GC/ICPMS using solid-phase microextraction for sample introduction. *Analytical Chemistry* **2002**, 74: 5837-5844
- Michalke B. The coupling of LC to ICP-MS in element speciation Part II: recent trends in application. *Trend in Analytical Chemistry* **2002**, 21: 154-165
- Michel M., Buszewski B. Porous graphitic carbon sorbents in biomedical and environmental applications. *Adsorption* **2009**, 15(2): 193-202.
- Monperrus M, Krupp E, Amouroux D, Donard OFX, Rodriguez Martin-Doimeadios RC Potential and limits of speciated isotope-dilution analysis for metrology and assessing environmental reactivity. *Trends in Analytical Chemistry* **2004**, 23: 261-272
- Montaser A. (ED), *Inductively coupled plasma mass spectrometry*, Wiley-VCH, New York, USA, **1998**
- Montes-Bayón M., Grant T D, Meija J, Caruso J A., Selenium in plants by mass spectrometric techniques: developments in bio-analytical methods *Journal of Analytical Spectrometry* **2002**, 17: 1015-1023
- Montes-Bayón M., De Nicola K., Caruso J. Liquid chromatography-inductively coupled mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2003**, 1000: 457-476
- Monteil-Rivera F., Fedoroff M., Jeanjean J., Minel L., Barthes M G. and Dumonceau J. Sorption of Selenite (SeO_3^{2-}) on Hydroxyapatite: An Exchange Process. *Journal of Colloid and Interface Science* **2000**, 221: 291-300

- Monteil-Rivera F., Masset S., Dumonceau J., Federoff M., Jeanjean J. Sorption of selenite ions on hydroxyapatite. *Journal of Materials Science Letters* **1999**, 18: 1143-1145
- Mosher B W. and Duce R A. A global atmospheric selenium budget. *Journal of Geophysical Research* **1987**, 92: 13289-13298
- Mounicou S, Vonderheide AP, Shann JR and Caruso JA. Comparing a selenium accumulator plant (*Brassica juncea*) to a nonaccumulator plant (*Helianthus annuus*) to investigate selenium -containing proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2006**, 386: 1367-78
- Munier-Lamy C, Deneux-Mustin S, Mustin C, Merlet D, Berthelin J, Leyval C. Selenium bioavailability and uptake as affected by four different plants in a loamy clay soil with particular attention to mycorrhizae inoculated ryegrass. *Journal of Environmental Radioactivity*. **2007**, 97(2-3): 148-58.
- N-
- Nakamaru Y., Tagami K., Uchiga S. Distribution coefficient of selenium in Japanese agricultural soils. *Chemosphere* **2005**, 58: 1347-1354
- Nakamaru Y., Tagami K., Uchida S. Effect of phosphate addition on the sorption-desorption reaction of selenium in Japanese agricultural soils. *Chemosphere* **2006**, 63: 109-115
- National Research Council. Dietary Reference Intakes (DRI). National Academy Press, Whashington (**2000**)
- Navarro-Alarcón M., Lopez-Ga de la Serrana H., Perez-Valero V., Lopez-Martinez M.C.,elenium concentrations in serum of individuals with liver diseases (cirrhosis or hepatitis): relationship with some nutritional and biochemical markers *Science of Total Environment*, **2002**, 291: 135-141
- Neal R H., Sposito G. Selenate adsorption on alluvial soils. *Soil Science Society of America Journal* **1989**, 53(1): 70-74
- Neuhierl B., and Boeck A. On the mechanism of selenium tolerance in selenium-accumulating plants: purification and characterization of a specific selenocysteine methyltransferase from cultured cells of *Astragalus bisulcatus*. *European Journal of Biochemistry* **1996**, 239: 235-238
- Neuhierl B., Thanbichler M., Lottspeich F., Boeck A., 1999. A family of S-methylmethionine-dependent thiol/selenol methyltransferases: role in selenium tolerance and evolutionary relation. *Journal of Biology and Chemistry* **1999**, 274: 5407-5414
- Nichols A L., Aldama D L., VerPELLI. Handbook of Nuclear Data for Safeguards. *International Atomic Energy Agency, Vienna (Austria)*. INDC(NDS)-0534 **2008**
- Nriagu J O., A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature* **1989**, 338: 47-49.

-O-

- O'Brien S E., Acon B W., Boulyga S F., Becker J S., Dietze H J. Reduction of molecular ion interferences with hexapole collision cell in direct injection nebulization–inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2003**, *18*: 230-238.
- Ogra Y., Kitaguchi T., Ishiwata, K., Suzuki, K.T Simultaneous speciation of selenium and sulfur species in selenized odorless garlic (*Allium sativum* L. Shiro) and shallot (*Allium ascalonicum*) by HPLC-inductively coupled plasma-(octopole reaction system)-mass spectrometry and electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2005**, *1093*: 118-125
- Ohta Y., Koboyashi Y., Konishi S., Hirano S. Speciation Analysis of Selenium Metabolites in Urine and Breath by HPLC- and GC-Inductively Coupled Plasma-MS after Administration of Selenomethionine and Methylselenocysteine to Rats. *Chemical Research in Toxicology* **2009**, *22*: 1795-1801
- Oldfield J E. Risk and benefits in agricultural uses of selenium. *Environmental Geochemistry and Health*. **1992**, *14*: 81-86
- Oldfield J E. (1999) The case for selenium fertilisation: an update. In STDA Bulletin
- Oremland R S., Hollibaugh J T., Maest A S., Presser T S., Miller L G., Culbertson C W. Selenate reduction to elemental selenium by anaerobic bacteria in sediments and culture: biogeochemical significance of a novel, sulfate-independent respiration. *Applied and Environmental Microbiology* **1989**, *55* (9): 2333–2343.
- Oremland R.S., Herbel M.J., Switzer Blum J., Langley S., Beveridge T J., Ajayan P M., Ellis A V., and Curran S. Structural and spectral features of selenium nanospheres produced by Se-respiring bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **2004**, *70*: 52-60

-P-

- Palacios O., Ruiz-Encinar J., Shaumloffel D., Lobinski R. Fraction of selenium-containing proteins in serum by multiaffinity liquid chromatography before size-exclusion chromatography-ICPMS *Analytical Bioanalytical Chemistry* **2006**, *384*: 1276-1283.
- Peak D. Adsorption mechanisms of selenium oxyanions at the aluminum oxide/water interface. *Journal of Colloid and Interface Science* **2006**, *303*: 337-345.
- Pedrero Z., Elvira D., Camara C. Selenium species bioaccessibility in enriched radish (*Raphanus sativus*): A potential dietary source of selenium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*: 2412-2417
- Pedrero Z., Madrid Y., Hartikainen H., Camara C. Protective effect of selenium in broccoli (*Brassica oleracea*) plants subjected to cadmium exposure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008** *56*: 266-271

- Peng A., Yang C.L., Rui H.F., Li H., Study on the pathogenic factors of Kashin-Beck disease. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **1992**, 35: 79-90
- Pilon-Smith E., Hwang S., Lytle C M., Zhu Y., Tai J C., Bravo R C., Chen Y., Leustek T., Terry N. Overexpression of ATP Sulfurylase in Indian Mustard leads to increased selenate uptake, reduction, and tolerance. *Plant Physiology* **1999**, 119: 123-132
- Pilon-Smits E A H., and Colin F. Quinn. Selenium metabolism in plant *Cell Biology of Metals and Nutrients* **2010**,17: 225-241
- Pickering I J., Prince R C., Salt D E., George G N. Quantitative, chemically specific imaging of selenium transformation in plants. *Proceedings of National Academy of Science USA* **2000**, 97: 10717–1072
- Plant JA, Kinniburgh DG, Smedley PL, Fordyce FM, Klinck BA (2004) Arsenic and selenium. In: Dollar BS (ed) *Environmental Geochemistry* 9: 17–66
- Ponce de Leon C A., Montes-Bayon M., DeNicola, Caruso, J.A. Elemental speciation by chromatographic separation with inductively plasma mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A* **2002**, 974: 1-21
- Ponce de Léon C A., DeNicola K., Montes-Bayon M., Caruso J A. Sequential extractions of selenium soils from Stewart Lake: total selenium and speciation measurement with ICP-MS detection. *Journal of Environmental Monitoring* **2003**, 5: 435-444
- Potin-Gautier M., Seby M., Astruc M., Interference of humic substances on the speciation analysis of inorganic selenium in waters and soils by DPCSV. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1995**, 351: 443-448
- Premarathna H L, McLaughlin M J, Kirby J K, Hettiarachchi G M, Beak D, Stacey S. Potential availability of fertilizer selenium in field capacity and submerged soils. *Soil Science Society American Journal*. **2010**, 74: 1589-96
- Presser T S and Ohlendorf H M. Biogeochemical cycling of selenium in the San Joaquin Valley, California, USA, *Environmental Management* **1987**, 11: 805-821
- Price, N.M.; Thompson, R.A.; Harrison, P.J. Selenium: An essential element for growth of the coastal marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Journal of Phycology* **1987**, 23: 1–9.
- Pyrzynska K., Selenium speciation in enriched vegetables. *Food Chemistry* **2009**, 114: 1183-1191
- Pukacka S., Ratajczak E., Kalembe., E. The protective role of selenium in recalcitrant *Acer saccharum* L. seeds subjected to desiccation. *Journal of Plant Physiology* **2011**, 168: 220-225

-R-

- Ramirez Jr P., Rogers B P., Selenium in a Wyoming grassland community receiving wastewater from an in situ uranium mine. *Archive of Environmental Contamination and Toxicology* **2002**, 42: 431-436.
- Ranger J., Bonneau M. Effets prévisibles de l'intensification de la production et des récoltes sur la fertilité des sols de forêt. Le cycle biologique en forêt. *Revue Forestière Française* **1984**, 36 (2): 93-111
- Ranger J., Colin-Belgrand M. Nutrient dynamics of chestnut tree (*Castanea sativa* Mill.) coppice stands. *Forest Ecology Management* **1996**, 86: 259 - 277.
- Ranger J., Marques R, Colin-Belgrand M. Nutrient dynamics during the development of a Douglas-fir (*Pseudotsugamenziesii* Mirb.) stand. *Acta Oecologica* **1997**, 18(2): 73 -90.
- Ranger J., Allié S, Gelhaye D., Pollier B., Turpault M P., Granier A., Nutrient budgets for a rotation of a Douglas-fir plantation in the Beaujolais (France) based on a chronosequence study. *Forest Ecology Management* **2002**, 171: 3-16.
- Rayman M P. The importance of selenium to human health. *The Lancet* **2000**, 356 (9225): 233-241
- Rayman M P. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proceeding of the Nutrition Society*, **2005**, 64(4): 527-542
- Rayman M P., Infante H G., Sargent M. Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. *British Journal of Nutrition* **2008a**, 100: 238-253
- Rayman M P. Food-chain Se and human health: emphasis on intake. *British Journal of Nutrition* **2008**, 100: 254-268
- Rayman M P. Selenium and human health *The Lancet* **2012**, 379: 1256-1268
- Raymond F. Burk and Kristina E. Hill Selenoprotein P – Expression, Functions, and Roles in Mammals. *Biochimimica Biophysica Acta* **2009**, 1790 (11): 1441–1447
- Reamer D C. and Zoller W H. Selenium biomethylation products from soil and sewage sludge. *Science* **1980**, 208: 500-505.
- Redman A.D., Macalady D.L, Ahmann D. Soil organic matter affect arsenic speciation and sorption onto hematite *Environmental Science and Technology* **2002**, 36: 2889-2896
- Reid M E., Duffield-Lillico A J., Slate E., Natarajan N., Turnbull B., Jacobs E., Combs G F., Alberts D S., Clark L C., Marchall J R. The nutritional prevention of cancer: 400 mcg per day Se treatment. *Nutrition and Cancer* **2008**, 60: 155-163
- Reimann C, de Caritat P (**1998**) Chemical elements in the environment. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg

- Reilly C., Aust. J., Selenium in health and disease. *Nutrition & Dietetics*, **1993**, 50: 136-144
- Robberecht H. and Van Grieken R. Selenium in environmental waters: Determination speciation and concentration levels. *Talanta* **1982**, 29: 823-844
- Rodriguez-Gonzalez P., Marchante-Gayon J.M., Garcia Alonso J.I. and Sanz-Medel A. Isotope dilution analysis for elemental speciation: A tutorial review. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*. **2005**, 60: 151-207.
- Rodriguez Martin-Doimeadios R C., Krupp E., Amouroux D., Donard O F X. Application of isotopically labeled methylmercury for isotope dilution analysis of biological samples using gas chromatography/ICP-MS. *Analytical Chemistry*. **2002**, 74 (11): 2505-2512.
- Rosman K.J.R, Taylor P.D.P.. Abundance Measurement *Pure and Applied. Chemistry*. **1999**, 71, 1593-1607.
- Ross H B., Lindberg S E. Atmospheric Chemical Input to Small Catchment. Chapitre IV: In *Biogeochemistry of Small Catchments: A Tool for Environmental Research* Edited by B. Moldan and J. Cerny. Press **1994**
- Roussel-Debet S., Colle C. Comportement de radionucléides (Cs, I, Sr, Se, Tc) dans le sol: proposition de valeurs de K_d par défaut. *Radioprotection* **2005**, 40: 203-229
- Ruiz Encinar J., Garcia Alonso J I., Sanz-Medel A. Synthesis and application of isotopically labelled dibutyltin for isotope dilution analysis using gas chromatography-ICPMS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **2000**, 15 : 1233-1239.
- S-
- Sabeh F, Wright T, Norton S J. Purification and characterization of a glutathione peroxidase from the *Aloe vera* plant. *Enzyme and Protein* **1993**, 47: 92-98
- Sager M. Selenium in agriculture, food, and nutrition. *Pure and Applied Chemistry* **2006**, 78: 111-133
- Saiki M K., Jennings M R., May T W., Selenium and other elements in freshwater fishes from the irrigated San Joaquin Valley, California. *Science of Total Environment* **1992**, 126: 109-137
- Saito Y., Hayashi T., Tanaka A., Watanabe Y., Suzuki M., Saito E., Takahashi K., Selenoprotein P in human plasma as an extracellular ... Isolation and enzymatic characterization of human selenoprotein P. *Journal of Biological Chemistry*, **1999**, 274: 2866-2871
- Sanchez-Martinez M., Pérez-Corona T., Martinez-Villaluenga C., Frias J., Penas E., Porres J M., Urbano G., Camara C., Madrid Yolanda. Synthesis of [⁷⁷Se]-methylselenocysteine when preparing sauerkraut of [77Se]-selenite. Metabolic transformation of [77Se]-methylselenocysteine in Wistar rats determined by LC-IDA-ICP-MS. *Analytical Bioanalytical Chemistry* **2014**, 406: 7949-7958

- Saint-Andre L, M'Bou A T, Mabilia A, Mouvondy, W, Jourdan C, Roupsard O, Deleporte P, Hamel O, Nouellon Y, Age-related equations for above- and below-ground biomass of a Eucalyptus hybrid in Congo *Forest Ecology and Management* **2005**, 205: 199-214
- Scheinost A C., Charlet L. Selenite reduction by mackinawite, magnetite and siderite: XAS characterisation of nanosized redox products. *Environment Science and Technology*.**2008**, 42 (6): 1984–1989
- Scheinost A C., Kirsch R., Banerjee D., Fernandez-Martinez A., Zaenker H., Funke H., Charlet L. X-ray absorption and photoelectron spectroscopy investigation of selenite reduction by FeII-bearing minerals. *Journal of Contaminant Hydrology* **2008**, 102: 228-245
- Séby F. (1994) Optimisation de methods analytiques pour la speciation du selenium inorganique dans les eaux et les sols. *Thèse de doctorat de l'Université de Pau et Pays de l'Adour*.
- Séby F., Potin-Gautier M., Giffaut E., Donard O F X. Assessing the speciation on the biogeochemical processes affecting the mobility of selenium from a geological repository of radioactive wastes to the biosphere. *Analisis*, **1998**, 26: 193-198
- Séby F., Potin-Gautier M., Borge M., Donard O F X. A critical review of thermodynamic data for selenium species at 25 °C. *Chemical Geology* **2001**, 171: 173-194
- Sevel L., Hansen H., Raulund-Rasmussen K. Mass balance of cadmium in two contrasting oak forest ecosystems *Journal of Environmental Quality* 2009, 38(3): 93-102.
- Shah, M. Kannamkumarath S S., Wuilloud J C A., Wuilloud R G., Caruso J A. Identification and characterization of selenium species in enriched green onion (*Allium fistulosum*) by HPLC-ICP-MS and ESI-ITMS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2004**, 19: 381 – 386
- Shaw W H., Anderson J W., Purification, proprieties and substrate specificity of adenosine triphosphate sulphurylase from spinach leaf tissue. *Biogeochemistry Journal* 1972, 127: 237-347
- Shen S Kengeri S S., Xu H P., Shilittler D L., Chiang E., Chen Y. Selenium, DNA damage and apoptosis: Defining the optimal selenium dose for prostate cancer prevention. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **2006**, 47: 424-434
- Sheppard S C, Thibault D H, Default solid/liquid partition coefficients K_{ds} , for four major soil types: a compendium. *Health Physics* **1990** 59: 471-482
- Sheppard S.C. Robust Prediction of K_d from Soil Properties for Environmental Assessment. *Human and Ecological Risk Assessment* **2011**, 17: 263-279.
- Shibagaki N, Rose A, McDermott JP, Fujiwara T, Hayashy H, Yoneyama T, Davies JP. Selenate-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* identify Sultr1;2, a sulfate transporter required for efficient transport of sulfate into roots. *Plant Journal* **2002**, 29: 475-486

- Simonoff M. Simonoff G. (1991) Le cycle du selenium dans la nature, in: *Le selenium et la vie, Masson Paris (France)*
- Sloth, J. J.; Larsen, E. H. The application of inductively coupled plasma dynamic reaction cell mass spectrometry for measurement of selenium isotopes, isotopes ratios and chromatographic detection of selenoamino acids *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2000**, 15: 669-672.
- Sloth J J., Larsen E H., Bugel S H., Moesgaard S. Determination of total selenium and ⁷⁷Se in isotopically enriched human samples by ICP-dynamic reaction cell-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2003**, 18: 317-322
- Smith FW, Ealing PM, Hawkesford MJ, Clarkson DT (1995) Plant members of a family of sulfate transporters reveal functional subtypes. *Proceeding of National Academy of Science USA* **1995**, 92: 9373–9377
- Smolen S., Kowalska I., Sady W. Assessment of biofortification with iodine and selenium of lettuce cultivated in the NFT hydroponic system. *Scientia Horticulturae* **2014**, 166: 9-16
- Smrekolj, P., Stibilj V., Kreft, I., Kapolna E. Selenium species determination in selenium enriched pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds by HPLC–UV–HG–AFS. *Analytical Sciences* **2005**, 21, 1501-1504
- Smrkolj P, Osvald M, Osvald J and Stibilj V (2007) Selenium uptake and species distribution in selenium-enriched bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds obtained by two different cultivations. *European Food Research and Technology* **2007**, 225: 233-237
- Sinegani A A S. Sedri S. Effects of sterilization and temperature on the decrease kinetic of phosphate bioavailability in two different soil types. *Journal of Soil Science Plant Nutrition* **2011**, 11 (2): 109-122
- Sposito G. (1989) The chemistry of soils. *Oxford University, New York (USA)*
- Sposito G. (2004) The surface chemistry of natural particles. Oxford University Press, New York (USA).
- Sors, T G., Ellis, D R. & Salt D E. Selenium uptake, translocation, assimilation and metabolic fate in plants. *Photosynthesis Research* **2005**, 86: 373-389
- Srivastava M., Ma Q L., and Cotruvo J A. Uptake and distribution of selenium in different fern species. *International Journal of Phytoremediation* **2005**, 7: 33 - 42
- Stork A., Jury W A. and Frankenberger Jr W T. Accelerated volatilization rates of selenium. *Biological Trace Element Research* **1999**, 69: 217-234.
- Stranges S, Marshall JR, Trevisan M, Natarajan R, Donahue RP, Combs GF. Effects of selenium supplementation on cardiovascular disease incidence and mortality: secondary analyses in a randomized clinical trial. *American Journal of Epidemiology* **2006**, 163: 694-699.

- Switzer G L, and Nelson, L E. Nutrient accumulation and cycling in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) plantation ecosystems: the first twenty years. *Soil Science Society of America, Proceedings* **1972**, 36: 143-147.
- Su C. and Suarez D L. Selenate and selenite sorption on iron oxides: an infrared and electrophoretic study. *Soil Science Society of America Journal* **2000**, 64: 101-111.
- Suzuki K T., Itoh M. Metabolism of selenite labeled with enriched stable isotope in bloodstream. *Journal of Chromatography, B* **1997**, 692: 15-22.
- Suzuki K.T., Doi C. and Suzuki N. Metabolism of ⁷⁶Se-methylselenocysteine compared with that of ⁷⁷Se-selenomethionine and ⁸²Se-selenite. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **2006a**, 217: 185-195.
- Suzuki, K.T., Somekawa, L., Kurasaki, K., Suzuki, N., Simultaneous tracing of ⁷⁶Se-selenite and ⁷⁷Se-selenomethionine by absolute labeling and speciation. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **2006b**, 217: 43-50.
- Suzuki, K.T. Doi C Suzuki, N. Metabolism of ⁷⁶Se-methylselenocysteine compared with of ⁷⁷Se-selenomethionine and ⁸²Se-selenite *Toxicology and Applied Pharmacology*. **2006c**, 217: 185-195
- Suzuki K.T., Somekawa L., Kurasaki K., Suzuki N. Absolute labeling and simultaneous speciation in tracer experiments with multiple stable isotopes. *Journal of Health Science* **2006d**, 52: 590-597
- Suzuki K T., Kurasaki K., Ogawa S., Suzuki N. Metabolic transformation of methylseleninic acid through key selenium intermediate selenide. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2006f**, 215: 189-197
- Suzuki K T., Somekawa L., Suzuki N. Distribution and reuse of ⁷⁶Se-selenosugar in selenium-deficient rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2006e**, 216: 303-308
- Suzuki K.T. Doi C Suzuki N. Simultaneous tracing of multiple precursors each labeled with different homo-elemental isotope by speciation analysis: Distribution and metabolism of four parenteral selenium sources *Pure and Applied Chemistry*. **2008**, 80: 2699-2713
- Suzuki Y., Hashiura Y., Sakai T., Yamamoto T., Matsukawa T., Shinohara A., Furuta N. Selenium metabolism and excretion in mice after injection of 82-Se-enriched selenomethionine. *Metallomics* **2013**, 5: 445-452

-T-

- Tam S C., Chow A. And Hadley D. Effects of organic component on the immobilization of selenium on iron oxyhydroxide. *Science of the Total Environment* **1995**, 164(1): 1-7
- Tamari Y. Methods of analysis for the determination of selenium in biological, geological and water sample. in *Environmental Chemistry of Selenium Marcel Dekker, New York (USA)* **1998**, 27-46

- Tan J., Zhu W., Wang W., Li R., Hou S., Wang D., Yang L. Selenium in soil and endemic diseases on China. *Science of the Total Environment* **2002**, 284: 227-235
- Tanner S D., Baranov V I., Bandura D R. Reaction cells and collision cells for ICP-MS: a tutorial review. *Spectrochimica Acta B: Atomic Spectroscopy* **2002**, 57(9): 1361-1452
- Terry N., Carlson C, Raab T K., Zayed A M. Rates of selenium volatilization among crop species. *Journal of Environment Quality* **1992**, 21: 341-44
- Terry N., Zayed A. Selenium volatilization by plants. In: Frankenberger JR and Benson S (ed) *Selenium in the environment*. Marcel Dekker, New York, **1994**, 343-368
- Terry N., Zayed A M., de Souza M P., Tarun A S. Selenium in Higher Plant *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **2000**, 51:401-32
- Théron P., Malvy D., Favier A., Toxicité du sélénium à doses pharmacologiques par voie orale. *Nutrition Clinique et Métabolisme* **1997**, 11 (2): 91-101
- Thompson-Eagle E.T. and Frankenberger Jr W.T. Volatilization of selenium from agricultural evaporation pond water. *Journal of Environmental Quality*, **1990**, 19: 125-131.
- Tinggi U. Selenium: its role as antioxidant in human health *Environmental Health and Preventive Medicine*. **2008**, 13(2): 102–108.
- Tokunaga T K., Lipton D S., Benson S M., Yee A W., Oldfather J M., Duckart E C., Johannis P W., Halvorsen E W. Soil selenium fractionation, depth profiles and time trends in a vegetated site at Kesterson Reservoir. *Water, Air, and Soil Pollution* **1991**, 57-58 (1): 31-41
- Tolu J. (2012) Spéciation et mobilité du sélénium présent dans les sols à l'état de traces: contribution aux prévisions à long terme. *Thèse de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour*
- Tolu J., Di Tullo P., Le Hécho I., Thiry Y., Pannier F., Potin-Gautier M., Bueno M. A new methodology involving stable isotope tracer to compare simultaneously short- and long term selenium mobility in soils. *Analytical Bioanalytical Chemistry* **2014a**, 406: 1221-1231
- Tolu J., Thiry Y., Bueno M., Jolivet C., Potin-Gautier M., Le Hécho I. Distribution and speciation of ambient selenium in contrasted soils from mineral to organic rich. *Science of Total Environment* **2014b**, 93-101: 479-480
- Törnkvist A. (2003) Aspects of Porous Graphitic Carbon as packing material in capillary liquid chromatography. *Thèse de l'Université d'Uppsala (Suède)*
- Trelease S F, and Trelease H M. Physiological differentiation in *Astragalus* with reference to selenium. *American Journal of Botany* **1939**. 26: 530-535

Turpault M P. (2015) Web site "Montiers Ecosystem Research": www.nancy.inra.fr/en/Outils-et-Ressources/montiers-ecosystem-research.

Turpault M P., Calvaruso C. (2013) Le site de Montiers. Plaquette.

Turpault M P., Saint-André L., Gégout J C., Simon B., Genet A., Calvaruso C., Dupouey J L. (2008) Caractérisation des milieux forestiers - Site Andra Meuse/Haute Marne. *Rapport scientifique INRA*.

-U-

Uden, P C, Boakye H T, Kahakacjji C, Tyson J F. Selective detection and identification of Se containing compounds- Review and recent developments. *Journal of Chromatography A* **2004**, 1050: 85-93

Ulrich B. Influence de la fertilisation sur le cycle des éléments nutritifs dans les écosystèmes forestiers. IUFRO/FAO **1973** Paris 23-34

Ukonmaanaho L, Merilä P, Nöjd P, Nieminen T M. Litterfall production and nutrient return to the forest floor in Scots pine and Norway spruce stands in Finland *Boreal Environment Research* **2008**; 13: 67-91

USDA United States Department of Agriculture. Soil Science Primer **1999**, A-5

-V-

Van Dael P., Lewis J., Barclay D. Stable isotope-enriched Selenite and selenate tracers for human metabolic studies: a fast and accurate method for their preparation from elemental selenium and their identification and quantification using hydride generation atomic adsorption spectrometry. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2004**, 18: 75-80

Varshney K G., Khan A A., Gupta U., Maheshwari S M. Kinetics of adsorption of phosphamidon on antimody (V) phosphate cation exchanger evaluation of the order of reaction and some physical parameters. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1996**, 113 (1-2): 19-23

Villalobos-Aragon A., Ellis A S., Armienta M A., Morton-Bermea O. Johnson T M. Geochemistry and Cr stable isotopes of Cr-contaminated groundwater in Leon valley, Guanajuato, Mexico. *Applied Geochemistry* **2012**, 27: 1783-1794

-W-

Wallace K., Kelsey K T., Schened A., Morris J S., Andrew A S., Karagas M R. Se and risk of bladder cancer: a population-based case-control study. *Cancer Prevention Research* **2009**, 2: 70-73

Wallschlager, D.; London, J. Determination of inorganic selenium species in rain and sea waters by anion exchange chromatography-generation-inductively-coupled plasma-

- dynamic reaction cell-(AEC- HG-ICP-DRC-MS) *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2004**, *19*, 1119-1127.
- Wang D., Alfthan G., Aro A. The impact of selenium fertilization on the distribution of selenium in rivers in Finland. *Agriculture Ecosystem and Environment* **1994a**, *50*: 133-149
- Wang Z J., Gao Y X., Biogeochemical cycling of selenium in Chinese environments. *Applied Geochemistry* **2001**, *16*: 1345-1351
- Wang X., Liu X. Sorption and desorption of radioselenium on calcareous soil and its solid components studied by batch and column experiments. *Applied Radiation and Isotopes* **2005**, *62*: 1-9.
- Watts C.A., Ridley H., Condie K.L., Leaver J.T., Richardson D.J. and Butler C.S. Selenate reduction by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1 is catalysed by a molybdenum-dependent membrane- bound enzyme that is distinct from the membrane- bound nitrate reductase *FEMS Microbiology Letters* **2003**, *228*: 273-279
- Webster R. K. *Methods of Geochemistry* (eds. A. A. Smales and L. R. Wagner), **1960**: 202-246. Interscience
- Wen H., Carignan J., Reviews on atmospheric selenium: Emissions, speciation and fate. *Atmospheric Environment* **2007**, *41*: 7151-7165
- Weng L., Vega F A., Supriatin S., Bussink W., Van Riemsdijk W H. Speciation of Se and DOC in soil solution and their relation to Se bioavailability. *Environmental Science Technology* **2011**; *45*: 262–267
- Wessjohann L A., Schneider A., Abbas, M., and Brandt W., Selenium in chemistry and biochemistry in comparison to sulfur. *Biology and Chemistry* **2007**, *388*: 997-1006.
- Wijnja H. and Schulthess C.P. Vibrational spectroscopy study of selenate and sulfate adsorption mechanisms on Fe and Al (hydr)oxide surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **2000**, *229*: 286-297
- Wiseman P E., Day S D., Harris R. Organic Amendment Effects on Soil Carbon and Microbial Biomass in the Root Zone of Three Landscape Tree Species. *Arboriculture & Urban Forestry* **2012**. *38*(6): 262–276
- White P J., Broadley M R. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets—iron, zinc, copper, calcium, magnesium, Se and iodine. *New Phytology* **2009**, *182*:49–84
- Whanger P.D., Polan C.E., Uden P.C., Welbaum G. Tumorogenesis metabolism, speciation, bioavailability and tissue deposition of selenium in selenium-enriched ramps *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48*: 5726-5730
- Whanger, P D. Selenocompounds in plants and animals and their biological significance. *Journal of the American College of Nutrition* **2002**, *21* : 212-223.

Wrobel K., Wrobel K., Kannamkumarath S S., Caruso J A., Wysocka I A., Bulska E. HPLC–ICP-MS speciation of selenium in enriched onion leaves – a potential dietary source of Se-methylselenocysteine. *Food Chemistry*, **2004**, 86: 617-623.

Wu S., Gschwend P M. Sorption kinetics of hydrophobic organic compounds to natural sediments and soils. *Environmental Science and Technology* **1986**, 20: 717-725

-X-

Xue T L., Hartikainen H. Association of antioxidative enzymes with the synergistic effect of selenium and UV irradiation in enhancing plant growth. *Agricultural and Food Science in Finland* **2000**, 9: 177-186

Xue T L., Hartikainen H., Piironen V. Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing lettuce. *Plant Soil*. **2001**, 237: 55-61

Ximenez-Embun P., Alonso I., Madrid-Albarran Y., Camara C. Establishment of selenium uptake and species distribution in lupine, indian mustard and sunflower plants. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **2004**, 52: 832-838

-Y-

Yamada N., Takahashi J., Sakata K., The effects of cell-gas impurities and kinetic energy discrimination in an octopole collision cell ICP-MS under non-thermalized conditions. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **2002**, 17: 1213-1222

Yudovich Y E. and Ketris M P. Selenium in coal: A review. *International Journal of Coal Geology* **2006**, 67: 112-126

Yin R., Feng X., Li X., Yu Ben., Du B. Trends and advances in mercury stable isotopes as a geochemical tracer. *Trends in Environmental Analytical Chemistry* **2014**, 2: 1-10

Yu L L., Fasset J D., Guthrie W F. Detection limit of isotope dilution mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2002**, 74: 3887-3891

Yu C., Orlandini K A., Cheng J J., Biwer. Assessing the impact of hazardous constituents on the mobilisation, transport, and fate of radionuclide in RCRA waste disposal units. *Environmental Assessment Division, Argonne National Laboratory, Argonne (USA)*. ANL/EAD/TM-93 (**2001**)

-Z-

Zayed. A M., Terry. N. Selenium volatilization in roots and shoots: effects of shoot removal and sulfate level. *Journal of Plant Physiology*. **1994**, 143: 8-14

Zayed A M., Lytle M., Terry N. Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Planta*, **1998** 206: 284-292

- Zhang Y Q. and Frankenberger Jr W.T. Fate of dimethyldiselenide in soil. *Journal of Environmental Quality* **2002**, 31: 1124-1128.
- Zhang Y Q., Moore J.N Selenium fraction and speciation in a wetland system. *Environment Science and technology* **1996** 30: 2613-2619
- Zhang Y., Pan G., Chen J., and Hu Q. Uptake and transport of selenite and selenate by soybean seedlings of two genotypes. *Plant Soil* **2003**, 253: 437-443
- Zhang L, Shi W and Wang X Difference in selenite absorption between high- and low selenium rice cultivars and its mechanism. *Plant Soil* **2006**, 282: 183-193
- Zhang Y Q., Wang J F., Amrhein C and Frankenberger W T., Removal of selenate from water by zerovalent iron. *Journal of Environmental Quality*, **2005**, 34(2): 487-495
- Zhao F J., McGrath S P. Biofortification and phytoremediation. *Current Opinion in Plant Biology* **2009**, 12: 373-380
- Zhu, Y.G., Pilon-Smith, E.A.H., Zhao, F.J., Williams, P.N., Meharg, A.A., *Trends in Plant Science* **2009** 14 (8), 436-442
- Zieve R and Peterson P J. Factors influencing the volatilization of selenium from soil. *Science of the Total Environment* **1981**, 19(3): 277-284
- Zieve R. Peterson P.J., The accumulation and assimilation of dimethylselenide by four plant species. *Planta* **1984**, 160: 180-184

Annexe I

A new methodology involving stable isotope tracer to compare simultaneously short- and long-term selenium mobility in soils

Julie Tolu · Pamela Di Tullo · Isabelle Le Hécho ·
Yves Thiry · Florence Pannier · Martine Potin-Gautier ·
Maïté Bueno

Received: 29 April 2013 / Revised: 23 July 2013 / Accepted: 26 August 2013 / Published online: 19 September 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract A better understanding of Se fate in soils is required for different environmental issues, such as radioactive waste management or soil fertilization procedures. In these contexts, the mobility and speciation of Se have to be studied at both short and long terms after Se inputs. Here, we present a new methodology to monitor simultaneously the reactivity of added (isotopic enriched tracers) and ambient Se at trace level in soils by high-performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) following specific extractions. To do so, the collision/reaction cell of the ICP-MS instrument and the interference corrections were optimized to measure reliably the four major Se isotopes. To exemplify the method capabilities, the behaviors of added $^{77}\text{Se}(\text{IV})$ and ambient Se were followed up in two soils submitted to an ageing process during 3 months. The solid/liquid distribution of added Se reached a steady state after 1 month while its speciation and distribution among soil solid phases were still changing after 3 months. The results clearly

demonstrate that slow processes are involved in Se retention and transformation in soils. The usual short-term experiments (<1 month) performed after Se addition are thus not suitable for long-term risk assessment. Interestingly, the behavior of added Se tended to that of ambient Se, suggesting that ambient Se would be useful to infer the fate of Se input over long time scales.

Keywords Selenium · HPLC-ICP-MS · Stable isotope tracer · Speciation · Soil · K_d

Introduction

The fate of selenium in the environment is of great interest because of its dual toxic and beneficial character to health [1]. The Se soil–plant transfer is a critical step as Se inputs to humans or animals are mainly provided through plant consumption. In many regions of the world, Se is deficient in soils (<0.125 mg kg⁻¹; New Zealand, the Keshan area of China and Scandinavia) or not readily available for plants (e.g., the UK). Se fertilization is thus under investigation to enhance Se content in plants [2–4]. Conversely, soils from some areas (e.g., North America, China, and Ireland) contain excessive Se concentrations (>3 mg kg⁻¹) leading to ecological problems and human diseases [5]. Accumulation in soils of radioactive Se (^{79}Se ; $T=3.3 \cdot 10^5$ years [6]), a degradation product of ^{235}U (0.05 % [7]) is also of great potential concern. It is indeed found in long-lived nuclear wastes of high and intermediate radioactivity levels for which a geological disposal in deep formations is considered a safe and feasible option. The safety assessment of such disposal requires the determination of the radiological and chemical consequences for the biosphere of hypothetical soil contamination following irrigation using ^{79}Se -contaminated groundwater [8].

Published in the special issue *Analytical Science in France* with guest editors Christian Rolando and Philippe Garrigues.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00216-013-7323-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

J. Tolu · P. Di Tullo · I. Le Hécho · F. Pannier · M. Potin-Gautier ·
M. Bueno

Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et
Environnement (LCABIE), IPREM, Université de Pau et des Pays de
l'Adour/CNRS UMR 5254, Hélioparc, 2 Avenue du Président
Angot, 64053 Pau Cedex 9, France

J. Tolu (✉) · P. Di Tullo · Y. Thiry
Research and Development Division, Andra, Parc de la Croix
Blanche, 1/7 rue Jean Monnet, 92298 Châtenay-Malabry Cedex,
France
e-mail: julietolu@hotmail.com

In this context, Se species transformations and interactions with soil components must be understood at low concentration levels (in micrograms per kilogram). Selenate (Se(VI)) and selenite (Se(IV)) exist as dissolved species or sorbed onto soil organic and mineral (especially Fe, Al oxides and clays) fractions. Se(VI) behaves mainly as a non-sorbing solute, whereas Se(IV) can be strongly sorbed to soil solid phases [1]. These species can also be reduced into insoluble, and thus poorly mobile, elemental selenium, Se(0), and metal-selenides (Se(-II)) precipitates (e.g., FeSe(s), FeSe₂(s)) by abiotic reactions or into Se(0) and organic selenides (e.g., SeMet and SeCys) by organisms. All these processes have generally been studied with short-term experiments after Se addition (<60 h mainly and few <2 months), often with the radioactive ⁷⁵Se(IV) tracer. The Se species distribution among soil fractions determined by specific extractions and the solid/liquid distribution coefficients (K_d , in liters per kilogram; calculated from water extraction) have been reported for different soil types or different incubation conditions [9–17]. These information, in particular the K_d values, are then used in models to predict Se behavior in soils over the long-time span relevant for radiological contaminations (century to millennia) [18]. However, Sheppard [19] previously emphasized that the information obtained from short-term experiments may not apply to long periods as the behavior of many radionuclides is affected by slow reactions with soil components. One example is the progressive adsorption of caesium on frayed edge and interlayer sites of micaceous clays [20]. Conversely, insoluble thorium may become mobilized by ligands and colloids over long time periods [19]. The K_d values determined from desorption of ambient elements (e.g., As, Cd, Co, Cs, Cu, or Th), were significantly different than the ones determined from short-term experiments with added elements [19]. Sheppard [19] thus suggested that the resulting prediction of long-term radionuclide mobility is more robust when the modeling is performed with K_d values from ambient elements. We also recently observed that K_d values for ambient Se were 3 to 13 times higher than those reported from Se-spiking experiments (Tolu et al., unpublished data), suggesting that Se retention in soils involves slow processes.

The use of stable isotopic tracers in conjunction with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) hyphenated to chromatographic separation enables (1) accurate and precise determination of metal species concentrations at ultra-trace levels by isotope dilution [21]; (2) simultaneous monitoring of the added and ambient metal species by isotopic ratio determination [22]; and (3) investigation of antagonist processes involved in trace metal cycling if complementary species enriched with different isotopes are added [23]. To our knowledge, only three studies have previously employed Se stable isotopes for environmental investigations, probably because of the difficulty to determine Se isotope ratios at environmental concentration levels (micrograms per kilogram).

Indeed, Se detection with ICP-MS can be interfered by various elements (e.g., Br, Fe, Ca, and P) which are highly concentrated in environmental samples, especially in soils and sediments [24, 25]. Inagaki et al. [26] developed a methodology based on isotope dilution leading to an accurate and precise quantification of Se in sediments. However, this method is not suitable for Se species determination because of the strong evaporation pre-treatment needed to remove the highly interfering Br (200 °C in HNO₃ and HClO₄ medium). Collins et al. [27] determined ⁷⁸Se(IV) and ⁷⁶Se(VI) species-specific K_d and isotopically exchangeable concentrations in soil and sediment suspensions; but both the added and ambient Se concentrations were very high (1–25 mg kg⁻¹) overcoming the potential interferences. Recently, Chilimba et al. [4] have employed ⁷⁴Se(VI)-labeled fertilizers to distinguish Se uptake by maize from ambient and added Se sources and thereby demonstrated low plant uptake of ⁷⁴Se(IV) after 1 year (<0.1 % of the original fertilizer application). However, the authors could not determine if this low uptake was related to strong immobilization of ⁷⁴Se in soil solid phases or ⁷⁴Se transfer to aquatic systems, because of high levels of interferences affecting ⁷⁴Se analyses in soils (⁷⁴Ge, ⁵⁷Fe–OH, or ⁵⁶Fe–OH₂).

Here, we present the optimization and application of enriched stable isotope Se tracer methodology to simultaneously monitor the reactivity of newly added and ambient Se at trace level (less than micrograms per kilogram) in soils by high-performance liquid chromatography (HPLC)-ICP-MS following specific extractions. First, operating conditions and methods to remove spectral interferences were optimized to ensure the quality and reliability of Se isotopic ratios measurements in soil extracts. Then, a ⁷⁷Se(IV) tracer was added to two soils that further went through an ageing process during 3 months and both added and ambient Se distribution and speciation were regularly determined. The objective was twofold: (1) demonstrate the suitability of the methodology to investigate the fate of Se in soils and (2) address the abovementioned points concerning the relevance of considering ambient Se in long-term models.

Experimental

Isotopically enriched Se tracer

The elemental ⁷⁷Se powder was purchased from Isoflex (Moscow, Russia). The oxidation step to give ⁷⁷Se(IV) was performed according to Van Dael et al. [28], and the product was further stored in the dark at 4 °C. The ⁷⁷Se(IV) standard was first characterized in terms of concentration by isotope dilution and isotopic composition: 511±5 mg kg⁻¹; 98.3 % ⁷⁷Se and 1.7 % ⁷⁸Se. Then, it was shown to contain only Se(IV) by HPLC-ICP-MS analysis (described below).

Ageing experiment

Two soils, one from agriculture and one from forest, were collected (0- to 25-cm surface depth) at the experimental and monitoring sites managed by Andra in the Bure area (Meuse/Haute-Marne, France), selected for the possible installation of a deep underground disposal of radioactive waste. The fresh soils were air-dried during 24 h, then homogenized and sieved at 2 mm. Major soil characteristics are presented in the Electronic supplementary material (ESM) (Table S1). The soils were mixed with $^{77}\text{Se(IV)}$ solutions in polypropylene flasks with a solid/liquid ratio of 1/1 (kg/L). The mixtures were rotary stirred during 24 h for homogenization and then air-dried (24 h) before the beginning of the ageing experiments (noted T0). $^{77}\text{Se(IV)}$ concentrations at T0 were 211 ± 16 and $297 \pm 28 \mu\text{g kg}^{-1}$ for the agricultural and the forest soils respectively, and were determined as described below. These values are close to ambient Se concentrations (i.e., 402 ± 38 and $431 \pm 36 \mu\text{g kg}^{-1}$) allowing a comparison of their reactivity by avoiding the saturation of binding sites. The $^{77}\text{Se(IV)}$ spiked soils were then placed in glass recipients (22×35 and 5 cm deep), resulting in 3-cm soil thickness, under a clean fume hood. They were subjected to nine wetting and drying cycles under the following operating conditions [29, 30]: 3 days of wetting with ultrapure water up to 3 cm height above the soil surface while the recipients were covered with shrink-wrap double layers to prevent evaporation; from 4 to 10 days of air-drying at room temperature, the shrink-wrap layers were removed to reach a residual soil water content below 10 %. Soils were sampled after each drying step for the cycles 1 to 6 and then at the end of the experiment (cycle 9). For each sampling, a full soil layer was retrieved from three different positions in the recipient to get triplicate samples. Before analyses, samples were grinded in a zirconium oxide bowl during 7 min at 30 Hz.

Parallel-single extraction methodology

Distribution and speciation of Se were determined according to our previously developed method [31]. Briefly, three parallel-single-specific extractions were applied to soil samples: ultrapure water, phosphate buffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.1 mol L⁻¹) with pH 7 and sodium hydroxide (0.1 mol L⁻¹). For each solution, the stability of inorganic Se(IV) and Se(VI) and of organic Se compounds for which Se standards exist (e.g., seleno-methionine, seleno-cystine, trimethylselenonium ion, and methane seleninic acid) was previously validated [31]. According to Zhang and Frankenberger [32], Se distribution was then calculated as follows: $\text{Se}_{\text{water-soluble}} = \text{Se extracted by ultrapure water}$; $\text{Se}_{\text{exchangeable}} = \text{Se extracted by phosphate from which } \text{Se}_{\text{water-soluble}} \text{ was subtracted}$; $\text{Se}_{\text{OM}} = \text{Se extracted by NaOH from which } \text{Se}_{\text{exchangeable}} \text{ was subtracted}$. Soil extracts were filtered at 0.45 μm and kept in the fridge until Se analyses.

As the sensitivity of the ICPMS detection is decreased by high salt concentrations, phosphate and NaOH samples were diluted five- and tenfold respectively just before analyses [31].

Se total and speciation analyses and quantification

Total Se content was determined with an Agilent 7500ce ICP-MS instrument equipped with an octopole collision/reaction cell (C/RC). An Agilent 1100 series HPLC pump was hyphenated to this instrument for Se speciation analyses. The chromatographic separation was performed with a Thermo Hypercarb column (mixed-mode; 10 cm×4.6 mm i.d.) and a mobile phase containing 240 mmol L⁻¹ formic acid with 1 % methanol at pH 2.4 [31, 33]. The mobile phase was delivered at a flow rate of 1 mL min⁻¹ and sample injection volumes were of 200–400 μL depending on soil extracts. ICP-MS operating conditions are given in Table 1.

Table 1 Operating conditions for total selenium and speciation analyses

Sample introduction	Concentric nebulizer Scott double pass spray chamber cooled to 2 °C
Plasma parameters	
RF power	1,500 W
Ar plasma gas flow rate	15 L min ⁻¹
Ar auxiliary gas flow rate	0.85–1.15 L min ⁻¹ , optimized daily for best sensitivity ^a
Nebulization gas flow rate	0.10–0.20 L min ⁻¹ , optimized daily for best sensitivity ^a
Sampler and skimmer cones	Platinum
Ions lens setting	Optimized daily for best sensitivity ^a
Reaction/collision parameters	
H ₂ gas flow	Optimized for our study
He gas flow	Optimized for our study
Octopole bias	–18 V ^b
Quadrupole bias	–17 V ^b
Detector dead time	47 ns
Data acquisition parameters	
Total analysis	
Monitored isotopes	74, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, and 83
Point per peak	3 s ^c
Acquisition time per point	1 s ^c
Replicates	3
Speciation analysis	
Monitored isotopes	74, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, and 83
Integration time per isotope	0.2 ^d

^a Using a solution of 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ of gallium, yttrium, thallium, and cerium

^b Adopted from Darrouzès et al. [25]

^c Based on the test of Hinojosa-Reyes et al. [24]

^d Calculated to give 22 measurement points per chromatographic peak providing an adequate peak profile for peak area integrations [21]

Total and Se species concentrations were determined by isotope dilution (ID) using a natural abundance Se standard and $^{78}\text{Se}/^{77}\text{Se}$ ratios (ESM (text); [21]). For each sample, the amount of natural Se standard added for ID was chosen to give an optimal $^{78}\text{Se}/^{77}\text{Se}$ ratio allowing minor error propagation during ID calculation [24]. Ambient and added Se concentrations were then calculated, for total and speciation analyses, from the Eqs. 1 and 2 based on those developed by Hintelmann and Evans [22]. ^{78}Se was used as the reference isotope for ambient Se while ^{77}Se was the reference isotope for added Se.

$$\text{Ambient Se} = \frac{C \cdot ^{78}A_{\text{sample}}}{^{78}A_{\text{natural}}} \quad (1)$$

$$\text{Added Se} = \frac{(C \cdot ^{78}A_{\text{sample}}) - \left(\left(\frac{^{78}A_{\text{natural}}}{^{77}A_{\text{natural}}} \right) \cdot C \cdot ^{77}A_{\text{sample}} \right)}{\left(\frac{^{78}A_{\text{tracer}}}{^{77}A_{\text{tracer}}} \right) - \left(\frac{^{78}A_{\text{natural}}}{^{77}A_{\text{natural}}} \right)} \quad (2)$$

with C =Se concentration in the sample (in nanograms per liter); $^{77}, ^{78}A_{\text{sample}}$ =abundance of ^{77}Se or ^{78}Se in the sample (determined from the monitored Se isotopes; Equations in the ESM, text); $^{77}, ^{78}A_{\text{natural}}$ =natural abundance of ^{77}Se or ^{78}Se ; and $^{77}, ^{78}A_{\text{tracer}}$ =abundance of ^{77}Se or ^{78}Se in the tracer solution, i.e., $^{77}\text{Se(IV)}$ standard.

Se concentrations were then expressed in micrograms per kilogram based on precise weights of soil and reagent used for extraction or mineralization, taking into account the residual water content of sampled soils determined after drying at 105 °C in an air oven until constant mass.

Analytical uncertainties associated to ambient and added Se concentrations were calculated for each triplicate samples taken at each sampling point according to the random error propagation method along the calculation steps. They were then combined to the experimental uncertainties. The equations are detailed in the ESM (text).

Optimization

As Se isotopes are highly interfered by various polyatomic species, the accurate and precise determination of ambient and added Se concentrations requires that monitored isotopes are free of significant spectral interferences [24, 25]. The main instrumental parameters affecting the efficiency of spectral interferences removal are the nature of the collision/reaction cell gases (for Agilent instruments, He (collision) and/or H_2 (reaction)) and their flow. However, hydridation of Se and Br (50.7% ^{79}Br and 49.3% ^{81}Br), i.e., formation of SeH^+ and BrH^+ , were shown to occur in C/RCs, affecting the determination of Se ions of $m/z+1$ [24, 25, 34]. Deviation of measured isotopic ratios from theoretical ones is also caused by mass

discrimination, i.e., lower transmission of lighter isotopes in the ion optical lens system resulting in apparent increase in signal for the heavier isotopes [21]. Both interferences of hydrides and mass bias can be corrected by mathematical equations (ESM, text). C/RC conditions and correction methods were thus evaluated and optimized to ensure the quality and reliability of Se isotopic ratios measurements at trace level in soil extracts. The accuracy of Se isotopic ratios (in percent) was determined according to Eq. 3, and the precision corresponds to the relative standard deviation (RSD; in percent).

$$\frac{^x\text{Se}}{^{78}\text{Se}}\text{-accuracy} = \text{Abs} \left[\frac{\left(\frac{^x\text{Se}}{^{78}\text{Se}} \right)_{\text{experimental}} - \left(\frac{^x\text{Se}}{^{78}\text{Se}} \right)_{\text{theoretical}}}{\left(\frac{^x\text{Se}}{^{78}\text{Se}} \right)_{\text{theoretical}}} \right] \cdot 100 \quad (3)$$

with: $x=m/z$ 74,76, 77, 80, or 82

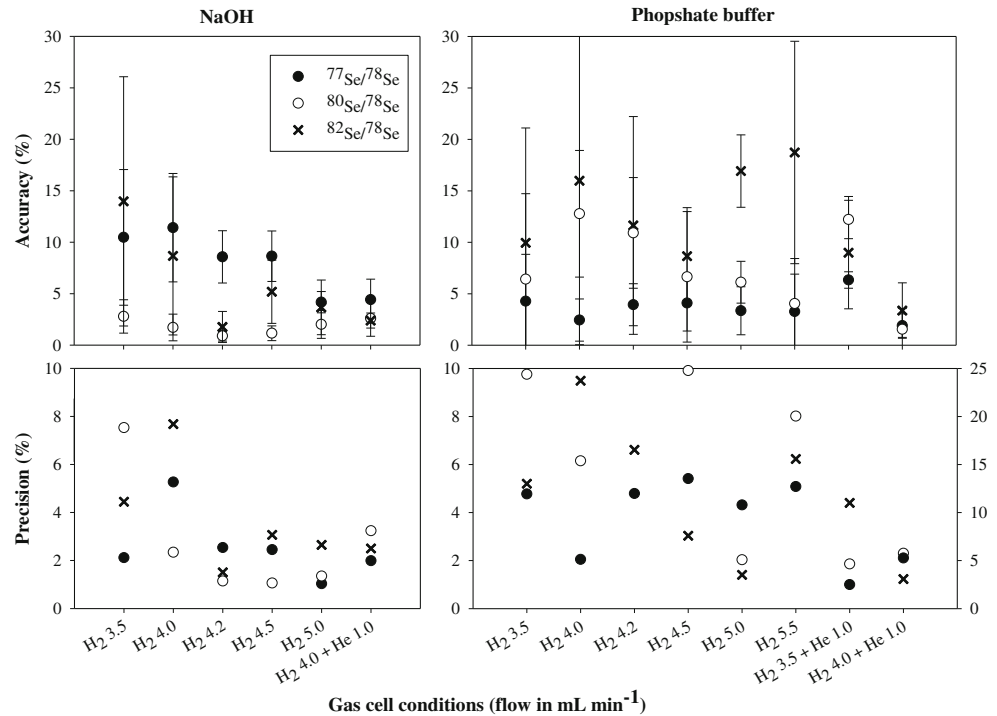
Results and discussion

Optimization for accurate and precise Se isotopic ratio measurements

Gas flow rates in the collision/reaction cell

Nature and optimum flow rates of the cell gases were evaluated for phosphate and NaOH soil extracts as they represent more complex matrices than water extracts. Preliminary experiments showed that H_2 flow rates above 5.5 mL min^{-1} lead to a significant decrease of analyte ions intensities and that He alone does not allow quantitative elimination of interferences. Figure 1 presents the effects of H_2 flow rates ($3.5\text{--}5.5 \text{ mL min}^{-1}$) and $\text{H}_2\text{--He}$ mixtures on the accuracy and precision of Se isotopic ratios ($n=12$) corrected from SeH^+ and BrH^+ interferences and mass bias as described in the following paragraph. A H_2 flow rate of 5 mL min^{-1} is effective enough to obtain an accurate (error, $<5\%$) and precise (RSD, $<2\%$) determination of Se isotopic ratios in NaOH extracts. In phosphate extracts, the addition of 1 mL min^{-1} He to 4 mL min^{-1} H_2 is required to obtain the same performances (Fig. 1), in relation to the complementary action of these two gases to remove polyatomic interferences (He, collision dissociation; H_2 , ion-molecules reactions) [25]. Improved accuracy and precision of the $^{80}\text{Se}/^{78}\text{Se}$ and $^{82}\text{Se}/^{78}\text{Se}$ ratios with He are also related to more accurate and precise determination of Br isotopes in samples and blank solutions (not shown) used to correct the BrH^+ interferences, because of thermalization and focalization effects [25, 35]. The $\text{H}_2\text{--He}$ mixture is similarly efficient in NaOH (Fig. 1) and water extracts (error, $<5\%$; RSD, $<6\%$; Table S2 in the ESM), and is thus chosen as the optimal C/RC gas conditions. Even under these

Fig. 1 Accuracy and precision of Se isotopic ratios in NaOH and phosphate soil extracts ($n=12$) as a function of gas conditions in the C/RC. For phosphate soil extracts, the precision of $^{77}\text{Se}/^{78}\text{Se}$ and $^{80}\text{Se}/^{78}\text{Se}$ is plotted on the left y-axis while the precision of $^{82}\text{Se}/^{78}\text{Se}$ is plotted on the right y-axis



optimal conditions, the low-abundance ^{74}Se (0.89 %) and ^{76}Se (9.73 %) are still interfered, probably by germanium (m/z 70, 72, 73, 74, and 76) and/or polyatomic interferences containing Fe, S, or As.

Corrections for SeH^+ and BrH^+ interferences and mass discrimination

Interferences caused by the formation of SeH^+ and BrH^+ were removed by mathematical corrections (Eqs. 1 to 6 in the ESM) following the determination of Se and Br hydridation factors, noted $f\text{Se}$ and $f\text{Br}$, in Se and Br standard solutions. A particular attention was given to the correction of ^{80}Se and ^{82}Se from BrH^+ interferences. Indeed, ^{79}Br concentrations are 25–40 times higher than ^{80}Se concentrations in the different extracts, while the difference is even more pronounced between ^{81}Br and ^{82}Se (from 110 to 240 times). $f\text{Se}$ and $f\text{Br}$ vary slightly over time ($f\text{Se}=2\text{--}3\%$; $f\text{Br}=11\text{--}14\%$ depending on the day) in agreement with previously reported values for the same ICP-MS instrument [36]. The variation of $f\text{Se}$ over 4 h is inferior to 3 % and does not affect the accuracy and precision of isotopic ratios. $f\text{Br}$ also varies by about 3 % within 4 h, but the corrections of ^{82}Se and ^{80}Se are impacted in this case. The efficiency of a bracketing method, i.e., the regular measurement of $f\text{Br}$ between samples, was then tested. The determination of $f\text{Br}$ after triplicates of each sample is found to enhance the accuracy of isotopic ratios involving ^{80}Se and ^{82}Se (Fig. 2).

We also investigated the impact of extractant matrices on the formation of Se and Br hydrides by measuring $f\text{Se}$ and $f\text{Br}$ in ultrapure water, phosphate buffer and NaOH matrices the same day ($n=10$). In ultrapure water and NaOH solutions, $f\text{Se}$ and $f\text{Br}$ values are identical, reaching 2.3 ± 0.1 ($f\text{Se}$) and $13.2\pm 0.2\%$ ($f\text{Br}$). They are slightly higher in phosphate buffer, i.e., 2.8 ± 0.1 ($f\text{Se}$) and $14\pm 1\%$ ($f\text{Br}$), indicating that $f\text{Se}$ and $f\text{Br}$ should be determined in solutions representative of studied samples.

Finally, the mass discrimination is corrected using an exponential model (ESM, text and equation 9) after determination of the mass bias factor with natural abundance Se standards. It varies between 3 and 4 % in agreement with previously reported mass bias factor [24, 34]. Its variation within 4 h ($<3\%$) does not significantly affect the determination of isotopic ratios indicating that the bracketing method is not necessary.

Eventually, reliable measurements of four Se isotopes, hence three isotopic ratios, are now possible in complex soil extracts matrices with the optimized C/RC conditions and BrH^+ correction method. The associated detection limits (calculated from Yu et al. [37]), presented in Table 2 are about 15–30 times lower than those we have previously determined for Se quantification by a standard addition method [31]. The simultaneous investigation of both ambient and up to three different added Se species in trace amounts (nanograms per kilogram) is therefore possible. The application of a $^{77}\text{Se}(\text{IV})$ isotopic tracer added to two different soils under ageing

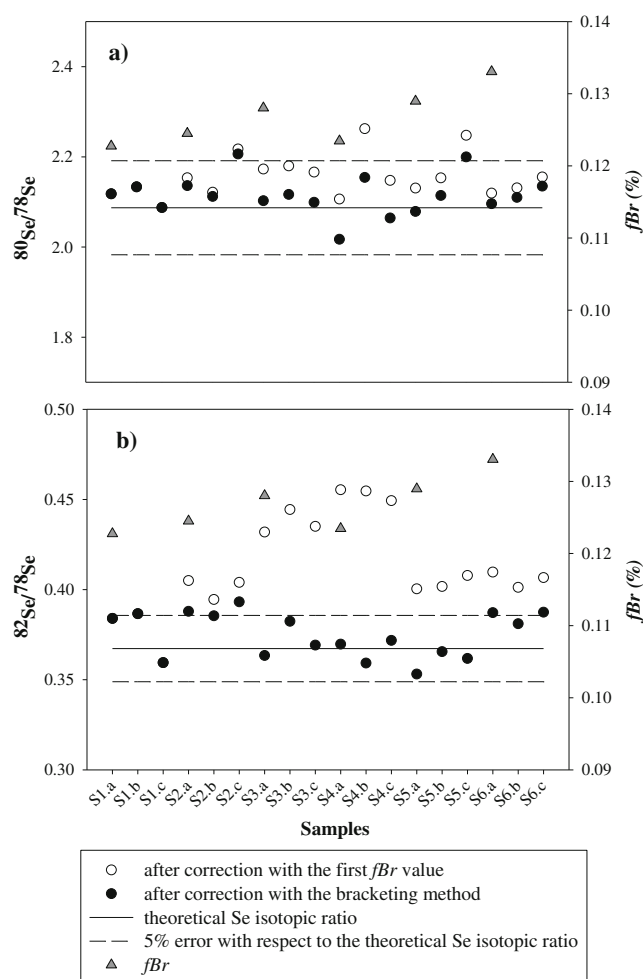


Fig. 2 $^{80}\text{Se}/^{78}\text{Se}$ and $^{82}\text{Se}/^{78}\text{Se}$ ratios determined in six different soil extracts (in triplicate) analyzed sequentially after correction of BrH^+ interferences with: (1) the first measured fBr value; (2) the fBr value measured just before analyses of one sample in triplicate (bracketing method). This sequence lasted for about 4 h (10 min/samples or blank solutions); fBr varies by 1.8 % within the sequence

conditions is described thereafter. While ^{78}Se was used as the reference isotope for ambient Se (Eq. 1.), isotopes ^{80}Se and ^{82}Se were also monitored during incubations to check the robustness of our analytical conditions and calculate the

abundance of ^{77}Se and ^{78}Se (equations in the *ESM*, text) needed to quantify ambient and added Se concentrations.

Application to environmental investigations: the differential reactivity of ambient and added Se throughout soils ageing incubations

Total Se distribution among soil fractions

To compare the differential reactivity of ambient and added Se in soils, their distribution is discussed with results expressed as percent of total ambient Se in soils and percent of total added Se in soils respectively (Figs. 3 and 4). Complete data are given in Tables S3 and S4 in the *ESM*.

Ambient Se The spiking-homogenization step slightly disturbs the distribution of ambient Se from different fractions of the two soils. In the agricultural soil, the Se_{OM} fraction increases from 13 ± 1 (measured before spiking) to 22 ± 3 % (T0) while in the forest soil, the $\text{Se}_{\text{water-soluble}}$ fraction increases from 2.7 ± 0.2 to 4.8 ± 0.5 % (Figs. 3c and 4a). However, both fractions come back, eventually, to their initial values during the ageing incubation. Throughout the incubation, the ambient $\text{Se}_{\text{water-soluble}}$ and $\text{Se}_{\text{exchangeable}}$ are rather constant in the agricultural soil, their average values (3.8 ± 0.8 and 11 ± 4 %, respectively) being close to the values determined before soil spiking (3.2 ± 0.4 and 10 ± 1 %, respectively; Fig. 3a, b). The steady state of ambient Se distribution in agricultural soils has been previously reported under aerobic conditions (two soils; moisture contents at 20–70 % of water-holding capacity) [14, 17]. In the forest soil, the ambient $\text{Se}_{\text{exchangeable}}$ and Se_{OM} fractions rise up during the first wetting/drying cycles. The exchangeable fraction then decreases regularly almost to its initial value while the OM fraction keeps increasing (Fig. 4b, c). This remobilization of ambient Se, from retentive phases refractory to phosphate and NaOH extractions back to $\text{Se}_{\text{water-soluble}}$ and $\text{Se}_{\text{exchangeable}}$ fractions, may be related to the disruption of soil aggregates caused by the wetting of soils that were previously dried [38]. In line with these results, we recently highlighted a higher mobility

Table 2 Detection and quantification limits for isotope dilution with ^{77}Se standard

	Instrumental (in ng (Se) L^{-1}) ^a			In soil (in μg (Se) kg^{-1}) ^b		
	$^{78}\text{Se}/^{77}\text{Se}$ D.L.	$^{80}\text{Se}/^{77}\text{Se}$ D.L.	$^{82}\text{Se}/^{77}\text{Se}$ D.L.	$^{78}\text{Se}/^{77}\text{Se}$ D.L.	$^{80}\text{Se}/^{77}\text{Se}$ D.L.	$^{82}\text{Se}/^{77}\text{Se}$ D.L.
Ultrapure water	0.3	0.5	3	0.01	0.02	0.1
Phosphate buffer	0.3	1	3	0.1	0.4	0.9
NaOH	1	1	6	0.3	0.2	2

^a Determined from the equation developed by Yu et al. [37] for isotope dilution method

^b Calculated from instrumental D.L. taking into account sample dilution, soil mass, and volume used for extraction

of ambient Se in forest soils compared with agricultural ones because of the lower stability of organo-mineral associations (26 soils; Tolu et al., unpublished data).

Added Se In both soils, the added $\text{Se}_{\text{water-soluble}}$ fraction decreases exponentially to reach a steady state after 21–25 days (Figs. 3a and 4a). This fraction is found to be reduced by 2.5–4 times (agriculture-forest) after 1 month, in close agreement with previous studies that examined various soil ageing conditions [14, 15, 17]. In the agricultural soil, the 18 % decrease of added $\text{Se}_{\text{water-soluble}}$ during the first 14 days (from 32 ± 2 to 14 ± 2 %) corresponds well with the 16 % increase of the exchangeable fraction (from 33 ± 2 to 49 ± 3 %; Fig. 3a, b). The same is observed, but to a lesser extent, in the forest soil where the added $\text{Se}_{\text{water-soluble}}$ decreases by about 6 % during the first 7 days (9.8 ± 0.8 to 4.2 ± 0.7 %) while $\text{Se}_{\text{exchangeable}}$ increases (56 ± 4 to 62 ± 5 %; Fig. 4a, b). These results clearly point out a transfer of the added Se from the water-soluble fraction to the exchangeable fraction, which is considered representative of Se adsorbed onto oxides and/or clay mineral phases. This is consistent with the well-known affinity of Se for surfaces of Fe or Al oxides and clay minerals [1]. Between days 7 and 25, both $\text{Se}_{\text{water-soluble}}$ and $\text{Se}_{\text{exchangeable}}$ fractions in the forest soil decrease resulting in a loss of respectively about 2 and 17 %, which matches fairly well with the increase of the OM fraction (22 %). The exchangeable fraction is still decreasing after 25 days from 45 ± 5 to 36 ± 4 % while Se_{OM} increases from 55 ± 7 to 68 ± 7 %. It is therefore likely that the added $\text{Se}_{\text{water-soluble}}$ and $\text{Se}_{\text{exchangeable}}$ fractions are transferred to OM phases, as expected from the reported interaction between

Se and soil OM [1]. In the agricultural soil, $\text{Se}_{\text{exchangeable}}$ decreases after 14 days, whereas the OM fraction stays rather stable during the entire incubation period, indicating a redistribution of the exchangeable added Se towards more retentive phases refractory to NaOH. However, these retentive phases may still contain OM as NaOH was shown to be less efficient to extract OM in agricultural soils because of stronger associations between organic and mineral soil fractions (Tolu et al., unpublished data) [39].

Overall, our results indicate that slow processes are involved in the stabilization of Se added to soils. Although the $\text{Se}_{\text{water-soluble}}$ fraction has come to a steady state in 1 month, Se distribution among the exchangeable and OM fractions is evolving within the 3 months of incubation and may be beyond. It is indeed difficult to ascertain that these fractions reach equilibrium at the end of the experiment although the curves apparently flattened. Despite the fact that the distributions of ambient and added Se are still different after 3 months, they show similar trends during the ageing incubation, supported by significant correlations between added and ambient Se for the three fractions of the forest soil (Spearman's $r = 0.58\text{--}0.99$; $P < 0.1\text{--}0.01$). It suggests that an understanding of the ambient Se behavior would be useful to infer the long-term fate of added Se, which is of interest in radiological contamination or Se fertilization contexts [4, 8, 19].

Se speciation in soil fractions

Ambient Se As previously observed for total Se, the proportion of ambient Se(IV) in the agricultural soil extracts is relatively

Fig. 3 Distribution of ambient and added Se in the agricultural soil throughout the ageing experiment: **a** water-soluble fraction (ultrapure water extraction), **b** exchangeable fraction (phosphate-buffered extraction) and **c** OM fraction (NaOH extraction)

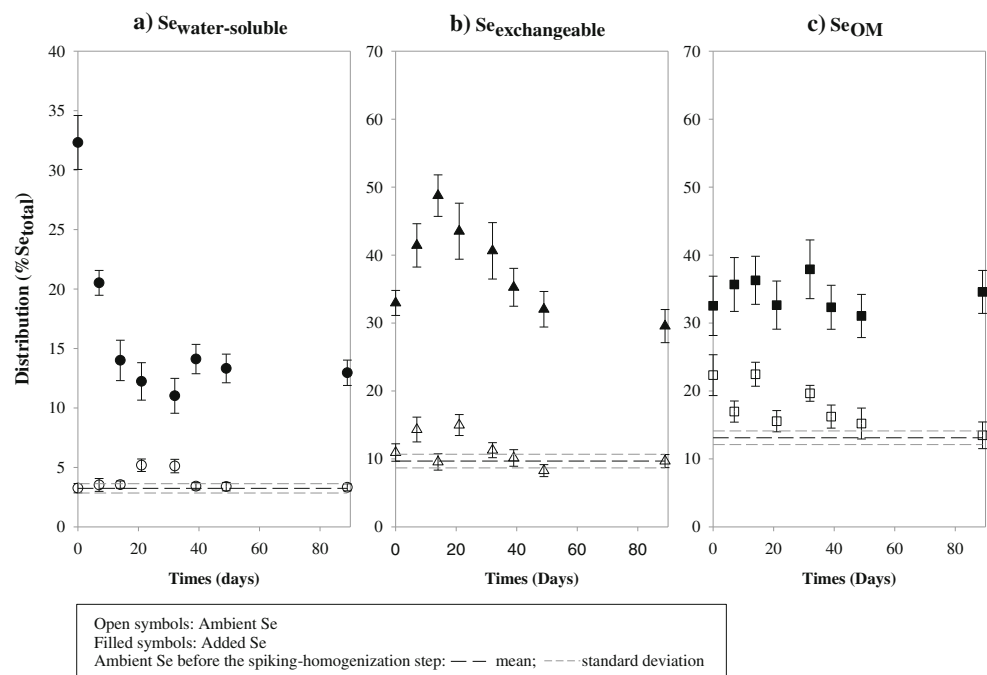
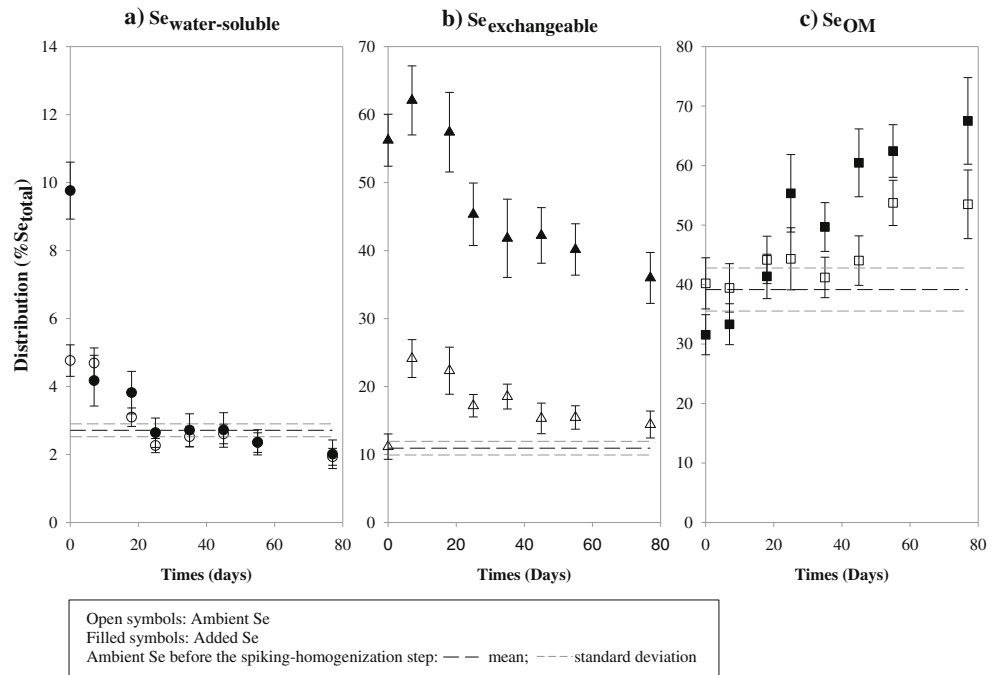


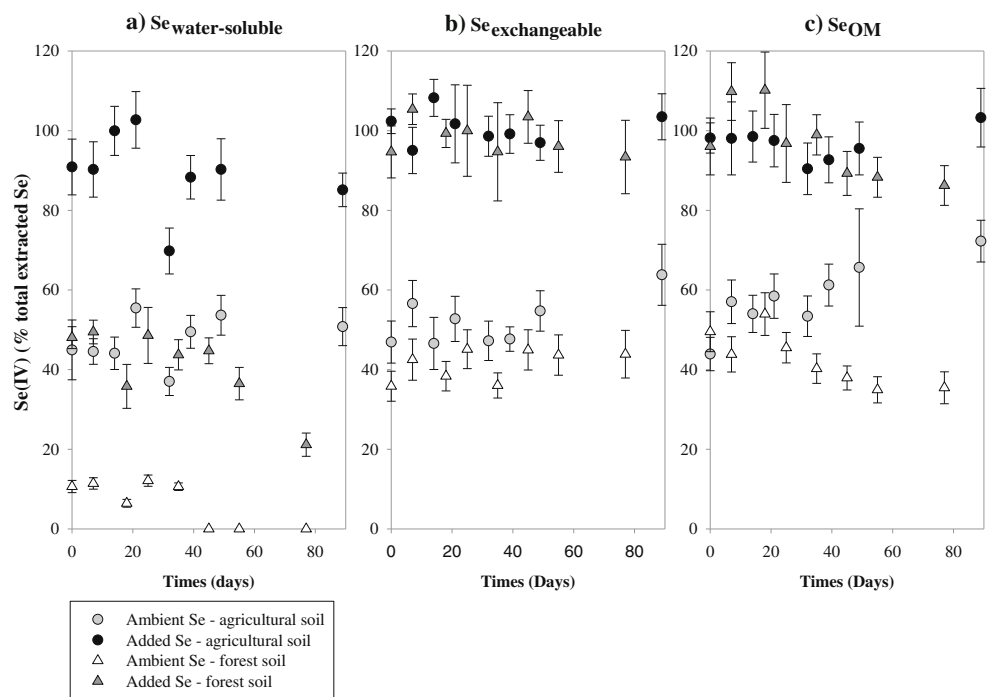
Fig. 4 Distribution of ambient and added Se(IV) in the forest soil throughout the ageing experiment: **a** water-soluble fraction, **b** exchangeable fraction and **c** OM fraction



stable over the incubation period with average values of 48 ± 6 , 52 ± 6 and 58 ± 9 % of total extracted ambient Se, respectively in ultrapure water, phosphate and NaOH extracts (Fig. 5; Table S3 in the ESM). In the forest soil, the proportion of ambient Se(IV) is also stable in the exchangeable fraction (average: 41 ± 4 %) while it clearly drops down in the OM fraction, from 54 ± 5 to 35 ± 4 %, after 18 days and in the water-

soluble fraction, from 11 ± 1 % to undetectable levels, after 45 days (Fig. 5; Table S4 in the ESM). No other known species could be detected by HPLC-ICP-MS in these soil extracts. Therefore, unidentified Se species account for 25 to 100 % of total extracted ambient Se depending on soil type and extraction reagent. Previous works have already reported similar proportions of unidentified Se species [17, 31, 40] while other

Fig. 5 Ambient and added Se(IV) proportions in soil extracts throughout the ageing experiment: **a** water-soluble fraction, **b** exchangeable fraction and **c** OM fraction



studies have highlighted the presence of Se bound to and/or incorporated into purely organic or organo-mineral colloids in soil extracts [41, 42].

Added Se At T0, 52 % of the added Se(IV) is already transformed into unidentified Se species in the water-soluble fraction of the forest soil while Se(IV) still accounts for 91 % of added $\text{Se}_{\text{water-soluble}}$ in the agricultural soil (Fig. 5a). Throughout the incubation, the proportion of added Se(IV) in the water-soluble fraction starts to decrease at 32–45 days (agriculture-forest) without reaching a plateau at the end of the experiment. The proportion of added Se(IV) in the exchangeable and OM fractions of the agricultural soil remains constant over the whole incubation period, making up the totality of the Se extracted (Fig. 5b, c). For the forest soil, most of the added Se(IV) is also recovered as such in these fractions although its proportion slightly decreases after 45 days in the OM fraction as observed for ambient Se, reaching 86 ± 5 % of added Se_{OM} (Fig. 5b, c).

Similarly to the conclusions drawn for Se distribution, these results indicate that slow processes are involved in the transformation of Se(IV) added to soils. Consistent with ambient Se, these transformations do not lead to known Se species. After 3 months, the speciation of ambient and added Se is still very different in both soils. Roughly half of ambient Se is present as unidentified Se species while the added Se is mainly found as Se(IV) (>80 %), except in the water-soluble extract of the forest soil. The formation of unknown Se species is of concern as their behaviors are most likely different from Se(IV) one. However, their influence on Se mobility and bio-availability would not be properly considered with the commonly used short-term experiments after Se-spiking (<1 month). In the same way than Se distribution, the ambient Se speciation may be used to infer the fate of these unidentified, probably colloidal [41, 42], Se species, to evaluate their possible transfer to surface and ground waters or incorporation by plants.

Implication for long-term modeling of Se fate

Ultrapure water extraction is widely used to determine solid/liquid distribution coefficient (K_d , in liters per kilogram), one of the main parameter used in modeling for long-term risk assessment. K_d values are commonly determined after Se addition to soils and a short equilibration time (<68 h) [9–16, 18]. However, our results question the suitability of this short equilibration duration as added $\text{Se}_{\text{water-soluble}}$ reached a steady state only after a month. Interestingly, if K_d values are calculated at T0 (69 ± 5 – 338 ± 29 L kg^{-1} ; agriculture-forest, Tables S3 and S4 in the ESM), they are in good agreement with the extensive K_d compilation of reference for radioactive waste management agencies, ranging from 4 to $2,130$ L kg^{-1} with a geometric mean value of 200 ± 3 L kg^{-1} (172 Se-spiked

soils) [18, 43]. When calculated at 1 month, i.e., when added $\text{Se}_{\text{water-soluble}}$ has reached an apparent equilibrium, the K_d values are significantly higher, 270 ± 39 and $1,323 \pm 216$ L kg^{-1} for the agricultural and forest soils. At this point, they are also closer to those calculated from ambient $\text{Se}_{\text{water-soluble}}$, i.e., 896 ± 159 L kg^{-1} (agricultural soil-average value T0–3 months) and $1,490 \pm 171$ L kg^{-1} (forest soil-average value 25 days–3 months) and to the geometric mean reported for ambient Se in 9 Canadian soils (670 ± 2 L kg^{-1} [44]) and 26 French soils (642 ± 1 L kg^{-1} ; Tolu et al., unpublished data). In line with the previous discussions on Se distribution and speciation, it suggests that the K_d s determined from the desorption of ambient Se should be used in long-term risk assessment models as previously proposed by Sheppard [19] for others elements.

Conclusions

This work presents for the first time the use of an isotopically enriched tracer in combination with the determination of Se distribution and speciation in soils by HPLC-ICP-C/RC-MS. The accurate and precise measurement of the four major Se isotopes at trace level (in nanograms per liter) in soil extracts requires the use of a H_2 -He mixture (4 – 1 mL min^{-1}) for the C/RC and a bracketing method for mathematical correction of BrH^+ interferences. The application of a $^{77}\text{Se(IV)}$ tracer to simultaneously monitor the fate of ambient and newly added Se in two soils under ageing simulation has shown the robustness of the optimized methodology. The reactivity of added $^{77}\text{Se(IV)}$ during 3 months of incubation clearly demonstrates that the usual short-term experiments (<1 month) performed after Se addition are not suitable to infer the long-term fate of Se input in soils, which is critical for the long-term risk assessment of radioactive waste disposal and Se fertilization. Our results also suggest that ambient Se would perform better for this latter task and should be used to determine modeling parameters like K_d and processes controlling long-term Se mobility and speciation in soils. Further investigations are needed to unravel the transformations into unknown Se species, which represent a large pool (>30 %) of extractable ambient Se. This optimized methodology will open the applications of Se tracers to field investigation since isotopically enriched tracers are less dangerous than radioactive ones.

Acknowledgments This research was financially supported by the French National Radioactive Waste Management Agency (Andra).

References

1. Fernández-Martínez A, Charlet L (2009) Selenium environmental cycling and bioavailability: a structural chemist point of view. *Rev Environ Sci Biotechnol* 8:81–110

2. Premarathna HL, McLaughlin MJ, Kirby JK, Hettiarachchi GM, Beak D, Stacey S, Chittleborough DJ (2010) Potential availability of fertilizer selenium in field capacity and submerged soils. *Soil Sci Soc Am J* 74:1589–1596
3. Premarathna HL, McLaughlin MJ, Kirby JK, Hettiarachchi GM, Stacey S (2012) Influence of submergence and subsequent drainage on the partitioning and lability of added selenium fertilizers in a sulphur-containing Fluvisol. *Eur J Soil Sci* 63:514–522
4. Chilimba ADC, Young SD, Black CR, Meacham MC, Lammel J, Broadley MR (2012) Assessing residual availability of selenium applied to maize crops in Malawi. *Field Crop Res* 134:11–18
5. Fordyce F (2007) Selenium geochemistry and health. *Ambio* 36:94–97
6. Jörg G, Bühnemann R, Hollas S, Kivel N, Kossert K, Van Winckel S, Gostomski CLV (2010) Preparation of radiochemically pure ⁷⁹Se and highly precise determination of its half-life. *Appl Radiat Isot* 68:2339–2351
7. Nichols AL, Aldama DL, Verpelli M (2008) Handbook of nuclear data for safeguards. IAEA, Vienna
8. Andra (2005) Référentiel du comportement des radionucléides et des toxiques chimiques d'un stockage dans le Callovo-Oxfordien jusqu'à l'homme, Site de Meuse Haute-Marne. Andra, Châtenay-Malabry
9. Tao Z, Du J, Dong W, Zheng L (1996) Sorption and desorption of radioselenium on calcareous soil and its solid components. *J Radioanal Nucl Chem* 214:245–254
10. Dong W, Wang X, Du J, Wang DC, Tao Z (1999) Sorption and desorption of radioselenium on red earth and its solid components. *J Radioanal Nucl Chem* 240:715–719
11. Dhillon KS, Dhillon SK (1999) Adsorption-desorption reactions of selenium in some soils of India. *Geoderma* 93:19–31
12. Nakamaru Y, Tagami K, Uchiga S (2005) Distribution coefficient of selenium in Japanese agricultural soils. *Chemosphere* 58:1347–1354
13. Coppin F, Chabroulet C, Martin-Garin A (2009) Selenite interactions with some particulate organic and mineral fractions isolated from a natural grassland soil. *Eur J Soil Sci* 60:369–376
14. Haudin CS, Renault P, Hallaire V, Leclerc-Cessac E, Staunton S (2007) Effect of aeration on mobility of selenium in columns of aggregated soil as influenced by straw amendment and tomato plant growth. *Geoderma* 141:98–110
15. Février L, Martin-Garin A, Leclerc E (2007) Variation of the distribution coefficient (K_d) of selenium in soils under various microbial states. *J Environ Radioact* 97:189–205
16. Ashworth DJ, Moore J, Shaw G (2008) Effects of soil type, moisture content, redox potential and methyl bromide fumigation on K_d values of radio-selenium in soil. *J Environ Radioact* 99:1136–1142
17. Li HF, Lombi E, Stroud JL, McGrath SP, Zhao FJ (2010) Selenium speciation in soil and rice: influence of water management and Se fertilization. *J Agric Food Chem* 58:11837–11843
18. Gil-García C, Tagami K, Uchida S, Rigol A, Vidal M (2009) New best estimates for radionuclide solid–liquid distribution coefficients in soils. Part 3: miscellany of radionuclides (Cd, Co, Ni, Zn, I, Se, Sb, Pu, Am, and others). *J Environ Radioact* 100:704–715
19. Sheppard SC (2011) Robust prediction of K_d from soil properties for environmental assessment. *Hum Ecol Risk Assess* 17:263–279
20. Dumat C, Staunton S (1999) Reduced adsorption of caesium on clay minerals caused by various humic substances. *J Environ Radioact* 46:187–200
21. Monperrus M, Krupp E, Amouroux D, Donard OFX, Rodriguez Martin-Doimeadios RC (2004) Potential and limits of speciated isotope-dilution analysis for metrology and assessing environmental reactivity. *Trends Anal Chem* 23:261–272
22. Hintelmann H, Evans RD (1997) Application of stable isotopes in environmental tracer studies - Measurement of monomethylmercury (CH_3Hg^+) by isotope dilution ICP-MS and detection of species transformation. *Fresenius J Anal Chem* 358:378–385
23. Rodriguez-Gonzalez P, Bouchet S, Monperrus M, Tessier E, Amouroux D (2013) In situ experiments for element species-specific environmental reactivity of tin and mercury compounds using isotopic tracers and multiple linear regression. *Environ Sci Pollut Res* 20(3):1269–1280
24. Hinojosa Reyes L, Marchante-Gayón JM, García Alonso JI, Sanz-Medel A (2003) Determination of selenium in biological materials by isotope dilution analysis with an octopole reaction system ICP-MS. *J Anal At Spectrom* 18:11–16
25. Darrouzès J, Bueno M, Lespès G, Potin-Gautier M (2005) Operational optimisation of ICP-octopole collision/reaction cell-MS for applications to ultratrace selenium total and speciation determination. *J Anal At Spectrom* 20:88–94
26. Inagaki K, Takatsu A, Nakama A, Eyama S, Yarita T, Okamoto K, Chiba K (2006) Determination of selenium in sediment by isotope-dilution inductively coupled plasma mass spectrometry with an octopole reaction cell. *Anal Bioanal Chem* 385:67–75
27. Collins RN, Tran ND, Bakkaus E, Avoscan L, Gouget B (2006) Assessment of isotope exchange methodology to determine the sorption coefficient and isotopically exchangeable concentration of selenium in soils and sediments. *Environ Sci Technol* 40:7778–7783
28. Van Dael P, Lewis J, Barclay D (2004) Stable isotope-enriched Selenite and selenate tracers for human metabolic studies: a fast and accurate method for their preparation from elemental selenium and their identification and quantification using hydride generation atomic absorption spectrometry. *J Trace Elem Med Biol* 18:75–80
29. Han FX, Banin A, Triplett GB (2001) Redistribution of heavy metals in arid-zone soils under a wetting/drying cycle soil moisture regime. *Soil Sci* 166:18–28
30. Rosén K, Shand CA, Haak E, Cheshire MV (2006) Effect of clay content and wetting-and-drying on radiocaesium behaviour in a peat and a peaty podzol. *Sci Total Environ* 368:795–803
31. Tolu J, Le Hécho I, Bueno M, Thiry Y, Potin-Gautier M (2011) Selenium speciation analysis at trace level in soils. *Anal Chim Acta* 684:126–133
32. Zhang Y, Frankenberger WT (2003) Determination of selenium fractionation and speciation in wetland sediments by parallel extraction. *Int J Environ Anal Chem* 83:315–326
33. Dauthieu M, Bueno M, Darrouzès J, Gilon N, Potin-Gautier M (2006) Evaluation of porous graphitic carbon stationary phase for simultaneous preconcentration and separation of organic and inorganic selenium species in “clean” water systems. *J Chromatogr, A* 1114:34–39
34. Sloth JJ, Larsen EH (2000) Application of inductively coupled plasma dynamic reaction cell mass spectrometry for measurement of selenium isotopes, isotope ratios and chromatographic detection of selenoamino acids. *J Anal At Spectrom* 15:669–672
35. Yamada N, Takahashi J, Sakata K (2002) The effects of cell-gas impurities and kinetic energy discrimination in an octopole collision cell ICP-MS under non-thermalized conditions. *J Anal At Spectrom* 17:1213–1222
36. Darrouzès J, Bueno M, Simon S, Pannier F, Potin-Gautier M (2008) Advantages of hydride generation interface for selenium speciation in waters by high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry coupling. *Talanta* 75:362–368
37. Yu LL, Fassett JD, Guthrie WF (2002) Detection limit of isotope dilution mass spectrometry. *Anal Chem* 74:3887–3891
38. Deneff K, Six J, Paustian K, Merckx R (2001) Importance of macro-aggregate dynamics in controlling soil carbon stabilization: short-term effects of physical disturbance induced by dry-wet cycles. *Soil Biol Biochem* 33:2145–2153
39. Marschner B, Brodowski S, Dreves A, Gleixner G, Gude A, Grootes PM, Hamer U, Heim A, Jandl G, Ji R, Kaiser K, Kalbitz K, Kramer C, Leinweber P, Rethemeyer J, Schäffer A, Schmidt MWI, Schwark L, Wiesenberger GLB (2008) How relevant is recalcitrance for the stabilization of organic matter in soils? *J Plant Nutr Soil Sci* 171:91–110
40. Stroud JL, McGrath SP, Zhao FJ (2012) Selenium speciation in soil extracts using LC-ICP-MS. *Int J Environ Anal Chem* 92:222–236

41. Le Hécho I, Tolu J, Thiry Y, Bueno M, Potin-Gautier M (2012) In: Selim HM (ed) Competitive sorption and transport of heavy metals in soils and geological media. CRC Press, Boca Raton
42. Weng L, Vega FA, Supriatin S, Bussink W, Van Riemsdijk WH (2011) Speciation of Se and DOC in soil solution and their relation to Se bioavailability. *Environ Sci Technol* 45:262–267
43. IAEA (2010) Handbook of parameter values for the prediction of radionuclides transfer in terrestrial and freshwaters environments -technical report series no. 472. IAEA, Vienna
44. Sheppard SC, Grant CA, Drury CF (2009) Trace elements in Ontario soils—mobility, concentration profiles, and evidence of non-point-source pollution. *Can J Soil Sci* 89:489–499

Annexe II

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications

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

Di Tullo P., Versini A., Bueno M., Le Hécho I., Thiry Y., Biron P., Castrec-Rouelle M., Pannier F. Stable isotope tracing: a powerful tool for selenium speciation and metabolic studies in non-hyperaccumulator plants (ryegrass *Lolium perenne* L.) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (DOI: 10.1007/s00216-015-9069-4)

Di Tullo P., Pannier F., Bueno M., Le Hecho I., Turpault MP., Saint André L., Thiry Y. Dynamics of selenium cycling in a *Fagus sylvatica* forest of Meuse/Haute-Marne region (*in preparation*).

Di Tullo P., Pannier F., Thiry Y., Le Hécho I., Bueno M. In situ study of selenium retention in soils using isotopically enriched stable selenite tracer (*in preparation*).

Communications

Communications orales

7th Franco-Spanish Workshop on Bio-inorganic Analytical Chemistry (Juillet 2012; Gijon, Espagne)

Di Tullo P., Tolu J., Bueno M., Thiry Y., Pannier F., Potin-Gautier M., Le Hécho I. “Tracing differential reactivity of native and freshly added Se in soils using stable isotopically enriched selenite”.

3th International Conference on Selenium in the Environment and Human Health (Novembre 2013 Hefei, Chine)

Di Tullo P., Bueno M., Le Hécho I., Thiry Y. Pannier F. “Use of stable enriched selenite tracer in fields experiment to investigate short- and long-term fate in soil of selenium”.

BIOGEOMON 2014: 8th International Symposium on Ecosystem Behavior» (Juillet 2014; Bayreuth, Allemagne)

Di Tullo P., Pannier F., Bueno M., Le Hecho I., Turpault MP., Thiry Y.

“Dynamics of selenium cycling in deciduous forests”.

RST: 24th Réunion de Science de la Terre” (Octobre 2014; Pau, France)

Di Tullo P., Bueno M., Thiry I., Le Hécho I. Pannier F.

“Investigation of short-and long term selenium fate in forest soil”.

Communications par voie d’affiche

European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry (Février 2013; Cracovie, Pologne)

Di Tullo P., Bueno M., Le Hécho I., Thiry Y., Pannier F.

“Use of stable isotope-enriched selenite tracer to differentiate and determine native and spiked selenium behavior in soils”.

Spectr’Atom 2014 (Mai 2014; Pau, France)

Di Tullo P., Versini A., Bueno M., Thiry Y., Castrec-Rouelle M., Le Hécho I., Pannier F.

“Utilisation des traceurs isotopiques pour l’étude de la bioincorporation du sélénium inorganique dans le ray-grass (Lolium perenne L.)”.

