



Etude de la résistance de Cupriavidus metallidurans CH34 aux oxyanions sélénite et séléniate : accumulation, localisation et transformation du sélénium.

Laure Avoscan

► To cite this version:

Laure Avoscan. Etude de la résistance de Cupriavidus metallidurans CH34 aux oxyanions sélénite et séléniate : accumulation, localisation et transformation du sélénium.. Physique [physics]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT : . tel-00162019v1

HAL Id: tel-00162019

<https://theses.hal.science/tel-00162019v1>

Submitted on 12 Jul 2007 (v1), last revised 26 Nov 2007 (v3)

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

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

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
Discipline : BIOLOGIE STRUCTURALE ET NANOBIOLOGIE
présentée et soutenue publiquement

par

Laure AVOSCAN

Le 7 juin 2007

Etude de la résistance de *Cupriavidus metallidurans*
CH34 aux oxyanions sélénite et séléniate :
accumulation, localisation et transformation du
sélénium.

JURY

Prof. Dominique SCHNEIDER (président)

Dr. David PIGNOL (rapporteur)

Dr. Jérôme ROSE (rapporteur)

Prof. Jean GUZZO (examineur)

Dr. Jacques COVES (directeur de thèse)

Dr. Barbara GOUGET (co-directrice de thèse)

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
Discipline : BIOLOGIE STRUCTURALE ET NANOBIOLOGIE
présentée et soutenue publiquement

par

Laure AVOSCAN

Le 7 juin 2007

Etude de la résistance de *Cupriavidus metallidurans*
CH34 aux oxyanions sélénite et séléniate :
accumulation, localisation et transformation du
sélénium.

JURY

Prof. Dominique SCHNEIDER (président)

Dr. David PIGNOL (rapporteur)

Dr. Jérôme ROSE (rapporteur)

Prof. Jean GUZZO (examineur)

Dr. Jacques COVES (directeur de thèse)

Dr. Barbara GOUGET (co-directrice de thèse)

*« La rigueur vient toujours à bout de l'obstacle »
Léonard de Vinci*

« A la lumière de la connaissance, l'heureux résultat semble presque aller de soi ; tout étudiant (...) peut l'appréhender sans trop de difficulté. Mais les longues années de tâtonnements, de recherches dans le noir, avec leur lancinante tension, l'alternance des périodes de confiance et de découragement, puis finalement la sortie vers la lumière, seuls ceux qui ont éprouvé cela peuvent le comprendre. »

A. Einstein (1934)

Remerciements

Cette thèse de doctorat de l'Université Joseph Fourier de Grenoble I a été réalisée au Laboratoire Pierre Süe, Unité Mixte de Recherche CEA/CNRS – CEA Saclay, sous la direction de Jacques Covès, Directeur de recherche CNRS à l'Institut de Biologie Structurale UMR CNRS/CEA/UJF, et sous la co-direction de Barbara Gouget, Chercheur CEA et responsable du groupe Toxicologie Humaine et Environnementale du Laboratoire Pierre Süe.

Je souhaite tout d'abord remercier Mr Stéphane Lequien, Directeur du Laboratoire Pierre Süe, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans le cadre de mon travail d'assistante ingénieur CNRS.

Un grand merci à Barbara Gouget qui m'a accordée sa confiance dans ce travail. Barbara, je te remercie pour tes conseils avisés tout au long de la thèse et ton aide précieuse lors de la rédaction de ce manuscrit.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à Jacques Covès pour avoir dirigé avec grand intérêt ce travail malgré la distance.

Je tiens à adresser mes très sincères remerciements à tous les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail.

Je remercie Mr Dominique Schneider de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury. Je remercie Mrs David Pignol et Jérôme Rose pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Je tiens également à remercier Mr Jean Guzzo qui a gentiment accepté d'être membre du jury.

Je tiens à remercier Olivier Proux et Jean-Louis Hazemann pour leur amical accueil sur la ligne FAME du rayonnement synchrotron ESRF de Grenoble. Un grand merci à Olivier pour son aide dans l'exploitation des spectres EXAFS.

Je remercie également Géraldine Sarret pour sa collaboration lors des expériences de spectroscopie d'absorption des rayons X sur la ligne FAME et son aide précieuse lors de l'exploitation des spectres XANES.

Je tiens à remercier Jéril Dégrouard et Danielle Jaillard pour leur disponibilité et gentillesse lors des préparations et observations de bactéries en microscopie électronique à transmission.

Je remercie Albert Perrat pour les analyses de microscopie électronique à transmission équipée d'une détection EDX. Je remercie également François Guyot et Nicolas Menguy des Universités Paris VI et VII pour la microanalyse de microscopie électronique à transmission couplée d'une détection EDX.

Mes remerciements s'adressent ensuite à tous les membres du LPS qui ont participé, de près ou de loin, au bon déroulement de ce doctorat.

Je remercie l'ensemble de l'équipe Toxicologie Humaine et Environnementale pour leur bonne humeur quotidienne. Merci plus particulièrement à Richard Collins, pour le développement de l'analyse HPLC-ICPMS au LPS. Je tiens à remercier également Marie Carrière, Estelle Bakkaus, Sarah Milgram, Céline Thiebault pour leur participation aux campagnes ESRF.

Je remercie Francine Carrot pour les nombreux dosages du sélénium par ICP-MS.

Je remercie Hicham Khodja et Laurent Daudin, pour leurs participations à l'analyse des protéines à la microsonde nucléaire et à l'exploitation des résultats.

Un immense merci à Anne Morel et Martine Piquart pour leur disponibilité et gentillesse.

Enfin, merci à tous mes proches de m'avoir toujours soutenue et encouragée dans mes démarches. Je dédie tout particulièrement cette thèse à mes parents et grands-parents. Je la dédie aussi à Stéphane, qui a vécu cette aventure au quotidien à mes côtés et qui m'a soutenue dans les moments difficiles. Merci à vous tous, du fond du cœur.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	7
ABREVIATIONS	13
AVANT-PROPOS	16
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	17
I. Généralités sur l'élément sélénium	17
1. De sa découverte à nos jours	17
2. Propriétés physico-chimiques du sélénium	17
2.1. Propriétés chimiques	17
2.2. Propriétés physiques	19
3. Utilisation industrielle du sélénium	20
4. Importance biologique du sélénium	21
4.1. Le sélénium : élément trace essentiel	21
4.2. Toxicité du sélénium par excès ou par carence	24
4.2.1. Excès de sélénium	24
4.2.2. Carence en sélénium	27
II. Le sélénium dans l'environnement	29
1. Le cycle biogéochimique du sélénium	29
2. Distribution du sélénium dans l'environnement	30
III. Mécanismes de transformation du sélénium par les micro-organismes	33
1. Réduction des formes oxydées du sélénium	34
1.1. Réduction du séléniat	34
1.2. Réduction du sélénite	37
2. Méthylation et volatilisation du sélénium	40
3. Oxydation des formes réduites du sélénium	41
4. Assimilation du sélénium dans le métabolisme	42
4.1. Les protéines sélénées	43
4.1.1. Synthèse des acides aminés sélénés	43
4.1.2. Incorporation non spécifique des acides aminés dans les protéines	44
4.2. Les sélénoprotéines chez les procaryotes	44
4.2.1. Synthèse de la sélénocystéine	44
4.2.2. Incorporation spécifique de la sélénocystéine dans les sélénoprotéines	44
4.2.3. Les principales sélénoprotéines	47
4.3. Les principales sélénoprotéines chez les eucaryotes	50

IV. Mécanismes de prise en charge du sélénium par les bactéries	52
1. Transport du séléniate	52
2. Transport du sélénite	53
V. Méthodes de dépollution des sols et eaux contaminés en sélénium	54
1. Méthodes physicochimiques	54
2. Méthodes biologiques	55
<u>PRESENTATION DU MODELE D'ETUDE</u>	<u>57</u>
<u>OBJECTIF DE CE TRAVAIL</u>	<u>61</u>
<u>MATERIELS ET METHODES</u>	<u>63</u>
I. Techniques de microbiologie	66
1. Souche bactérienne et conditions de culture	66
1.1. Souche bactérienne et mutants résistants	66
1.2. Milieux de cultures	66
1.3. Conditions et suivis de croissance de <i>C. metallidurans</i> CH34 ou de mutants résistants	67
2. Concentration minimale d'inhibition (CMI)	68
3. Tests de sensibilité	68
4. Dénombrements bactériens en milieu solide	68
5. Expositions au sélénium	69
5.1. Etude de la résistance aux oxyanions de sélénium	69
5.1.1. Chez la souche sauvage	69
5.1.2. Chez les souches mutantes	70
5.2. Etude de l'accumulation et de la consommation des oxyanions de sélénium	70
5.2.1. Influence de concentrations croissantes de sélénium sur l'accumulation	70
5.2.2. Influence de la croissance sur l'accumulation du sélénium	71
5.2.3. Comparaison de l'accumulation du sélénium chez les mutants résistants au sélénite et chez la souche sauvage	71
5.3. Etude de la prise en charge du sélénium	72
5.3.1. Compétitions du sélénium avec le sulfate	72
5.3.2. Induction du mécanisme de prise en charge du sélénium	72
5.4. Contrôle du sélénium relargué après accumulation	73
5.5. Cultures exposées au sélénium pour l'étude de sa transformation au cours de son accumulation	73
5.5.1. Etude chez la souche sauvage et les mutants résistants au sélénite	73
5.5.2. Etude de la compétition entre le séléniate et le sélénite chez la souche sauvage	75
5.5.3. Induction des mécanismes de réduction du sélénium	76
5.5.3.1. Induction du mécanisme de réduction du sélénite	76

5.5.3.2. Induction du mécanisme de réduction du séléniate	76
5.6. Cultures exposées au sélénium pour la recherche de protéines sélénées	76
5.7. Cultures exposées au sélénium pour l'imagerie	77
5.7.1. Expositions au sélénite	77
5.7.2. Expositions au séléniate	77
5.8. Traitements des prélèvements de culture	77
II. Techniques analytiques de biochimie et chimie	78
1. Dosage des protéines	78
2. Dosage du sulfate par colorimétrie	79
3. Dosage du sélénite par fluorimétrie	79
4. Dosage du sélénium total par ICP-MS	80
5. Synthèse de particules de sélénium élémentaire rouge abiotique et biologique, et synthèse de sélénodiglutathion	83
III. Techniques de spéciation des espèces sélénées	86
1. Spéciation des espèces sélénées extraites des culots bactériens par couplage AE-HPLC-ICP-MS	85
1.1. Extraction d'espèces sélénées organiques et inorganiques à partir d'un culot bactérien	86
1.2. Analyse des espèces sélénées par couplage AE-HPLC-ICP-MS	87
2. Spéciation des espèces sélénées par la spectroscopie d'absorption des rayons X	89
3. Recherche de protéines sélénées par SDS-PAGE-PIXE	102
3.1. Electrophorèse de protéines extraites de culots bactériens (SDS-PAGE)	103
3.1.1. Extraction des protéines insolubles (protéines membranaires) et solubles (protéines périsplasmiques et cytoplasmiques)	103
3.1.2. Gel d'électrophorèse en condition dénaturante (SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)	103
3.1.3. Transfert sur membranes de nitrocellulose (Western blot)	105
3.2. Analyse du transfert SDS-PAGE par PIXE	105
IV. Microscopies électroniques	109
1. Analyse de structures par microscopie électronique à transmission (MET)	109
2. Analyse chimique par MET équipée d'un spectromètre de dispersion d'énergie (MET-EDS)	115
V. Analyses statistiques	116
RESULTATS ET DISCUSSIONS	117
<u>RESULTATS CHAPITRE I</u>	118
I. RESISTANCE DE <i>C. metallidurans</i> CH34 AUX OXYANIONS DE SELENIUM	118

1. Effets du sélénite sur la croissance de <i>C. metallidurans</i> CH34 et détermination de la CMI	118
1.1. Effets du sélénite sur la croissance de la souche sauvage	118
1.2. Effets du sélénite sur la croissance des souches mutantes résistantes au sélénite	120
1.3. La résistance chez la souche sauvage	123
2. Effets du séléniat sur la croissance de <i>C. metallidurans</i> CH34 et détermination de la CMI	124
2.1. Effets du séléniat sur la croissance de la souche sauvage	124
2.2. La résistance chez la souche sauvage	126
<u>DISCUSSION ET CONCLUSION du chapitre I</u>	127
<u>RESULTATS CHAPITRE II</u>	129
II. ACCUMULATION DU SELENIUM CHEZ <i>C. metallidurans</i> CH34	129
1. Accumulation du sélénite dans la bactérie et consommation du sélénite présent dans le milieu de culture	129
1.1. Influence de la concentration en sélénite sur son accumulation	129
1.2. Influence de l'état physiologique des bactéries sur l'accumulation du sélénite	131
1.3. Influence de la densité cellulaire sur l'accumulation du sélénium	132
2. Accumulation du séléniat dans la bactérie et consommation du séléniat présent dans le milieu de culture	135
2.1. Influence de la concentration en séléniat sur son accumulation	135
2.2. Influence de l'état physiologique des bactéries sur l'accumulation du séléniat	136
3. Relargage de sélénium par la bactérie	136
<u>DISCUSSION ET CONCLUSION du chapitre II</u>	139
<u>RESULTATS CHAPITRE III</u>	139
III. PRISE EN CHARGE DES OXYANIONS DE SELENIUM CHEZ <i>C. metallidurans</i> CH34	141
1. Prise en charge du sélénite	141
1.1. Prise en charge du sélénite par un système de transport spécifique	141
1.2. Effet de la compétition du sulfate sur la prise en charge du sélénite	142
2. Etude de l'induction du mécanisme de prise en charge du sélénite	144
3. Prise en charge du séléniat	145
3.1. Effet de la compétition du sulfate sur la prise en charge du séléniat	146
3.2. Etude du transport du séléniat chez les mutants résistants au sélénite	147
3.3. Induction du transport du séléniat	147
<u>DISCUSSION ET CONCLUSION du chapitre III</u>	150
<u>RESULTATS CHAPITRE IV</u>	153
IV. MECANISMES DE REDUCTION DES OXYANIONS DE SELENIUM CHEZ <i>C. metallidurans</i> CH34	153

1. Spectroscopie par absorption des rayons X de composés de référence	153
2. Cinétiques de transformation des oxyanions du sélénium	155
2.1. Cinétique de transformation du sélénite par la souche sauvage	155
2.2. Cinétique de transformation du sélénite par les mutants	158
2.3. Caractérisation des particules de sélénium élémentaire formées après exposition au sélénite	161
2.4. Cinétique de transformation du séléniat par la souche sauvage	165
2.5. Cinétique de transformation du séléniat par les mutants	167
2.6. Compétition entre le sélénite et le séléniat lors de la réduction du sélénium	168
3. Réduction du séléniat en milieu limité en sulfate : compétition entre le séléniat et le sulfate	169
3.1. Identification et quantification des espèces générées lors de la réduction	169
3.2. Identification de la troisième espèce sélénée : RSSeSR ou Se^0 ?	171
3.2.1. Analyses MET-EDX	172
3.2.2. Analyses EXAFS	173
4. Induction des mécanismes de réduction du sélénium	175
4.1. Induction du mécanisme de réduction du sélénite	175
4.2. Induction du mécanisme de réduction du séléniat	175
4.2.1. Analyses XANES	175
4.2.2. Analyses EXAFS	178
5. Identification des espèces sélénées organiques produites par <i>C. metallidurans</i> CH34 après exposition aux oxyanions de sélénium	180
5.1. Identification des alkyl séléniures RSeR après exposition au sélénite et au séléniat	180
5.1.1. Rendement de l'extraction	180
5.1.2. Identification des espèces sélénées dans les extraits bactériens	181
6. Recherche des protéines ayant incorporé du sélénium	183
<u>DISCUSSION ET CONCLUSIONS du chapitre IV</u>	189
<u>PUBLICATIONS</u>	199
<u>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</u>	213
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	219
<u>ANNEXE</u>	239

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX**FIGURES**

Figure 1 : diagramme de Pourbaix d'une solution 0,1 μ M de sélénium à 25°C, 1000 hPa (pression atmosphérique) (d'après Séby <i>et al.</i> , 1998).	19
Figure 2 : métabolisme du sélénium dans l'organisme : pool entre le sélénium ingéré et le sélénium présent dans les tissus (adapté de Fishbein, 1991).	24
Figure 3 : impacts positifs et négatifs d'une supplémentation en sélénium chez les animaux d'élevage (d'après Kishchak, 1998).	28
Figure 4 : cycle global du sélénium montrant les flux entre les principaux Compartiments (adapté d'Haygarth, 1994).	29
Figure 5 : transformation du sélénium par les micro-organismes (adapté d'Oremland, 1994).	34
Figure 6 : voies possibles de réduction des oxyanions de sélénium en condition anaérobie.	36
Figure 7 : hypothèse de la réduction biologique du sélénite (d'après Kessi et Hanselmann, 2004).	38
Figure 8 : images de microscopie électronique à balayage de particules de sélénium élémentaire isolées et formées par réduction biologique chez <i>B. selenitireducens</i> MLS10 (A), <i>S. barnesii</i> SES3 (B), and <i>S. shriftii</i> DSSE1 (C) et de sélénium élémentaire formé chimiquement (oxydation de H_2Se) (Oremland <i>et al.</i> , 2004).	39
Figure 9 : voies de synthèse et précurseurs potentiels dans la formation et la dégradation des composés volatiles alkyls du soufre et des composés séléniés (Oremland, 1994).	41
Figure 10 : structures chimiques de la méthionine, de la sélénométhionine, de la cystéine et de la sélénocystéine.	42
Figure 11 : incorporation spécifique ou non spécifique du séléniure dans le métabolisme du sélénium chez les bactéries (adapté de Turner <i>et al.</i> , 1998).	43
Figure 12 : synthèse de sélénocystéine chez les procaryotes (A) et insertion de la sélénocystéine dans la chaîne protéique (B) (adapté de Namy, 2004 et Birringer <i>et al.</i> , 2002).	46
Figure 13 : voies de régulation du transport du sulfate (adapté de Kredich, 1996) et de son assimilation chez <i>S. typhimurium</i> (Kredich, 1971).	53
Figure 14 : récapitulatif de l'ensemble des expositions au sélénium et les techniques analytiques mises en œuvre pour la caractérisation de la résistance au sélénium, de la prise en charge du sélénium, de son accumulation, de sa transformation et de sa localisation intracellulaire et moléculaire chez <i>C. metallidurans</i> CH34.	65
Figure 15 : les conditions d'exposition pour l'étude de la compétition du sélénite et du séléniat.	75
Figure 16 : gamme étalon pour le dosage du sulfate en mM (Aquaquant [®] , VWR)	79
Figure 17 : schéma de principe de l'ICP-MS.	81
Figure 18 : protocole de traitement des échantillons pour le dosage du sélénium total dans les échantillons bactériens et le milieu de culture.	82
Figure 19 : protocole d'extraction des particules de sélénium biologique.	85

Figure 20 : méthodologie d'extraction des espèces sélénées pour le dosage du sélénium par AE-HPLC-ICP-MS.	87
Figure 21 : AE-HPLC Gilson couplée à l'ICP-MS series X7 du Laboratoire Pierre Süe.	88
Figure 22 : effet photoélectrique (A) et spectre d'absorption des rayons X obtenu (B) schématisés.	91
Figure 23 : la ligne de mesure FAME BM30B à l'ESRF de Grenoble. Analyse à température ambiante (A) et à -260°C sous hélium avec un cryostat (B).	93
Figure 24 : schéma simplifié de la ligne de mesure FAME BM30B.	93
Figure 25 : protocole expérimental de préparation des échantillons pour l'analyse XAS	94
Figure 26 : méthodologie de traitement des spectres XANES.	97
Figure 27 : méthodologie de traitement des spectres EXAFS avec le programme SEDEM.	101
Figure 28 : protocole de préparation et d'analyse des extraits protéiques.	102
Figure 29 : schéma du système de transfert électrophorétique d'un gel de polyacrylamide vers une membrane de nitrocellulose (Western blot).	105
Figure 30 : schéma simplifié montrant l'origine de quelques transitions de fluorescence.	107
Figure 31 : schéma et images de la microsonde nucléaire du Laboratoire Pierre Süe (CEA/CNRS Saclay, Laboratoire Pierre Süe).	108
Figure 32 : schéma simplifié d'un microscope électronique à transmission (adapté de Prescott <i>et al.</i> , 1995) et microscope électronique Philips EM 208, CCME Orsay.	110
Figure 33 : protocole de préparation des inclusions pour l'ultramicrotomie.	113
Figure 34 : ultramicrotome LEICA EM FC6 du CCME d'Orsay.	114
Figure 35 : préparation de coupes d'échantillons pour l'observation par microscopie électronique à transmission.	114
Figure 36 : courbes de croissance de <i>C. metallidurans</i> CH34 en fonction de la concentration en sélénite.	119
Figure 37 : vitesse de croissance et temps de latence en fonction de la concentration en sélénite dans le milieu de culture.	120
Figure 38 : croissance de la souche mutante (RM8) et de la souche sauvage (WT) en absence et en présence de sélénite.	122
Figure 39 : viabilité bactérienne exprimée en pourcentage de cellules viables par rapport à une culture contrôle sans sélénium au cours de la croissance de la souche mutante RM8 et de la souche sauvage exposée à 2 mM de sélénite.	123
Figure 40 : détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour le sélénite.	124
Figure 41 : résistance de <i>C. metallidurans</i> CH34 en fonction d'une gamme de concentrations de sélénite en milieu solide selon la méthode de " patch test ".	124
Figure 42 : courbes de croissance de <i>C. metallidurans</i> CH34 en fonction de la concentration en sélénite.	125
Figure 43 : temps de latence et vitesse de croissance en fonction de la concentration en sélénite dans le milieu de culture.	126
Figure 44 : détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour le sélénite.	126
Figure 45 : variations de la consommation du sélénium du milieu de culture (A) et de l'accumulation dans les bactéries (B) lors de la croissance de <i>C. metallidurans</i> CH34 en présence de différentes concentrations de sélénite.	130

Figure 46 : maxima de consommation et vitesse d'accumulation du sélénium dans les bactéries en fonction de différentes concentrations de sélénite.	131
Figure 47 : accumulation de sélénium dans les bactéries lors de la croissance de <i>C. metallidurans</i> CH34 en présence de 2 mM de sélénite ajoutés à différents stades de la croissance.	132
Figure 48 : croissance sans sélénium et en présence de 2 mM de sélénite dans le milieu à 0,2% et 2% de gluconate et consommation du sélénium du milieu de culture par <i>C. metallidurans</i> CH34.	133
Figure 49 : pourcentages d'accumulation du sélénium par les bactéries exposées à 2 mM de sélénite dans le milieu à 0,2% de gluconate par rapport aux bactéries cultivées dans le milieu à 2% de gluconate.	134
Figure 50 : pourcentage d'accumulation du sélénium dans les bactéries lors de la croissance de <i>C. metallidurans</i> CH34 exposées à 2 mM de sélénite par rapport à la concentration de sélénite initiale présente dans le milieu de culture.	135
Figure 51 : accumulation de sélénium dans les bactéries lors de la croissance de <i>C. metallidurans</i> CH34 en présence de 2 mM de sélénite ajoutés à différents stades de la croissance (absorbance de 0,3, début de phase exponentielle et absorbance de 1, milieu de phase exponentielle).	136
Figure 52 : pourcentage d'accumulation de sélénium chez les mutants résistants au sélénite par rapport à l'accumulation de la souche sauvage au cours du temps.	142
Figure 53 : courbes de croissance de <i>C. metallidurans</i> CH34 cultivée dans le milieu TSM contenant 0,3 ou 3 mM de sulfate (Na_2SO_4) en absence de sélénium (courbes pointillées) et en présence de 2 mM de sélénite (courbes pleines).	143
Figure 54 : pourcentage d'accumulation du sélénium par <i>C. metallidurans</i> CH34 cultivée dans le milieu TSM contenant 0,3 mM de sulfate en présence de 2 mM de sélénite par rapport à l'accumulation dans le milieu classique (TSM à 3 mM de sulfate).	144
Figure 55 : profils d'accumulations du sélénite par la souche sauvage en présence de chloramphénicol exprimés en pourcentage d'accumulation par rapport à la souche sauvage en absence de chloramphénicol.	145
Figure 56 : suivi de l'accumulation de sélénium dans les bactéries cultivées en présence de 2 mM de sélénite ajouté en phase stationnaire dans le milieu TSM contenant 0,3 mM de sulfate.	146
Figure 57 : suivi de l'accumulation de sélénium dans les bactéries en présence de 2 mM de sélénite et de chloramphénicol ajoutés en phase stationnaire dans le milieu TSM contenant 0,3 mM de sulfate par rapport à l'accumulation dans le même milieu en absence de chloramphénicol.	148
Figure 58 : spectres XANES au seuil K du sélénium de composés de référence.	154
Figure 59 : spectres XANES au seuil K du sélénium et distribution des espèces sélénées obtenus à différents temps d'exposition de <i>C. metallidurans</i> CH34 à 2 mM de sélénite.	157
Figure 60 : cinétique de réduction du sélénite au cours de la croissance de <i>C. metallidurans</i> CH34.	158
Figure 61 : spectres XANES au seuil K du sélénium et distribution des espèces sélénées obtenus après différents temps d'exposition de la souche mutante RM7 à 10 mM de sélénite.	159
Figure 62 : cinétique de réduction du sélénite au cours de la croissance de RM7.	160

Figure 63 : cultures de <i>C. metallidurans</i> CH34 en absence (A) et en présence de 2 mM de sélénite (B).	161
Figure 64 : cinétique de formation des particules de sélénium élémentaire par <i>C. metallidurans</i> CH34 au cours de l'exposition à 2 mM de sélénite.	163
Figure 65 : spectre EDX d'une particule dense dans le cytoplasme d'une bactérie exposée à 2 mM de sélénite.	164
Figure 66 : microphotographies prises au microscope électronique à transmission de particules de sélénium élémentaire.	164
Figure 67 : spectres XANES au seuil K du sélénium et distribution des espèces séléniées obtenus à différents temps d'exposition de <i>C. metallidurans</i> CH34 à 2 mM de sélénite.	166
Figure 68 : cinétique de réduction du sélénite durant la croissance de <i>C. metallidurans</i> CH34.	167
Figure 69 : spectres XANES au seuil K du sélénium et distribution des espèces séléniées obtenus à différents temps d'exposition des souches mutantes RM6, RM7 et RM8 à 5 mM de sélénite.	168
Figure 70 : spectres XANES au seuil K du sélénium et distribution des espèces séléniées obtenus à différents temps d'exposition de <i>C. metallidurans</i> CH34 2 mM de sélénite ajoutés dans le milieu TSM contenant 0,3 mM de sulfate.	171
Figure 71 : microphotographies prises en microscopie électronique à transmission de coupes ultra-fines de <i>C. metallidurans</i> CH34 au cours de l'exposition à 2 mM de sélénite dans le milieu limité en sulfate (A à D).	172
Figure 72 : spectre EDX d'une particule dense dans le cytoplasme d'une bactérie exposée à 2 mM de sélénite dans le milieu TSM limité en sulfate.	173
Figure 73 : oscillations EXAFS dans l'espace des vecteurs d'onde au seuil K du sélénium des échantillons bactériens en début (spectre noir) et fin d'exposition (spectre orange) à 2 mM de sélénite dans le milieu TSM contenant 0,3 mM de sulfate et de références de sélénium.	174
Figure 74 : spectres XANES au seuil K du sélénium obtenus à différents temps d'exposition de <i>C. metallidurans</i> CH34 à 2 mM de sélénite ajoutés dans le milieu TSM contenant 0,3 mM de sulfate en présence (A) et en absence (B) de chloramphénicol.	177
Figure 75 : oscillations EXAFS dans l'espace des vecteurs d'onde au seuil K du sélénium des échantillons bactériens en début (spectres noirs) et fin d'exposition (spectres oranges) à 2 mM de sélénite en absence et en présence de chloramphénicol dans le milieu TSM contenant 0,3 mM de sulfate et de références de sélénium.	179
Figure 76 : rendement d'extraction du sélénium total suite à la lyse enzymatique des échantillons bactériens de la souche sauvage exposée à 2 mM de sélénite (A) et à 2 mM de sélénite (B) et de la souche mutante RM8 exposée à 2 et 10 mM de sélénite (B).	181
Figure 77 : chromatogrammes obtenus par HPLC-ICP-MS de la solution standard (A) et chromatogrammes caractéristiques des extraits de bactéries sauvages exposées à 2 mM de sélénite (B) et à 2 mM de sélénite (C) et de bactéries mutantes exposées à 2 mM de sélénite (D) pendant 24 heures.	183
Figure 78 : photographies des gels SDS-PAGE des extraits cytoplasmique, périsplasmique et membranaire de <i>C. metallidurans</i> CH34 exposée à 2 mM de sélénite ou à 7 mM de sélénite.	184

Figure 79 : analyse SDS-PAGE-PIXE d'extraits protéiques membranaires après exposition au sélénite (A), d'extraits protéiques cytoplasmiques et périplasmiques après exposition au sélénite (B) et au séléniate (C).	186
Figure 80 : schéma récapitulatif de la voie de réduction du sélénium (adapté de Turner <i>et al.</i> , 1998).	188

TABLEAUX

Tableau 1 : propriétés physicochimiques du sélénium et du soufre (adapté de Haygarth, 1994).	18
Tableau 2 : les isotopes naturels du sélénium et leur abondance.	20
Tableau 3 : apports conseillés en sélénium pour les différentes classes d'âges (Apports Nutritionnels Conseillés, 2001).	22
Tableau 4 : teneurs moyennes en sélénium mesurés dans des échantillons représentant les produits les plus consommés en France (INRA, 2004).	23
Tableau 5 : principaux composés de sélénium présents dans l'environnement (d'après Haygarth, 1994).	31
Tableau 6 : sélénoprotéome bactérien (adapté de Kryukov et Gladyshev, 2004).	49
Tableau 7 : sélénoprotéines de mammifères (adapté de Korhle, 2004 et Birringer <i>et al.</i> , 2002).	51
Tableau 8 : résistance aux métaux lourds de <i>C. metallidurans</i> CH34 (adapté de Mergeay, 2000).	60
Tableau 9 : Composition du milieu de culture salin minimum (TSM).	67
Tableau 10 : liste des composés de sélénium de référence.	98
Tableau 11 : compositions du gel de séparation (A) et du gel de concentration (B).	104
Tableau 12 : récapitulatif des résultats obtenus après exposition au sélénite et au séléniate de <i>C. metallidurans</i> CH34.	138
Tableau 13 : bilan des résultats des chapitres I à III.	149
Tableau 14 : différence d'énergie entre les sauts de seuil des composés de références.	155
Tableau 15 : taille des particules de sélénium élémentaire observées au cours de l'exposition de <i>C. metallidurans</i> CH34 à 2 mM de sélénite.	163
Tableau 16 : simulations des spectres XANES (A) et EXAFS (B).	175
Tableau 17 : simulations des spectres XANES (A) et EXAFS (A et B).	178

Tableau 18 : distribution des espèces sélénées obtenues à différents temps d'exposition de <i>C. metallidurans</i> CH34 à 2 mM de séléniate ajouté dans le milieu TSM contenant 0,3 mM de sulfate en présence de chloramphénicol.	180
Tableau 19 : bilan des résultats du chapitre IV.	187

ABREVIATIONS

A₆₀₀	absorbance à 600 nm
ACP	analyse en composante principale
AE	chromatographie échangeuse d'anions
APS	ammonium persulfate
BCA	acide bicinchoninique
BDMA	benzyl diméthylamine
BSA	albumine de sérum bovin
CCT	technologie cellule de collision
CMI	concentration minimale inhibitrice
DMSe	diméthyle séléniure
DMDSe	diméthyl diséléniure
EDX	energy dispersive X-ray
eV	électron volt
EXAFS	extended X-ray absorption fine structure
GPx	glutathion peroxydase
GSH	glutathion réduit
GSSe⁻	sélénopersulfide
GSSeH	gluathioséléniol
GSSeSG	sélénodiglutathion
GSSG	glutathion oxydée ou diglutathion
HMPA	hexaméthylphosphoramide
HPLC	high performance liquid chromatography
ICP-MS	spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif
LB	Luria Bertani
LCF	linear combinaison fit
MET	microscopie électronique à transmission
NSS	normalized sum-squares residuals
OMS	organisation mondiale pour la santé
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PIXE	particle induced X-ray emission
PHB	polyhydroxybutyrate
Prx	peroxyrédoxine
ROI	region of interest

SDS	sodium dodécyl sulfate
SECIS	selenocysteine insertion sequence
SeMet	sélénométhionine
TEMED	N,N,N,N,-tétra méthyle éthylène diamine
Trx	thiorédoxine
TSM	tris salt medium
XANES	X-ray absorption near edge structure

AVANT-PROPOS

Le sélénium, d'origine naturelle ou anthropique, est largement distribué dans l'environnement sous deux formes chimiques principales : le sélénite et le séléniate, formes très solubles, biodisponibles et hautement toxiques. La solubilité de ces formes oxydées du sélénium leur confère une grande mobilité dans l'environnement et de ce fait pose d'importants problèmes de pollution dans les régions sélénifères, dans les eaux usées de certaines industries et potentiellement dans les effluents du cycle du combustible nucléaire en tant que radioélément à vie longue (^{79}Se).

On sait que certains micro-organismes résidant dans les sols et dans les eaux contribuent au cycle géochimique du sélénium en réduisant le sélénite et/ou le séléniate, formes assimilables, en une forme insoluble peu toxique, le sélénium élémentaire. Cette réduction des formes oxydes permet de limiter leur mobilité et leur toxicité dans l'environnement. Depuis une quinzaine d'années, de nombreux travaux de recherche démontrent les capacités dépolluantes de certains micro-organismes. Ces procédés de réhabilitation par voie biologique ou bioremédiation pourraient être exploités en complément des techniques physico-chimiques de dépollution déjà existantes. Pour envisager une application des micro-organismes en bioremédiation, les mécanismes biologiques de résistance, d'accumulation, de réduction et d'immobilisation (sans relargage) des oxyanions du sélénium doivent être compris.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur l'élément sélénium

1. De sa découverte à nos jours

En 1817, le chimiste suédois Jöns Jakob Berzelius a découvert l'élément sélénium dans des dépôts sur les parois de chambres de plomb utilisées pour la préparation d'acide sulfurique (Hatfield, 2001). Cette découverte ayant eu lieu peu de temps après celle de l'élément tellure, du latin *tellus* c'est-à-dire « terre », il l'appela sélénium, issu du grec « selene » signifiant « lune ».

Le sélénium a été caractérisé par sa toxicité et ses effets néfastes durant plus d'un siècle. En 1954, il fut démontré que certaines bactéries se développaient plus rapidement dans un milieu enrichi en sélénium (Pinsent, 1954). La première sélénoprotéine, la glutathion peroxydase, identifiée dans les cellules eucaryotes chez l'homme, a permis d'établir ses fonctions biochimiques en tant qu'élément essentiel (Rotruck *et al.*, 1973 ; Flohé *et al.*, 1973). Dès lors, de nombreuses études ont montré des effets bénéfiques du sélénium notamment en tant qu'agent de prévention pour certains cancers.

2. Propriétés physico-chimiques du sélénium

2.1. Propriétés chimiques

Positionné entre le soufre (S) et le tellure (Te) dans le groupe 16 (ou VIa) du tableau périodique, les propriétés chimiques du sélénium sont proches de celles du soufre (tableau 1) et du tellure. Appartenant à la famille des chalcogènes (oxygène, soufre, tellure, polonium), cet élément présente les caractéristiques d'un métal et d'un non-métal : c'est un métalloïde.

Propriétés	Sélénium	Soufre
Symbole	Se	S
Numéro atomique	34	16
Masse atomique	78,96	32,06
Electronégativité de Pauling	2,4	2,5
Densité	4,79 (20°C, gris)	2,07 (20°C)
Température de fusion, °C	217	113
Température d'ébullition, °C	685	445
Rayon atomique, nm (Van der Waals)	0,14	0,127
Rayon ionique (nm)	0,198 nm (-2) 0,042 nm (+6)	0,184 (-2) 0,029 (+6)
Isotopes naturels	6	4
Configuration électronique	[Ar] 3d ¹⁰ 4s ² 4p ⁴	[Ne] 3s ² 3p ⁴
Energie de première ionisation, kJ/mol	940,7	999,3
Potentiel standard, V	-0,77	-0,51

Tableau 1 : propriétés physicochimiques du sélénium et du soufre (adapté de Haygarth, 1994).

Comme tous les éléments du groupe 16, le sélénium possède 6 électrons sur sa couche de valence et existe sous différents états d'oxydation dans les milieux naturels : (+VI) dans les espèces sélénates (HSeO_4^- , SeO_4^{2-}) et dans l'acide sélénique (H_2SeO_4), (+IV) dans les espèces sélénites (HSeO_3^- , SeO_3^{2-}) et dans l'acide sélénieux (H_2SeO_3), (0) dans le sélénium élémentaire et (-II) dans les séléniures (Se^{2-} , HSe^-) et dans le séléniure d'hydrogène (H_2Se). Le sélénium peut former des espèces organiques diséléniées (RSeSeR , où R est un groupement alkyl) (Milne, 1998). L'état d'oxydation (+II) est très instable et n'existe pas naturellement (Elkin, 1982).

La plupart des formes organiques du sélénium, les séléniures organiques (R_2Se , R étant un groupement alkyl), où le sélénium se substitue souvent au soufre, sont à l'état d'oxydation (-II). Ces formes organiques incluent les acides aminés (sélénocystéine, sélénométhionine), les méthylséléniures (par exemple, diméthyle séléniure $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$ et diméthyle diséléniure $(\text{CH}_3)_2\text{Se}_2$), les méthylsélénonones (par exemple, diméthyle sélénone $(\text{CH}_3)_2\text{SeO}_2$), les esters méthylséléniques (par exemple, méthyle ester de sélénobétaïne $(\text{CH}_3)_2\text{Se}^+\text{CH}_2\text{COOCH}_3$) et les ions méthylsélénonium (par exemple, ion triméthylsélénonium $(\text{CH}_3)_3\text{Se}^+$).

Le sélénium réagit avec de nombreux éléments pour donner des composés analogues à ceux formés avec le soufre. Par exemple, le séléniure d'hydrogène (ou hydrogène sélénié, H_2Se) est gazeux et hautement toxique. Il est rapidement oxydé en sélénium élémentaire (Se^0) en présence d'oxygène. L'affinité du sélénium pour l'oxygène est plus faible que celle du

soufre. Les formes inorganiques du sélénium sont toutes anioniques et solubles dans l'eau à pH neutre alors que le sélénium élémentaire est insoluble. Les espèces sélénure (HSe^-) sont très instables. La stabilité des différents états d'oxydo-réduction est fonction du potentiel électrochimique du milieu (figure 1).

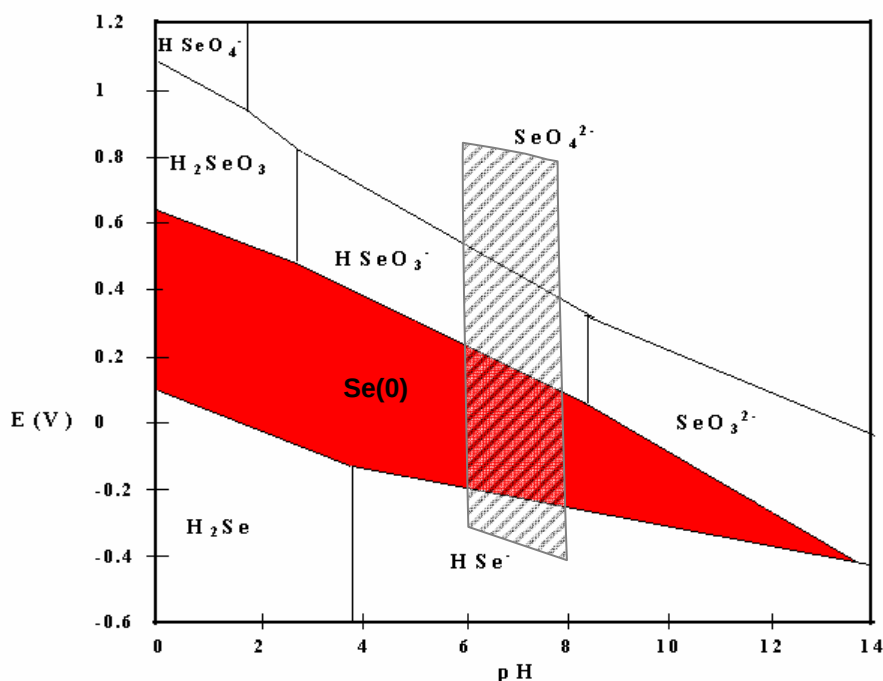


Figure 1 : diagramme de Pourbaix d'une solution $0,1 \mu\text{M}$ de sélénium à 25°C , 1000 hPa (pression atmosphérique) (d'après Séby et al., 1998). La zone hachurée délimite les conditions physiologiques normales du milieu intracellulaire (d'après Milne, 1998).

2.2. Propriétés physiques

Le sélénium présente des caractéristiques structurales proches de celles du soufre (Schmidt *et al.*, 1973 ; Kudryavtsev, 1974). Selon les conditions, le sélénium peut exister sous trois formes allotropiques distinctes : les formes amorphe, vitreuse et cristalline (Cooper et Westbury, 1982). La forme amorphe, rouge, est formée par précipitation et possède des propriétés photoconductrices. Cette forme est le produit de la réduction biologique de composés sélénés inorganiques dans la nature. Le sélénium vitreux et cristallin est produit industriellement pour ses propriétés semi-conductrices. De couleur noire, il est formé par trempe du sélénium liquide amorphe. Le sélénium métal, de couleur grise, est le résultat du refroidissement lent du sélénium vitreux jusqu'à sa solidification sous une forme granulaire, cristalline (Lide, 1997). Trois états cristallins sont décrits : deux formes monocliniques (α - et β -) et une forme trigonale.

Le sélénium comprend 6 isotopes naturels stables dont les abondances isotopiques sont indiquées dans le tableau 2 et 9 isotopes radioactifs non naturels issus de réactions de fission. Parmi ces isotopes, ^{75}Se (émetteur β , temps de demie vie de 119,8 jours), produit par activation neutronique, est utilisé en radiobiologie et en tant que traceur biologique (Elkin, 1982). ^{79}Se (émetteur β , demie vie de 7.10^4 ans) est un produit de fission de l'uranium-235 (Seby *et al.*, 1998 ; Simonoff et Simonoff, 1991). Il est présent dans le combustible nucléaire usé, dans les déchets radioactifs issus du retraitement du combustible et dans les rejets associés au fonctionnement normal des centrales nucléaires et des usines de retraitement du combustible (IRSN, 2002).

Isotope	Abondance (%)
^{74}Se	1
^{76}Se	9
^{77}Se	7,5
^{78}Se	23,6
^{80}Se	50
^{82}Se	8,8

Tableau 2 : les isotopes naturels du sélénium et leur abondance.

3. Utilisation industrielle du sélénium

Les applications industrielles du sélénium sont nombreuses (Fishbein, 1991 ; Haygarth, 1994). Il est utilisé dans la fabrication du verre en tant que colorant rouge sous forme de sélénite d'ammonium, mais également comme agent de décoloration pour neutraliser la coloration des oxydes de fer. Ses propriétés pigmentaires sont également utilisées dans l'industrie des peintures et des plastiques. Dans l'industrie des pneumatiques, il est utilisé pour augmenter la résistance du caoutchouc lors du processus de vulcanisation mais aussi en métallurgie dans la préparation d'alliages et le traitement de surfaces. Le sélénium est employé dans l'industrie des lubrifiants pour ses propriétés anti-oxydantes. Ses propriétés photoélectriques sont largement exploitées en électricité et en électronique (fabrication de cellules photo-électriques, de semi-conducteurs, de tambours de photocopieurs...). En agriculture, le sélénium est utilisé dans la fertilisation et comme additif alimentaire pour le bétail dans les régions pauvres en sélénium (Simonoff et Simonoff, 1991). Dans l'industrie chimique, le sélénium est exploité en tant que catalyseur. Dans le secteur médical, le traitement antifongique de *Tinea versicolor* et le traitement anti-pelliculaire sont à base de sélénium.

4. Importance biologique du sélénium

Le sélénium est une molécule ambivalente car sa présence en faible concentration est indispensable à la vie pour l'homme, les animaux, les végétaux et les micro-organismes. En cas de carence ou d'excès, il entraîne de sérieux troubles biologiques et écologiques. Les concentrations limites en tant qu'élément essentiel et en tant qu'élément toxique sont très proches.

4.1. Le sélénium : élément trace essentiel

Le sélénium est un élément essentiel pour la plupart des organismes, y compris l'homme (Ge et Yang, 1993). Il est nécessaire à de nombreuses enzymes, en particulier la glutathion peroxydase impliquée dans la défense cellulaire contre le stress oxydant (Rotruck *et al.*, 1973 ; Flohé *et al.*, 1973).

Historiquement, son rôle essentiel n'a pas été reconnu immédiatement malgré qu'il a d'abord été montré des effets nutritionnels bénéfiques d'une supplémentation en sélénium chez des rats atteints de nécrose du foie suite à une carence en vitamine E (Schwartz et Foltz, 1957). Ce rôle nutritionnel du sélénium a été rapporté chez les bactéries (Pinsent, 1954). Son rôle biochimique a été établi en 1973 par la découverte de la première sélénoprotéine chez les procaryotes, la sélénoprotéine A (Turner et Stadtman, 1973).

Le rôle fondamental du sélénium est en partie expliqué par son incorporation dans les protéines sous la forme biologique de l'acide aminé sélénocystéine. La sélénocystéine confère aux protéines des activités biochimiques diverses souvent liées à des activités d'oxydo-réduction (Kohrle *et al.*, 2000). La sélénométhionine, acide aminé présent en faible quantité dans les protéines à la place de la méthionine, pourrait également catalyser la réduction du peroxyxynitrite à la place du glutathion, intervenant ainsi dans le stress oxydant (Klotz *et al.*, 2003). Le sélénium est présent également au niveau du site actif de la thiorédoxine réductase sous forme de groupement séléinol (-SeH) où le sélénium joue un rôle fondamental dans la protection contre les radicaux libres (Tapiero *et al.*, 2003).

Largement documenté pour son rôle dans la protection contre les espèces réactives de l'oxygène en tant que cofacteur de sélénoenzymes, le sélénium intervient également dans le métabolisme des hormones thyroïdiennes par l'intermédiaire des désiodases, sélénoenzymes permettant de cliver une liaison carbone-iode dans ces hormones, régulant ainsi leur activité.

Besoins en sélénium

Le sélénium est essentiellement apporté à l'homme et l'animal par la nourriture. Les besoins chez l'adulte sont estimés à 50 - 80 µg par jour (Apports Nutritionnels Conseillés, 2001) avec une dose limite de sécurité fixée par le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique Française à 150 µg par jour (cf. tableau 3). La réglementation du code français de santé publique a fixé le taux limite de sélénium dans l'eau du réseau public de distribution à 10 µg par L (soit 10 ppb ou 0,13 µM). Cette valeur est identique à celle donnée par l'organisation mondiale pour la santé (OMS).

A dose nutritionnelle, le sélénium aurait un effet préventif sur l'apparition de certains cancers (Clark *et al.*, 1991 ; Schrauzer *et al.*, 1977). Il a été montré sur des modèles expérimentaux tumoraux que le sélénium aurait des propriétés anticancéreuses, en limitant la prolifération cellulaire, en améliorant la réponse immunitaire et en protégeant les cellules contre les oxydations aberrantes.

Age	Apport Nutritionnel Conseillé (ANC en µg par jour)
0 – 6 mois	15
7 – 12 mois	20
1 – 3 ans	20
4 – 6 ans	30
7 – 9 ans	30
10 – 13 ans	40
14 – 18 ans	50
Adultes	50 à 80

Tableau 3 : apports conseillés en sélénium pour les différentes classes d'âges (Apports Nutritionnels Conseillés, 2001). Pour les adultes, la dose limite de sécurité française est fixée à 150 µg par jour par le Conseil supérieur d'hygiène publique de France. Cette dose a été fixée à partir de l'étude de Yang *et al.* (1989) en utilisant un facteur de sécurité de 10 (inter espèce), afin de ne pas inciter à une supplémentation trop importante en sélénium. En 2000, sur la base de la même étude, le Scientific Committee on Food a proposé une limite de sécurité plus élevée (300 µg par jour pour les adultes). La valeur toxicologique de référence proposée par l'OMS pour l'adulte est de 240 µg par jour. L'OMS estime que les sels de sélénium solubles dans l'eau sont plus toxiques que le sélénium organique présent dans les aliments.

La teneur en sélénium dans l'alimentation dépend de la disponibilité et de l'abondance de cet élément dans l'environnement d'origine. En général, les céréales, les féculents, les champignons, la charcuterie, les volailles et gibiers, le poisson et les œufs contiennent du sélénium. Le tableau 4 présente les teneurs moyennes en sélénium des principaux produits consommés en France (INRA, 2004). Dans les zones sélénoprivées, un apport supplémentaire comme additif permet de corriger une carence de sélénium (cf. § I.3.2).

Produit	Sélénium (μg / kg de poids frais)
viandes	95
poissons	170
céréales	39
légumes (hors pomme de terre)	17
boissons alcoolisées	11
laits	15
ultra-frais laitier	20
huiles	11
eaux	11
sucres et dérivés	11
condiments et sauces	29

Tableau 4 : teneurs moyennes en sélénium mesurées dans des échantillons représentant les produits les plus consommés en France (INRA, 2004). Les teneurs en sélénium dans l'alimentation française concordent avec celles mesurées dans d'autres pays européens (Pologne, Allemagne, Grande-Bretagne et Belgique). En revanche, elles sont faibles comparées aux valeurs mesurées aux Etats-Unis.

Le sélénium dans l'organisme

L'absorption du sélénium dépend de sa forme chimique. La sélénométhionine est l'acide aminé le plus répandu dans les protéines animales ou végétales. Elle est majoritairement absorbée au niveau du duodénum par un transport actif (75% d'absorption), alors que l'absorption du sélénite est réalisée par un transport non actif (Brown *et al.*, 1972 ; Simonoff et Simonoff, 1991). Le séléniate est plus efficacement absorbé que le sélénite (94% contre 59%) (Thomson et Robinson, 1986), mais son excrétion urinaire est plus grande. Le sélénium élémentaire et les sélénures sont faiblement absorbés au niveau des intestins (5% d'absorption).

Le sélénium absorbé est transporté par des protéines plasmatiques de la circulation pour être distribué dans l'organisme (figure 2). Certains organes, comme le foie (15%), les reins (5%), le cerveau (1%) et le pancréas (0,5%), accumulent spécifiquement le sélénium (Thomson et Stewart, 1974). Dans le métabolisme du sélénium, le foie constitue une réserve d'échange rapide avec le sang alors que les réserves dans le muscle constituent un stockage d'échange lent (Simonoff et Simonoff, 1991).

Le sélénium est principalement excrété par les urines (60%) sous la forme d'ion triméthylsélénonium. En cas d'excès, l'air expiré peut être une voie secondaire de l'excrétion sous forme principale de diméthyle séléniure, responsable de l'odeur alliagée caractéristique (Simonoff et Simonoff, 1991).

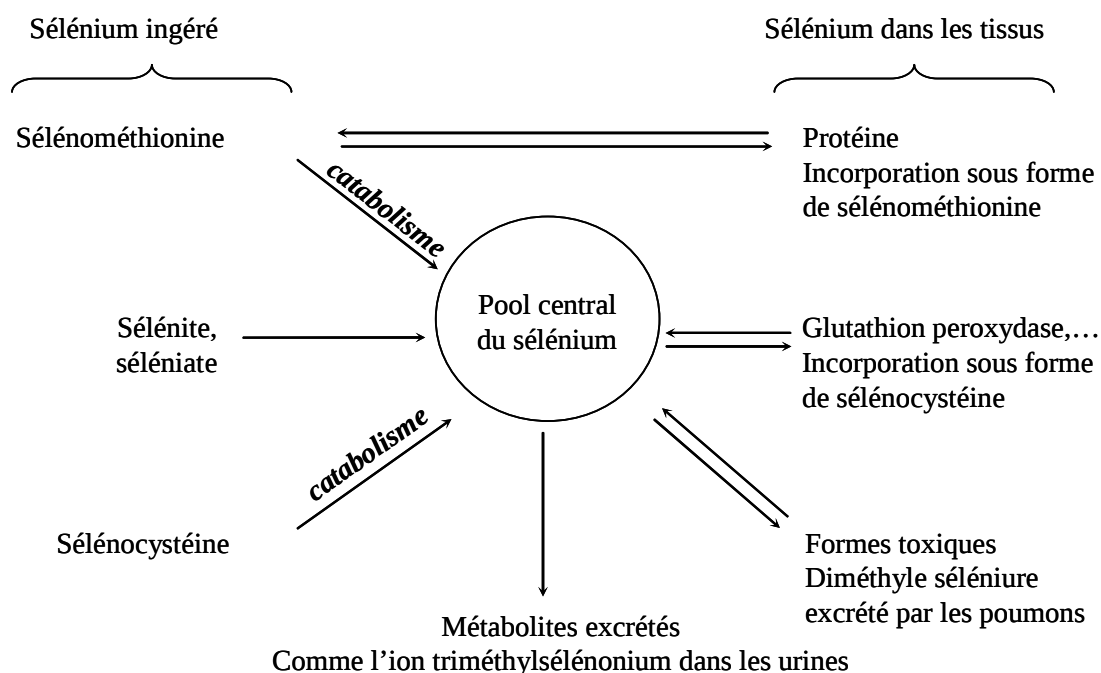


Figure 2 : métabolisme du sélénium dans l'organisme : pool entre le sélénium ingéré et le sélénium présent dans les tissus (adapté de Fishbein, 1991). Les composés de sélénium sont métabolisés par deux voies majeures : la première voie permet la réduction en sélénium élémentaire puis soit incorporation dans ou fixation aux protéines après conversion en sélénocystéine, soit après réaction avec des ions métalliques conduisant à la formation de séléniures métalliques par un processus de réduction en séléniure pour être en définitive incorporé dans les protéines ; la seconde voie permet la réduction en séléniure d'hydrogène, puis méthylation en composés volatiles ou en ion triméthylsélénonium (IRSN, 2002).

4.2. Toxicité du sélénium par excès ou par carence

4.2.1. Excès de sélénium

Causes d'une surcharge en sélénium

Une forte exposition humaine peut provenir de teneurs en sélénium naturellement élevées, par exemple lors de cultures sur sols sélénifères et passage du sélénium dans la chaîne alimentaire, ou d'une forte exposition d'origine anthropique, par exemple chez les travailleurs des raffineries de minerais et des industries de transformation du sélénium.

Les utilisations importantes du sélénium, dans l'industrie, en médecine et dans l'agriculture, conduisent à son rejet dans l'environnement (Barceloux, 1999 ; Lemly, 2004). En France, des teneurs en sélénium supérieures à l'exigence de qualité dans les installations de production d'eau destinée à l'alimentation humaine ont été répertoriées dans de nombreux départements français, notamment dans le département de l'Essonne (Robaux, 2005).

Les formes sélénées les plus toxiques pour les organismes vivants sont le sélénite et le séléniate, du fait de leur grande solubilité et donc disponibilité. Le sélénium élémentaire est toxique pour des organismes aquatiques : il peut être assimilé et fortement accumulé dans les mollusques bivalves (Schlekat *et al.*, 2000).

Symptomatologie

Historiquement, la toxicité du sélénium a été décrite par Marco Polo à la fin du XIII^{ème} siècle, soit bien avant sa découverte. Sa progression vers la Chine occidentale fut rapidement compromise par la perte des sabots de ses chevaux, suivie de la mort des animaux (Latham, 1968). Ceux-ci consommaient une plante à teneur élevée en sélénium, l'*Astragalus*, aujourd'hui reconnue comme hyperaccumulatrice de sélénium lorsqu'elle est cultivée sur des sols sélénifères, comme c'est le cas dans l'Ouest de la Chine. Ce syndrome de toxicité est aujourd'hui connu sous le nom d'"Alkali disease" (Moxon, 1937). L'empoisonnement a été reproduit expérimentalement chez des animaux d'élevage (O'Toole et Raisbeck, 1995 ; Yaeger *et al.*, 1998).

Dans les années 1980, une grande zone de marécages, la réserve de Kesterson (Californie), a été réalisée pour offrir un habitat pour les oiseaux aquatiques mais en ignorant que l'eau de la réserve était fortement contaminée en sélénium. Les oiseaux aquatiques de la réserve ont présenté alors un taux élevé de malformations embryonnaires et de mortalités (Ohlendorf, 1989). Un lien direct entre la teneur élevée en sélénium et le taux de mortalité anormalement élevé de ces oiseaux a été démontré (Ohlendorf et Santolo, 1994 ; Lemly, 1994). Des effets tératogènes ont été rapportés chez des poissons (Lemly, 1994).

Les cas d'intoxications aiguës ou chroniques chez l'homme sont rares. Les symptômes sont une chute des cheveux et des ongles, un état dépressif et de la fatigue. Dans les cas d'intoxications aiguës, une atteinte neurologique accompagnée de convulsions ou de paralysies a été observée (IRSN, 2002). L'effet mutagène du sélénium et de ses composés est variable en fonction des composés. *In vitro*, le sélénite augmente le taux d'aberrations chromosomiques dans les lymphocytes humains (Tucker *et al.*, 1993). *In vivo*, le sélénite et le séléniate administrés par ingestion à forte dose augmentent le nombre d'aberrations chromosomiques

dans les cellules de moelle osseuse de souris (Biswas *et al.*, 1997). L'effet cancérigène du sélénium est controversé ; son effet tératogène chez l'homme semble pouvoir être écarté (IRSN, 2002).

Conséquences : toxicité cellulaire

Au niveau cellulaire, de nombreux composés du sélénium (sélénite, dioxyde de sélénium, sélénocystine, disélénodipropionate, diphenyldiséléniure, 1,4-phénylènebis-(méthylène) sélénocyanate et 6-propylsélénouracil) génèrent des espèces réactives de l'oxygène, notamment du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, en réagissant avec les groupements thiols du glutathion. Ces espèces réactives de l'oxygène sont responsables de leur toxicité (Seko *et al.*, 1989 ; Spallholz, 1997). La toxicité du sélénite pour des cellules procaryotes ou eucaryotes a été largement décrite (Kramer et Ames, 1988 ; Kitahara *et al.*, 1993 ; Shen *et al.*, 1999 ; Bébien *et al.*, 2002 ; Kessi et Hanselmann, 2004). Le sélénite agirait comme catalyseur pro-oxydant. Sa toxicité se manifesterait lorsque les conditions pro-oxydantes excèderaient les défenses anti-oxydantes (Spallholz, 1997).

Outre l'induction de stress oxydant, le sélénium interfère au niveau cellulaire avec le métabolisme du soufre, par substitution non spécifique du sélénium par le soufre. Le sélénium entre dans la voie d'assimilation du soufre et prend sa place dans des biomolécules, en particulier les acides aminés sélénocystéine et sélénométhionine. La proportion de soufre remplacé par le sélénium dépend de la concentration intracellulaire de ces deux éléments mais aussi de l'affinité des enzymes impliquées dans la voie d'assimilation du soufre vis-à-vis des substrats contenant du soufre ou du sélénium. En cas d'excès de sélénium, la fréquence de la substitution du soufre augmente (Sekowska *et al.*, 2000).

Les propriétés chimiques de la sélénocystéine et de la cystéine sont très différentes. A pH physiologique, le groupe séléinol de la sélénocystéine est ionisé alors que le groupe sulfhydryl de la cystéine est protoné ($-SeH$, $pK_a = 5,2$; $-SH$, $pK_a = 8$). En conséquence, la réactivité des protéines à sélénocystéine est plus importante que celle de leurs homologues cystéines. De plus, la taille du groupe séléinol est plus importante que celle du groupe sulfhydryl. L'incorporation de sélénocystéine dans les protéines peut modifier leur structure tertiaire et altérer leur activité catalytique (Jacob *et al.*, 2003).

Les différences chimiques entre la sélénométhionine et la méthionine ne sont pas majeures. L'incorporation de sélénométhionine dans les protéines n'altère pas leur structure tertiaire. Par contre, la sélénométhionine substituée à la place de la méthionine au voisinage du site actif d'enzymes peut influencer leurs activités car le groupement CH_3-Se de la

sélenométhionine est plus hydrophobe que le groupement $\text{CH}_3\text{-S}$ de la méthionine. L'accès du substrat au site actif peut être affecté modifiant les paramètres de cinétiques (Schrauzer, 2000). Par exemple, lorsque la sélenométhionine remplace la méthionine de la thymidylate synthase d'*Escherichia coli*, alors l'activité de l'enzyme est augmentée de 40% par rapport à l'enzyme sans substitution (Boles *et al.*, 1991). L'activité d'une phosphomannose isomérase de *Candida albicans* est augmentée d'un facteur 4 lorsque la sélenométhionine remplace la méthionine à proximité du site actif (Bernard *et al.*, 1995). *A contrario*, le remplacement de plus de la moitié des 150 résidus méthionine de la β -galactosidase d'*E. coli* par de la sélenométhionine inactive l'enzyme (Huber et Criddle, 1967).

4.2.2. Carence en sélénium

Comme nous l'avons vu précédemment, les apports en sélénium se font essentiellement par l'alimentation. Une carence est principalement liée à un régime alimentaire pauvre en sélénium. Le sélénium étant un élément trace essentiel, son déficit conduit à des troubles tels qu'un retard mental, une infertilité masculine, une déficience immunitaire, des maladies cardiovasculaires, des myopathies et/ou cardiomyopathies. Un déficit en sélénium peut augmenter les risques de certains cancers (Ip, 1998 ; Irons *et al.*, 2006) et accélérer les processus de vieillissement (Simonoff et Simonoff, 1991). La plupart des maladies infectieuses sont associées à des stress oxydants, engendrés par la réponse immunitaire innée. En cas de déficience en sélénium ou de dysfonctionnement important d'une sélénoprotéine impliquée dans l'élimination de radicaux libres, l'une des premières conséquences sera un dysfonctionnement de la réaction inflammatoire, et par cela même, l'aggravation de l'infection (Rayman, 2000).

Une carence sévère en sélénium peut conduire à deux pathologies : les maladies de Keshan et de Kashin-Beck. La maladie de Keshan est une cardiomyopathie congestive fatale. Elle a été découverte dans la région de Keshan, dans l'Est de la Chine, où le sol est particulièrement pauvre en sélénium. Elle a conduit à plus de dix millions de décès dans cette région. Le sol très peu sélénifère entraîne une carence en sélénium chez des sujets porteurs d'un virus de la famille des coxsackie qui modifie le génome viral et rend les virions virulents (Ge et Yang, 1993). La carence seule en sélénium n'est donc pas responsable de la maladie. Depuis, les autorités chinoises ont éradiqué cette maladie par l'apport de compléments alimentaires sélénisés (Cheng et Qian, 1990).

La maladie de Kashin-Beck est une arthrose endémique entraînant une déformation des articulations. Elle touche 80% de la population rurale dans certaines régions du Tibet, où les apports en sélénium par l'alimentation sont 10 à 20 fois plus faibles comparés aux autres régions (soit en dessous de 7 μg de sélénium par jour alors que les apports quotidiens recommandés pour un adulte sont de 50 à 80 μg) (Yang *et al.*, 1989). A ce jour, il n'a pas été démontré qu'une carence seule en sélénium était responsable de la maladie. Une exposition à un facteur toxique d'origine alimentaire, par exemple des mycotoxines présentes dans les céréales, pourrait en être également la cause (Jeandel *et al.*, 1992).

En Nouvelle Zélande, où les sols sont particulièrement pauvres en sélénium, la déficience est contrée par un apport supplémentaire sous la forme de sélénite ou de sélénométhionine. Cependant, la faible marge existant entre l'effet toxique et la dose essentielle rend cette supplémentation controversée. La figure 3 présente les effets bénéfiques et néfastes attendus suite à une supplémentation en sélénium d'animaux d'élevage, en fonction de la concentration en sélénium administrée (d'après Kishchak, 1998).

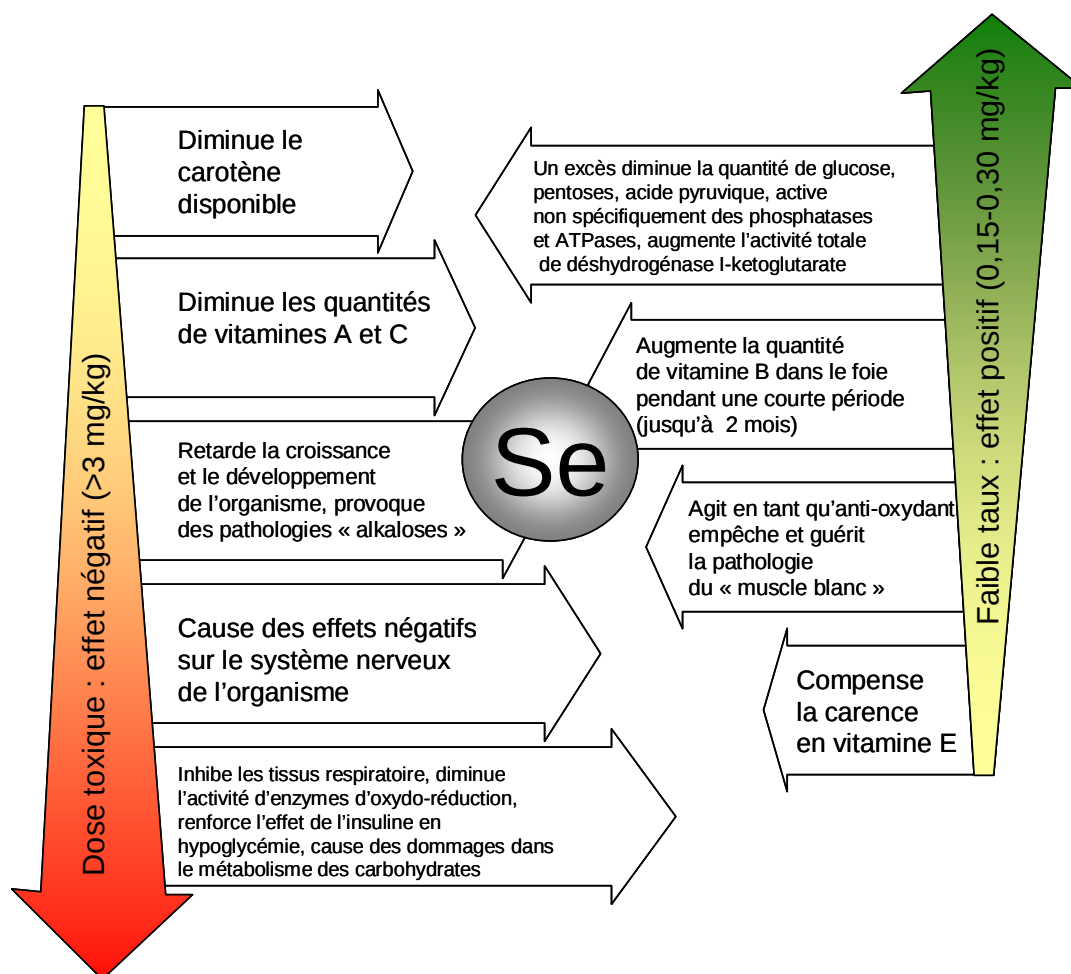


Figure 3 : impacts positifs et négatifs d'une supplémentation en sélénium chez les animaux d'élevage (d'après Kishchak, 1998). Le sélénium est utilisé comme additif dans l'alimentation des animaux car il est indispensable pour préserver la santé de l'animal et favoriser sa productivité. Selon la dose administrée, l'impact du sélénium sur la croissance et le développement est très variable.

II. Le sélénium dans l'environnement

1. Le cycle biogéochimique du sélénium

La disparité des concentrations en sélénium dans l'environnement s'explique par le cycle géochimique de cet élément (Howard, 1977). La figure 4 présente le cycle global du sélénium. La géochimie du sélénium est proche de celle du soufre. Le sélénium incorporé dans les minéraux soufrés est séparé des sulfures par oxydation au cours de leur altération : il est alors transformé en sélénium élémentaire ou en sélénite. La géochimie du sélénium est largement contrôlée par le fer aussi bien en milieu réducteur qu'en milieu oxydant. Par exemple, dans les sédiments alcalins neutres, le séléniate co-précipite avec les oxydes de fer à faible pH (Lindstrom, 1983).

Dans les roches ignées, le sélénium est généralement associé à des sulfures naturels (chalcopryrite (CuFeS_2), pyrite (FeS_2)...) (Berrow et Ure, 1989 ; Kudryavtsev, 1974 ; Elkin, 1982). Plus rarement, on le retrouve sous la forme de minéraux de séléniure (klockmannite (CuSe), clausthalite (PbSe), naumannite (Ag_2Se), tiemannite (HgSe)). Il peut également être associé à des minéraux mixtes (par exemple cucairite (AgCuSe) et crookesite (CuTlSe_4)).

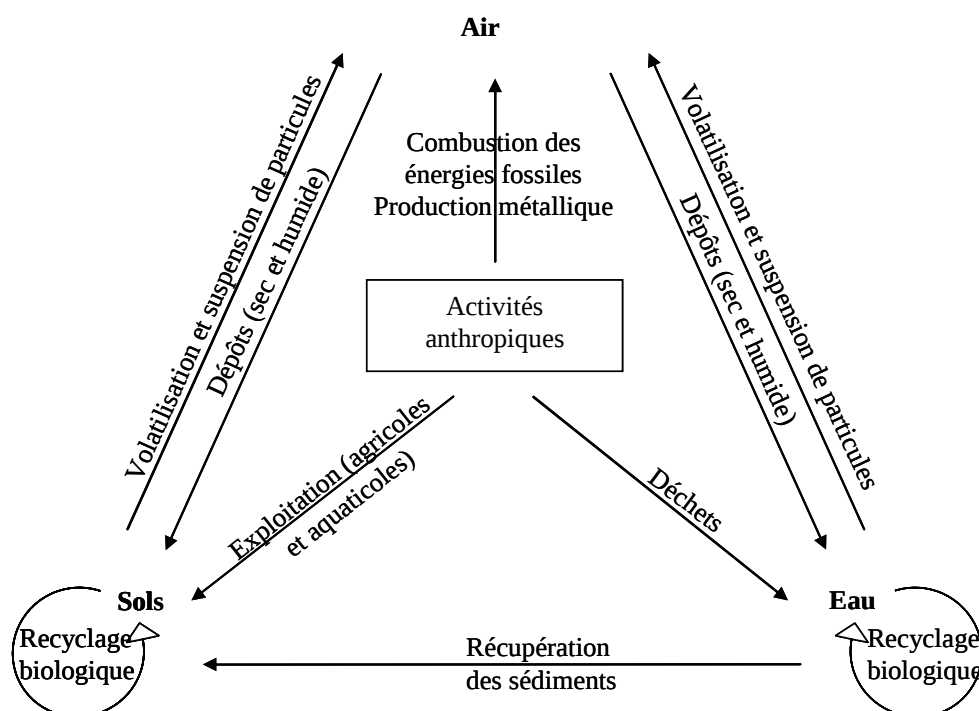


Figure 4 : cycle global du sélénium montrant les flux entre les principaux compartiments (adapté d'Haygarth, 1994). La combustion des énergies fossiles et la production de métaux constituent les principaux flux anthropiques. Le compartiment marin génère naturellement du sélénium par volatilisation et par la voie majoritaire du recyclage biologique du sélénium (bactéries, animaux et plantes). A l'échelle globale, les flux dans l'atmosphère sont faibles mais le turnover et le transport du sélénium sont très rapides dans ce compartiment. Les flux générés par le système terrestre sont importants du fait de la contribution des activités humaines (activités agricoles : cultures et élevages).

2. Distribution du sélénium dans l'environnement

Le sélénium est naturellement présent dans l'environnement. Les concentrations moyennes dans la croûte terrestre sont de 0,09 mg par kg, concentrations approximativement équivalentes à celles du cadmium et de l'antimoine mais inférieures à celles du molybdène, de l'argent, du mercure et de l'uranium. Malgré sa faible concentration dans la croûte terrestre, le sélénium est largement présent dans les différents compartiments de l'environnement. A titre de comparaison, la concentration moyenne en soufre dans ce même compartiment est de 520 mg par kg (Simonoff et Simonoff, 1991). Les roches sédimentaires, couvrant les trois quarts de la surface cultivée, sont riches en sélénium avec des concentrations variant de 0,08 à 1 mg par kg.

Les activités anthropiques générant du sélénium conduisent à sa redistribution dans les compartiments environnementaux. Plus de 1600 tonnes de sélénium sont produites annuellement dans le monde à partir des résidus de l'affinage électrolytique du cuivre (Haygarth, 1994). Le Canada, les Etats-Unis et le Japon sont les principaux producteurs mondiaux de sélénium. Le sélénium est également pour une grande part introduit dans l'atmosphère par la combustion des énergies fossiles et par l'industrie métallurgique (Fishbein, 1991). Les principaux composés de sélénium présents dans l'environnement sont récapitulés dans le tableau 5.

Nom (état d'oxydation)	Formule	Origine
Sélénures (-II)	Se^{2-}	Présents dans les milieux réducteurs comme les sols. Les sélénures forment des complexes métalliques ; très peu mobiles
Diméthyle sélénure (DMSe)	$(\text{CH}_3)_2\text{Se}$	Gaz formé par volatilisation à partir de bactéries et de champignons dans les sols
Diméthyle disélénure (DMDSe)	$(\text{CH}_3)_2\text{Se}_2$	Gaz formé par volatilisation à partir des plantes
Diméthyle sélénone/ méthyle méthylsélénite	$(\text{CH}_3)_2\text{SeO}_2$	Métabolite volatile, formation possible comme intermédiaire terminal avant la réduction en DMSe
sélénure d'hydrogène	H_2Se	Gaz, instable en présence d'humidité ; se décompose en Se^0 dans l'eau
Sélénium élémentaire (0)	Se^0	Stable en environnements réducteurs ; forme cristalline rouge monoclinique α et β ; forme rouge brillante ou noire amorphe, toutes insolubles dans l'eau ; l'oxydation/réduction sont lentes
Sélénite (+IV)	SeO_3^{2-}	Forme soluble, principalement présent en conditions légèrement oxydantes comme dans les sols ou dans les particules de l'air
	HSeO_3^-	Majoritaire dans les sols
Triméthylsélénonium	$(\text{CH}_3)_3\text{Se}^+$	Métabolite excrété dans les urines par les mammifères, rapidement indisponible pour les plantes par fixation et volatilisation
Acide sélénieux	H_2SeO_3	Protoné en conditions acide/neutre. Se(IV) est facilement réduit en Se^0 par de l'acide ascorbique (vitamine C) ou par du dioxyde de soufre en environnement acide chez les micro-organismes. Rapidement disponible par les oxydes de fer, les hydroxydes amorphes de fer et par les sesquioxydes ¹ d'aluminium dans les sols
Dioxyde de sélénium	SeO_2	Gaz formé par la combustion de carburants fossiles : sa dissolution dans l'eau forme de l'acide sélénieux
Séléniate (+VI)	SeO_4^{2-}	Stable dans les environnements bien aérés et très mobile dans les sols, facilement disponible pour les plantes. Lentement convertie en formes plus réduites : absorption moins importante que le sélénite
Acide sélénique	H_2SeO_4	
	HSeO_4^-	

Tableau 5 : principaux composés de sélénium présents dans l'environnement (d'après Haygarth, 1994). ¹Les sesquioxydes correspondent à l'ensemble des oxydes et hydroxydes d'aluminium généralement colloïdaux présents dans un sol.

Sélénium dans le sol

Les sols ont des concentrations en sélénium comprises entre 0,01 et 2 mg par kg (Mayland, 1994). Les sols pauvres en sélénium sont désignés sols sélénoprivés ($< 0,1$ mg par kg). On en trouve par exemple en Nouvelle Zélande, en Chine et en Finlande. De façon ponctuelle, des sols peuvent avoir des concentrations supérieures à 100 mg par kg (par exemple en Irlande et aux Etats-Unis). Ces sols riches en sélénium sont nommés sols sélénifères. Les formes séléniées les plus fréquemment trouvées dans les sols sont le sélénite et le séléniate. La spéciation des espèces séléniées dépend du pH, de la concentration, des conditions d'oxydo-réduction et de la présence de ligands dans le sol. Leur forme physico-chimique détermine leur disponibilité pour les organismes vivants (Losi et Frankenberger, 1997a ; Haygarth, 1994). Typiquement, dans les sols alcalins et aérés, le sélénium est principalement sous la forme soluble séléniate, disponible et assimilable. Le sélénite, disponible et assimilable, domine dans les sols aérés légèrement oxydants. Dans les sols acides et réducteurs riches en matière organique (sols sédimentaires), le sélénium est majoritairement sous forme de sélénium élémentaire et de séléniures liés aux métaux, formes très peu solubles et non disponibles (Frankenberger et Karlson, 1994 ; Zawislanski et McGrath, 1998). Le sélénium élémentaire peut être formé par les micro-organismes qui réduisent les formes oxydées (Doran et Alexander, 1977). Les formes organiques peuvent provenir des plantes en décomposition et ces espèces peuvent être transformées en alkyl-séléniures par les micro-organismes (Peterson *et al.*, 1981).

Sélénium dans l'eau

Les concentrations en sélénium dans les eaux de surface, marines et continentales, en milieu non contaminé, sont rarement supérieures à $0,1 \mu\text{g}$ par L (Simonoff et Simonoff, 1991). Dans les eaux terrestres et les eaux de pluie qui drainent le sélénium de sols sélénifères, les teneurs peuvent atteindre $400 \mu\text{g}$ par L (Conde et Sanz Alaejos, 1997). Selon les zones géographiques, les sources anthropiques peuvent entraîner une augmentation de ces concentrations.

D'une manière générale, les espèces séléniate et sélénite sont majoritaires dans les eaux oxydantes (par exemple, les eaux de surface) et le sélénium élémentaire est plus abondant dans les zones anoxiques (Stolz et Oremland, 1999).

Sélénium dans l'atmosphère

Le sélénium est introduit dans l'atmosphère par des processus naturels physiques, comme l'activité volcanique, ou biologiques, comme sa volatilisation par méthylation par les

micro-organismes, les plantes et les animaux (Haygarth, 1994 ; Cahill et Eldred, 1998). Les alkyl sélénieux (diméthyle sélénure, diméthyle disélénure et diméthyle sélénone) sont les principaux composés gazeux (Fishbein, 1991 ; Haygarth, 1994) (Tableau 5).

La concentration en sélénium dans l'atmosphère est en moyenne de 3 ng par m³ en milieu urbain et de 1,3 ng par m³ en milieu rural (Fishbein, 1991). Cette concentration peut atteindre 10 ng par m³ dans certaines zones géographiques (OMS, 2003).

III. Mécanismes de transformation du sélénium par les micro-organismes

De nombreuses études montrent l'implication de l'activité microbienne dans le cycle biogéochimique du sélénium (Diels *et al.*, 2002 ; Gadd, 2004). Certains micro-organismes, en modifiant le degré d'oxydation du sélénium, contribuent à augmenter ou à diminuer la mobilité et la biodisponibilité de cet élément dans l'environnement, soit par oxydation d'espèces insolubles du sélénium, soit par réduction d'espèces solubles en espèces insolubles (Fleming et Alexander, 1972 ; Doran et Alexander, 1977).

Les transformations microbiennes du sélénium peuvent être le résultat de processus d'assimilation où le sélénium est incorporé dans la biomasse, de dissimilation où la transformation d'oxydo-réduction conduit à fournir de l'énergie en utilisant le sélénium comme accepteur d'électron, ou de détoxification (immobilisation ou volatilisation des espèces sélénées inorganiques) (Doran, 1982 ; Oremland, 1994 ; Stolz *et al.*, 2006) (cf. figure 5).

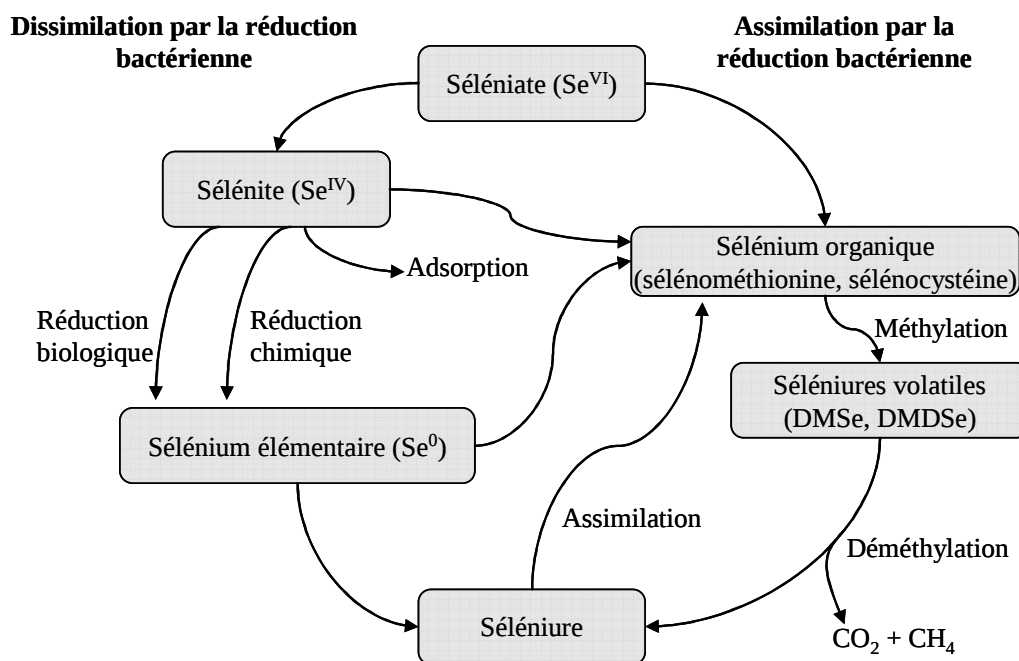


Figure 5 : transformation du sélénium par les micro-organismes (adapté d'Oremland, 1994). DMSe correspond à du diméthyle séléniure et DMDSe à du diméthyle diséléniure.

1. Réduction des formes oxydées du sélénium

De nombreuses espèces bactériennes sont capables de réduire les oxyanions de sélénium (Oremland, 1994). Ce mécanisme de réduction se déroule principalement dans les sols, les sédiments et les eaux. C'est une stratégie développée par certaines bactéries pour résister à une forte exposition au sélénium.

1.1. Réduction du séléniate

Selon les micro-organismes, la réduction du séléniate peut suivre les trois processus : la dissimilation, l'assimilation ou la détoxication.

Réduction du séléniate par dissimilation : respiration du séléniate

Pour la plupart des espèces présentes en environnement anoxique, le procédé de dissimilation est prépondérant (Oremland, 1994).

Les bactéries dissimilatrices de séléniate se cultivent en conditions anaérobies. Ces souches sont donc difficiles à isoler et à cultiver. Jusqu'à maintenant, seules quelques unes ont

été isolées. Parmi elles, nous pouvons citer *Sulfurospirillum barnesii* (Oremland *et al.*, 1994), *Bacillus selenitireducens* et *Bacillus arsenicoselenatis* (Blum *et al.*, 1998) et la bactérie anaérobie stricte *Thauera selenatis* (Macy *et al.*, 1993).

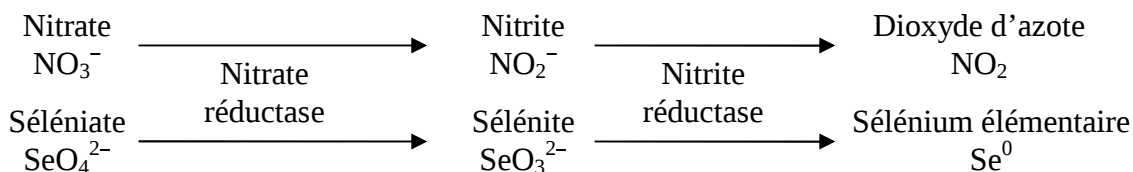
Le séléniate est utilisé comme accepteur terminal d'électrons. Sa réduction est couplée à l'oxydation de composés organiques simples et au processus de dénitrification (cf. figure 6) (Lovley, 1993 ; White *et al.*, 1995 ; Oremland *et al.*, 1999 ; Stolz *et al.*, 2002). Deux voies de dissimilation du séléniate sont décrites. La première immobilise le séléniate et le réduit en sélénium élémentaire et la seconde permet sa méthylation et conduit à sa volatilisation (Stolz et Oremland, 1999). Cette seconde voie est décrite dans le paragraphe III.2.

Les complexes enzymatiques mis en jeu sont des nitrate réductases, bien caractérisées. Il a été montré *in vitro* que les nitrate réductases de souches dénitrifiantes peuvent réduire le séléniate en sélénium élémentaire. C'est le cas par exemple de l'enzyme périplasmique Nap de *Rhodobacter sphaeroides* ou des nitrate réductases membranaires Nar d'*E. coli* (Sabaty *et al.*, 2001). Cependant, l'activité catalytique de ces enzymes pour le séléniate reste faible comparée à celle d'enzymes spécifiques.

Des séléniate réductases spécifiques peuvent également être impliquées dans la réduction du séléniate. Ces enzymes catalysent la réduction du séléniate en sélénite. Les séléniate réductases identifiées à ce jour requièrent toutes un cofacteur molybdène (Watts *et al.*, 2004). Ces enzymes peuvent être distinguées par leur localisation cellulaire : périplasmique chez *Thauera selenatis* (Macy *et al.*, 1993 ; Schröder *et al.*, 1997) ; liée à la membrane chez *Enterobacter cloacae* (Watts *et al.*, 2003 ; Losi et Frankenberger, 1997b) et *Sulfurospirillum barnesii* (Stolz *et al.*, 1997) ; cytoplasmique chez *E. coli* (Bébian *et al.*, 2002).

Des travaux poussés ont été réalisés sur la séléniate réductase de *T. selenatis*. Cette enzyme ne réduit pas le sélénite, le nitrate, le nitrite, le chlorate ou encore le sulfate (Schröder *et al.*, 1997 ; Watts *et al.*, 2004 ; Maher *et al.*, 2004). La séléniate réductase de *S. barnesii* ne semble pas être aussi spécifique que celle de *T. selenatis*, puisque des extraits membranaires de *S. barnesii* montrent une activité également pour le nitrate, le thiosulfate et le fumarate.

A



B

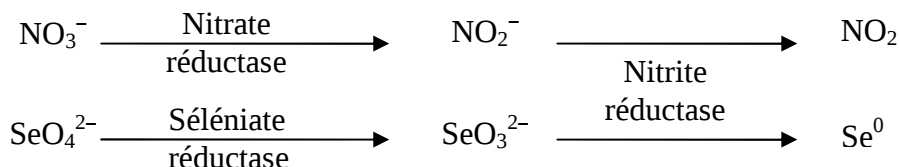


Figure 6 : voies possibles de réduction des oxyanions de sélénium en condition anaérobie. Représentation schématique des enzymes impliquées dans la réduction dissimilatrice du séléniate, du sélénite, du nitrate et du nitrite par des bactéries dénitrifiantes (A). Représentation schématique des enzymes impliquées dans la réduction du séléniate, du sélénite, du nitrate et du nitrite par *Thauera selenatis* (B).

Réduction du séléniate par la voie d'assimilation du sulfate

Chez la plupart des micro-organismes, le séléniate est transporté dans la cellule par les perméases sulfate. Son incorporation dans la voie d'assimilation des sulfates est alors possible. Des enzymes de la voie de réduction du sulfate peuvent ainsi catalyser la réduction du séléniate (Lindblow-Kull *et al.*, 1985). Par exemple, chez *Desulfovibrio desulfuricans*, le séléniate est réduit en séléniure via la voie d'assimilation du sulfate ; des isolats bactériens d'un bassin de la vallée de San Joaquin en Californie sont capables de réduire le séléniate en une espèce similaire à la sélénométhionine (De Souza *et al.*, 2001). Des analogues séléniés peuvent également être produits comme l'adénosine-5'-sélénophosphate (APSeO_4^{2-}) issue de l'activation du séléniate par l'ATP sulfurylase en présence de magnésium (Oremland, 1994).

Réduction du séléniate par le système de détoxification

Chez certaines espèces, par exemple *Pseudomonas stutzeri* (Lortie *et al.*, 1992), *Wolinella succinogenes* (Tomei *et al.*, 1992) et *Bacillus subtilis* (Garbisu *et al.*, 1995), le séléniate est réduit en sélénium élémentaire. Le nitrate et le sulfate n'ont pas d'effet inhibiteur sur la réduction du séléniate suggérant dans ce cas que le sélénium suit une voie différente de celle de l'assimilation du sulfate et de la dénitrification (dissimilation). Un processus de détoxification est supposé.

Chez *E. coli*, la réduction du séléniate en sélénium élémentaire est lente et limitée (Fels et Cheldelin, 1949). Elle se fait en deux étapes où le sélénite est le produit intermédiaire (McCready *et al.*, 1966).

1.2. Réduction du sélénite

La réduction bactérienne du sélénite est davantage décrite que celle du séléniate (Doran, 1982 ; Maiers *et al.*, 1988). En général, elle conduit à la formation de sélénium élémentaire, processus de détoxification conduisant à l'immobilisation du sélénium dans le cytoplasme et/ou le périplasme de la bactérie. Elle peut également venir d'un processus de dissimilation.

Implication de systèmes enzymatiques dans la réduction du sélénite

A ce jour, aucune sélénite réductase n'a été caractérisée. Cependant, de nombreux systèmes enzymatiques sont supposés intervenir dans la réduction du sélénite chez les bactéries.

Parmi eux, le plus fréquemment rapporté dans la littérature est la nitrite réductase (par exemple chez *Rhodobacter sphaeroides* et *R. capsulatus*) (Richardson *et al.*, 1994 ; Schwintner *et al.*, 1998). Chez *Rhodospirillum rubrum*, *R. capsulatus* et *Thauera selenatis*, la voie de réduction du nitrite (dissimilation) semble être étroitement liée à celle du sélénite (Kessi, 2006 ; DeMoll-Decker et Macy, 1993). Elle conduit à la formation de sélénium élémentaire. Quelques espèces ont été décrites comme pouvant respirer le sélénite : *Bacillus selenitireducens* (Blum *et al.*, 1998) et trois souches appartenant à l'ordre des *Aquificales* (HGMK-1, 2, et 3) (Takai *et al.*, 2002).

Une activité sélénite réductase a été montrée pour l'hydrogénase I de *Clostridium pasteurianum* (Yanke *et al.*, 1995). Malgré qu'une sulfite réductase purifiée de *Clostridium pasteurianum* présente une activité sélénite réductase *in vitro* (Harrison *et al.*, 1984), le sulfite ou le sulfate n'affecte pas la réduction du sélénite pour la plupart des bactéries, signifiant que la réduction du sélénite est indépendante du métabolisme du soufre.

Implication du glutathion dans la réduction du sélénite

La forte réactivité du glutathion avec le sélénite fait du glutathion un candidat évident pour sa participation dans la réduction de détoxification du sélénite chez les organismes capables de synthétiser ce métabolite. Le glutathion est présent à des taux de l'ordre du millimolaire chez les cyanobactéries et les α -, β - et γ -protéobactéries (Kessi et Hanselmann, 2004).

In vitro, il a été montré que le sélénite réagit avec le glutathion pour former du sélénodiglutathion (GS₂SeSG). Le sélénodiglutathion est ensuite réduit en sélénium élémentaire par la glutathion réductase (Ganther, 1971). Ces réactions ont été confirmées *in vivo* chez *E. coli* (Rabenstein et Tan, 1988). Chez *R. sphaeroides* et *E. coli*, la synthèse de glutathion réductase est induite en présence de sélénite (Bébian *et al.*, 2001 ; Bébian *et al.*, 2002).

Le sélénodiglutathion est un oxydant très efficace de la thiorédoxine bactérienne réduite (Björnstedt *et al.*, 1992). Chez *E. coli*, il a été rapporté qu'une exposition au sélénite induisait la synthèse de thiorédoxine et de thiorédoxine réductase (Bébian *et al.*, 2002). La thiorédoxine oxydée peut être réduite par la thiorédoxine réductase au dépend du NADPH (Björnstedt *et al.*, 1992).

La réduction abiotique du sélénite avec le glutathion et la réaction biologique avec *E. coli* ont toutes les deux montré la production simultanée d'anions superoxydes (figure 7) (Bébian *et al.*, 2002 ; Kessi et Hanselmann, 2004).

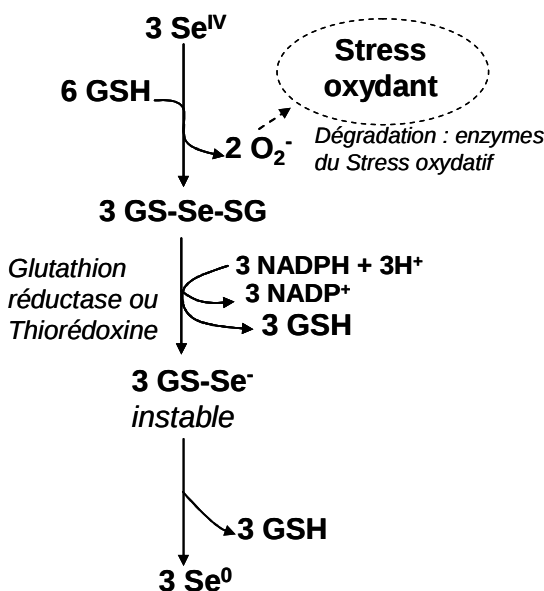


Figure 7 : hypothèse de la réduction biologique du sélénite (d'après Kessi et Hanselmann, 2004). Le glutathion est proposé pour fonctionner comme donneur d'électron dans la réduction. Le 1^{er} produit intermédiaire est le sélénodiglutathion (GS₂SeSG) qui est un substrat pour la glutathion réductase et aussi pour la thiorédoxine bactérienne en accord avec Björnstedt *et al.* (1992). Le glutathion réduit est régénéré continuellement par l'action de la glutathion réductase. La thiorédoxine oxydée est régénérée par la thiorédoxine réductase (n'apparaît pas sur le schéma). Le produit de réaction de ces enzymes est le sélénopersulfide de glutathion (GS-Se⁻) qui est dismuté en glutathion réduit (GSH) et en sélénium élémentaire (Se⁰).

Formation de sélénium élémentaire

La détoxication est un processus de résistance bactérienne conduisant à la formation de particules de sélénium élémentaire de couleur rouge, insolubles en milieu aqueux et moins toxiques que les formes inorganiques solubles. Les particules de sélénium élémentaire

produites par un processus bactérien sont différentes selon l'espèce bactérienne (chaque espèce possède une signature spectrale : orientations structurales et propriétés optiques différentes). Les particules biotiques sont également différentes de celles produites par un procédé chimique comme la réduction du sélénite avec l'acide ascorbique ou l'oxydation du séléniure d'hydrogène avec du dioxygène (figure 8) (Oremland *et al.*, 2004). Une autre étude a montré que les particules abiotiques de sélénium élémentaire produites par réaction du sélénite et du glutathion sont similaires à celles résultantes de l'activité biologique (taille, couleur et structure sphérique). Ce résultat appuie le rôle du glutathion dans la réduction du sélénite dans les cellules vivantes (Kessi et Hanselmann, 2004). Les particules biotiques semblent être des complexes protéines-sélénium qui contiennent environ 20 mg de protéines par mmole de sélénium (Kessi, 1999).

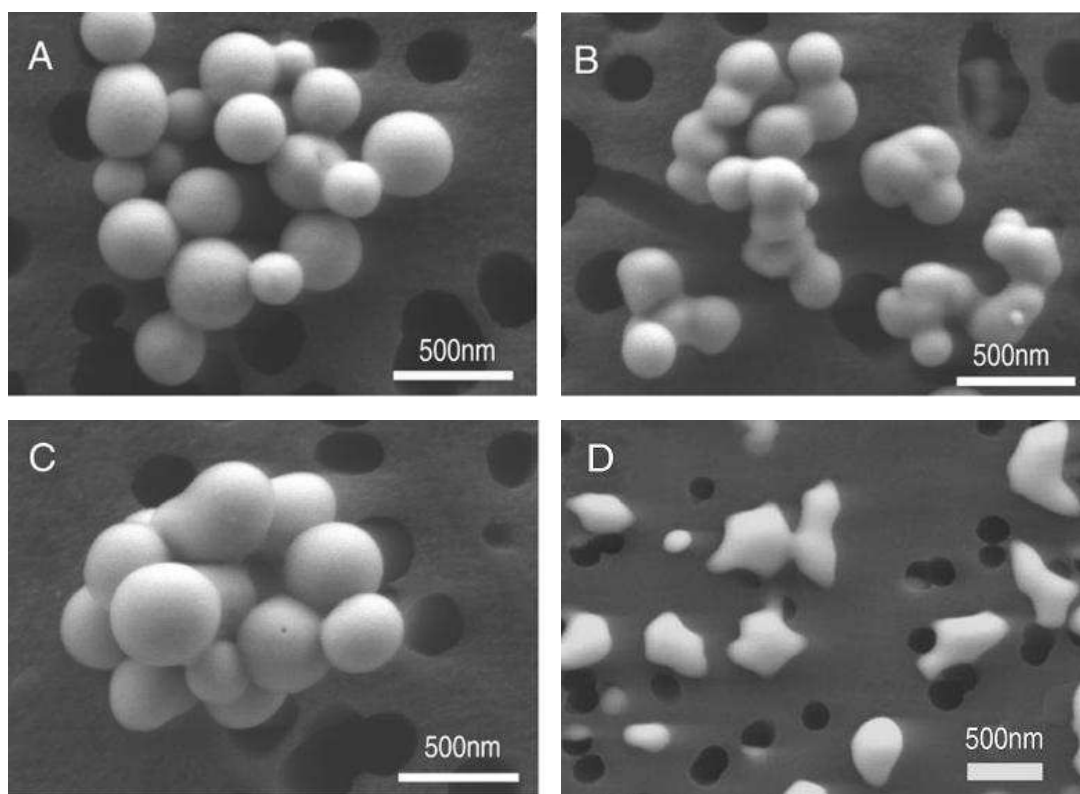


Figure 8 : images de microscopie électronique à balayage de particules de sélénium élémentaire isolées et formées par réduction biologique chez *B. selenitireducens* MLS10 (A), *S. barnesii* SES3 (B), and *S. shriftii* DSSE1 (C) et de sélénium élémentaire formé chimiquement (oxydation de H_2Se) (Oremland *et al.*, 2004).

La détoxification du sélénite a été rapportée chez de nombreuses espèces de bactéries (Tomei *et al.*, 1992 ; Tomei *et al.*, 1995 ; Dungan *et al.*, 2003). Selon les espèces bactériennes, le sélénium élémentaire produit peut être accumulé à l'extérieur de la cellule comme chez *Enterobacter cloacae* SLD1a-1 (Losi et Frankenberger, 1997b) ou à l'intérieur de la cellule au niveau du cytoplasme et/ou de l'espace périplasmique. Par exemple, les dépôts de sélénium

élémentaire sont observés à la fois dans le cytoplasme et dans l'espace périplasmique chez *E. coli* (Gerrard *et al.*, 1974) alors que chez *R. sphaeroides*, les particules de sélénium élémentaire sont localisées essentiellement dans le cytoplasme (Bébian *et al.*, 2001). La différence de localisation des particules laisse supposer les mécanismes de réduction différents.

2. Méthylation et volatilisation du sélénium

La réduction du sélénium en espèces méthylées, comme le diméthyle séléniure et le diméthyle diséléniure, constitue une voie dissimilatrice ou de détoxification. Les espèces organiques volatiles du sélénium sont moins toxiques que les espèces inorganiques. Ce processus se déroule généralement dans les eaux et les sols contaminés, en conditions aérobies (Frankenberger et Karlson, 1994). Il est aisément reconnaissable à l'odeur alliagée qu'il dégage, odeur caractéristique des dérivés méthylés du sélénium (White *et al.*, 1995).

Parmi les micro-organismes responsables de la méthylation du sélénium, nous pouvons citer *R. tenuis* qui réduit le sélénite en diméthyle séléniure ou *Rhodocyclus tenuis* et *Rhodospirillum rubrum* qui réduisent le séléniate en diméthyle séléniure et diméthyle diséléniure en croissance phototrophe (McCarty *et al.*, 1993). La méthylation du sélénium est également plus efficace en condition phototrophe chez *Rb. sphaeroides*, alors que la présence de sulfate l'inhibe (Van Fleet Stalder *et al.*, 1997). La méthylation peut être affectée par la présence de certains métaux lourds (Mo, Hg, Cr et le Pb) alors que d'autres vont la stimuler (Ni, Zn) (Frankenberger et Karlson, 1994). Selon les espèces, des effets compétiteurs sont montrés notamment avec le nitrate, le nitrite et le sulfate (Frankenberger et Karlson, 1994 ; Van Fleet Stalder *et al.*, 1997). Ces résultats suggèrent que certains micro-organismes utilisent un mécanisme similaire à celui de la dénitrification et d'autres utilisent la voie des sulfates.

La figure 9 montre les voies de synthèse et les précurseurs potentiels dans la formation et la dégradation des composés volatiles du soufre et du sélénium. La méthylation consiste en un transfert enzymatique d'un groupement méthyle sur le métalloïde à partir de différents donneurs. La méthylation enzymatique via une méthyltransférase est le procédé le plus répandu chez les procaryotes (Heider et Böck, 1993). Par exemple, deux méthyltransférases différentes ont été identifiées chez des espèces de *Pseudomonas*. La première est une thiopurine méthyltransférase qui réduit le séléniate, le sélénite ou la sélénocystéine en diméthyle séléniure et diméthyle diséléniure (Ranjard *et al.*, 2002 ; Ranjard *et al.*, 2003). La seconde, une homologue d'une calichaémicine méthyltransférase, réduit le sélénite et la sélénocystéine également en diméthyle séléniure et diméthyle diséléniure (Ranjard *et al.*, 2004). L'enzyme,

MmtA, définissant un nouveau groupe de méthyltransférases, compte des homologues chez de nombreuses bactéries (Ranjard *et al.*, 2004).

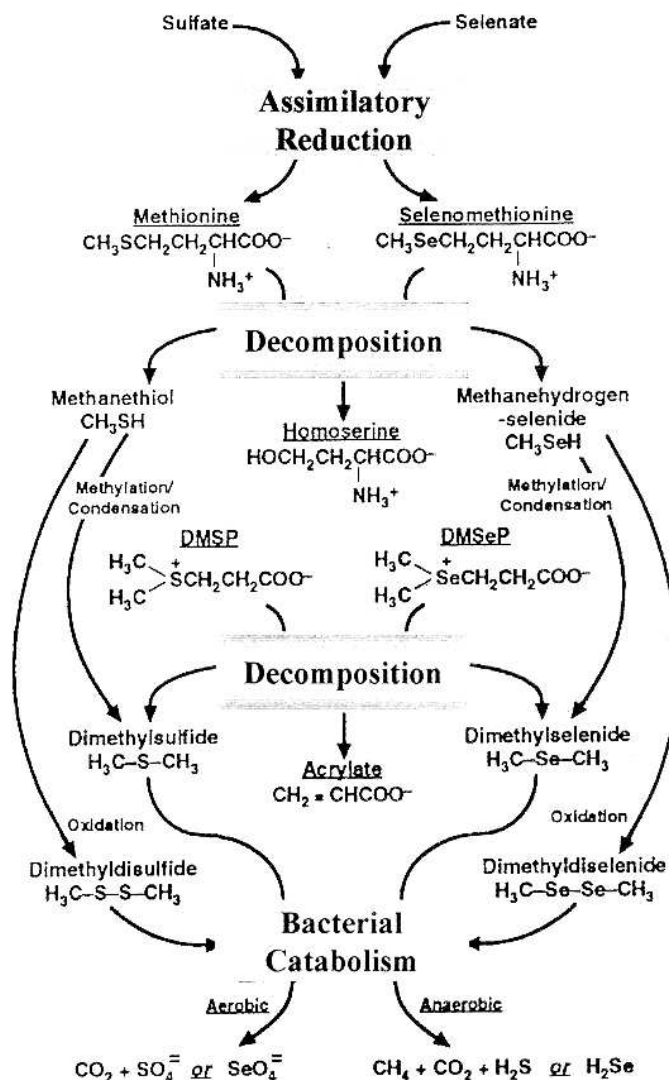


Figure 9 : voies de synthèse et précurseurs potentiels dans la formation et la dégradation des composés volatiles alkyles du soufre et des composés sélénés (Oremland, 1994).

3. Oxydation des formes réduites du sélénium

Les composés sélénés inorganiques peuvent être oxydés par certains micro-organismes pour leur fournir l'énergie nécessaire à leur croissance. Par exemple, le sélénium élémentaire peut être oxydé en sélénite et/ou en séléniate. Ce mécanisme est peu étudié et concerne essentiellement des bactéries hétérotrophes ou autotrophes isolées d'environnements contaminés, comme un bacille tellurique (Lipman et Waksman, 1923), une bactérie pourpre (Sapozhnikov, 1937) ou *Bacillus megaterium* (Sarathchandra et Watkinson, 1981).

Thiobacillus ferrooxidans oxyde le sélénure de cuivre CuSe en sélénium élémentaire (Torma et Habashi, 1972).

Chez deux autres souches isolées de sols contaminés (*Leptothrix* sp. souche MNB-1 et *Thiobacillus* sp. souche ASN-1), l'oxydation du sélénium élémentaire en séléniate a été mise en évidence. Cependant, la réaction est lente et ne fournit pas d'énergie à leur croissance (Dowdle et Oremland, 1998).

4. Assimilation du sélénium dans le métabolisme

Le sélénium inorganique est assimilé et incorporé dans de nombreuses molécules organiques après sa réduction en sélénure (Se^{II}). Il peut être conjugué à des glucides ou à des lipides, ou retrouvé sous la forme d'acides aminés sélénés (sélénométhionine et sélénocystéine). Les acides aminés sélénés peuvent être incorporés dans des protéines (Losi et Frankenberger, 1997a). Les acides aminés sélénés et leurs homologues méthionine et cystéine sont présentés sur la figure 10. Ce processus d'assimilation permet l'incorporation du sélénium dans la biomasse cellulaire (Stolz et Oremland, 2002).

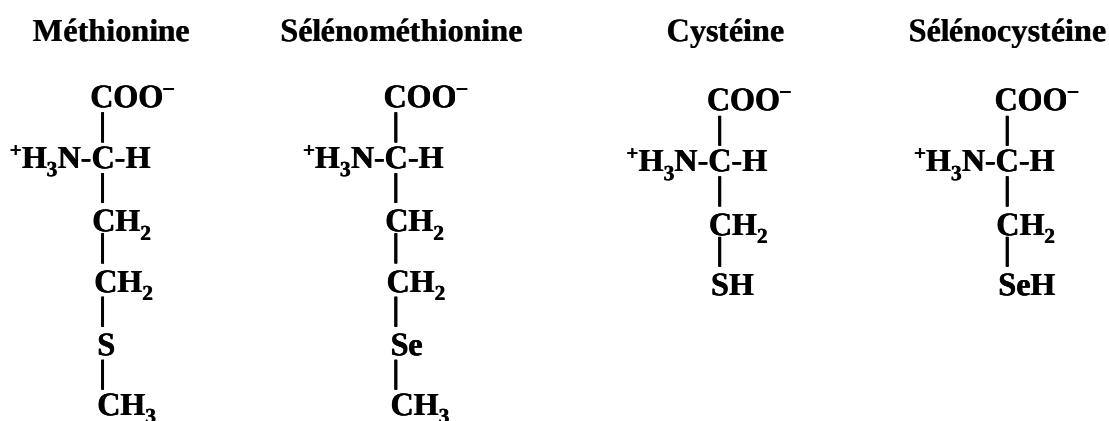


Figure 10 : formules chimiques de la méthionine, de la sélénométhionine, de la cystéine et de la sélénocystéine. La sélénocystéine est un analogue de la cystéine, mais de réactivité bien supérieure. La sélénocystéine est synthétisée à partir de sérine, synthèse plus consommatrice en énergie.

L'assimilation du sélénium dans le métabolisme des organismes conduit à la synthèse de protéines sélénées et de sélénoprotéines. Ainsi sont définies deux voies principales d'assimilation : la voie d'incorporation non spécifique dans les protéines sélénées et la voie spécifique avec les sélénoprotéines (cf. figure 11).

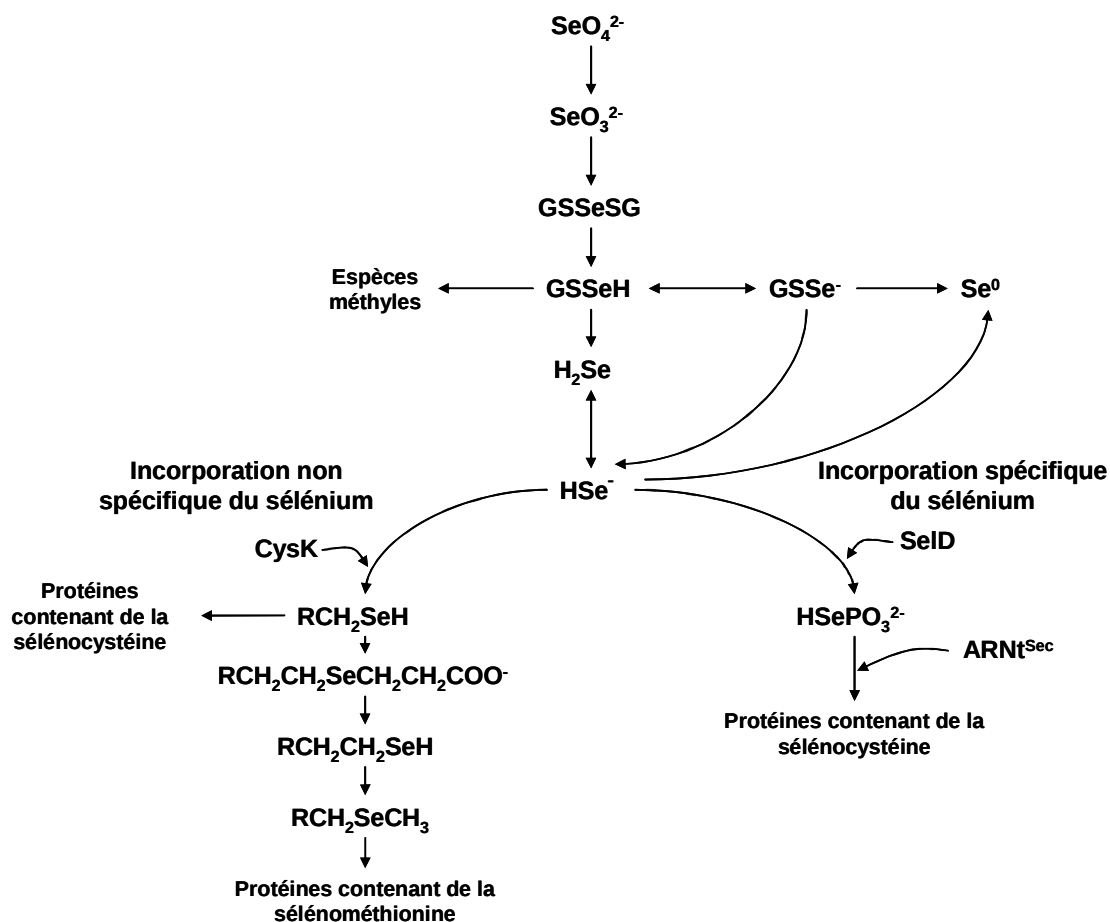


Figure 11 : incorporation spécifique ou non spécifique du sélénium dans le métabolisme du sélénium chez les bactéries (adapté de Turner et al., 1998).

4.1. Les protéines sélénées

Les protéines sélénées sont produites non spécifiquement, principalement par la voie d'assimilation du soufre lorsque le ratio sélénium/soufre augmente (Müller *et al.*, 1997) (cf. figure 11). Au cours du métabolisme des composés soufrés, un atome de sélénium peut remplacer de façon aléatoire un atome de soufre. La proportion de soufre remplacée par le sélénium dépend de la concentration intracellulaire en ces deux éléments, mais aussi de l'affinité des enzymes impliquées dans cette voie d'assimilation du soufre vis-à-vis des substrats contenant du soufre ou du sélénium.

4.1.1. Synthèse des acides aminés sélénés

La synthèse des acides aminés sélénés, sélénométhionine et sélénocystéine est réalisée à partir de l'intermédiaire sélénure (HSe^-). Chez *E. coli*, le sélénure d'hydrogène est

transformé en sélénocystéine libre par la *O*-acétylsérine(thiol)-lyase codée par le gène *cys* (*CysK*). La sélénocystéine libre est à son tour transformée en sélénométhionine libre par la voie de synthèse de la méthionine, grâce à une cystathionine γ -synthase (*MetB*), une β -cystathionase (*MetC*) et une méthionine synthase (*MetE* et *MetH*) (Turner *et al.*, 1998). Il est admis que la sélénométhionine est produite par cette même voie chez d'autres micro-organismes et organismes comme les plantes (White *et al.*, 2004), la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Ponce de Leon, 2002) et les mammifères (Pan *et al.*, 1964).

4.1.2. Incorporation non spécifique des acides aminés sélénisés dans les protéines

La substitution de la méthionine dans les protéines est possible puisque l'ARNt^{Met} ne différencie pas la sélénométhionine de la méthionine (McConnell et Hoffman, 1972). La sélénocystéine libre pourrait être directement incorporée dans les protéines par erreur suite à l'aminacylation de la sélénocystéine sur l'ARN de transfert de la cystéine (Stortchevoi, 2006).

4.2. Les sélénoprotéines chez les procaryotes

Les sélénoprotéines sont synthétisées spécifiquement par l'insertion du 21^{ème} acide aminé, la sélénocystéine, dans la chaîne polypeptidique. Cette insertion est codée par le codon UGA du code génétique. Ce codon est reconnu également comme un codon stop.

4.2.1. Synthèse de la sélénocystéine

La première étape de synthèse de la sélénocystéine consiste à convertir l'acide aminé sérine chargé sur un ARN de transfert spécifique de la sélénocystéine, noté ARNt^{Sec} et produit de l'expression du gène *selC* (étape ① de la figure 12A). Ensuite, le séryl-ARNt^{Sec} est reconnu par la sélénocystéine synthase (*SelA*, produit du gène *selA*). Cette enzyme *SelA* utilise le sélénophosphate (H_3SePO_3) comme donneur de sélénium ② et elle convertit le séryl-ARNt^{Sec} en sélénocystéyl-ARNt^{Sec}. Le sélénophosphate est formé à partir d'ATP et de séléniure (HSe^-) par une sélénophosphate synthétase (*SelD*, produit du gène *selD*)③.

4.2.2 Incorporation spécifique de la sélénocystéine dans les sélénoprotéines

Au niveau de l'ARN_m codant la sélénoprotéine, le codon UGA est reconnu par le ribosome comme un codon codant la sélénocystéine grâce à un système spécifique mettant en

jeu deux partenaires : le facteur d'élongation spécifique de la sélénocystéine (SelB, produit du gène *selB*) et l'élément SECIS (SElenoCysteine-Inserting Sequences). Le facteur d'élongation SelB lie et transporte spécifiquement le sélénocystéyl-ARNt^{Sec} dans le ribosome grâce à la reconnaissance de la séquence SECIS structurée en « tige-boucle » au niveau de l'ARN_m. Cet ensemble forme le complexe d'insertion SelB-GTP-sélénocystéyl-ARNtSec ④ (figure 12B). La séquence SECIS est située immédiatement en aval du codon UGA dans la région codant les gènes de sélénoprotéines (Böck *et al.*, 1991 ; Birringer *et al.*, 2002 ; Allmang et Krol, 2006).

Ce processus est complètement caractérisé chez *E. coli*. Il implique l'expression des gènes *selA*, *selB*, *selC* et *selD*.

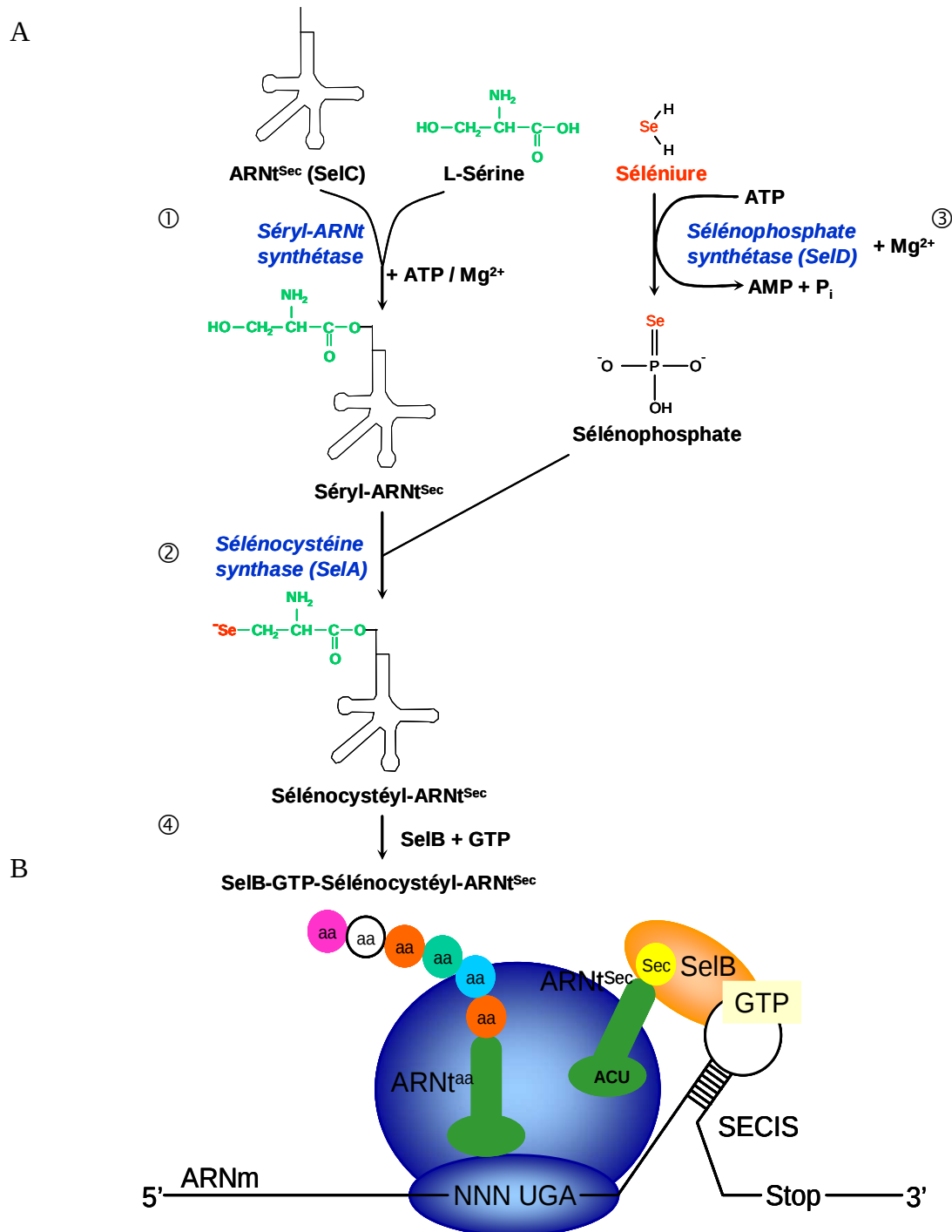


Figure 12 : synthèse de sélénocystéine chez les procaryotes (A) et insertion de la sélénocystéine dans la chaîne protéique (B) (adapté de Namy, 2004 et Birringer et al., 2002). (A) La sélénocystéine est synthétisée à partir de la sérine directement sur un ARN de transfert spécifique de la sélénocystéine, nommé ARNt^{Sec} (Chambers et al., 1986 ; Zinoni et al., 1986). Cet ARN de transfert noté sélénocystéyl- ARNt^{Sec} porte l'anticodon complémentaire du codon stop UGA (Leinfelder et al, 1988). (B) L'insertion dans la chaîne protéique de la sélénocystéine nécessite plusieurs partenaires : l'ARN de transfert spécifique de la sélénocystéine forme un complexe avec le facteur d'élongation SelB et la séquence SECIS, située directement en aval du codon UGA.

4.2.3. Les principales sélénoprotéines

Le groupement sélénol de la sélénocystéine, plus acide que le groupement thiol de la cystéine (pKa respectifs de 5,2 et 8), est entièrement ionisé à pH physiologique. Cette ionisation, à laquelle s'ajoute sa taille plus importante, fait du sélénol un meilleur nucléophile. La réactivité des protéines à sélénocystéine est ainsi plus importante que celle de leurs homologues à cystéine (Gromer *et al.*, 2003 ; Johansson *et al.*, 2005 ; Müller *et al.*, 1994 ; Stadtman, 1991 ; Sekowska, 2000). Du fait de leurs propriétés catalytiques, de nombreuses sélénoprotéines sont des sélénoenzymes ayant des activités d'oxydo-réduction.

Les formiate déshydrogénases

Les formiate déshydrogénases constituent une famille de sélénoprotéines bactériennes connue et bien caractérisée. Ces enzymes catalysent la transformation de l'acide formique en dihydrogène et dioxyde de carbone. La première formiate déshydrogénase a été identifiée chez *E. coli* (Zinoni *et al.*, 1986 ; Sawers *et al.*, 1991) puis chez *Neurospora crassa* (Chow et RajBhandary, 1993). *E. coli* possède trois isoformes de formiate déshydrogénase : les formiates déshydrogénases H, N et O (FDH_H, FDH_N, FDH_O). La première enzyme est la plus caractérisée et elle appartient au complexe formiate-hydrogène lyase (Cox *et al.*, 1981). Des études cristallographiques et spectroscopiques de cette protéine ont montré que l'atome de sélénium du résidu sélénocystéine est directement coordonné à un atome de molybdène, localisé dans le site actif, et impliqué dans l'activité catalytique de l'enzyme (Boyington *et al.*, 1997). La seconde est une enzyme du complexe nitrite réductase qui couple l'oxydation du formiate à la réduction du nitrate (Enoch et Lester, 1974). Enfin, la dernière est le principal constituant de la formiate oxydase, oxydant le formiate en dioxyde de carbone par la réduction du dioxygène avec NAD⁺ comme accepteur. Inversement, elle peut catalyser la réduction du dioxyde de carbone en formiate en présence de NADPH ou de ferrédoxine (Sawers *et al.*, 1991). Ce système enzymatique est un monomère dont le gène a été localisé dans le même opéron que celui de la sélénophosphate synthétase, SelD.

Les hydrogénases

La première des hydrogénases a été identifiée chez *M. vanielii*. Il s'agit d'un hétérooctamère de trois sous-unités, dont l'une contient un résidu sélénocystéine. L'atome de sélénium y est coordonné à un atome de nickel au niveau du site actif. Les hydrogénases

catalysent la réaction de clivage du dihydrogène en 2 protons et 2 électrons. Cette réaction est en partie possible grâce au potentiel catalytique élevé du sélénium (Garcin *et al.*, 1999).

Les réductases

La première de ces enzymes, la glycine réductase contenant un résidu sélénocystéine, a été découverte chez *Clostridium sticklandii* (Cone *et al.*, 1976). Depuis, chez *Eubacterium acidaminophilum*, les trois complexes glycine réductase, sarcosine réductase et bétaine réductase ont été caractérisés. Ils sont composés d'une sélénoprotéine A identique et d'une sélénoprotéine B spécifique pour chaque substrat (Andreesen et Ljungdahl, 1973; Wagner *et al.*, 1999). Ces complexes enzymatiques jouent un rôle important dans le métabolisme énergétique (Andreesen *et al.*, 1999 ; Sliwowski et Stadtman, 1988). La proline réductase du même organisme est également une sélénoprotéine, assez similaire à la protéine B du complexe glycine réductase.

Les autres sélénoprotéines

Chez *E. acidaminophilum*, une enzyme de la famille des peroxyrédoxines, contenant un résidu sélénocystéine et impliquée dans la réduction des hydroperoxydes, a été identifiée (Andreesen *et al.*, 1999). La sélénophosphate synthétase est directement impliquée dans la synthèse de sélénocystéine (Guimaraes *et al.*, 1996 ; Stadtman, 1996 ; Peters *et al.*, 2004).

Ces dernières années, grâce à l'approche protéomique bioinformatique, de nouvelles sélénoprotéines ont été identifiées (Kryukov et Gladyshev, 2004 ; Zhang et Gladyshev, 2005). Ainsi, onze sélénoprotéines connues ont pu être retrouvées, 5 nouvelles sélénoprotéines ont été identifiées dans plusieurs génomes et 8 sélénoprotéines sont considérées potentielles car leur identification ne concerne qu'un seul génome (tableau 6).

Sélénoprotéines	Génomes	Fonctions
Formiate déshydrogénases, chaîne α (FDH _N)	37	Métabolisme énergétique
Méthylviologène- hydrogénase réductrice, sous unité α	3	Fonctions d'oxydo-réduction
Coenzyme F420- hydrogénase réductrice, sous unité δ	2	Fonctions d'oxydo-réduction
Hétérodisulfide réductase, sous unité A	1	Fonctions d'oxydo-réduction
Sélénophosphate synthétase	17	Synthèse sélénoprotéine
Peroxirédoxine (Prx)	2	Fonctions d'oxydo-réduction ?
Glycine réductase A	9	Métabolisme énergétique
Glycine réductase B	8	Métabolisme énergétique
Proline réductase	3	Métabolisme énergétique
<u>Protéine du métabolisme Fer-Soufre de type HesB</u>	5	Fonctions d'oxydo-réduction
<u>Thiorédoxine (Trx)</u>	4	Fonctions d'oxydo-réduction
<u>Thiol-disulphure oxydoréductase de type Prx</u>	3	Fonctions d'oxydo-réduction
<u>Protéine de type SelW</u>	3	Anti-oxydant ?
<u>Glutathion peroxydase</u>	1	Fonctions d'oxydo-réduction
<i>Glutarédoxine (Grx)</i>	1	Fonctions d'oxydo-réduction
<i>Protéine similaire à la Peroxirédoxine</i>	1	Fonctions d'oxydo-réduction
<i>Protéine de conversion thiol-disulfure (Dsb)</i>	1	Fonctions d'oxydo-réduction
<i>Oxydoréductase Fer-Soufre</i>	1	Fonctions d'oxydo-réduction
<i>Protéine de type Dsr (disulfide reduction)</i>	1	Fonctions d'oxydo-réduction
<i>NADH oxydase</i>	1	Métabolisme énergétique
<i>Peroxydase/peroxynitrite réductase</i>	1	Fonctions d'oxydo-réduction

Tableau 6 : sélénoprotéome bactérien (adapté de Kryukov et Gladyshev, 2004). Le nom des différentes sélénoprotéines est indiqué, ainsi que le nombre de génomes bactériens contenant la sélénoprotéine. Les protéines soulignées sont nouvelles dans le génome bactérien. Les protéines en italique correspondent à des sélénoprotéines potentielles, lesquelles n'ont été retrouvées que dans un seul génome et avec des séquences SECIS putatives.

4.3. Les principales sélénoprotéines chez les eucaryotes

Il existe d'autres sélénoprotéines spécifiques aux eucaryotes. La première qui a été identifiée est la glutathion peroxydase (GPx) (Flohé *et al.*, 1973; Rotruck *et al.*, 1973). Depuis, cinq isoformes de glutathion peroxydases ont été caractérisées (GPx1, 2, 3, 4 et 6) (Hall *et al.*, 1998 ; Kryukov *et al.*, 2003 ; Vernet *et al.*, 1996). Ces isoformes diffèrent par leur distribution dans les tissus (Birringer *et al.*, 2002). Leur principale fonction est de protéger les cellules des dommages oxydants.

D'autres sélénoenzymes sont les thiorédoxine réductases (TRx1, TRx2 et TRx3 ou TGR pour Thiorédoxine Glutathion Réductase), des iodothyronine désiodinases (Dio1, Dio2 et Dio3), les sélénoprotéines I, H, K, M, N, O, W, X, Y, Z et la sélénophosphate synthétase. Les principales sélénoprotéines chez les mammifères sont présentées dans le tableau 7. La plupart de leurs fonctions sont encore inconnues mais le lien entre les déficits en sélénium et un nombre croissant de pathologies a permis de comprendre les fonctions de certaines d'entre elles. En général, ces protéines possèdent des propriétés anti-oxydantes impliquées dans différents mécanismes de protection de l'organisme contre les agressions oxydantes.

Un exemple de fonction de sélénoprotéine chez les eucaryotes est celui de la sélénoprotéine P, SelP (Richardson, 2005) : le sélénium ingéré est délivré au foie et utilisé pour la biosynthèse de la sélénoprotéine P. Ce mode de stockage circulant sous forme de sélénocystéine est relativement inerte d'un point de vue toxicologique. SelP est ensuite sécrétée dans le plasma et délivrée dans les différents tissus où la présence de sélénium est requise. Dans les cellules, SelP est dégradée et libère le sélénium, lequel est recyclé pour permettre la synthèse de nouvelles sélénoprotéines.

Sélénoprotéines	Distribution dans les tissus	Fonctions
Famille des glutathion peroxydases (GPx1, GPx2, GPx3, GPx4, GPx6 ; snGPx4)	Ubiquiste (GPx1, GPx4), gastro-intestinal (GPx2), reins et plasma (GPx3), épithélium olfactif, glande de Bowmans (GPx6), testicules, spermatozoïdes (snGPx4)	Processus anti-oxydant, modulation de lipoxygénases, transduction du signal rédox, régulation du cycle cellulaire (apoptose et prolifération cellulaire)
Famille des thiorédoxine réductases (TRx1, TRx2 ; TRx3 ou TGR)	Ubiquiste (TRx1, TRx2), spermatozoïdes (TRx3 ou TGR)	Rôles multiples dans la régulation rédox, métabolisme des drogues, transduction du signal, spermatogénèse (TRx3 ou TGR)
Famille des iodothyronine désiodases (Dio1, Dio2, Dio3)	Expression et régulation dans des tissus spécifique : principalement glande thyroïde, foie, reins, glande pituitaire	Catalyse conversion de la prohormone thyroïdienne T4 en hormone thyroïdienne active T3 et dégradation de rT3 (Dio1 et Dio2) ; dégradation de T4 et T3 (Dio1 et Dio3)
Sélénophosphatase synthétase 2 (SPS2)	Tissus variés	Catalyse la production de sélénophosphate
Sélénoprotéines 15 et 18 kDa (Sel15, Sel18)	Tissus variés incluant cerveau	Inconnues
Sélénoprotéine M (SelM)	Tissus variés dont majoritairement dans le cerveau	Inconnue
Sélénoprotéine N (SelN)	Muscle squelettique, foie, cerveau, cœur et estomac	Régénération et prolifération cellulaire ? Pathologie : mutation conduit à dystrophie musculaire
Sélénoprotéine P (SelP)	Foie (50% des réserves plasmatiques), ubiquiste	Rôle stockage et transport du sélénium ? Anti-oxydant ?
Sélénoprotéine R (SelR, MsrB)	Tissus variés incluant le cerveau	R-méthionine sulfoxyde réductase
Sélénoprotéine T (SelT)	Tissus variés	Inconnue
Sélénoprotéine W (SelW)	Principalement muscle squelettique, muscle cardiaque, cerveau, testicule et rate	Anti-oxydant ?
Sélénoprotéines H, K, O, S, V, X, Y, Z	Tissus variés	Inconnues
Sélénoprotéine I (SelI)	Tissus variés	Inconnue

Tableau 7 : sélénoprotéines de mammifères (adapté de Korhle, 2004 et Birringer et al., 2002). Pour la plupart, elles possèdent des fonctions anti-oxydantes.

IV. Mécanismes de prise en charge du sélénium par les bactéries

1. Transport du séléniat

Compétition avec d'autres anions

Des études de transport compétitif ont montré que le séléniat peut être transporté par les systèmes de transport du sulfate, la sulfate perméase, que ce soit chez les algues (Williams *et al.*, 1994 ; Riedel et Sanders, 1996), les plantes (Richter et Bergmann, 1993 ; Sors *et al.*, 2005), les crustacés (Ogle et Knight, 1996), les champignons (Gharieb *et al.*, 1995), les cellules animales (Yan et Frenkel, 1994) ou les bactéries (Lindblow-Kull *et al.*, 1985). Par exemple, le passage du séléniat par le transporteur du sulfate est démontré chez *E. coli* et chez *Saccharomyces cerevisiae* (Smith *et al.*, 1995). Il s'agit d'un transport non spécifique ; l'affinité du transporteur pour le sulfate est plus grande que pour le séléniat (Lindblow-Kull *et al.*, 1985).

D'autres anions compétiteurs du séléniat sont rapportés dans la littérature, comme le phosphate chez une algue verte (Riedel et Sanders, 1996), le chromate et le tungstate chez des bactéries indigènes anaérobies isolées de sédiments contaminés (Oremland *et al.*, 1989).

Les systèmes de transport du sulfate

Plusieurs stratégies ont été développées par les micro-organismes pour maintenir une concentration intracellulaire en sulfate suffisante en fonction des conditions environnantes. Par exemple, le transporteur du sulfate d'*E. coli* est composé d'un simple système de transport de type perméase, Cys A (Sirko *et al.*, 1995). La levure *S. cerevisiae* possède deux systèmes de sulfate perméase. L'un présente une forte affinité pour le sulfate : il est synthétisé en condition limitée en sulfate ; l'autre présente une faible affinité pour le sulfate : il est actif en permanence (Breton et Surdin-Kerjan, 1977). Chez d'autres bactéries comme *Salmonella typhimurium*, le système de transport du sulfate est capable de répondre à une concentration extracellulaire limitée en sulfate, en augmentant le transport du sulfate par induction d'un plus grand nombre de transporteurs (cf. figure 13) (Kredich, 1996). Ainsi, selon l'organisme considéré, la présence de sulfate dans le milieu de culture peut directement influencer l'accumulation du séléniat, de sorte que le transport du séléniat est non spécifique.

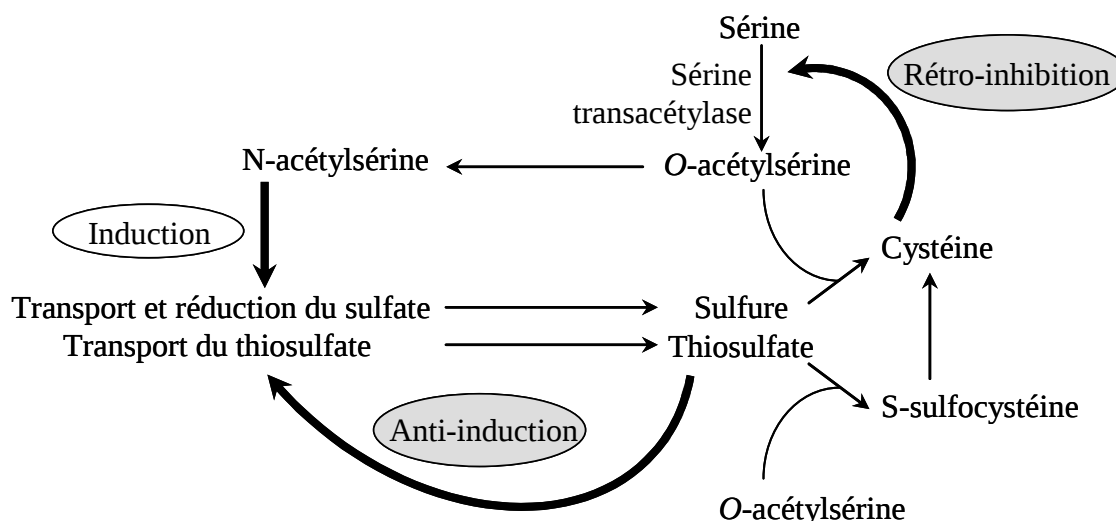


Figure 13 : voies de régulation du transport du sulfate (adapté de Kredich, 1996) et de son assimilation chez *S. typhimurium* (Kredich, 1971). Les voies de régulation sont indiquées par les flèches en traits épais. Divers mécanismes de régulation contrôlent le transport et la réduction du sulfate et du thiosulfate. Le régulon cystéine contient tous les gènes impliqués dans la régulation (notamment le gène codant la sulfate perméase) dans le transport excepté le gène *cysG* nécessaire à la synthèse de la sulfite réductase (Wu et al., 1991). La transcription de ce régulon est activée par le facteur de transcription *CysB* dont l'activité nécessite la présence d'un inducteur : la *N*-acétylsérine (Ostrowski et Kredich, 1989). La sérine transacétyle subit une rétro-inhibition par la cystéine, bloquant la synthèse de l'*O*-acétylsérine. Comme la *N*-acétylsérine dérive de l'*O*-acétylsérine, le régulon cystéine est par conséquent réprimé en présence de cystéine. Cette répression peut être levée en cultivant les bactéries dans un milieu appauvri en composés soufrés (par exemple le sulfate), car ces conditions de culture entraînent un déficit en sulfate, thiosulfate et cystéine dans la cellule.

2. Transport du sélénite

Il a été montré chez *E. coli* que lorsque la bactérie est exposée à de fortes concentrations en sélénite, celui-ci pouvait emprunter le transporteur non spécifique du sulfate : la sulfate perméase est cependant 50 fois moins affine pour le sélénite comparé au sulfate (à titre de comparaison, la sulfate perméase est environ 9 fois moins affine pour le séléniat comparé au sulfate) (Lindblow-Kull et al., 1985).

Un transport sélectif du sélénite, indépendant de celui du sulfate et du séléniat, a été montré chez *E. coli* mais la protéine de ce transporteur n'a pas été identifiée (Brown et Shrift, 1982). Une autre étude chez *E. coli* a permis de démontrer la régulation d'un gène *gutS* par le sélénite et le tellurite. Le produit de ce gène est une protéine homologue aux protéines impliquées dans le transport de petits composés et de sucres (Guzzo et Dubow, 2000). Chez *Rb. sphaeroides*, un transporteur TRAP associé à la protéine périplasmique SmoM participerait au transport du sélénite (Bernier-Pierru, 2006). Une protéine membranaire DedA vraisemblablement impliquée dans le transport du sélénite a été identifiée à partir de mutants résistants au sélénite de *C. metallidurans* CH34 (Ledgham et al., 2005). Ces mutants sont décrits dans le paragraphe présentation du modèle d'étude.

V. Méthodes de dépollution des sols et eaux contaminés en sélénium

Il existe deux stratégies de dépollution des sols et eaux contaminés en sélénium : les traitements physico-chimiques et les traitements biologiques. Les procédés physico-chimiques sont principalement utilisés pour traiter les effluents contaminés. Les procédés biologiques sont étudiés intensivement depuis une quinzaine d'années car ils permettraient de dépolluer à la fois des sols et des eaux contaminés. Ils présentent l'avantage d'être facilement réalisables et peu coûteux mais la durée du traitement peut être importante. Ces procédés de bioremédiation sont étudiés en laboratoire afin de valider la faisabilité sur le terrain : des études pilotes *ex situ* sont menées sur des sédiments et eaux contaminés. Puis ces traitements sont mis en œuvre soit sur le site de la pollution, en excavant le matériel pollué avant de le traiter, ou *in situ* (c'est-à-dire sans excavation) ; soit hors site, en excavant puis évacuant le matériel pollué vers un centre de traitement approprié.

1. Méthodes physicochimiques

Les méthodes physico-chimiques regroupent les procédés de co-précipitation avec des sels de fer, d'adsorption sélective sur du sable recouvert d'oxydes métalliques (oxydes ou oxyhydroxydes de fer et d'aluminium) et la technique de filtration sur résines échangeuses d'anions. L'efficacité de ces techniques dépend du pH de l'effluent contaminé. Par exemple, l'adsorption sélective permet d'éliminer 90% du sélénite lorsque le pH de l'effluent est compris entre 4 à 6 alors que le taux d'adsorption diminue à 20 à 40% lorsque le pH est supérieur à 6 (Kuan *et al.*, 1998). La méthode de décontamination par co-précipitation ne permet pas d'atteindre des concentrations inférieures à la limite de qualité fixée à 10 µg par L dans l'eau de boisson (AFSSA, 2005). La technique de filtration sur résines échangeuses d'anions est une technique non sélective : elle retient les différentes formes anioniques du sélénium mais également les anions majeurs de l'eau comme les sulfates, essentiellement par échange avec les chlorures. D'autres systèmes de filtration ont prouvé leur efficacité. Par exemple, des essais en laboratoire ont montré que l'osmose inverse permettait d'éliminer 97% du séléniate ou du sélénite d'une eau contenant jusqu'à 0,1 mg par L de sélénium (EPA, 2004). Ces techniques, rapides mais coûteuses, permettent d'atteindre des teneurs en sélénium en dessous des limites fixées pour l'eau potable.

2. Méthodes biologiques

Les méthodes biologiques, ou procédés de bioremédiation, consistent à dépolluer des sols et eaux contaminés par l'utilisation d'organismes vivants tels que des champignons, des algues ou des bactéries. Comme l'activité microbienne influence fortement la spéciation et donc la solubilité du sélénium dans l'environnement, des plans de remédiation ou de réhabilitation de sites contaminés peuvent être proposés par les deux mécanismes microbiens de réduction des oxyanions en sélénium élémentaire insoluble et de méthylation en formes volatiles (Thompson-Eagle et Frankenberger, 1992).

Des tests pilotes, réalisés *ex situ* en bioréacteurs en laboratoire sur des sédiments et effluents de terrains contaminés, ont permis de prouver l'efficacité de tels procédés.

Par exemple, le procédé de traitement biologique Algal-Bacterial Selenium Removal (ABSR) consiste à produire des micro-algues qui constituent une source de carbone et d'énergie aux bactéries capables de réduire le séléniate et le sélénite en sélénium élémentaire. Ce système présente également l'avantage de dénitrifier l'effluent. D'abord testé en station pilote en Californie (Lundquist *et al.*, 1994), il est opérationnel et en démonstration pour traiter la rivière San Joaquin depuis 1997 : 80% du sélénium soluble a été réduit et plus de 95% des nitrates ont été éliminés. Ces performances sont obtenues avec l'apport d'une source de carbone organique supplémentaire pour optimiser la croissance bactérienne. Les particules de sélénium sont collectées par un système de filtration (procédé « slow sand filter », SSF) ; les espèces solubles résiduelles (sélénite) peuvent être récupérées par coagulation avec du chlorure de fer (procédé « dissolved air flotation », DAF) (Quinn *et al.*, 2000).

Un autre procédé de décontamination du séléniate *ex situ*, utilisant la souche *Thauera selenatis* en conditions anaérobies, a permis de transformer jusqu'à 96% des oxydes de sélénium en sélénium élémentaire. Le sélénium élémentaire peut ensuite être récupéré par précipitation-coagulation (Cantafio *et al.*, 1996).

Dans les sols, des expériences réalisées *in situ* sur des sédiments contaminés en sélénium dans la vallée San Joaquin en Californie ont montré l'efficacité de la transformation du séléniate en sélénium élémentaire par des microflore indigènes, cependant la récupération des particules est impossible (Oremland *et al.*, 1991 ; Diels *et al.*, 2002). Les stratégies avec les bactéries ayant des capacités de volatilisation du sélénium peuvent constituer une meilleure solution pour dépolluer les sols contaminés. Des essais expérimentaux menés *in situ* dans une zone contaminée de la réserve de Kesterson consistent à mesurer le rendement de volatilisation en fonction de divers paramètres (par exemple, en arrosant certaines zones avec de l'eau seule,

d'autres avec de l'eau additionnée de sources de carbone organique). Les résultats ont montré que les rendements d'émissions gazeuses sélénées augmentent avec la présence d'une source de carbone, l'aération, l'humidité et de hautes températures (Frankenberger et Karlson, 1994). Cependant, l'arrosage doit être limité car les formes solubles peuvent migrer et elles ne seront plus disponibles pour la volatilisation.

PRESENTATION DU MODELE D'ETUDE

Cupriavidus metallidurans CH34 (Vandamme et Coenye, 2004), anciennement connue sous les noms de *Wautersia metallidurans* (Vaneechoutte *et al.*, 2004), *Ralstonia metallidurans* (Goris *et al.*, 2001) et *Alcaligenes eutrophus* (Mergeay *et al.*, 1985), est une β -protéobactérie isolée à la fin des années 1970 de sédiments d'un bassin de décantation d'une usine de zinc près de Liège en Belgique (Mergeay *et al.*, 1978).

Cette bactérie est un bacille non sporulant, Gram négatif, opaque légèrement rosé, aérobie-anaérobie facultatif. Elle se développe en condition anaérobie en présence de nitrate. Elle est également capable de se développer sous condition chimolithotrophe en utilisant le dihydrogène (H_2) comme source d'énergie et le dioxyde de carbone (CO_2) comme source de carbone grâce à deux formes d'hydrogénases : une hydrogénase membranaire, HoxP et une hydrogénase cytoplasmique et soluble NAD-dépendante, HosS (Taghavi *et al.*, 1997). En condition hétérotrophe, plusieurs sources de carbone sont possibles : gluconate, acétate, lactate, succinate ou azélate. En revanche, elle ne se développe pas en présence de glucose, de fructose et de lactose. Sa température optimale de croissance est de 30°C.

Son génome est totalement séquencé et disponible : http://www.jgi.doe.gov/JGI_microbial/html/ralstonia/ralston_homepage.html.

Plasticité génomique

La plasticité génomique de *C. metallidurans* CH34 lui permet de s'adapter à des conditions environnementales extrêmes. Un réarrangement génomique, par un phénomène de mutagenèse appelé TIMM (Temperature-Induced Mutagenesis and Mortality), aiderait la population bactérienne à survivre aux stress extérieurs (Taghavi *et al.*, 1997). La bactérie cultivée à 37°C exprime de nouvelles fonctions responsables de mutations. La génération de mutants résulte de l'activité d'éléments génétiques mobiles, ou séquences d'insertion, qui entraînent des délétions, des excisions ou des inversions au niveau de l'ADN génomique pouvant être létales pour la bactérie. Les mutations peuvent également entraîner chez la bactérie la perte de la capacité à se développer sous certaines conditions (par exemple en conditions chimolithotrophes ou en anaérobie) et la sensibilisation à certains métaux, en particulier ceux impliquant l'opéron *czc* (Mergeay, 2000).

Transport des métaux/métalloïdes

Chez les microorganismes, deux systèmes de transport des métaux sont décrits. Le premier est rapide et non spécifique et de ce fait, divers substrats peuvent l'emprunter. Ce système de transport, constitutif, est généralement dépendant du gradient électrochimique existant entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule.

Le second type de transport a une forte spécificité de substrat mais il est plus lent que le précédent. Ce système utilise souvent l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie et parfois également le gradient électrochimique. Ce système consommateur en énergie est induit par la cellule en réponse à un besoin en éléments traces, par exemple en cas de carence. Certains métaux non essentiels peuvent également entrer dans la cellule par des systèmes de transport spécifiques.

Par exemple, chez *C. metallidurans* CH34 comme chez les autres bactéries résistantes au mercure, le mercure emprunte une voie de transport spécifique, la protéine MerT, pour entrer dans la cellule (Barkay *et al.*, 2003). Malgré l'absence d'étude formelle démontrant le transport du séléniate au travers de la sulfate perméase chez *C. metallidurans* CH34, le séléniate pourrait entrer par cette voie comme montré chez *E. coli* (Lindblow-Kull *et al.*, 1985). Le criblage d'une banque de mutants de *C. metallidurans* CH34 a permis d'identifier une protéine DedA probablement impliquée dans le transport du sélénite (voir la description des mutants ci-dessous) (Ledgham *et al.*, 2005). Les autres métaux (Ni, Zn, Cd, As) entreraient dans la bactérie par un système non spécifique.

Résistance aux métaux/métalloïdes

C. metallidurans CH34 résiste à de nombreux métaux (cadmium, zinc, cobalt, nickel, mercure, plomb...) grâce à des gènes de résistance portés par deux plasmides géants pMOL30 (240 kb) et pMOL28 (180 kb) (Mergeay, 2000) (cf. tableau 8). *C. metallidurans* CH34 dispose de deux stratégies pour résister aux métaux après leur internalisation : un système d'efflux et un mécanisme de transformation des métaux internalisés en une forme peu toxique.

Les systèmes d'efflux sont généralement actifs et classés en deux catégories : les transports actifs primaires utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP ; les transports actifs secondaires tirent leur énergie directement de la force proton motrice. Une des caractéristiques de *C. metallidurans* CH34, souche adaptée à des environnements pollués en métaux, est sa

grande quantité de système d'efflux ATPasique (Monchy *et al.*, 2006). *C. metallidurans* CH34 utilise cette stratégie pour expulser le cuivre et le plomb.

Pour les ions cobalt, nickel, cadmium et zinc, *C. metallidurans* CH34 utilise un système d'efflux plus complexe composé de 3 protéines : une protéine dans la membrane externe, une protéine dans la membrane interne et une protéine intermédiaire au niveau du périplasme. Ce système fonctionne comme un antiport cation/proton : il appartient à la famille RND (Resistance Nodulation and Cell Division). Les protéines impliquées sont CnrCBA ou CzcCBA (Nies, 1999).

L'accumulation de chromate dans *C. metallidurans* CH34 induirait l'expression d'une protéine membranaire ChrA1, responsable de son efflux. Ce système est contrôlé par des protéines régulatrices : ChrB1 (activateur) et ChrF1 (répresseur), dont les gènes sont localisés sur le mégaplasme pMOL28 (Juhnke *et al.*, 2002).

L'autre stratégie qui permet à *C. metallidurans* CH34 de résister à des métaux/métalloïdes est leur transformation en une forme peu toxique. Par exemple, *C. metallidurans* CH34 est capable de résister au mercure. Comme nous l'avons déjà décrit, l'ion mercurique Hg(II) est transporté vers l'intérieur de la bactérie par l'implication d'une protéine spécifique : un transporteur transmembranaire, MerT. Il est ensuite réduit dans la bactérie en mercure élémentaire (Hg(0)) grâce à la mercurique réductase MerA (Misra, 1992) (tableau 8). Le mercure élémentaire, légèrement lipophile, peut ensuite se volatiliser, traverser les membranes biologiques puis se diluer dans l'atmosphère.

C. metallidurans CH34 est également connue pour résister aux oxydes de sélénium (Roux *et al.*, 2001). Cependant les mécanismes moléculaires impliqués dans la réduction du sélénite et du séléniate sont méconnus. Une étude précédente a montré que cette bactérie résiste au sélénite en le réduisant en sélénium élémentaire rouge et l'accumule dans le cytoplasme. Une exposition au sélénite entraîne simultanément la surexpression de protéines impliquées dans le stress général et le stress oxydant, notamment une superoxyde dismutase à fer (Fe-SOD) (Roux et Covès, 2002). Sa résistance au séléniate est plus élevée mais il semble que la bactérie soit incapable de le réduire en sélénium élémentaire : la culture ne présente pas de coloration rouge, signe de la présence de cette espèce (Roux *et al.*, 2001).

Mégaplasmides	Opérons	Métaux	Mécanisme de résistance
pMOL28	<i>cnr</i> <i>chr</i> <i>mer</i> (Tn4378)	Co^{2+} , Ni^{2+} CrO_4^{2-} Hg^{2+}	Efflux par système antiport cation/proton Système d'efflux Réduction de l'ion mercurique
pMOL30	<i>czc</i> <i>cop</i> <i>pbr</i> <i>mer</i> (Tn4380)	Cd^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} Cu^{2+} Pb^{2+} Hg^{2+}	Efflux par système antiport cation/proton Efflux par pompe ATP dépendante Efflux par pompe ATP dépendante Réduction de l'ion mercurique

Tableau 8 : résistance aux métaux lourds de *C. metallidurans* CH34 (adapté de Mergeay, 2000). En milieu minimum, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) du nickel, du cobalt, du zinc et du cadmium sont respectivement de 2,5, 20, 12 et 2,5 mM (Mergeay et al., 1985).

Mutants résistants au sélénite

Des souches mutantes de *C. metallidurans* CH34, résistantes au sélénite et fournies par J. Covès de l'Institut de biologie structurale de Grenoble, ont également été retenues comme modèles de choix pour l'étude de la résistance au sélénium de la souche. Les mutants ont été obtenus par mutagenèse aléatoire par insertion du mini transposon Tn5-*gfp*. Ce processus de mutagenèse a conduit au criblage de 4000 clones. Parmi eux, trois mutants, RM6, RM7 et RM8, sont capables de résister à de fortes concentrations en sélénite (jusqu'à 15 mM à comparer à 4-6 mM pour la souche sauvage). L'identification des gènes perturbés, réalisée par les techniques southern blot et PCR inverse, a révélé que ces trois mutants résistants contiennent une seule insertion du transposon Tn5, lequel est localisé dans un même gène possédant une forte homologie avec ceux de la famille *dedA*. Cette famille représente un groupe de gènes codant des protéines membranaires de fonction totalement inconnue. La caractérisation phénotypique de ces mutants résistants incapables d'exprimer la protéine DedA montre qu'ils n'ont pas perdu leur capacité à réduire le sélénite en sélénium élémentaire car la culture devient rouge. Cependant, ils consomment beaucoup moins de sélénite comparé à la souche sauvage. Ces résultats suggèrent fortement que cette protéine est impliquée dans l'import du sélénite dans la cellule (Ledgham et al., 2005).

OBJECTIF DE CE TRAVAIL

Ce travail de thèse s'inscrit dans le projet « Résistance chez les bactéries » du programme Toxicologie Nucléaire et Environnementale. Dans ce projet, plusieurs souches, reflètes de la diversité bactérienne, sont étudiées : la cyanobactérie de l'eau *Synechocystis*, la bactérie de laboratoire *E. coli* et notre modèle biologique, la bactérie du sol *Cupriavidus metallidurans* CH34. L'objectif de ce travail est de préciser les mécanismes de résistance de *C. metallidurans* CH34 au sélénium en étudiant l'accumulation, la localisation intracellulaire et la transformation des oxyanions sélénite et séléniate au cours de la croissance microbienne. Nous avons choisi de travailler à une concentration élevée en sélénium (plusieurs millimolaires de sélénite et séléniate) pour provoquer une réponse suffisante de la bactérie afin de pouvoir caractériser les mécanismes de résistance en termes d'accumulation et de transformation.

L'aspect novateur de ce projet est la complémentarité des techniques mises en œuvre à l'interface entre la chimie analytique, la physique et la microbiologie. Ces techniques permettent d'une part le dosage du sélénium au cours de la croissance microbienne, directement dans la bactérie et sa localisation ; d'autre part, la spéciation de cet élément dans les culots bactériens et les milieux de culture au cours de la croissance microbienne. Ce projet, qui couple le développement et l'utilisation d'outils physiques et chimiques très pointus, constitue une approche tout à fait originale au plan national car il combine trois méthodes de spéciation qui apportent des éléments de réponse de plus en plus fins :

- les techniques de spectroscopie d'absorption des rayons X au seuil K du sélénium : la spectroscopie XANES (X-ray absorption near edge structure) apporte des informations sur l'état d'oxydation et la forme chimique de l'élément ; la spectroscopie EXAFS (Extended X-ray absorption fine structure) permet de préciser l'environnement structural de cet élément dans la bactérie ;
- la technique de couplage HPLC-ICP-MS (High performance liquid chromatography – Inductively coupled plasma-mass spectrometry) permet, après extraction enzymatique, de séparer et d'identifier les espèces sélénées solubles comme les acides aminés sélénés ;
- la technique SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate – Polyacrylamide gel electrophoresis) couplée à l'analyse PIXE (Particule induced X-ray emission) permet de séparer et de détecter les protéines ayant incorporé du sélénium.

Matériels et méthodes

L'objectif de l'étude, défini à l'issue de l'introduction, est d'apporter des éléments de réponse visant à préciser les mécanismes de résistance de micro-organismes au sélénium. A terme, la compréhension de ces mécanismes de résistance permettra d'envisager des procédés de bioremédiation. Afin de répondre à cela, une méthodologie alliant la complémentarité de techniques à l'interface de la microbiologie, de la chimie analytique et de la physique a été mise en place. Cette seconde partie, divisée en 4 chapitres, présente l'ensemble du dispositif expérimental pour l'étude de la résistance, de l'accumulation, de la prise en charge du sélénium et de sa transformation jusqu'à sa localisation intracellulaire et moléculaire dans la bactérie tellurique *Cupriavidus metallidurans* CH34.

MATERIELS ET METHODES

Le premier chapitre expose les conditions de culture et les expositions au sélénium de la souche bactérienne mises en place pour l'ensemble de l'étude. Il passe en revue les techniques de microbiologie mises en œuvre pour caractériser la résistance de la bactérie au sélénium.

Le second chapitre expose les techniques analytiques de biochimie et de chimie utilisées pour l'étude de l'accumulation du sélénium et de sa prise en charge. L'accumulation et la prise en charge du sélénium sont quantifiées par la technique chimique du dosage de sélénium au moyen de l'ICP-MS. En parallèle, les protéines bactériennes sont dosées pour normaliser l'accumulation du sélénium.

Le troisième chapitre présente les techniques de spéciation appliquées dans cette étude pour identifier les espèces de sélénium produites par la transformation bactérienne. Les techniques physiques spectroscopiques d'absorption X (XANES-EXAFS) sont complétées par les techniques chimiques de séparation et de quantification que sont la chromatographie échangeuse d'anion liquide haute performance (AE-HPLC) couplée à l'ICP-MS. Les protéines bactériennes ayant incorporé du sélénium sont recherchées par la technique biochimique séparative en gel d'électrophorèse en condition dénaturante (SDS-PAGE) couplée à une technique physique de détection, l'émission de fluorescence X par particule induite (PIXE) de la microsonde nucléaire du Laboratoire Pierre Süe (SDS-PAGE-PIXE).

Enfin, le quatrième chapitre décrit la microscopie électronique à transmission (MET) utilisée pour localiser le sélénium dans les bactéries entières et dans les coupes de bactéries. La détection de sélénium dans les bactéries est réalisée par spectroscopie dispersive en énergie couplée à la microscopie électronique à transmission (MET-EDX).

L'ensemble du dispositif expérimental mis en place est récapitulé en figure 14.

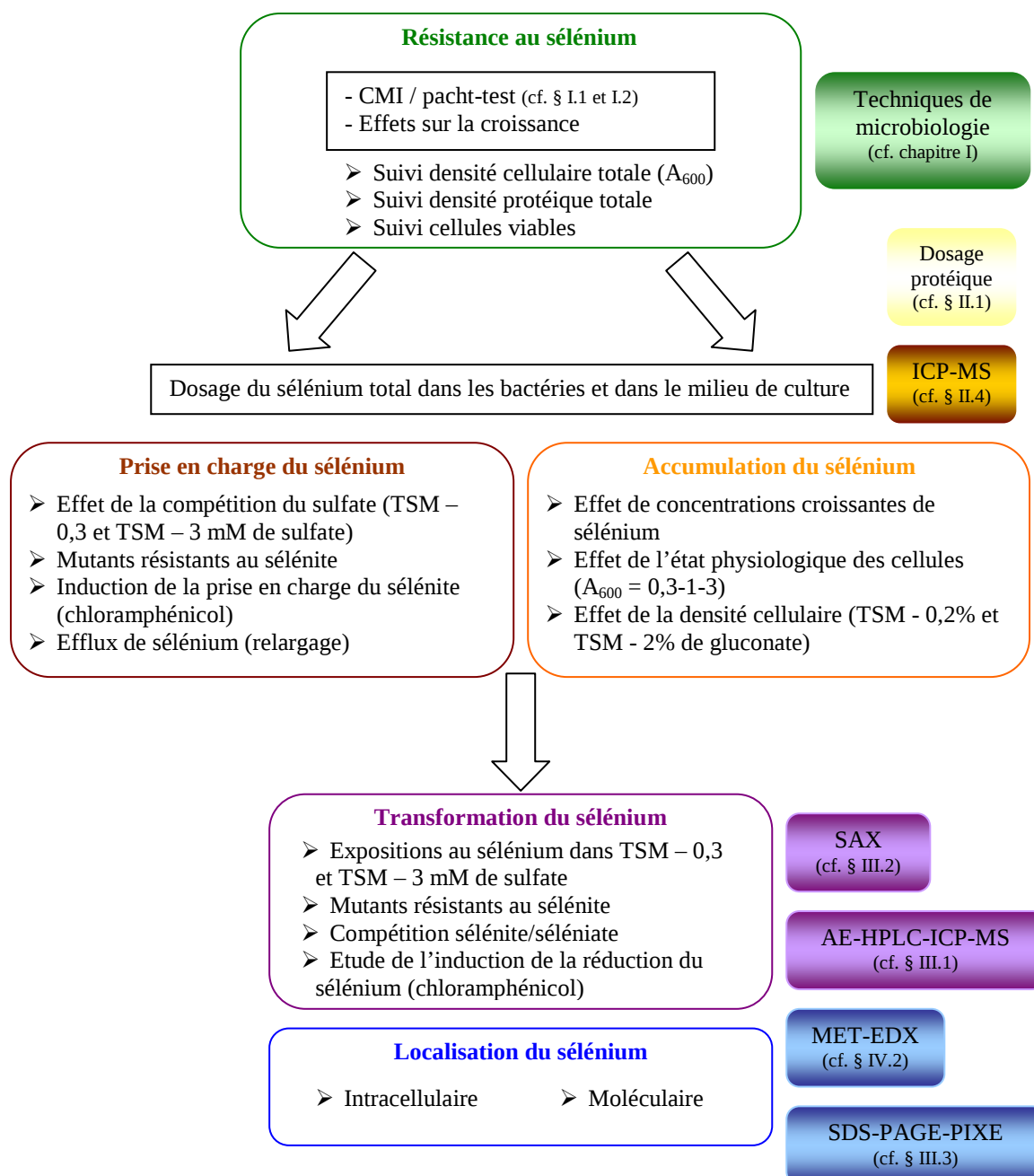


Figure 14 : récapitulatif de l'ensemble des expositions au sélénium et les techniques analytiques mises en œuvre pour la caractérisation de la résistance au sélénium, de la prise en charge du sélénium, de son accumulation, de sa transformation et de sa localisation intracellulaire et moléculaire chez *C. metallidurans* CH34. Le dosage du sélénite dans le milieu par fluorimétrie et le dosage du sulfate dans le milieu par colorimétrie ne sont pas indiqués car ils sont réalisés ponctuellement.

I. Techniques de microbiologie

1. Souche bactérienne et conditions de culture

1.1. Souche bactérienne et mutants

Notre modèle d'étude *Cupriavidus metallidurans* CH34 a été fourni par le Professeur Max Mergeay du Centre d'Energie Nucléaire de Mol, en Belgique. La bactérie a été isolée de sédiments riches en zinc d'un réservoir de décantation d'une zinguerie en Belgique en 1976 (Mergeay *et al.*, 1978). La bactérie est aérobie facultative. La source de carbone utilisée en condition hétérotrophe est l'acide gluconique.

Les mutants utilisés dans cette étude dérivent de la souche sauvage *C. metallidurans* CH34. Obtenus par insertion aléatoire du transposon mini-Tn5*gfp*, ils ont été criblés et caractérisés par les Drs. F. Ledgham et J. Covès. Les trois souches mutantes RM6, RM7 et RM8, incapables d'exprimer une protéine membranaire de la famille DedA, consomment moins de sélénite et deviennent hyper-résistantes à cet oxyanion (Ledgham *et al.*, 2005).

1.2. Milieux de cultures

Les cultures liquides sont réalisées dans le milieu salin minimum, le Tris Salt Medium (TSM) (Schlegel *et al.*, 1961 ; Mergeay *et al.*, 1985). Le milieu est complété avec une solution d'oligo-éléments SL7 (Biebl et Pfennig, 1981) et une solution de citrate de fer. La source de carbone utilisée est l'acide gluconique à une concentration finale de 2%, 1% ou 0,2% selon les expériences. Le pH du milieu est ajusté à 7,4 avant stérilisation par autoclavage. Les solutions SL7 et citrate de fer sont stérilisées par filtration sur membrane stérile (0,22µm, Millipore).

Les cultures solides sont réalisées avec le milieu salin minimum, TSM-agar et le milieu riche Luria Broth agar (LB-agar, Sigma). Le tableau 9 présente la composition du milieu de culture salin minimum.

Composés	Concentrations finales
Tris (HCl)	50 mM
NaCl	80 mM
KCl	20 mM
Na ₂ SO ₄	3 mM ou 0,3 mM
MgCl ₂ , 6 H ₂ O	1 mM
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	200 µM
Na ₂ HPO ₄	1,3 mM
Acide gluconique	2% ou 1% ou 0,2%
C ₆ H ₅ FeO ₇	1%
SL7	1 ml/L
Agar (pour milieu solide)	20 g/L
SL7 : ZnCl ₂ (500 µM); MnCl ₂ , 4 H ₂ O (500 µM); H ₃ BO ₃ (1 mM); CoCl ₂ , 6 H ₂ O (800 µM); CuCl ₂ , 2 H ₂ O (100 µM); NiCl ₂ , 6 H ₂ O (100 µM); Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O (150 µM); HCl (8,2 mN)	

Tableau 9 : composition du milieu de culture salin minimum (TSM)
(Tous les réactifs sont fournis par Sigma)

1.3. Conditions et suivis de croissance de *C. metallidurans* CH34 et des mutants

La souche sauvage et les mutants sont cultivés dans le milieu TSM liquide décrit précédemment, en condition aérobie, sous une agitation de 250 rpm à 29°C (Infors, Novotron). L'oxygénation est assurée avec un volume de culture correspondant à 1/5^{ème} du volume du flacon de culture. La croissance des cultures est suivie par lecture de la turbidité à la longueur d'onde de 600 nm (A_{600}) à l'aide d'un spectrophotomètre (Biowave, Biochrom). La croissance se traduit par une augmentation de la population et donc une augmentation de la quantité de protéines totales. Ainsi, et afin de normaliser la quantité de sélénium accumulée par rapport à la biomasse bactérienne, la croissance est également suivie par dosage des protéines totales par la méthode colorimétrique à l'acide bicinchoninique (BCA-kit, Sigma ; cf. § II.1).

La souche sauvage est régulièrement contrôlée par ensemencement sur milieu solide TSM-agar contenant 800 µM de CdCl₂ et 2 mM de ZnCl₂. Les souches mutantes sont contrôlées par inoculation en milieu TSM liquide contenant 10 mM de sélénite puis par isolement sur TSM-agar et LB-agar.

2. Concentration minimale d'inhibition (CMI)

La CMI est définie comme la concentration minimale d'inhibiteur empêchant la croissance bactérienne. Cette méthode est utilisée pour déterminer la sensibilité aux antibiotiques. L'application de cette technique pour d'autres toxiques, comme le sélénium, permet de déterminer le seuil de résistance des bactéries. La CMI peut être déterminée en milieu solide ou en milieu liquide.

Dans ce travail, cette valeur est déterminée en milieu TSM liquide contenant des concentrations croissantes de sélénium à partir des cultures décrites dans le paragraphe I.5.1. Le seuil de résistance au sélénium est quantifié par lecture de l'absorbance à 600 nm. Cette lecture est effectuée lorsque la culture témoin est en phase stationnaire. La CMI correspond alors à la plus petite concentration de sélénium pour laquelle la croissance est nulle, c'est-à-dire que l'absorbance à 600 nm stagne.

3. Tests de sensibilité

Des mesures de sensibilité de la souche sauvage et des mutants résistants au sélénite ont également été réalisées en « patch-test » selon le protocole décrit par M. Bebien (Bebien *et al.*, 2001). Pour cela, 5 μL d'une culture en milieu de phase exponentielle de croissance, contenant approximativement 10^7 cellules, sont déposés en spot sur du milieu TSM solide contenant des concentrations croissantes de sélénium. Les boîtes sont observées après une incubation à 29°C de 5 jours.

4. Dénombrements bactériens en milieu solide

Les bactéries viables sont dénombrées en milieu LB-agar selon la méthode directe de dénombrements des colonies après culture et dilution en série (Prescott *et al.*, 1995). Ces dénombrements sont réalisés à intervalles réguliers durant les cinétiques de croissance en milieu liquide TSM avec ou sans sélénium. Pour cela, 100 μL de culture sont prélevés et dilués en cascade (dilutions 10^1 à 10^7) dans 900 μL d'eau ultra pure stérile et refroidie à 4°C. Les dilutions sont homogénéisées et 100 μL des dilutions 10^5 , 10^6 et 10^7 sont étalés au moyen d'un étaleur stérile à la surface de la gélose. Chaque dilution est triplée. Après une incubation de 48 à 72 heures à 29°C, les colonies sont dénombrées.

5. Expositions au sélénium

Les cultures utilisées pour les expériences sont toujoursensemencées à partir d'une pré-culture en phase exponentielle de croissance. Une culture témoin est réalisée systématiquement en absence de sélénium. La croissance bactérienne est suivie par lecture de l'absorbance à 600 nm et par dosage protéique. Des solutions-stock de sélénite de sodium (Na_2SeO_3 , Sigma) et de séléniat de sodium (Na_2SeO_4 , Sigma) de 1 M et 0,2 M dans de l'eau ultra pure (résistivité $> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) ont été utilisées. Ces solutions stock sont stérilisées par filtration sur membrane stérile de $0,22 \mu\text{m}$ de porosité (Millipore) et conservées à 4°C à l'abri de la lumière. Le sélénite ou le séléniat sont additionnés à différentes concentrations et à différents stades de la croissance bactérienne. Selon les expériences, les milieux d'exposition sont modifiés au niveau des concentrations en sulfate (Na_2SO_4 , 3 mM ou 0,3 mM) et en gluconate (2%, 1% ou 0,2%). Lorsque ce n'est pas précisé, le milieu de culture est le TSM liquide et la concentration en gluconate utilisée est fixée à 2% afin d'obtenir une densité cellulaire suffisante pour détecter le sélénium lors des analyses ultérieures.

5.1. Etude de la résistance au sélénium

5.1.1. Chez la souche sauvage

Deux séries de cultures de *C. metallidurans* CH34 sont inoculées à une absorbance à 600 nm de 0,3. La première série est exposée à des concentrations croissantes de sélénite (1, 2, 4, 6 et 8 mM) et la seconde série est exposée à des concentrations croissantes de séléniat (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 et 16 mM). Le sélénite ou le séléniat sont ajoutés au moment de l'ensemencement correspondant au temps "zéro" de l'expérience. La croissance bactérienne est suivie pendant 192 heures afin de déterminer les effets du sélénium sur la durée de la phase de latence, la vitesse de croissance lors de la phase exponentielle de croissance et la densité cellulaire atteinte en phase stationnaire. Cette étude est complétée par le dénombrement bactérien durant la croissance de cultures exposées à 2 mM de sélénite et de séléniat (cf. § I.4).

Une éventuelle mutation de la souche est recherchée après les expositions au sélénite. La méthode décrite par M. Roux est appliquée (Roux *et al.*, 2001). Pour cela, une première étape consiste à isoler toutes les cultures en phase stationnaire, issues de la première exposition aux différentes concentrations de sélénite, sur milieu TSM solide sans sélénium. Après incubation à

29°C pendant 5 jours, les bactéries sont repiquées dans le milieu liquide contenant les mêmes concentrations en sélénite que lors de la première exposition. Au cours de cette seconde étape, la durée du temps de latence est suivie par mesure de l'absorbance à 600 nm. L'objectif est de comparer la durée du temps de latence des premières cultures avec celle des secondes cultures. Dans le cas d'une adaptation métabolique aux conditions environnementales, le temps de latence reste constant pour une concentration en sélénite donnée. Dans le cas de la sélection d'un mutant, le temps de latence est plus court pour la même concentration en sélénite.

5.1.2. Chez les souches mutantes

Les souches mutantes résistantes au sélénite RM6 et RM8 sont inoculées à une absorbance à 600 nm de 0,3. Pour chaque mutant, 2 ou 10 mM de sélénite sont ajoutés au moment de l'inoculation. Les effets du sélénium sur la croissance sont étudiés durant 144 heures de la même manière que cela a été décrit pour la souche sauvage (cf. § I.5.1.1).

5.2. Etude de l'accumulation du sélénium

L'accumulation du sélénium dans les bactéries est quantifiée par deux méthodes : par mesure directe de la quantité de sélénium accumulé dans les bactéries et par mesure indirecte du sélénium non consommé par les bactéries et restant dans le milieu de culture. Au cours de la culture bactérienne, des prélèvements réguliers sont effectués afin de séparer bactéries et surnageants de culture. Le traitement des prélèvements est décrit dans le paragraphe I.5.8. Les vitesses d'accumulation du sélénium dans les bactéries et de consommation du sélénium du milieu de culture sont déterminées dans la partie linéaire des courbes respectives d'accumulation et de consommation. Les conditions de culture mises en œuvre pour ces expériences sont décrites ci-dessous.

5.2.1. Influence de la concentration en sélénium dans le milieu de culture sur l'accumulation bactérienne du sélénium

Les cultures précédentes (cf. § I.5.1.1) contenant des concentrations croissantes en sélénium sont suivies au cours du temps par le dosage du sélénium dans les bactéries et dans le milieu de culture.

5.2.2. Influence du stade de croissance et de la densité cellulaire sur l'accumulation bactérienne du sélénium

L'influence de l'état physiologique de la bactérie sur l'accumulation du sélénium est recherchée. En parallèle, l'effet de la densité cellulaire sur la cinétique d'accumulation du sélénium par la bactérie est analysé. Dans ces deux approches, la concentration en sélénium est fixe.

Influence de l'état physiologique des bactéries sur l'accumulation du sélénium

Des cultures de *C. metallidurans* CH34 sontensemencées à une absorbance à 600 nm de 0,3. 2 mM de sélénite ou de séléniat sont ajoutés au milieu de culture à différents stades de la croissance : en début de croissance ($A_{600} = 0,3$), au cours de la première moitié de la phase exponentielle de croissance ($A_{600} = 1$) et en fin de phase exponentielle de croissance ($A_{600} = 3$). L'expérience est réalisée durant 144 heures.

Influence de la densité cellulaire sur l'accumulation du sélénium

Des maxima de densité cellulaire différents sont obtenus en utilisant les concentrations de gluconate de 0,2 et 2%. Le milieu de culture contenant 0,2 ou 2% de gluconate est inoculé avec *C. metallidurans* CH34 à une absorbance à 600 nm de 0,3 en présence de 2 mM de sélénite durant 120 heures.

5.2.3. Comparaison de l'accumulation du sélénium chez les mutants résistants au sélénite et chez la souche sauvage

Pour cette expérience, la méthode de culture décrite par F. Ledgham est adaptée à nos conditions de culture (Ledgham *et al.*, 2005). Pour cela, les cultures de la souche sauvage et des mutants sont conduites jusqu'en milieu de phase exponentielle de croissance dans le milieu TSM à 2% ou 1% de gluconate, en absence de sélénium. Les bactéries de chaque culture sont ensuite collectées par centrifugation à 2350 g pendant 15 minutes à 25°C, puis lavées deux fois avec le milieu TSM à 2% ou 1% de gluconate et concentrées deux fois dans du milieu TSM à 0,2% de gluconate contenant 1 ou 2 mM de sélénite. L'exposition durant 12 heures dans le milieu TSM à 0,2% de gluconate permet de limiter la croissance bactérienne.

Pour l'étude de la prise en charge du séléniat, les mutants sontensemencés à une absorbance à 600 nm de 3 et exposés à 5 mM de séléniat durant 48 heures.

L'accumulation du sélénium dans les bactéries et la consommation du sélénite du milieu de culture sont suivies au cours du temps.

5.3. Etude de la prise en charge du sélénium

L'étude de la prise en charge du sélénium est réalisée par comparaison de l'accumulation du sélénium dans les bactéries dans des conditions de culture ciblées. Dans une première série d'expériences, la prise en charge est examinée en réalisant une compétition du sélénium (sélénite et séléniat) avec le sulfate. Dans une seconde série d'expériences, l'induction de la prise en charge est contrôlée avec un inhibiteur de synthèse protéique.

5.3.1. Compétition du sélénium avec le sulfate

C. metallidurans CH34 estensemencée dans deux milieux TSM sans sélénium, différents par leurs concentrations en sulfate (3 et 0,3 mM). Ces milieux sont notés respectivement TSM-3 mM et TSM-0,3 mM. La culture dans le milieu TSM-0,3 mM estensemencée successivement trois fois à une absorbance à 600 nm de 0,3 afin d'épuiser les bactéries en sulfate. Au troisième repiquage, les cultures dans les milieux TSM-3 mM et TSM-0,3 mM sont exposées à 2 mM de sélénite durant 96 heures ou 2,5 mM de séléniat durant 144 heures. Le sélénite est ajouté au moment de l'inoculation ($A_{600} = 0,3$) et le séléniat est additionné en début de phase stationnaire ($A_{600} = 7$).

5.3.2. Induction du mécanisme de prise en charge du sélénium

Afin de préciser si la prise en charge du sélénium par la bactérie nécessite l'induction de la synthèse de néo-protéines, les expériences d'accumulation du sélénium par la bactérie sont réalisées en présence d'un inhibiteur de la traduction, le chloramphénicol. La solution de chloramphénicol 100X (Sigma) est préparée extemporanément dans de l'éthanol et stérilisée par filtration (Millipore). L'accumulation du sélénium dans les bactéries et la consommation du sélénium du milieu de culture de *C. metallidurans* CH34 sont comparées dans des cultures réalisées en absence et en présence de chloramphénicol.

Dans le cas d'une exposition au sélénite, les cultures concentrées, obtenues dans le milieu TSM à 0,2% de gluconate contenant 1 mM ou 2 mM de sélénite, sont exposées durant 12

heures au chloramphénicol, additionné en fractionné ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ 3 heures avant l'exposition au sélénite puis $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ 3 et 8 heures après le début du contact avec le sélénite).

Dans le cas d'une exposition au séléniat, l'étude est réalisée durant 144 heures avec des cultures dans les milieux TSM-0,3 mM et TSM-3 mM de sulfate, obtenues au troisième repiquage, exposées à $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de chloramphénicol et à 2 mM de séléniat ajoutés en début de phase stationnaire ($A_{600} = 7$).

Une culture témoin supplémentaire est effectuée en présence de chloramphénicol. La viabilité bactérienne des cultures en présence de chloramphénicol est contrôlée en les inoculant en début, milieu et fin de croissance dans le milieu TSM à 1% ou 2% de gluconate en absence de sélénium et de chloramphénicol.

5.4. Dosage du sélénium relargué par les bactéries après accumulation

Deux cultures dans le milieu contenant 2 mM de sélénite ou 2 mM de séléniat sontensemencées à une absorbance à 600 nm de 0,3. Le maximum d'accumulation est atteint après respectivement 7 et 9 jours d'exposition au sélénite et au séléniat. 5 mL de chaque culture sont réservés pour quantifier le sélénium accumulé par les bactéries et celui restant dans le milieu de culture (cf. § I.5.8).

Les bactéries contenues dans le reste de chaque culture sont récupérées par centrifugation à 3380 g pendant 15 minutes à température ambiante. Elles sont lavées deux fois avec du milieu TSM sans sélénium et remises en culture dans du milieu sans sélénium. Cette inoculation correspond au temps " zéro " du suivi de relargage du sélénium dans le milieu de culture. Des prélèvements réguliers de la culture sont réalisés durant 10 jours. Le milieu de culture est récupéré par centrifugation à 3380 g pendant 5 minutes. Il est ensuite filtré sur une membrane filtrante de $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore) pour éliminer les cellules bactériennes restant en suspension. Le sélénium relargué dans le milieu filtré est quantifié par ICP-MS (cf. § I.5.8.).

5.5. Cultures exposées au sélénium pour l'étude de sa transformation au cours de son accumulation

5.5.1. Etude chez la souche sauvage et les mutants résistants au sélénite

La spéciation des intermédiaires formés au cours de la réduction du sélénium par la souche sauvage est suivie à partir des cultures exposées à 2 mM de sélénium et décrites dans le

paragraphe I.5.2. L'étude pour les mutants résistants au sélénite est effectuée à partir des cultures exposées à 10 mM de sélénite (cf. § I.5.1.2) et à partir des cultures exposées à 5 mM de séléniat (cf. § I.5.2.3). Des prélèvements réguliers sont réalisés afin de quantifier l'accumulation du sélénium dans les bactéries et d'identifier les espèces séléniées (cf. § I.5.8., III.1 et III.2).

5.5.2. Etude de la compétition entre le séléniate et le sélénite chez la souche sauvage

Deux cultures de *C. metallidurans* CH34 exposées à 1 mM ou 2 mM de sélénite sont inoculées à une absorbance à 600 nm de 3 dans le milieu. Ces cultures ont permis de déterminer le temps nécessaire pour l'observation de l'apparition de la coloration rouge, révélatrice de la réduction du sélénite en sélénium élémentaire rouge. Ainsi défini, le temps moyen d'apparition de la coloration rouge de la culture dans ces conditions est de 6h30.

L'éventuelle compétition des deux oxyanions est ensuite étudiée en suivant l'effet de la présence de séléniate sur l'apparition de la coloration rouge observée après exposition au sélénite. Les deux oxyanions de sélénium sont ajoutés dans une culture soit à la même concentration, soit à des concentrations différentes comme indiqué en figure 15. Le temps avant l'apparition de la coloration rouge dans les trois conditions de cultures est mesuré. Une culture contenant le sélénite seul contrôle la durée de contact d'apparition de la coloration.

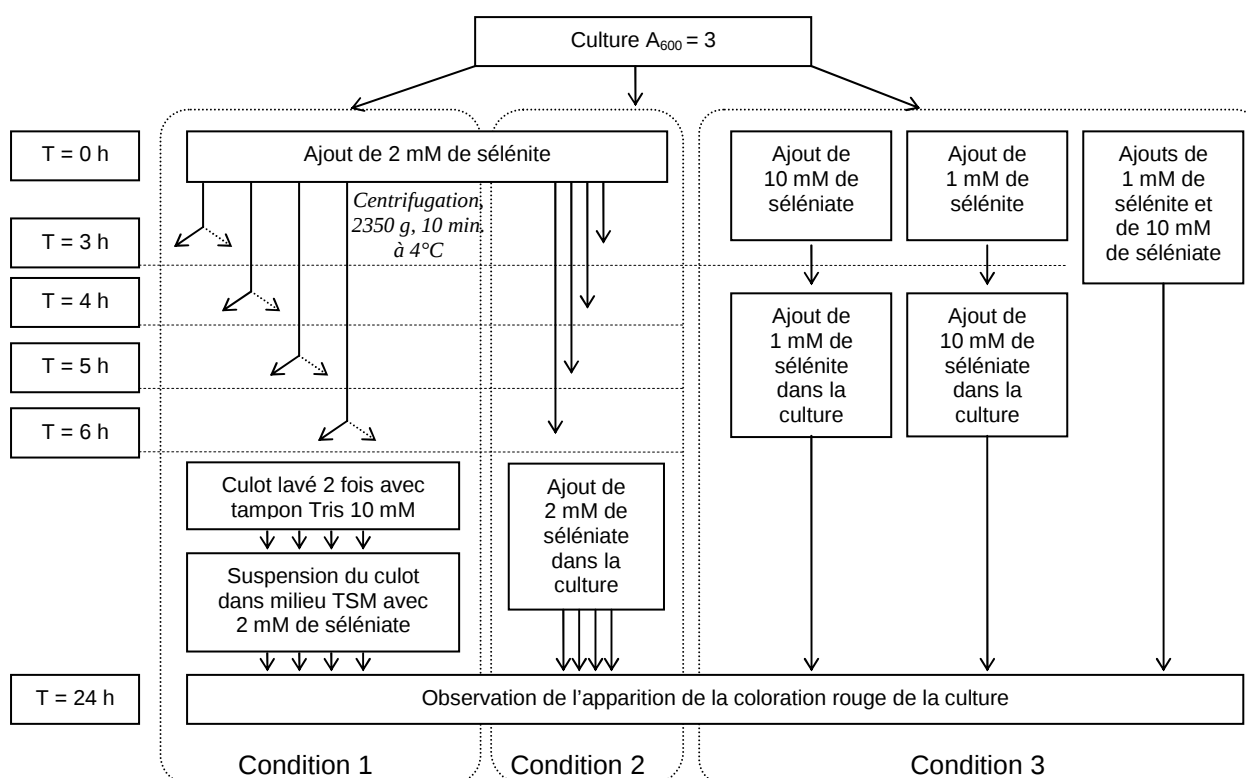


Figure 15 : les conditions d'exposition pour l'étude de la compétition du sélénite et du séléniate. La condition 1 consiste à exposer successivement le sélénite et le séléniate à la même concentration. Après chaque temps de contact avec le sélénite, les bactéries sont récupérées par centrifugation et remises en culture dans du milieu TSM contenant 2 mM de séléniate. La condition 2 se déroule de la même manière que la condition 1, sauf que le séléniate est ajouté directement dans la culture exposée au sélénite. Enfin la condition 3 correspond à l'exposition successive ou simultanée de sélénite et de séléniate à des concentrations différentes.

5.5.3. Induction des mécanismes de réduction du sélénium

5.5.3.1. Induction du mécanisme de réduction du sélénite

L'induction du mécanisme de réduction du sélénite est vérifiée dans deux séries d'expériences décrites ci-après.

Dans un premier temps, les cultures sontensemencées dans le milieu à une absorbance de 0,3 et exposées à 0,02, 0,2 et 2 mM de sélénite durant 48 heures. L'induction de la réduction du sélénite en sélénium élémentaire aux différentes concentrations de sélénite est suivie par l'observation de la coloration rouge de la culture.

Dans un second temps, les cultures sont exposées durant 5 heures à 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de chloramphénicol et 2 mM de sélénite, ajoutés en une seule fois au moment de la phase stationnaire ($A_{600} = 10$) dans le milieu TSM contenant 0,2% de gluconate. Une culture témoin sans chloramphénicol et avec 2 mM de sélénite est réalisée en parallèle. L'induction de la réduction du sélénite en sélénium élémentaire est suivie par l'observation de l'apparition de la coloration rouge du milieu de culture dans les différentes conditions. Le dosage de l'accumulation du sélénium dans les bactéries complète cette observation.

5.5.3.2. Induction du mécanisme de réduction du séléniat

Les cultures de *C. metallidurans* CH34 en présence de chloramphénicol décrites dans le paragraphe I.5.3.2 sont analysées pour identifier les espèces séléniées.

5.6. Cultures exposées au sélénium pour la recherche de protéines séléniées

Deux séries de 3 cultures sont inoculées dans le milieu à une absorbance à 600 nm de 0,3 et exposées à 2 mM de sélénite (série 1) ou 7 mM de séléniat (série 2). Pour chaque série, une culture est récupérée en milieu de phase exponentielle de croissance, une en fin de phase exponentielle de croissance et une en milieu de phase stationnaire. A la fin des expositions, les bactéries sont séparées par centrifugation de 20 minutes à 12520 g et 4°C. Les bactéries sont lavées deux fois avec du milieu de culture sans sélénium et stockées à -20°C en attendant leurs traitements pour l'extraction des protéines (cf. § III.3).

5.7. Cultures exposées au sélénium pour l'imagerie

5.7.1. Expositions au sélénite

Une culture de *C. metallidurans* CH34 est réalisée jusqu'à une absorbance à 600 nm de 3 et exposée à 2 mM de sélénite dans le milieu de culture. Une culture témoin, sans sélénium, est conduite en parallèle. Des prélèvements réguliers sont réalisés durant 24 heures. Les bactéries ainsi collectées sont destinées aux observations en microscopie électronique à transmission (MET) (cf. IV).

5.7.2. Expositions au séléniat

Des cultures de *C. metallidurans* CH34 contenant 0,3 mM ou 3 mM de sulfate, sont réalisées comme décrit dans le paragraphe I.5.3.1. Des prélèvements réguliers sont réalisés durant 50 heures. Les prélèvements sont traités comme décrit dans le paragraphe I.5.8.

5.8. Traitement des prélèvements de culture

Les prélèvements réalisés sur les cultures décrites précédemment et destinés à des analyses ultérieures sont traités de la manière suivante.

Le milieu de culture et les bactéries sont séparés par centrifugation à 3380 g pendant 10 minutes à 4°C (Centrifugeuse Br4i, Jouan). Le milieu de culture est filtré à travers une membrane filtrante de 0,22 µm (Millipore) pour éliminer les cellules bactériennes restant en suspension. Les cellules bactériennes contenues dans le culot sont lavées deux fois avec du tampon TRIS-HCl 10 mM à pH 7,2. Puis elles sont concentrées dans un volume d'eau ultra-pure. Le milieu de culture et les bactéries sont congelés à -20°C en attendant d'être analysés par ICP-MS (cf. § II.4).

Pour la recherche d'espèces sélénées (XANES/EXAFS, cf. § III.2) et pour l'imagerie (MET/MET-EDX, cf. chapitre IV), le culot bactérien ainsi préparé est fractionné. Pour normaliser la quantité de sélénium dosé, la quantité de protéines de ces prélèvements est déterminée (cf. § II.1).

II. Techniques analytiques de biochimie et chimie

Ce second chapitre présente les techniques analytiques de biochimie et de chimie utilisées lors de ce travail. L'ensemble de ces techniques est récapitulé en figure 14.

1. Dosage des protéines

La croissance bactérienne correspond à une production de biomasse se traduisant par une augmentation du contenu protéique. Ainsi, le dosage des protéines totales bactériennes permet de normaliser les résultats de dosages de sélénium dans les bactéries. Le dosage protéique complète le suivi de croissance par lecture de l'absorbance à 600 nm.

Le principe du dosage des protéines

Le dosage des protéines totales est réalisé par la technique du BCA (Smith, 1985) à l'aide du Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (Sigma) suivant les indications du fournisseur. Les courbes étalons sont réalisées à l'aide d'une solution standard d'albumine de sérum bovin (BSA, Sigma). Le principe de la méthode BCA est similaire à la procédure de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Dans ces deux techniques, les protéines réduisent les ions Cu(II) en Cu(I) en milieu alcalin, et les ions Cu(I) sont chélatés par l'acide bicinchoninique. Le complexe obtenu, de couleur pourpre, absorbe fortement à 562 nm et dans la gamme de longueurs d'onde de 540 à 590 nm. Cette absorbance est linéaire en fonction de la concentration en protéines dans une gamme de 200 à 1000 µg / mL de protéines. Cette méthode présente l'avantage de pouvoir être appliquée en présence de détergents comme le Triton ou le SDS.

La préparation des échantillons

Les échantillons bactériens sont d'abord lysés avec la solution de lyse commerciale CellLytic™ B (Sigma) suivant les indications du fournisseur. Le dosage est préparé en microplaque 96 puits avec un volume d'échantillon pour huit volumes de la solution réactive BCA, préparée extemporanément. La microplaque est incubée pendant 30 minutes à 37°C à l'abri de la lumière puis 15 minutes à température ambiante. L'absorbance du complexe obtenu est lue à 577 nm avec le spectrophotomètre StatFax (Fisher Bioblock). Chaque dosage est triplé. La concentration en protéine de l'échantillon est déterminée avec une gamme étalon BSA de 200 à 1000 µg / mL.

2. Dosage du sulfate par colorimétrie

Le sulfate est dosé semi-quantitativement dans le surnageant de culture filtré grâce à une méthode colorimétrique commerciale et suivant les indications du fournisseur (Aquaquant[®], VWR). Le mélange réactionnel est constitué de 2,5 mL de surnageant de culture filtré, 2 gouttes du réactif SO₄-1A permettant de masquer les ions carbonates et une cuillère (fournie par le kit) du réactif SO₄-2A (iodate de baryum). Le mélange est incubé 5 minutes à 40°C et régulièrement agité. L'iodate de baryum réagit avec les ions sulfates en milieu aqueux organique avec 2,5 mL du réactif SO₄-3A pour former des ions iodates et un précipité blanc de sulfate de baryum. Les ions iodates, libérés par cette réaction sont séparés du précipité de sulfate de baryum par filtration du mélange sur une membrane filtrante fournie par le kit. Puis, les ions iodates, contenus dans le filtrat, oxydent le tannin (4 gouttes du réactif SO₄-4A) en donnant un composé coloré rouge-brun après une incubation de 7 minutes à 40°C. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'ions iodates et donc à la quantité d'ions sulfate. La détermination de la concentration est obtenue par comparaison optique de la coloration de l'échantillon avec une gamme étalon sous forme de palette de couleur fournie par le kit (figure 16).

Il s'agit donc d'une méthode colorimétrique indirecte de dosage de la quantité d'ions sulfates en solution. Ce dosage colorimétrique donne une indication de concentration dans une gamme étalon allant de 0 à 3 mM de sulfate.

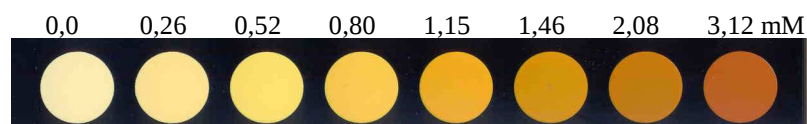


Figure 16 : gamme étalon pour le dosage du sulfate en mM (Aquaquant[®], VWR)

3. Dosage du sélénite par fluorimétrie

Afin de suivre la disparition du sélénite dans le milieu de culture au cours de la croissance bactérienne, le sélénite du surnageant (milieu de culture) est dosé par fluorimétrie. Cette méthode de dosage du sélénite dans le milieu de culture est adaptée de celle décrite par J. Kessi (Kessi *et al.*, 1999). Elle complète le dosage du sélénium total dans le milieu de culture réalisée par ICP-MS, technique d'analyse élémentaire.

Pour ces dosages, l'ensemble des manipulations s'effectue à l'abri de la lumière et dans des tubes en verre. Le sélénite est dosé dans le surnageant filtré (0,22 µm). Le milieu réactionnel est composé par le mélange de 5 mL de HCl 0,1 M ; 500 µL de EDTA ; 0,1 M (pH 7,3) ; 500 µL de NaF 0,1 M ; 500 µL d'oxalate de sodium 0,1 M ; 50 µL de surnageant de

culture et 1,25 mL de 2,3-diaminonaphtalène (0,1% dans HCl 0,1 M). Le mélange est incubé 40 minutes à 37°C puis placé une quinzaine de minutes à température ambiante. Au cours de cette incubation, le sélénite se complexe avec le 2,3-diaminonaphtalène. Le complexe formé est ensuite extrait par 3 mL de cyclohexane sous agitation vigoureuse. L'absorbance à 377 nm de la phase organique supérieure contenant le complexe est mesurée. La concentration en sélénite est obtenue en reportant la valeur d'absorbance lue sur une gamme étalon réalisée à partir d'une solution de sélénite de concentration connue.

Le principe de la mesure consiste à exciter le complexe fluorescent formé avec les photons ultra-violet. La molécule excitée revient à son état initial en émettant des radiations lumineuses détectables. La quantité de radiation lumineuse émise est proportionnelle à la quantité de sélénite présent initialement dans l'échantillon. La sensibilité de la technique a pu être appréciée par comparaison au dosage du sélénium total dans le milieu de culture par ICP-MS.

4. Dosage du sélénium total par ICP-MS

Le sélénium total contenu dans les bactéries et dans le milieu de culture est dosé par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry, ICP-MS) selon la méthode de dosage de standard réalisé en calibration externe avec un étalon interne. Les analyses sont réalisées avec l'ICP-MS series X7 (Thermo Electron Corporation) du Laboratoire Pierre Süe. Cet appareil permet une analyse multi-élémentaire rapide et précise d'échantillons en solution. Cette technique possède des limites de détection très basses (de l'ordre de 0,01 à 0,1 ppb) variant selon les éléments et les matrices. Dans le cas du sélénium, la limite de détection est fixée à 1 ppb ou 1 µg / L ou 0,013 µM.

Le principe de la technique

Cette technologie consiste en une torche plasma à couplage inductif (ICP) couplée à un système de détection, un spectromètre de masse quadripolaire (MS). Le plasma à couplage inductif permet de générer des ions ensuite détectés par le spectromètre de masse. L'argon est utilisé comme gaz plasmagène car il a un potentiel d'ionisation élevé.

Le schéma de principe est montré en figure 17 et détaillé ici. Les chiffres entre parenthèse sont reportés sur la figure. L'introduction de l'échantillon liquide dans l'ICP-MS est réalisée grâce à un passeur d'échantillons automatique (type AS 90) couplé à une pompe péristaltique (1). L'échantillon est envoyé dans un nébuliseur qui le pulvérise en un aérosol de

fines gouttelettes (2). La chambre de nébulisation à impact, qui suit le nébuliseur, est refroidie par effet Peltier (environ 5°C) et permet d'effectuer un tri des gouttelettes les plus fines. L'aérosol ainsi formé est ensuite envoyé par un courant d'argon gazeux dans la torche à plasma d'argon (12 L min⁻¹) à très haute température (entre 6 000 et 10 000°C) (3). La température élevée du plasma conduit à la complète ionisation de la plupart des éléments.

Les ions produits par la source ICP sont pompés dans une interface à travers l'ouverture de deux cônes en nickel (échantillonneur et écorceur, (4)) par un système de vide différentiel. Puis, les ions du plasma sont accélérés vers un ensemble de lentilles électrostatiques permettant de focaliser le faisceau d'ions (5) et de le transporter vers le filtre de masse quadripolaire (6). Celui-ci est composé de quatre barreaux diamétralement appariés auxquels est appliquée une tension. La fréquence appliquée au quadripôle, définie par la sélection des isotopes de l'élément à analyser, détermine un seul rapport « masse de l'ion sur sa charge » (m/z). Le rapport m/z de l'ion à doser présente une trajectoire stable dans le spectromètre et atteint la sortie. Un détecteur d'ions (7), placé à la sortie du quadripôle, enregistre alors les ions transmis. Le sélénium total est déterminé avec les isotopes 78 et 82 (abondances naturelles respectives, 23,61% et 8,84%). L'enregistrement de la détection ICP-MS est réalisé par l'interface PlasmaLab (Thermo Electron Corporation) (8).

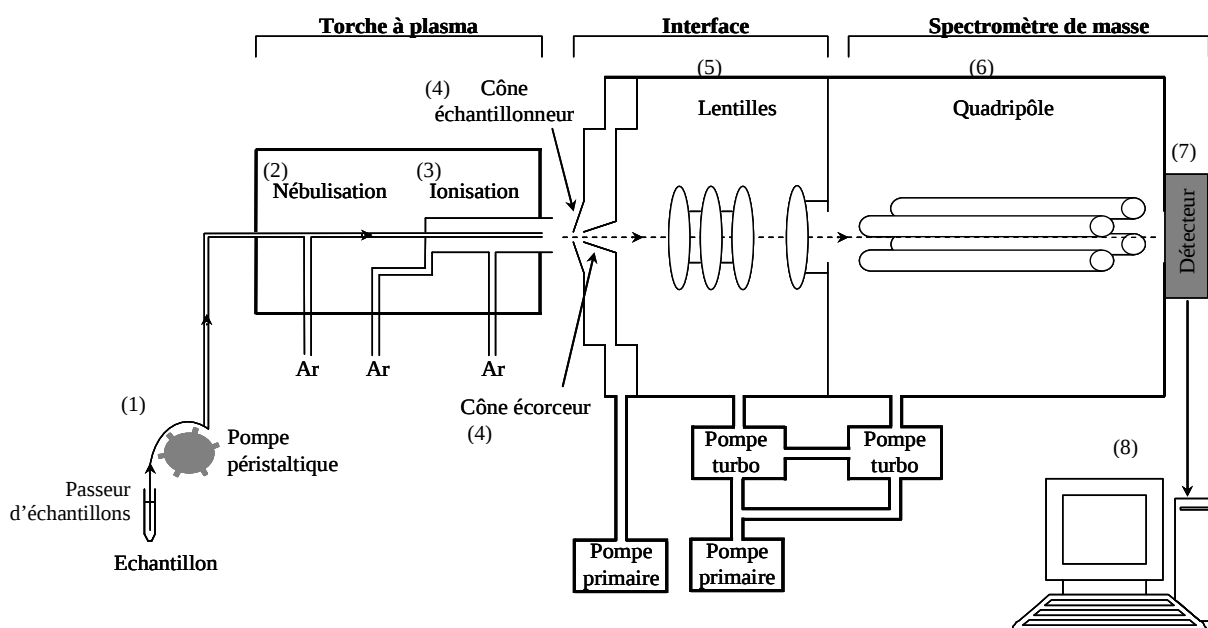


Figure 17 : schéma de principe de l'ICP-MS.

Préparation des échantillons

Afin d'être nébulisés, les échantillons à analyser doivent être en solution et totalement dissous. Les échantillons sont préparés dans des tubes à usage unique (tubes Falcon[®], VWR). Ainsi, les bactéries, décongelées à température ambiante, subissent un traitement chimique

visant à dissoudre totalement les différents composants qui les constituent comme indiqué en figure 18. Les cellules sont lysées par SDS/NaOH. L'eau oxygénée (H_2O_2) est utilisée afin de dissoudre le sélénium élémentaire rouge insoluble. L'échantillon est ensuite dilué pour que sa concentration en sélénium soit dans la gamme étalon ($2 - 100 \mu\text{g}$ de sélénium L^{-1}). La dilution est réalisée dans de l'eau acidifiée 2% pour stabiliser la solution à doser tout en favorisant l'ionisation de l'échantillon. Les échantillons sont conservés à 4°C en attendant leur analyse.

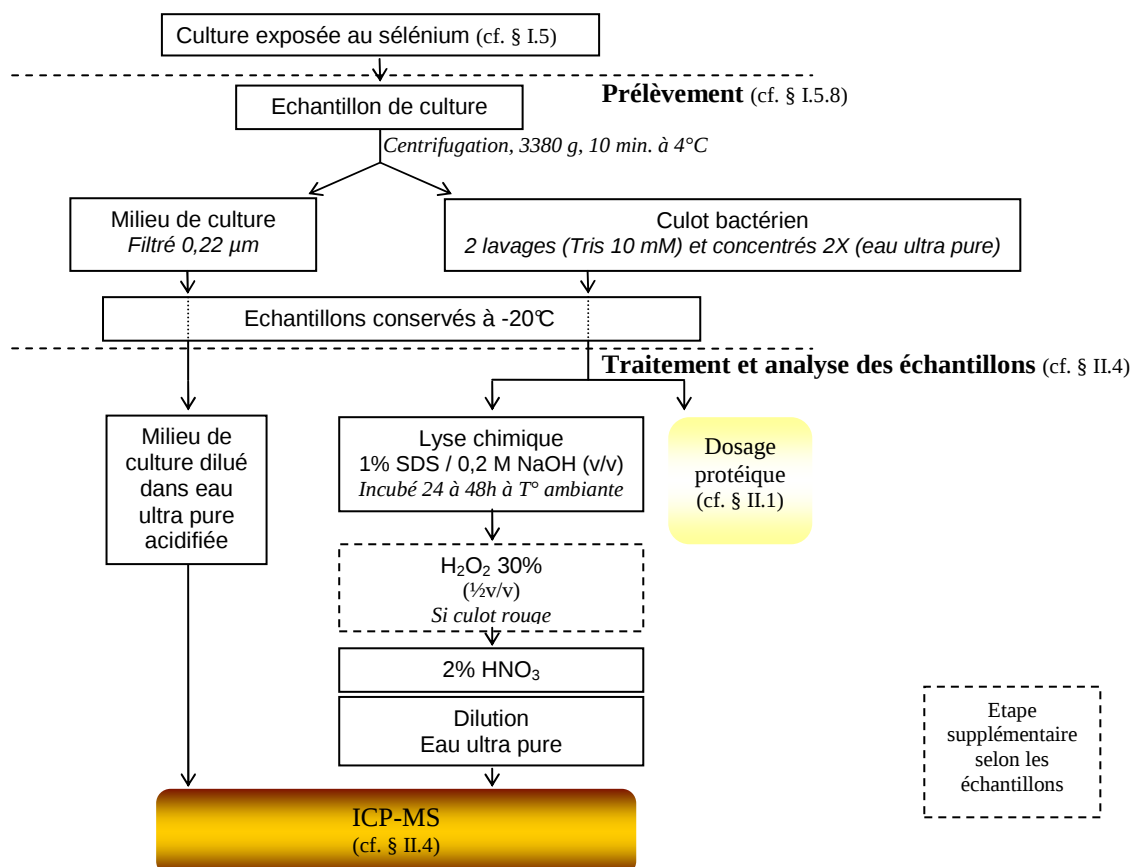


Figure 18 : protocole de traitement des échantillons pour le dosage du sélénium total dans les échantillons bactériens et le milieu de culture. La solution de lyse chimique SDS/NaOH est préparée extemporanément. Le sélénium élémentaire rouge présent dans les culots bactériens est totalement solubilisé en ajoutant une fraction d'eau oxygénée jusqu'à disparition de la couleur caractéristique. (H_2O_2 Normapur, Prolabo, VWR International). L'eau acidifiée est préparée avec 2% d'acide nitrique (HNO_3 65%, VWR) dans de l'eau ultra-pure (résistivité de $18 \text{ M}\Omega$).

Traitement des données expérimentales

Le nombre d'ions mesuré par le détecteur permet de calculer directement la concentration en sélénium en coups sec^{-1} convertis en $\mu\text{g L}^{-1}$ (ppb) grâce à une courbe de calibration et à l'aide du programme PlasmaLab (Thermo Electron Corporation). La courbe de calibration est obtenue par analyse d'une gamme étalon ($2 - 100 \mu\text{g}$ de sélénium L^{-1}) préparée à partir d'une solution standard monoélémentaire de sélénium (SPEX certiPrep, Metuchen, NJ). Les solutions standard sont préparées de façon identique aux échantillons. Le rhénium est utilisé comme étalon interne en ajoutant une quantité connue dans l'échantillon ($1 \mu\text{g Rh L}^{-1}$).

Le rhénium corrige la dérive instrumentale propre à chaque appareil lors de la mesure. Cette correction est effectuée automatiquement par le programme. Un échantillon de référence de concentration connue en sélénium, SRM 1640 (cf. annexe), contrôle la méthode analytique. Des blancs analytiques, composés d'eau ultra pure acidifiée, sont systématiquement passés au début de chaque procédure pour enlever le bruit de fond. La valeur mesurée pour ce blanc est soustraite des valeurs mesurées pour les échantillons. Le dosage de sélénium total dans les bactéries est normalisé par la quantité de protéines dosée dans les bactéries (le résultat final est exprimé en mg de sélénium par g de protéines).

5. Synthèse de particules de sélénium élémentaire rouge abiotique et biologique, et synthèse de sélénodiglutathion

Préparation des particules abiotiques de sélénium rouge

Elles sont synthétisées à température ambiante et à l'abri de la lumière en mélangeant 2 volumes de 100 mM d'acide ascorbique avec 1 volume de 100 mM de sélénite de sodium. La réaction est immédiate. Le mélange est agité à 100 rpm pendant quelques heures (Labotron, Infors). Le précipité de sélénium rouge est récupéré par centrifugation à 11000 g pendant 1 h 30 et lavé deux fois avec de l'eau ultra-pure afin d'éliminer l'excès d'acide ascorbique et de sélénite. Le résidu est lyophilisé puis pesé afin de déterminer le rendement de synthèse. Ce stock de sélénium rouge est conservé à -20°C.

Extraction des particules biologiques de sélénium rouge

Elles sont extraites à partir d'une culture de *C. metallidurans* CH34 exposée à 2 mM de sélénite. La méthode d'extraction, décrite en figure 19, est adaptée de celle décrite par R.S. Oremland (Oremland *et al.*, 2004). Deux préparations sont effectuées : la première consiste à collecter une partie des particules de la culture agrégée sur le bord du flacon de culture. Ces particules agrégées sont mises en suspension dans de l'eau ultra-pure. La seconde préparation consiste à extraire les particules contenues dans les bactéries de la culture. Les cellules sont lysées suite à un choc osmotique (figure 19) complété par une lyse enzymatique à l'aide du lysozyme. Les ultrasons (figure 19) permettent de compléter la lyse et de dissocier les particules de sélénium élémentaire (Se^0) qui ont tendance à s'agréger. A la fin de l'extraction, une solution orangée est obtenue. Les deux préparations de particules sont stockées à 4°C en attendant leur caractérisation par microscopie électronique.

Préparation de sélénodiglutathion

Le sélénodiglutathion est synthétisé en mélangeant du sélénite de sodium avec du glutathion au ratio 4:1 dans une solution diluée d'acide chlorhydrique (pH=1,3) (Ganther, 1968).

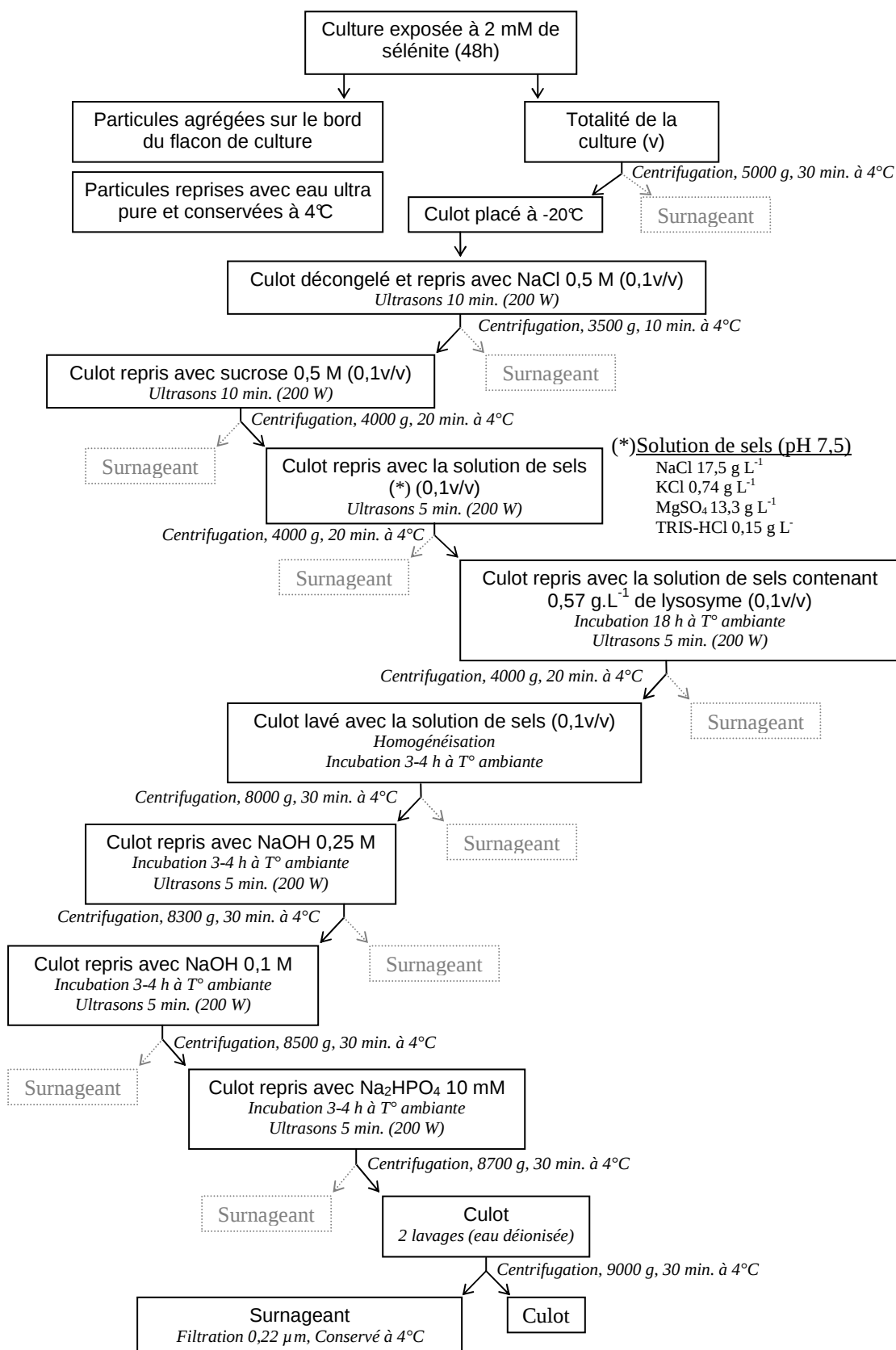


Figure 19 : protocole d'extraction des particules de sélénium biologique.

III. Techniques de spéciation des espèces sélénées

1. Spéciation des espèces sélénées extraites des culots bactériens par couplage AE-HPLC-ICP-MS

Les espèces de sélénium sont extraites d'une culture de *C. metallidurans* CH34 exposée au sélénium. Les espèces sélénées obtenues sont d'abord séparées par chromatographie échangeuse d'anions liquide haute performance (AE-HPLC) puis détectées et quantifiées par ICP-MS avec la technologie de la cellule de collision (CCT).

L'ensemble de ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr. Richard Collins lors de son stage postdoctoral au Laboratoire Pierre Süe.

1.1. Extraction d'espèces sélénées organiques et inorganiques à partir d'un culot bactérien

Le protocole d'extraction est décrit en figure 20. Ce protocole est adapté de celui décrit par l'équipe de Milchalke (Milchalke *et al.*, 2002). Le lysozyme attaque le peptidoglycane en hydrolysant la liaison unissant l'acide N-acétylmuramique et la N-acétylglucosamine. La protéase XIV correspondant à un mélange d'enzymes possédant des activités protéolytiques permet de digérer les protéines en leurs acides aminés. Les lyses enzymatiques sont conduites selon les recommandations du fournisseur (Sigma).

D'après l'étude de Milchalke, quatre autres protocoles d'extraction ont été testés au laboratoire mais ils n'ont pas amélioré le rendement d'extraction (par exemple, extraction à l'eau bouillante, lysozyme seul, NaOH / SDS et lysozyme / protéase XIV).

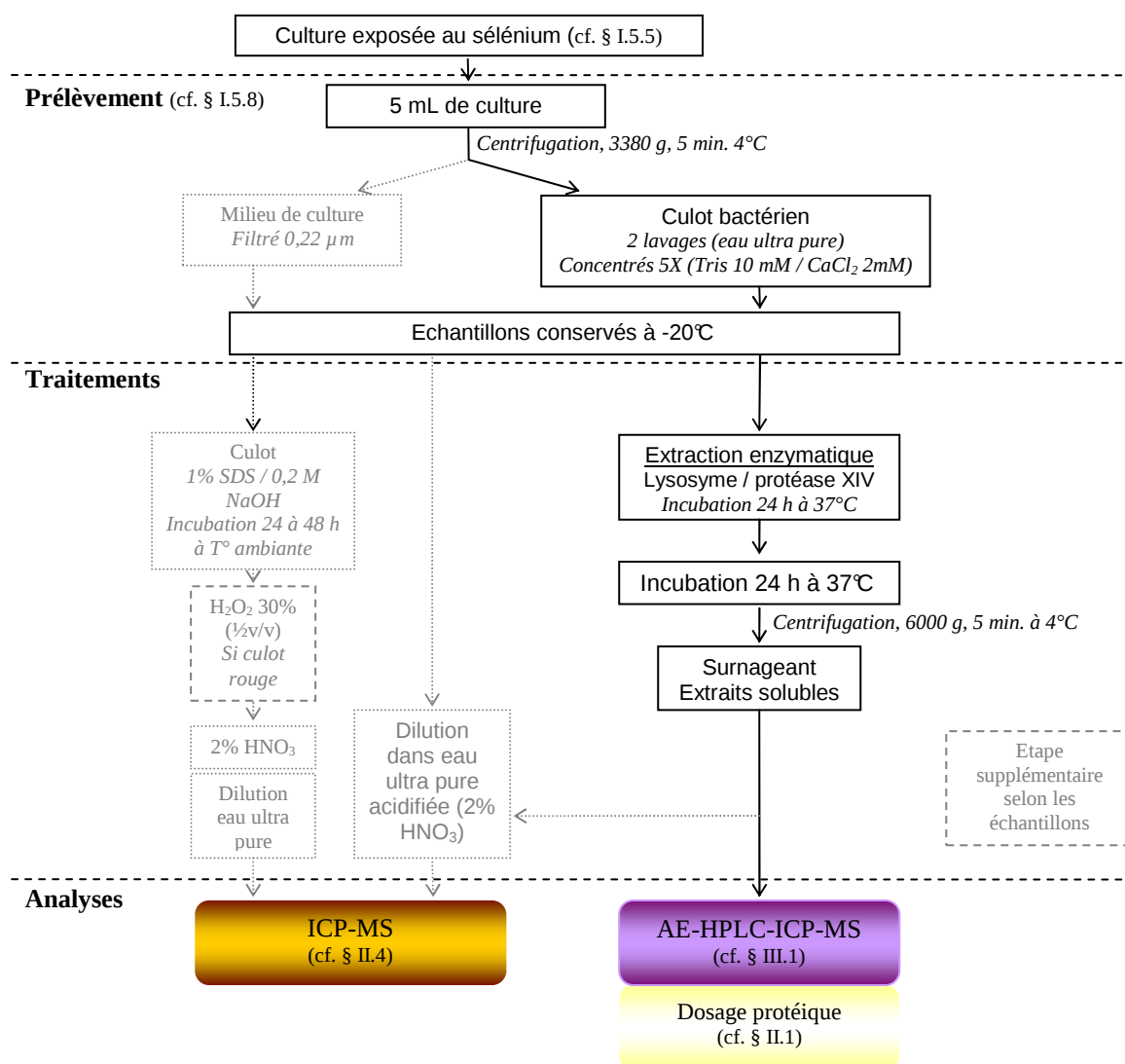


Figure 20 : méthodologie d'extraction des espèces sélénées pour le dosage du sélénium par AE-HPLC-ICP-MS. La lyse enzymatique contient 72 g L⁻¹ de lysozyme et de protéase XIV (Sigma). Les lysats obtenus à partir de la lyse sont stockés à 4°C et dilués 5 fois dans de l'eau ultra pure avant leurs analyses par AE-HPLC-ICP-MS. Le dosage du sélénium total complète l'analyse (parties pointillées grises).

1.2. Analyse des espèces sélénées par couplage AE-HPLC-ICP-MS

L'ensemble des espèces sélénées obtenues à partir de la lyse enzymatique des culots bactériens est analysé directement en une seule injection grâce à un couplage AE-HPLC-ICP-MS. Ce protocole d'analyse AE-HPLC-ICP-MS a été développé au laboratoire à partir de données de la littérature (Uden *et al.*, 2004). Les espèces sélénées anioniques comme le sélénite, le séléniate et les autres espèces sélénées anioniques contenues dans les extraits de culots bactériens telles que les acides aminés sélénés sont détectées.

La séparation chromatographique (AE-HPLC)

L'appareil de chromatographie liquide haute performance (HPLC, High Performance Liquid Chromatography, Gilson Pompe 321) est équipé d'une colonne échangeuse d'anions (AE) (Dionex AS11 IonPac[®] 4-mm). La colonne AS11 est composée d'une résine de polymères portant des groupements greffés de type ammonium quaternaire. L'échantillon est injecté manuellement avec une seringue de 1 mL dans le système d'injection de l'appareil HPLC, constitué par la vanne d'injection Rhéodyne associée à une boucle d'injection de 25 μL en polyéther-éthercétone (PEEK[®]). La séparation des composés de sélénium est réalisée avec le gradient linéaire d'élution de NaOH suivant : 0.8 mM NaOH (0-1 min) ; 0.8–40 mM NaOH (1-4 min) ; 0.8 mM NaOH (4-7 min). Ce gradient est obtenu à partir de solutions de NaOH 100 mM et 0,8 mM. Le débit appliqué, de 2 mL min^{-1} , est suffisant pour établir la connexion avec l'ICP-MS. La colonne est directement couplée au nébuliseur du système de détection, l'ICP-MS, par un tube en PEEK[®] de 20 cm de long et 0,13 mm de diamètre interne (figure 21).

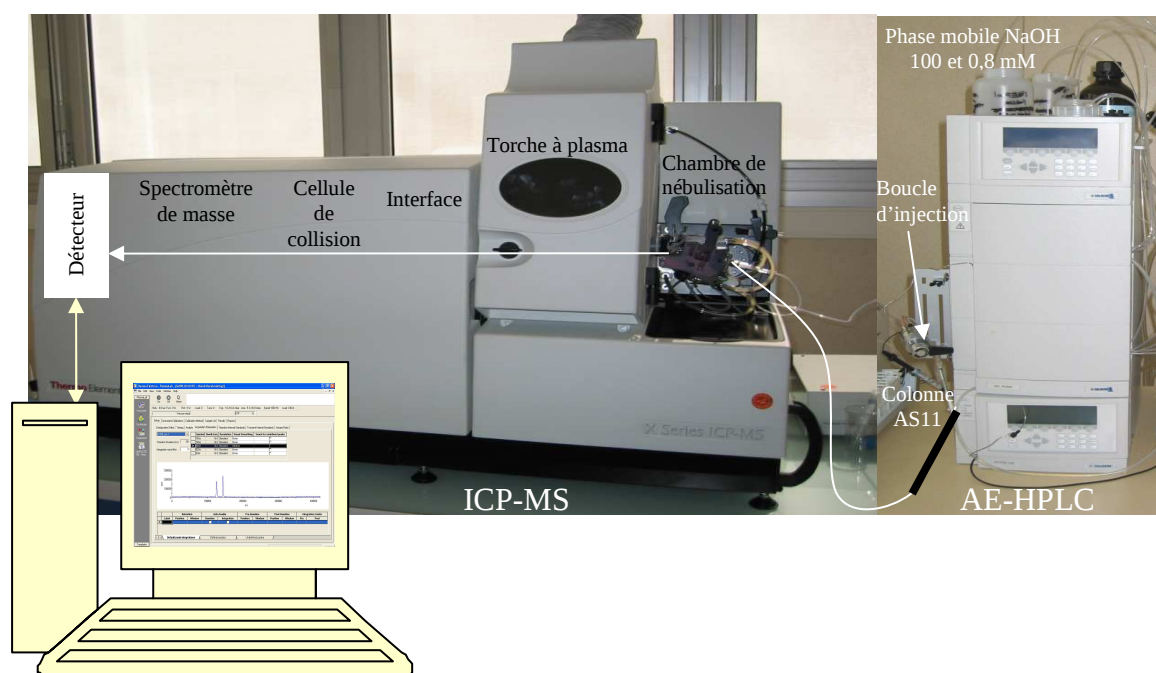


Figure 21 : AE-HPLC Gilson couplée à l'ICP-MS series X7 du Laboratoire Pierre Süe.

La détection au spectromètre de masse (ICP-MS)

Une fois les différentes espèces sélénées séparées, elles sont détectées par l'ICP-MS grâce au couplage avec l'appareil HPLC. L'enregistrement de la détection ICP-MS est réalisé par l'interface PlasmaLab.

Dans ces expériences, l'ICP-MS est utilisé en mode « technologie de cellule de collision » (CCT) pour supprimer les interférences isobariques causées par le plasma d'argon et améliorer le seuil de détection du sélénium dans les extraits. Ces interférences sont

majoritairement de nature polyatomique. Elles sont formées par les dimères d'argon $^{36}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$, $^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$ et $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$ qui interfèrent respectivement avec les isotopes du sélénium ^{76}Se , ^{78}Se et ^{80}Se . Grâce à l'utilisation de la CCT, l'isotope du sélénium le plus abondant, ^{80}Se (49,96%), peut alors être utilisé pour la quantification. La cellule de collision est située entre les lentilles électrostatiques et le quadripôle. La CCT est composée par un hexapôle dans lequel on injecte un gaz ou un mélange de gaz. Le mélange de gaz utilisé est l'hélium (He) et 8% de dihydrogène (H_2) dans de l'hélium. Ce mélange de gaz provoque des collisions et des réactions avec les interférants formés par les dimères d'argon. Les débits de gaz utilisés pour la CCT sont $1,7 \text{ mL min}^{-1}$ pour le mélange 8% H_2 - He et $6,5 \text{ mL min}^{-1}$ pour He seul.

Le principe de détection reste le même que celui utilisé pour la mesure du sélénium total dans les échantillons (cf. chapitre II.4). Tous les isotopes sont mesurés durant un temps d'intégration de 2,5 secondes. Le temps de comptage du détecteur pour chaque isotope est de 10 millisecondes. L'acquisition du chromatogramme est fixée à 7,01 minutes, temps nécessaire pour éluer la totalité des espèces sélénées. Le nombre d'isotopes mesurés par le détecteur permet de calculer la concentration en sélénium en coups sec^{-1} (cps). Pour convertir la quantité de sélénium en $\mu\text{g L}^{-1}$, les solutions standard de sélénite de sodium, séléniat de sodium, L-sélénométhionine, L-sélénocystine et Se-méthyle L-sélénocystéine, sont utilisées pour établir la courbe d'étalonnage de 0,5 à $130 \mu\text{g L}^{-1}$.

Traitement des données expérimentales

La quantification de chaque espèce est ici réalisée avec l'isotope ^{80}Se . A l'aide du programme PlasmaLab, la surface des pics obtenus est intégrée selon un temps d'intégration de 1400 millisecondes (700 millisecondes de chaque côté du maximum du pic). Le bruit de fond est calculé par le logiciel en sélectionnant une zone de 5000 millisecondes sans pic. Puis la valeur de la surface de cette zone est soustraite à l'ensemble des pics du chromatogramme. En parallèle et afin de calculer le rendement d'extraction, le sélénium total est quantifié pour ces échantillons avec l'isotope ^{80}Se en mode CCT de l'ICP-MS. La préparation des échantillons et le traitement des dosages pour le sélénium total sont décrits dans le chapitre II.4.

2. Spéciation des espèces sélénées par la spectroscopie d'absorption des rayons X

La spéciation des espèces sélénées dans les bactéries est réalisée par spectroscopie d'absorption des rayons X (SAX) au seuil K du sélénium, technique spectroscopique qui englobe les spectroscopies XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure) et EXAFS

(Extended X-ray Absorption Fine Structure). Le XANES permet de connaître l'environnement structural du sélénium dans la bactérie en caractérisant par exemple sa structure électronique (degré d'oxydation). L'EXAFS est utilisée pour apporter des informations supplémentaires sur les atomes entourant l'atome central de sélénium : nature et nombre d'atomes voisins, distances interatomiques.

Principe de la spectroscopie d'absorption des rayons X

La spectroscopie d'absorption des rayons X s'est développée à partir du milieu des années 1970 grâce au développement du rayonnement synchrotron, source multi-longueur d'onde (rayonnement blanc) et très brillante (très grand flux) de rayons X. Cette technique est basée sur l'effet photoélectrique résultant de l'interaction entre un photon X et la matière (figure 22A). Le coefficient d'absorption d'un élément décroît en fonction de l'énergie et présente des discontinuités brusques (seuils d'absorption). La position en énergie de ces seuils (notée E_0 sur la figure 22B) est liée à des transitions électroniques et est de ce fait caractéristique d'un élément donné. Les seuils K, L_I , L_{II} , L_{III} ... correspondent aux transitions d'un niveau de cœur 1s, 2s, 2p... vers un état vide situé au-dessus du niveau de Fermi. Cette transition électronique aboutit à l'émission d'un photoélectron. Quasi instantanément (temps caractéristique de l'ordre de 10^{-15} à 10^{-16} s), l'atome excité se relaxe avec la transition d'un électron d'une orbitale externe vers l'état excité d'énergie plus faible (orbitale interne), comblant ainsi la lacune créée. Cette relaxation conduit à l'émission soit d'un photon X dit « de fluorescence », soit d'un électron dit « Auger ». Les énergies de ces deux processus non-radiatifs ou radiatifs sont caractéristiques de chaque élément et permettent donc son identification. Dans notre cas, nous ne nous sommes intéressés qu'au processus de fluorescence (l'exploitation du processus Auger nécessite que l'échantillon soit sous vide). Pour que le processus d'absorption se produise, il faut que l'énergie du photon X soit supérieure ou égale à celle des premiers niveaux vides de l'atome, en dessous ou au dessus du niveau de Fermi.

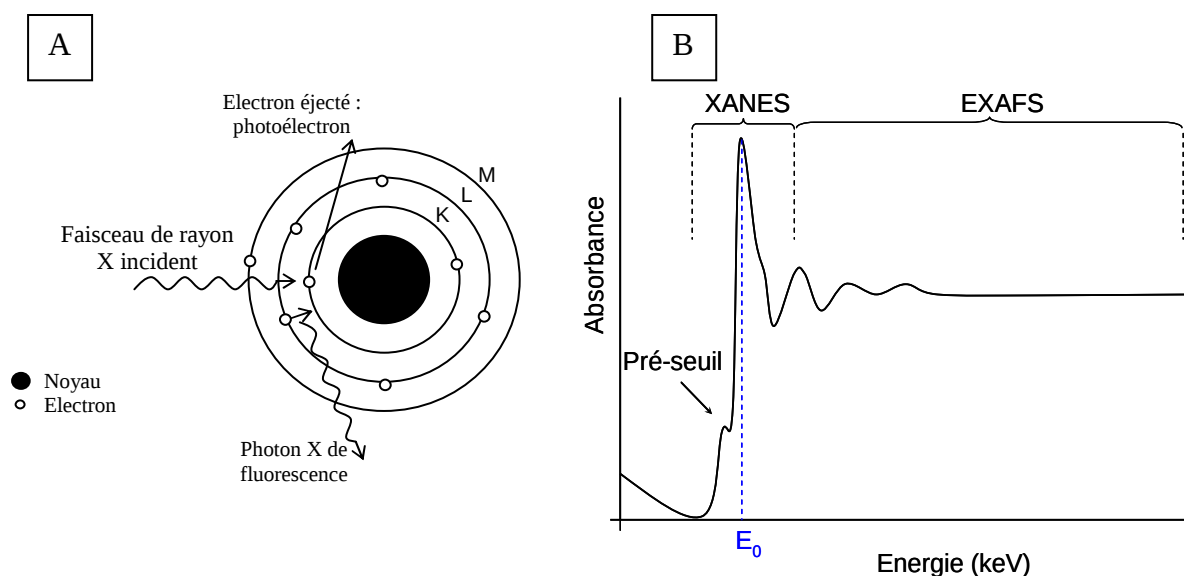


Figure 22 : effet photoélectrique (A) et spectre d'absorption des rayons X obtenu (B) schématisés. Le signal d'absorption X (B) se déduit de la mesure du coefficient d'absorption des rayons X. Ce coefficient, noté μ , est une fonction de l'énergie E des rayons X incidents et se calcule à partir des intensités mesurées des faisceaux incident et transmis selon une loi de type Beer-Lambert : $I = I_0 e^{-\mu x}$.

x est l'épaisseur de l'échantillon

I_0 correspond à l'intensité du faisceau incident

I correspond à l'intensité du faisceau transmis après traversée de l'échantillon.

Un spectre d'absorption X typique est montré en figure 22B. Sur ce spectre, on visualise les régions du pré-seuil, XANES et EXAFS, associées aux différents phénomènes physiques de l'électron excité.

Le pré-seuil correspond au domaine d'énergie du photon suffisant pour exciter un électron 1s de l'atome absorbeur mais restant cependant inférieur à l'énergie de seuil E_0 . Pour les métaux de transition, la couche électronique 3d étant incomplète, des « pré-pics » peuvent être présents. Dans ce cas, l'analyse dans ce domaine apporte des informations sur le degré d'oxydation de l'atome étudié. Pour le sélénium, le seuil K d'absorption ne présente aucun pré-pic.

La partie du spectre d'absorption, qui s'étend de quelques eV en dessous du seuil et jusqu'à environ 50 eV au delà est appelée spectre XANES. L'énergie absorbée par l'électron est suffisante pour que l'électron excité transite vers les couches électroniques supérieures de l'atome, 4s et 4p, et au-delà du niveau de Fermi. Le photoélectron émis a une énergie cinétique très faible et par-là même, un libre parcours moyen autour de l'atome central très important. Les interactions qui ont lieu vont donc être caractéristiques d'un ordre à grande distance. Le spectre XANES apporte ainsi des informations sur le degré d'oxydation de l'atome étudié (position du seuil...), sur la géométrie du site et sur le nombre de coordination de l'élément ainsi que sur la nature de ses voisins.

Au-delà du seuil d'absorption (domaine suivant les 50 premiers eV après le seuil), le photoélectron émis a une énergie cinétique grandissante, et par conséquent un libre parcours moyen de plus en plus limité. Les interactions qui ont lieu sont donc, dans cette région, caractéristiques d'un ordre local. L'interaction entre l'onde associée au photoélectron et les nuages électroniques des atomes voisins créent des interférences, constructives et destructives. Ces interférences conduisent à l'apparition des oscillations du coefficient d'absorption observées dans le domaine EXAFS. La fréquence des oscillations est corrélée à la longueur des distances interatomiques alors que leur amplitude transcrit la nature et le nombre d'atomes proches voisins, mais aussi décrit le désordre thermique et structural du système. Ainsi, la simulation du spectre EXAFS permet d'obtenir des informations sur le proche voisinage de l'atome central : distance entre l'atome et ses voisins (R), nombre (N) et nature des voisins.

Description de la ligne expérimentale utilisée

Les analyses sont réalisées sur la ligne de lumière FAME (BM30B), utilisant le rayonnement synchrotron de l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) à Grenoble. La ligne est équipée d'un monochromateur deux-cristaux en silicium (220) permettant de sélectionner la gamme d'énergie correspondant au seuil K du sélénium à partir du faisceau de rayons X polychromatique, et d'une optique focalisante permettant de concentrer les photons sur l'échantillon en un spot de 300 par 200 μm^2 (H x V). La qualité de l'optique permet d'avoir une résolution en énergie proche de la résolution intrinsèque des cristaux (0,65 eV au seuil K du sélénium).

En raison de la faible concentration en sélénium de nos échantillons, l'acquisition des spectres d'absorption des rayons X est effectuée en détection de fluorescence avec un détecteur solide résolu en énergie (Canberra, 30 éléments en germanium). Lorsque les échantillons sont concentrés, notamment pour les références, l'acquisition est réalisée en mode transmission avec un détecteur de type diode photoélectrique (figure 24). Les mesures sont effectuées soit à température ambiante (cf. figure 23A), soit à -260°C (à l'aide d'un cryostat à hélium liquide, cf. figure 23B) pour limiter les dégâts d'irradiation.

En fonction de la concentration en sélénium dans l'échantillon, plusieurs spectres sont enregistrés et sommés ; le temps d'acquisition est d'environ 10 minutes par spectre pour les acquisitions XANES et de 45 minutes par spectre pour les acquisitions EXAFS. Pour éviter une détérioration de l'échantillon sous le faisceau à température ambiante, la position du faisceau est déplacée entre chaque acquisition pour un même échantillon. Une calibration interne en énergie de la ligne est réalisée en enregistrant simultanément un spectre pour la référence de

sélénium élémentaire (Se^0) et un spectre pour l'échantillon. La référence de Se^0 gris est placée derrière l'échantillon (figure 23).

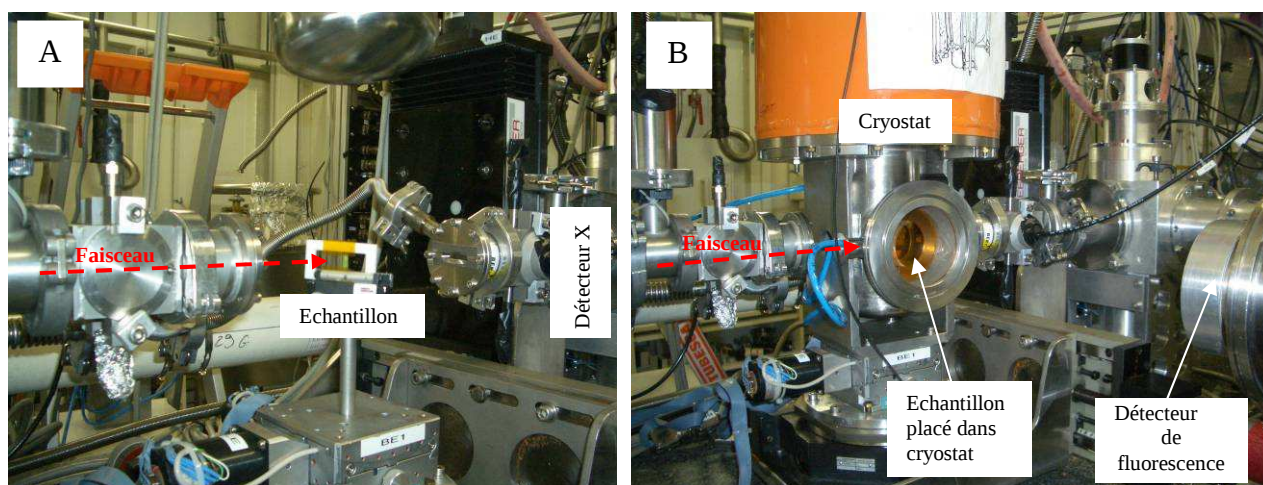


Figure 23 : la ligne de mesure FAME BM30B à l'ESRF de Grenoble. Analyse à température ambiante (A) et à -260°C sous hélium avec un cryostat (B).

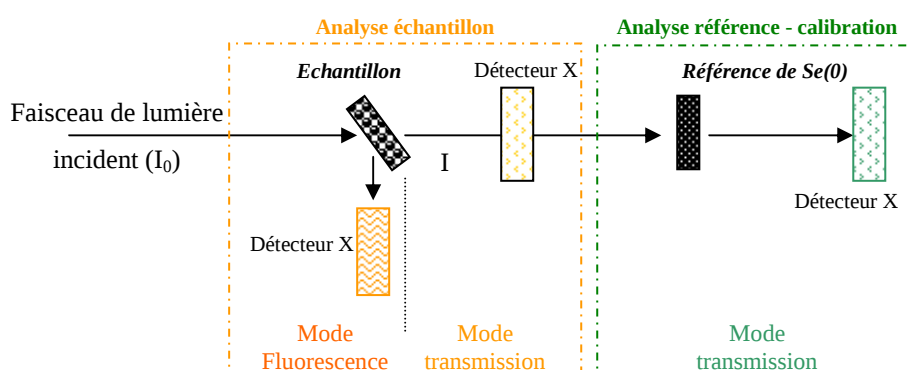


Figure 24 : schéma simplifié de la ligne de mesure FAME BM30B. L'échantillon peut être analysé en mode transmission ou fluorescence. La référence de sélénium placée derrière l'échantillon est analysée en seconde transmission. Les données enregistrées sont les intensités avant (I_0) et après échantillon (I) en fonction de l'énergie E . Ainsi, en mode fluorescence, le coefficient d'absorption est calculé par $\mu_x = I/I_0$ et en mode transmission, le calcul du coefficient est $\mu_x = \ln(I_0/I)$ où x est l'épaisseur de l'échantillon.

Préparation des échantillons pour les analyses XANES et EXAFS

Les échantillons analysés sont issus des prélèvements de culture décrits dans le paragraphe I.5.5. La figure 25 présente le protocole de préparation et d'analyse des échantillons. Les échantillons bactériens sont lyophilisés, homogénéisés et préparés sous forme de pastilles. L'homogénéisation de l'échantillon lyophilisé est une étape clé car elle permet d'améliorer le rapport signal sur bruit. Les échantillons lyophilisés ne sont pas modifiés puisque une étude précédente n'a pas montré de différence de spectres entre les culots frais et lyophilisés de *C. metallidurans* CH34 (Roux *et al.*, 2001).

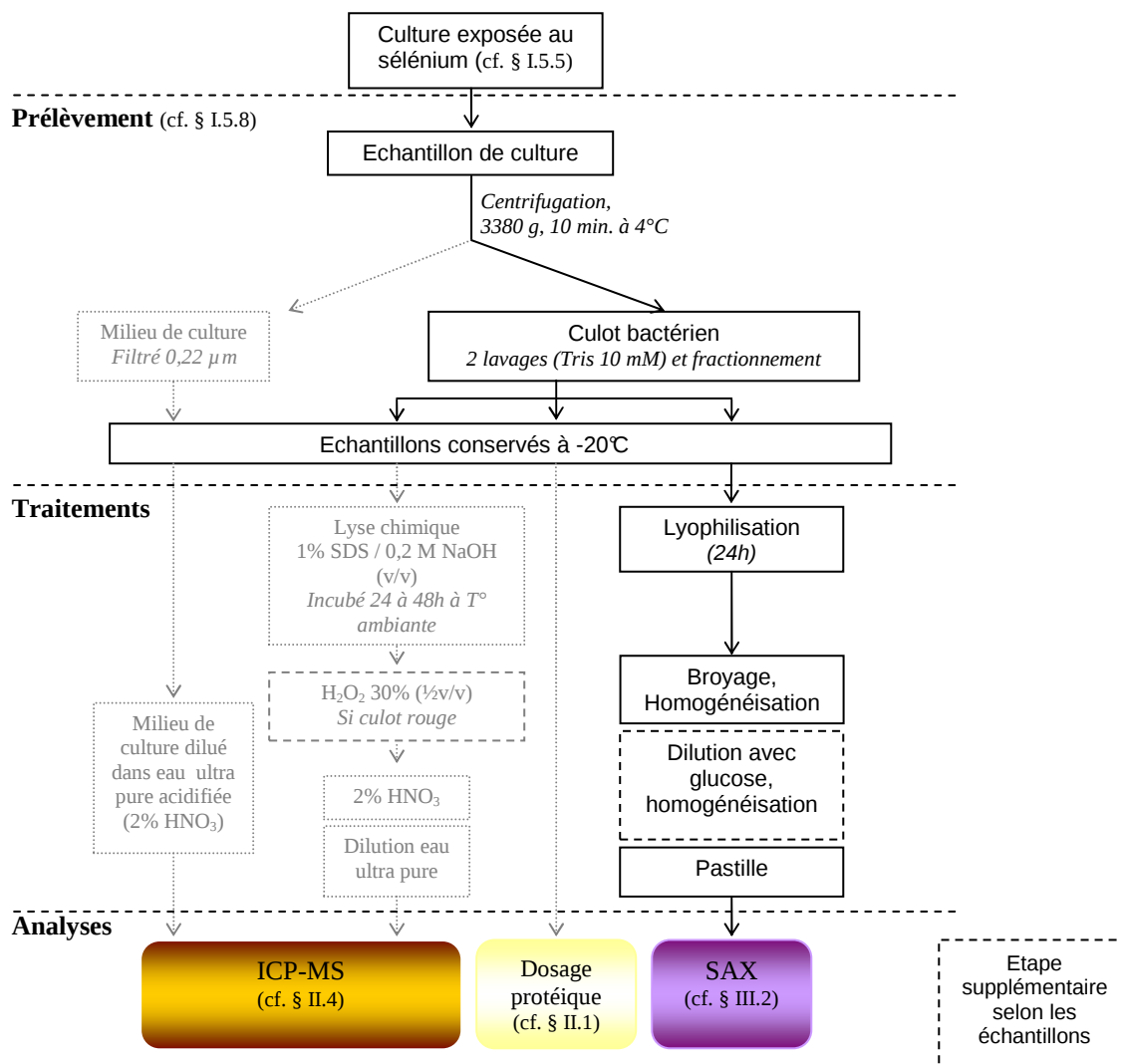


Figure 25 : protocole expérimental de préparation des échantillons pour l'analyse SAX. Le culot congelé est directement lyophilisé (Lyophilisateur Christ, Bioblock scientifique). Le culot de bactéries lyophilisé est réduit en une fine poudre dans un mortier en agate à l'aide d'un pilon et homogénéisé pendant au moins 20 minutes. Le culot peut être dilué avec du glucose (Sigma). L'homogénat obtenu est ensuite pressé en une pastille de 5 mm de diamètre (presse hydraulique manuelle et moule à pastilleuse 5 mm, SPECAC, USA et Royaume Uni) et conservé dans un pilulier en attendant les analyses par SAX. Le dosage du sélénium total indiqué dans les parties pointillées grises est décrit dans le paragraphe II.4.

Traitements des données expérimentales

Les spectres XANES

Avant de pouvoir traiter l'information des spectres XANES, ceux-ci sont calibrés et normalisés à l'aide du programme WinXAS (Ressler *et al.*, 2000) (figure 26).

Calibration

Chaque spectre est calibré en énergie grâce à l'enregistrement simultané du spectre d'absorption de la référence Se^0 . Cette étape permet de corriger la déviation interne de la ligne de mesure pour chaque spectre, en appliquant la valeur de la déviation de la valeur expérimentale du seuil d'absorption de la référence, positionnée derrière l'échantillon en seconde transmission, par rapport à la valeur théorique : la position du point d'inflexion au seuil K du sélénium élémentaire doit théoriquement être située à 12,6592 keV. Une fois la calibration réalisée, les 3 à 4 spectres X enregistrés pour un même échantillon sont comparés, sommés et moyennés. En pratique, les écarts de position de seuil à corriger n'ont jamais dépassés 0,5 eV.

Normalisation

Les spectres calibrés et moyennés sont normalisés en deux étapes. La normalisation débute par l'élimination du fond continu d'absorption avant-seuil en modélisant cette partie avec une fonction linéaire. Cette droite, soustraite au spectre, place ainsi la zone avant-seuil à la valeur d'absorbance zéro et redresse horizontalement le spectre (figure 26a). La deuxième étape consiste à modéliser l'après seuil avec une fonction polynomiale du troisième degré plaçant l'ensemble du spectre à une valeur d'absorbance de 1 (figure 26b).

Exploitation des données spectrales

Les spectres XANES calibrés et normalisés (figure 26c) sont exploités grâce à la comparaison avec une base de données de spectres de composés séléniés de référence préalablement constituée. Les spectres d'absorption de ces composés de référence sont enregistrés dans les mêmes conditions. Les composés de référence, présentés dans le tableau 10, ont été obtenus chez Sigma-Aldrich sauf pour le sélénium élémentaire rouge, obtenu à partir d'une culture de *C. metallidurans* CH34 et pour le sélénodigluthation, synthétisé *in vitro* (cf. tableau 10 et § II.5).

Dans les échantillons où plusieurs espèces sont présentes, le nombre de composés constituant principalement le mélange (composés principaux) est estimé à l'aide d'un outil

statistique, l'analyse en composante principale. L'ensemble des spectres d'une cinétique (composé de plus de 10 spectres) est donc traité avec le programme statistique PCA (Principal Component Analysis). Pour une cinétique donnée, le programme propose une reconstruction du signal expérimental en utilisant 1, 2, 3 ou un nombre supérieur de composés et permet de les identifier en simulant le signal à partir de spectres de composés de référence. Le nombre de composés principaux est déterminé en se basant sur la valeur « eigenvalue » de chaque composé et sur la qualité de reconstruction des spectres en utilisant 1 ou plusieurs composés de la base de données.

Pour une description détaillée de la PCA appliquée aux données XANES, le lecteur pourra se reporter aux travaux de T. Ressler (Ressler *et al.*, 2000).

Connaissant le nombre d'espèces dans chaque cinétique, les espèces composant le mélange sont identifiées par combinaison linéaire. Le pourcentage de chaque espèce est déterminé par la combinaison linéaire de chaque spectre en utilisant les données des spectres de référence. La combinaison linéaire est effectuée avec le programme EXAFS Linear least-squares fit, combinations1 (LCF, National Instruments). Ces pourcentages sont ensuite multipliés par la quantité de sélénium total, déterminée par ICP-MS, dans le but d'obtenir des concentrations d'espèces dans l'échantillon bactérien (mg d'espèces sélénées par g de protéines).

La qualité de reconstruction du signal est évaluée par une valeur appelée en anglais « normalized sum-squares residuals » (*NSS total*) et définie par la relation suivante :

$$Total\ NSS = \sum_{spectra} \sum_i [\mu_{exp.} - \mu_{reconst.}]^2 / \sum_{spectra} \sum_i [\mu_{exp.}]^2 \cdot 100$$

où μ est l'absorbance normalisée (μ_{exp} correspond à l'absorbance du spectre XANES expérimental et $\mu_{reconst}$ à l'absorbance du spectre reconstruit). Les principaux composés sont identifiés par la « target transformation » en utilisant le critère *NSS* suivant :

$$NSS = \sum_i [\mu_{exp.} - \mu_{reconst.}]^2 / \sum_i [\mu_{exp.}]^2 \cdot 100$$

Plus la valeur du *NSS* est faible, plus la simulation est proche du signal expérimental ; c'est pourquoi nous choisissons de conserver les simulations dont la valeur de *NSS* associée est inférieure à 1.10^{-3} .

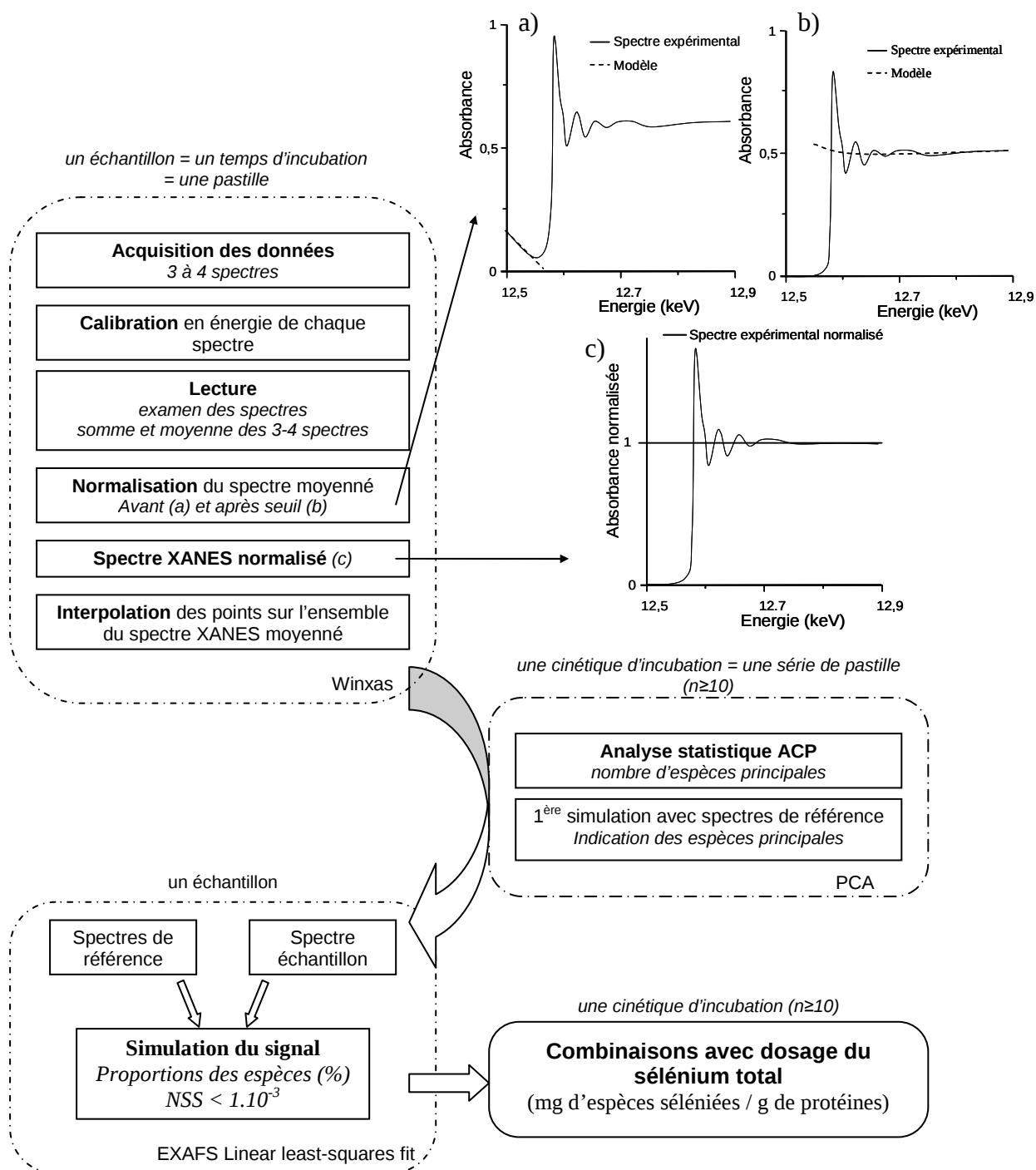


Figure 26 : méthodologie de traitement des spectres XANES.

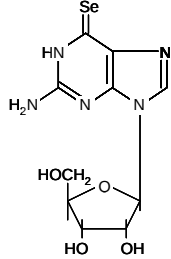
Formes	Noms	Etats d'oxydations	Formules chimiques ou moléculaires
inorganiques	sélénium élémentaire hexagonal gris*	(0)	Se
	sélénium élémentaire rouge**	(0)	Se
	sulfure de sélénium	(0)	SeS ₂
	séléniat de sodium	(+VI)	Na ₂ SeO ₄
	sélénite de sodium	(+IV)	Na ₂ SeO ₃
	dioxyde de sélénium	(+IV)	SeO ₂
	diméthyle séléniure	(-II)	CH ₃ SeCH ₃
	sélénourée		$\begin{array}{c} \text{Se} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{NH}_2 \end{array}$
organiques	séléénométhionine	(-II)	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{CSeCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \end{array}$
	Se méthyle L-sélenocystéine		$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{CSeCH}_2\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \end{array}$
	DL-sélenocystine		$\begin{array}{c} \text{O} \quad \quad \quad \text{O} \\ \quad \quad \quad \\ \text{HO}-\text{C}-\text{CHCH}_2\text{SeSeCH}_2\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \quad \quad \quad \\ \text{NH}_2 \quad \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$
	sélenocystamine		H ₂ NCH ₂ CH ₂ SeSeCH ₂ CH ₂ NH ₂
	sélenodiglutathion***		GS-Se-SG
	6-sélenoguanosine		

Tableau 10 : liste des composés de sélénium de référence

* Référence utilisée également pour la calibration en énergie de la ligne.

** Le sélénium élémentaire rouge a été obtenu à partir d'une culture de *C. metallidurans* CH34 après 10 jours d'exposition au sélénite.

*** Le sélenodiglutathion a été préparé par G. Sarret selon le protocole décrit par Ganther (Ganther, 1968).

Les spectres EXAFS

Le protocole de traitement des analyses EXAFS est présenté sur la figure 27. Les différentes étapes nécessaires à l'exploitation de ces analyses EXAFS sont brièvement décrites ci après (Hazemann et Proux, 2004). Le signal EXAFS, noté $\chi(E)$, correspond à la composante oscillante du coefficient d'absorption :

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

où $\mu(E)$ est le coefficient d'absorption de l'élément dans sa matrice (mesuré) et $\mu_0(E)$ le coefficient d'absorption atomique de ce même élément (dédit de la mesure comme on va le voir par la suite). Une formulation complexe permet, après différentes approximations, de déterminer les paramètres structuraux caractérisant le voisinage de l'atome absorbeur. Le traitement des résultats expérimentaux est réalisé à l'aide du programme SEDM (Aberdam, 1998).

Extraction du signal EXAFS

Le signal EXAFS est extrait en normalisant d'abord le spectre avec le programme (cf. figure 27). Ce traitement consiste d'abord à éliminer le fond continu d'absorption du signal avant le seuil et à simuler l'absorption atomique ($\mu_0(E)$) de l'élément absorbant par une courbe ajustée pour passer au milieu des oscillations EXAFS. Ainsi, une fonction de type « spline cubique » est soustraite au signal d'absorption. Les oscillations EXAFS sont exprimées en fonction du vecteur d'onde associé au photoélectron émis (k , en $\text{\AA}^{-1}$), la conversion d'unité ayant lieu après détermination de l'énergie de seuil E_0 (pris de façon arbitraire au point d'inflexion du seuil) :

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

où m_e est la masse de l'électron. Le signal EXAFS total $\chi(k)$ est alors obtenu : il correspond à la somme des contributions de toutes les paires atomiques dans un rayon de 1,5 à 7 $\text{\AA}$ (en fonction de la cristallinité) autour de l'atome absorbeur.

A ce niveau, deux solutions s'offrent à nous pour analyser les spectres obtenus : le signal expérimental est comparé à un signal EXAFS de référence et si la superposition des signaux suffit à apporter des éléments de réponse, alors l'analyse s'arrête à ce niveau. En revanche, si cette étape ne permet pas de répondre à nos attentes, l'analyse du signal se poursuit

par l'étape suivante, c'est-à-dire son filtrage par la transformée de Fourier pour pouvoir le simuler à l'aide du programme d'analyse.

Filtrage du signal par la transformée de Fourier directe et inverse

Le signal EXAFS total est représenté en fonction du vecteur d'onde de l'espace des k , c'est-à-dire que toutes les contributions ou interférences destructives et constructives des différentes couches atomiques sont visualisées. Pour pouvoir décorréliser chaque contribution, la transformée de Fourier du signal permet de passer de l'espace des vecteurs d'onde k (en $\text{\AA}^{-1}$) à l'espace réel des distances R (en $\text{\AA}$). Cette transformation permet de séparer les différentes contributions au signal EXAFS total.

Le calcul de la transformée de Fourier conduit à l'obtention de deux fonctions : l'une correspond à la partie imaginaire et l'autre à la partie réelle du signal. Généralement et pour une meilleure lisibilité, on représente le module de cette fonction, aussi appelé pseudo-fonction de distribution radiale (FDR). La FDR obtenue présente des pics qui correspondent aux fréquences des différentes contributions au signal total. Avec beaucoup de précautions, chaque pic peut être grossièrement associé à une couche d'atomes localisé à une certaine distance de l'atome absorbeur. Pour aller plus loin et obtenir des informations qualitatives (nature des atomes voisins) et quantitatives (différents paramètres structuraux), il est nécessaire d'effectuer des simulations de chacune de ces contributions, que l'on peut isoler par transformée de Fourier inverse, en sélectionnant notamment le premier pic correspondant à la première couche atomique. Un signal EXAFS partiel, noté $\chi_p(k)$, est obtenu dans l'espace des k .

Simulation

Le signal EXAFS partiel obtenu est modélisé pour extraire les paramètres structuraux N_i (nombre de voisin de nature i), R_i (distance entre l'atome absorbeur et l'atome i rétrodiffuseur), σ_i (facteur de Debye-Waller) et ΔE (écart entre le seuil d'absorption du composé et la valeur du seuil choisie pour le calcul). Cette modélisation est en général effectuée en utilisant des fonctions théoriques décrivant la phase et l'amplitude des signaux, en fonction de la nature chimique des atomes voisins. Pour valider la procédure (extraction, choix des phases et amplitudes...), les signaux des composés de référence sont modélisés, tous les paramètres étant alors connus. Les spectres des échantillons peuvent être alors ajustés.

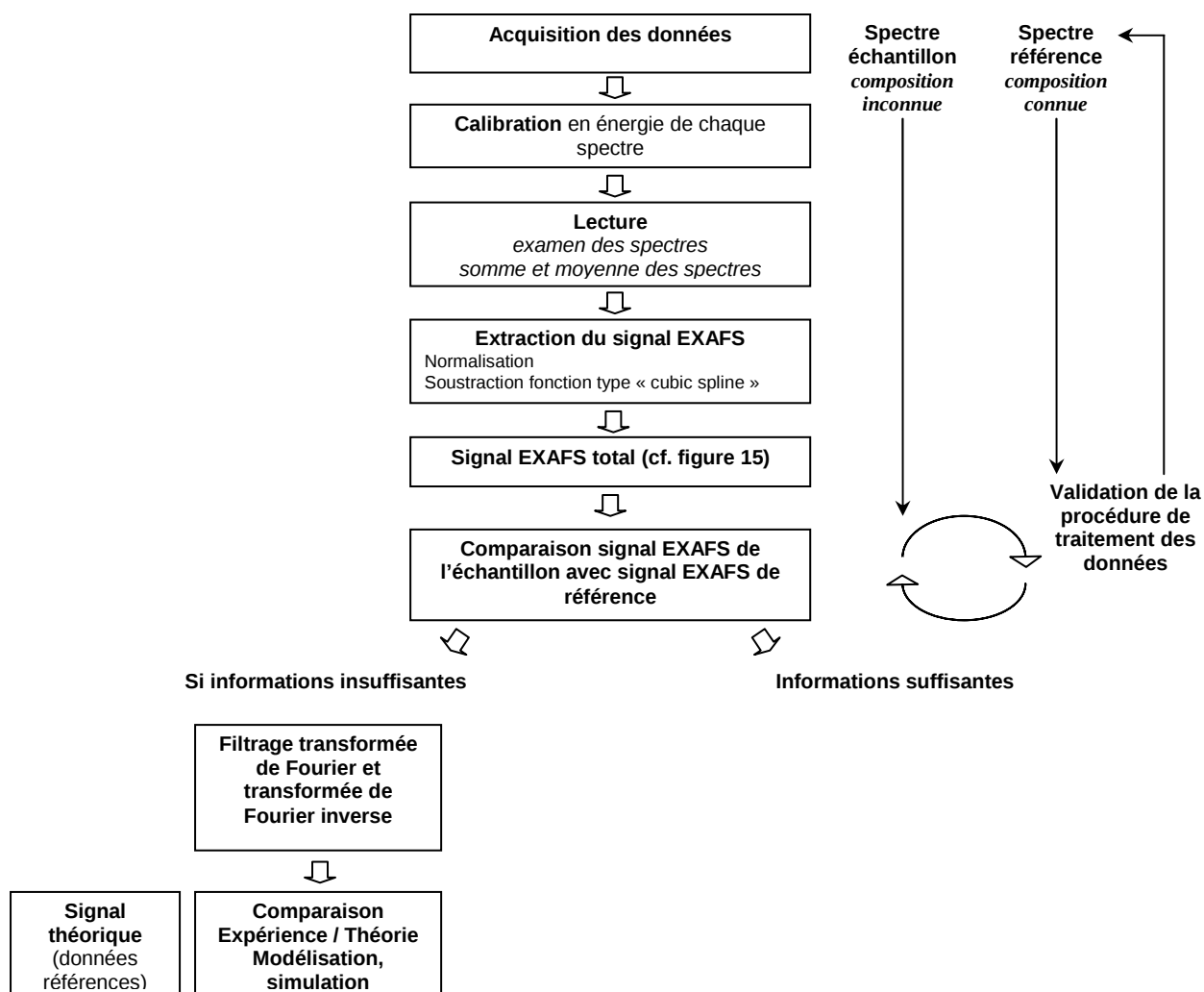


Figure 27 : méthodologie de traitement des spectres EXAFS avec le programme SEDEM.

3. Recherche de protéines sélénées par SDS-PAGE-PIXE

La figure 28 présente une vue d'ensemble du protocole mis en place pour la recherche de protéines sélénées chez *C. metallidurans* CH34.

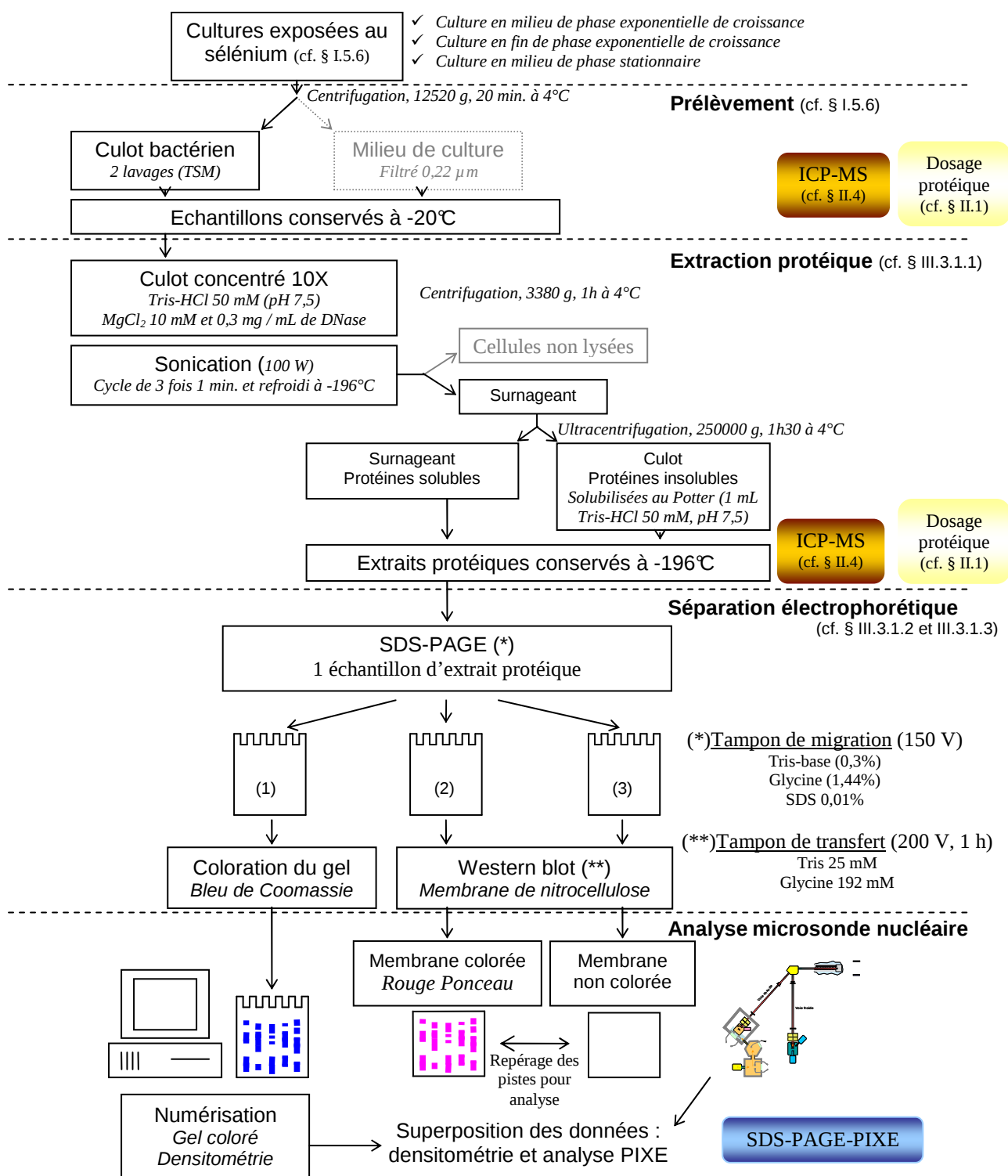


Figure 28 : protocole de préparation et d'analyse des extraits protéiques.

3.1. Séparation électrophorétique de protéines extraites de culots bactériens

3.1.1. Extraction des protéines insolubles (protéines membranaires) et solubles (protéines périsplasmiques et cytoplasmiques)

Les extraits protéiques solubles et insolubles sont préparés à partir des culots obtenus dans le paragraphe I.5.6 et comme rappelé en figure 28. Les culots bactériens sont décongelés à température ambiante puis lysés par sonication (Bioblock Scientific Vibra Cell 71408, 3 fois 1 minute, amplitude 35%). Les lysats bactériens obtenus sont centrifugés afin d'éliminer les cellules non lysées. Ensuite par ultracentrifugation (Beckman Optima LE-80K, rotor 50.2Ti), le surnageant contenant les protéines solubles extraites est récupéré, aliquoté et conservé à -196°C. Le culot contenant les protéines insolubles membranaires est repris dans le tampon Tris par broyage mécanique au Potter. Puis, la suspension obtenue est aliquotée et conservée à -196°C.

Les extraits protéiques solubles et insolubles obtenus sont caractérisés par leur quantité de protéines et leur concentration en sélénium (dosage protéique cf. § II.1 et analyses ICP-MS cf. § II.4).

3.1.2. Gel d'électrophorèse en condition dénaturante (SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Au contraire des autres métaux, le sélénium est lié aux protéines de façon covalente et il ne sera pas perdu lors de la migration dans les conditions dénaturantes. Les protéines solubles et insolubles extraites sont dénaturées par un chauffage de 5 minutes à 100°C dans du tampon de dénaturation sans bleu de bromophénol (Tris 10 mM pH 8,4 ; SDS 2,6 % (v/v) ; β -mercaptoéthanol 5 % (v/v), glycérol 10 % (v/v)). Le β -mercaptoéthanol réduit les ponts disulfures entre les cystéines, alors que le SDS rompt les interactions intra- et inter-protéiques en les chargeant négativement : les protéines sont linéarisées par dénaturation de leurs structures tertiaires et quaternaires. Le bleu de bromophénol est omis car le signal de fluorescence X du brome qu'il contient interfère avec le signal du sélénium pour l'analyse PIXE (raies du brome : $K\alpha = 11,9$ keV et $K\beta = 13,3$ keV et raies du sélénium : $K\alpha = 11,2$ keV et $K\beta = 12,5$ keV).

Les fractions dénaturées sont ensuite déposées sur un gel de polyacrylamide contenant du SDS selon le protocole de Laemmli (Laemmli, 1970). Un gel de polyacrylamide 12% est

choisi pour la séparation des protéines entre 14 et 90 kDa : une réticulation adéquate du gel est obtenue par un mélange d'acrylamide et de bis-acrylamide dans le rapport 37,5:1. Les compositions du gel de séparation et du gel de concentration sont données dans le tableau 11.

A		B	
	Gel de séparation 12% (pH 8,8)		Gel de concentration 5% (pH 6,8)
Acrylamide/bis-acrylamide (30%)	2,4 mL	Acrylamide/bis-acrylamide (30%)	0,85 mL
Tris (1M) pH 8,8	1,8 mL	Tris (1M) pH 6,8	0,78 mL
Glycérol (50%)	1,8 mL	Eau distillée	3,4 mL
SDS (10%)	60 µL	SDS (10%)	50 µL
TEMED	4 µL	TEMED	4 µL
APS (100 mg/mL)	30 µL	APS (100 mg/mL)	25 µL
Volume total	6 mL		2 mL

Tableau 11 : compositions du gel de séparation (A) et du gel de concentration (B). Le système mini PROTEAN 3 (Bio-Rad) permet de couler le gel de polyacrylamide (dimension du gel : 9 cm x 7 cm ; épaisseur : 0,75 mm). Le gel de séparation (12%) est surmonté d'un gel de concentration (5%). Ce système est discontinu dans la composition du tampon et du pH. Cette discontinuité permet de concentrer d'abord l'échantillon dans une zone constituée par le gel de concentration avant d'être séparé dans un gel de séparation à plus petits pores.

La fixation d'un grand nombre de molécules de SDS apporte une charge négative globale telle que la charge propre de chaque protéine devient négligeable. Les peptides chargés migrent dans le gel lors du passage d'un courant électrique constant de 150 V et 30 mA pendant 90 min dans le tampon de migration (cf. figure 28). Le gel joue un rôle de tamis, séparant les molécules selon leur poids moléculaire. La masse apparente des peptides est évaluée grâce au calibrage du gel par des protéines de poids moléculaire connu. Un marqueur de poids moléculaire coloré commercial (BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder, Invitrogen) est utilisé afin de suivre la migration des peptides.

Un même échantillon est déposé sur 3 gels (cf. figure 28). Après migration, le gel (1) est coloré 15 à 20 minutes dans une solution de bleu de Coomassie (Bleu de Coomassie R250 0,1% (w/v), méthanol (20% (v/v)) et acide acétique (0,5% (v/v)) puis décoloré 1 à 2 heures dans le tampon de décoloration (éthanol 30% (v/v), acide acétique 5% (v/v)). Ce gel de polyacrylamide coloré est numérisé et analysé en densitométrie au moyen du système GelDoc avec le programme Quantity One (Bio-Rad). Les gels (2) et (3) ne sont pas colorés. Ils sont directement transférés sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad) et serviront aux analyses ultérieures.

3.1.3. Transfert sur membranes de nitrocellulose (Western blot)

Il est difficile de travailler directement sur les gels de protéines qui résistent mal au faisceau lors de l'analyse PIXE. De plus, les protéines sont diluées dans l'épaisseur du gel et des interférences de matrice sont possibles lors de l'analyse (cf § III.3.2). C'est pourquoi les protéines du gel de polyacrylamide non coloré sont directement transférées sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad). Le transfert s'effectue grâce au système de transfert Mini Trans-Blot (Bio-Rad) (cf. figure 29). Le système permet de transférer deux gels en même temps. Après assemblage des éléments du système de transfert, les protéines du gel sont transférées vers la membrane de nitrocellulose grâce au champ électrophorétique. Pour éviter les risques d'échauffement, le tampon de transfert est refroidi. Les deux transferts obtenus sur membrane de nitrocellulose sont rincés avec de l'eau ultra-pure. L'un des deux transferts est conservé non coloré pour l'analyse par PIXE. Le second transfert est coloré 5 à 10 minutes avec du rouge Ponceau (Sigma) pour contrôler l'efficacité du transfert (cf. figure 28).

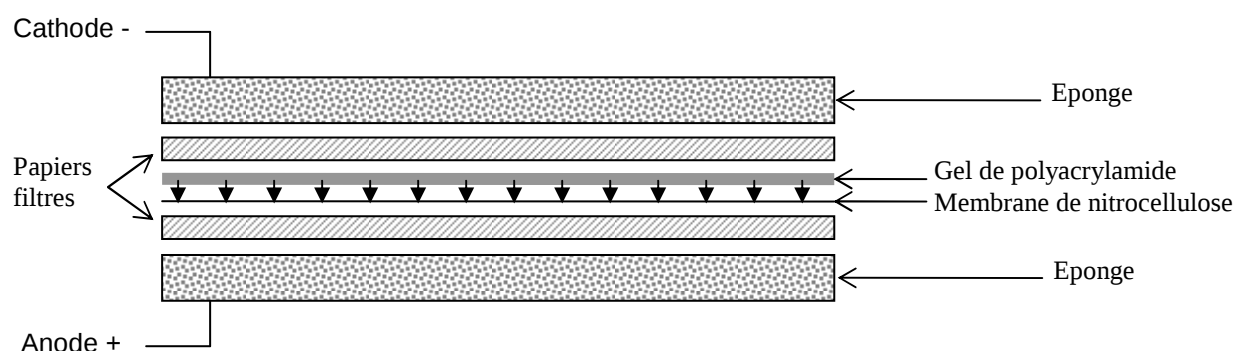


Figure 29 : schéma du système de transfert électrophorétique d'un gel de polyacrylamide vers une membrane de nitrocellulose (Western blot). Les protéines, chargées négativement avec le SDS, vont migrer vers l'anode (les flèches indiquent le sens de migration sur le schéma). Le système est composé par 2 éponges, 2 papiers filtres et 1 membrane de nitrocellulose (tous ces éléments sont de la taille du gel). L'ensemble des éléments est équilibré préalablement avec le tampon de transfert (cf. figure 28).

3.2. Analyse du transfert SDS-PAGE par PIXE

Le sélénium dans les extraits protéiques préalablement séparés par électrophorèse en condition dénaturante (cf. § III.3.1) est détecté à l'aide de la méthode d'analyse par fluorescence X induite par un faisceau de particules chargées (PIXE, Particle induced X-ray Emission) à la microsonde nucléaire du Laboratoire Pierre Süe en collaboration avec Hicham Khodja, responsable de l'instrument. La microsonde nucléaire est un outil d'analyse non destructif permettant la caractérisation chimique élémentaire à l'échelle du micromètre d'éléments mineurs et de traces de l'échantillon (Khodja H. *et al.*, 2001). Ainsi, le couplage des

techniques de séparation SDS-PAGE et de détection PIXE permet de tracer le profil de répartition de sélénium *in situ* dans les bandes protéiques bactériennes.

Principe de la technique PIXE

Le principe de la méthode repose sur la détection et la caractérisation de la fluorescence X émise par l'interaction d'un microfaisceau d'ions légers avec les atomes composant l'échantillon. En comparaison avec la fluorescence X induite par le rayonnement synchrotron, dans le cas de la microsonde nucléaire, le faisceau incident est composé d'ions légers (principalement protons, deutérons, particules alphas). C'est pourquoi le phénomène de fluorescence, décrit précédemment (cf. § III.2), est brièvement rappelé dans ce paragraphe. Un électron d'une couche profonde (K) peut être éjecté lorsque la fraction de l'énergie de la particule incidente qui lui est transférée est supérieure à son énergie de liaison. Pour ioniser efficacement le sélénium, une énergie de 3 MeV est utilisée. Pour revenir à son état fondamental, l'atome se désexcite par des transitions électroniques en cascade. La libération de l'excédent d'énergie (typiquement la différence d'énergie de liaison entre la couche finale et initiale) peut prendre deux formes : l'une radiative, correspond à l'émission d'un rayonnement X caractéristique de l'élément, appelée fluorescence X, l'autre non radiative aboutissant à l'éjection vers le continuum d'un électron de la même couche, il s'agit ici de l'effet Auger. Le processus radiatif est schématisé en figure 30. Dans le cas du sélénium, les transitions $K\alpha$ et $K\beta$ sont visibles sur le spectre X aux énergies respectives de 11,2 et 12,5 keV.

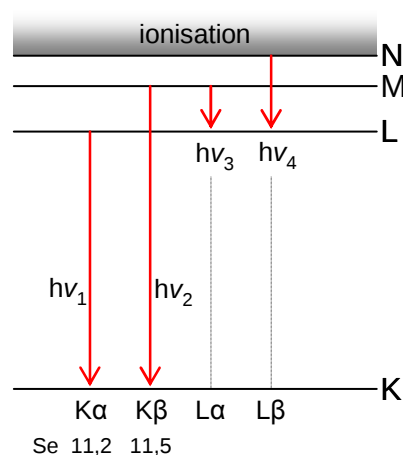


Figure 30 : schéma simplifié montrant l'origine de quelques transitions de fluorescence. Les différentes transitions possibles sont représentées sur ce schéma suite à la réorganisation des électrons de l'atome en conséquence du départ d'un électron de la couche K. Cette réorganisation fait naître des photons de fluorescence caractérisés par une valeur d'énergie spécifique égale à la différence d'énergies entre les deux niveaux de transition considérés.

Les valeurs d'énergie pour le sélénium utilisées pour sa détection PIXE sont indiquées en dessous des raies correspondantes (keV). Les valeurs d'énergie des raies L sont trop faibles pour être visibles sur le spectre X.

L'obtention du signal se fait par la collecte des rayons X émis par l'échantillon cible à l'aide d'un détecteur de rayons X. Les spectres de rayons X permettent d'identifier tous les éléments autres que légers ($Z > 14$) présents dans l'échantillon. L'intensité du spectre est proportionnelle au flux incident (mesuré en Coulomb). Un écran peut être placé devant le détecteur afin de stopper les particules chargées rétrodiffusées et d'atténuer les rayons X des éléments légers non recherchés responsables d'un bruit de fond qui peut s'avérer important.

Description du dispositif expérimental

La figure 31 décrit brièvement le dispositif expérimental de la microsonde nucléaire du Laboratoire Pierre Süe. Pour une description détaillée de la microsonde nucléaire, le lecteur pourra se reporter aux techniques de l'ingénieur (Berger et Revel, 2005).

Lors de l'analyse, le détecteur est distant du porte échantillon de 21 mm. L'écran placé devant l'entrée du détecteur correspond à un collimateur de diamètre 6,06 mm et un filtre de mylar de 200 μm d'épaisseur. Afin de pouvoir quantifier l'analyse PIXE, la charge totale de l'irradiation de l'échantillon est mesurée simultanément au niveau de l'échantillon en fixant une feuille de carbone derrière le dispositif du porte échantillon. La feuille de carbone joue le rôle d'une cage de Faraday. L'ensemble du dispositif expérimental est maintenu sous un vide d'environ 10^{-6} hPa pour éviter la perte du faisceau par interaction avec les molécules gazeuses résiduelles.

Au cours de nos expériences, le faisceau de protons a une taille estimée de 200 μm de largeur par 50 μm de hauteur. Le faisceau irradie l'échantillon en le balayant verticalement sur 1500 μm (hauteur) par 800 μm (largeur) avec un pas de 50 μm (x) par 50 μm (y). Ainsi, le rectangle d'irradiation du faisceau est déplacé verticalement tous les 1580 μm le long de l'axe de migration des extraits protéiques sur la membrane de nitrocellulose. L'acquisition du signal X de chaque scan est réalisée avec le programme MPAWIN (Daudin *et al.*, 2003).

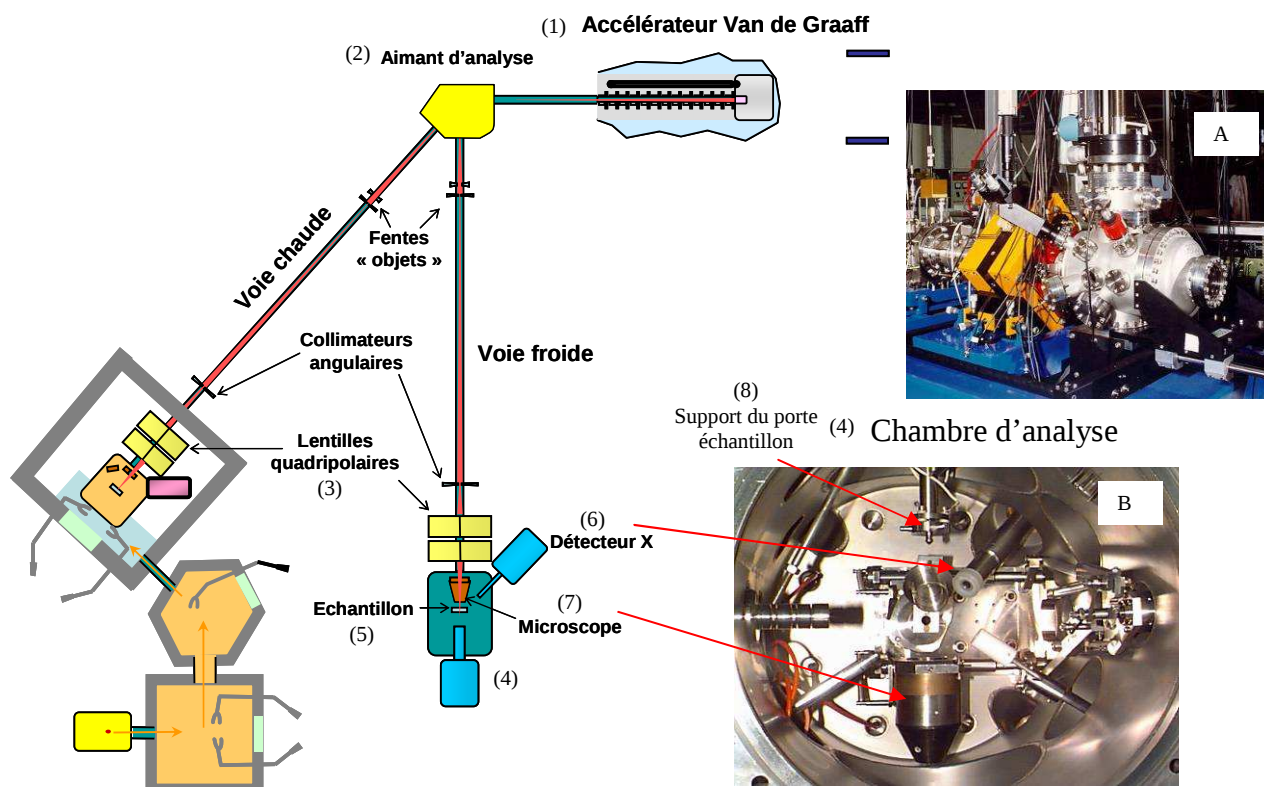


Figure 31 : schéma et images de la microsonde nucléaire du Laboratoire Pierre Süe (CEA/CNRS Saclay, Laboratoire Pierre Süe). La chambre d'analyse est visualisée de l'extérieur (A) et de l'intérieur (B). Le faisceau de protons de 3 MeV est produit par un accélérateur de particules de type Van de Graaff (1). Le faisceau de protons accélérés est ensuite dirigé à l'aide d'un électro-aimant vers l'une des deux voies d'analyses disponibles (2), puis mis en forme et focalisé sur l'échantillon à analyser grâce à un système de lentilles (3). La chambre d'analyse (4) renferme le porte échantillon (5) et le détecteur de rayons X (6). Un microscope optique permet de repérer et d'observer la zone irradiée (7). L'optique amovible n'est pas activée en figure 31B. Le porte échantillon n'est pas en place dans la chambre en figure 31B ; il se fixe verticalement (8).

Préparation des échantillons

Les membranes des transferts d'extraits de protéines non colorés sont directement analysées par microanalyse PIXE. Pour cela, la membrane de nitrocellulose est collée avec des pastilles adhésives de carbone sur le porte échantillon.

Traitements des données expérimentales

Le traitement des données expérimentales est réalisé en définissant la région d'intérêt (ROI, Region of interest) de la raie $K\alpha$ du sélénium sur le spectre X. Le signal correspondant au scan de la zone est affiché en 2D. Ensuite, en sélectionnant la zone scannée, on retrace le profil de coups de sélénium sur la hauteur de chaque scan. Chaque profil est alors combiné dans un fichier pour retracer l'ensemble du profil de sélénium sur la longueur de la migration des protéines séparées en fonction de leurs poids moléculaires. Après avoir supprimé le bruit de fond, le nombre de coups de sélénium obtenus par l'analyse PIXE est ensuite rapporté à la concentration en sélénium de l'extrait.

IV. Microscopie électronique

1. Analyse de structures par microscopie électronique à transmission (MET)

La microscopie électronique à transmission (MET) est largement exploitée dans le domaine des sciences de la vie notamment pour l'observation de structures cellulaires. Les observations des échantillons sont réalisées avec la collaboration de Jéril Degrouard et Danielle Jaillard, à l'aide d'un microscope Philips EM 208 (Centre Commun de Microscopie Electronique, UMR 8080, CNRS/université Paris XI à Orsay) (figure 32). Les observations sont réalisées sous une tension d'accélération maximale de 80 kV, une résolution théorique de 0,1 nm et un grossissement maximal de 180000 fois. La numérisation des images est réalisée grâce à une caméra numérique bas niveau de lumière, modèle AMT Advantage HR3 (Capteur CCD 1,3 millions de pixels, 1024 x 1024) piloté par le logiciel d'acquisition AMT Image Capture Engine.

Principe de la technique de microscopie électronique à transmission

La figure 32 décrit le fonctionnement du microscope électronique. Dans son principe, la microscopie électronique ressemble à la microscopie photonique à la différence que le faisceau lumineux (photons) du microscope optique est remplacé par un faisceau convergent d'électrons. L'image observée est le résultat de l'interaction des électrons traversant l'échantillon plus ou moins denses : les électrons traversant une région dense de l'échantillon seront stoppés ou déviés et l'image de la zone sur l'écran fluorescent apparaîtra sombre, en revanche les électrons traversant une zone peu dense seront transmis et l'image de la zone sera

claire sur l'écran fluorescent. L'image visible et agrandie de l'échantillon sur l'écran fluorescent est formée par la focalisation du faisceau d'électrons ayant traversé l'échantillon au moyen des lentilles électromagnétiques.

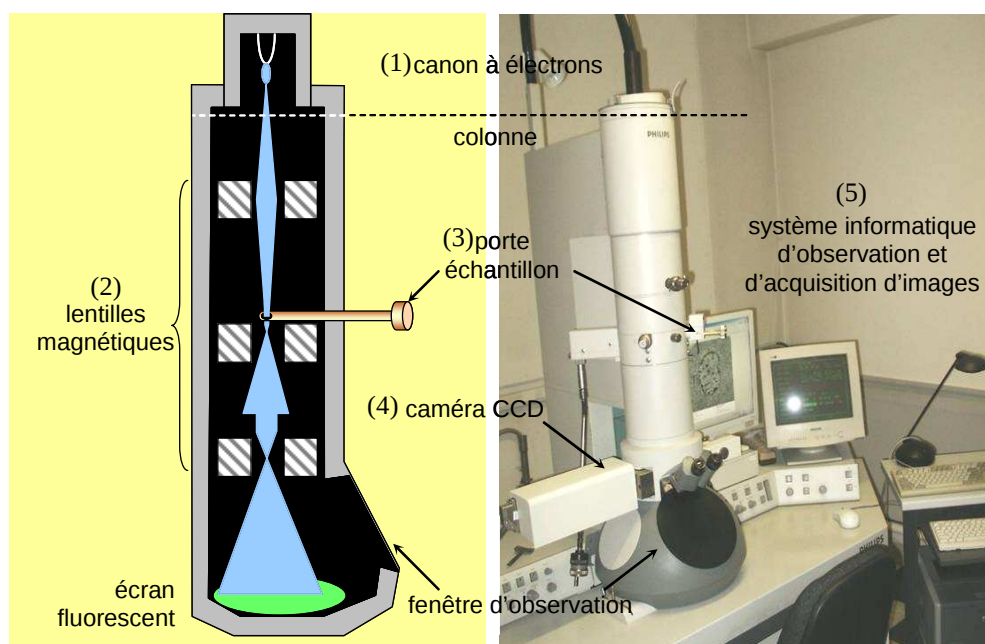


Figure 32 : schéma simplifié d'un microscope électronique à transmission (adapté de Prescott et al., 1995) et microscope électronique Philips EM 208, CCME Orsay. Le faisceau d'électrons est généré par un filament de tungstène chauffé dans le canon à électrons au sommet de la colonne centrale du microscope (1). Le faisceau d'électrons est accéléré par une différence de potentiel de 80000 Volts. Il est ensuite dirigé et focalisé par un double condenseur, constitués par des lentilles électromagnétiques (2), sur la préparation de coupes ultrafines de l'échantillon au niveau du porte échantillon (3). L'ensemble de la colonne est maintenu sous un vide poussé pour éviter une déviation des électrons par collision avec les molécules gazeuses. Le microscope électronique est équipé d'une caméra numérique (4) permettant d'observer et de numériser les images obtenues à l'aide d'un programme de traitement et d'analyse d'image (5).

Préparation des échantillons

Coupes ultrafines de cellules

La colonne sous vide et la transmission du faisceau du microscope électronique à transmission imposent une préparation particulière de l'échantillon car les électrons sont facilement absorbés et diffractés par la matière solide. Ainsi, seules de très fines coupes de l'échantillon peuvent être observées. En général, l'échantillon doit avoir une épaisseur comprise entre 20 et 100 nm d'épaisseur, soit environ $1/50^{\text{ème}}$ à $1/10^{\text{ème}}$ du diamètre moyen d'une bactérie.

L'obtention des aliquots bactériens issus des cultures exposées au sélénium est décrite dans le paragraphe I.5.7. La figure 33 expose le protocole de traitement des prélèvements réalisé en plusieurs étapes comprenant la double fixation chimique, la déshydratation,

l'inclusion dans une résine et la réalisation de coupes ultrafines par ultramicrotomie. Chacune des étapes est expliquée ci-après. Les produits chimiques utilisés sont obtenus chez Sigma, Electron Microscopy Sciences et Agar Scientific.

Etape de fixation et post-fixation chimique

Cette première étape a pour but d'immobiliser les bactéries dans un état aussi voisin que possible de celui du vivant. La double fixation chimique est utilisée par immersion liquide d'abord avec le glutaraldéhyde dans le tampon cacodylate de sodium 0,1 M (pH 7,2) puis avec le tétr oxyde d'osmium. L'échantillon bactérien est immédiatement fixé après son prélèvement à température ambiante. L'échantillon fixé avec le glutaraldéhyde peut être conservé pendant quelques jours à 4°C dans le tampon cacodylate contenant 4,1% de sucrose (0,12 M) en attendant la totalité des prélèvements durant une cinétique de croissance. Dans ce cas, le culot fixé est rincé quinze minutes dans le tampon cacodylate avant l'étape de post-fixation. Afin de pouvoir manipuler aisément l'échantillon sans perdre des cellules, le culot bactérien fixé et post-fixé est enrobé dans de l'agarose inerte.

Etape de déshydratation

L'échantillon est progressivement déshydraté afin de l'inclure dans une résine non hydrosoluble. Pour cela, l'échantillon est immergé dans des bains successifs d'éthanol en concentrations croissantes. Chaque incubation est agitée par un roller (5 rpm).

Etape d'imprégnation

Avant d'inclure l'échantillon dans une résine d'Epon (Epoxy 812), il est imprégné dans des bains successifs de solvant hexaméthylphosphoramide (HMPA) et d'éthanol puis de HMPA et d'Epon. Le solvant HMPA remplace progressivement l'éthanol, lequel est non miscible avec l'Epon. L'imprégnation de l'échantillon est réalisée à température ambiante par une table d'agitation à 150 rpm.

Etape d'inclusion

L'échantillon est inclus dans l'Epon pur contenant 2% d'accélérateur benzyldiméthylamine (BDMA) dans des moules en caoutchouc. 3 à 5 blocs de résine sont préparés pour un même échantillon. La résine polymérise à 60°C.

Etape d'ultramicrotomie

L'échantillon contenu dans le bloc de résine est préparé pour les coupes ultrafines avec le système de façonnage EM trim Leica. Les coupes sont réalisées avec un ultramicrotome LEICA EM FC6 équipé d'un couteau diamant Diatome pour obtenir des coupes ultrafines de 70 nm à 90 nm d'épaisseur (cf. figures 34 et 35). Pour observer les coupes au microscope électronique, elles sont déposées sur une grille en cuivre (200 mesh) préalablement ionisée sous ultra-violet (au moins 20 minutes). Les coupes sont contrastées avec des solutions contenant les métaux lourds uranium et plomb. Pour cela, les coupes sont incubées 15 minutes dans de l'acétate d'uranyle 5% aqueux à l'obscurité. Après un rinçage à l'eau ultra-pure (résistivité $> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$), elles sont ensuite incubées 5 minutes dans le tampon Reynolds contenant du citrate de plomb.

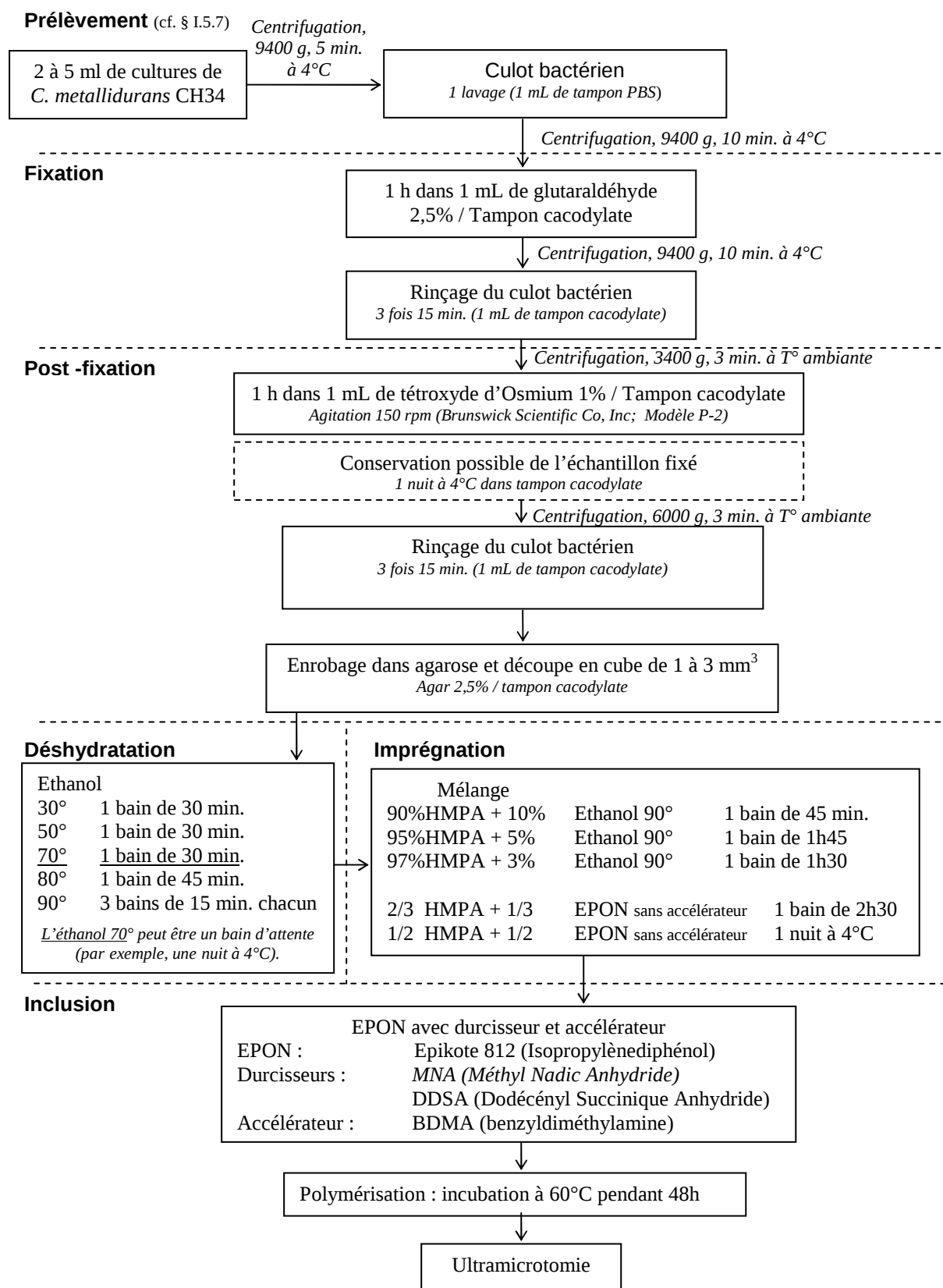


Figure 33 : protocole de préparation des inclusions pour l'ultramicrotomie.

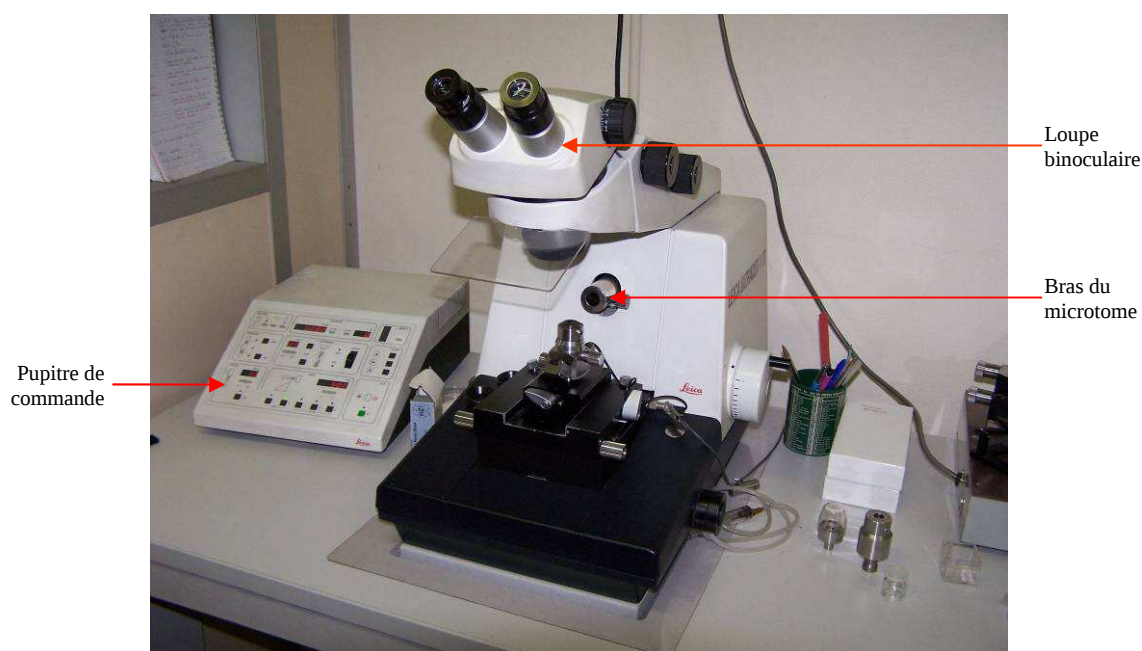


Figure 34 : ultramicrotome LEICA EM FC6 du CCME d'Orsay.

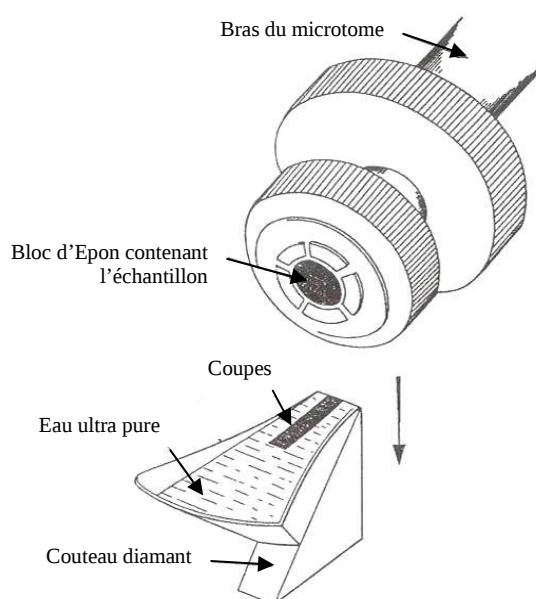


Figure 35 : préparation de coupes d'échantillons pour l'observation par microscopie électronique à transmission.

Cellules entières

Il est possible d'observer l'échantillon bactérien directement sans inclusion et coupe ultrafine. Des prélèvements réguliers d'une culture exposée à 2 mM de sélénite sont déposés sur une grille de cuivre (400 mesh) avec un film Formvar recouvert d'une couche de carbone. Après séchage de l'échantillon, la coloration négative permet de contraster l'échantillon grâce à une solution de phosphotungstate 1% à pH 7,25. Le tungstène est un métal lourd, opaque aux

électrons et la solution ne réagit pas avec la matière organique. Après séchage de la grille, elle est observée par microscopie électronique à transmission.

Les particules de sélénium élémentaire rouge

La suspension de particules de sélénium élémentaire rouge d'origines abiotique et biologique est déposée sur une grille de cuivre (400 mesh) avec un film de Formvar recouvert d'une couche de carbone. Les observations au MET sont directes sans inclusion et sans coloration.

2. Analyses chimiques par MET équipée d'un spectromètre de dispersion d'énergie (MET-EDX)

Les analyses sont réalisées avec le microscope Jeol 1200 EX équipé d'une détection EDX au Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie et à la Géologie (CMEABG) par Albert Perrat à l'université Claude Bernard de Lyon. Ces analyses ont été complétées par la microanalyse réalisée avec le microscope Jeol JEM 2100 F équipé d'une détection EDX au Laboratoire de Minéralogie-Cristallographie de l'Institut de Physique du Globe (IPG), UMR 7590, CNRS/universités Paris VI et Paris VII par Nicolas Menguy et François Guyot.

Principe de la technique

L'interaction des électrons et de l'échantillon dans le microscope électronique à transmission provoque l'émission de rayons X dont l'énergie est caractéristique de l'atome excité. Le microscope électronique est couplé avec une sonde EDX permettant de détecter l'émission des rayons X. L'analyse X permet ainsi d'obtenir la composition élémentaire de l'échantillon à l'échelle globale de la bactérie ou dans une particule intracellulaire.

Préparation de l'échantillon

Les échantillons préparés et décrits dans le chapitre III.1 sont les mêmes pour l'analyse X. La différence dans la préparation se situe à l'étape d'ultramicrotomie. Pour l'analyse EDX, les coupes ont une épaisseur de 100 nm et elles ne sont pas contrastées. Elles sont déposées sur une grille en cuivre préalablement recouverte d'un film de Formvar. Elles sont éventuellement carbonées.

V. Analyses statistiques

Les données présentées correspondent pour la plupart des expériences à la moyenne arithmétique de 3 réplicats dont les barres d'erreurs indiquent l'écart-type de cette moyenne. La comparaison des données est effectuée par des tests d'analyse de variance à un facteur (utilitaire d'analyse ANOVA, Microsoft Excel 2003). Dans un même groupe statistique, une différence significative est indiquée comme suit : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Résultats et discussion

Cette partie s'articule autour de 4 chapitres dans chacun desquels les résultats sont d'abord présentés puis discutés. Le premier chapitre présente l'étude de la résistance au sélénite et au séléniate de *C. metallidurans* CH34 dans nos conditions de culture. Puis les capacités d'accumulation du sélénium dans les bactéries et de consommation de sélénium du milieu de culture en fonction de divers paramètres de cultures sont présentées dans le deuxième chapitre. Les résultats obtenus sur la prise en charge des oxyanions avec la souche sauvage et les mutants résistants au sélénite sont présentés puis discutés dans le troisième chapitre. Le quatrième chapitre présente l'étude de la transformation du sélénite et du séléniate chez la souche sauvage et chez les mutants résistants au sélénite. L'ensemble de ces résultats conduira à préciser les mécanismes de résistance aux oxyanions de sélénium mis en jeu chez *C. metallidurans* CH34, micro-organisme modèle et candidat pour les procédés de bioremédiation.

RESULTATS CHAPITRE I

I. RESISTANCE DE *C. metallidurans* CH34 AUX OXYANIONS DE SELENIUM

Les cultures bactériennes en milieu liquide, sans apport de milieu frais au cours de l'incubation, c'est-à-dire en système fermé appelé « culture en batch », conduisent à une diminution de la quantité d'éléments nutritifs au cours de la croissance et à une augmentation de la quantité de déchets au cours du temps. La courbe de croissance des bactéries, représentée par la densité cellulaire (absorbance à 600 nm) en échelle logarithmique en fonction du temps est alors divisée en quatre phases distinctes : la phase de latence, la phase exponentielle de croissance, la phase stationnaire et enfin la phase de déclin.

Les paramètres caractéristiques de cette croissance comme le temps de latence, la vitesse de croissance au cours de la phase exponentielle et la densité cellulaire maximale, précisés selon les conditions de culture et d'exposition au sélénium, permettent de définir les capacités de résistance de la souche et apportent des indications quant aux mécanismes de résistance mis en jeu. Pour cela, les courbes de croissance de *C. metallidurans* CH34 sont suivies après exposition à différentes concentrations en sélénium.

1. Effets du sélénite sur la croissance de *C. metallidurans* CH34 et détermination de la CMI

1.1. Effets du sélénite sur la croissance de la souche sauvage

Les courbes de croissance des cultures de *C. metallidurans* CH34 dans le milieu TSM en absence de sélénium et en présence de concentrations variables de sélénite sont présentées sur la figure 36. Le temps de latence et la vitesse de croissance ont été déterminés à partir de ces courbes. Les résultats sont présentés sur la figure 37. Les effets du sélénite sur la croissance bactérienne se traduisent par des perturbations dans les différentes phases de croissance en comparaison avec la culture témoin.

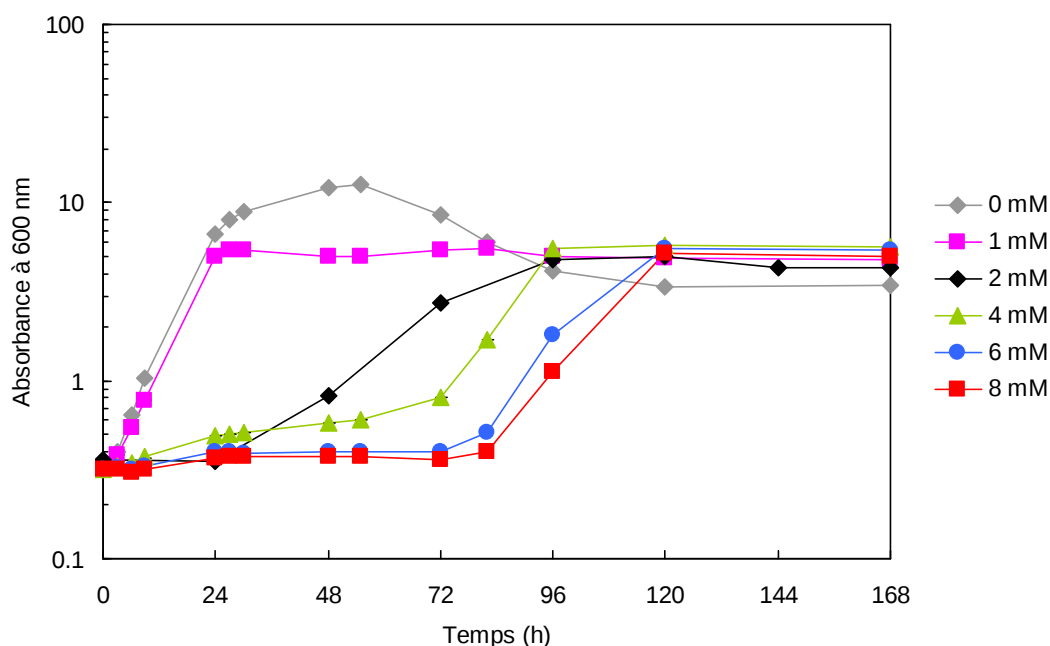


Figure 36 : courbes de croissance de *C. metallidurans* CH34 en fonction de la concentration en sélénite. La croissance est suivie par mesure de l'absorbance à 600 nm au cours du temps. Le sélénite est ajouté au moment de l'ensemencement lorsque l'absorbance à 600 nm est de 0,3 ($t = 0$ heure). La barre d'erreur correspond à la déviation standard de la moyenne de 3 mesures d'absorbance. Le suivi de croissance est stoppé lorsque les cultures sont en fin de phase stationnaire.

La phase de latence

A la concentration de 1 mM, nous observons une courte phase de latence de 9 heures précédant la phase exponentielle de croissance, puis la durée de la phase de latence s'allonge lorsque la concentration en sélénite présent dans le milieu de culture augmente. Par exemple, à des concentrations supérieures à 4 mM de sélénite, nous observons une longue phase de latence de 72 à 82 heures précédant la phase exponentielle de croissance. Afin de vérifier si dans ces conditions, la souche bactérienne a muté, la méthode de vérification d'une mutation ou d'une adaptation, décrite par M. Roux (Roux *et al.*, 2001) a été appliquée. Le principe de cette méthode repose sur l'observation de la durée de la phase de latence après deux expositions au sélénite alternées par un passage en milieu sans sélénium, c'est-à-dire sans pression de sélection. En réalisant ces expériences pour chacune des expositions de 1 à 8 mM de sélénite, la durée du temps de latence est similaire pour les cultures exposées à 1 et 2 mM de sélénite. Ces résultats montrent qu'à ces concentrations, la phase de latence correspond à un phénomène d'adaptation. Nous avons observé une diminution de la durée du temps de latence pour les cultures exposées à des concentrations supérieures à 4 mM. Par exemple, la culture exposée à 4 mM de sélénite présente un temps de latence deux fois plus court entre la première et la seconde exposition au sélénium (36 heures au lieu de 72 heures) (résultats non montrés). Ce résultat suggère la mutation aléatoire de la souche à partir d'une exposition à 4 mM de sélénite

permettant la survie de la souche. Cette diminution à partir de 4 mM a été observée pour deux séries d'expérience.

La phase de croissance exponentielle

A partir de 1 mM de sélénite, la vitesse de croissance diminue lorsque la concentration en sélénite augmente. Elle atteint un plateau à $0,1 \text{ h}^{-1}$ pour des concentrations supérieures à 2 mM. La vitesse de croissance des bactéries en présence de 2 à 8 mM de sélénite est divisée par 3 par rapport à celle des bactéries cultivées en absence de sélénite (par exemple, à 6 mM de sélénite, la vitesse de croissance est de $0,13 \text{ h}^{-1}$ versus $0,38 \text{ h}^{-1}$).

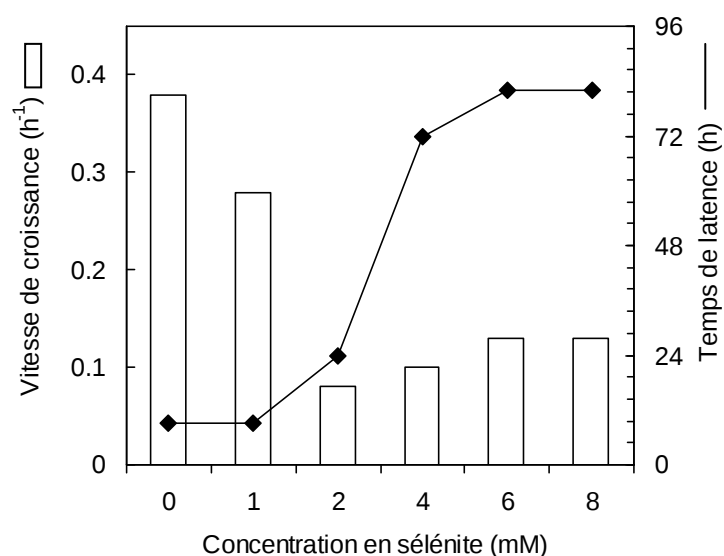


Figure 37 : vitesse de croissance et temps de latence en fonction de la concentration en sélénite dans le milieu de culture. La vitesse de croissance durant la phase exponentielle et le temps de latence sont déterminés à partir des courbes de croissance des cultures présentées sur la figure 48.

La phase stationnaire

La densité cellulaire maximale atteinte en phase stationnaire, lorsque les bactéries sont cultivées en présence de sélénite, est divisée par 2 par rapport à celle des bactéries cultivées en absence de sélénium : l'absorbance à 600 nm maximale atteinte en phase stationnaire est proche de $12 \pm 0,1$ pour la culture témoin alors qu'elle est en moyenne de $5,4 \pm 0,5$ en présence de sélénite.

1.2. Effets du sélénite sur la croissance des souches mutantes résistantes au sélénite

Une étude précédente a montré que les souches mutantes RM6, RM7 et RM8, avec lesquelles nous travaillons, résistent jusqu'à 15 mM de sélénite. Ces mutants sont caractérisés par l'absence d'une protéine appartenant à la famille DedA, protéine suspectée être impliquée dans le transport du sélénite (Ledgham *et al.*, 2005). Dans ces expériences, la caractérisation phénotypique des mutants résistants au sélénite a été réalisée dans le milieu TSM à 0,2% de

gluconate, contenant 1, 2 et 5 mM de sélénite. Nous vérifions ici les capacités de résistance des souches mutantes dans nos conditions de culture : les bactéries sont cultivées dans le milieu TSM à 2% de gluconate contenant 2 et 10 mM de sélénite. Le comportement des souches mutantes RM6 et RM7 est similaire à celui de RM8. La croissance de la souche mutante RM8, en présence et en absence de sélénite, est présentée et comparée à celle de la souche sauvage (figure 38).

En absence de sélénite, les vitesses de croissance des souches mutante et sauvage sont similaires (respectivement 0,27 et 0,26 h⁻¹) et les densités cellulaires maximales atteintes sont identiques. Le petit temps de latence observé pour la culture de la souche mutante en absence de sélénium est lié aux conditions de repiquage.

La phase de latence

En présence de 2 mM de sélénite, on note l'absence de phase de latence pour la souche mutante contrairement à la souche sauvage. A 10 mM de sélénite, la souche mutante présente une phase de latence d'une durée équivalente à celle de la souche sauvage exposée à 2 mM (environ 24 heures).

La phase exponentielle de croissance

La vitesse de croissance de la souche mutante RM8 diminue d'environ 24% entre les expositions 2 et 10 mM de sélénite (respectivement, 0,21 et 0,16 h⁻¹). A titre de comparaison, la vitesse de croissance de la souche sauvage diminue de 64% entre les expositions 1 et 2 mM de sélénite. Cette vitesse de croissance reste supérieure à celle de la souche sauvage en présence de 2 mM de sélénite.

La phase stationnaire

La densité cellulaire maximale des mutants en phase stationnaire est diminuée de plus de la moitié, comme précédemment observé avec la souche sauvage (figure 36).

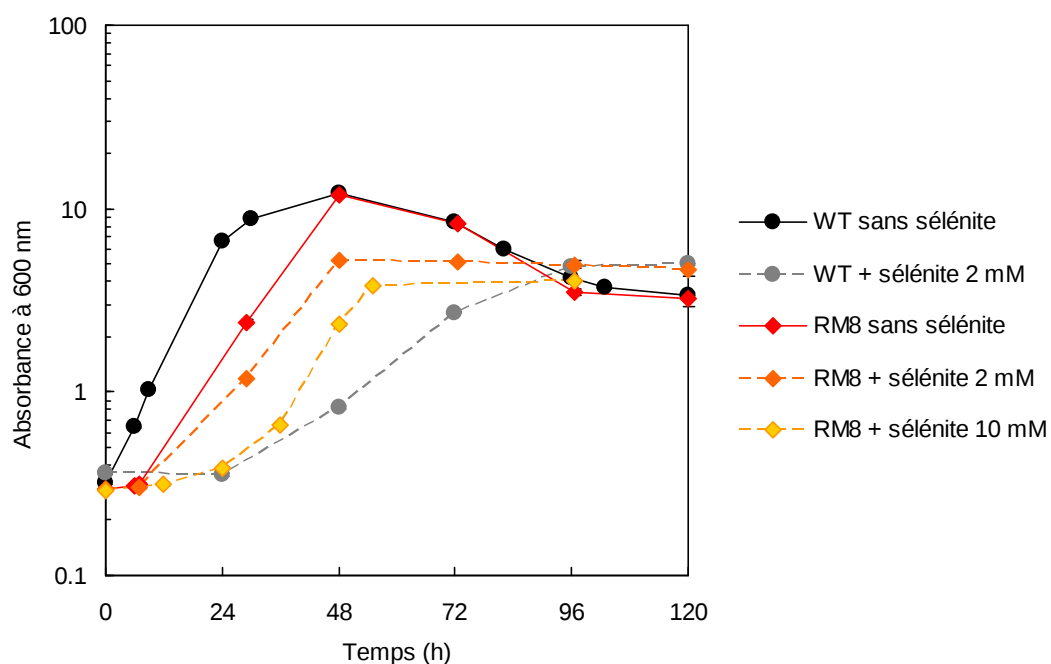


Figure 38 : croissance de la souche mutante (RM8) et de la souche sauvage (WT) en absence et en présence de sélénite. Le sélénite est ajouté au moment de l'ensemencement lorsque l'absorbance à 600 nm est de 0,3 ($t = 0$ heure). La barre d'erreur correspond à la déviation standard de la moyenne de 3 mesures d'absorbance.

Enfin, afin de comparer la résistance à un stress sélénite de la souche sauvage et des mutants, la viabilité bactérienne est précisée en dénombrant les bactéries viables sur milieu solide après culture en milieu liquide, à différents temps d'exposition au sélénite. Des cultures témoins (souche sauvage et mutant) sans sélénium sont réalisées en parallèle pour calculer le pourcentage de cellules vivantes après un stress au sélénite par rapport aux cellules témoins cultivées en absence de sélénium. Les résultats, présentés sur la figure 39, montrent qu'après 48 heures d'exposition à 2 mM de sélénite, il y a environ 2 fois moins (55%) de bactéries mutantes viables par rapport aux bactéries mutantes cultivées sans sélénium. Il y a environ 3 fois moins (33%) de bactéries sauvages viables par rapport aux bactéries sauvages cultivées sans sélénium. Cette différence de viabilité entre les souches mutante et sauvage au temps d'exposition 48 heures est significative ($p < 0,01$). Ces résultats montrent une résistance au stress sélénite de la souche mutante RM8 supérieure à celle de la souche sauvage.

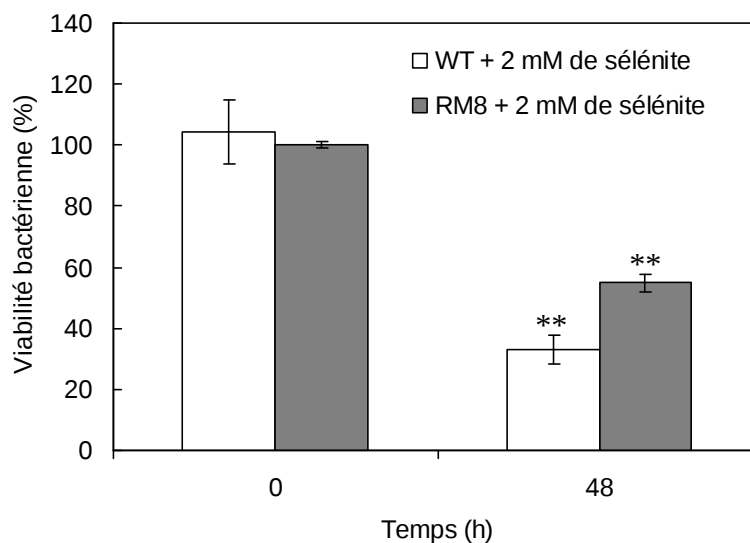


Figure 39 : viabilité bactérienne exprimée en pourcentage de cellules viables par rapport à une culture contrôle sans sélénium au cours de la croissance de la souche mutante RM8 et de la souche sauvage exposée à 2 mM de sélénite. Le pourcentage de cellules viables est calculé par le rapport du nombre de cellules viables (UFC / mL, Unité Formant Colonie par mL) en présence de 2 mM de sélénite sur le nombre de cellules viables sans sélénium. Le sélénite est ajouté lors de l'inoculation à une absorbance à 600 nm de 0,3. La barre d'erreur correspond à la déviation standard de la moyenne de 3 mesures.

****Les pourcentages de viabilité à 48 heures d'exposition sont significativement différents entre les souches mutante et sauvage en présence de sélénite ($P < 0,01$).**

1.3. La résistance chez la souche sauvage

La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée en milieu TSM liquide contenant 2% de gluconate (figure 40) et confirmée par la méthode de mesure de sensibilité en "patch test " (figure 41). Les deux méthodes indiquent une sensibilité de la souche à partir de 4 mM de sélénite dans le milieu de culture au moment de l'exposition.

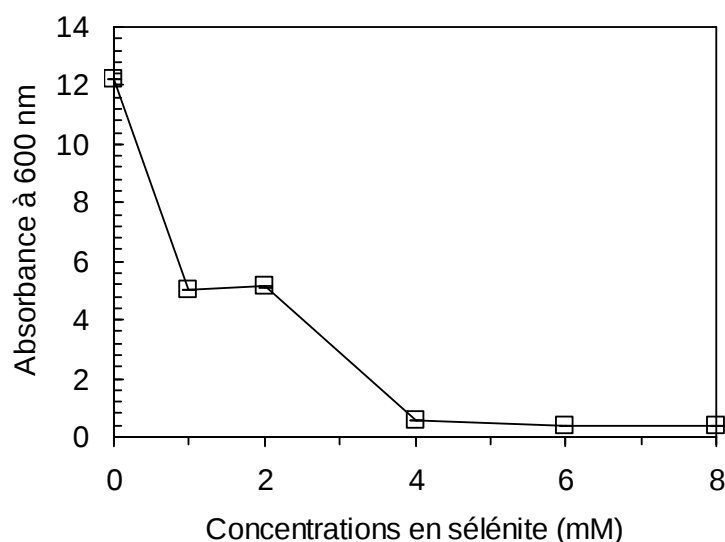


Figure 40 : détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour le sélénite. La CMI est déterminée par lecture de l'absorbance à 600 nm dès que la culture témoin atteint la phase stationnaire. La barre d'erreur correspond à la déviation standard de 3 mesures.

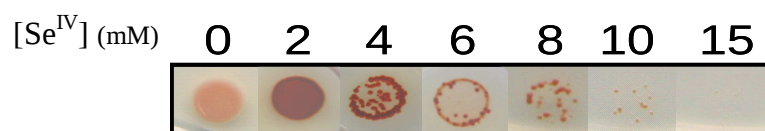


Figure 41 : résistance de *C. metallidurans* CH34 en fonction d'une gamme de concentrations de sélénite en milieu solide selon la méthode de "patch test". 5 μ L de la culture de *C. metallidurans* CH34 cultivée en milieu liquide TSM sans sélénium jusqu'en milieu de phase exponentielle sont déposés sur des géloses TSM contenant des concentrations croissantes en sélénite. L'observation de tapis cellulaire est réalisée après 5 jours d'incubation à 29 °C.

2. Effets du séléniate sur la croissance de *C. metallidurans* CH34 et détermination de la CMI

2.1. Effets du séléniate sur la croissance de la souche sauvage

Les courbes de croissance de *C. metallidurans* CH34 exposée à des concentrations variables de séléniate sont présentées sur la figure 42. Le temps de latence et la vitesse de croissance ont été déterminés à partir de ces courbes et les résultats sont présentés sur la figure 43.

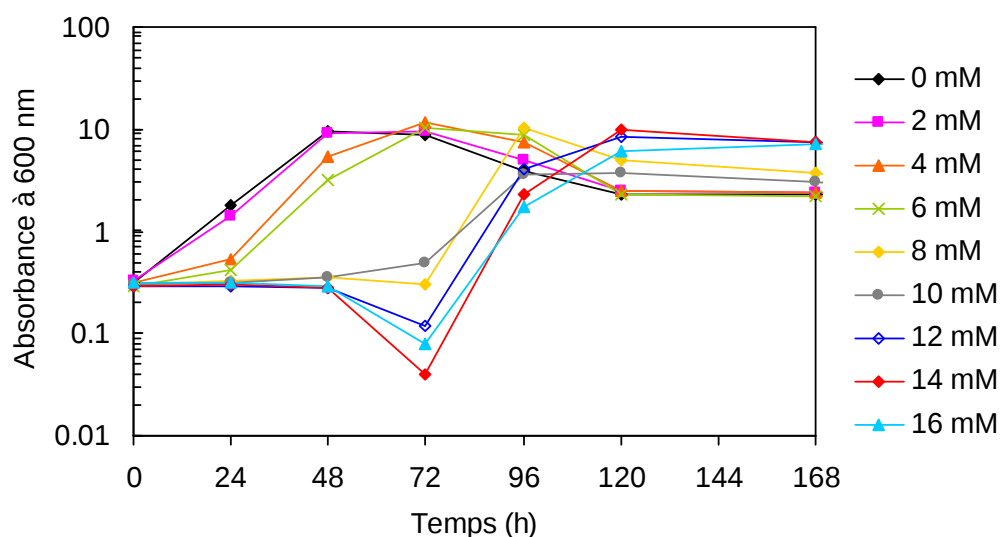


Figure 42 : courbes de croissance de *C. metallidurans* CH34 en fonction de la concentration en séléniate. Le séléniate est ajouté au moment de l'ensemencement lorsque l'absorbance à 600 nm est de 0,3 ($t = 0$ heure).

La phase de latence

Nous notons l'absence de phase de latence à une exposition à 2 mM de séléniate dans le milieu de culture. A partir de 4 mM, la phase de latence apparaît et sa durée augmente jusqu'à 8 mM pour atteindre un plateau.

La phase de croissance exponentielle

Pour une exposition à 2 mM de séléniate dans le milieu de culture, la vitesse de croissance bactérienne n'est pas modifiée par rapport à une culture témoin en absence de sélénium. Nous distinguons deux valeurs moyennes de vitesses de croissance : une vitesse moyenne de $0,3 \text{ h}^{-1}$ pour les concentrations en séléniate inférieures à 8 mM ; cette vitesse diminue d'un facteur 2 au delà de ces concentrations.

La phase stationnaire

La densité cellulaire maximale atteinte en phase stationnaire n'est pas affectée par la présence de séléniate.

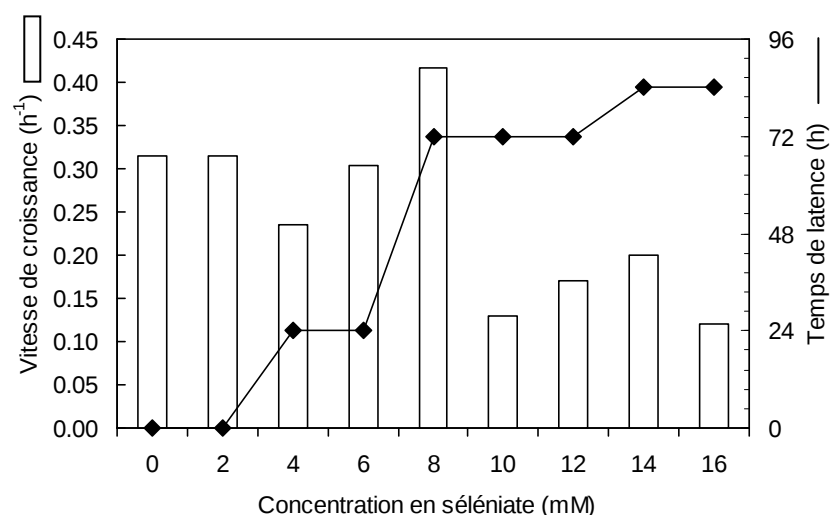


Figure 43 : temps de latence et vitesse de croissance en fonction de la concentration en séléniate dans le milieu de culture. La vitesse de croissance est déterminée durant la phase exponentielle à partir des courbes de croissance des cultures présentées figure 42.

2.2. La résistance chez la souche sauvage

La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée en milieu TSM liquide contenant 2% de gluconate (figure 44). Dans nos conditions de culture, la CMI du séléniate est de 8 mM. Ce résultat est en accord avec les faibles effets du séléniate sur la croissance comme par exemple l'absence de perturbation de la viabilité bactérienne en présence de 2 mM de séléniate (résultat non montré).

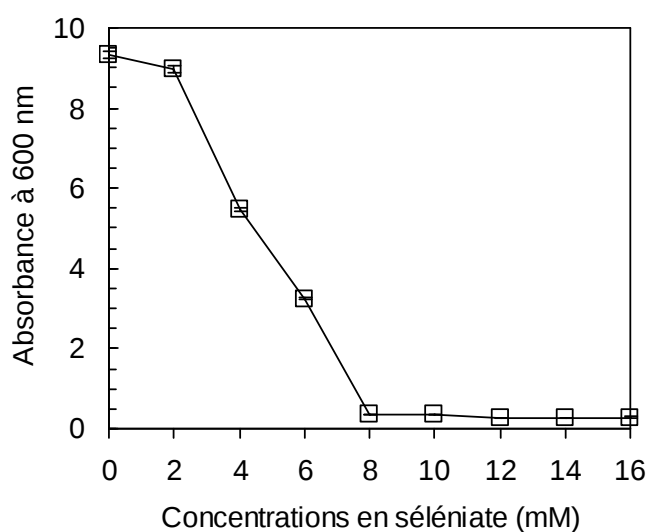


Figure 44 : détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour le séléniate. La CMI est déterminée par mesure de l'absorbance à 600 nm 48 heures après l'inoculation de *C. metallidurans* CH34 en milieu TSM liquide à 2% de gluconate contenant des concentrations croissantes de séléniate. La barre d'erreur correspond à la déviation standard de 3 mesures.

DISCUSSION ET CONCLUSION du chapitre I

La résistance aux oxyanions de sélénium de *C. metallidurans* CH34 est déterminée par l'évaluation de leurs toxicités se traduisant par la perturbation ou l'inhibition de la croissance cellulaire de la souche. Nous avons montré une différence de résistance au sélénite et au séléniate chez *C. metallidurans* CH34. La durée de la phase de latence augmente proportionnellement à la concentration en sélénite présent dans le milieu de culture au moment de l'exposition, comme cela a déjà été montré lors d'une étude précédente (Roux *et al.*, 2001). La phase de latence peut également conduire à une mutation de la souche. En effet, si les nouvelles conditions environnementales sont trop exigeantes, par exemple en présence d'un agent toxique, les micro-organismes ont la capacité de s'adapter par des mutations aléatoires (Wright *et al.*, 2004). Dans ce cas, si la mutation générée est bénéfique pour la bactérie, alors les mutants sélectionnés survivront dans cet environnement sélectif.

En présence de sélénite, l'entrée en phase stationnaire se déroule à une densité cellulaire plus faible qu'en absence de sélénite et des concentrations élevées de cet oxyanion diminuent la vitesse de croissance des bactéries d'un facteur 3. Les expériences rapportées dans la littérature sont généralement réalisées à des concentrations en sélénite inférieures à 2 mM et on constate des effets différents du sélénite selon l'espèce considérée et le mode de croissance. Par exemple, chez la bactérie pourpre *Rhodobacter sphaeroides*, la densité cellulaire en fin de croissance exponentielle n'est pas modifiée en présence de 1 mM de sélénite en condition aérobie et anaérobie. En revanche, sa vitesse de croissance diminue en condition aérobie alors qu'en condition anaérobie, elle n'est pas affectée (Bébian *et al.*, 2001). Chez la souche photosynthétique *Rhodospirillum rubrum*, la densité cellulaire maximale atteinte est divisée de moitié en présence de 0,5 mM de sélénite en condition anaérobie alors que la vitesse de croissance n'est pas modifiée (Kessi *et al.*, 1999).

Nous avons montré que, dans nos conditions de culture, *C. metallidurans* CH34 est capable de résister jusqu'à 4 mM de sélénite. Dans une étude précédente, la CMI de *C. metallidurans* CH34, en milieu TSM solide contenant 0,2% de gluconate, a été déterminée voisine de 5 ou 6 mM (Roux *et al.*, 2001). Ce résultat souligne l'importance des conditions de croissance pour la détermination de la CMI. A titre de comparaison, la CMI en présence de sélénite, en milieu liquide en condition aérobie, pour une bactérie phototrophe de l'eau, *Synechocystis sp.* PCC 6803, a été déterminée à 400 μ M (Gouget *et al.*, 2005). L'espèce *Rhodobacter sphaeroides* a une CMI de 1,3 mM de sélénite, déterminée en milieu solide en condition aérobie (Bébian *et al.*, 2001). Les espèces telluriques *Bacillus subtilis* (Moore et Kaplan, 1992) et *Escherichia coli* (Bébian *et al.*, 2002) ont des CMI respectives, voisine de 5

mM en condition anaérobie et supérieure à 5 mM en condition aérobie en milieu solide. Selon les espèces étudiées, les CMI sont différentes et dépendent des conditions de cultures. Nous avons également montré dans nos conditions de culture que les capacités de résistance au sélénite sont plus importantes pour les souches mutées comparées au type sauvage, reflétant les précédents travaux réalisés par l'équipe de J. Covès (Ledgham *et al.*, 2005).

Notre étude montre également qu'en réponse à des concentrations élevées en séléniolate, la vitesse de croissance de *C. metallidurans* CH34 est diminuée d'un facteur 2 mais sans affecter significativement la densité cellulaire maximale. *C. metallidurans* CH34 est capable de résister jusqu'à 8 mM de séléniolate lorsqu'elle est cultivée en milieu TSM liquide contenant 2% de gluconate. Pour la même souche, la CMI a été déterminée à 12 mM en milieu TSM-agar contenant 0,2% de gluconate (Roux *et al.*, 2001). La souche présente donc une résistance plus élevée par comparaison au sélénite. Toutefois, elle reste très résistante au séléniolate comparé à d'autres espèces. Par exemple, la CMI de la bactérie pourpre, *Rhodobacter sphaeroides*, est de 0,8 mM en condition anaérobie (Moore et Kaplan, 1992). La bactérie phototrophe *Synechocystis* sp. PCC 6803 a une CMI de 200 μ M en condition aérobie (Gouget *et al.*, 2005).

De plus, les expériences montrent que des expositions bactériennes à des concentrations élevées en sélénite semblent conduire à la sélection de mutants. Cela n'a pas été observé auparavant (Roux *et al.*, 2001). Toutefois, nous poursuivons l'étude dans un premier temps avec des concentrations en sélénium supérieures à 2 mM afin de caractériser les capacités accumulatrices de la souche. Puis, dans un second temps lors de l'étude du comportement de résistance, nous travaillons à des concentrations en sélénite et de séléniolate inférieures ou égales à 2 mM chez la souche sauvage.

A présent, afin d'expliquer la différence de résistance de *C. metallidurans* CH34 au sélénite et au séléniolate, l'accumulation du sélénium dans les bactéries et la consommation du sélénium présent dans le milieu de culture au cours de la croissance microbienne sont directement quantifiées.

RESULTATS CHAPITRE II

II. ACCUMULATION DU SELENIUM CHEZ *C. metallidurans* CH34

Les cinétiques d'accumulation du sélénium dans les bactéries (dosage du sélénium dans le culot bactérien) sont suivies au cours de la croissance bactérienne. Les résultats sont directement comparés aux cinétiques de consommation du sélénium présent dans le milieu de culture par les bactéries (dosage du sélénium dans le surnageant de culture). Dans ces expériences, que ce soit dans le milieu de culture ou dans le culot bactérien, le sélénium total est dosé par ICP-MS. Lorsque les cultures sont réalisées en présence de sélénite, l'espèce sélénite est systématiquement dosée par fluorimétrie dans le milieu de culture. Les concentrations en sélénium total et en sélénite déterminées par ces deux méthodes sont similaires. Seuls les résultats ICP-MS sont présentés ici.

1. Accumulation du sélénite dans la bactérie et consommation du sélénite présent dans le milieu de culture

1.1. Influence de la concentration en sélénite sur son accumulation

Les bactéries sont exposées à des concentrations de 2 à 8 mM de sélénite. La figure 45 présente les résultats des cinétiques de consommation du sélénium dans le milieu de culture par les bactéries (figure 45A) et d'accumulation du sélénium dans les culots bactériens (figure 45B). Ces résultats sont directement comparables aux courbes de croissance des cultures présentées précédemment (cf. figure 36).

Nous pouvons remarquer que quelle que soit la concentration initiale en sélénite ajouté dans le milieu de culture au moment de l'exposition, la concentration en sélénium présent dans le milieu diminue significativement lorsque la culture atteint la fin de la phase exponentielle de croissance (par exemple, pour une exposition à 2 mM, la consommation du sélénite débute après 48 heures ; à 4 mM, à 96 heures ; à 6 et 8 mM : à 120 heures). Comme attendu, cette diminution est corrélée à l'augmentation de la concentration en sélénium dans les bactéries

L'accumulation du sélénium administré sous forme sélénite aux bactéries se fait en deux étapes. Pendant la phase de latence et la phase exponentielle de croissance, l'accumulation du sélénium est très faible : en fonction de la concentration initiale en sélénite ajouté dans le milieu de culture au moment de l'exposition, nous quantifions de 10 à 80 mg de sélénium accumulé

par g de protéines. En fin de phase exponentielle de croissance et début de phase stationnaire, l'accumulation devient rapide et importante (de 200 à 2570 mg de sélénium par g de protéines).

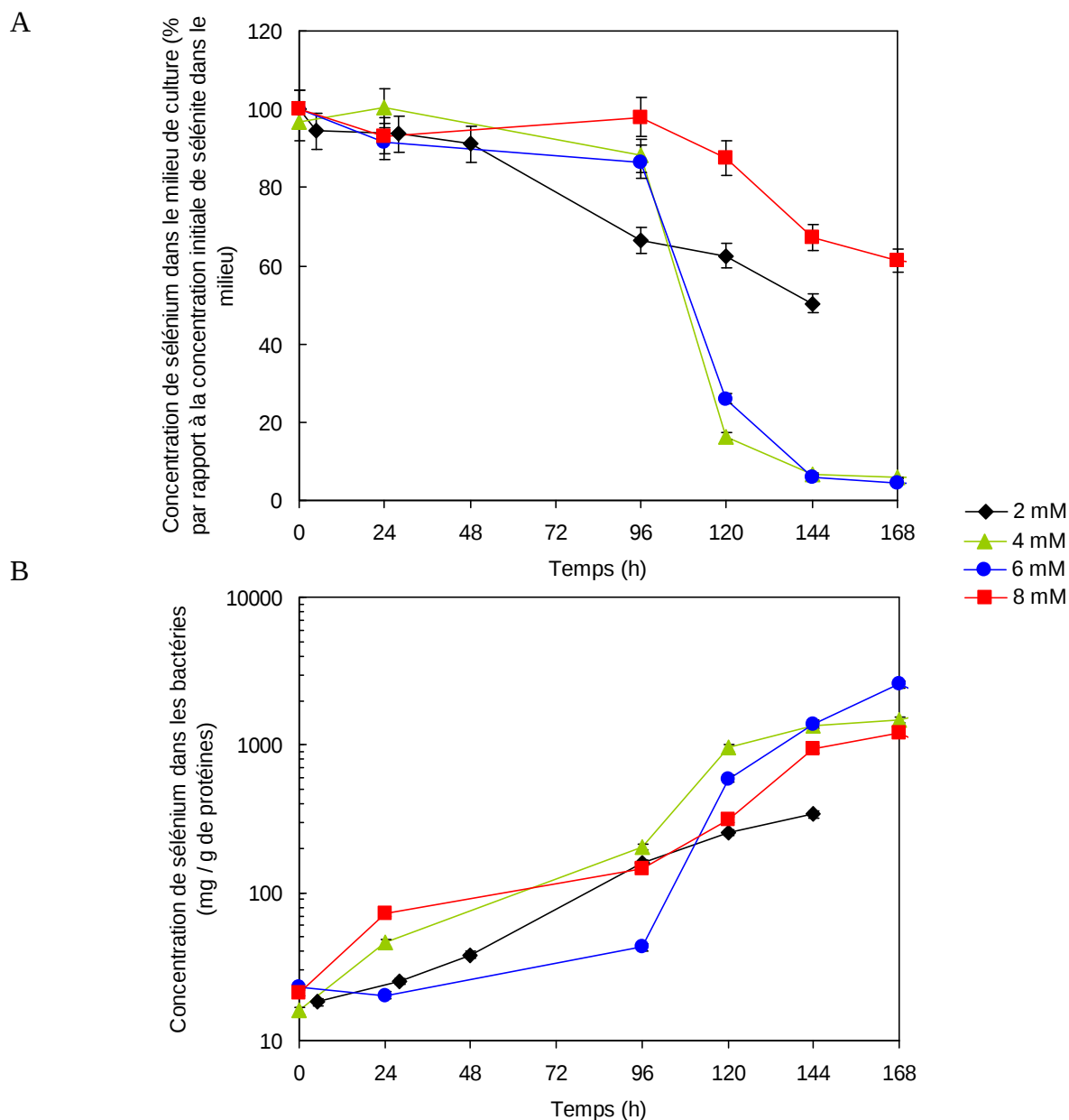


Figure 45 : variations de la consommation du sélénium du milieu de culture (A) et de l'accumulation dans les bactéries (B) lors de la croissance de *C. metallidurans* CH34 en présence de différentes concentrations de sélénite. Les concentrations de sélénium dans le milieu de culture et dans les bactéries sont déterminées à partir des analyses par ICP-MS. L'erreur de mesures est estimée à 5%. L'axe des ordonnées de la figure B est en échelle logarithme. L'accumulation du sélénium dans les bactéries exposées à 2 mM est suivie jusqu'à 120 heures correspondant à la fin de la phase stationnaire.

Afin de préciser les capacités accumulatrices de la souche, la consommation maximale du sélénium dans les bactéries en fonction de la concentration initiale de sélénite ajouté dans le milieu de culture et la vitesse maximale d'accumulation du sélénium dans les bactéries ont été calculées pour chaque concentration d'exposition au sélénite. Les résultats sont reportés sur la figure 46. Les cultures exposées à 4 et 6 mM de sélénite accumulent la quasi-totalité du sélénium (95%). Au-delà de 6 mM, le pourcentage de sélénium consommé par les bactéries

chute à 40%. La vitesse d'accumulation augmente jusqu'à 6 mM de sélénite (5 et 36 mg de sélénium g^{-1} de protéines h^{-1} en présence de 2 et 6 mM de sélénite, respectivement), puis diminue pour les concentrations supérieures en sélénite suggérant que l'exposition à 6 mM de sélénite correspond à la concentration limite des capacités de résistance de la souche. Jusqu'à 6 mM de sélénite présent dans le milieu de culture au moment de l'exposition, les bactéries sont capables d'accumuler une part importante du sélénium.

Il est à noter que le bilan de matière entre la quantité de sélénite initialement présente et la quantité de sélénium accumulée dans les bactéries reste supérieur à 90%.

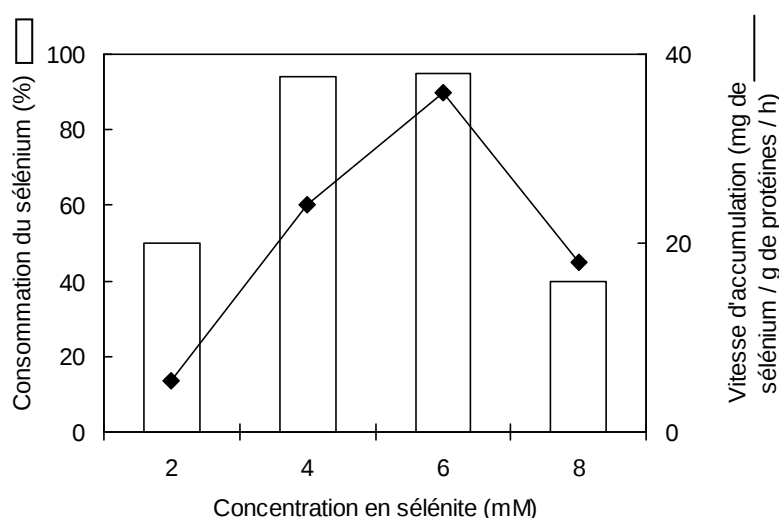


Figure 46 : maxima de consommation et vitesse d'accumulation du sélénium dans les bactéries en fonction de la concentration en sélénite. La consommation maximale de sélénium correspond au pourcentage de consommation maximale du sélénium dans le milieu de culture. Cette valeur est calculée par la différence de la quantité de sélénium ajoutée et dosée dans le milieu au temps zéro avec la quantité minimale de sélénium dosée dans le milieu de culture au cours de la cinétique de croissance. La vitesse d'accumulation est déterminée dans la partie linéaire de la courbe d'accumulation du sélénium dans les bactéries.

1.2. Influence de l'état physiologique des bactéries sur l'accumulation du sélénite

Quel que soit le moment d'ajout du sélénite à la concentration de 2 mM (ajout en début c'est-à-dire lorsque l'absorbance à 600 nm est de 0,3, en milieu c'est-à-dire lorsque l'absorbance à 600 nm est de 1 ou en fin de phase exponentielle de croissance, lorsque l'absorbance à 600 nm est de 3), la cinétique d'accumulation du sélénium dans les bactéries suit le même profil, avec une phase d'accumulation lente suivie d'une phase d'accumulation rapide initiée en début de phase stationnaire (figure 47). Par exemple, pour la culture exposée à une absorbance à 600 nm de 0,3, les bactéries accumulent moins de 50 mg de sélénium par g de protéines lors des phases de latence et exponentielle de croissance. Puis, l'accumulation du sélénium augmente rapidement lorsque la culture atteint la phase stationnaire (environ 150 mg de sélénium par g de protéines en début de phase stationnaire). Ce résultat montre que

l'accumulation est rapide lors de la phase stationnaire et cela peut suggérer une levée d'inhibition de l'accumulation et/ou une induction de molécules permettant l'accumulation en phase stationnaire.

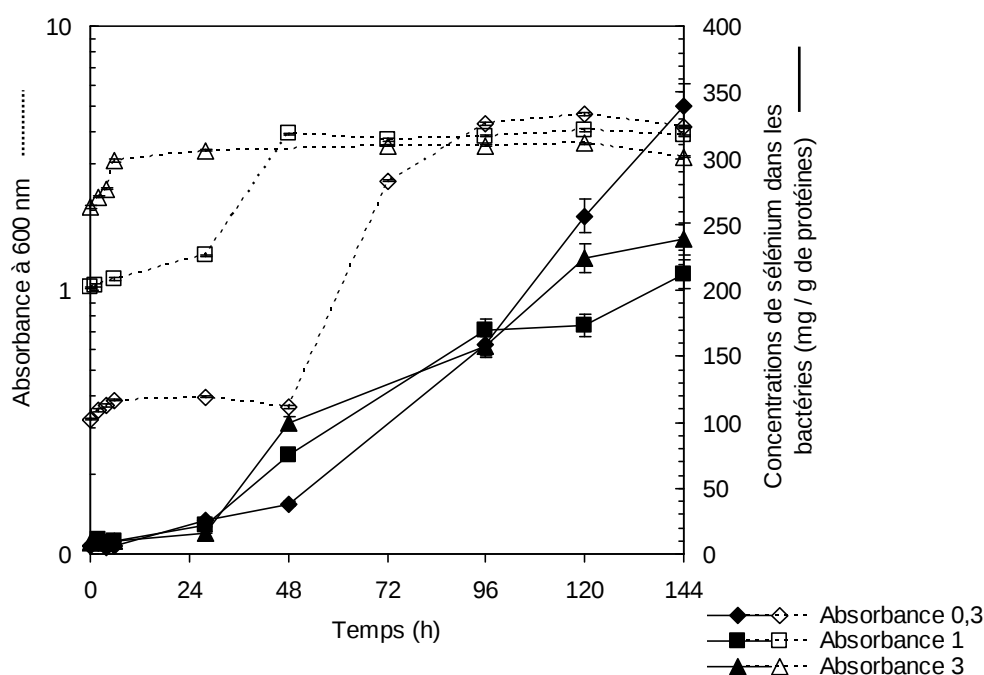


Figure 47 : accumulation de sélénium dans les bactéries lors de la croissance de *C. metallidurans* CH34 en présence de 2 mM de sélénite ajoutés à différents stades de la croissance. Les courbes en traits pleins correspondent à l'accumulation de sélénium dans les bactéries. L'accumulation de sélénium dans les bactéries est déterminée à partir des analyses ICP-MS et normalisées par rapport à la quantité de protéines bactériennes. Les courbes en pointillés correspondent au suivi de croissance par mesure de l'absorbance à 600 nm. Le sélénite est ajouté dans 3 cultures soit en début (absorbance 0,3), milieu (absorbance 1) ou fin de phase exponentielle de croissance (absorbance 3). L'erreur des mesures est estimée à 5%.

1.3. Influence de la densité cellulaire sur l'accumulation du sélénium

Les résultats de la consommation du sélénite initialement présent à 2 mM dans le milieu de culture contenant 0,2% ou 2% de gluconate, au cours de la croissance de *C. metallidurans* CH34, sont présentés sur la figure 48. A 0,2% de gluconate, la culture reste à faible densité cellulaire avec un maximum d'absorbance à 600 nm à 2 alors qu'à 2% de gluconate, la culture a une densité cellulaire élevée avec un maximum d'absorbance à 600 nm à 6.

Quelle que soit la concentration en gluconate dans le milieu, l'accumulation du sélénium est initiée en début de phase stationnaire (c'est-à-dire à 17 heures dans le milieu à 0,2% de gluconate et après 48 heures dans le milieu à 2% de gluconate). Il est à noter que lorsque les bactéries sont cultivées dans un milieu contenant 0,2% de gluconate, la consommation du sélénium par les bactéries ne dépasse pas 2% du sélénium ajouté initialement dans le milieu de culture (cf. figure 48). De plus, dans ces conditions, la croissance bactérienne n'est pas

précédée par une phase de latence. La vitesse de croissance est très légèrement affectée par rapport à une culture réalisée dans le même milieu mais en absence de sélénium. La densité cellulaire atteinte en phase stationnaire est comparable à celle de la culture témoin sans sélénium. La culture réalisée dans le milieu à 2% de gluconate a sa croissance précédée par une phase de latence d'environ 24 heures. Sa vitesse de croissance est perturbée comme montré dans le chapitre précédent (cf. § I.1.1).

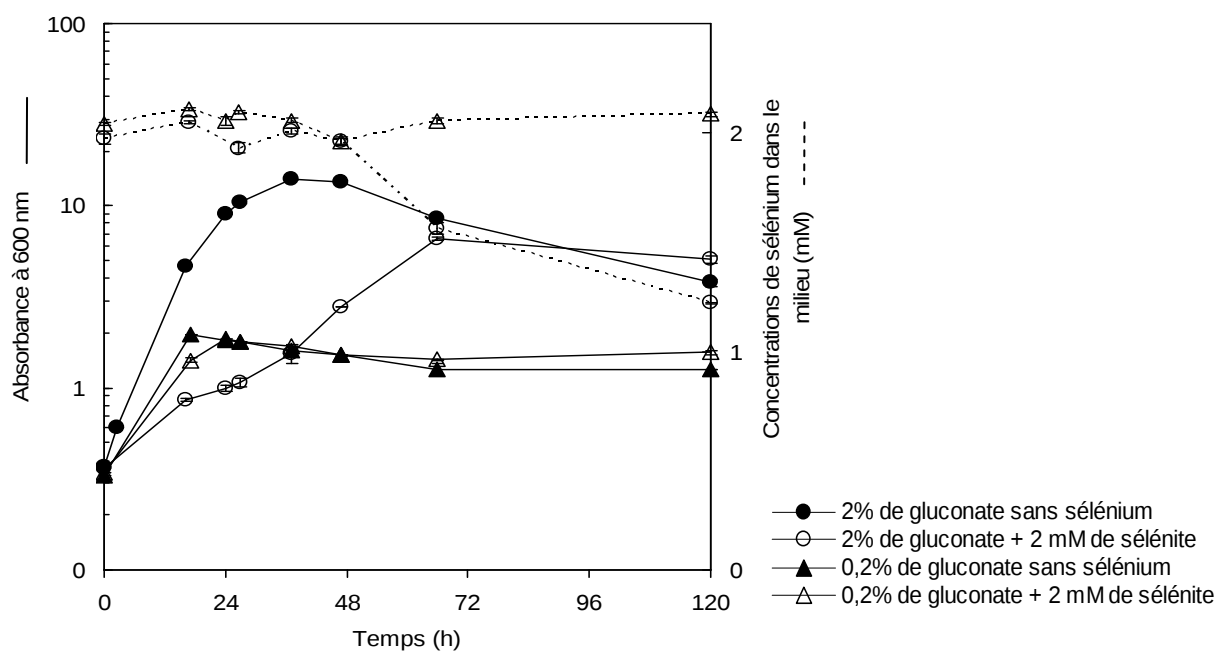


Figure 48 : croissance sans sélénium et en présence de 2 mM de sélénite dans le milieu à 0,2% et 2% de gluconate et consommation du sélénium du milieu de culture par *C. metallidurans* CH34. Les courbes en traits pleins correspondent à la croissance des bactéries dans le milieu contenant 0,2 et 2% de gluconate en absence et en présence de 2 mM de sélénite. La consommation du sélénium du milieu de culture dans les bactéries est représentée par les courbes pointillées. La barre d'erreur correspond à la déviation standard de la moyenne de 3 mesures.

La figure 49 présente le pourcentage d'accumulation des bactéries dans le milieu contenant 0,2% de gluconate par rapport à l'accumulation des bactéries cultivées dans le milieu contenant 2% de gluconate, pour différents stades de la croissance microbienne. Ainsi, que ce soit en phase exponentielle de croissance ou en phase stationnaire, les bactéries cultivées dans un milieu à 0,2% de gluconate accumulent beaucoup moins le sélénite que les bactéries cultivées dans un milieu à 2% de gluconate. Par exemple, l'accumulation maximale dans un milieu à 0,2% de gluconate représente seulement 24% de l'accumulation maximale dans un milieu contenant 2% de gluconate (pour 120 heures d'exposition, 61 mg de sélénium par g de protéines sont accumulés dans le milieu à 0,2% de gluconate contre 255 mg de sélénium par g de protéines dans le milieu à 2% de gluconate).

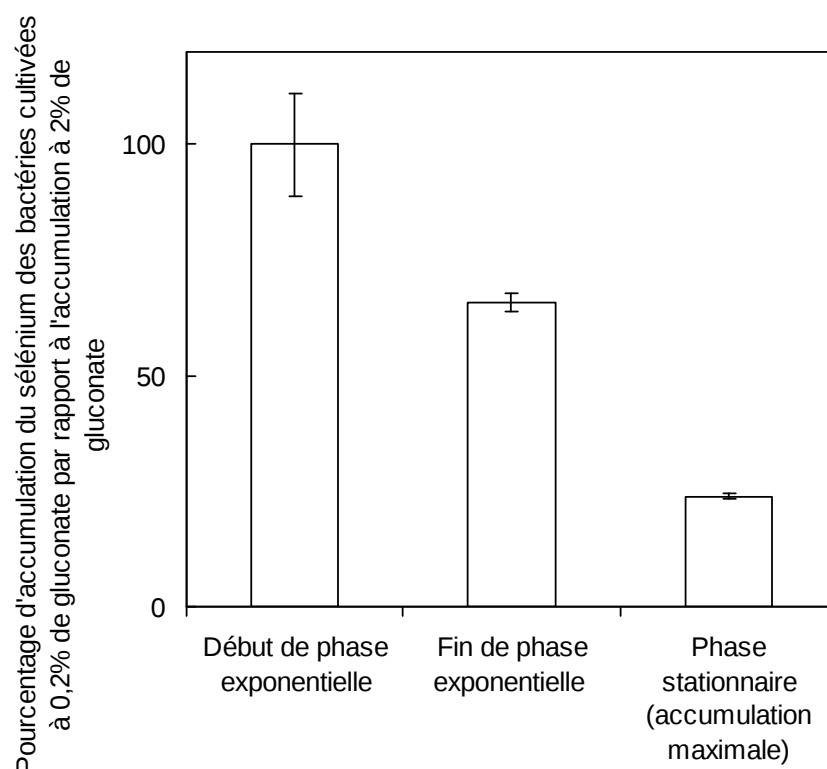


Figure 49 : pourcentages d'accumulation du sélénium par les bactéries exposées à 2 mM de sélénite dans le milieu à 0,2% de gluconate par rapport aux bactéries cultivées dans le milieu à 2% de gluconate. La barre d'erreur correspond à la déviation standard de la moyenne de 3 mesures.

Une hypothèse qui permettrait d'expliquer la plus forte accumulation du sélénite lorsque les bactéries sont cultivées dans un milieu à 2% de gluconate par rapport aux bactéries cultivées dans un milieu à 0,2% de gluconate est avancée : les bactéries cultivées dans un milieu contenant 2% de gluconate atteignent une densité cellulaire plus importante que lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu à 0,2% de gluconate. Dans ces conditions, lorsque les bactéries arrivent en fin de phase exponentielle de croissance, le milieu de culture peut être davantage appauvri en nutriments, notamment en sulfate, anion potentiellement compétiteur du sélénite. Le transport du sulfate pourrait être compensé par un transport du sélénite et son accumulation dans la bactérie.

Afin de vérifier cette hypothèse, la concentration en sulfate dans le milieu de culture a été déterminée parallèlement au dosage du sélénium dans le milieu de culture (résultats non montrés). Aucune diminution significative de la concentration en sulfate dans le milieu de culture n'a été mesurée au cours de la croissance bactérienne, que la culture soit réalisée à faible ou à forte densité cellulaire. L'hypothèse a donc été invalidée.

2. Accumulation du séléniate dans la bactérie et consommation du séléniate présent dans le milieu de culture

2.1. Influence de la concentration en séléniate sur son accumulation

Les bactéries sont exposées à des concentrations de 2 à 16 mM de séléniate. Quelle que soit la concentration initiale d'exposition au séléniate, sa consommation par les bactéries est négligeable (inférieure à 2% de la quantité de séléniate initialement présente dans le milieu de culture).

La cinétique d'accumulation du sélénium dans les bactéries pour la culture exposée à 2 mM de séléniate est présentée sur la figure 50. La courbe de croissance correspondante, présentée en figure 42 dans le chapitre précédent, est reportée. Le séléniate ajouté en début de croissance, c'est-à-dire lorsque l'absorbance à 600 nm est de 0,3, est faiblement accumulé dans les bactéries au cours de la croissance bactérienne (au maximum 12 ± 2 mg de sélénium accumulé par g de protéines). Nous n'observons pas de phase d'accumulation rapide comme c'est le cas après une exposition au sélénite.

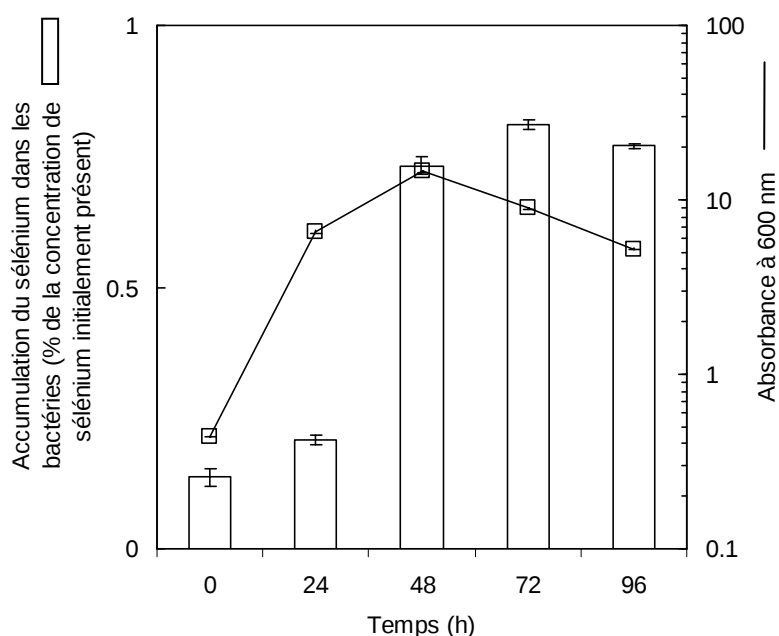


Figure 50 : pourcentage d'accumulation du sélénium dans les bactéries lors de la croissance de *C. metallidurans* CH34 exposées à 2 mM de séléniate par rapport à la concentration de séléniate initiale présente dans le milieu de culture. La barre d'erreur correspond à la moyenne de 3 mesures.

2.2. Influence de l'état physiologique des bactéries sur l'accumulation du séléniate

Quel que soit le moment d'ajout du séléniate à la concentration de 2 mM (en début ($A_{600} = 0,3$) ou en milieu de phase exponentielle de croissance ($A_{600} = 1$)), la cinétique d'accumulation du sélénium dans les bactéries suit le même profil : l'accumulation du sélénium débute lorsque la culture arrive en phase stationnaire (figure 51). Par exemple, la culture exposée à une absorbance à 600 nm de 0,3 accumule de faibles quantités de séléniate lors des phases de latence et exponentielle de croissance (inférieure à 5 mg de sélénium par g de protéines). Puis, la culture en phase stationnaire accumule des quantités légèrement plus importantes de sélénium (environ 15 mg de sélénium par g de protéines). Ce résultat suggère que l'accumulation est indépendante de l'état physiologique des cellules en phase exponentielle de croissance. Elle semble être contrôlée par le métabolisme cellulaire de la phase stationnaire comme c'est le cas pour le sélénite.

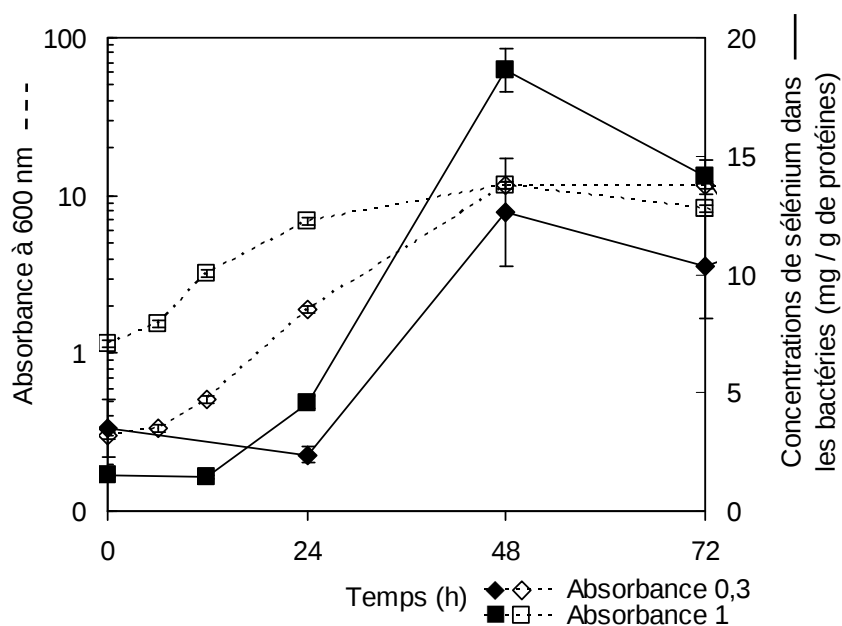


Figure 51 : accumulation de sélénium dans les bactéries lors de la croissance de *C. metallidurans* CH34 en présence de 2 mM de séléniate ajoutés à différents stades de la croissance (absorbance de 0,3, début de phase exponentielle et absorbance de 1, milieu de phase exponentielle). Les courbes en pointillés correspondent au suivi de croissance par mesure de l'absorbance à 600 nm. Les courbes en traits pleins correspondent à l'accumulation de sélénium dans les bactéries. L'accumulation de sélénium dans les bactéries est déterminée à partir des analyses ICP-MS normalisées par la quantité de protéines. L'erreur des mesures est estimée à 5%.

3. Relargage de sélénium par la bactérie

Un relargage potentiel du sélénium après que les bactéries aient atteint leur maximum d'accumulation est recherché. Pour ces expériences, les cultures exposées au sélénite et au séléniate ont respectivement accumulé 60 et 2% du sélénium initialement ajouté au milieu de

culture. A la fin de la période d'accumulation, les culots bactériens sont rincés avant d'être remis en culture dans du milieu frais sans sélénium. Le sélénium relargué par les bactéries est dosé dans le milieu de culture.

Un relargage est observé pour les deux oxyanions de sélénium. Après exposition au sélénite, un maximum de 12% du sélénium accumulé par les bactéries est retrouvé dans le milieu de culture, ce qui correspond à 10% du sélénium initialement ajouté à la culture. Après exposition au séléniat, environ 2% du sélénium initialement présent dans le milieu de culture est relargué, soit la quasi-totalité de la fraction accumulée par les bactéries. Le relargage est lent pour les bactéries ayant accumulé l'espèce sélénite alors qu'il est très rapide pour les bactéries ayant accumulé du séléniat : dans le cas du sélénite, 2 à 9% de sélénium accumulé est relargué durant les 24 premières heures post-exposition et environ 2% du séléniat initialement présent dans le milieu de culture est retrouvé durant les premières heures après remise en culture dans du milieu frais. Comme le surnageant est filtré (0,22 μm), le sélénium dosé correspond à la fraction soluble et probablement pas à du sélénium élémentaire insoluble. Il est à noter que dans ces expériences, nous ne tenons compte ni de la croissance bactérienne dans le milieu frais ni de la lyse cellulaire au cours du temps.

Un tableau récapitulatif des résultats obtenus dans les chapitres I et II est présenté ici.

	Sélénite	Séléniate
Résistance		
CMI	4 mM	8 mM
Temps de latence	2 mM : 24 h 4 mM : 72 h 6-8 mM : 96 h	2 mM : < 24 h 4-6 mM : 24 h 8-12 mM : 72 h
Vitesse de croissance	0 mM : 0,38 h ⁻¹ 2 mM : 0,18 h ⁻¹ 4-8 mM : 0,12 h ⁻¹	0 mM : 0,38 h ⁻¹ 2-6 mM : 0,30 h ⁻¹ 8-16 mM : 0,15 h ⁻¹
Accumulation		
Quelques valeurs	4-6 mM : 95% soit 2000 à 2600 mg de Se par g de protéines	2 mM : < 2% soit 14 à 18 mg de Se par g de protéines
Facteurs influençant l'accumulation	<u>L'accumulation dépend :</u> • de la concentration initialement présente • de l'état physiologique en phase stationnaire • de la concentration de la source de carbone • de la durée d'exposition	<u>L'accumulation dépend :</u> • de l'état physiologique en phase stationnaire <u>Consommation est indépendante :</u> • de la concentration initialement présente

Tableau 12 : récapitulatif des résultats obtenus après exposition au sélénite et au séléniate de *C. metallidurans* CH34.

DISCUSSION ET CONCLUSION du chapitre II

Nous avons mis en évidence chez *C. metallidurans* CH34 que l'accumulation des deux oxyanions sélénite et séléniate suit des profils différents.

Quelle que soit la concentration initialement ajoutée dans le milieu de culture, l'accumulation du sélénite se déroule en deux phases. Une période d'accumulation lente et faible, d'une durée proportionnelle à la concentration initiale de sélénite, est suivie par une période d'accumulation rapide et forte. Compte tenu du délai de prise en charge du sélénite, un système d'activation lent de son transport peut être suggéré. Ce profil d'accumulation en deux phases existe quel que soit l'état physiologique des bactéries (bactéries exposées en début, milieu ou fin de phase exponentielle de croissance) et quelle que soit la densité bactérienne (bactéries cultivées à faible ou à forte concentration de source de carbone) au moment de l'exposition au sélénite. L'accumulation semble être contrôlée par le métabolisme cellulaire de la bactérie au moment de la phase stationnaire. Ce phénomène a déjà été observé chez *Rhodospirillum rubrum* où la consommation du sélénite coïncide avec l'entrée en phase stationnaire, suggérant son contrôle par des molécules régulatrices en phase stationnaire (Kessi *et al.*, 1999).

La quantité de sélénium accumulé, lorsqu'il est apporté sous la forme sélénite, dépend des conditions de culture et en particulier de la concentration en source de carbone. La souche est capable d'accumuler la quasi-totalité du sélénite initialement présent dans le milieu de culture à des concentrations de plusieurs millimolaires. Dans la littérature, peu de souches cultivées en condition aérobie sont capables d'accumuler de telles concentrations de sélénium présent sous la forme sélénite. Par exemple, la bactérie photosynthétique *Rhodospirillum rubrum* cultivée en condition aérobie consomme 25% du sélénite présent dans le milieu à une concentration initiale de 0,5 mM. La totalité du sélénite, initialement présent à 0,5 ou 1 mM dans le milieu de culture, est consommé lorsque la culture est réalisée en condition anaérobie (Kessi *et al.*, 1999). *R. sphaeroides* cultivée en condition anaérobie est capable de consommer 94% du sélénite présent à la concentration de 1,3 mM (Van Fleet-Stalder *et al.*, 2000). Dans une autre étude, cette souche consomme presque la totalité des 1 mM de sélénite en conditions aérobie et anaérobie (Bébian *et al.*, 2001).

En parallèle, nous avons montré que la bactérie accumule faiblement le sélénium lorsque celui-ci est administré sous la forme séléniate (accumulation dans la bactérie inférieure à 2% du sélénium présent initialement). A titre de comparaison, la souche accumule jusqu'à 20 fois plus de sélénium lorsque celui-ci est administré sous la forme sélénite que sous la forme séléniate. La consommation du séléniate est indépendante de la concentration d'exposition. La résistance

élevée de la souche au séléniate pourrait être liée à sa très faible accumulation, affectant peu la viabilité de la population bactérienne.

De nombreuses études toxicologiques des composés du sélénium ont été réalisées chez les eucaryotes révélant une toxicité plus élevée du sélénite par rapport au séléniate (Yan *et al.*, 1991). Chez les procaryotes, l'effet nocif du sélénite est rapporté par exemple chez *Salmonella typhimurium* (Kramer et Ames, 1988). La toxicité du sélénite est notamment attribuée à sa forte réactivité avec les groupements thiols générant des anions superoxydes (Bébién *et al.*, 2002 ; Kessi et Hanselmann, 2004). Une précédente étude a montré qu'une superoxyde dismutase à fer (Fe-SOD) impliquée dans le stress oxydant est sur-exprimée en présence de sélénite chez *C. metallidurans* CH34 (Roux et Covès, 2002).

Enfin, nous avons montré un relargage de sélénium post-accumulation mais nous ne pouvons pas conclure sur un efflux. La proportion du sélénium accumulé puis relargué est élevée pour les bactéries accumulant faiblement le séléniate alors qu'elle est faible pour les bactéries accumulant fortement le sélénite. Le relargage est rapide dans le cas d'une accumulation du séléniate et lente après accumulation du sélénite. Nous savons que le sélénite est immobilisé dans la bactérie sous forme de sélénium élémentaire (Roux *et al.*, 2001). Pour le séléniate, l'absence de la coloration rouge de la culture (couleur caractéristique du sélénium élémentaire) suggère qu'il n'est probablement pas immobilisé : il resterait sous forme soluble dans la bactérie et pourrait alors être relargué probablement au cours de la lyse cellulaire. Certaines bactéries relarguent le sélénium accumulé suite à la lyse cellulaire comme *Desulfovibrio desulfuricans*, (Tomei *et al.*, 1995) ou suite à un transport efficace des particules de sélénium à l'extérieur des cellules comme supposé chez *Rhodospirillum rubrum* (Kessi *et al.*, 1999).

Compte tenu de cette différence d'accumulation du sélénite et du séléniate chez *C. metallidurans* CH34, l'existence de deux mécanismes différents de prise en charge est supposée et fait l'objet de la suite de nos recherches.

RESULTATS CHAPITRE III

III. PRISE EN CHARGE DES OXYANIONS DE SELENIUM CHEZ *C. metallidurans* CH34

1. Prise en charge du sélénite

Deux approches ont été mises en œuvre afin de mieux appréhender la prise en charge du sélénite par *C. metallidurans* CH34.

La prise en charge du sélénite est suivie par comparaison de son accumulation chez les mutants résistants et chez la souche sauvage. Les mutants résistants au sélénite sont caractérisés par l'absence d'une protéine membranaire appartenant à la famille DedA, protéine suspectée être impliquée dans le transport du sélénite. La souche sauvage exprime la protéine DedA.

Dans le chapitre précédent (cf. § II.1.3 influence de la densité cellulaire), nous avons montré en dosant le sulfate du milieu de culture que la teneur en sulfate ne diminue pas lorsque l'accumulation rapide et importante du sélénite s'initie ; autrement dit, nous avons montré de façon indirecte que le sulfate n'inhibe pas la prise en charge du sélénite. Afin de préciser ce résultat, une approche directe est menée avec des expériences mettant en compétition le sélénite et le sulfate. L'accumulation du sélénite dans la bactérie cultivée dans un milieu appauvri en sulfate est comparée à son accumulation dans un milieu classique.

1.1. Prise en charge du sélénite par un système de transport spécifique

La prise en charge du sélénite par un éventuel transporteur spécifique, la protéine DedA, est étudiée en comparant l'accumulation du sélénite chez la souche sauvage (WT) et les mutants résistants (RM6 et RM8) comme décrit par l'équipe de J. Covès (Ledgham *et al.*, 2005).

Les pré-cultures, réalisées dans le milieu TSM à 1 ou 2% de gluconate, en absence de sélénium, sont récupérées en milieu de phase exponentielle de croissance et concentrées deux fois dans le milieu TSM à 0,2% de gluconate en présence de 1 ou 2 mM de sélénite. Les bactéries ainsi concentrées simulent une densité cellulaire de phase stationnaire et la croissance est limitée par l'utilisation du milieu appauvri en source de carbone (TSM à 0,2% de gluconate). L'exposition au sélénium dans le milieu contenant 0,2% de gluconate permet de maintenir la densité cellulaire constante pendant plusieurs heures. Le milieu riche en source de carbone (TSM à 1 ou 2% de gluconate) utilisé pour les pré-cultures permet d'atteindre une densité cellulaire suffisante en une nuit.

Comme le montre la figure 52, les mutants résistants RM6 et RM8 accumulent beaucoup moins le sélénite que la souche sauvage. Les valeurs d'accumulation des mutants sont significativement différentes de celles de la souche sauvage ($p < 0,001$). Quel que soit le mutant, quelle que soit la concentration initiale d'exposition au sélénite et quel que soit le temps, l'accumulation du sélénite dans les mutants ne dépasse pas $21 \pm 1\%$ de l'accumulation de la souche sauvage. L'accumulation maximale des souches mutantes est inférieure à 6,5 mg de sélénium par g de protéines (valeur maximale atteinte pour le mutant RM6 exposé à 2 mM de sélénite ; dans ces conditions, la souche sauvage accumule jusqu'à 192 mg de sélénium par g de protéines). Au-delà de 3 heures d'exposition, c'est-à-dire lorsque la phase rapide d'accumulation du sélénite se met en place pour la souche sauvage, l'accumulation par les mutants est 30 fois moindre que l'accumulation par les bactéries de la souche sauvage dans nos conditions de cultures. Ces résultats montrent que les mutants résistants au sélénite ont perdu leurs capacités accumulatrices.

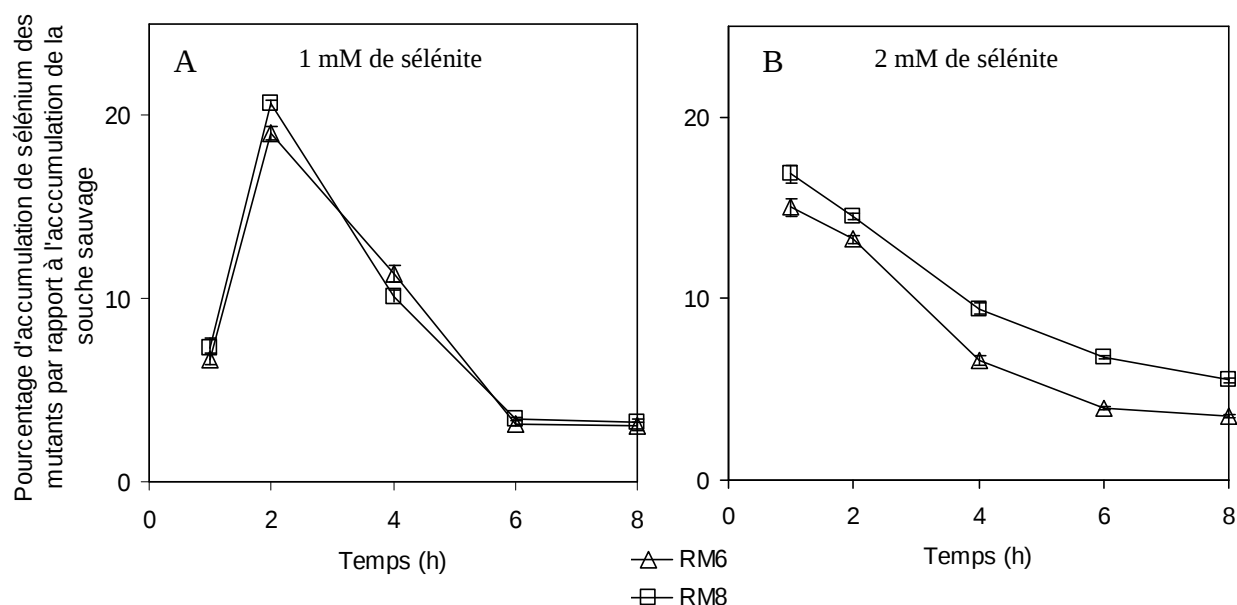


Figure 52 : pourcentage d'accumulation de sélénium chez les mutants résistants au sélénite par rapport à l'accumulation de la souche sauvage au cours du temps. Les pré-cultures sont concentrées à une absorbance à 600 nm de 10 et exposées à 1 (A) ou 2 mM (B) de sélénite. La légende de l'axe des ordonnées est indiquée pour l'ensemble des figures 52A et 52B. La barre d'erreur correspond à la déviation standard de la moyenne de 3 mesures.

1.2. Effet de la compétition du sulfate sur la prise en charge du sélénite

Afin de mettre en évidence un éventuel passage du sélénite par un transporteur du sulfate, nous examinons la compétition entre le sulfate et le sélénite pour ce transporteur en quantifiant la consommation du sélénium initialement présent dans le milieu de culture et

l'accumulation du sélénium dans les bactéries lorsqu'elles sont cultivées en condition limitée en sulfate.

La figure 53 montre la croissance des bactéries cultivées dans les milieux limités et non limités en sulfate (respectivement à 0,3 et 3 mM de sulfate), en absence et en présence de 2 mM de sélénite. Lorsque les cellules limitées en sulfate sont cultivées en absence de sélénite, la culture présente une phase de déclin précoce comparée à la culture non limitée en sulfate (cf. flèche, figure 53). Lorsque les bactéries limitées en sulfate sont cultivées en présence de sélénite, la culture ne présente pas de phase de déclin. La vitesse de croissance est légèrement plus faible comparée à la culture non limitée en sulfate mais la phase stationnaire est atteinte en même temps, c'est-à-dire après 48 heures d'exposition au sélénite. Ces résultats suggèrent que les cellules limitées en sulfate sont plus fragiles, probablement du fait de leur concentration intracellulaire en sulfate insuffisante, et sont ainsi plus affectées par la présence de sélénite.

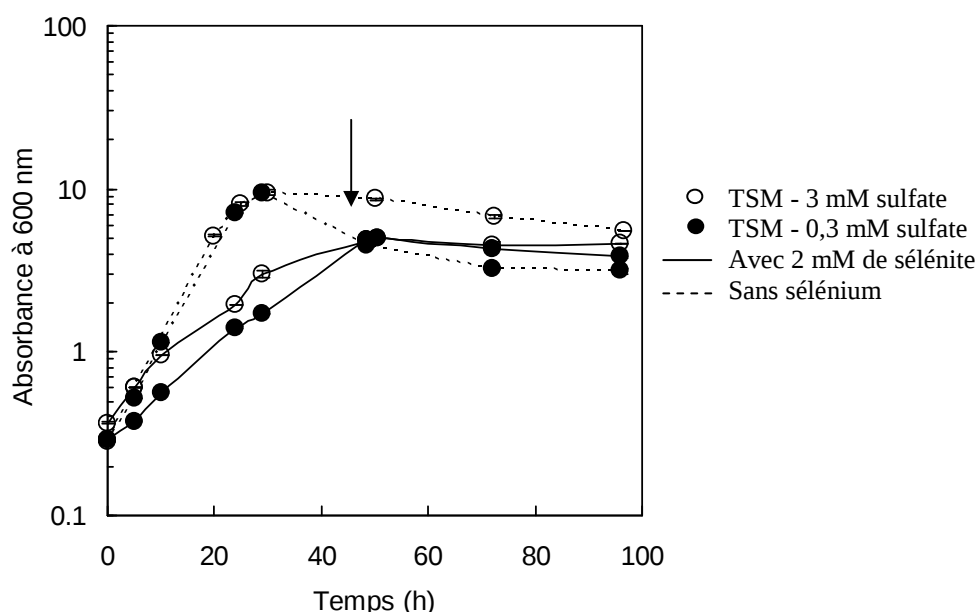


Figure 53 : courbes de croissance de *C. metallidurans* CH34 cultivée dans le milieu TSM contenant 0,3 ou 3 mM de sulfate (Na_2SO_4) en absence de sélénium (courbes pointillées) et en présence de 2 mM de sélénite (courbes pleines). La culture est inoculée à une absorbance à 600 nm de 0,3. La barre d'erreur correspond à la déviation standard de la moyenne de 3 mesures. La flèche indique la phase de déclin de la culture dans le milieu limité en sulfate et sans sélénium.

Le pourcentage d'accumulation du sélénite dans les bactéries cultivées dans le milieu TSM à 0,3 mM de sulfate et en présence de 2 mM de sélénite rapportée aux concentrations accumulées dans les bactéries cultivées dans le milieu classique est présenté sur la figure 54. Nous constatons que les bactéries limitées en sulfate accumulent moins de 50% de la concentration accumulée dans les cellules non limitées, quel que soit le stade de la croissance bactérienne.

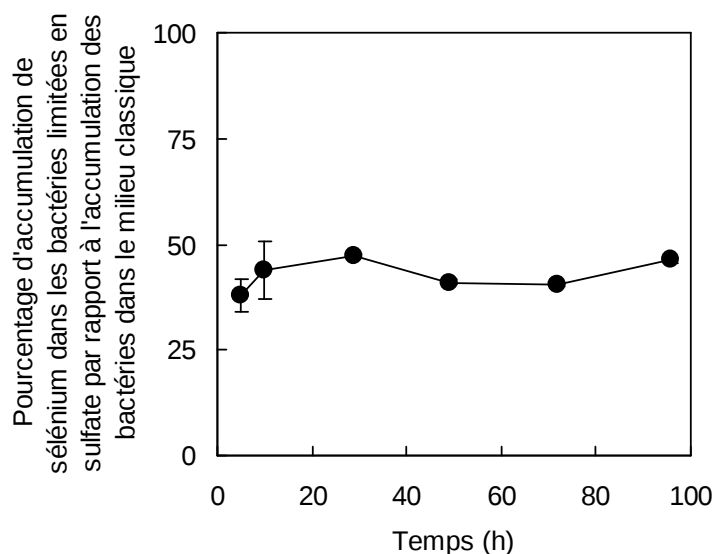


Figure 54 : pourcentage d'accumulation du sélénium par *C. metallidurans* CH34 cultivée dans le milieu TSM contenant 0,3 mM de sulfate en présence de 2 mM de sélénite par rapport à l'accumulation dans le milieu classique (TSM à 3 mM de sulfate). La barre d'erreur correspond à la déviation standard de la moyenne de 3 mesures.

2. Etude de l'induction du mécanisme de prise en charge du sélénite

Nous avons précédemment montré que l'accumulation du sélénite par *C. metallidurans* CH34 se fait en deux étapes : une première étape d'accumulation lente et faible, suivie d'une seconde étape d'accumulation rapide et importante. Afin de comprendre si cette seconde phase d'accumulation est liée à une activation lente d'un mécanisme spécifique de prise en charge du sélénite, comme l'induction d'une protéine spécifique impliquée dans le transport de sélénite et/ou dans son accumulation dans la bactérie, des expériences sont réalisées en présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique. Les bactéries sont cultivées en présence de chloramphénicol et de 1 ou 2 mM de sélénite. Dans ces expériences, l'effet inhibiteur du chloramphénicol n'est pas vérifié au niveau de la synthèse des protéines mais au niveau de la croissance cellulaire. Ces résultats pourront être directement comparés à ceux publiés par l'équipe de J. Covès (Ledgham *et al.*, 2005).

La figure 55 montre l'évolution au cours du temps de l'accumulation du sélénium par la souche sauvage exposée à 1 ou 2 mM de sélénite en présence de chloramphénicol rapportée à son accumulation en absence de chloramphénicol. L'accumulation du sélénium est le reflet direct de la prise en charge du sélénite. Les résultats montrent que l'accumulation de sélénium dans les bactéries exposées à 2 mM de sélénite est diminuée de 30 à 60% lorsque la synthèse de néo-protéines est réduite (les valeurs d'accumulation en présence de chloramphénicol sont

significativement différentes de celles en absence de chloramphénicol avec $p < 0,001$). La vitesse d'accumulation est quant à elle diminuée d'un facteur 2 lorsque les bactéries sont exposées à 2 mM de sélénite et cultivées en présence de chloramphénicol (résultats non montrés).

Cependant, l'accumulation du sélénium par la souche sauvage cultivée en présence de chloramphénicol reste significativement supérieure à celle obtenue chez les mutants résistants au sélénite, laquelle est reportée et indiquée par la droite en pointillés sur la figure 55. Nous constatons que la culture exposée à 1 mM de sélénite accumule rapidement le sélénium comparé à la culture exposée à 2 mM de sélénite.

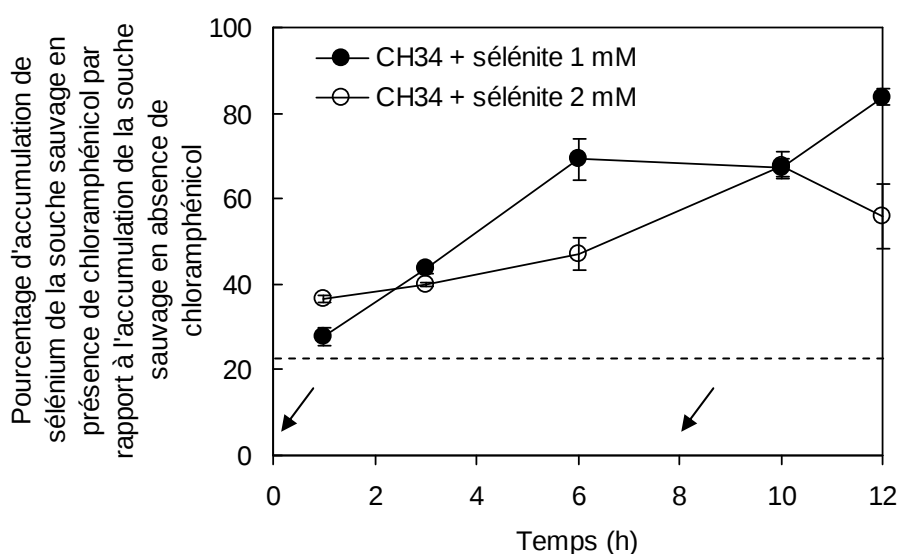


Figure 55 : profils d'accumulations du sélénite par la souche sauvage en présence de chloramphénicol exprimés en pourcentage d'accumulation par rapport à la souche sauvage en absence de chloramphénicol. La droite en pointillés indique la limite supérieure du pourcentage d'accumulation des mutants par rapport à l'accumulation de la souche sauvage présentée sur la figure 52.

Les cultures ont été concentrées à une absorbance à 600 nm de 10 et exposées à 1 ou 2 mM de sélénite. Trois ajouts de chloramphénicol ont été effectués au cours de l'expérience avec la souche sauvage (50 µg/ml de chloramphénicol, 3 heures avant l'exposition puis 30 µg / ml à 0 heure et 8 heures (les flèches indiquent ces deux derniers ajouts de chloramphénicol)).

3. Prise en charge du séléniate

Deux approches ont été mises en œuvre afin de mieux appréhender la prise en charge du séléniate par *C. metallidurans* CH34.

Nous avons montré dans les chapitres I et II que la croissance de *C. metallidurans* CH34 est peu affectée par une exposition au séléniate et son accumulation est très faible. Dans la littérature, le séléniate est décrit comme étant lentement transporté à l'intérieur des cellules via le système de sulfate perméases (Heider et Böck, 1993), bien qu'il ne présente qu'une faible

affinité pour cet oxyanion (Lindblow-Kull *et al.*, 1985). *C. metallidurans* CH34 possède 5 perméases potentielles du sulfate (SulP) (von Rozycki *et al.*, 2005). Dans la première approche, afin de vérifier le passage du séléniate au travers des sulfate perméases de *C. metallidurans* CH34, des expériences mettant en compétition le séléniate et le sulfate ont été réalisées. L'objectif de ces expériences est d'essayer d'augmenter l'accumulation du séléniate par cette voie en appauvrissant le milieu en sulfate.

Cette étude a été complétée par une autre approche avec les mutants résistants au sélénite caractérisés par l'absence d'une protéine membranaire appartenant à la famille DedA. Les capacités d'accumulation de ces mutants sont étudiées et comparées à celles de la souche sauvage exprimant la protéine DedA.

3.1. Effet de la compétition du sulfate sur la prise en charge du séléniate

Les résultats de cinétique d'accumulation du sélénium chez les bactéries cultivées dans le milieu TSM appauvri en sulfate (TSM à 0,3 mM de sulfate) rapportée à l'accumulation dans le milieu non appauvri en sulfate (TSM à 3 mM de sulfate) sont présentés sur la figure 56. A partir de 5 heures d'exposition au séléniate, l'accumulation dans les bactéries limitées en sulfate est significativement différente de celle dans les bactéries non limitées ($p < 0,01$ pour 5 heures d'exposition et $p < 0,001$ pour 10 à 48 heures d'exposition). L'accumulation maximale du sélénium dans les bactéries cultivées dans le milieu à 0,3 mM de sulfate est plus de 6 fois supérieure à celle des bactéries cultivées dans le milieu classique.

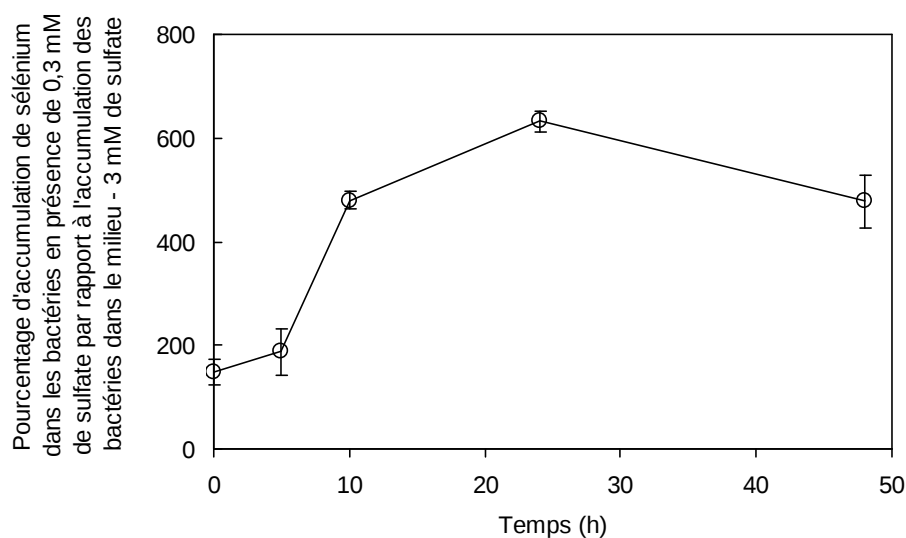


Figure 56 : suivi de l'accumulation de sélénium dans les bactéries cultivées en présence de 2 mM de séléniate ajouté en phase stationnaire dans le milieu TSM contenant 0,3 mM de sulfate. L'accumulation du sélénium dans les bactéries cultivées dans le milieu contenant 0,3 mM de sulfate est exprimée en pourcentage de celle obtenue dans le milieu non appauvri en sulfate (TSM à 3 mM de sulfate). La barre d'erreur correspond à la déviation standard de la moyenne de 3 mesures.

3.2. Etude du transport du séléniate chez les mutants résistants au sélénite

Une étude précédente (Ledgham *et al.*, 2005) a montré que la mutation du gène *dedA* des mutants résistants au sélénite avec lesquels nous travaillons est directement liée à leur résistance au sélénite et à son accumulation dans la bactérie. Ainsi, si le séléniate emprunte un système de transport différent de celui du sélénite, ces mutants doivent avoir conservé les mêmes capacités accumulatrices du séléniate que la souche sauvage.

Les résultats des cinétiques d'accumulation du sélénium après culture des souches mutantes RM6, RM7 et RM8 en présence de 5 mM de séléniate sont identiques à ceux obtenus pour la souche sauvage : moins de 5% du sélénium ajouté dans le milieu de culture est accumulé par les mutants (résultats non montrés). La mutation du gène *dedA* n'a pas d'effet sur la prise en charge du séléniate. Le séléniate n'emprunte pas le transporteur potentiel DedA.

3.3. Induction du transport du séléniate

L'induction d'un mécanisme de transport du séléniate est recherchée comme précédemment (paragraphe 2 de ce chapitre), en cultivant les bactéries en présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique, le chloramphénicol. Ces expériences sont réalisées en cultivant *C. metallidurans* CH34 dans le milieu pauvre en sulfate (0,3 mM de sulfate) à 2 mM de séléniate. L'accumulation du séléniate est ainsi suffisante pour visualiser l'effet de l'inhibiteur de la synthèse protéique sur le transport du séléniate. Les résultats, présentés sur la figure 57, montrent que les bactéries accumulent environ 40% de séléniate en moins lorsque les cultures sont réalisées en présence de chloramphénicol, signifiant que la prise en charge du séléniate nécessite au moins partiellement la synthèse de néo-protéines et qu'elle est donc partiellement induite. La diminution d'accumulation est significative à partir de 5 heures d'exposition ($p < 0,01$ pour 5 heures d'exposition et $p < 0,001$ pour 10 à 48 heures d'exposition).

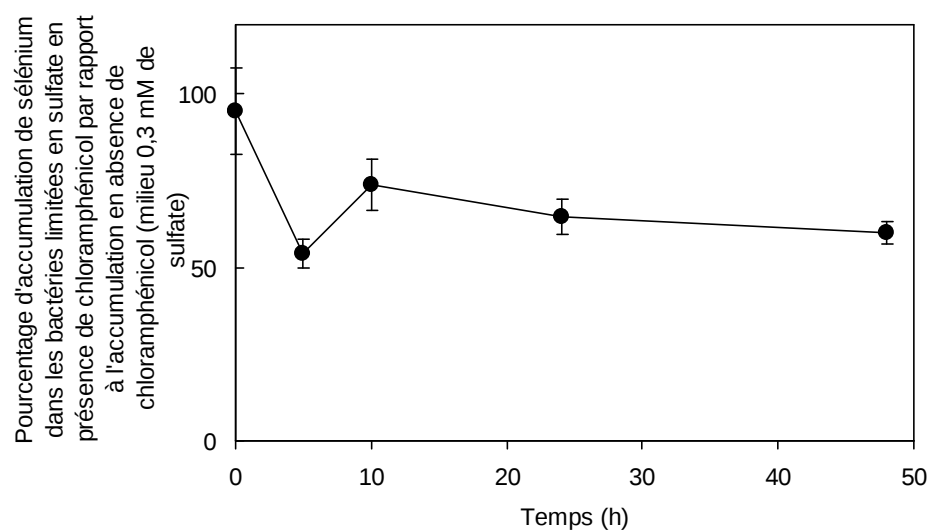


Figure 57 : suivi de l'accumulation de sélénium dans les bactéries en présence de 2 mM de séléniate et de chloramphénicol ajoutés en phase stationnaire dans le milieu TSM contenant 0,3 mM de sulfate par rapport à l'accumulation dans le même milieu en absence de chloramphénicol. La barre d'erreur correspond à la déviation standard de la moyenne de 3 mesures.

Le tableau récapitulatif des résultats des chapitres I et II est complété et présenté ci-après.

	Sélénite	Séléniate
Résistance		
CMI	4 mM	8 mM
Temps de latence	2 mM : 24 h 4 mM : 72 h 6-8 mM : 96 h	2 mM : < 24 h 4-6 mM : 24 h 8-12 mM : 72 h
Vitesse de croissance	0 mM : 0,38 h ⁻¹ 2 mM : 0,14 h ⁻¹ 4-8 mM : 0,12 h ⁻¹	0 mM : 0,38 h ⁻¹ 2-6 mM : 0,30 h ⁻¹ 8-16 mM : 0,15 h ⁻¹
Accumulation		
Quelques valeurs	4-6 mM : 95% soit 2000 à 2600 mg de Se par g de protéines	2 mM : < 2% soit 14 à 18 mg de Se par g de protéines
Facteurs influençant l'accumulation	<u>L'accumulation dépend :</u> • de la concentration initialement présente • de l'état physiologique en phase stationnaire • de la concentration de la source de carbone • de la durée d'exposition	<u>L'accumulation dépend :</u> • de l'état physiologique en phase stationnaire <u>Consommation est indépendante :</u> • de la concentration initialement présente
Transport	• partiellement dépendant de la synthèse de néo-protéines • non inhibé par le sulfate • diminué chez les mutants résistants au sélénite	• partiellement dépendant de la synthèse de néo-protéines • inhibé par le sulfate • pas d'effet chez les mutants résistants au sélénite

Tableau 13 : bilan des résultats des chapitres I à III.

DISCUSSION ET CONCLUSION du chapitre III

Dans ce chapitre, nous avons mis en évidence différents mécanismes de prise en charge du séléniate et du sélénite par *C. metallidurans* CH34.

Prise en charge du séléniate :

Nous avons montré que le séléniate emprunte très probablement le transporteur du sulfate chez *C. metallidurans* CH34. En effet, les bactéries cultivées dans un milieu limité en sulfate incorporent plus de séléniate. Cette augmentation peut s'expliquer par une plus grande quantité de systèmes de transport du sulfate en réponse à des conditions limitées en sulfate comme cela a été démontré chez *Salmonella typhimurium* (Dreyfuss, 1964). Pour de nombreuses bactéries comme pour *C. metallidurans* CH34, la prise en charge du séléniate se ferait par une sulfate perméase (Brown et Shrift, 1980 ; Lindblow-Kull *et al.*, 1985).

De plus, nous avons montré que les cultures réalisées en présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique conduisaient à une diminution de l'accumulation du séléniate dans les bactéries : le chloramphénicol pourrait ralentir le turn-over de la sulfate perméase. Dans la littérature, selon les micro-organismes, le système transportant le sulfate est décrit comme pouvant adapter la quantité de sulfate perméases en fonction des conditions environnementales. Par exemple, lorsque les composés intermédiaires du cycle d'assimilation du soufre sont en concentrations élevées dans le milieu intracellulaire, alors les systèmes de transports et les protéines impliquées sont réprimés (Yildiz *et al.*, 1994 ; Marzluf, 1970).

Enfin, nous avons montré que les mutants résistants au sélénite accumulent le séléniate à un taux comparable aux bactéries de la souche sauvage, confirmant que le mécanisme de prise en charge du séléniate ne fait pas intervenir la protéine DedA.

Prise en charge du sélénite :

Nous avons montré que la prise en charge du sélénite implique au moins deux systèmes de transport : la potentielle protéine DedA et la sulfate perméase.

En effet, quelles que soient les conditions de culture testées, les mutants résistants au sélénite ont perdu leur capacité de forte accumulation du sélénite comparés à la souche sauvage : ils accumulent au maximum 20% de la concentration maximale accumulée par la souche sauvage. Ces résultats sont parfaitement corrélés à ceux publiés par l'équipe de J. Covès sur la consommation du sélénite présent dans le milieu de culture par ces mutants (Ledgham *et al.*, 2005). Les auteurs ont montré que les souches mutantes ne consommaient que 20% du sélénite initial. Nous pouvons estimer que chez *C. metallidurans* CH34, environ 80% du sélénite emprunterait la voie DedA, transporteur probable du sélénite.

Les mutants résistants au sélénite ne possèdent plus cette protéine suite à l'insertion aléatoire du transposon Tn5 dans un gène ayant une forte homologie avec ceux de la famille *dedA*. Les auteurs ont séquencé ce gène *dedA* et la base de données ExPASy montre que la protéine DedA, codée par ce gène, correspond à une protéine à 5 segments transmembranaires supposant son implication dans des fonctions de transport. Bien que cette famille de protéines soit très répandue à travers le phylum bactérien (bactéries Gram positives et négatives ; archaebactéries), ses fonctions restent inconnues (Ledgham *et al.*, 2005).

Nous avons mis en évidence que l'accumulation du sélénite par la souche sauvage est diminuée d'environ 45% en présence d'un inhibiteur de traduction, le chloramphénicol. Etant donné que la voie majoritaire d'accumulation du sélénite serait attribuée au transport via la protéine DedA, le transport du sélénite via cette protéine serait partiellement induit. Des mécanismes d'induction de transporteurs sont décrits chez d'autres souches avec d'autres métaux, par exemple, chez *C. metallidurans* CH34 et *Enterococcus hirae* avec le cuivre et *Pseudomonas aeruginosa* avec le chromate (Silver et Phung, 1996).

La persistance de l'incorporation du sélénite chez les mutants pourrait être assurée par d'autres voies non spécifiques dans lesquelles la sulfate perméase pourrait intervenir. Cependant, l'affinité de la sulfate perméase pour l'oxyanion sélénite est 50 fois moins élevée que pour le sulfate chez *E. coli* (Lindblow-Kull *et al.*, 1985). Le faible taux de transfert du sélénite chez les bactéries sauvages limitées en sulfate et chez les mutants peut s'expliquer par une faible affinité des transporteurs d'autres voies aspécifiques.

A notre connaissance, il n'existe pas de données disponibles sur la caractérisation d'un transport spécifique du sélénite chez les micro-organismes. Très récemment, une protéine SmoM, composant périplasmique d'un système de transport TRAP, a été suggérée pour transporter le sélénite chez *Rh. sphaeroides* (Bernier-Pierru, 2006). Une étude avec *E. coli* a montré que l'import du sélénite est effectué au travers du transporteur sulfate mais la répression de ce transporteur n'inhibe pas complètement la consommation du sélénite, suggérant le passage du sélénite par un autre transporteur (Turner *et al.*, 1998). Une autre étude avec *E. coli* a mis en évidence l'expression d'une protéine GutS en réponse à la présence de sélénite ou de tellurite. La protéine GutS, codée par le gène *gutS*, est une protéine de 43 kDa présentant de forte homologie avec des protéines impliquées dans le transport de molécules organiques et de sucres (Guzzo et Dubow, 2000). Chez *S. typhimurium*, le sélénite est assimilé indépendamment de la voie du sulfate puisque le transport est détecté à la fois chez les bactéries sauvages réprimées pour le transport du sulfate et chez les mutants ayant perdu les fonctions de la sulfate perméase (Brown et Shrift, 1980).

La résistance au sélénite de *C. metallidurans* CH34 repose sur sa réduction en sélénium élémentaire comme cela a été démontré dans une étude précédente (Roux *et al.*, 2001). En revanche la résistance au séléniolate est méconnue chez *C. metallidurans* CH34 puisque l'on ne connaît pas le mécanisme de transformation et les éventuels intermédiaires générés. L'étude de la cinétique de transformation du sélénite et du séléniolate par *C. metallidurans* CH34 au cours de la croissance cellulaire fait l'objet du chapitre suivant.

RESULTATS CHAPITRE IV

IV. MECANISMES DE REDUCTION DES OXYANIONS DE SELENIUM CHEZ *C. metallidurans* CH34

Nous avons montré dans les chapitres précédents que *C. metallidurans* CH34 est capable de résister au sélénium (chapitre I) et d'accumuler fortement le sélénite et dans une moindre mesure le séléniate (chapitre II). Le chapitre III a permis de mettre en évidence des voies de prise en charge différentes pour les deux oxyanions, suggérant des mécanismes de résistance, transport et accumulation distincts.

A ce jour, ces mécanismes sont peu connus. Afin d'apporter des éléments de réponse et de les caractériser, les formes de sélénium accumulées dans les bactéries sont recherchées au cours de la croissance microbienne chez la souche sauvage et chez les mutants résistants au sélénite. La spectroscopie d'absorption des rayons X (XANES et EXAFS) et l'analyse ICP-MS sont combinées pour identifier et quantifier les espèces sélénées accumulées dans les bactéries. La microscopie électronique à transmission couplée à de l'analyse dispersive en énergie (EDX) permet l'observation et l'identification de formes précipitées de sélénium. Les espèces sélénées solubles sont identifiées par HPLC-ICP-MS. Les protéines ayant incorporé du sélénium sont recherchées par SDS-PAGE-PIXE. Ces informations pourront permettre d'estimer l'importance relative de plusieurs voies de transformation des oxyanions du sélénium chez *C. metallidurans* CH34.

1. Spectroscopie par absorption des rayons X de composés de référence

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

La technique XANES (X-ray absorption near edge structure), au seuil K du sélénium, apporte des informations sur l'état d'oxydation et la forme chimique de cet élément. Sa sensibilité est aujourd'hui bien établie (Pickering *et al.*, 1995 ; Pickering *et al.*, 1999). Le sélénium élémentaire (degré d'oxydation (0)), le sélénite (degré d'oxydation (+IV)), le séléniate (degré d'oxydation (+VI)) et plusieurs espèces de sélénium organique (états d'oxydation (-II)) peuvent être identifiés.

La figure 58 montre les spectres des composés de référence utilisés dans cette étude. L'énergie au saut d'absorption est déterminée par la dérivée du seuil grâce au programme Winxas.

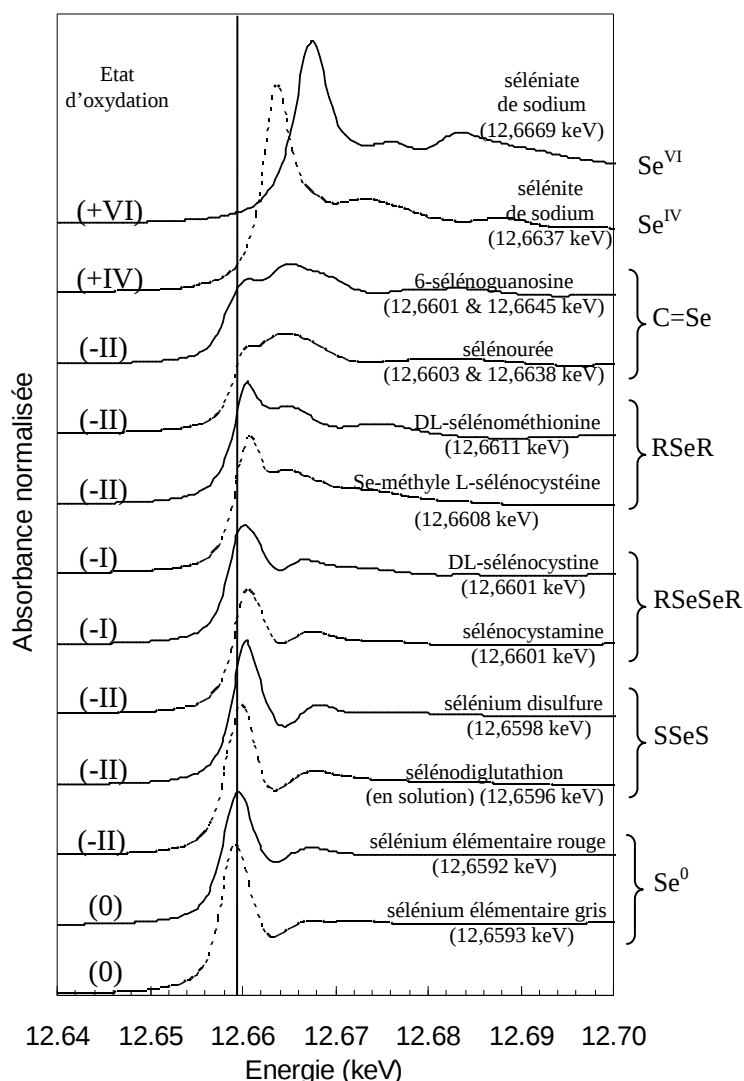


Figure 58 : spectres XANES au seuil K du sélénium de composés de référence (les références sont sous forme de poudre lorsque l'état n'est pas spécifié). La valeur entre parenthèses correspond à l'énergie du pic principal. La droite indique la position du pic principal du sélénium élémentaire rouge. Le radical R correspond à un groupement alkyle.

Le tableau 14 montre la discrimination des composés de référence en fonction de la différence d'énergie du spectre au saut de seuil d'absorption. Les espèces inorganiques, sélénium élémentaire rouge (Se⁰), sélénite (Se^{IV}) et séléniate (Se^{VI}), sont différenciables puisque la différence en énergie du saut de seuil est suffisante pour les distinguer. Le déplacement en énergie du maximum de la raie blanche entre le degré d'oxydation 0 (sélénium élémentaire) et certaines espèces au degré d'oxydation –II (alkyle sélénures (RSeR) avec Se-méthyle L-sélenocystéine et sélenométhionine) est également suffisant pour les distinguer.

En revanche, il est difficile par XANES de différencier le triplet Se⁰, RSSeSR et RSeSeR et le doublet RSeSeR et RSeR, car le déplacement en énergie est inférieur à 0,5 eV.

L'espèce sélénocystéine (RSeH), composé instable, n'a pas pu faire parti de notre base de données.

Composés de référence	Différences d'énergie entre les sauts de seuil (eV)
Se ⁰ / Se ^{IV} / Se ^{VI}	3,2 à 7,8
Se ⁰ et RSeR	1,6
RSSeSR et RSeR	1
Se ⁰ / RSSeSR / RSeSeR	< 0,5
RSeSeR et RSeR	< 0,5

Tableau 14 : différence d'énergie entre les sauts de seuil des composés de références. Une différence inférieure à 0,5 eV de la valeur d'énergie du pic principal ne permet pas la différenciation des espèces en mélange à partir des données XANES.

2. Cinétiques de transformation des oxyanions du sélénium

Les spectres XANES obtenus après analyse des culots bactériens prélevés au cours de la croissance microbienne sont exploités d'une part par une approche statistique par analyse en composante principale (ACP), qui détermine le nombre d'espèces de sélénium présentes dans les bactéries et d'autre part, par analyse par combinaison linéaire des spectres de référence disponibles dans notre base de données, qui précise les espèces et détermine leurs pourcentages respectifs (cf. Matériels et méthodes, chapitre III.2).

Dans tous les échantillons bactériens que nous avons analysés, aux temps d'exposition les plus courts au sélénite ou au séléniate, et même pour des faibles taux d'accumulation, les espèces sélénées ont pu être détectées. L'analyse d'un échantillon bactérien issu d'une culture non exposée au sélénium n'a pas présenté de quantité détectable de sélénium par rayonnement X. Dans le cas des échantillons récoltés après exposition au sélénite ou au séléniate, le sélénium détecté est bien un produit de réaction de l'oxyanion et non pas du sélénium constitutif contenu dans les acides aminés et/ou les protéines.

2.1. Cinétique de transformation du sélénite par la souche sauvage

La figure 59 présente des spectres XANES des échantillons bactériens après exposition à 2 mM de sélénite. Le sélénite est ajouté à différents stades de la croissance microbienne : en début, milieu et fin de phase exponentielle de croissance (cultures présentées dans le chapitre II).

Lorsque le sélénite est ajouté en début de croissance (absorbance à 600 nm de 0,3), le maximum de la raie blanche se situe à 12,6637 keV (t = 0 heure). On note la présence d'un

léger épaulement dans la zone des faibles énergies, suggérant que la bactérie contient du sélénite et probablement une proportion minoritaire de sélénium organique. De 1 à 48 heures d'exposition au sélénite, les spectres sont identiques et le saut de seuil s'effectue à 12,6599 keV, valeur d'énergie intermédiaire entre l'espèce organique RSeR et le Se^0 . A 96 heures d'exposition, le saut de seuil se déplace légèrement vers les basses énergies (maximum à 12,6596 keV) et atteint la position de Se^0 à partir de 120 heures d'exposition (12,6592 keV).

L'approche statistique ACP indique que la série de spectres peut être décrite en composant un mélange de 3 espèces sélénées. La simulation avec les spectres des composés de références de notre base de données identifie le sélénite (Se^{IV}), le sélénium élémentaire rouge (Se^0) et un alkyle séléniure RSeR comme composés principaux.

La répartition des espèces sélénées dans les bactéries au cours de la croissance microbienne déterminée par ce traitement est reportée sur la figure 59. On note qu'immédiatement après l'introduction du sélénite, le sélénium accumulé dans les bactéries est composé pour 60% de sélénite et 40% de sélénium organique (RSeR). Puis, de 1 heure d'exposition jusqu'à la fin de la phase de latence (48 heures), une proportion équivalente de RSeR et de Se^0 est présente dans les bactéries. A partir de 96 heures d'exposition au sélénite (phase stationnaire de croissance), Se^0 devient l'espèce majoritaire, puis l'espèce unique détectée en fin d'expérience (au-delà de 120 heures d'exposition).

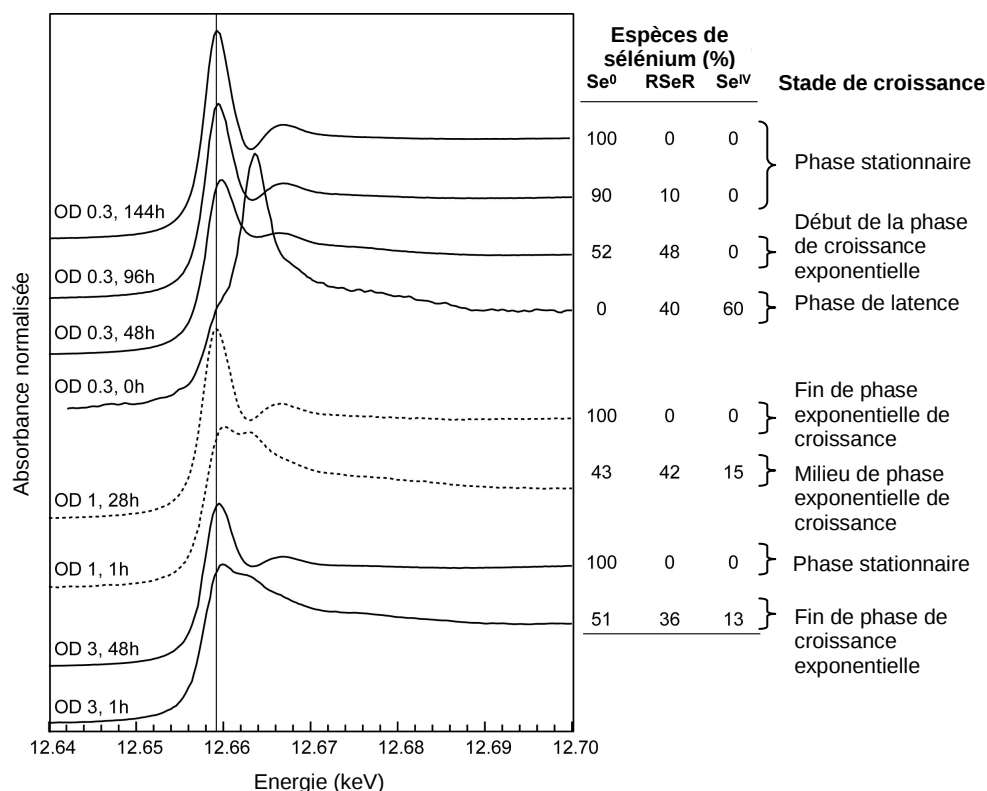


Figure 59 : spectres XANES au seuil K du sélénium et distribution des espèces sélénées obtenus à différents temps d'exposition de *C. metallidurans* CH34 à 2 mM de sélénite. Le sélénite est ajouté dans le milieu de culture à différents stades de la croissance (OD, ou absorbance à 600 nm, à 0,3, 1 ou 3). La distribution des espèces de sélénium est déterminée par la simulation de combinaisons linéaires à partir de spectres de références.

La figure 60 présente les concentrations de chacune des espèces sélénées au cours de la croissance microbienne lorsque le sélénite est ajouté dans le milieu de culture en début de croissance (absorbance à 600 nm de 0,3). Elles sont déterminées par normalisation des pourcentages d'espèces présentés sur la figure 59 par la concentration en sélénium total accumulé dans les bactéries. Durant la période de faible accumulation, les quantités de RSeR et de Se⁰ présentes dans les bactéries restent inférieures à 20 mg de sélénium par g de protéines. Lors de la période de forte accumulation qui suit (de 48 à 96 heures d'exposition), la concentration en RSeR est quasi constante (de 15 à 20 mg de sélénium par g de protéines), alors que la concentration en Se⁰ augmente fortement (de 20 à 140 mg de sélénium par g de protéines). Toutefois, la forme dominante du Se⁰ au-delà de 120 heures d'exposition peut masquer de faibles concentrations d'autres espèces sélénées. La limite de détection est estimée à 5% du sélénium total.

Lorsque le sélénite est ajouté au cours de la phase exponentielle de croissance (absorbance à 600 nm de 1) et en début de phase stationnaire (absorbance à 600 nm de 3), des évolutions similaires de la spéciation sont observées (figure 59). Les espèces RSeR et Se⁰ sont détectées durant la période de faible accumulation au profit de la seule espèce Se⁰ pendant la forte accumulation. On constate que la production de Se⁰ est plus rapide à hautes valeurs de

densités cellulaires. Par exemple, à 48 heures d'exposition, la bactérie contient 99 mg de Se^0 par g de protéines quand le sélénite est ajouté à une absorbance à 600 nm de 1 comparé à 20 mg de Se^0 par g de protéines quand le sélénite est ajouté à une absorbance à 600 nm de 0,3.

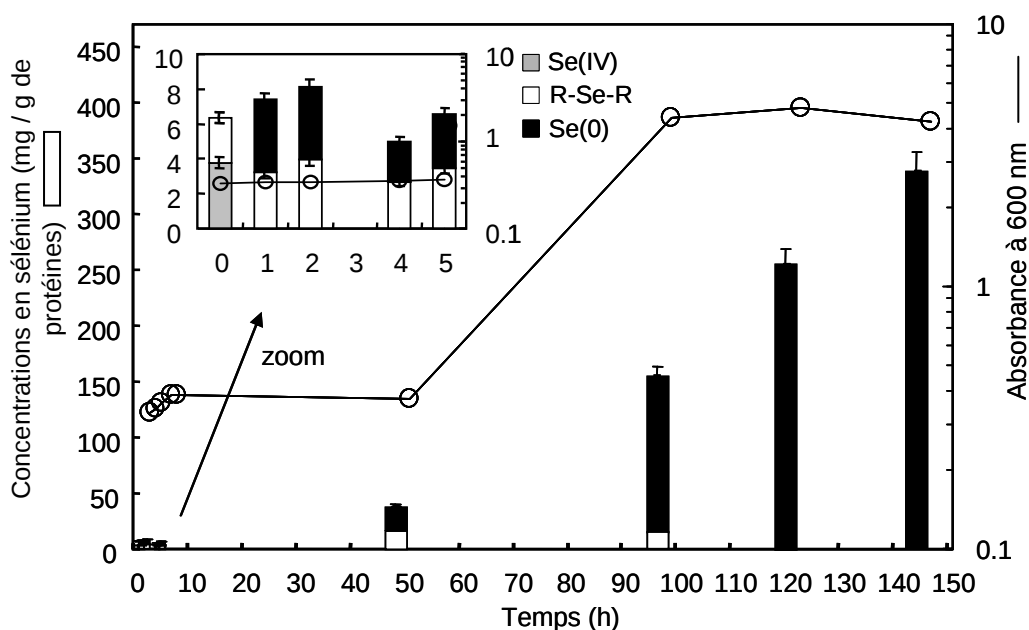


Figure 60 : cinétique de réduction du sélénite au cours de la croissance de *C. metallidurans* CH34. 2 mM de sélénite sont ajoutés au moment de l'inoculation (absorbance à 600 nm de 0,3). La croissance est suivie par lecture de l'absorbance à 600 nm. Les espèces de sélénium sont déterminées par combinaison linéaire des spectres XANES. Les concentrations en sélénium sont obtenues par normalisation des pourcentages d'espèces par la concentration en sélénium total déterminée par ICP-MS. La barre d'erreur correspond à $\pm 5\%$ du sélénium total.

Il est à noter que les espèces méthyles de sélénium sont minoritaires puisque le bilan de matière entre la quantité de sélénium accumulée dans les bactéries et la quantité de sélénite initialement présente dans le milieu de culture est supérieur à 90%.

2.2. Cinétique de transformation du sélénite par les mutants

La figure 61 présente les spectres XANES et la répartition des espèces au cours de l'accumulation du sélénite chez la souche mutante RM7. Des résultats similaires sont obtenus avec la souche RM8 (résultats non présentés). Pour ces expériences, les bactéries sont exposées à 10 mM de sélénite, ajouté soit en début soit en fin de phase exponentielle de croissance.

Durant les 6 premières heures après ajout du sélénite en début de croissance exponentielle (absorbance à 600 nm de 0,3), l'énergie de la raie blanche du spectre XANES se situe à 12,6596 keV, ce qui correspond à une énergie intermédiaire entre le maximum de la raie blanche de l'espèce organique RSeR et du sélénium élémentaire Se^0 . Puis de 12 à 34 heures d'exposition au sélénite, les spectres sont identiques : le saut de seuil se situe à une énergie de 12,6601 keV. De 48 à 96 heures, il s'effectue à plus basse énergie : 12,6595 keV.

Pour cette série de spectres, la simulation avec le programme de combinaison linéaire et la base de données de références sélénées de notre base de données conduit, comme dans le cas de la souche sauvage, à la détection de trois espèces principales dans les échantillons issus des bactéries mutantes : le sélénite, le sélénium élémentaire et un alkyle séléniure RSeR.

Pendant la phase de latence, c'est-à-dire durant les 6 premières heures d'exposition, le sélénium organique RSeR et le sélénium élémentaire Se^0 sont détectés mais l'espèce Se^0 est majoritaire. Entre 12 et 34 heures d'exposition (c'est-à-dire entre la fin de la phase de latence et le début de la phase exponentielle de croissance), le mélange entre le RSeR et le Se^0 s'équilibre. De 48 à 96 heures d'exposition, le sélénium élémentaire devient à nouveau majoritaire (plus de 85%). Durant cette période, la proportion de RSeR fluctue (de 7 à 34%). Il est à noter que la proportion de sélénite détectée en début de cinétique n'est pas significative ($< 10\%$). Cependant, la reconstruction du spectre en tenant compte de cette espèce améliore la simulation (par exemple à 6 heures d'exposition, la qualité de l'ajustement est améliorée de 36%).

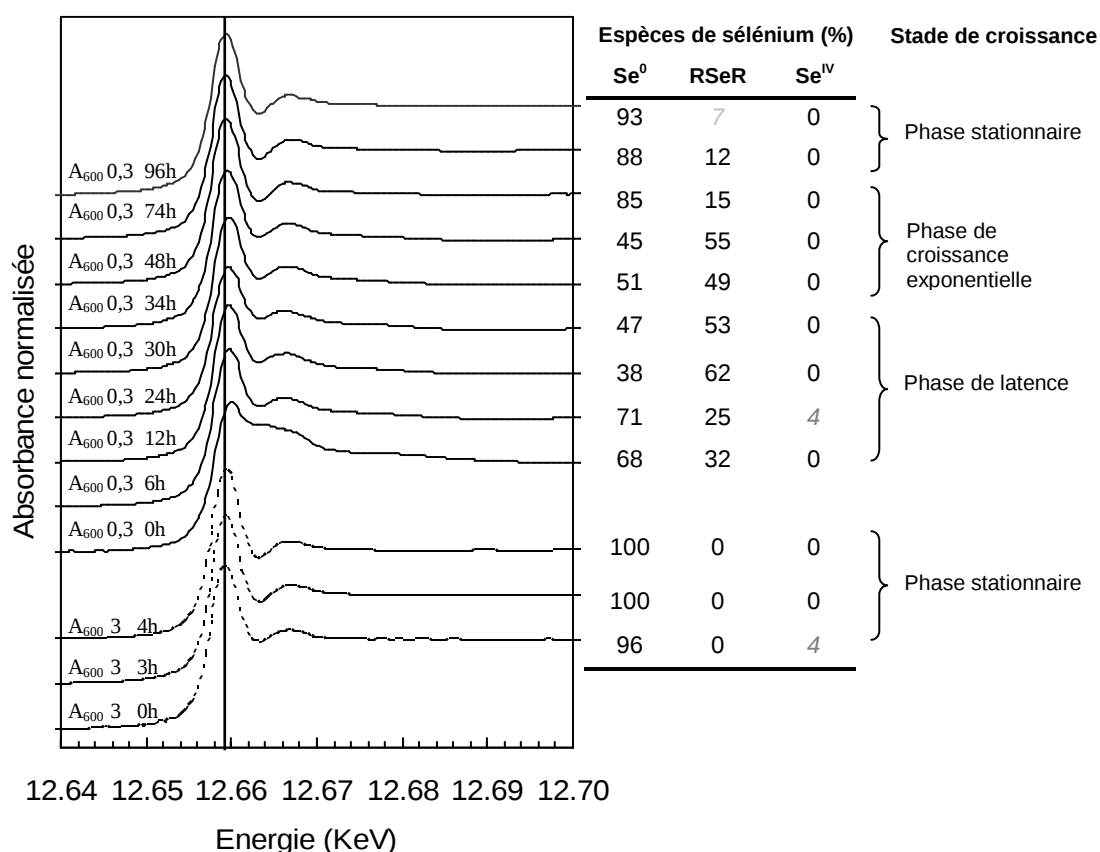


Figure 61 : spectres XANES au seuil K du sélénium et distribution des espèces sélénées obtenus après différents temps d'exposition de la souche mutante RM7 à 10 mM de sélénite. Le sélénite est ajouté dans le milieu de culture à différents stades de la croissance (absorbance à 600 nm (A_{600}) de 0,3 et 3). La distribution des espèces de sélénium est déterminée par la simulation de combinaison linéaire à partir de spectres de références. La droite indique la position du pic principal du sélénium élémentaire rouge. Les valeurs en dessous de 10% ne sont pas significatives (valeurs grises en italiques).

L'évolution au cours de la croissance des concentrations de chacune des espèces sélénées accumulées dans les bactéries lorsque le sélénite est ajouté à une absorbance de 0,3 est présentée sur la figure 62. Les concentrations en sélénium dans les bactéries sont déterminées par normalisation des pourcentages d'espèces présentés sur la figure 61 par la concentration en sélénium total accumulé dans les bactéries.

Durant la phase de latence, Se^0 est en concentrations supérieures à RSeR (respectivement, 14 et 6 mg par g de protéines). Au cours de la phase exponentielle de croissance, ces deux espèces sont en concentrations équivalentes et ne dépassent pas 12 mg de sélénium par g de protéines. De 48 à 96 heures d'exposition, la concentration en RSeR augmente de 8 à 23 mg de sélénium par g de protéines. Pour la souche sauvage, la concentration en RSeR atteignait en moyenne 17 mg par g de protéines entre 48 et 96 heures d'exposition.

Enfin et comme cela a déjà été souligné dans le cas de la souche sauvage, le sélénite ajouté à haute densité cellulaire (absorbance à 600 nm de 3) entraîne une production de sélénium élémentaire plus rapide. Par exemple, à 4 heures d'exposition, la bactérie RM7 contient 27 mg de Se^0 par g de protéines quand le sélénite est ajouté à une absorbance à 600 nm de 3, comparé à 14 mg de Se^0 par g de protéines à 5 heures d'exposition quand le sélénite est ajouté à une absorbance à 600 nm de 0,3.

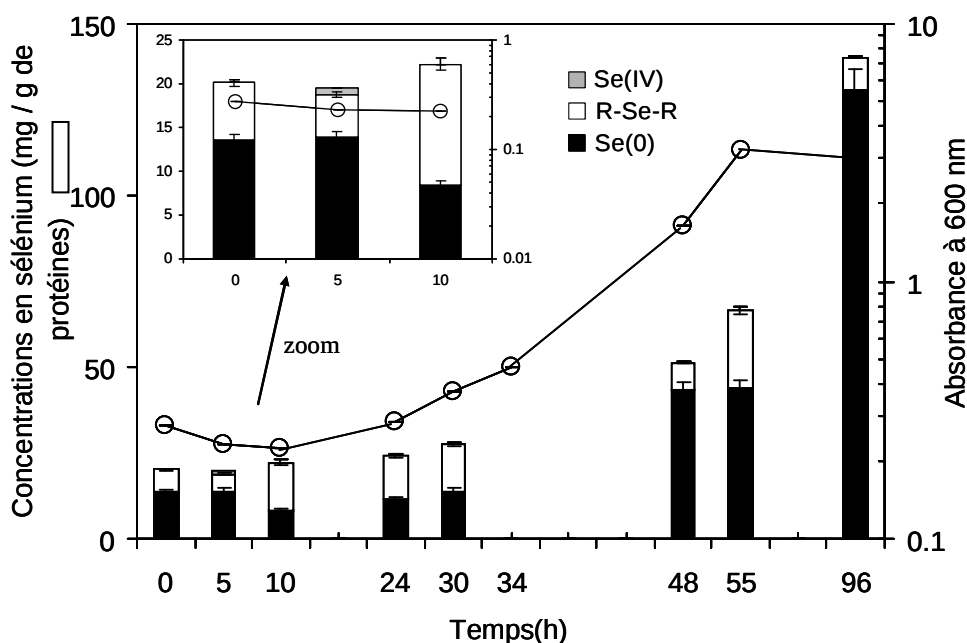


Figure 62 : cinétique de réduction du sélénite au cours de la croissance de RM7. 10 mM de sélénite sont ajoutés au moment de l'inoculation (absorbance à 600 nm de 0,3). La croissance est suivie par lecture de l'absorbance à 600 nm. Les espèces de sélénium sont déterminées par combinaison linéaire des spectres XANES. Les concentrations en sélénium sont obtenues par normalisation des pourcentages d'espèces par la concentration en sélénium total déterminée par ICP-MS. La barre d'erreur correspond à $\pm 5\%$ du sélénium total.

2.3. Caractérisation des particules de sélénium élémentaire formées après exposition au sélénite

Le sélénium élémentaire formé par réduction du sélénite conduit à l'apparition d'une coloration rouge caractéristique de la culture (figure 63). Le sélénium élémentaire est insoluble en milieu aqueux. Lorsque *C. metallidurans* CH34 transforme le sélénite en sélénium élémentaire, celui-ci précipite dans les bactéries sous la forme de nanoparticules denses observables par microscopie électronique à transmission. La cinétique de formation de ces particules est suivie au cours de l'exposition de *C. metallidurans* CH34 à 2 mM de sélénite ajouté en début de phase exponentielle de croissance ou en phase stationnaire (figure 64). Les bactéries sont observées après dépôt direct de suspension de culture sur une grille de microscopie (microphotographies A à E) ou après réalisation de coupes ultra fines de culots bactériens (microphotographies F à H).

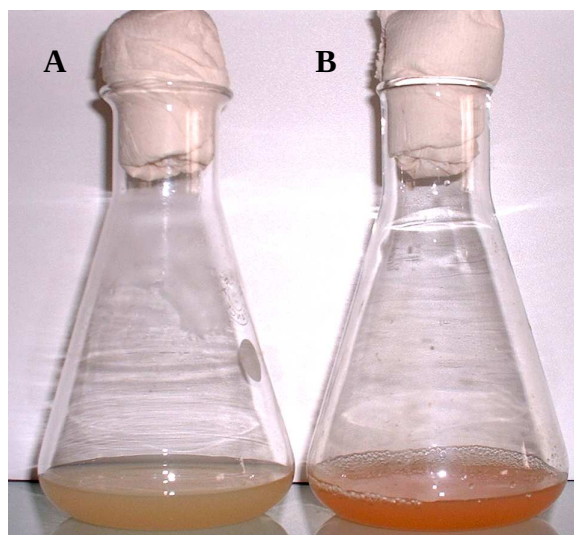


Figure 63 : cultures de *C. metallidurans* CH34 en absence (A) et en présence de 2 mM de sélénite (B). La coloration rouge de la culture (B) reflète la réduction du sélénite en sélénium élémentaire.

La première méthode permet de visualiser les particules denses aux électrons par transparence à travers la membrane bactérienne. Il est ainsi possible d'estimer le pourcentage de bactéries contenant une particule de sélénium. Que le sélénite soit ajouté en début de phase exponentielle de croissance ou en phase stationnaire, on observe au maximum une particule par bactérie. Lorsque le sélénite est ajouté au moment de la phase stationnaire, 43% des bactéries contiennent une particule de sélénium au bout de 3 heures de contact (figure 64C). Lorsque le sélénite est ajouté en début de phase stationnaire, 74% des bactéries contiennent une particule au bout de 24 heures d'exposition (cf. tableau 15). Il est à noter que de nombreuses particules denses sont présentes dans le milieu extracellulaire (figures 64C et 64G). C'est à ce moment que la coloration rouge de la culture apparaît.

La seconde méthode permet de préciser finement la localisation de la particule dans la bactérie. Les particules de sélénium sont des sphères régulières présentes principalement dans le cytoplasme des bactéries dès les premières heures d'exposition lorsque la culture est en phase stationnaire (figure 64F). Plus rarement, des particules sont observées dans l'espace périplasmique (figure 64H). La taille des particules augmente avec le temps d'exposition au sélénite (tableau 15) : le diamètre moyen des particules au cours de la cinétique est de 100 nm. De plus grosses particules sont observées à l'intérieur des bactéries ou adsorbés à la surface des bactéries aux temps longs d'exposition (diamètre jusqu'à 250 nm). L'analyse EDX focalisée sur une particule dense de coupe ultra fine de bactéries révèle la présence de sélénium mais également d'oxygène, de chlore et de phosphore (figure 65).

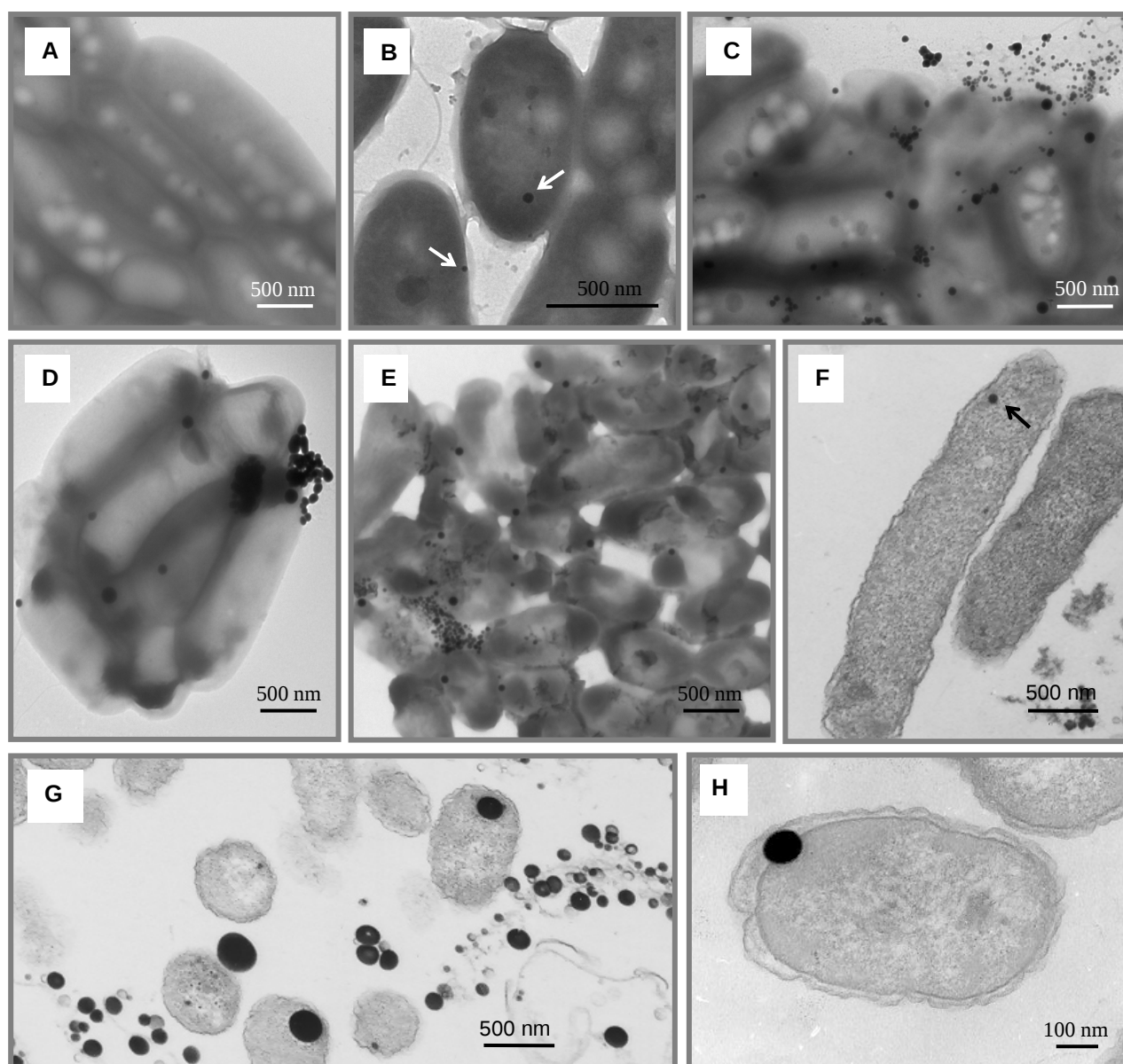


Figure 64 : cinétique de formation des particules de sélénium élémentaire par *C. metallidurans* CH34 au cours de l'exposition à 2 mM de sélénite. Les observations de cellules entières (A à E) et de coupes ultra fines de bactéries (F et G) sont réalisées par microscopie électronique à transmission. Durées de l'exposition au sélénite des cellules entières : (A) 0 minute, (B) 1h30, (C) 3h, (D et E) 24h. (F) coupe ultra fine de bactéries après 6h de contact avec le sélénite contenant une particule de sélénium élémentaire dans son cytoplasme et (G) coupe ultra fine de bactéries après 17h de contact avec le sélénite montrant à la fois des particules de sélénium élémentaire à l'extérieur et à l'intérieur des bactéries dans le cytoplasme ou dans l'espace périplasmique (H). Les cellules entières sont prélevées à partir d'une culture de *C. metallidurans* CH34 exposée au sélénite à densité cellulaire fixe ($A_{600} = 10$ dans le milieu TSM contenant 0,2% de gluconate). Les coupes ultra fines sont obtenues au cours d'une culture en croissance de *C. metallidurans* CH34 en présence de sélénite ajouté en début de croissance exponentielle le milieu TSM contenant 2% de gluconate.

Durée d'exposition à 2 mM de sélénite	Diamètre des particules adsorbées ou à l'intérieur des bactéries (nm)	Bactéries contenant 1 particule (%)
1 h 30 < t < 3 h	30 - 90	< 10 (n = 50)
3 h < t < 24 h	60 - 90	43 (n = 89)
> 24 h	100 - 175	74 (n = 73)

Tableau 15 : taille des particules de sélénium élémentaire observées au cours de l'exposition de *C. metallidurans* CH34 à 2 mM de sélénite. n correspond au nombre total de bactéries comptées.

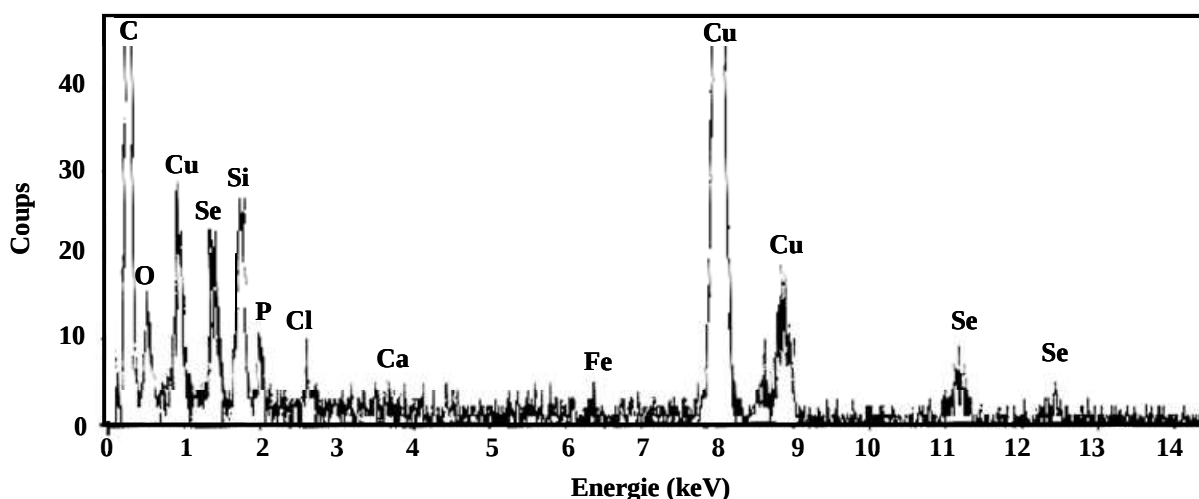


Figure 65 : spectre EDX d'une particule dense dans le cytoplasme d'une bactérie exposée à 2 mM de sélénite. Le signal du sélénium se situe à 1,37 keV (raie $SeL\alpha$), 11,22 (raie $SeK\alpha$) et 12,49 keV (raie $SeK\beta$). Les pics d'énergie correspondant au cuivre sont dus à l'interaction du faisceau électronique avec la grille de cuivre où sont déposées les coupes ultra-fines.

Les granules de sélénium isolés d'une culture bactérienne après exposition au sélénite sont également observés après dépôt direct sur grille de microscopie électronique à transmission. La figure 66 permet de les comparer à des granules de sélénium élémentaire abiotiques (préparés par synthèse chimique). Il est à noter que les particules biotiques sont isolées les unes des autres. Les particules de synthèse forment des agrégats de tailles hétérogènes. La taille moyenne des particules abiotiques est environ cinq fois supérieure à celle des particules formées par les bactéries (nanoparticules) (figure 66B).

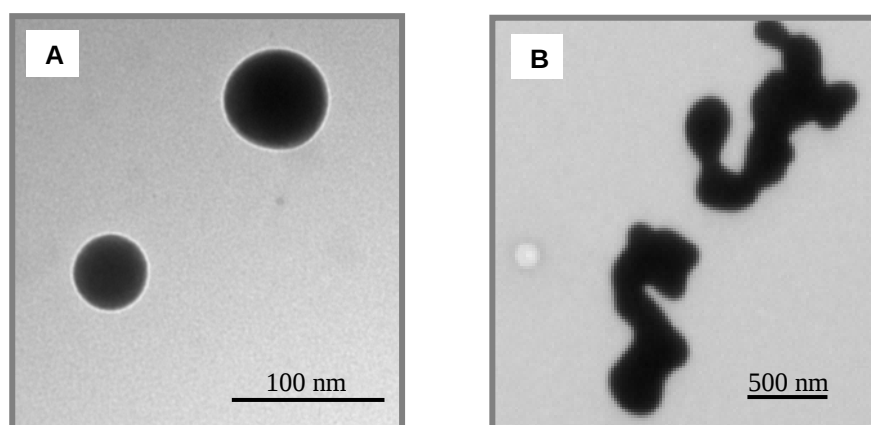


Figure 66 : microphotographies prises au microscope électronique à transmission de particules de sélénium élémentaire. (A) particules de sélénium élémentaire isolées d'une culture en fin de réduction de 2 mM de sélénite. (B) particules de sélénium élémentaire abiotiques synthétisées par réduction du sélénite avec l'acide ascorbique.

2.4. Cinétique de transformation du séléniate par la souche sauvage

La figure 67 présente des spectres XANES et la répartition des espèces dans les bactéries aux différents stades de la croissance après exposition à 2 mM de séléniate. L'approche ACP pour cette série de spectres propose la présence de trois espèces de sélénium : le séléniate, le sélénite et une espèce organique identifiée comme un alkyle séléniure RSeR.

Lorsque le séléniate est ajouté dans le milieu de culture à une absorbance à 600 nm de 0,3, l'espèce séléniate Se^{VI} est détectée dans les culots bactériens durant les 12 premières heures d'exposition. A 12 heures d'exposition au séléniate, les bactéries contiennent un mélange de Se^{VI} , Se^{IV} et RSeR. La simulation du spectre obtenu à partir de l'échantillon collecté à 24 heures d'exposition au séléniate est significativement améliorée en ajoutant le Se^0 à la reconstruction (la qualité de l'ajustement est améliorée de 27% en ajoutant 8% de Se^0). Toutefois, cette espèce n'est pas un composé principal du système. A des temps d'exposition plus longs, le RSeR devient la seule espèce détectée.

Lorsque le séléniate est ajouté en milieu de phase exponentielle (absorbance à 600 nm de 1), la même évolution de spéciation du sélénium est observée. La reconstruction du signal propose deux composés principaux. L'alkyle séléniure RSeR reste l'espèce majoritaire quel que soit le temps d'exposition. Le séléniate n'est plus détecté. Le sélénium élémentaire est présent dans des proportions plus importantes, jusqu'à 27% du sélénium total aux temps courts.

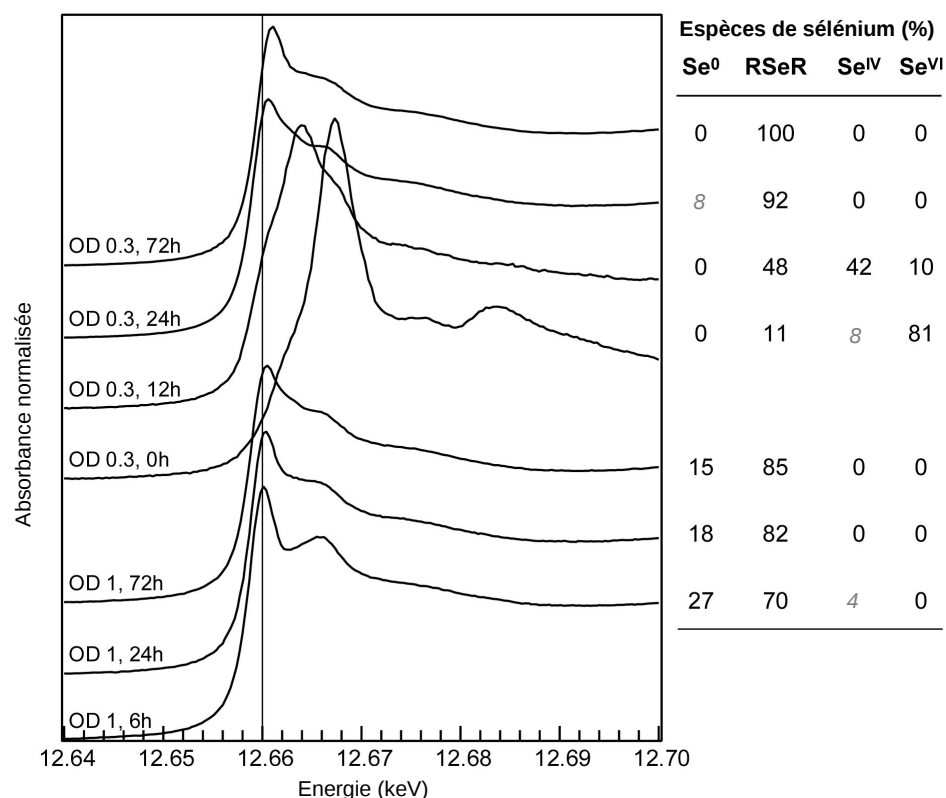


Figure 67 : spectres XANES au seuil K du sélénium et distribution des espèces sélénées obtenus à différents temps d'exposition de *C. metallidurans* CH34 à 2 mM de séléniate. Le séléniate est ajouté dans le milieu de culture à différents stades de la croissance (OD correspond à l'absorbance à 600 nm de 0,3 ou 1). La distribution des espèces sélénées est déterminée par la simulation de combinaison linéaire à partir de spectres de références. Les valeurs en dessous de 10% ne sont pas significatives (valeurs grises en italiques).

La figure 68 montre l'évolution des concentrations de chacune des espèces au cours de la croissance bactérienne lorsque le séléniate est ajouté à une absorbance à 600 nm de 0,3. La concentration en RSeR, espèce majoritaire au cours de la transformation du séléniate, reste inférieure à 20 mg par g de protéines comme dans le cas de l'exposition au sélénite. Les 8% de Se⁰ détectés dans la culture exposée à une absorbance à 600 nm de 0,3 correspondent à 1 mg de Se⁰ par g de protéines. Pour la culture exposée à une absorbance à 600 nm de 1, la concentration en Se⁰ dans la bactérie ne dépasse pas 2,1 mg par g de protéines.

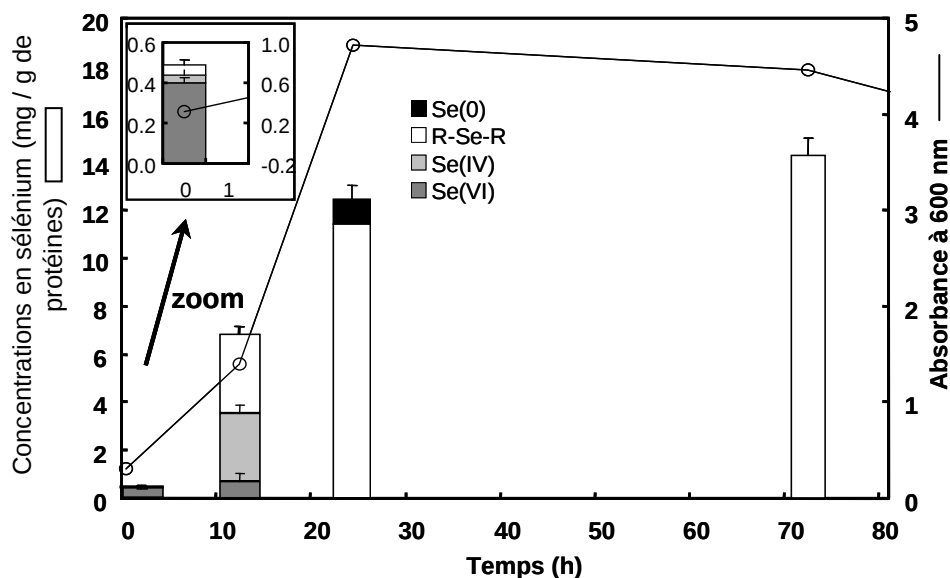


Figure 68 : cinétique de réduction du séléniate durant la croissance de *C. metallidurans* CH34. 2 mM de séléniate sont ajoutés au moment de l'inoculation (absorbance à 600 nm de 0,3). La croissance est suivie par lecture de l'absorbance à 600 nm. Les espèces de sélénium sont déterminées par combinaisons linéaires des spectres XANES. Les concentrations en sélénium sont obtenues par normalisation des pourcentages d'espèces par la concentration en sélénium total déterminée par ICP-MS. La barre d'erreur des espèces sélénées correspond à $\pm 5\%$ du sélénium total.

2.5. Cinétique de transformation du séléniate par les mutants

La figure 69 présente les spectres XANES et la répartition des espèces lors de la cinétique de réduction du séléniate chez les souches mutantes RM6, RM7 et RM8. Les bactéries mutantes ont été exposées à 5 mM de séléniate ajoutés en fin de phase exponentielle de croissance (absorbance à 600 nm de 3).

La simulation avec le programme de combinaison linéaire et notre base de données de références sélénées conduit à la détection des deux espèces séléniate et un alkyle séléniure RSeR dans les échantillons issus des bactéries mutantes.

Chez les trois souches mutantes après 6 heures d'exposition au séléniate, l'espèce séléniate est majoritaire (de 70 à 82%) ; l'espèce RSeR est présente à hauteur de 18 à 38%. Puis de 24 à 48 heures d'exposition au séléniate, l'espèce organique RSeR devient majoritaire (90 à 95%).

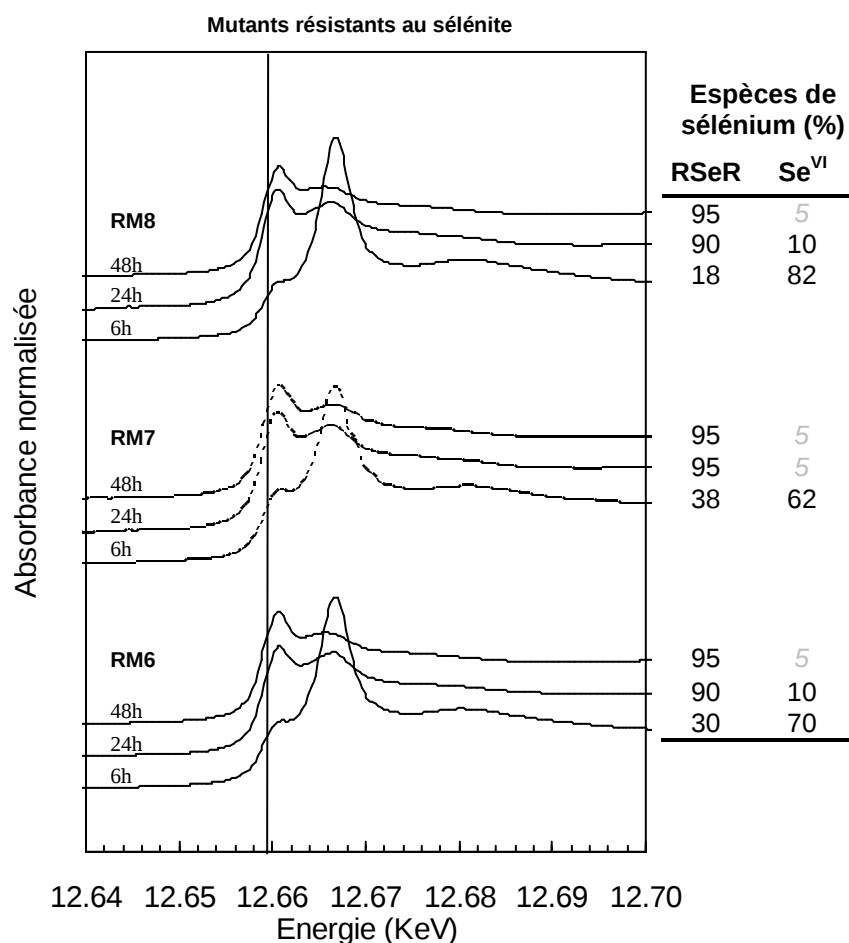


Figure 69 : spectres XANES au seuil K du sélénium et distribution des espèces séléniées obtenus à différents temps d'exposition des souches mutantes RM6, RM7 et RM8 à 5 mM de séléniat. Le séléniat est ajouté dans le milieu de culture à une absorbance à 600 nm de 3. La distribution des espèces de sélénium est déterminée par la simulation de combinaison linéaire à partir de spectres de références. La droite indique la position du pic principal du sélénium élémentaire rouge. Les valeurs en dessous de 10% ne sont pas significatives (valeurs grises en italiques).

L'évolution des concentrations des espèces séléniées est obtenue par normalisation des pourcentages d'espèces présentés sur la figure 69 par la concentration en sélénium total (résultats non montrés). A 6 heures d'exposition, de 10 à 15 mg de séléniat par g de protéines sont présents dans les souches mutantes. La concentration en alkyle séléniure RSeR est voisine de celle déterminée pour la souche sauvage (16 mg par g de protéines à 48 heures d'exposition pour le mutant RM8 par exemple).

2.6. Compétition entre le sélénite et le séléniat lors de la réduction du sélénium

Nous avons montré qu'au cours de la croissance microbienne, le sélénite accumulé dans les bactéries est complètement réduit en sélénium élémentaire. Par ailleurs, l'exposition des bactéries au séléniat conduit à sa faible accumulation dans la bactérie. Le séléniat se transforme pour une fraction en sélénite. Par exemple à 12 heures d'exposition, 42% du

séléniate accumulé dans les bactéries est transformé en sélénite, soit environ 3 mg par g de protéines. Ce sélénite intracellulaire ne conduit cependant pas à la formation de sélénium élémentaire. Afin de comprendre cette différence de comportement, nous avons testé l'éventuelle compétition entre le sélénite et le séléniate lors de la réduction du sélénite : est-ce que la présence de séléniate pourrait empêcher la transformation du sélénite en sélénium élémentaire ?

Les bactéries sont exposées à la fois au sélénite et au séléniate, introduits en même temps ou à des temps différents (l'une des espèces est introduite 3 heures après l'autre), à des concentrations équivalentes (2 mM) ou différentes (1 mM de sélénite et 10 mM de séléniate). Dans chacun de ces cas, les cultures deviennent rouges au lendemain de l'exposition, démontrant la réduction du sélénium en sélénium élémentaire. Le séléniate n'inhibe pas la réduction du sélénite.

3. Réduction du séléniate en milieu limité en sulfate : compétition entre le séléniate et le sulfate

3.1. Identification et quantification des espèces générées lors de la réduction

Nous avons montré dans le chapitre III que le milieu appauvri en sulfate favorise l'accumulation du séléniate dans les bactéries. Compte tenu de ce résultat, nous examinons la spéciation du sélénium lorsque les bactéries accumulent une plus grande quantité de séléniate. La figure 70 présente les spectres XANES et la répartition des espèces lors de la cinétique de réduction du séléniate chez la souche sauvage exposée à 2 mM de séléniate dans le milieu TSM contenant 0,3 mM de sulfate. Juste après ajout du séléniate (en fin de phase exponentielle), l'énergie de la raie blanche du spectre XANES se situe à 12,6669 keV, ce qui correspond à l'énergie du saut de seuil de la référence séléniate. La présence d'un épaulement à plus faible énergie suggère que la bactérie contient une proportion de sélénium organique et/ou de sélénium élémentaire. Au cours de la croissance bactérienne (entre 5 et 144 heures d'exposition), le pic à 12,6669 keV tend à disparaître au profit du pic à 12,6601-12,6609 keV.

L'approche statistique ACP pour cette série de spectres propose un mélange de trois composés principaux. Deux d'entre eux sont identifiés comme le séléniate (Se^{VI}) et une espèce organique d'alkyle séléniure (RSeR). Pour le troisième composé, la simulation la plus proche du signal expérimental est obtenue avec les espèces RSSeSR ou Se^0 . La différence d'énergie des seuils pour les espèces RSSeSR et Se^0 est inférieure à 0,5 eV et donc insuffisante pour les

différencier. C'est pourquoi des simulations de répartition d'espèces sélénées sont proposées en prenant en compte la présence d'une espèce ou de l'autre.

La figure 70A présente l'évolution des espèces sélénées dans les bactéries obtenue avec la première simulation, incluant l'espèce sélénée organique RSSeSR. Dans cette première hypothèse, les trois espèces principales sont donc le séléniate et les espèces organiques RSeR et RSSeSR. Immédiatement après introduction du séléniate dans le milieu de culture, 86% du sélénium détecté dans les bactéries est sous la forme séléniate. En même temps, la bactérie a déjà transformé une fraction de séléniate en l'espèce organique RSeR (14%). Au cours des 24 heures suivantes, le séléniate et l'alkyle sélénure RSeR sont présents en proportions équivalentes. Puis de 48 à 144 heures d'exposition, la proportion de séléniate diminue de moitié tandis que la fraction de RSeR reste constante. Lors de cette période, l'espèce RSSeSR apparaît et à partir de 96 heures, elle se stabilise autour d'une valeur moyenne à $42 \pm 1\%$.

La figure 70B présente la seconde proposition de simulation. Dans cette hypothèse, les trois espèces principales sont le séléniate (Se^{VI}), un alkyle sélénure RSeR et le sélénium élémentaire (Se^0). Les résultats de simulation sont très proches de ceux obtenus avec la première simulation : l'espèce RSSeSR est remplacée par du Se^0 . Cette hypothèse prend en compte la formation de sélénium élémentaire. Cependant, à aucun moment la culture n'a présenté de coloration rouge caractéristique de cette espèce. Il est à souligner ici que la quantité de sélénium élémentaire formé dans la bactérie ne dépasserait par 17 mg par g de protéines.

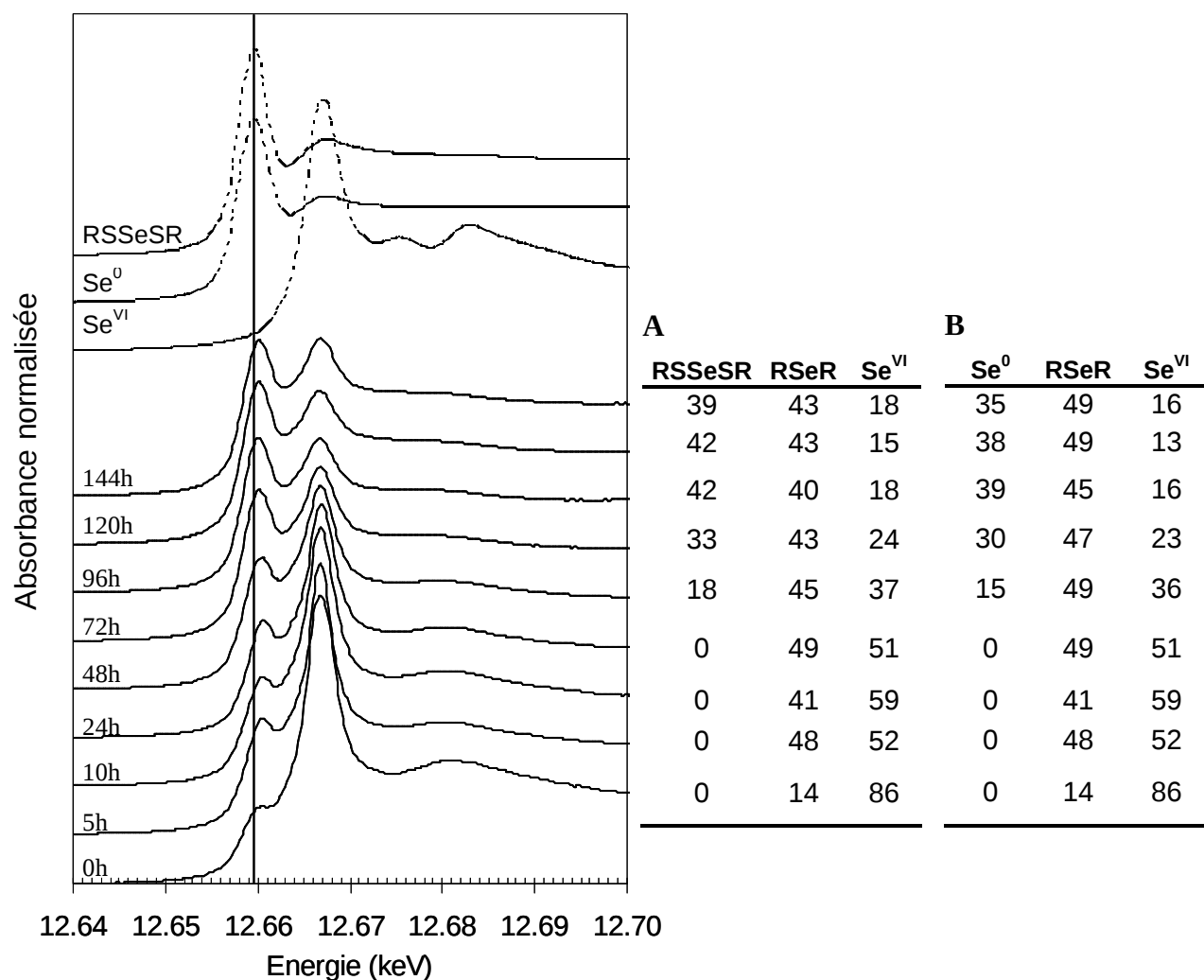


Figure 70 : spectres XANES au seuil K du sélénium et distribution des espèces sélénées obtenus à différents temps d'exposition de *C. metallidurans* CH34 à 2 mM de séléniate ajoutés dans le milieu TSM contenant 0,3 mM de sulfate. Le séléniate est ajouté dans le milieu de culture en fin de phase exponentielle de croissance. La distribution des espèces de sélénium est déterminée par la simulation de combinaison linéaire à partir des spectres de références en présence de RSSeSR (A) ou de Se⁰ (B). La droite indique l'énergie du pic principal du sélénium élémentaire rouge. Les spectres supérieurs correspondent aux références de séléniate de sodium (Se^{VI}), de sélénium élémentaire rouge (Se⁰) et de l'espèce organique sélénodiglutathion (RSSeSR). Le spectre XANES du séléniate correspond à du séléniate de sodium cristallisé expliquant les oscillations vers 12,685 keV que nous n'observons pas dans les spectres XANES des bactéries.

3.2. Identification de la troisième espèce sélénée : RSSeSR ou Se⁰ ?

En conditions limitées en sulfate, la spectroscopie XANES montre que les bactéries accumulent le séléniate et le transforment en trois espèces qui sont Se^{VI}, RSeR et RSSeSR ou Se⁰ (la différence d'énergie entre les raies blanches de RSSeSR et Se⁰ étant inférieure à 1 eV, il n'est pas possible de différencier ces espèces par XANES).

Deux méthodes sont employées pour essayer de préciser si l'espèce la plus probable est RSSeSR ou Se⁰ : la microscopie électronique à transmission couplée à l'analyse dispersive en énergie (MET-EDX) permet l'éventuelle observation de particules de sélénium élémentaire

précipitées dans les bactéries ; l'EXAFS (Extended X-ray absorption fine structure) apporte des données structurales précises sur les premiers voisins des atomes de sélénium contenus dans les échantillons bactériens.

3.2.1. Analyses MET-EDX

La figure 71 montre les microphotographies prises en microscopie électronique à transmission de coupes ultra fines de *C. metallidurans* CH34 au cours de l'exposition à 2 mM de séléniate en milieu limité en sulfate. Nous pouvons souligner ici la présence de nombreux granules peu denses à l'intérieur du cytoplasme des bactéries. Des particules denses aux électrons sont également observées (figures 71B et 71D) mais leur analyse par EDX ne révèle pas la présence de sélénium (figure 72). L'hypothèse de la présence de sélénium élémentaire semble pouvoir être écartée.

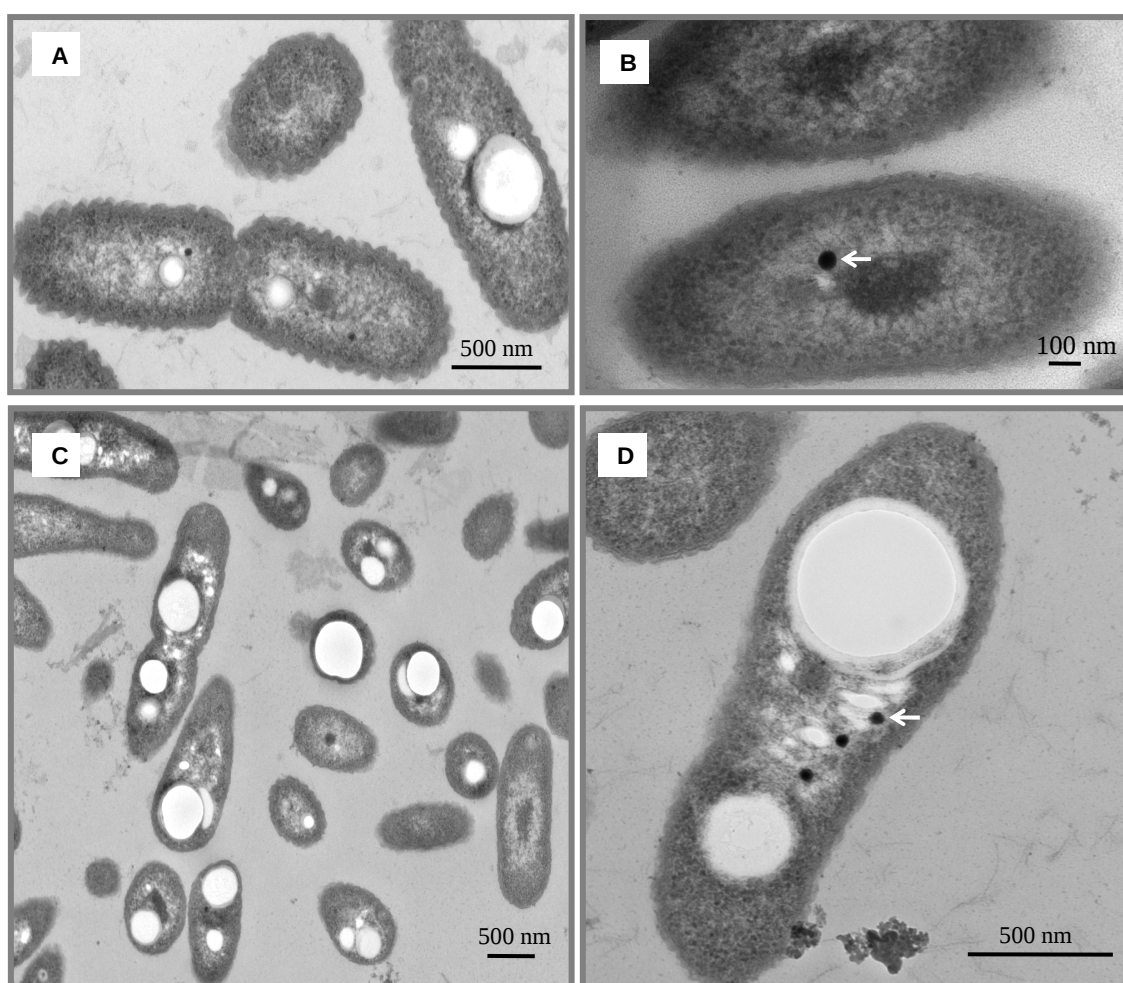


Figure 71 : microphotographies prises en microscopie électronique à transmission de coupes ultrafines de *C. metallidurans* CH34 au cours de l'exposition à 2 mM de séléniate dans le milieu limité en sulfate (A à D). (A) 0 minute, (B) 5 heures, (C) 24 heures, (D) 49 heures d'exposition. Les flèches montrent les particules denses aux électrons dans les bactéries.

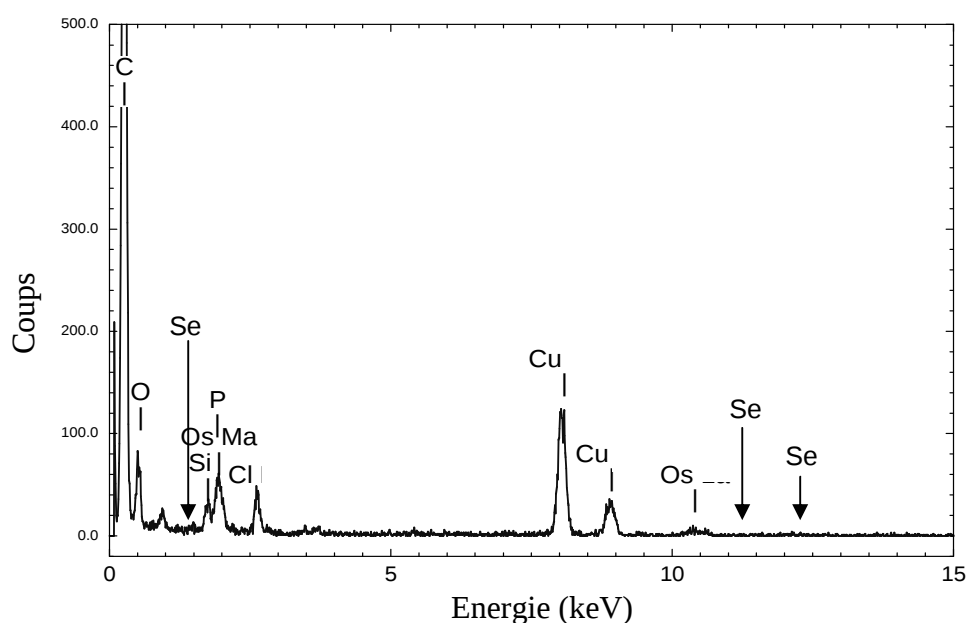


Figure 72 : spectre EDX d'une particule dense dans le cytoplasme d'une bactérie exposée à 2 mM de séléniate dans le milieu TSM limité en sulfate. Le signal du sélénium devrait se situer à 1,37 keV (raie SeL α), 11,22 (raie SeK α) et 12,49 keV (raie SeK β) comme indiqué par les flèches.

3.2.2. Analyses EXAFS

Afin de préciser l'environnement structural du sélénium accumulé dans les bactéries *C. metallidurans* CH34 au cours de l'exposition à 2 mM de séléniate en milieu limité en sulfate, les données EXAFS sont analysées pour deux temps d'exposition. La figure 73 présente les spectres EXAFS obtenus dans chacune des conditions. Les spectres des références séléniate, alkyle séléniure RSeR (Se méthyle L-sélénocystéine et L-sélénométhionine), sélénium élémentaire et RSSeSR y figurent également.

En début d'exposition (5 heures), nous avons montré dans le paragraphe 3.1 par la combinaison linéaire de spectres de références que les bactéries contiennent les espèces Se^{VI} et RSeR en proportions équivalentes. Dans ce cas, il n'y a pas d'ambiguïté sur l'absence de Se⁰ et/ou RSSeSR. Les oscillations EXAFS extraites et présentées dans l'espace des vecteurs d'onde sur la figure 73 confirment le mélange.

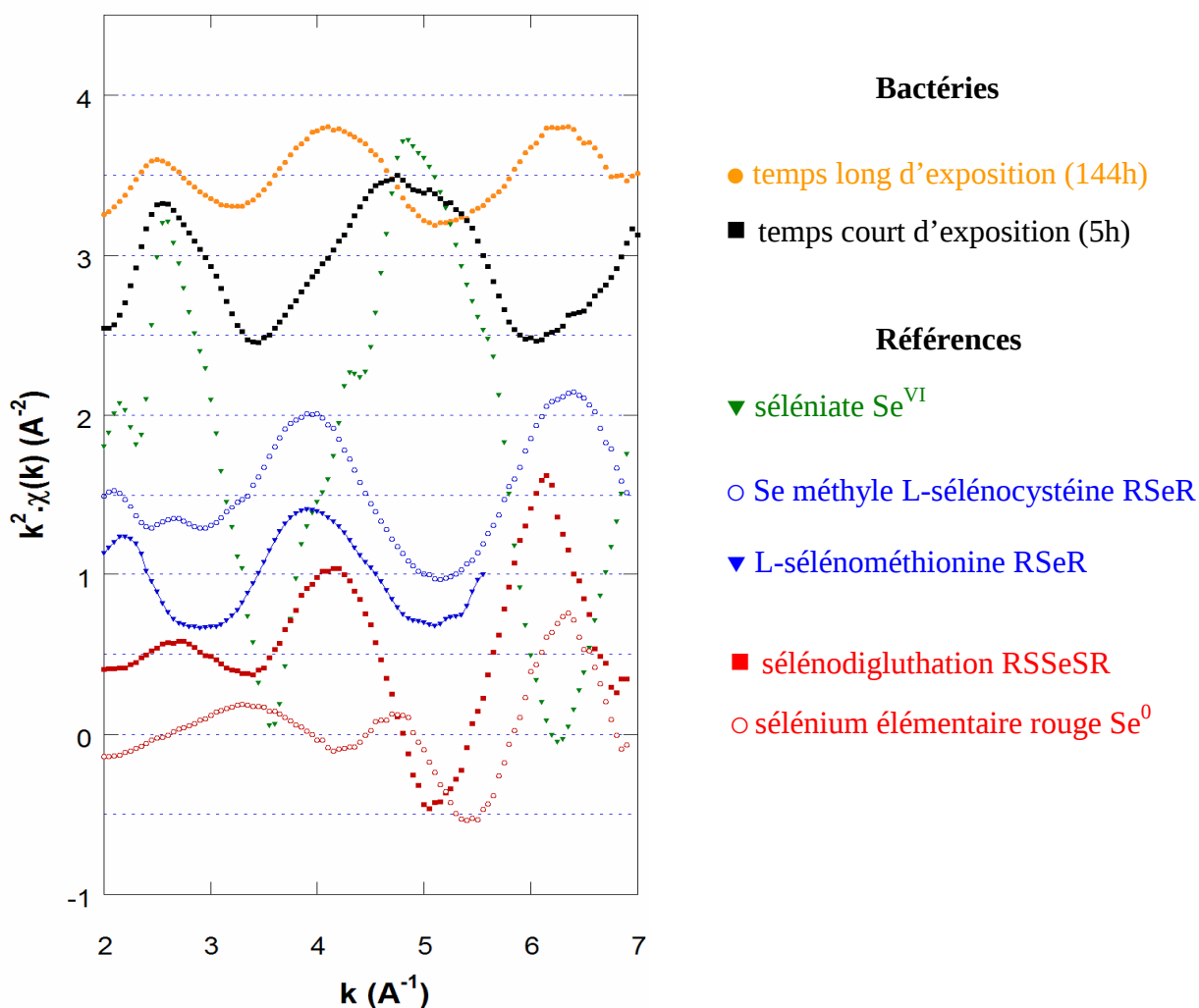


Figure 73 : oscillations EXAFS dans l'espace des vecteurs d'onde au seuil K du sélénium des échantillons bactériens en début (spectre noir) et fin d'exposition (spectre orange) à 2 mM de séléniate dans le milieu TSM contenant 0,3 mM de sulfate et de références de sélénium avec de haut en bas : séléniate (Se^{VI}), Se méthyle L-sélénocystéine (RSeR), L-sélénométhionine (RSeR), sélénodiglutathion (RSSeSR) et sélénium élémentaire rouge (Se^0). Les oscillations EXAFS sont extraites des spectres d'absorption X au seuil K du sélénium. Le signal EXAFS permet de visualiser les oscillations correspondantes aux interférences entre le sélénium et les atomes voisins. Ainsi, les oscillations des spectres EXAFS permettent de différencier les espèces Se^0 et RSSeSR.

En fin d'exposition (144 heures), les deux possibilités de spéciation, décrites dans le paragraphe 3.1, sont rappelées dans le tableau 16A. Les oscillations EXAFS sont à leur tour simulées et les résultats sont présentés dans le tableau 16B.

La simulation des oscillations EXAFS des échantillons bactériens par combinaison des 4 références Se^0 , RSSeSR, RSeR et Se^{VI} :

- confirme que RSeR est l'espèce majoritaire après exposition au séléniate en milieu limité en sulfate
- montre que le taux de Se^0 n'est pas significatif ($< 10\%$). L'espèce organique retenue est RSSeSR (18%), le sélénodiglutathion de notre base de données.

A	% espèces (spectres XANES)			
	Se ⁰	RSSeSR	RSeR	Se ^{VI}
Hypothèse 1	<i>0</i>	39	43	18
Hypothèse 2	35	<i>0</i>	49	16

B	% espèces (spectres EXAFS)			
	Se ⁰	RSSeSR	RSeR	Se ^{VI}
	6	18	62	14

Tableau 16 : simulations des spectres XANES (A) et EXAFS (B). Les échantillons bactériens analysés correspondent à la fin d'exposition (temps 144 heures) à 2 mM de séléniate dans le milieu TSM contenant 0,3 mM de sulfate. Les valeurs en dessous de 10% ne sont pas significatives (valeurs grises en italiques).

4. Induction des mécanismes de réduction du sélénium

4.1. Induction du mécanisme de réduction du sélénite

Effet de la concentration en sélénite sur le moment d'apparition de la coloration rouge de la culture

Pour toutes les concentrations testées dans le chapitre II (de 1 à 8 mM de sélénite), nous avons observé l'apparition de la coloration rouge, caractéristique de la réduction du sélénite en sélénium élémentaire. L'apparition de la coloration rouge coïncide avec la phase rapide d'accumulation. Nous examinons ici l'effet de faibles concentrations en sélénite sur l'apparition de cette coloration rouge.

Le moment d'apparition de la coloration rouge-orange est observé pour des cultures exposées à 0,02 ; 0,2 et 2 mM de sélénite. La culture exposée à 0,02 mM de sélénite ne présente pas de coloration. En revanche, une coloration orange apparaît au bout de 26 heures d'exposition à 0,2 mM de sélénite. Une coloration rouge apparaît au bout de 48 heures d'exposition à 2 mM de sélénite. La coloration rouge-orange est observée lorsque ces deux cultures atteignent la phase stationnaire, c'est-à-dire lorsque la concentration en sélénium accumulé dans les bactéries avoisine 100 mg par g de protéines.

Effet d'un inhibiteur de synthèse protéique sur la réduction du sélénite

Nous avons montré dans le chapitre III que la prise en charge du sélénite est partiellement induite. Nous examinons ici si la réduction du sélénite en sélénium élémentaire est également dépendante de la synthèse de néo-protéines. Les bactéries sont exposées à 2 mM de sélénite ajouté en phase stationnaire, c'est-à-dire lorsque la phase de réduction rapide se met en place. En présence comme en absence de chloramphénicol, la totalité du sélénite accumulé dans les bactéries est transformé en sélénium élémentaire. Une plus faible proportion d'alkyle séléniure RSeR est présente aux temps courts d'exposition. Ces résultats suggèrent que la réduction du sélénite en sélénium élémentaire n'est pas directement soumise à la présence de nouvelles molécules.

4.2. Induction du mécanisme de réduction du séléniat

4.2.1. Analyses XANES

Nous avons montré dans le chapitre III que la prise en charge du séléniat est partiellement induite. Nous examinons ici si la réduction du séléniat en sélénium organique est également dépendante de la synthèse de néo-protéines. Les bactéries sont cultivées dans le milieu limité en sulfate pour favoriser l'accumulation du sélénium en absence et en présence d'un inhibiteur de synthèse protéique, le chloramphénicol. Les espèces séléniées sont recherchées par l'analyse des spectres XANES.

Les spectres XANES obtenus en présence de chloramphénicol sont présentés sur la figure 74A et les spectres XANES obtenus en absence de chloramphénicol, présentés sur la figure 70 dans le paragraphe 3.1, sont reportés sur la figure 74B. Une comparaison de ces spectres montre qu'à partir de 5 heures d'exposition à 2 mM de séléniat, la contribution de l'espèce séléniat (pic à 12,6669 keV indiqué par la flèche sur la figure 74) a une amplitude moins élevée en présence de chloramphénicol.

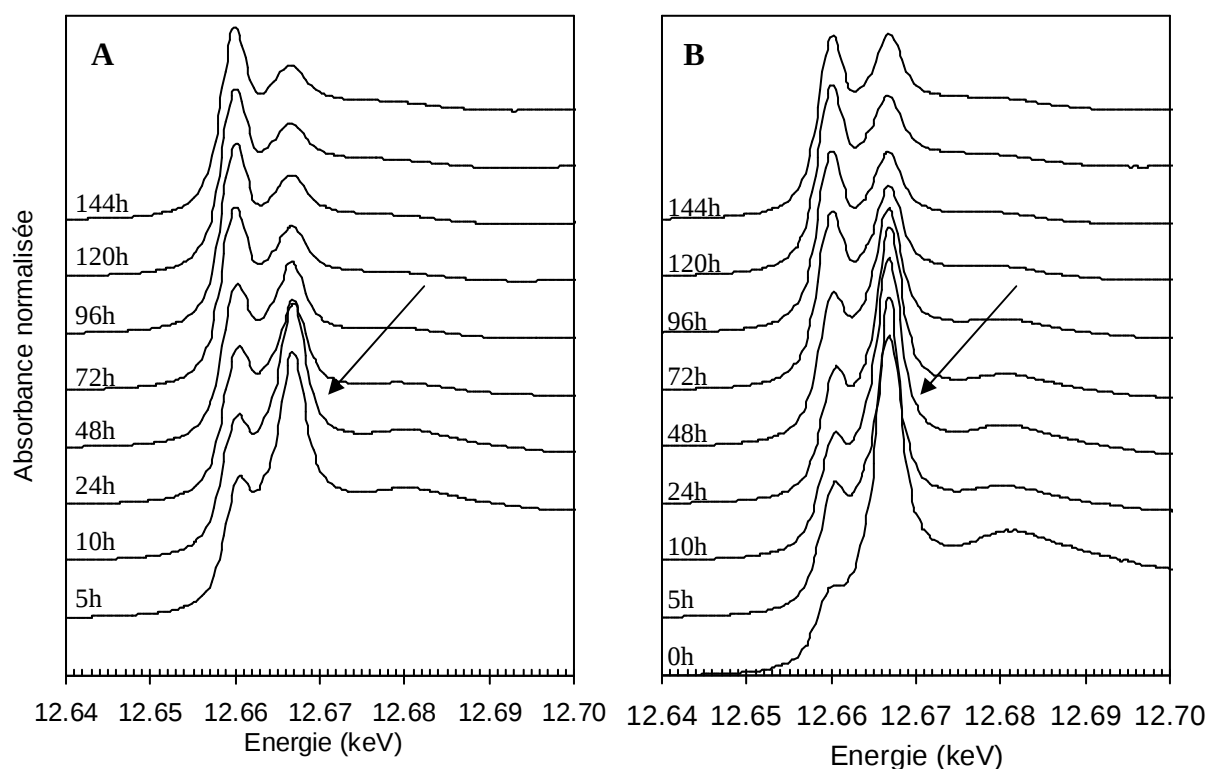


Figure 74 : spectres XANES au seuil K du sélénium obtenus à différents temps d'exposition de *C. metallidurans* CH34 à 2 mM de séléniate ajoutés dans le milieu TSM contenant 0,3 mM de sulfate en présence (A) et en absence (B) de chloramphénicol. Le séléniate est ajouté dans le milieu de culture en fin de phase exponentielle de croissance. La flèche indique le second pic principal du spectre correspondant à l'espèce séléniate. L'absorbance normalisée pour les deux cinétiques est représentée à la même échelle. Le spectre 0 heure en présence de chloramphénicol est absent car le sélénium n'a pas été détecté.

L'approche statistique ACP pour cette série de spectres propose un mélange de trois composés principaux identifiés comme étant le séléniate (Se^{VI}), un alkyle séléniure (RSeR) et comme précédemment (paragraphe 3.1), soit du RSSeSR (sélénodiglutathion), soit du Se^0 . Le tableau 17 présente les deux simulations des pourcentages d'espèces majoritaires de sélénium : la première hypothèse inclue l'espèce RSSeSR dans la base de données des spectres de références (tableau 17A) et la seconde hypothèse inclue l'espèce Se^0 (tableau 17B). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus en absence de chloramphénicol (figure 69).

La première hypothèse propose un mélange de Se^{VI} , RSeR et RSSeSR . Au cours des 10 premières heures de l'exposition, les espèces RSeR et Se^{VI} sont détectées en proportions équivalentes. Au bout de 24 heures, l'espèce Se^{VI} diminue d'un facteur 2 au profit de l'espèce organique RSeR . Aux temps plus longs, l'espèce RSSeSR apparaît et se stabilise à une valeur moyenne de $36 \pm 3\%$.

La seconde hypothèse propose un mélange également composé de Se^{VI} , RSeR et Se^0 . Les variations des proportions sont similaires à celles décrites dans le cas de la première hypothèse : Se^0 remplace l'espèce RSSeSR . Cette hypothèse propose la formation de sélénium élémentaire. Toutefois, nous n'avons pas observé de coloration rouge de la culture, couleur

caractéristique de la formation de cette espèce. La simulation rapportée à la quantité de sélénium total dosé montre que la concentration en sélénium élémentaire formé dans la bactérie serait inférieure à 18 mg par g de protéines.

Hypothèse 1					Hypothèse 2				
A	Temps (h)	RSSeSR	RSeR	Se ^{VI}	B	Temps (h)	Se(0)	RSeR	Se ^{VI}
	5	0	53	47		5	0	53	47
	10	0	57	43		10	0	57	43
	24	0	73	27		24	20	53	27
	48	19	58	23		48	30	49	21
	72	34	54	12		72	43	45	12
	96	33	57	10		96	44	48	8
	120	41	49	10		120	46	46	8
	144	37	54	9		144	47	46	7

Tableau 17 : distribution des espèces sélénées obtenues à différents temps d'exposition de *C. metallidurans* CH34 à 2 mM de séléniate ajouté dans le milieu TSM contenant 0,3 mM de sulfate en présence de chloramphénicol. Le séléniate et le chloramphénicol (25 µg/mL) sont ajoutés dans le milieu de culture en fin de phase exponentielle de croissance. La distribution des espèces de sélénium est déterminée par la simulation de combinaison linéaire à partir des spectres de références en présence de RSSeSR (A) ou de Se⁰ (B). Les pourcentages en dessous de 10% ne sont pas significatifs (valeurs grises en italiques).

4.2.2. Analyses EXAFS

Comme précédemment, nous précisons la spéciation de cette troisième espèce (RSSeSR et/ou Se⁰) par l'analyse EXAFS des bactéries à un temps court et un temps long d'exposition à 2 mM de séléniate dans un milieu limité en sulfate en présence de chloramphénicol. Les oscillations EXAFS en absence de chloramphénicol sont reportées et celles en présence de chloramphénicol sont présentées sur la figure 75. Les spectres EXAFS des références sont également reportés. Le tableau 18A rappelle les deux possibilités de spéciation obtenues par la simulation des spectres XANES en présence de chloramphénicol (paragraphe 4.2.1), et il montre les pourcentages d'espèces obtenus par EXAFS en absence de chloramphénicol (paragraphe 3.2.2). Les oscillations EXAFS des bactéries au temps long en présence de chloramphénicol sont à leur tour simulées et le résultat est montré dans le tableau 18B.

En début d'exposition (5 heures), les spectres EXAFS sont similaires en absence comme en présence de chloramphénicol, confirmant les résultats XANES : le mélange est composé par les espèces RSeR et Se^{VI}.

En fin d'exposition (144 heures) et en présence de chloramphénicol, la simulation des oscillations EXAFS propose la participation de Se⁰ et de RSSeSR en proportions équivalentes (aux alentours de 15%) alors que la proportion de séléniate diminue significativement. Lorsque

les bactéries sont cultivées en présence de chloramphénicol, la première oscillation EXAFS est décalée vers les courtes distances dans l'espace des vecteurs d'onde (flèche sur la figure 75), et la seule référence dans notre base de données qui a un spectre avec une oscillation positive dans ce domaine est Se^0 .

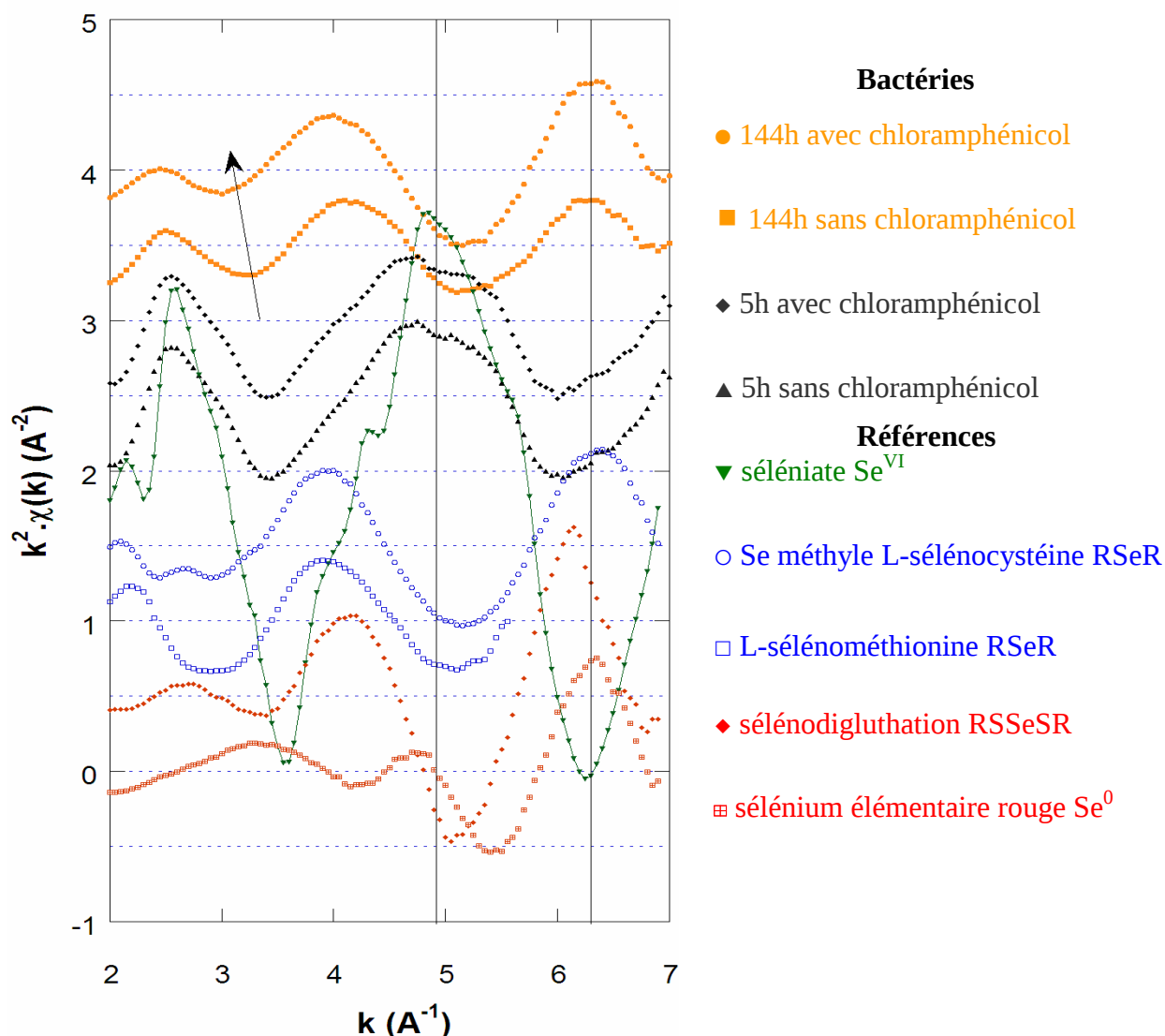


Figure 75 : oscillations EXAFS dans l'espace des vecteurs d'onde au seuil K du sélénium des échantillons bactériens en début (spectres noirs) et fin d'exposition (spectres oranges) à 2 mM de séléniate en absence et en présence de chloramphénicol dans le milieu TSM contenant 0,3 mM de sulfate et de références de sélénium avec de haut en bas : séléniate (Se^{VI}), Se méthyle L-sélénocystéine (RSeR), L-sélénométhionine (RSeR), sélénodiglutathion (RSSeSR) et sélénium élémentaire rouge (Se^0). Les oscillations EXAFS sont extraites des spectres d'absorption X au seuil K du sélénium. Le signal EXAFS permet de visualiser les oscillations correspondantes aux interférences entre le sélénium et les atomes voisins. Ainsi, les oscillations des spectres EXAFS permettent de différencier les espèces Se^0 et RSSeSR. La flèche sur le graphique indique le décalage de la fin de la première oscillation entre le signal EXAFS des bactéries à $t = 144$ heures (spectres oranges) avec et sans chloramphénicol.

A	% espèces			
	Se ⁰	RSSeSR	RSeR	Se ^{VI}
Sans chloramphénicol (spectres EXAFS)	6	18	62	14
Avec chloramphénicol (spectres XANES)	0	37	54	9
	47	0	46	7
B				
Avec chloramphénicol (EXAFS)	14	17	66	3

Tableau 18 : simulations des spectres XANES (A) et EXAFS (A et B). Les échantillons bactériens analysés correspondent à la fin d'exposition (144 heures) à 2 mM de sélénite en absence ou en présence de chloramphénicol dans le milieu TSM contenant 0,3 mM de sulfate. Les valeurs en dessous de 10% ne sont pas significatives (valeurs grises en italiques).

Les résultats montrent qu'en présence de chloramphénicol, la teneur en sélénium élémentaire est voisine de 4 mg par g de protéines (pourcentage de Se⁰ rapporté au sélénium total accumulé dans les bactéries). Cette valeur est plus élevée que celle accumulée dans le milieu classique (2 mg de Se⁰ par g de protéines).

5. Identification des espèces sélénées organiques produites par *C. metallidurans* CH34 après exposition aux oxyanions de sélénium

L'alkyle sélénure RSeR détecté après exposition au sélénite et au sélénite est identifié grâce au développement du couplage HPLC-ICP-MS.

5.1. Identification des alkyles sélénures RSeR après exposition au sélénite et au sélénite

La spéciation par spectroscopie d'absorption des rayons X ne permet pas de caractériser plus finement cette ou ces espèce(s) (RSeR) et notamment de préciser la présence de Se-méthyle L-sélénocystéine ou de L-sélénométhionine. Les espèces sélénées solubles contenues dans les bactéries après exposition aux oxyanions sont donc extraites par lyse enzymatique. Après avoir évalué le rendement d'extraction, ces espèces sont séparées, identifiées et quantifiées par couplage HPLC-ICP-MS.

5.1.1. Rendement de l'extraction

L'efficacité de l'extraction des espèces sélénées est évaluée en calculant le rendement par le dosage du sélénium avant et après extraction. La figure 76 montre le rendement d'extraction du sélénium soluble après lyse enzymatique des bactéries sauvages exposées à 2

mM de sélénite ou de séléniate et des bactéries mutantes RM8 exposées à 2 mM et 10 mM de sélénite. En moyenne, $82 \pm 2\%$ de la concentration en sélénium total accumulé dans les bactéries sauvages exposées au séléniate sont extraits, ce qui démontre l'efficacité de la lyse. Dans le cas des bactéries exposées au sélénite, le rendement d'extraction du sélénium soluble ne dépasse pas 5% de la concentration en sélénium total accumulé à partir de 24 et 48 heures d'exposition (respectivement pour les bactéries mutantes et la souche sauvage), c'est-à-dire lorsque la souche atteint la phase stationnaire. Cette différence était prévisible puisqu'au delà de 24 heures d'exposition, le sélénium élémentaire insoluble devient le principal produit de la réduction du sélénite.

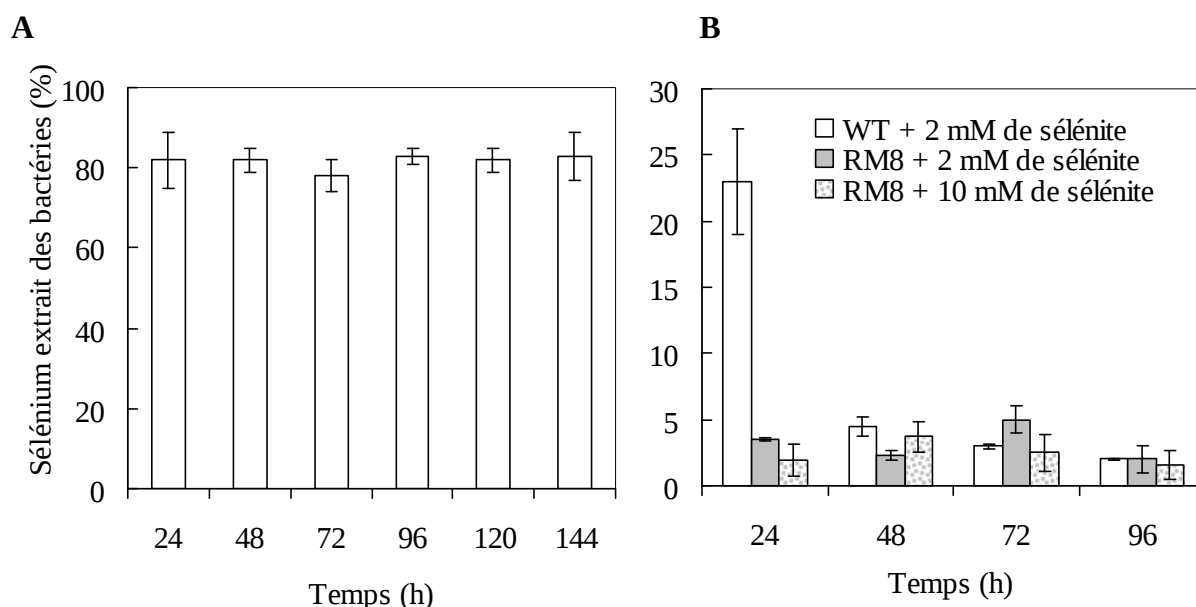


Figure 76 : rendement d'extraction du sélénium total suite à la lyse enzymatique des échantillons bactériens de la souche sauvage exposée à 2 mM de séléniate (A) et à 2 mM de sélénite (B) et de la souche mutante RM8 exposée à 2 et 10 mM de sélénite (B). Le rendement d'extraction est exprimé en pourcentage du sélénium total dosé dans les extraits bactériens obtenus après lyse enzymatique par rapport à la concentration en sélénium total dans les culots bactériens avant lyse. L'erreur correspond à la déviation standard de la moyenne de 3 mesures. La légende de l'axe des ordonnées est indiquée pour les figures 89A et 89B.

5.1.2. Identification des espèces sélénées dans les extraits bactériens

La figure 77 présente le chromatogramme d'une solution de références sélénées et des chromatogrammes caractéristiques des extraits bactériens de la souche sauvage et des mutants. La méthode HPLC-ICP-MS sépare et identifie les 5 références suivantes : Se-méthyle L-sélénocystéine (pic 1 de la figure 77A), L-sélénométhionine (pic 2), sélénite (pic 3), DL-sélénocystéine (pic 4) et séléniate (pic 5). Les chromatogrammes des extraits solubles des bactéries, obtenus par extraction enzymatique des culots bactériens exposés au sélénite et au séléniate, présentent chacun un seul pic dont le temps de rétention correspond à celui de la L-sélénométhionine (figures 90B, 90C et 90D). Lorsque la référence L-sélénométhionine est

ajoutée aux extraits bactériens, le chromatogramme ne comporte qu'un seul pic dont le temps de rétention est identique à celui de la référence seule. Ces résultats suggèrent que l'espèce RSeR, mise en évidence par spectroscopie XANES après accumulation et transformation du sélénite et du séléniate par *C. metallidurans* CH34 et ses mutants, correspond majoritairement à la L-sélénométhionine. Les espèces Se-méthyle L-sélénocystéine et DL-sélénocystine sont absentes des échantillons.

Chez la souche sauvage, la concentration en L-sélénométhionine représente environ 25 mg par g de protéines lorsque la culture atteint la phase stationnaire (soit après 50 heures d'exposition à 2 mM de sélénite), c'est-à-dire environ 10% du sélénium accumulé dans les bactéries. Après exposition au séléniate, la concentration en L-sélénométhionine représente près de 95% du sélénium accumulé dans les bactéries, soit seulement 11 mg par g de protéines. Chez la souche mutante, la concentration en L-sélénométhionine correspond à environ 22 mg par g de protéines, soit environ 35% du sélénium accumulé quand la culture arrive en phase stationnaire (après 50 heures d'exposition à 10 mM de sélénite).

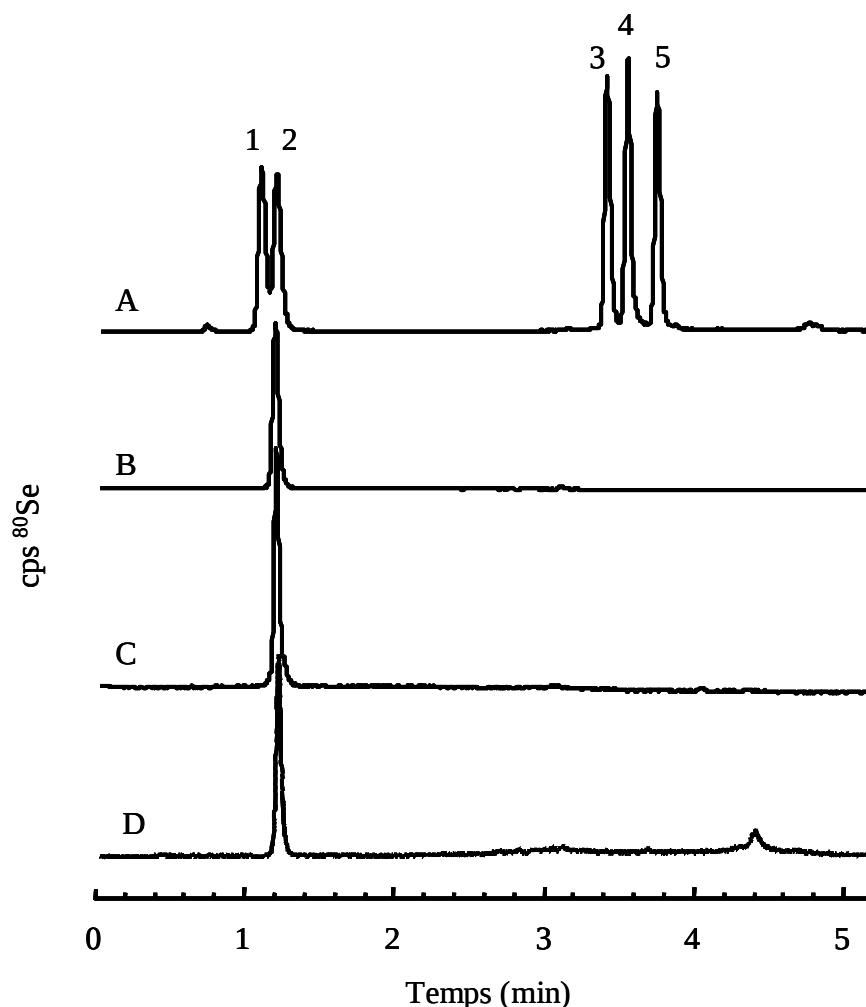


Figure 77 : chromatogrammes obtenus par HPLC-ICP-MS de la solution standard (A) et chromatogrammes caractéristiques des extraits de bactéries sauvages exposées à 2 mM de sélénite (B) et à 2 mM de séléniate (C) et de bactéries mutantes exposées à 2 mM de sélénite (D) pendant 24 heures. La solution standard est composée de Se-méthyle L-sélenocystéine (RSeR, pic 1), de L-sélenométhionine (RSeR, pic 2), de sélénite (Se^{IV} , pic 3), de DL-sélenocystine (RSeSeR, pic 4) et de séléniate (Se^{VI} , pic 5), chacune à la concentration de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$. Les solutions d'extraits de bactéries sont obtenues par extraction enzymatique des échantillons bactériens.

6. Recherche des protéines ayant incorporé du sélénium

Nous avons montré que *C. metallidurans* CH34 transforme le sélénite et le séléniate en une espèce organique majoritairement identifiée en sélénométhionine. Nous recherchons si, sous cette forme, le sélénium est incorporé aléatoirement ou spécifiquement dans les protéines bactériennes de *C. metallidurans* CH34. Pour ces expériences, les extraits protéiques solubles et insolubles obtenus par lyse mécanique (cf. matériels et méthodes III.3.1) sont séparés en fonction de leurs poids moléculaires sur un gel SDS-PAGE (figure 78). Ils sont ensuite transférés sur membrane de nitrocellulose afin de rechercher la présence de sélénium le long de la piste de migration (analyses PIXE à la microsonde nucléaire ; le sens de migration et le déplacement de l'analyse PIXE sont indiqués par la flèche sur la figure 78). Les extraits analysés à la microsonde sont les suivants :

- des échantillons protéiques solubles en fin de phase exponentielle de croissance d'une culture exposée à 2 mM de sélénite (23% du sélénium total est dosé dans ces extraits soit 5,4 mg par g de protéines) (piste 2)
- des échantillons protéiques insolubles en fin de phase exponentielle de croissance d'une culture exposée à 2 mM de sélénite (8% du sélénium total est dosé dans ces extraits soit 1,8 mg par g de protéines) (piste 4)
- des échantillons protéiques solubles en fin de phase exponentielle de croissance d'une culture exposée à 7 mM de séléniat (34% du sélénium total est dosé dans ces extraits soit 3,1 mg par g de protéines) (piste 6).

Les extraits membranaires collectés après exposition au séléniat n'ont pas pu être analysés : les concentrations en sélénium étaient en dessous de la limite de détection de la technique.

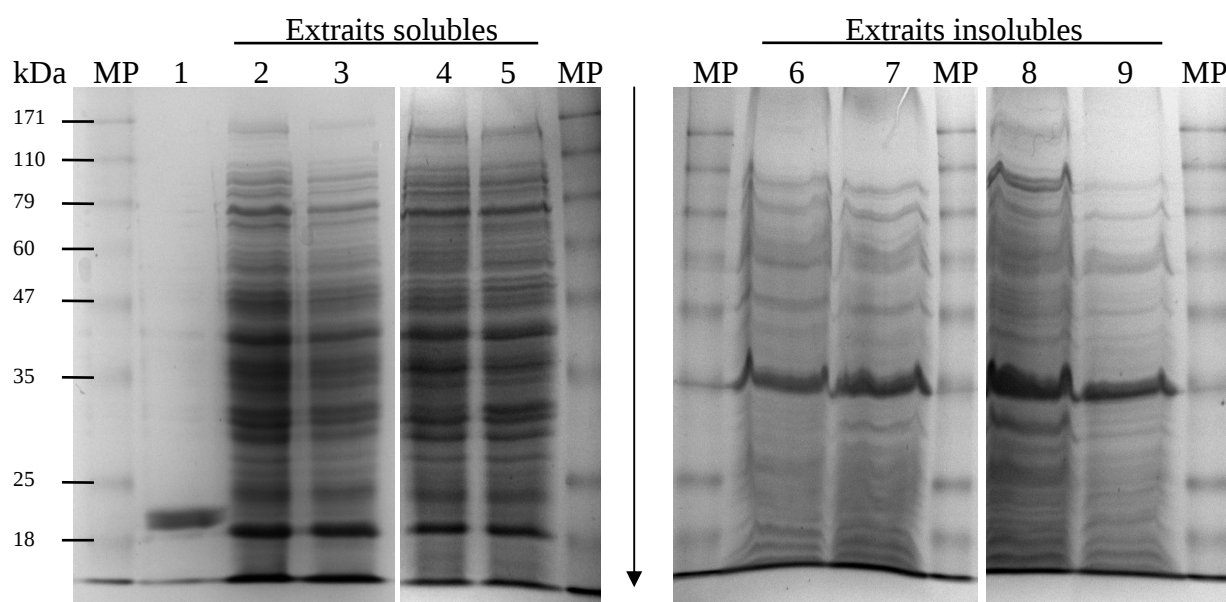


Figure 78 : photographies des gels SDS-PAGE des extraits cytoplasmique, périplasmique et membranaire de *C. metallidurans* CH34 exposée à 2 mM de sélénite ou à 7 mM de séléniat. MP correspond au marqueur de poids moléculaires. La flèche indique le sens de migration et du déplacement de l'analyse PIXE. Les pistes numérotées correspondent aux échantillons suivants :

- 1/ référence commerciale de glutathion peroxidase d'érythrocyte bovin
- 2/ extraits solubles fin de phase exponentielle après exposition au Se^{IV} (transfert analysé par PIXE)
- 3/ extraits solubles phase stationnaire après exposition au Se^{IV}
- 4/ extraits solubles fin de phase exponentielle après exposition au Se^{VI} (transfert analysé par PIXE)
- 5/ extraits solubles phase stationnaire après exposition au Se^{VI}
- 6/ extraits insolubles fin de phase exponentielle après exposition au Se^{IV} (transfert analysé par PIXE)
- 7/ extraits insolubles phase stationnaire après exposition au Se^{IV}
- 8/ extraits insolubles fin de phase exponentielle après exposition au Se^{VI}
- 9/ extraits insolubles phase stationnaire après exposition au Se^{VI}

La figure 79 montre les profils de sélénium obtenus à partir de l'analyse PIXE des membranes de transferts des extraits solubles (membranes) et insolubles (cytoplasme et

périplasme). La densitométrie des protéines représentée sur cette figure 79 est obtenue à partir de l'analyse des gels de polyacrylamide grâce au programme Quantity One (Bio-rad). Dans les extraits membranaires de la fin de phase exponentielle de croissance après exposition au sélénite (figure 79A), le sélénium est essentiellement localisé dans les protéines de hauts poids moléculaires (poids moléculaires supérieurs à 60 kDa) et dans les protéines dont le poids est compris entre 25 et 35 kDa (pic de sélénium élevé dans les protéines de poids moléculaire de 33 kDa). Dans les extraits solubles de la fin de phase exponentielle de croissance après exposition au sélénite (figure 78B), le sélénium est essentiellement localisé dans les protéines de hauts poids moléculaires (poids moléculaires supérieurs à 60 kDa) et dans les protéines de faibles poids moléculaires (autour de 25 kDa).

Dans les extraits solubles collectés en fin de phase exponentielle après exposition au séléniat (figure 79C), le sélénium est retrouvé préférentiellement dans la zone de masses protéiques aux environs de 25 kDa comme dans les extraits solubles collectés après exposition au sélénite. Pour les deux oxyanions dans cette zone protéique de faible poids moléculaire, un pic élevé de sélénium est présent (protéines à 26 kDa pour l'exposition sélénite et à 27 kDa pour l'exposition séléniat).

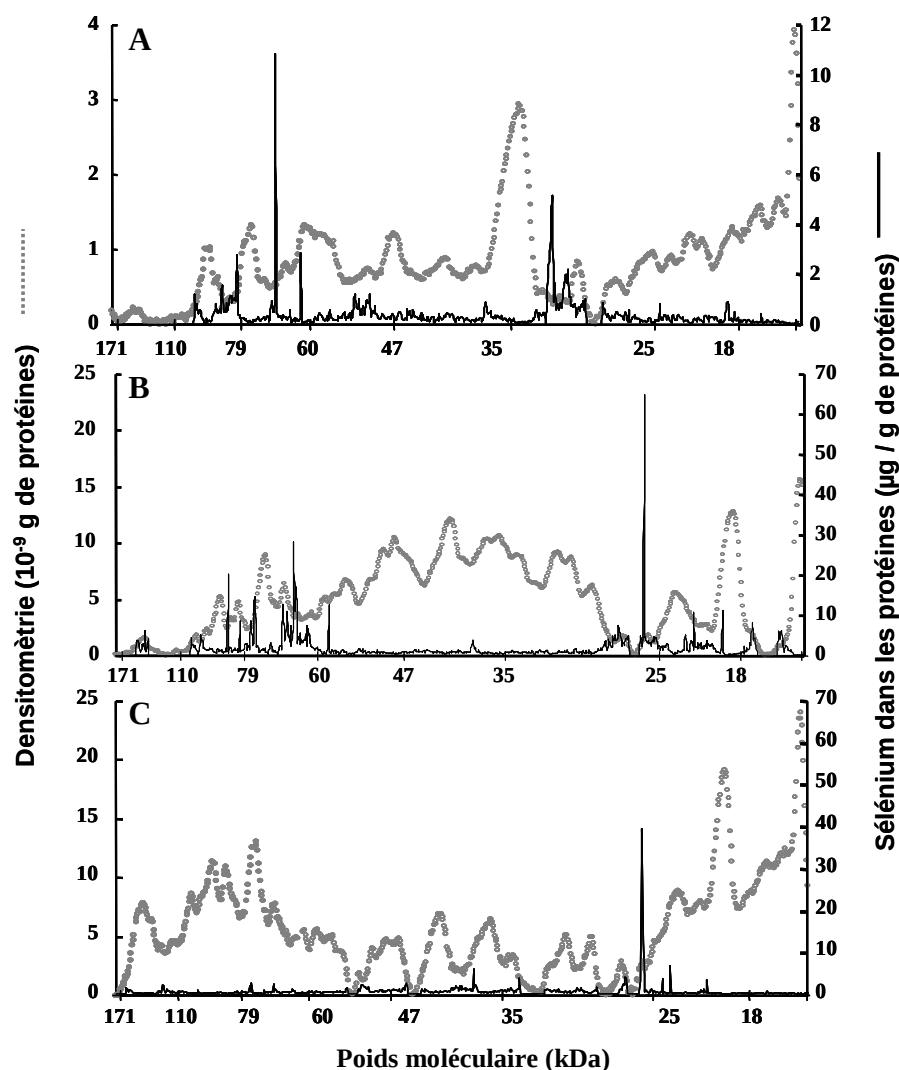


Figure 79 : analyse SDS-PAGE-PIXE d'extraits protéiques membranaires après exposition au sélénite (A), d'extraits protéiques cytoplasmiques et périplasmiques après exposition au sélénite (B) et au séléniate (C). L'ensemble des extraits analysés correspond à des prélèvements en fin de phase exponentielle de croissance. La densitométrie des gels est obtenue grâce au programme Quantity One (Bio-rad) et les proportions de densitométrie sont corrélées à la quantité de protéines de l'extrait. L'analyse PIXE est réalisée sur les transferts de membrane de nitrocellulose obtenus à partir de gels doublons. Après avoir supprimé le bruit de fond, le nombre de coups de sélénium obtenu par l'analyse PIXE est combiné à la concentration en sélénium total de l'extrait dosé par ICP-MS. La concentration en sélénium est normalisée par rapport à la quantité de protéines de l'extrait et exprimée en µg par g de protéines. La légende de l'échelle des abscisses est indiquée pour les figures 92A, 92B et 92C.

Les trois profils protéiques de migration sont comparés en fonction de la distance de migration des marqueurs de poids moléculaire (kDa).

Notes pour les figures B et C : afin de pouvoir comparer les profils de sélénium dans les extraits solubles, l'échelle des valeurs de sélénium en ordonnée à droite est similaire pour les deux oxyanions.

Le tableau récapitulatif des résultats de ce chapitre IV est présenté ci-après.

	Sélénite		Séléniat			
			Sulfate 3 mM		Sulfate 0,3 mM	
Stade de croissance	Souche Sauvage	Mutants	Souche sauvage	Mutants	Souche sauvage sans chloramphénicol	Souche sauvage avec chloramphénicol
Début % mg par g de protéines	$\text{Se}^{\text{IV}} + \text{SeMet}$ 60 + 40 3,6 + 2,4	$\text{SeMet} + \text{Se}^0$ 30 + 70 6,6 + 15,4	$\text{Se}^{\text{VI}} + \text{Se}^{\text{IV}} + \text{SeMet}$ 80 + 10 + 10 0,5 + <0,1 + <0,1	$\text{Se}^{\text{VI}} + \text{SeMet}$ 70 + 30 10,5 + 4,5	$\text{Se}^{\text{VI}} + \text{SeMet}$ 85 + 15 0,7 + 0,1	$\text{Se}^{\text{VI}} + \text{SeMet}$ 50 + 50 0,3 + 0,3
Milieu % mg par g de protéines	$\text{SeMet} + \text{Se}^0$ 50 + 50 40 + 40	$\text{SeMet} + \text{Se}^0$ 50 + 50 14 + 14	$\text{Se}^{\text{VI}} + \text{Se}^{\text{IV}} + \text{SeMet}$ 10 + 40 + 50 0,7 + 2,8 + 3,2	$\text{Se}^{\text{VI}} + \text{SeMet}$ 10 + 90 1,2 + 10,8	$\text{Se}^{\text{VI}} + \text{SeMet}$ 50 + 50 15 + 15	$\text{Se}^{\text{VI}} + \text{SeMet} + \text{RSSeSR}/\text{Se}^0 ?$ 20 + 50 + 30 4,8 + 12 + 7,2
Fin % mg par g de protéines	Se^0 100 350	Se^0 100 130	SeMet 100 15	SeMet 100 15	$\text{Se}^{\text{VI}} + \text{SeMet} + \text{RSSeSR}$ 10 + 50 + 40 6 + 30 + 20	$\text{SeMet} + \text{RSSeSR} + \text{Se}^0$ 70 + 20 + 10 28 + 8 + 4
La coloration rouge du milieu apparait lorsque la concentration en Se^0 dépasse 100 mg par g de protéines						

Tableau 19 : bilan des résultats du chapitre IV. SeMet correspond à la sélénométhionine ; l'espèce RSSeSR correspond au sélénodiglutathion de notre base de données de références. La concentration de chaque espèce est reportée pour l'accumulation maximale dans les bactéries

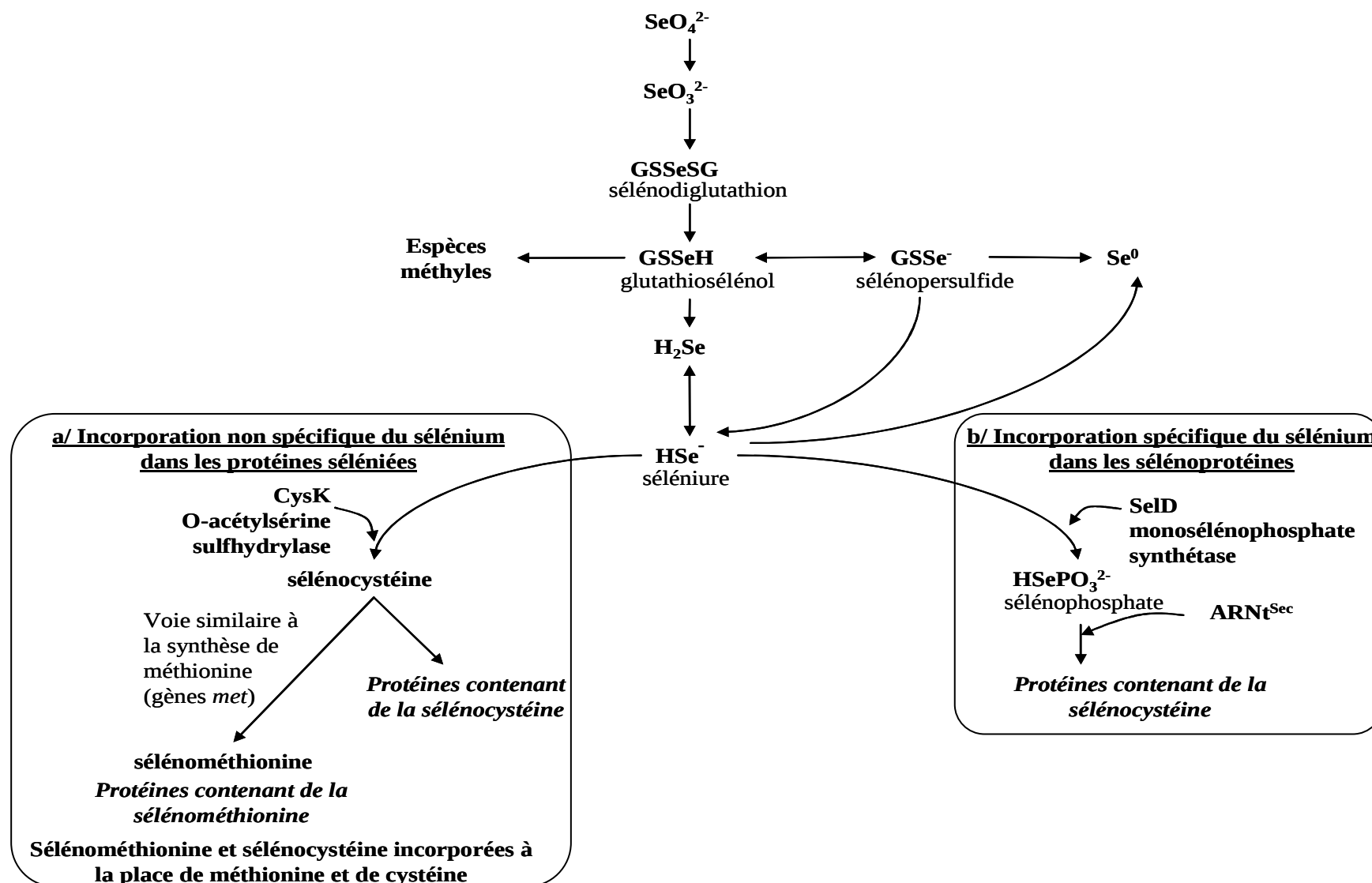


Figure 80 : schéma récapitulatif de la voie de réduction du sélénium (adapté de Turner et al., 1998).

DISCUSSION ET CONCLUSIONS du chapitre IV

1- il existe deux voies de réduction du sélénium chez *C. metallidurans* CH34

Dans ce chapitre, nous avons montré que le sélénium accumulé par *C. metallidurans* CH34 est transformé et l'étude de la cinétique de cette transformation a permis d'identifier des espèces transitoires ou intermédiaires. Qu'il soit administré sous la forme de sélénite (degré d'oxydation (+IV)) ou de séléniate (degré d'oxydation (+VI)), le sélénium est réduit dans la bactérie, principalement en sélénium organique (degré d'oxydation (-II)) et/ou en sélénium élémentaire (degré d'oxydation (0)).

La transformation du sélénite conduit à sa complète réduction en sélénium élémentaire. Une espèce transitoire ou intermédiaire est un alkyle séléniure. Nous avons pu montrer qu'il s'agit d'une espèce unique qui est la sélénométhionine. Une faible proportion de sélénite est retrouvée dans la fraction bactérienne aux temps courts d'exposition.

La transformation du séléniate conduit principalement à la formation d'un alkyle séléniure : la sélénométhionine. Du sélénium élémentaire est produit de façon très minoritaire : dans ce cas, la culture ne vire pas au rouge, coloration caractéristique de la présence de cette espèce. De nombreuses formes de sélénium transitoires ou intermédiaires ont été mises en évidence : une fraction de séléniate et de sélénite est présente dans les culots bactériens aux temps courts d'exposition.

Dans la littérature, il est rapporté plusieurs mécanismes de transformation bactérienne du sélénium (cf. synthèse bibliographique IV), notamment son assimilation ou des processus de détoxification. Lors de son assimilation, le sélénium est incorporé dans la biomasse sous la forme d'acides aminés séléniés : sélénométhionine ou sélénocystéine. Les mécanismes de détoxification du sélénium peuvent être sa volatilisation ou son immobilisation, par exemple par transformation de la forme soluble du sélénium en une forme insoluble, le sélénium élémentaire qui précipite dans la bactérie et devient ainsi moins toxique (Doran, 1982 ; Stolz *et al.*, 2006). Dans notre étude, la transformation du sélénite et du séléniate, principalement en sélénométhionine et en sélénium élémentaire, laisse supposer la présence de deux mécanismes de transformation parallèles : l'assimilation et la détoxification. D'autres espèces organiques comme le Se méthyle L-sélénocystéine, forme méthylée et soluble du sélénium (Chasteen et Bentley, 2003), n'ont pas été détectées dans la bactérie. Chez *C. metallidurans* CH34, la méthylation, si elle existe, est un mécanisme négligeable (cf. paragraphe 2.1). Nous avons montré que chez les mutants résistants au sélénite, la transformation du sélénite et du séléniate est inchangée par rapport à la souche sauvage.

La figure 79 présente les processus de réduction des oxyanions de sélénium (assimilation et détoxification) rapportés dans la littérature (adapté de Turner *et al.*, 1998).

2- une voie d'assimilation transforme les oxyanions du sélénium en sélénium organique : la sélénométhionine, et conduit à son incorporation dans les protéines bactériennes

Le sélénium dans les acides aminés

Qu'elle soit exposée au sélénite ou au séléniate, *C. metallidurans* CH34 accumule et transforme le sélénium en L-sélénométhionine. Dans la littérature, il est rapporté que l'espèce non volatile la plus communément trouvée chez les micro-organismes est la sélénométhionine (Chasteen et Bentley, 2003), résultat d'une voie d'assimilation.

Comme nous l'avons vu précédemment, du fait de sa forte similitude avec le sulfate, le séléniate entre fréquemment dans la bactérie en empruntant le système de transport du sulfate. Une fois dans le cytoplasme, le séléniate est décrit comme étant réduit principalement par voie enzymatique en sélénite (Turner *et al.*, 1998). Cette première étape de réduction est une réaction lente (McCready *et al.*, 1966).

Plusieurs voies de réduction du séléniate en sélénite sont décrites dans la littérature : *Thauera selenatis* possède une séléniate réductase spécifique impliquée dans la dissimilation (Schröder *et al.*, 1997 ; Macy, 1994) ; *E. coli* utilise ses nitrate réductases A et Z (Avazeri *et al.*, 1997) ; *R. sphaeroides*, *Paracoccus denitrificans*, *Paracoccus pantotrophus* et *Ralstonia eutropha* utilisent leurs nitrate réductases membranaires et périplasmiques (Sabaty *et al.*, 2001).

La voie métabolique du sélénite suit ensuite une série de réactions de réduction dont le glutathion serait le principal acteur (Turner *et al.*, 1998). Le séléniate pourrait également réagir directement avec le glutathion par une réaction lente (Shamberger, 1985). Le glutathion constitue le thiol majoritaire des β -protéobactéries (Newton et Fahey, 1989). La forte réactivité du sélénite avec le glutathion conduirait d'abord à la synthèse de sélénodiglutathion, GSSeSG (Ganther, 1971 ; Rabenstein et Tan, 1988), qui serait lui-même réduit en glutathiosélénol GSSeH puis en séléniure HSe^- . La synthèse de sélénométhionine serait le résultat final de la transformation du séléniure en sélénocystéine par l'O-acétylsérine sulphydrylase *cys K* (cf. synthèse bibliographique, chapitre III figure 23 et figure 80a) (Müller *et al.*, 1997 ; Turner *et al.*, 1998).

Un même mécanisme d'assimilation du séléniate a été rapporté chez *Halomonas* (de Souza *et al.*, 2001) et *R. sphaeroides* (Van Fleet-Stalder *et al.*, 2000). Chez *C. metallidurans* CH34, les intermédiaires séléniate (après exposition au séléniate), sélénite et sélénométhionine (après exposition au sélénite ou au séléniate) appuient cette voie métabolique.

Le sélénium dans les protéines

Nous avons montré que les fractions protéiques cytoplasmiques et périplasmiques de *C. metallidurans* CH34 après exposition au sélénite ou au séléniat, et les protéines membranaires après exposition au sélénite, ont toutes deux incorporé du sélénium.

Après séparation des protéines des fractions solubles et insolubles par SDS-PAGE, les plus fortes concentrations en sélénium sont retrouvées dans les protéines de faibles poids moléculaire (de 20 à 30 kDa), que ce soit après une exposition au sélénite ou au séléniat. Après une exposition au sélénite, une seconde zone de forte concentration en sélénium se situe aux poids moléculaires élevés (60 à 110 kDa). De façon intéressante, dans la fraction des protéines membranaires des bactéries exposées au sélénite, un pic 2 à 3 fois plus concentré en sélénium que la moyenne des protéines de la fraction apparaît aux alentours de 70 kDa ; un pic similaire vers 26-27 kDa, 4 fois plus concentré que la moyenne, apparaît dans la fraction des protéines cytoplasmiques et périplasmiques après une exposition aux deux oxyanions sélénite et séléniat.

Dans la voie d'assimilation du sélénium, les acides aminés sélénés sont incorporés dans les protéines par deux mécanismes distincts :

- un mécanisme non spécifique conduit à la synthèse de protéines sélénées par substitution des acides aminés sélénés libres, sélénométhionine et sélénocystéine, à la place des résidus méthionine et cystéine (Stadtman, 1991 ; cf. figure 79a) ;
- l'incorporation spécifique du sélénium conduit à la synthèse de sélénoprotéines par la traduction de l'ARN messager contenant l'anticodon UGA de la sélénocystéine (cf. synthèse bibliographique figure 12, paragraphe IV.3.2 et figure 79b).

Le seul acide aminé séléné que nous ayons mis en évidence chez *C. metallidurans* CH34 après exposition au sélénite ou au séléniat est la sélénométhionine. L'incorporation du sélénium dans les protéines serait donc essentiellement non spécifique. Les protéines présentes dans les zones de poids moléculaires où les concentrations en sélénium sont plus élevées sont probablement des protéines riches en résidus méthionine.

Nos expériences n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de sélénocystéine. Cependant, l'instabilité de cette espèce peut expliquer sa non détection. Les principales sélénoprotéines bactériennes répertoriées sont des hydrogénases et des formiates déshydrogénases (par exemple, chez *E. coli*, la formiate déshydrogénase H a un poids moléculaire d'environ 80 kDa (Zinoni *et al.*, 1986) et la sélénoprotéine SelB a un poids moléculaire voisin de 70 kDa (Stadtman, 1991)). Les protéines de plus faible poids moléculaire ont été identifiées comme la sélénophosphate synthétase de 40 kDa chez *E. coli* (Leinfelder *et al.*, 1990) ou une protéine de 22 kDa ayant une homologie avec des peroxyrédoxines chez

Eubacterium acidaminophilum (Andreesen *et al.*, 1999). A ce stade de l'étude, nous ne pouvons pas préciser davantage l'origine des pics de concentrations élevées en sélénium (26-27, 30 et 70 kDa). Ces résultats nécessitent des investigations supplémentaires pour affiner la recherche de protéines sélénées ou de sélénoprotéines potentielles.

3- une voie de détoxification précipite le sélénite en nanoparticules de sélénium inorganique : le sélénium élémentaire

C. metallidurans CH34 accumule et transforme le sélénite en particules de sélénium élémentaire dont la taille, nanométrique, augmente avec le temps d'exposition. Cette transformation se fait en quelques heures une fois que les bactéries atteignent la phase stationnaire. Des résultats similaires sont observés chez *Pseudomonas fluorescens* qui accumule et transforme le sélénite en granules de sélénium élémentaire dès les premières d'exposition. La taille des particules augmente avec le temps d'exposition (Garbisu *et al.*, 1996).

Leur caractérisation fine a permis de mettre en évidence des différences morphologiques entre les nanoparticules de sélénium élémentaire synthétisées par les bactéries, libérées dans le milieu de culture au moment de la lyse bactérienne, et les mêmes particules abiotiques synthétisées par un mélange d'acide ascorbique et de sélénite (cf. matériels et méthodes II.5). Les particules biologiques sont des particules ultra fines, dissociées les unes des autres. Les particules issues de cette synthèse chimique se présentent en chapelets de particules semi fines associées les unes aux autres. De telles observations ont déjà été rapportées (Oremland *et al.*, 2004). Un autre type de synthèse chimique de particules de sélénium élémentaire, par mélange de glutathion et de sélénite, permet d'obtenir des granules de morphologie proche des particules biotiques (Kessi et Hanselmann, 2004).

Comme observé précédemment (Roux *et al.*, 2001), nous avons montré que les nanoparticules synthétisées par *C. metallidurans* CH34 sont localisées dans l'espace périplasmique et plus généralement dans le cytoplasme des bactéries, à proximité de la membrane, siège probable de la réduction. *P. fluorescens* (Gram négative) et *B. subtilis* (Gram positive), en conditions aérobies, forment également des particules de sélénium qui sont respectivement observées dans le cytoplasme et entre le peptidoglycane et la membrane plasmique de la bactérie (Garbisu *et al.*, 1996).

Dans la littérature, il est rapporté que le sélénite peut être utilisé par certaines bactéries comme accepteur d'électrons en respiration anaérobie (Macy *et al.*, 1989). C'est la voie de dissimilation. Il peut également être réduit indépendamment de cette voie (Lortie *et al.*, 1992).

Plusieurs mécanismes de détoxification par réduction du sélénite en sélénium élémentaire dans la bactérie sont proposés mais non encore élucidés.

Le premier mécanisme est celui qui fait intervenir le glutathion et qui est décrit dans le paragraphe précédent. Le sélénite accumulé dans les bactéries est réduit en sélénodiglutathion. Intermédiaire instable (Turner *et al.*, 1998), il serait ensuite réduit en sélénium élémentaire par la glutathion réductase (Ganther, 1971). Une étude réalisée *in silico* précise que la transformation du sélénite en sélénodiglutathion est rapide (quelques minutes) (Kessi et Hanselmann, 2004). Le sélénopersulfide (GSSe^-) peut se dismuter de façon spontanée en glutathion réduit (GSH) et en sélénium élémentaire Se^0 , comme cela a été observé *in vitro* (Ganther, 1971). Cette voie de détoxification est décrite pour *E. coli* et *B. subtilis* (Turner *et al.*, 1998 ; Garbisu *et al.*, 1996). Bien que nous n'ayons pas détecté la présence de sélénodiglutathion ou de sélénopersulfide au cours de la transformation bactérienne du sélénite par *C. metallidurans* CH34, cette voie ne peut pas être exclue, du fait de l'instabilité de ces espèces et de la rapidité des réactions. Comme nous l'avons précisé plus haut, les nanoparticules synthétisées par *C. metallidurans* CH34 ont une morphologie proche des particules abiotiques synthétisées grâce au glutathion.

D'autres mécanismes enzymatiques de réduction du sélénite en sélénium élémentaire, ne faisant pas intervenir le glutathion, sont décrits dans la littérature. Par exemple, le sélénite pourrait réagir avec les thiorédoxines de la bactérie (Turner *et al.*, 1998). Chez *Thauera selenatis*, la réduction du sélénite est contrôlée par une nitrite réductase périplasmique (Macy, 1994). Une nitrite ou une nitrate réductase catalyse cette réduction chez *Enterobacter cloacae* (Dungan et Frankenberger, 1998 ; Losi et Frankenberger, 1998).

Nous ne pouvons pas préciser davantage le mécanisme de détoxification du sélénite chez *C. metallidurans* CH34. Les granules situés à proximité des membranes peuvent venir soit de la voie glutathion, soit d'une autre voie enzymatique. Cependant, la voie glutathion est la voie la plus souvent rapportée dans la littérature. Les autres mécanismes enzymatiques sont des mécanismes non spécifiques et à ce jour, aucune sélénite réductase n'a été décrite. Par contre, nous avons montré que la réduction du sélénite en sélénium élémentaire n'est pas un mécanisme de détoxification induit chez *C. metallidurans* CH34, comme c'est le cas chez *B. subtilis* (Garbisu *et al.*, 1996). Il s'agit donc d'un mécanisme constitutif de la bactérie.

4- Exposition au sélénium et stress oxydant

Après exposition au séléniat dans un milieu limité en sulfate, l'accumulation du sélénium dans les bactéries *C. metallidurans* CH34 augmente significativement (augmentation d'un facteur 6 par rapport à l'accumulation dans les bactéries cultivées dans un milieu riche en

sulfate ; chapitre III paragraphe 3.1). Pendant les 48 premières heures de cette exposition, le séléniate est présent en forte proportion dans les bactéries (de 85 à 50%). Puis la proportion de séléniate diminue au fur et à mesure de l'apparition de sélénodiglutathion. A titre de comparaison, lorsque les cultures sont réalisées dans un milieu riche en sulfate, à 12 heures d'exposition, les bactéries ne contiennent déjà plus que 10% de séléniate et le sélénodiglutathion n'est pas détecté. Nous avons vu que la réduction du séléniate en sélénite dans la bactérie est une réaction lente. La réaction du sélénite avec le glutathion est par contre une réaction rapide. L'espèce sélénite n'est donc présente que furtivement dans le cytoplasme bactérien.

Comment expliquer que le sélénodiglutathion ne soit détecté que lorsque les bactéries sont cultivées en conditions limitées en sulfate ?

Le sélénium a un rôle d'agent oxydant au sein des cellules contenant de fortes concentrations en molécules à groupements thiols comme le glutathion : la voie impliquant le glutathion est accompagnée de la production d'ions superoxydes $O_2^{\cdot -}$ (Kramer et Ames, 1988 ; Bébien *et al.*, 2002 ; Kessi et Hanselmann, 2004). Une précédente étude a déjà montré que le sélénite et le séléniate administrés à *C. metallidurans* CH34 provoque un stress oxydant accompagné d'une surexpression de la superoxyde dismutase à fer (Roux et Covès, 2002). Cette étude a montré que l'activité de la superoxyde dismutase est plus importante chez les bactéries cultivées en présence de séléniate qu'en présence de sélénite, laissant supposer un pouvoir oxydant plus élevé pour le séléniate. Dans notre étude, nous avons noté la présence de nombreux granules peu denses à l'intérieur du cytoplasme des bactéries lorsqu'elles sont cultivées en condition limitée en sulfate. Ces granules seraient des réserves de carbone sous forme de polyhydroxybutyrates (PHB), décrites dans la littérature comme caractéristiques d'un stress (Tian *et al.*, 2005).

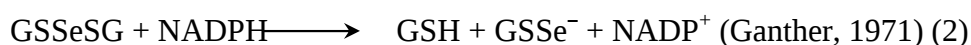
En tenant compte de ces observations, les bactéries cultivées dans le milieu limité en sulfate et en présence de séléniate pourraient subir un stress oxydant important. Comme nous l'avons vu, le séléniate entrant dans le cytoplasme des bactéries est réduit en sélénite. Le sélénite, pour partie, réagit par voie non enzymatique avec le glutathion réduit, pour former du glutathion oxydé (GSSG) et du sélénodiglutathion (GSSeSG), en provoquant un stress oxydant :



Il a déjà été montré que la synthèse de glutathion réductase est augmentée chez des bactéries en réponse au stress sélénite (Bébien *et al.*, 2001). Ainsi, après exposition au sélénium dans un milieu limité en sulfate, l'activité de la glutathion réductase pourrait être activée par la présence du sélénite dans le cytoplasme bactérien. Le glutathion oxydé formé par la réaction 1

pourrait donc être réduit par la glutathion réductase (réaction 2) et régénérer continuellement du glutathion réduit qui pourrait à nouveau réagir avec du sélénite.

Glutathion réductase



Une exposition au séléniate conduit à une faible accumulation du sélénium dans la bactérie : la voie de détoxification ne se met pas en place. Une exposition au séléniate dans un milieu limité en sulfate permet à la bactérie d'accumuler davantage le sélénium, mais pas suffisamment pour induire le mécanisme de détoxification. En revanche, dans ces conditions, la bactérie est dans un fort état de stress ; le séléniate accumulé est réduit en sélénite ; le sélénite interagit davantage avec le glutathion et conduit à davantage de produits ou intermédiaires de réaction, comme le sélénodiglutathion, lesquels sont alors détectables.

Dans le cas d'une exposition au sélénite, son accumulation dans la bactérie est suffisamment importante pour induire la voie de détoxification et ainsi limiter le stress bactérien et la synthèse de sélénodiglutathion.

Par ailleurs, les bactéries cultivées dans un milieu limité en sulfate en présence de chloramphénicol synthétisent jusqu'à 20 mg de sélénium élémentaire par g de protéines. La concentration en Se^0 reste trop faible pour donner une couleur rouge à la culture, puisque la couleur caractéristique de la présence de Se^0 apparaît lorsque sa concentration dépasse 100 mg par g de protéines. En condition non limitée en sulfate, la concentration maximale en sélénium élémentaire est de 3 mg par g de protéines.

Comment expliquer que le sélénium élémentaire est produit en plus grande concentration lorsque les bactéries sont cultivées en conditions limitées en sulfate et en présence de chloramphénicol ?

Lorsque la synthèse de néo-protéines est limitée, l'assimilation du sélénium est réduite au profit du mécanisme de détoxification. A une étape, l'assimilation nécessiterait une induction enzymatique permettant la transformation du sélénium inorganique en sélénium organique.

5- pourquoi après une exposition au séléniate, la voie de détoxification ne se met pas en place ?

Quelles que soient les conditions d'exposition de *C. metallidurans* CH34 au séléniate, la culture ne devient jamais rouge malgré la présence de sélénite qui se transforme partiellement en sélénium élémentaire. Nous avons montré que le séléniate n'inhibe pas la réduction du sélénite

en sélénium élémentaire. La voie rapide de détoxification observée avec le sélénite n'est pas activée en présence de séléniat.

De même, une culture de bactéries exposées à une faible concentration de sélénite ne devient pas rouge. A faible stress sélénite, la voie de détoxification ne se met pas en place.

L'induction du mécanisme de réduction du sélénium (sélénite ou séléniat) en sélénium élémentaire par un mécanisme de détoxification nécessiterait une concentration seuil d'accumulation de sélénium. Après une exposition au sélénite, la coloration rouge de la culture apparait lorsque la concentration en sélénium élémentaire dépasse 100 mg par g de protéines. Le mécanisme de détoxification se déclenche lorsque la bactérie a accumulé aux alentours de 120 mg de sélénium par g de protéines (la coloration orange est visible dès 70 mg par g de protéines). Le sélénium élémentaire n'est pas une espèce majoritaire au cours de la transformation du séléniat et sa concentration ne dépasse jamais 20 mg de Se^0 par g de protéines, ce qui explique que le mécanisme de détoxification ne s'active pas.

De la même manière, il a été montré que lorsque le sélénite est administré à une concentration suffisante aux besoins de la bactérie *R. sphaeroides*, il est transformé en sélénium organique proche ou similaire à la sélénométhionine dans la bactérie. Au contraire, si le sélénite est apporté en excès par rapport aux besoins métaboliques de la souche, la voie de détoxification est activée (Van Fleet-Stalder *et al.*, 2000). En accord avec ces résultats, nous avons montré que la réduction du sélénite en sélénium élémentaire est induite lorsque les bactéries sont exposées à une concentration supérieure à 0,02 mM.

Conclusion

En conclusion, nous avons mis en évidence que le sélénite est accumulé à travers deux voies compétitives, une voie assimilatrice lente et dans un second temps, une voie de détoxification. En revanche après une exposition au séléniat, seule la voie d'assimilation est présente et la voie de détoxification ne se met pas en place. La quantité de sélénium accumulée semble être insuffisante pour que cette voie s'active suite à l'exposition au séléniat. La plupart des résultats ont été rapportés dans les articles suivants dont une copie figure à la suite de ce chapitre :

G. Sarret, L. Avoscan, M. Carrière, R. Collins, J. Covès, B. Gouget (2005) Chemical forms of selenium in the metal-resistant bacteria *Ralstonia Metallidurans* CH34 exposed to selenite and selenate. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5): 2331-7.

L. Avoscan, R. Collins, M. Carrière, B. Gouget, J. Covès (2006) Seleno-L-methionine is the predominant organic form of selenium in *Cupriavidus metallidurans* CH34 exposed to selenite or selenate. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 6414-6416.

Publications

Chemical Forms of Selenium in the Metal-Resistant Bacterium *Ralstonia metallidurans* CH34 Exposed to Selenite and Selenate

Géraldine Sarret,^{1*} Laure Avoscan,² Marie Carrière,² Richard Collins,² Nicolas Geoffroy,¹ Francine Carrot,² Jacques Covès,³ and Barbara Gouget²

Environmental Geochemistry Group, LGIT, University of Grenoble and CNRS, BP 53, 38041 Grenoble, Cedex 9, France¹; Laboratoire Pierre Süe, CEA-CNRS UMR 9956, CEA/Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France²; and Institut de Biologie Structurale—J.-P. Ebel, Laboratoire des Protéines Membranaires, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex, France³

Received 7 October 2004/Accepted 30 November 2004

Ralstonia metallidurans CH34, a soil bacterium resistant to a variety of metals, is known to reduce selenite to intracellular granules of elemental selenium (Se⁰). We have studied the kinetics of selenite (Se^{IV}) and selenate (Se^{VI}) accumulation and used X-ray absorption spectroscopy to identify the accumulated form of selenate, as well as possible chemical intermediates during the transformation of these two oxyanions. When introduced during the lag phase, the presence of selenite increased the duration of this phase, as previously observed. Selenite introduction was followed by a period of slow uptake, during which the bacteria contained Se⁰ and alkyl selenide in equivalent proportions. This suggests that two reactions with similar kinetics take place: an assimilatory pathway leading to alkyl selenide and a slow detoxification pathway leading to Se⁰. Subsequently, selenite uptake strongly increased (up to 340 mg Se per g of proteins) and Se⁰ was the predominant transformation product, suggesting an activation of selenite transport and reduction systems after several hours of contact. Exposure to selenate did not induce an increase in the lag phase duration, and the bacteria accumulated approximately 25-fold less Se than when exposed to selenite. Se^{IV} was detected as a transient species in the first 12 h after selenate introduction, Se⁰ also occurred as a minor species, and the major accumulated form was alkyl selenide. Thus, in the present experimental conditions, selenate mostly follows an assimilatory pathway and the reduction pathway is not activated upon selenate exposure. These results show that *R. metallidurans* CH34 may be suitable for the remediation of selenite-, but not selenate-, contaminated environments.

Microorganisms play a major role in the biogeochemical cycle of selenium in the environment (12). Certain strains that are resistant to selenium oxyanions, and reduce selenite (Se^{IV}) and/or selenate (Se^{VI}) to the less available elemental selenium (Se⁰) (7), could be potentially used for the bioremediation of contaminated soils, sediments, industrial effluents, and agricultural drainage waters.

Ralstonia metallidurans CH34 is a soil bacterium characteristic of metal-contaminated biotopes. It is resistant to a variety of heavy metals and metalloids including Cr^{VI}, Co^{II}, Ni^{II}, Cu^{II}, Zn^{II}, As^V, Cd^{II}, Hg^{II}, and Pb^{II}. The genes for metal resistance are located in two large plasmids (pMOL28 and pMOL30). Their function and regulation are well understood for some of these elements (18). This bacterial strain is also resistant to selenite, and detoxification is realized by the incorporation of this oxyanion and its subsequent reduction to red Se⁰, as shown by X-ray absorption spectroscopy (24). This study also revealed that the Se⁰ granules were localized mainly in the cytoplasm. In contrast to previously cited metals and metalloids, the genes involved in selenite resistance have not yet been identified, and the exact mechanism of selenite bioreduction is still unknown. *R. metallidurans* CH34 can also resist up to 16 mM selenate (2). The capacity of *R. metallidurans* CH34 to accumulate selenate

and the fate of this oxyanion following incorporation have never been investigated. We have now studied the kinetics of selenite and selenate accumulation and used X-ray absorption near-edge structure (XANES) spectroscopy to determine Se speciation in order to identify the chemical intermediates putatively appearing during reduction. For such a purpose, XANES is the method of choice since it is nondestructive and enables direct determination of the target element speciation, i.e., its oxidation state and sometimes its exact chemical form. The results obtained on speciation were combined with the total metal content of each sample in order to deduce the concentration of each metal species. Such quantitative information is particularly useful to estimate the relative importance of several chemical pathways in a particular system.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strain and growth media. *R. metallidurans* CH34 provided by Max Mergeay (SCK/CEN, Mol, Belgium) was grown aerobically at 29°C in Tris salt mineral medium with 2% gluconate as a carbon source (18, 19).

One-contaminant (Se^{IV} or Se^{VI}) exposure. A preculture was obtained by growing the cells until mid-exponential phase (absorbance at 600 nm [*A*₆₀₀] of 1.5). Cells were then appropriately diluted to inoculate 300 ml Tris salt mineral medium at an initial *A*₆₀₀ of 0.3. The cultures were monitored by recording the *A*₆₀₀ as a function of time. A first series of experiments was run by adding selenite or selenate at a final concentration of 2 mM at time zero (*A*₆₀₀ = 0.3). In a second set of experiments, the selenium oxyanion was added during the first half of the exponential phase (*A*₆₀₀ = 1). Finally, a third series was run by adding the selenium oxyanion at the beginning of the stationary phase (*A*₆₀₀ = 3). Sodium selenite and sodium selenate were prepared as a 1 M stock solution in ultrapure water and sterilized by filtration. Control cultures were grown under identical

* Corresponding author. Mailing address: Environmental Geochemistry Group, LGIT, University of Grenoble and CNRS, BP 53, 38041 Grenoble, Cedex 9, France. Phone: 33 (0)4 76 82 80 21. Fax: 33 (0)4 76 82 81 01. E-mail: gsarret@ujf-grenoble.fr.

conditions in the absence of the selenium oxyanions. Anywhere from 5 to 15 ml, depending on the turbidity of the cell suspension, was sampled at various time intervals over 6 days and centrifuged, and the pellets were freeze-dried and stored for further use. Cell yield was determined by recording the A_{600} and assaying the protein content (bicinchoninic acid method with bovine serum albumin as standard).

Two-contaminant (Se^{IV} and Se^{VI}) exposure. Cultures of *R. metallidurans* CH34 were inoculated to an absorbance at 600 nm of 3 (stationary phase) and exposed to two different mixtures of selenite and selenate (2 mM selenite and 2 mM selenate or 1 mM selenite and 10 mM selenate). Three cases were tested: (i) selenite and selenate were both added immediately after inoculation, (ii) selenite was added immediately after inoculation and selenate 3 h later, or (iii) selenate was introduced immediately after inoculation and selenite 3 h later. A control culture, under identical conditions, was grown in the presence of selenite alone added immediately after inoculation. The appearance of the red color, a sign of the reduction of selenite to Se^0 , was checked after 24 h of exposure. **Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) analyses.** Bacteria and culture medium were separated by centrifugation at 6,000 g for 10 min. Cell pellets were washed twice with ultrapure water at 4°C and resuspended in a minimum volume of ultrapure water. A fraction of the pellet was digested in a mixture of 1 M NaOH–20% sodium dodecyl sulfate. In order to fully solubilize elemental selenium, H_2O_2 was added to the digested sample until the characteristic red color disappeared. These samples were used to determine total Se accumulation.

Selenium concentrations were measured by ICP-MS using an X7 series quad-rupole instrument (Thermo Electron Corporation, Cergy-Pontoise, France). Calibration curves were obtained by analysis of a range of SPEX certiPrep selenium standards (Metuchen, NJ). Selenium concentrations were determined with the isotopes 79 and 82, and yttrium was used as an internal standard (1 g liter⁻¹). For digested bacteria analyses, samples were acidified with ultrapure 65% nitric acid (Normatom quality grade; ProLabo, Fontenay sous Bois, France) and diluted in ultrapure water.

X-ray absorption spectroscopy. Selenium K-edge X-ray absorption experiments were performed on beamline FAME (BM30B) of the European Synchrotron Radiation Facility. The Se model compounds (all in solid state unless otherwise noted) used for this study were as follows: hexagonal (gray) elemental selenium, sodium selenate (solid and in solution), sodium selenite (solid and in solution), selenium sulfide, selenium dioxide, dimethyl selenide in solution, selenomethionine, S-methyl seleno L-cysteine, seleno-DL-cystine, selenocystamine, selenodiglutathione (RSSeSR) in solution, selenourea, and selenoguanosine. Selenodiglutathione was prepared by mixing sodium selenite and glutathione with a molar ratio of 1:4 in a dilute HCl solution (pH 1.3) (10). A bacterial pellet of *R. metallidurans* CH34 exposed to selenite over 10 days, and which was shown to contain monoclinic (red) Se^0 (24), was used as a reference for this compound. The other compounds were purchased from Sigma-Aldrich. Freeze-dried bacteria were ground in an agate mortar and diluted with glucose when necessary. The mixture was pressed into 5-mm-diameter pellets prior to determining XANES measurements. The spectra were recorded at room temperature in fluorescence mode, using a 30-element solid-state Ge detector (Canberra), for the most diluted bacterial samples and in transmission mode, using a diode, for the more concentrated samples. The monochromator was a Si(220) double crystal. Two to four scans of

10 min were summed, depending on Se concentration. The position of the beam on the pellet was changed between each scan in order to limit radiation damage. Hexagonal Se^0 was recorded simultaneously, and the spectra were energy calibrated by setting the energy of the maximum of the white line for this reference spectrum at 12.6592 keV. XANES spectra were normalized using polynomial functions of degrees 1 and 3 for the pre- and postedge parts, respectively. Each set of spectra for a given kinetics experiment was treated by using principal component analysis (PCA) (17, 30). This approach allows the determination of the number of Se species present in a set of samples and to identify these species, using a library of reference spectra. The number of principal components was determined based on the eigenvalue of each component and on the quality of the reconstructed spectra by using one, two, three, or more components with the total normalized sum-squares residual (total NSS):

$$\text{Total NSS} = \left(\sum_{\text{spectra } i} [\mu_{\text{exp.}} - \mu_{\text{reconst.}}]^2 \right) / \left(\sum_{\text{spectra } i} [\mu_{\text{exp.}}]^2 \cdot 100 \right) \quad (1)$$

where $\mu_{\text{exp.}}$ is the experimental normalized absorbance and $\mu_{\text{reconst.}}$ is the reconstructed normalized absorbance. The principal components were identified by target transformation using the NSS criterion as follows:

$$\text{NSS} = \left(\sum_i [\mu_{\text{exp.}} - \mu_{\text{reconst.}}]^2 \right) / \left(\sum_i [\mu_{\text{exp.}}]^2 \cdot 100 \right) \quad (2)$$

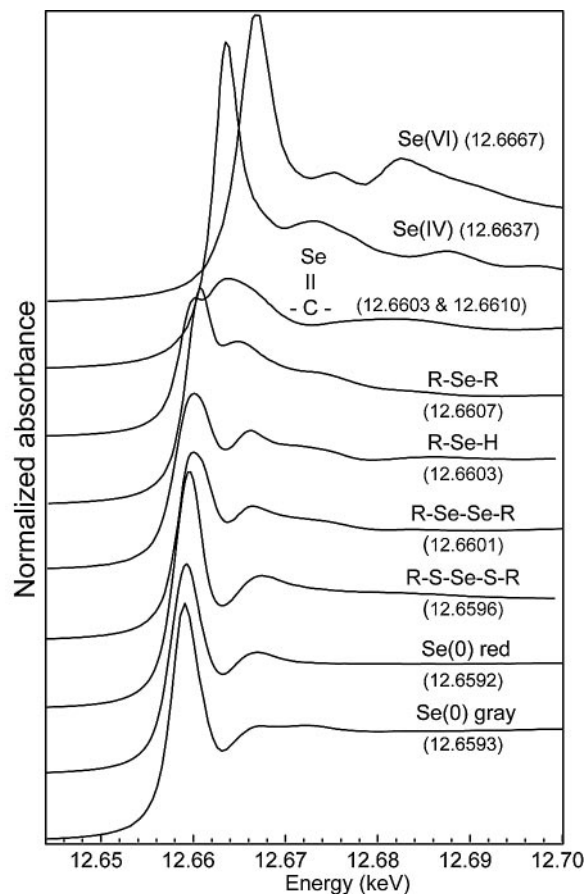


FIG. 1. XANES spectra for some reference compounds (in solid state unless otherwise specified). From top to bottom: sodium selenate, sodium selenite, selenourea, S-methyl seleno L-cysteine, seleno-DL-cystine, selenodiglutathione (in solution), red and gray elemental selenium. The position of the maximum of the white line is indicated in parentheses.

The percentage of each species, in molar fraction of Se, was then determined by linear combination fitting of each spectrum with the spectra of the identified reference materials. The precision was estimated at 5% of total Se. The percentages were then multiplied by total Se content, as determined by ICP-MS, in order to obtain the concentrations of each species (mg of Se per g of proteins).

RESULTS

The sensitivity of Se K-edge XANES spectroscopy for probing the oxidation state of Se is well established (20, 21). Figure 1 displays some of the reference spectra used in this study. The Se^{IV} and Se^{VI} is shifted by 4.5 eV and 7.5 eV main peak of Se respectively, relative to that of Se^0 . The energy shift is much smaller for organoselenium compounds (+0.4 to +1.5 eV relative to that of Se^0 , depending on the type of compound). The position of the main peak is identical for compounds with similar Se environments, for instance, S-methyl selenocysteine and selenomethionine for alkyl selenide (RSeR), seleno-DL-cystine and selenocystamine for alkyl diselenide (RSSeSR), and selenourea and selenoguanosine for the Se-C double bond (not shown). The energy shift between two types of Se local structures, for instance, RSeSR and RSSeSR, can be as small as 0.5 eV. The sensitivity of XANES is probably not sufficient to determine the distribution of several types of organic Se in

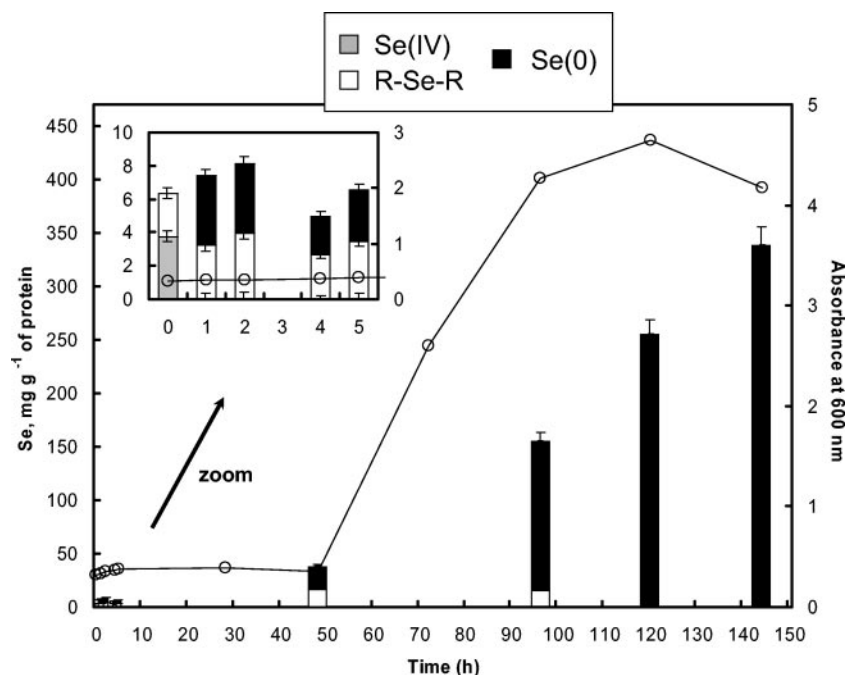


FIG. 2. Concentration of Se species in *R. metallidurans* CH34 exposed to selenite as determined by XANES linear combination fitting and ICP-MS analyses and time course of growth for the bacteria exposed to selenite (open circles). Error bars correspond to $\pm 5\%$ of total Se.

a complex mixture, but it certainly enables the identification of the major organoselenium species.

Selenite exposure. In the first experiment, a culture of *R. metallidurans* CH34 was exposed to 2 mM selenite added at the beginning of growth ($A_{600} = 0.3$). As described previously (24), the presence of selenite induced an increase in the lag phase duration (approximately 48 h compared to 10 h in the absence of selenite). The accumulation of selenite was minimal during this phase (40 mg Se per g of protein). However, at the end of the exponential phase, and during the stationary phase, selenium was strongly accumulated: at $t = 144$ h, Se accounted for one-third of the protein weight (Fig. 2).

Selected XANES spectra for the bacteria at various exposure times are shown in Fig. 3. The position of the main peak for $t = 0$ h at 12.6637 keV and the presence of a shoulder on the left-hand part of the peak suggested that the bacteria contain selenite and a minor proportion of organoselenium. At higher exposure times ($t = 1$ h to 48 h), the spectra were identical and the maximum of the main peak was intermediate between RSeR and Se⁰ (12.659 keV). The main peak was then slightly shifted to the left at $t = 96$ h (12.6596 keV) and matched the position of Se⁰ at $t = 120$ and 144 h (12.6592 keV). PCA showed that this set of spectra could be described by three components (eigenvalues of 80.0, 4.1, and 1.1). As expected, selenite and red Se⁰ were positively identified as principal components (NSS values of 4.7×10^{-3} and 2.9×10^{-4} , respectively). Several organoselenium species including RSeR, RSeSeR, and RSSeSR were also correctly reconstructed (NSS values of 1.2×10^{-4} to 4.3×10^{-4}). Among these five compounds retained, the most likely triplet of primary components should provide the best simulation of the whole set of bacterial spectra by linear combinations of these three spectra. Thus, all possible triplets were tested and selenite, red Se⁰, and RSeR provided

the best results. Fits using RSeSeR, or RSSeSR instead of RSeR, were poorer, as shown by increases of the residual by 27%, 34%, and 47%, respectively. The fact that these species were correctly reconstructed by PCA is due to their interme-

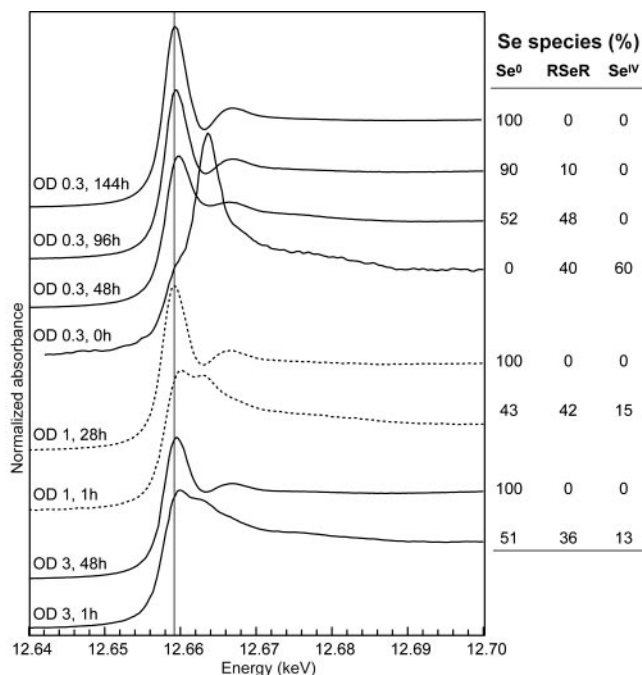


FIG. 3. Selected Se K-edge XANES spectra for *R. metallidurans* CH34 at various incubation times after introduction of selenite into the culture medium at A_{600} s (optical densities [O.D.]) of 0.3, 1, and 3 and the distribution of Se species determined by linear combination fitting.

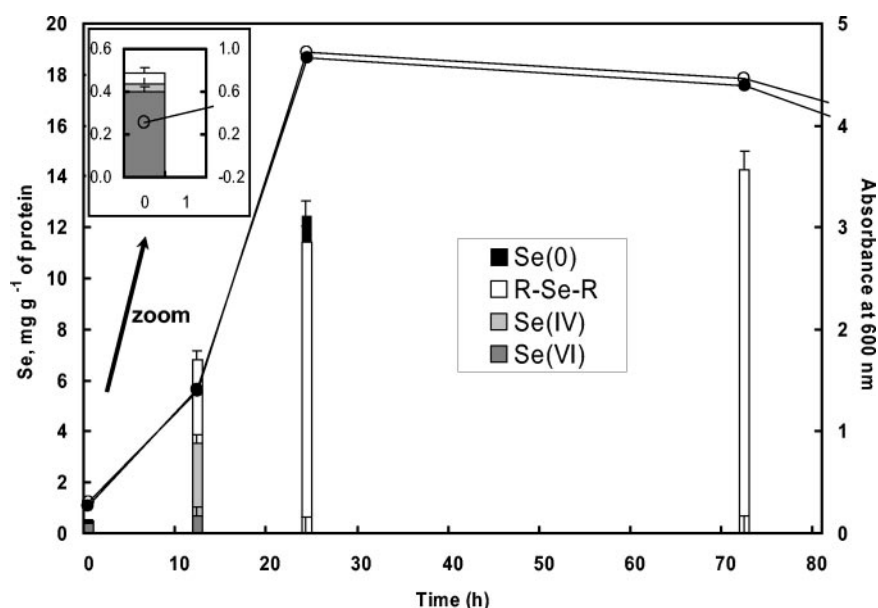


FIG. 4. Concentration of Se species in *R. metallidurans* CH34 exposed to selenate as determined by XANES linear combination fitting and ICP-MS analyses and time course of growth for the bacteria exposed to selenate (open circles) and for the control culture in the absence of added selenium oxyanion (filled circles). Error bars correspond to $\pm 5\%$ of total Se.

diolate position between Se⁰ and RSeR (Fig. 1). The occurrence of selenocysteine (RSeH) was not tested since this compound reoxidized to selenocystine during the experiment. However, preliminary results obtained by high-performance liquid chromatography support the predominance of the RSeR form (L. Avoscan, R. Collins, G. Sarret, M. Carrière, J. Covès, and B. Gouget, Abstr. 227th ACS Natl. Meet., abstr. 016, p. U1107, 2004). In conclusion, alkyl selenide is believed to be the dominant organic form of Se in the bacteria exposed to selenite.

Figure 2 shows the evolution in the concentration of Se species in the bacteria during growth. Immediately after the introduction of selenite, Se was distributed as 60% Se^{IV} and 40% RSeR in the bacteria. This latter species is likely to be a reaction product of selenite rather than constitutive selenium contained in amino acids and/or proteins since control bacteria, not exposed to selenite, did not yield a detectable Se XANES signal. Subsequently, until the end of the lag phase ($t = 1$ h to 48 h), a mixture of RSeR and Se⁰ in equivalent proportions was observed. The concentration of RSeR was almost stable from 48 to 96 h (18 and 15 mg Se g⁻¹ of proteins, respectively), whereas the Se⁰ concentration strongly increased (20 and 140 mg Se g⁻¹ of proteins, respectively). At 120 and 144 h, Se⁰ was the only species detected. The amount of organoselenium species identified at 96 h might still be present in these two samples but was masked by the dominant Se⁰ form (estimated error of $\pm 5\%$ of total Se, i.e., 13 mg g⁻¹ at 120 h and 17 mg g⁻¹ at 144 h).

In parallel experiments, selenite was added at approximately mid-exponential phase ($A_{600} = 1$) and at the beginning of the stationary phase ($A_{600} = 3$). Similar evolutions of Se accumulation and speciation were observed: Se uptake was limited for several hours and then increased. RSeR and Se⁰ were observed during the slow uptake period, followed by Se⁰ only (Fig. 3). However, the production of Se⁰ was faster at higher A_{600} val-

ues. For instance, after 48-h exposure, the bacteria contained 99.4 mg g⁻¹ Se⁰ compared to 19.8 mg g⁻¹ Se⁰ when selenite was added at A_{600} s of 1 and 0.3, respectively.

Selenate exposure. In this experiment, the bacteria were exposed to 2 mM selenate at the beginning of the growth ($A_{600} = 0.3$) (Fig. 4). The highest accumulation also occurred during the exponential phase, but this oxyanion was much less accumulated than selenite (the maximum concentration is 14 compared to 340 mg of Se g⁻¹ of proteins for selenite). In contrast with the selenite experiment, the presence of selenate did not increase the lag phase duration. During the exponential phase, bacteria in selenate-complemented media grew at rates comparable to those of bacteria grown in selenite-free media and maximal densities were very similar whether or not selenate was present in the culture medium (Fig. 4). The experiment was stopped after 72 h since the bacterial population started to decrease, probably due to the depletion of nutrients in the medium (the same decrease was observed for the control culture). This was indicated by the decrease in absorbance and verified by the numeration of cells forming colonies on Luria broth agar (data not shown).

XANES spectra for the bacteria at various selenate exposure times are shown in Fig. 5. The PCA of this set of spectra showed that three Se species were present (eigenvalues of 73, 4.9, and 1.9): Se^{VI}, Se^{IV}, and organoselenium (NSS values of $3.7 \cdot 10^{-3}$, $3.3 \cdot 10^{-3}$, and $2.7 \cdot 10^{-4}$ to $6.6 \cdot 10^{-4}$, respectively). Se⁰ could not be considered a principal component (NSS value of $1.2 \cdot 10^{-2}$). Using the same procedure as for the selenite experiment, we found that RSeR was the most likely organoselenium species. Se^{VI} was detected in the bacterial pellets immediately after its introduction to the culture medium ($t = 0$ h) and at $t = 12$ h (Fig. 5). At $t = 12$ h, the bacteria contained Se^{IV}, Se^{VI}, and RSeR. The simulation of the spectrum for $t = 24$ h was significantly improved by adding Se⁰ to the simulation (NSS value decreased by 27%), although this species was not a

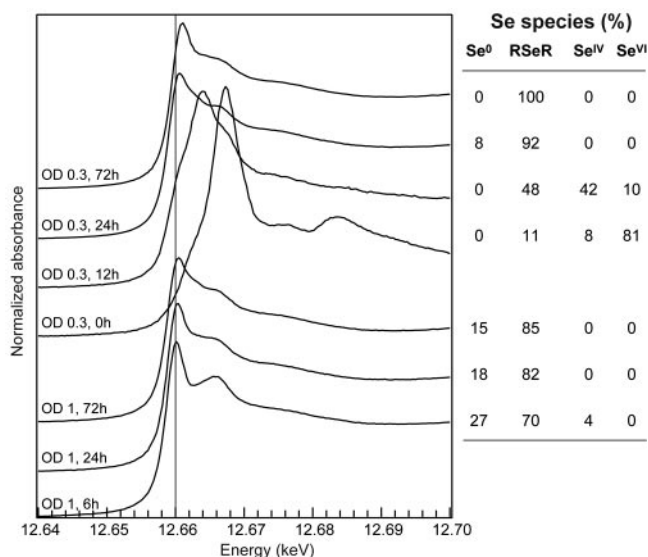


FIG. 5. Selected Se K-edge XANES spectra for *R. metallidurans* CH34 at various incubation times after the introduction of selenate into the culture medium at A_{600} s (optical densities [O.D.]) of 0.3 and 1 and the distribution of Se species determined by linear combination fitting.

principal component of the system. The occurrence of only 8% Se⁰ in one particular sample explains why it was not detected as principal component of the system. At longer exposure times, RSeR was the only species detected.

In another experiment, selenate was added at mid-exponential phase ($A_{600} = 1$). The same evolution in the speciation of selenium was observed, although Se⁰ was more represented

(up to 27% of total Se) (Fig. 5). The slight shift of the main peak for the spectrum at $t = 6$ h compared to at $t = 168$ h was indicative of this higher Se⁰ content (Fig. 5).

The composition of headspace gas was not investigated during the selenite and selenate experiments, but the formation of volatile methylated Se species is believed to be limited since >90% of the Se initially in solution could be accounted for upon ICP-MS analyses of the bacterial samples and solutions. **Two-contaminant (Se^{IV} and Se^{VI}) exposure.** As selenite is completely reduced to Se⁰, whereas selenate is not, although some selenite is produced, we have checked the hypothesis of the inhibition of the selenite reduction to Se⁰ by selenate. The bacteria were thus exposed to both selenite and selenate introduced at the same time or to one of these species first with the addition of the second one 3 h later. The day after exposure, the characteristic red color of Se⁰ was observed in the three experiments, both at equivalent selenite and selenate concentrations (2 mM) and with a 10-fold excess in selenate (1 mM selenite and 10 mM selenate) regardless of the order of introduction. Thus, the possible inhibition of selenite reduction by selenate could be ruled out.

DISCUSSION

The fast selenite uptake following several hours of slow uptake cannot be ascribed to the high metabolism of the cells during the exponential phase since the same profiles were observed when this oxyanion was added during the lag phase, during the exponential phase, or at the beginning of the stationary phase.

This behavior might suggest the slow activation of some selenite transport system. To our knowledge, no specific selenite transporter has been characterized in microorganisms. In *Escherichia coli*, selenite can enter the cell

through the sulfate transporter, but the repression of this carrier does not inhibit selenite uptake completely (28). In *Rhodobacter sphaeroides*, a polyol transporter is suggested as the transporting agent of selenite into the cytoplasm (4).

Could the organoselenium species observed during the period of slow uptake be an intermediate product of the formation of elemental selenium? For *E. coli*, selenite reduction can follow a nonenzymatic pathway involving glutathione, and organoselenium intermediates include RSSeSR and glutathioselenol (28). The fact that RSSeSR was not detected as transient species does not necessarily imply that this nonenzymatic reduction pathway does not exist in *R. metallidurans* CH34 (the occurrence of glutathioselenol was not tested since this compound was absent from our model compounds library). The nonenzymatic reduction of selenite is accompanied by the production of O₂^{•−} (14) and generates an oxidative stress. In the case of *R. metallidurans* CH34, the overexpression of an enzyme associated with oxidative stress, an iron-containing superoxide dismutase, has been recently observed in the presence of selenite (23). This might support the hypothesis that nonenzymatic reduction takes place in these bacteria. Alternatively, the RSeR species observed after selenite introduction might result from an assimilatory pathway. Such a pathway is thought to exist in bacteria since Se is a component of some bacterial enzymes such as formate dehydrogenase (27). The most commonly (nonvolatile) alkyl selenide species found in microorganisms is selenomethionine (6). High-performance liquid chromatography analyses are under way to determine the exact nature of the RSeR species present in *R. metallidurans* CH34. To summarize, the presence of RSeR and Se⁰ species in equivalent amounts during the period of slow uptake suggests that selenite is accumulated through two competing pathways, an assimilatory pathway and a slow detoxification pathway, with both having similar kinetics.

During the period of fast selenite uptake, the reduction pathway becomes predominant. These contrasting behaviors between the period of slow and fast uptake mirror what has been previously observed for *R. sphaeroides* at low and high selenite exposure: this bacterium metabolized selenite into approximately 60% RSeR and 40% Se⁰ after exposure to 1.6 mg liter^{−1} of selenite and produced almost 100% Se⁰ after exposure to 160 mg liter^{−1} selenite (29). For some bacteria, selenite reduction is mediated by a single enzyme: a periplasmic nitrite reductase (16) in *Thauera selenatis* and a nitrite or a nitrate reductase (NR) in *Enterobacter cloacae* (9, 15). The proteome analysis of *R. sphaeroides* exposed to selenite did not reveal the overexpression of a single enzyme capable of reducing selenite but did confirm the presence of some chaperones, an elongation factor, and some enzymes associated with oxidative stress (4). Garbisu et al. (11) showed that selenite reduction by *Bacillus subtilis* was not affected by an excess of nitrate, nitrite, sulfate, or sulfite in the medium and suggested that selenite was reduced by an inducible detoxification system different from N- and S-related reductases. The kinetics of selenite accumulation and transformation by *R. metallidurans* CH34 suggest the induction of some selenite uptake and reduction

systems whose nature remains unknown. The putative induction of selenite transport and reduction, which takes several hours, can be qualified as slow compared to the induction of the *mer* operon by Hg^{2+} , which takes a few seconds (3).

The uptake of selenate by *R. metallidurans* CH34 was strongly limited, and the bacterial growth was not affected by this oxyanion. This behavior is consistent with the general idea that selenate is slowly transported inside the cells via the sulfate permease system (13). Selenite was detected during the first 12 h after selenate introduction. Several types of enzymes have been shown to reduce selenate to selenite. In *T. selenatis*, this is done by a specific selenate reductase (16, 26). In *E. coli*, reduction is catalyzed by a molybdenum enzyme distinct from a nitrate reductase (5). Evidence for the role of a molybdo-enzyme in selenate reduction was also shown for *Enterobacter cloacae* (31). In vitro studies showed that several NR, including some membrane-bound NR of *E. coli* (1) and some membrane-bound and periplasmic NR of *R. sphaeroides*, *Paracoccus denitrificans*, *Paracoccus pantotrophus*, and *Ralstonia eutropha* DSM 428 (25), were able to reduce selenate under anaerobic conditions. Selenate might also be reduced by the enzymes of the sulfate assimilation pathway. Such a process is known to occur in higher plants (22), but there is no direct evidence for the role of sulfate-reducing enzymes in bacterial selenate reduction. For the moment, we have no indication of the selenate-reducing agent in *R. metallidurans* CH34. The occurrence of selenite is followed by a mixture of Se^0 and RSeR and then by RSeR only. The absence of Se^0 at $t = 72$ h can be explained by the high RSeR content, which may mask Se^0 (see the error bar in Fig. 4).

In summary, our results show that selenate is partly reduced to Se^0 but that the main process is the transformation and accumulation of an RSeR-like organoselenium compound. A similar fate for selenate was observed in *R. sphaeroides* at both low and high selenate concentrations (29). de Souza et al. (8) found that selenate-treated *Halomonas* bacteria accumulate selenate and a minor selenomethionine-like species and suggested that selenate follows the sulfate assimilation pathway. These results raise the question of why selenite and selenate follow different pathways, provided that selenate is first reduced to selenite. This study shows that reduction and assimilation pathways are taken by both oxyanions and that the former pathway seems to be activated upon selenite exposure only. The possible inhibition of the reduction of selenite to Se^0 by selenate can be ruled out since the bacteria exposed to both oxyanions still produced the red color indicative of Se^0 . The nonactivation of the reduction pathway upon selenate exposure could be related to the much smaller uptake of selenate relative to selenite, supposing that this pathway is activated above a threshold concentration of selenite or any chemical agent derived from selenite. In this study, maximum measured selenite concentrations were comparable upon selenite and selenate exposure (around 3 mg Se per g of proteins) (Fig. 2 and 4), but these values are only snapshot images, rather than a direct monitoring of the selenite content.

In conclusion, this study showed that both selenite and selenate follow an assimilatory and a detoxification pathway in *R. metallidurans* CH34 and that transport and reduction are activated upon selenite exposure. The capacity of this bacterium to accumulate and reduce large amounts of selenite may

qualify this strain as suitable for the bioremediation of selenite-contaminated soils, sediments, and waters. However, the same is not true for selenate, since the organoselenium species produced may represent some mobile and bioavailable forms of selenium. This study illustrates the potential of XANES spectroscopy combined with elemental analyses, which enable the quantification of Se species. This spectroscopic approach is complementary to analytical speciation techniques such as liquid or ionic chromatography or electrospray mass spectrometry (6), which are better suited to identify individual molecules.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge J. L. Hazemann and O. Proux for their assistance during XANES measurements and the ESRF for the provision of beam time.

This research was supported by the CNRS and CEA through the Programme National Toxicologie Nucléaire Environnementale.

REFERENCES

- Avazéri, C., R. Turner, J. Pommier, J. Weiner, G. Giordano, and A. Verméglio. 1997. Tellurite reductase activity of nitrate reductase is responsible for the basal resistance of *Escherichia coli* to tellurite. *Microbiology* **143**: 1181–1189.
- Avoscan, L., M. Carrière, F. Jehanneuf, R. Collins, F. Carrot, J. Covès, and B. Gouget. 2004. *Ralstonia metallidurans* CH34 resistance to selenium oxyanions: growth kinetics, bioaccumulation and reduction, p. 267–271. In J. A. Centeno, P. Collery, and G. Vernet (ed.), *Metal ions in biology and medicine*, vol. 8. John Libbey Eurotext, Montrouge, France.
- Barkay, T., S. Miller, and A. Summers. 2003. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**:355–384.
- Bebien, M., J.-P. Chauvin, J.-M. Adriano, S. Grosse, and A. Verméglio. 2001. Effect of selenite on growth and protein synthesis in the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4440–4447.
- Bebien, M., J. Kirsch, V. Méjean, and A. Verméglio. 2002. Involvement of a putative molybdenum enzyme in the reduction of selenate by *Escherichia coli*. *Microbiology* **148**:3865–3872.
- Chasteen, T., and R. Bentley. 2003. Biomethylation of selenium and tellurium: microorganisms and plants. *Chem. Rev.* **103**:1–25.
- Combs, G. F., Jr., C. Garbisu, B. C. Yee, A. Yee, D. E. Carlson, N. R. Smith, A. C. Magyarosy, T. Leighton, and B. B. Buchanan. 1996. Bioavailability of selenium accumulated by selenite-reducing bacteria. *Biol. Trace Elem. Res.* **52**:209–225.
- de Souza, M. P., A. Amini, M. A. Dojka, I. J. Pickering, S. C. Dawson, N. R. Pace, and N. Terry. 2001. Identification and characterization of bacteria in a selenium-contaminated hypersaline evaporation pond. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:3785–3794.
- Dungan, R. S., and W. T. Frankenberger. 1998. Reduction of selenite to elemental selenium by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1. *J. Environ. Qual.* **27**: 1301–1306.
- Ganther, H. 1968. Selenotrisulfides. Formation by the reaction of thiols with selenious acid. *Biochemistry* **7**:2898–2905.
- Garbisu, C., S. Gonzalez, W. H. Yang, B. C. Yee, D. L. Carlson, A. Yee, N. R. Smith, R. Otero, B. B. Buchanan, and T. Leighton. 1995. Physiological mechanisms regulating the conversion of selenite to elemental selenium by *Bacillus subtilis*. *Biofactors* **5**:29–37.
- Haygarth, P. 1994. Global importance and global cycling of selenium, p. 1–27. In W. T. Frankenberger, Jr., and S. Benson (ed.), *Selenium in the environment*. Marcel Dekker, New York, N.Y.
- Heider, J., and A. Böck. 1993. Selenium metabolism in microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* **35**:71–109.
- Kramer, G., and B. Ames. 1988. Mechanisms of mutagenicity and toxicity of sodium selenite (Na_2SeO_3) in *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.* **201**: 169–180.
- Losi, M. E., and W. T. Frankenberger. 1998. Reduction of selenium oxyanions by *Enterobacter cloacae* strain SLD1a-1, p. 515–544. In W. T. Frankenberger and R. A. Engberg (ed.), *Environmental chemistry of selenium*, vol. 64. Marcel Dekker, New York, N.Y.
- Macy, J. M. 1994. Biochemistry of selenium metabolism by *Thauera selenatis* gen. nov. sp. nov. and use of the organism for bioremediation of selenium oxyanions in San Joaquin Valley drainage water, p. 421–444. In W. T. Frankenberger, Jr., and S. Benson (ed.), *Selenium in the environment*. Marcel Dekker, New York, N.Y.
- Manceau, A., M. A. Marcus, and N. Tamura. 2002. Quantitative speciation of heavy metals in soils and sediments by synchrotron X-ray techniques, p. 341–428. In P. Fenter, M. Rivers, N. Sturchio, and S. Sutton (ed.), *Applications of synchrotron radiation in low-temperature geochemistry and envi-*

- ronmental science, vol. 49. Reviews in mineralogy and geochemistry, Mineralogical Society of America, Washington, D.C.
18. Mergeay, M., S. Monchy, T. Vallaey, V. Auquier, A. Benotmane, P. Bertin, S. Taghavi, J. Dunn, D. van der Lelie, and R. Wattiez. 2003. *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. FEMS Microbiol. Rev. 27:385–410.
 19. Mergeay, M., D. Nies, H. G. Schlegel, J. Gerits, P. Charles, and F. Van Gijsegem. 1985. *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. J. Bacteriol. 162:328–334.
 20. Pickering, I., G. George, V. Van Fleet-Stalder, T. Chasteen, and R. Prince. 1999. X-ray absorption spectroscopy of selenium-containing amino acids. J. Biol. Inorg. Chem. 4:791–794.
 21. Pickering, I. J., G. E. Brown, and T. K. Tokunaga. 1995. Quantitative speciation of selenium in soils using X-ray absorption spectroscopy. Environ. Sci. Technol. 29:2456–2459.
 22. Pilon-Smits, E. A. H., S. B. Hwang, C. M. Lytle, Y. L. Zhu, J. C. Tai, R. C. Bravo, Y. C. Chen, T. Leustek, and N. Terry. 1999. Overexpression of ATP sulfurylase in Indian mustard leads to increased selenate uptake, reduction, and tolerance. Plant Physiol. 119:123–132.
 23. Roux, M., and J. Covès. 2002. The iron-containing superoxide dismutase of *Ralstonia metallidurans* CH34. FEMS Microbiol. Lett. 210:129–133.
 24. Roux, M., G. Sarret, I. Pignot-Paintrand, M. Fontecave, and J. Covès. 2001. Mobilization of selenite by *Ralstonia metallidurans* CH34. Appl. Environ. Microbiol. 67:769–773.
 25. Sabaty, M., C. Avazeri, D. Pignol, and A. Vermeglio. 2001. Characterization of the reduction of selenate and tellurite by nitrate reductases. Appl. Environ. Microbiol. 67:5122–5126.
 26. Schröder, I., S. Rech, T. Krafft, and J. M. Macy. 1997. Purification and characterization of the selenate reductase from *Thauera selenatis*. J. Biol. Chem. 272:23765–23768.
 27. Stadtman, T. 1996. Selenocysteine. Annu. Rev. Biochem. 65:83–100.
 28. Turner, R. J., J. H. Weiner, and D. E. Taylor. 1998. Selenium metabolism in *Escherichia coli*. Biometals 11:223–227.
 29. Van Fleet-Stalder, V., T. G. Chasteen, I. J. Pickering, G. N. George, and R. C. Prince. 2000. Fate of selenate and selenite metabolized by *Rhodobacter sphaeroides*. Appl. Environ. Microbiol. 66:4849–4853.
 30. Wasserman, S. R., P. G. Allen, D. K. Shuh, J. J. Bucher, and N. M. Edelstein. 1999. EXAFS and principal component analysis: a new shell game. J. Synchrotron Rad. 6:284–286.
 31. Watts, C., H. Ridley, K. Condie, J. Leaver, D. Richardson, and C. Butler. 2003. 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 Microbiol. Lett. 228:273–279.

Seleno-L-Methionine Is the Predominant Organic Form of Selenium in *Cupriavidus metallidurans* CH34 Exposed to Selenite or Selenate† Laure

Avoscan,¹ Richard Collins,^{1‡} Marie Carriere,¹ Barbara Gouget,^{1*} and Jacques Covès^{2*} *Laboratoire Pierre Süe, CEA/CNRS UMR 9956, 91191 Gif sur Yvette,¹ and Laboratoire des Protéines Membranaires, Institut de Biologie Structurale—Jean-Pierre Ebel, UMR 5075 CNRS-CEA-UJF, 41, rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex,² France*

Received 5 May 2006/Accepted 21 June 2006

The accumulated organic form of selenium previously detected by X-ray absorption near-edge structure (XANES) analyses in *Cupriavidus metallidurans* CH34 exposed to selenite or selenate was identified as seleno-L-methionine by coupling high-performance liquid chromatography to inductively coupled plasma-mass spectrometry.

Accumulation of selenium from natural or anthropogenic sources generates toxic environmental conditions (1, 9, 17). Microorganisms can be involved in the geochemical cycle of selenium and thus can potentially be used for bioremediation processes (4–7, 13, 16). This is the case for *Cupriavidus metallidurans* CH34 (formerly *Ralstonia metallidurans* CH34), which has been demonstrated to resist high concentrations of selenite and to reduce it to elemental selenium immobilized by the biomass as electron-dense granules (14). *C. metallidurans* CH34 is a facultatively autotrophic gram-negative bacterium characteristic of metal-contaminated biotopes (10, 11) that has already been used to remove heavy metals from soil or liquid waste (2, 3, 10). Its use to target selenium-polluted environments still requires a better understanding of the molecular events leading to the incorporation of the selenium oxyanions, selenite [Se(IV)] and selenate [Se(VI)], and their subsequent reduction. In recent studies, we have identified a gene encoding a putative selenite transporter (8) and compared the kinetics of selenite and selenate accumulation to identify by X-ray absorption near-edge structure (XANES) spectroscopy the possible chemical intermediates during the transformation of these oxyanions (15). We observed that one, or numerous, organic species of Se (alkyl selenide) were produced by this bacterium regardless of the initial oxidation state of Se [Se(IV) or Se(VI)]. In cases of selenite exposure, this organic species is both transient and minor compared to the dominating chemical species, Se⁰, while in cases of selenate exposure, Se⁰ occurred as a minor species and the major accumulated form was alkyl selenide. However, it was impossible to unequivocally

identify this organic selenium species by XANES spectroscopy, and recourse to other analytical techniques is required. Here we have developed the direct coupling of high-performance liquid chromatography (HPLC) to inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) to identify the compound of interest after extraction of the endogenous Se species.

Cells were grown aerobically at 29°C in Tris salt mineral medium with 2% gluconate as a carbon source as previously described (15). The experiments were initiated by adding Se(IV) or Se(VI) to the culture medium when the absorbance at 600 nm reached 0.3. The final Se oxyanion concentration was 2 mM. The culture medium was sampled every 24 h over a 144-h period, and total accumulated selenium was quantified for each sample as previously reported (15). As expected, Se(IV) induced an extended lag phase (14), while Se(VI) did not cause any change in growth (Fig. 1) compared to the growth of a culture without any added selenium oxyanion (not shown). The concentrations of Se accumulated by the two cultures were similar after 24 h, but the accumulation patterns diverged rapidly thereafter. At the end of the experiment (144 h), the bacteria exposed to Se(IV) had accumulated Se to a concentration of 290 mg g of protein^{−1}, compared to 13 mg Se g of protein^{−1} for Se(VI) exposure (Fig. 1).

Bacterial pellets from 5-ml culture medium samples were obtained by centrifugation, washed three times with high-purity water, and finally resuspended in 1 ml of a solution containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.2) and 2 mM CaCl₂. Then cells were lysed and the proteins digested by addition of 50 µl of a solution containing 72 g liter^{−1} of both lysozyme and protease XIV (12). The samples were incubated at 37°C for 24 h until complete digestion of proteins to their mono-amino acids. The supernatant of a new centrifugation was removed and identified to species level by HPLC-ICP-MS analyses after dilution by a fivefold factor with high-purity water. This dilution step is required to prevent HPLC-ICP-MS peak retention time shifts induced by high ionic strength. As a control, the entire procedure was applied to seleno-L-methionine, seleno-DL-cystine, seleno-methylseleno-L-cysteine, Se(IV), Se(VI), and Se⁰. It was observed, by use of HPLC-ICP-MS, that the extraction procedure neither transformed these Se species nor solubilized Se⁰ into Se(IV) or Se(VI). Besides, these controls did not

* Corresponding author. Mailing address for J. Covès: Laboratoire des Protéines Membranaires, Institut de Biologie Structurale—Jean-Pierre Ebel, UMR 5075 CNRS-CEA-UJF, 41, rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex, France. Phone: 33 (0) 4-38-78-24-03. Fax: 33 (0) 4-38-78-54-94. E-mail: jacques.coves@ibs.fr. Mailing address for B. Gouget: Laboratoire Pierre Süe, CEA/CNRS UMR 9956, 91191 Gif sur Yvette, France. Phone: 33 (0) 1-69-08-33-13. Fax: 33 (0) 1-69-08-69-23. E-mail: barbara.gouget@cea.fr.

† Supplemental material for this article may be found at <http://aem.asm.org/>.

‡ Present address: Centre for Water and Waste Technology, School of Civil and Environmental Engineering, The University of New South Wales, Sydney 2052, Australia.

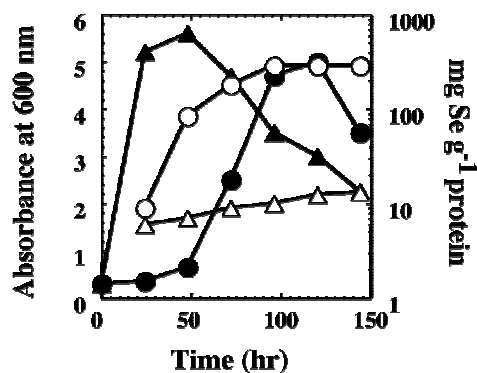


FIG. 1. Mean bacterial Se accumulation and culture medium absorbance at 600 nm during the exposure of *C. metallidurans* CH34 to Se(IV) or Se(VI) (initial concentration, 2 mM). ●, absorbance at 600 nm [Se(IV)-exposed cultures]; ▲, absorbance at 600 nm [Se(VI)-exposed cultures]; ○, Se accumulation [Se(IV)-exposed cultures]; △, Se accumulation [Se(VI)-exposed cultures]. Note that the scale of the right y axis is logarithmic. Bacterial growth was also assayed by quantification of the protein contents and confirmed the A_{600} data. As previously observed (14), the presence of particulate Se^0 did not disturb the measurement of the absorbance.

reveal any relevant contamination of selenite by selenate, or vice versa.

The percentage of Se recovered was variable, depending on whether the bacteria had been exposed to Se(IV) or Se(VI) (Table 1). Between 24 and 144 h of exposure to Se(IV), very little of the Se associated with the bacteria was extracted by using the enzymatic digestion protocol (<5% in terms of the total concentration of accumulated Se). This was expected, because insoluble Se^0 becomes the predominant biotransformation product (>95%) at later sampling times (14, 15). The extraction procedure was very effective for the Se(VI)-exposed bacteria, with an average Se recovery, at all sampling times, of

82% (Table 1). Therefore, the majority of Se accumulated by *C. metallidurans* CH34, during exposure to 2 mM concentrations of Se(VI), is found in soluble and/or proteinogenic forms, a finding that is also consistent with our previous XANES spectroscopy results (15).

Separation of the extracted Se species was achieved with a 4-mm AS11 anion-exchange column (Dionex, Sunnyvale, CA) using a flow rate of 2 ml min^{-1} and the following NaOH

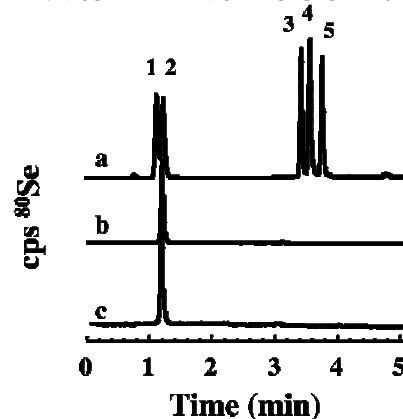


FIG. 2. Stacked HPLC-ICP-MS chromatograms of various solutions. Line a, standard solution containing 50 μg of each of the following Se species liter^{-1} : seleno-methylseleno-L-cysteine (peak 1), seleno-L-methionine (peak 2), Se(IV) (peak 3), seleno-DL-cystine (peak 4), and Se(VI) (peak 5). When the entire procedure, i.e., extraction plus identification to species level and quantification by HPLC-ICP-MS, was applied to these Se-containing chemical forms, no other species besides the initial chemical standards was detected, and their concentrations remained identical before and after extraction. Lines b and c, enzymatic extraction solution of *C. metallidurans* CH34 exposed for 24 h to 2 mM Se(IV) and 2 mM Se(VI), respectively. Peaks are relative to counts per second for the $^{80}\text{Se}^+$ isotope ion.

gradient elution: 0.8 mM NaOH (0 to 1 min), 0.8 to 40 mM NaOH (1 to 4 min), and 0.8 mM NaOH (4 to 7 min). An injection volume of 25 μl was used for all samples and standards. The column was coupled directly to the nebulizer of the ICP-MS, via PEEK tubing, and chromatograms of counts per second against time were recorded for each isotope ion of Se. Detailed ICP-MS conditions for total Se quantification and seleno-L-methionine identification are described in the supplemental material. A typical HPLC-ICP-MS chromatogram showing the separation of five reference compounds is shown in Fig. 2a. Upon HPLC-ICP-MS analysis of the enzymatic extraction solutions of the Se(IV)-exposed bacteria, only one peak was observed, with a retention time corresponding to that of seleno-L-methionine (Fig. 2b). As a control, the seleno-L-methionine standard was added to the sample solution and found to elute at the same time as the bacterially derived seleno-L-methionine. Similarly, seleno-L-methionine was the sole organic species of Se in the enzymatic extraction solutions of the Se(VI)-exposed bacteria (Fig. 2c), regardless of the time of sampling. It must be noted that any seleno-L-cystine that could be produced by oxidation of seleno-L-cysteine putatively present in the samples was not detected in any of the extraction solutions.

These results indicate that seleno-L-methionine is the accumulated proteinogenic (and organic) form of Se in this bacterium, whether it is exposed to 2 mM concentrations of Se(IV) or Se(VI). We have previously shown that transport and reduction of selenite are slowly activated upon selenite exposure (8, 15), while this is not the case for selenate exposure (15). From our previously published data (15), one can calculate that the now identified seleno-L-methionine represented about 25 mg g of protein $^{-1}$ after 50 h in the presence of Se(IV) (about 10% of the added selenium), while it represented only

TABLE 1. Percentage of recovery of total accumulated Se by *C. metallidurans* CH34 after enzymatic digestion of bacterial pellets

Time (h)	% extracted from cultures exposed to ^a :	
	Se(IV)	Se(VI)
24	23 $\pm$ 4	82 $\pm$ 7
48	4.5 $\pm$ 0.7	82 $\pm$ 3
72	3 $\pm$ 0.2	78 $\pm$ 4
96	2 $\pm$ 0.1	83 $\pm$ 2
120	1.8 $\pm$ 0.1	82 $\pm$ 3
144	1.5 $\pm$ 0.2	83 $\pm$ 6

^a Values for bacterial samples exposed to Se(IV) represent those obtained after extracting the pellets twice. Results are represented as a function of sampling time after the addition of 2 mM Se(IV) or Se(VI) to the

11 mg g of protein⁻¹ in the presence of Se(VI) (95% of the added selenium). One can speculate that a threshold in the seleno-L-methionine concentration could be the signal to set up a resistance pathway. This threshold should be reached after about 50 h in the presence of 2 mM selenite, triggering the phase of fast Se(IV) uptake.

This work was supported in part by the French National Program of Environmental Nuclear Toxicology (ToxNucE).

REFERENCES

1. Conde, J. E., and M. Sanz Alaejos. 1997. Selenium concentrations in natural and environmental waters. *Chem. Rev.* **97**:1979–2004.
2. Diels, L., M. De Smet, L. Hooyberghs, and P. Corbisier. 1999. Heavy metals bioremediation of soil. *Mol. Biotechnol.* **12**:149–158.
3. Diels, L., S. van Roy, K. Somers, I. Willems, W. Doyen, M. Mergeay, D. Springael, and R. Leysen. 1995. The use of bacteria immobilized in tubular membrane reactors for heavy metal recovery and degradation of chlorinated aromatics. *J. Membr. Sci.* **100**:249–258.
4. Dungan, R. S., S. R. Yates, and W. T. Frankenberger. 2003. Transformations of selenate and selenite by *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from a seleniferous agricultural drainage pond sediment. *Environ. Microbiol.* **5**:287–295.
5. Frankenberger, W. T., Jr., and M. Arshad. 2001. Bioremediation of selenium-contaminated sediments and water. *Biofactors* **14**:241–254.
6. Haygarth, P. 1994. Global importance and global cycling of selenium, p. 1–27. In W. T. Frankenberger, Jr., and S. Benson (ed.), *Selenium in the environment*. Marcel Dekker, New York, N.Y.
7. Lawson, S., and J. M. Macy. 1995. Bioremediation of selenite in oil refinery wastewater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**:762–765.
8. Ledgham, F., B. Quest, T. Vallaes, M. Mergeay, and J. Covès. 2005. A probable link between the DedA protein and resistance to selenite. *Res. Microbiol.* **156**:367–374.
9. Macy, J. M. 1994. Biochemistry of selenium metabolism by *Thauera selenatis* gen. nov. sp. nov. and use of the organism for bioremediation of selenium oxyanions in San Joaquin Valley drainage water, p. 421–444. In W. T. Frankenberger, Jr., and S. Benson (ed.), *Selenium in the environment*. Marcel Dekker, New York, N.Y.
10. Mergeay, M. 2000. Bacteria adapted to industrial biotopes: metal-resistant *Ralstonia*, p. 403–414. In G. Storz and R. Hengge-Aronis (ed.), *Bacterial stress responses*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
11. Mergeay, M., S. Monchy, T. Vallaes, V. Auquier, A. Benotmane, P. Bertin, S. Taghavi, J. Dunn, D. van der Lelie, and R. Wattiez. 2003. *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**:385–410.
12. Michalke, B., H. Witte, and P. Schramel. 2002. Effect of different extraction procedures on the yield and pattern of Se-species in bacterial samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **372**:444–447.
13. Oremland, R. S., N. A. Steinberg, T. S. Presser, and L. G. Miller. 1991. In situ bacterial selenate reduction in the agricultural drainage systems of western Nevada. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:615–617.
14. Roux, M., G. Sarret, I. Pignot-Paintrand, M. Fontecave, and J. Covès. 2001. Mobilization of selenite by *Ralstonia metallidurans* CH34. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:769–773.
15. Sarret, G., L. Avoscan, M. Carrière, R. Collins, N. Geoffroy, F. Carrot, J. Covès, and B. Gouget. 2005. Chemical forms of selenium in the metal-resistant bacterium *Ralstonia metallidurans* CH34 exposed to selenite and selenate. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:2331–2337.
16. Taratus, E. M., S. G. Eubanks, and T. J. DiChristina. 2000. Design and application of a rapid screening technique for isolation of selenite reduction-deficient mutants of *Shewanella putrefaciens*. *Microbiol. Res.* **155**:79–85.
17. Zawislanski, P. T., S. M. Benson, R. Terberg, and S. E. Borglin. 2003. Selenium speciation, solubility, and mobility in land-disposed dredged sediments. *Environ. Sci. Technol.* **37**:2415–2420.

Conclusion générale **et perspectives**

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Synthèse des principaux résultats

Les travaux menés au cours de cette thèse avaient pour objectif de préciser les mécanismes de résistance, d'accumulation et de transformation des oxyanions de sélénium chez la bactérie *C. metallidurans* CH34. L'originalité de notre démarche est la combinaison de plusieurs techniques de spéciation qui a permis de contribuer à l'amélioration des connaissances de ces mécanismes.

Dans une première partie, nous avons caractérisé la résistance de *C. metallidurans* CH34 dans nos conditions de travail. Nous avons établi les capacités de résistance de *C. metallidurans* CH34 en termes d'accumulation du sélénium, laquelle a été quantifiée pour la première fois directement dans les bactéries. Puis, nous avons précisé les voies possibles de prise en charge des oxyanions de sélénium. Dans une dernière partie, nous avons pu identifier les intermédiaires chimiques de la transformation par réduction du sélénium une fois accumulé par les bactéries *C. metallidurans* CH34. L'ensemble des résultats est récapitulé ici :

1- Résistance de *C. metallidurans* CH34 au sélénite et au séléniat et accumulation

Nous avons montré que la bactérie est moins résistante au sélénite qu'au séléniat (la CMI pour le sélénite est de 4 mM, celle pour le séléniat est de 8 mM ; de plus, la densité cellulaire maximale diminue en présence de sélénite). Cette différence de résistance s'explique, pour partie, par une accumulation quasi-totale du sélénium dans les bactéries après une exposition au sélénite. L'accumulation du séléniat est faible : la croissance bactérienne est peu affectée par la présence de séléniat.

2- Transport des oxyanions de sélénium

Nos recherches ont permis de montrer que l'accumulation du sélénite, reflet de son transport, se fait en deux temps : une phase d'accumulation lente et faible est suivie d'une phase rapide et importante. Des expériences réalisées avec des mutants, clones de la souche sauvage par inactivation d'un gène possédant une forte homologie avec ceux de la famille *dedA*, ont montré qu'ils n'accumulaient plus autant le sélénite comparé à la souche sauvage, laquelle exprime la protéine membranaire DedA. Les fonctions de cette protéine sont totalement inconnues. Cependant ces résultats suggèrent que la potentielle protéine DedA serait impliquée dans

l'import du sélénite, un système efficace mais lent à se mettre en place. Ce système de transport probable semble être constitutif puisque la diminution de la synthèse de néo-protéines ne modifie pas l'accumulation du sélénium.

Par ailleurs, nos résultats supportent l'hypothèse que le séléniate accumulé dans les bactéries emprunterait la voie d'entrée du sulfate, la sulfate perméase. La faible affinité de ce transporteur pour le séléniate, comme rapportée chez *E. coli* (Lindblow-Kull *et al.*, 1985), pourrait expliquer la faible accumulation de cet oxyanion.

3- Voies de réduction du sélénium

Nous avons apporté des éléments permettant une meilleure compréhension des mécanismes de résistance aux oxydes de sélénium chez *C. metallidurans* CH34. Trois niveaux de spéciation différents ont été recherchés :

- dans la bactérie entière, la spectroscopie XANES a permis d'identifier les intermédiaires et produits de réduction de degrés d'oxydation différents, formés après une exposition aux deux oxyanions : séléniate (après exposition au séléniate), sélénite et une forme organique de type alkyle séléniures (après exposition au séléniate et au sélénite) ont été identifiés ; lors de conditions de stress intenses, comme c'est le cas avec des cultures exposées au séléniate dans un milieu appauvri en sulfate, le sélénodiglutathion et le sélénium élémentaire, espèces de même état d'oxydation, ont été identifiés et différenciés grâce à l'analyse EXAFS ;
- dans les extraits solubles issus de la lyse enzymatique des bactéries, les espèces séléniées organiques de même état d'oxydation ont été précisées : un seul alkyle séléniure a été identifié grâce au couplage HPLC-ICP-MS : il s'agit de l'acide aminé sélénométhionine ; la forme Se méthyle L-sélénocystéine n'a pas été détectée ;
- dans les protéines bactériennes, l'analyse par SDS-PAGE-PIXE a permis de montrer que des protéines présentes dans des zones de faibles poids moléculaires (exposition sélénite et séléniate) et de hauts poids moléculaires (exposition sélénite) ont incorporé le sélénium. L'acide aminé sélénométhionine est probablement assimilé non spécifiquement au cours du métabolisme bactérien.

Ces résultats ont mis en évidence deux voies de réduction compétitives du sélénium chez *C. metallidurans* CH34 :

- une voie d'assimilation transforme le séléniate en sélénite et le sélénite en l'acide aminé sélénié, la sélénométhionine (degré d'oxydation (IV)) et conduit à son incorporation non spécifique dans les protéines bactériennes. Les protéines ayant incorporé du sélénium sont probablement des protéines riches en résidus méthionines,

- une voie de détoxification immobilise le sélénite en nanoparticules de sélénium inorganique, le sélénium élémentaire (degré d'oxydation (0)), principalement localisées dans le cytoplasme à proximité des membranes. Cette localisation peut résulter soit de la voie impliquant le glutathion, soit d'une voie enzymatique, laquelle, toutefois, est rapportée principalement en conditions anaérobies. La caractérisation des particules de sélénium élémentaire chez *C. metallidurans* CH34 a permis de mettre en évidence des similitudes morphologiques avec les particules de sélénium élémentaire abiotiques synthétisées par mélange de glutathion et de sélénite. Même si nous ne pouvons pas préciser davantage le mécanisme de détoxification du sélénite chez *C. metallidurans* CH34, l'implication du glutathion dans la voie de détoxification est la plus souvent rapportée dans la littérature,

- la non détection de formes méthylées comme la Se méthyle L-sélenocystéine suppose que la voie de méthylation est négligeable chez *C. metallidurans* CH34.

Nous avons réalisé pour la première fois un travail de spéciation sur des mutants optimisés pour leur capacité de résistance aux métaux/métalloïdes. Nous avons montré que la transformation du sélénite et du séléniate est inchangée chez les mutants résistants au sélénite par rapport à la souche sauvage : la mutation du gène *dedA* altère uniquement l'accumulation du sélénite. Le mécanisme de réduction du sélénite est indépendant du système de transport de l'oxyanion.

Au plan international, de telles approches de spéciation *in situ* (XANES, ICP-MS du surnageant de culture) ont été développées sur des systèmes analogues comme la bactérie photosynthétique *Rhodobacter sphaeroides* (Van Fleet-Stalder *et al.*, 2000), des bactéries pathogènes et contaminatrices des aliments dont *Salmonella enteritidis*, *Proteus mirabilis* et *Pseudomonas fluorescens* (Prange *et al.*, 2005), mais ces études n'ont pas recherché l'éventuelle incorporation de sélénium dans les acides aminés ou les protéines.

Etant donnés les niveaux de concentrations présents dans les environnements pollués (du nM au mM selon la localisation) (Wu, 2004), l'ensemble de ces résultats démontre que *C. metallidurans* CH34 est un bon candidat pour dépolluer les sols, les sédiments et les eaux contaminés avec le sélénite : la bactérie est capable de résister à ces fortes concentrations, d'accumuler une forte proportion du sélénite contaminant et de l'immobiliser sous une forme nanoparticulaire moins toxique.

PERSPECTIVES DE RECHERCHES

Plusieurs voies de recherches peuvent permettre de compléter ces travaux.

Concernant l'implication de la voie du glutathion dans la réduction du sélénite

Nous n'avons pas montré l'implication directe du glutathion dans la réduction du sélénite par son dosage intracellulaire. Le dosage de cette espèce (glutathion réduit et glutathion oxydé) ainsi que l'activité de la glutathion réductase lors de l'exposition au sélénite et au séléniate pourra apporter des éléments supplémentaires dans la compréhension du mécanisme mis en jeu.

Concernant le stress oxydant

Nous avons montré que les bactéries cultivées en milieu limité en sulfate présentent les caractéristiques physiologiques d'un stress par la présence de nombreux granules de polyhydroxybutyrates. Le type de stress en absence et en présence de séléniate dans ces conditions de culture pourra être recherché et comparé au stress induit suite à une exposition au sélénite.

Concernant la voie d'assimilation

De façon intéressante, nous avons montré une répartition différente de l'incorporation du sélénium dans les protéines bactériennes après exposition au sélénite et au séléniate et dans les fractions solubles et membranaires. Des investigations par ablation laser couplée à une détection ICP-MS sont en cours en collaboration avec R. Lobinski et G. Ballihaut du Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement (LCABIE) de l'université de Pau. Les résultats obtenus par cette technique très sensible viendront compléter les résultats obtenus par SDS-PAGE-PIXE (le PIXE permet de doser des ppm alors que l'ICP-MS a un seuil de détection de l'ordre du ppb).

Pour affiner ces résultats, les protéines contenant du sélénium en plus grande quantité pourront être isolées à partir des gels d'électrophorèse, puis séparées en gel 2D. Le séquençage pourrait permettre la découverte d'une nouvelle sélénoprotéine. La recherche des séquences SECIS par traitement informatique dans les génomes bactériens a permis d'identifier de nouvelles sélénoprotéines (Zhang et Gladyshev, 2005). Nous pouvons analyser le génome de *C. metallidurans* CH34 pour rechercher des gènes codant des sélénoprotéines.

Enfin, ces expériences ont été réalisées avec des bactéries exposées à une concentration de sélénium de 2 mM. Cette concentration semble conduire à une incorporation non spécifique

du sélénium dans les protéines. Il serait intéressant de reproduire ces expériences à des concentrations plus faibles (du μM au nM) afin de rechercher une éventuelle variation de la distribution des protéines sélénées.

Concernant l'activation de la voie de détoxification

Nous n'avons pas observé de coloration rouge lorsque la culture est exposée à $20\ \mu\text{M}$ de sélénite. Dans cette expérience, nous n'avons pas quantifié l'accumulation du sélénium car l'objectif était d'observer l'apparition de la coloration rouge de la culture. La concentration minimale de sélénium accumulée pour activer la voie de détoxification pourra être déterminée plus finement à cette concentration d'exposition.

Notre étude a été réalisée en condition aérobie. Le comportement de résistance au sélénite et au séléniate pourrait être recherché lorsque la souche est cultivée en condition anaérobie. Au laboratoire, les cultures en anaérobies sont en cours de développement dans le cadre d'un autre travail de recherche sur l'étude de la résistance et de la transformation de l'uranium.

Concernant la spéciation de l'espèce sélénée

Nous n'avons pas testé la résistance de la souche à d'autres formes sélénées comme les nanoparticules de sélénium élémentaire et les espèces organiques (par exemple, l'acide aminé sélénométhionine). Dans notre laboratoire, une étude avec *C. metallidurans* CH34 et des nanoparticules métalliques montre que la bactérie est capable d'accumuler des nanoparticules de titane (diamètre de $25\ \text{nm}$) dans sa paroi. Il serait intéressant d'étudier la résistance, l'accumulation et la consommation de sélénométhionine et de nanoparticules de sélénium élémentaire chez *C. metallidurans* CH34. Les particules de sélénium élémentaire formées dans les systèmes aquatiques peuvent sédimenter et notamment s'accumuler chez les organismes aquatiques comme des espèces de bivalves (Schlekat *et al.*, 2000). Quant aux espèces organiques issues de la réduction biologique, elles peuvent poser des problèmes de contamination puisqu'elles sont assimilables, notamment la sélénométhionine.

Concernant la production de nanoparticules

Chez d'autres souches, les nanoparticules de sélénium biologiques produites présentent des caractéristiques électro-optiques particulières pouvant être exploitées dans le domaine des nanotechnologies (Oremland *et al.*, 2004). Nous pouvons envisager une exploitation industrielle des nanoparticules de sélénium produites par *C. metallidurans* CH34.

Références bibliographiques

- Aberdam, D.** (1998) SEDEM, a Software Package for EXAFS Data Extraction and Modelling. *J. Synchrotron Rad.* 5, 1287-1297.
- AFSSA** (2005) Evaluation de l'utilisation des sables recouverts d'oxydes métalliques des eaux destinées à la consommation humaine et des eaux minérales naturelles. Les matériaux de filtration recouverts d'oxydes métalliques. Saisines n° 2004-SA-0236 et 2005-SA-0005.
- Allmang, C. and Krol, A.** (2006) Selenoprotein synthesis: UGA does not end the story. *Biochimie.* 88, 1561-1571.
- ANC** (2001) Apports nutritionnels conseillés pour la population française 3ème édition - Ambroise Martin, Technique et Documentation Edition, 605 p.
- Andreesen, J.R. and Ljungdahl, L.G.** (1973) Formate dehydrogenase of *Clostridium thermoaceticum*, incorporation of selenium-75, and the effects of selenite, molybdate, and tungstate on the enzyme. *J. Bacteriol.* 116, 867-873.
- Andreesen, J.R., Wagner, M., Sonntag, D., Kohlstock, M., Harms, C., Gursinsky, T., Jager, J., Parther, T., Kabisch, U., Grantzdorffer, A., Pich, A. and Sohling, B.** (1999) Various functions of selenols and thiols in anaerobic gram-positive, amino acids-utilizing bacteria. *Biofactors.* 10, 263-270.
- Avazéri, C., Turner, R. J., Pommier, J., Weiner, J. H., Giordano, G. and Verméglio, A.** (1997) Tellurite reductase activity of nitrate reductase is responsible for the basal resistance of *Escherichia coli* to tellurite. *Microbiol.* 143, 1181-1189.
- Barceloux, D.** (1999). Selenium. *Clinical Toxicology.* 37(2), 145-172.
- Barkay, T., Miller, S.M. and Summers A.O.** (2003) Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 27(2-3), 355-384.
- Bébian, M., Chauvin, J.-P., Adriano, J.-M., Grosse, S. and Verméglio, A.** (2001) Effect of selenite on growth and protein synthesis in the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4440-4447.
- Bébian, M., Lagniel, G., Garin, J., Touati, D., Verméglio, A. and Labarre, J.** (2002). Involvement of superoxide dismutases in the response of *Escherichia coli* to selenium oxides. *J. Bacteriol.* 184, 1556-1564.
- Berger, P. and Revel, G.** (2005) Microsonde nucléaire. Principe et appareillage. *In: Techniques de l'ingénieur* (Ed.), Sciences et techniques.
- Bernard, A.R., Wells, T.N., Cleasby, A., Borlat, F., Payton, M.A. and Proudfoot, A.E.** (1995) Selenomethionine labelling of phosphomannose isomerase changes its kinetic properties. *Eur. J. Biochem.* 230, 111-118.
- Bernier-Pierru, B.** (2006). Etude de la réduction du sélénite chez *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans*. Sciences de la vie et de la santé. Aix-Marseille II, Université de la méditerranée: 190 p.

- Berrow M.L. and Ure, A.M.** (1989) Geological materials and soils, Chapter 9 *In*: Occurrence and Distribution of Selenium. M. Inhat. (Ed.), CRC Press, Boca Raton.
- Biebl, H. and Pfennig, N.** (1981) Isolation of members of the family *Rhodospirillaceae*, p.267-273. *In* M. P. Starr, J. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows and H. G. Schlegel (ed.), The prokaryotes, a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria, vol. A. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Birringer M., Pilawa, S. and Flohé L.** (2002) Trends in selenium biochemistry. Nat. Prod. Rep. 19, 693-718.
- Biswas, S., Talukder, G. and Sharma, A.** (1997) Selenium salts and chromosome damage. Mutat Res. 390(3), 201-205.
- Björnstedt, M., Kumar, S. and Holmgren A.** (1992) Selenodiglutathione is a highly efficient oxidant of reduced thioredoxin and a substrate for mammalian thioredoxin reductase. Journal of biological chemistry. 267(12), 8030-8034.
- Blum, J.S., Bindi, A.B., Buzzelli, J., Stolz, J.F. and Oremland, R.S.** (1998) *Bacillus arsenicoselenatis*, sp. nov., and *Bacillus selenitireducens*, sp. nov.: two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic. Arch. Microbiol. 171, 19-30.
- Böck, A., Forchhammer, K., Heider, J. and Baron, C.** (1991) Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code. Trends Biochem Sci, 16, 463-467.
- Boles, J.O., Cisneros, R.J., Weir, M.S., Odom, J.D., Villafranca, J.E. and Dunlap, R.B.** (1991) Purification and characterization of selenomethionyl thymidylate synthase from *Escherichia coli*; comparison with the wild-type enzyme. Biochemistry. 30, 11073-11080.
- Boyington, J.C., Gladyshev, V.N., Khangulov, S.V., Stadtman, T.C. et Sun, P.D.** (1997) Crystal structure of formate dehydrogenase H: catalysis involving Mo, molybdopterin, selenocysteine, and an Fe₄S₄ cluster. Science, 275, 1305-1308.
- Breton, A. and Surdin-Kerjan Y.** (1977) Sulfate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: Biochemical and Genetic Study. J. Bacteriol. 132(1), 224-232.
- Brown, D.G., Burk, R.F., Seely, R.J., and Kiker, K.W.** (1972) Effect of dietary selenium on the gastrointestinal absorption of ⁷⁵SeO₃²⁻ in the rat. Int. J. Vitam. Nutr. Res. 42, 588-591.
- Brown, T.A. and Shrift, A.** (1980) Assimilation of selenate and selenite by *Salmonella typhimurium*. Can. J. Microbiol. 26, 671-675.
- Brown, T.A. and Shrift, A.** (1982) Selective assimilation of selenite by *Escherichia coli*. Canadian Journal of Microbiology. 28(3), 307-310.

- Cahill, T.A. and Eldred, R.A.** (1998) Particulate selenium in the atmosphere. *In*: Frankenberger Jr., W.T., Engberg, R.A. (Eds.). *Environmental Chemistry of Selenium*. Marcel Dekker, New York, pp. 613-632.
- Cantafio, A.W., Hagen, K.D., Lewis, G.E., Bledsoe, T.L., Nunan, K.M. and Macy, J.M.** (1996) Pilot-scale selenium bioremediation of San Joaquin drainage water with *Thauera selenatis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3289-3303.
- Chambers, I., Frampton, J., Goldfarb, P., Affara, N., McBain, W. and Harrison, P.R.** (1986) The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the “termination” codon, TGA. *Embo. J.* 5, 1221-1227.
- Chasteen, T.G. and Bentley R.** (2003). Biomethylation of Selenium and Tellurium: Microorganisms and Plants. *Chemical reviews.* 103(1), 1-26.
- Chen, Y.W., Belzile, N. and Gunn J.M.** (2001) Antagonistic effect of selenium on mercury assimilation by fish populations near Sudbury metal smelters. *Limnol. Oceanogr.* 46, 1814-1818.
- Cheng, Y.Y. and Qian, P.C.** (1990) The effect of selenium-fortified table salt in the prevention of Keshan disease on a population of 1.05 million. *Biomed. Environ. Sci.* 3, 422-428.
- Chow, C.M. and RajBhandary, U.L.** (1993) Developmental regulation of the gene for formate dehydrogenase in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 175, 3703-3709
- Clark, L.C., Cantor, K.P. and Allaway, W.H.** (1991) Selenium in forage crops and cancer mortality in U.S. counties. *Arch. Environ. Health.* 46, 37-42.
- Conde, J. E. and Sanz Alaejos, M.** (1997) Selenium concentrations in natural and environmental waters. *Chem. Rev.* 97, 1979-2004.
- Cone, J.E., Del Rio, R.M., Davis, J.N. and Stadtman, T.C.** (1976) Chemical characterization of the selenoprotein component of clostridial glycine reductase: Identification of selenocysteine as the organoselenium moiety. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73(8), 2659-2663.
- Cooper, W.C and Westbury, R.A.** (1982) The structure of selenium. *Proc. Phys. Soc.* 65, 86-147.
- Cox, J.C., Edwards E.S. and DeMoss J.A.** (1981) Resolution of distinct selenium-containing formate dehydrogenases from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 145, 1317-1324.
- Daudin, L. Khodja H. and Gallien, J.P.** (2003) Development of “position–charge–time” tagged spectrometry for ion beam microanalysis. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B.* 210, 153-158.
- de Souza, M.P., Amini, A., Dojka, M.A., Pickering, I.J., Dawson, S.C., Pace, N.R., Terry, N.** (2001). Identification and Characterization of Bacteria in a Selenium-Contaminated Hypersaline Evaporation Pond. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3785-3794.

- DeMoll-Decker, H. & Macy, J. M.** (1993) The periplasmic nitrite reductase of *Thauera selenatis* may catalyze the reduction of selenite to elemental selenium. *Arch. Microbiol.* 160, 241-247.
- Diels, L., De Smet, M., Hooyberghs, L. and Corbisier, P.** (1999) Heavy metals bioremediation of soil. *Molecular Biotechnology.* 12, 149-158.
- Diels, L., Van der Lelie, N. and Bastiaens, L.** (2002) New developments in treatment of heavy metal contaminated. *Environmental Science and Biotechnology.* 1, 75-82.
- Doran, J.W. and Alexander, M.** (1977) Microbial transformations of selenium. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 31-37.
- Doran, J.W.** (1982) Microorganisms and the biological cycling of selenium. *In* Marshall, K.C. (Ed.), *Advances in Microbial Ecology.* 6, 1-32.
- Dowdle, P.R., and Oremland R.S.** (1998) Microbial oxidation of elemental selenium in soil slurries and bacterial cultures. *Environ. Sci. Technol.* 32, 3749-3755.
- Dreyfuss, J.** (1964) Characterization of a sulfate- and thiosulfate-transporting system in *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 239(7), 2292-2297.
- Dungan, R.S. and Frankenberger, Jr., W.T.** (1998) Reduction of selenite to elemental selenium by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1. *J. Environ. Qual.* 27, 1301-1306.
- Dungan, R.S., Yates, S.R. and Frankenberger, Jr., W.T.** (2003) Transformations of selenate and selenite by *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from a seleniferous agricultural drainage pond sediment. *Environmental Microbial.* 5, 287-295.
- Elkin, E.M.** (1982) Selenium and selenium compounds. *In*: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, Vol. 20, Kroschwitz, J.I. and Howe-Grant, M. (Eds.), 3rd Ed, Wiley-Interscience, New York.
- Enoch, H.G. and Lester, R.L.** (1974) The role of a novel cytochrome b-containing nitrate reductase and quinone in the *in vitro* reconstruction of formate-nitrate reductase activity of *E. coli*. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 61, 1234-1241.
- EPA** (2004). Aquatic Life Water Quality Criteria for Selenium, Environmental Protection Agency, U.S.A.
- Fels, I.G. and Cheldelin, V.H.** (1949) Selenate inhibition studies. III. The reversal of selenate inhibition in *E. coli*. *Arch. Biochem Arch. Biochem.*, 22, 323-324.
- Fishbein, L.** (1991) Selenium. *In*: Metals and their compounds in the environment. Occurrence, Analysis, and Biological. Relevance. Merian E., (Ed.) VCH. Washington, DC, U.S.A. pp. 1153-1190.
- Fleming, R.W. and Alexander, M.** (1972) Dimethylselenide and dimethyltelluride formation by a strain of *Penicillium*, *Appl. Micro.* 24 (3), 424-429

- Flohé, L., Gunzler, W.A. and Schock, H.H.** (1973) Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.* 32, 132-134.
- Frankenberger Jr., W.T. and Karlson, U.** (1994) Microbial volatilization of selenium from soils and sediments. *In: Frankenberger Jr., W.T. and Benson, S. (Eds.), Selenium in the Environment.* Marcel Dekker, New York, pp. 369–388.
- Gadd, G.M.** (2004) Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma.* 122, 109– 119.
- Ganther, H.E.** (1968) Selenotrisulfides. Formation by the reaction of thiols with selenous acid. *Biochemistry.* 7, 2898-2905.
- Ganther, H.E.** (1971) Reduction of the selenotrisulfide derivative of glutathione to a persulfide analog by glutathione reductase. *Biochem.* 10, 4089-4098.
- Garbisu, C., Gonzalez, S., Yang, W.H., Yee, B.C., Carlson, D.L., Yee, A., Smith, N.R., Otero, R., Buchanan, B.B., and Leighton, T.** (1995) Physiological mechanisms regulating the conversion of selenite to elemental selenium by *Bacillus subtilis*. *Biofactors.* 5: 29–37.
- Garbisu, C., Ishii, T., Leighton, T. and B.B., Buchanan** (1996) Bacterial reduction of selenite to elemental selenium. *Chemical Geology.* 132, 199-204.
- Garcin, E., Vernede, X., Hatchikian, E.C., Volbeda, A., Frey, M. and Fontecilla-Camps, J.C.** (1999) The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center. *Structure.* 7, 557-566.
- Ge, K. and Yang, G.** (1993) The epidemiology of selenium deficiency in the etiological study of endemic diseases in China, *Am. J. Clin. Nutr.* 57, 259S-263S.
- Gerrard, T.L., Telford, J.N. and Williams, H.H.** (1974) Detection of selenium deposits in *Escherichia coli* by electron microscopy. *J. Bacteriol.* 119, 1057-1060.
- Gharieb, M.M., Wilkinson, S.C. and Gadd, G.M.** (1995) Reduction of selenium oxyanions by unicellular, polymorphic and filamentous fungi: cellular location of reduced selenium and implications for tolerance. *J. Ind. Microbiol.* 14, 300-311.
- Goris, J., De Vos, P., Coenye, T., Hoste, B., Janssens, D., Brim, H., Diels, L., Mergeay, M., Kersters, K. and Vandamme, P.** (2001). Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp. nov., *Ralstonia metallidurans* sp. nov. and *Ralstonia basilensis* Steinle *et al.* 1998 emend. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1773-1782.
- Gouget, B., Avoscan, L., Sarret, G., Collins, R. and Carrière, M.** (2005) Resistance, accumulation and transformation of selenium by the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 after exposure to inorganic SeVI or SeIV. *Radiochimica Acta.* 93, 683-689.

- Gromer, S., Johansson, L., Bauer, H., Arscott, L.D., Rauch, S., Ballou, D.P., Williams, C.H., Jr., Schirmer, R.H. and Arner, E.S.** (2003) Active sites of thioredoxin reductases: why selenoproteins? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 12618-12623.
- Guimaraes, M.J., Peterson, D., Vicari, A., Cocks, B.G., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Ferrick, D.A., Kastelein, R.A., Bazan, J.F. et Zlotnik, A.** (1996) Identification of a novel *selD* homolog from eukaryotes, bacteria, and archaea: is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 15086-15091.
- Guzzo, J. and Dubow, M.** (2000) A novel selenite- and tellurite- inducible gene in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4972-4978.
- Hall, L., Williams, K., Perry, A.C., Frayne, J. and Jury, J.A.** (1998) The majority of human glutathione peroxidase type 5 (GPX5) transcripts are incorrectly spliced: implications for the role of GPX5 in the male reproductive tract. *Biochem. J.* 333, 5-9.
- Harrison, G., Curle, C. and Laishley, E.J.** (1984). Purification and characterization of an inducible dissimilatory type sulfite reductase from *Clostridium pasteurianum*. *Arch. Microbiol.* 138, 72-78.
- Hatfield, D.L.** (2001) Introduction to selenium. *In* Hatfield, D.L. (éd.), *Selenium: its molecular biology and role in human health*. Kluwer Academic Publishers, Boston, 1-4.
- Haygarth, P.M.** (1994) Importance and global cycling of selenium. *In*: Frankenberger Jr., W.T., Benson, S. (Eds.), *Selenium in the Environment*. Marcel Dekker, New York, pp. 1-28.
- Hazemann, J.L. and O. Proux** (2004). Principes de la spectroscopie d'absorption X. *Bulletin de Liaison de la Société Française de Minéralogie et Cristallographie*.16.
- Heider, J. and Böck, A.** (1993) Selenium metabolism in micro-organisms. *Advances in Microbial Physiology*. 35, 71-109.
- Howard III, J. H.** (1977) Geochemistry of Selenium: formation of ferroselite and selenium behavior in the vicinity of oxidizing sulfide and uranium deposits. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 41, 1665-1678.
- Huber, R.E. and Criddle, R.S.** (1967) The isolation and properties of beta-galactosidase from *Escherichia coli* grown in sodium selenate. *Biochim. Biophys. Acta* 141: 587-599.
- INRA** (2004) Troisième partie – Minéraux, oligoélément et éléments toxiques. *In*: *Etude de l'alimentation totale française*. pp 32-52.
- Ip, C.** (1998) Lessons from basic research in selenium and cancer prevention. *J. Nutri.* 128, 1845-1854.
- Irons, R., Carlson, B.A., Hatfield, D.L. and Davis, C.D.** (2006) Both selenoproteins and low molecular weight selenocompounds reduce colon cancer risk in mice with genetically impaired selenoprotein expression. *J. Nutr.* 136, 1311-1317.

IRSN (2002). Sélénium et composés. Fiche toxicologique, INRS.

Jacob, C., Niroshini G.I.G., Giles, M. and Sies H. (2003) Sulfur and selenium: The role of oxidation state in protein structure and function. *Angewandte Chemie International Edition* 42(39), 4742-4758.

Jeandel, P. Galoo, E. and Chouc, P.Y. (1992) Facteurs alimentaires et arthroses endémiques. *Médecine d'Afrique Noire*. 39 (3), 215-216

Johansson, L., Gafvelin, G. and Arner, E.S. (2005) Selenocysteine in proteins-properties and biotechnological use. *Biochim. Biophys. Acta*. 1726, 1-13.

Juhnke, S., Peitzsch, N., Hübener, N., Große, C. and Nies, D.H. (2002) New genes involved in chromate resistance in *Ralstonia metallidurans* strain CH34. *Archives of Microbiology*. 179(1), 15-25.

Kessi, J., Ramuz, M., Wehrli, E., Spycher, M. and Bachofen, R. (1999). Reduction of selenite and detoxification of elemental selenium by the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 4734-4740.

Kessi, J. and Hanselmann, K. W. (2004). Similarities between the abiotic reduction of selenite with glutathione and the dissimilatory reaction mediated by *Rhodospirillum rubrum* and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 279, 50662–50669.

Kessi, J. (2006) Enzymic systems proposed to be involved in the dissimilatory reduction of selenite in the purple non-sulfur bacteria *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodobacter capsulatus*. *Microbiology*. 152, 731-743.

Khodja H., Berthoumieux E., Daudin, L. and Gallien, J.P. (2001) The Pierre Süe Laboratory nuclear microprobe as a multi-disciplinary analysis tool. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B*. 181, 83-86.

Kishchak, I.T. (1998) Supplementation of selenium in the diets of domestic animals. *In*: Frankenberger Jr., W.T., Engberg, R.A. (Eds.), *Environmental Chemistry of Selenium*. Marcel Dekker, New York, pp. 143–152.

Kitahara, J., Seko, Y. and Imura N. (1993) Possible Involvement of active oxygen species in selenite toxicity in isolated rat hepatocytes. *Archives of Toxicology*. 67(7), 497-501.

Klotz, L.O., Kröncke, K.D., Buchczyk, D.P., Sies, H. (2003) Role of Copper, Zinc, Selenium and Tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J. Nutr.* 133, 1448S-1451S.

Kohrle, J. (2004) Selenium in biology and medicine-further progress and increasing interest. *J. Trace Elements in Medicine and Biology*. 18, 61-63.

Kohrle, J., Brigelius-Flohé, R., Bock, A., Gartner, R., Meyer, O. and Flohé, L. (2000) Selenium in biology: facts and medical perspectives. *Biol. Chem.* 381, 849-864.

- Kramer, G., and Ames, B.** (1988) Mechanisms of mutagenicity and toxicity of sodium selenite (Na_2SeO_3) in *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.* 201,169–180.
- Kredich N.M.** (1971) Regulation of L-cysteine biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. I. Effects of growth of varying sulfur sources and O-acetyl-L-serine on gene expression. *J. Biol. Chem.* 246, 3474-3484.
- Kredich, N.M.** (1996) Biosynthesis of cysteine. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. F. C. Neidhardt, F.C., Curtiss, R., III, Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff W., Riley M. and Umberger H.E. (Eds). Washington, DC: American Society for Microbiology. pp 514-527.
- Kryukov, G.V., Castellano, S., Novoselov, S.V., Lobanov, A.V., Zehtab, O., Guigo, R. and Gladyshev, V.N.** (2003) Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*. 300, 1439-1443.
- Kryukov, G.V. and Gladyshev, V.N.** (2004) The prokaryotic selenoproteome. *EMBO. Rep.* 5, 538-543.
- Kuan, W.H., Lo, S.H., Wang, M.K. and Lin, C.F.** (1998) Removal of Se (IV) and Se (VI) from water by aluminium-oxide coated sand. *Water Res.* 32, 915-923.
- Kudryavtsev, A.A.** (1974) The Chemistry & Technology of Selenium and Tellurium, translated and revised by E. M. Elkin, Collet's (Publishers), London.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.
- Latham, R.** (Translator), (1968) The Travels of Marco Polo, The Folio Society, London, 72p.
- Ledgham, F., Quest, B., Vallaes, T., Mergeay, M. and Covès, J.** (2005) A probable link between the DedA protein and resistance to selenite. *Research in Microbiology*. 156(3), 367-374.
- Leinfelder, W., Zehelein, E., Mandrand-Berthelot, M.A. and Böck, A.** (1988) Gene for a novel tRNA species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine. *Nature*, 331, 723-725.
- Leinfelder, W., Forchhammer, K., Veprek, B., Zehelein E. and Böck, A.** (1990) *In vitro* synthesis of selenocysteinyl-tRNA UCA from seryl-tRNA UCA: Involvement and characterization of the *selD* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 543-547.
- Lemly, A.D.** (1994) Agriculture and Wildlife: ecological implications of subsurface irrigation drainage. *J. Arid. Environments*. 28, 85-94.
- Lemly, A.D.** (2004) Aquatic selenium pollution is a global environmental safety issue. *Ecotox. Environ. Safe.* 59, 44-56.
- Lide, D.R.** (1997) CRC Handbook of Chemistry and Physics, 78th ed., CRC Press (ed.), Boca Raton, New York.

- Lindblow-Kull, C., Kull, F.J. and Shrift, A.** (1985) Single transporter for sulfate, selenate, and selenite in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*. 163(3), 1267-1269.
- Lindstrom, K.** (1983) Selenium as a growth factor for plankton algae in laboratory experiments and in some Swedish lakes, *Hydrobiologia*. 101, 35-47
- Lipman J.G. and Waksman S.A.** (1923) The oxidation of selenium by a new group of autotrophic microorganisms. *Science*. 57, 60.
- Lortie, L., Gould, W.D., Rajan, S., McCready, R.G.L. and Cheng, K.J.** (1992) Reduction of selenate and selenite to elemental selenium by a *Pseudomonas stutzeri* Isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 12, 4042-4044.
- Losi, M.E. and Frankenberger Jr., W.T.** (1997a) Bioremediation of selenium in soil and water. *Soil Sci.* 162, 692-702.
- Losi, M.E. and Frankenberger, Jr., W.T.** (1997b) Reduction of selenium oxyanions by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1: isolation and growth of the bacterium and its expulsion of selenium particles. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3079-3084.
- Losi, M.E. and Frankenberger Jr., W.T.** (1998) Reduction of selenium oxyanions by *Enterobacter cloacae* strain SLDa-1. *In*: Frankenberger Jr., W.T. and Engberg, R.A. (Eds.), *Environmental Chemistry of Selenium*, Marcel Dekker, New York, pp. 515-544.
- Lovley, D. R.** (1993) Dissimilatory metal reduction. *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 263-290.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.** (1951). Protein measurement with a folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Lundquist, T.J., Green, F.B., Tresan, R.B., Newman, M.B., Oswald, W.L. and R.D., Gerhardt,** (1994) The Algal-Bacterial Selenium Removal System: mechanism and field study. *In*: Frankenberger Jr., W.T. and Benson, S. (Eds.), *Selenium in the Environment*. Marcel Dekker, New York, pp. 251-278.
- Macy, J. M., Michel, T. A. and Kirsch, D. G.** (1989) Selenate reduction by a *Pseudomonas* species: a new mode of anaerobic respiration. *FEMS microbiol. Lett.* 61, 195-198.
- Macy. J. M., Rech, S., Auling, G., Dorsch, M., Stackerbrandt, E. and Sly L.I.** (1993) *Thauera selenatis* gen. nov. sp. nov., a member of the beta subclass of proteobacteria with a novel type of anaerobic respiration. *International J. Systematic Bacteriology*. 43 (1), 135-142.
- Macy, J. M.** (1994) Biochemistry of selenium metabolism by *Thauera selenatis* gen. nov. sp. nov. and use of the organism for bioremediation of selenium oxyanions in San Joaquin Valley drainage water. *In*: Frankenberger Jr., W.T. and Benson S. (eds.), *Selenium in the Environment*. Marcel Dekker, New York. pp. 421-444.
- Maher, M.J., Santini, J., Pickering, I.J., Prince, R.C., Macy, J.M. and George G.N.** (2004) X-ray Absorption Spectroscopy of Selenate Reductase. *Inorg. Chem.*, 43(2), 402 -404.

- Maiers, D.T., Wichlacz, P.L. Thompson, D. L. and Bruhn, D. F** (1988) Selenate reduction by bacteria from a selenium-rich environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(10), 2591-2593.
- Marzluf, G.A.** (1970) Genetic and metabolic controls for sulfate metabolism in *Neurospora crassa*: isolation and study of chromate-resistant and sulfate transport-Negative mutants. *Journal of bacteriology.* 102(3), 716-721
- Mayland, H. F.** (1994) Selenium in Plant and Animal Nutrition. *In: Selenium in the Environment*, Frankenberger Jr., W. T. and Benson, S. (Eds.), Marcel Dekker, New York, pp 69-118.
- McCarty, S.L., Chasteen, T.G., Marshall, M., Fall, R. and Bachofen, R.** (1993) Phototrophic bacteria produce volatile, methylated sulfur and selenium compounds. *FEMS Microbiol. Lett.* 112, 93-98.
- McConnell, K.P. and Hoffman, J.L.** (1972) Methionine-selenomethionine parallels in *E. coli* polypeptide chain initiation and synthesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 140, 638-641.
- McCready, R.G.L., Campbell, J.N. and Payne, J.I.** (1966) Selenite reduction by *Salmonella Heidelberg*. *Can. J. Microbiol.* 12, 703-714.
- Mergeay, M., C., Houba and J., Gerits** (1978) Extrachromosomal inheritance controlling resistance to cadmium, cobalt, and zinc ions: evidence from curing in a *Pseudomonas*. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 86, 440-441.
- Mergeay, M., D. Nies, H. G. Schlegel, J. Gerits, P. Charles, and F. Van Gijsegem** (1985) *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J. Bacteriol.* 162,328-334.
- Mergeay, M.** (2000) Bacteria adapted to industrial biotopes: metal-resistant *Ralstonia*. *In: Bacterial stress responses*. G. Stortz and R. Hengge-Aronis (Eds). American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 403-414.
- Michalke, B., Witte, H. and Schramel P.** (2002) Effect of different extraction procedures on the yield and pattern of Se-species in bacterial samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 372, 444-447.
- Milne, J.B.** (1998) The uptake and metabolism of inorganic selenium species. *In: Frankenberger Jr. W.T., Engberg, R.A. (Eds.), Environmental Chemistry of Selenium*. Marcel Dekker, New York, pp. 459-478.
- Misra, T.K.** (1992) Bacterial resistances to inorganic mercury salts and organomercurials. *Plasmid.* 25, 4-16.
- Monchy, S., Vallaey, T., Bossus, A. and Mergeay, M.** (2006) Metal transport ATPase genes from *Cupriavidus metallidurans* CH34: a transcriptomic approach. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry.* 86(9), 677-692.
- Moore, M.D., and Kaplan, S.** (1992) Identification of Intrinsic High-Level resistance to Rare-Earth Oxides and Oxyanions in members of the Class Proteobacteria: Characterization of

- Tellurite, Selenite and Rhodum sesquioxide reduction in *Rhodobacter sphaeroides*. J. Bacteriol. 174, 1505-1514.
- Moxon, A.L.** (1937) Alkali disease, or selenium poisoning. Dak. Agric. Exp. Sta. Tech. Bull., 311, 1-91.
- Müller, S., Senn, H., Gsell, B., Vetter, W., Baron, C. and Bock, A.** (1994) The formation of diselenide bridges in proteins by incorporation of selenocysteine residues: biosynthesis and characterization of (Se)₂-thioredoxin. Biochemistry. 33, 3404-3412.
- Müller, S., Heider, J. and Böck A.** (1997) The path of unspecific incorporation of selenium in *Escherichia coli*. Arch. Microbiol. 168, 421-427.
- Namy, O., Rousset, J.P., Naphine, S. and Brierley, I.** (2004) Reprogrammed Genetic Decoding in Cellular Gene Expression. Molecular Cell. 13, 157-168.
- Nies, D.H.** (1999) Microbial heavy-metal resistance. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51, 730-750.
- Ogle, R.S. and Knight, A.W.** (1996) Selenium bioaccumulation in aquatic ecosystems: 1. effects of sulfate on the uptake and toxicity of selenate in *Daphnia magna*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 30, 274-279.
- Ohlendorf, H.M.** (1989) In "Selenium in Agriculture and the Environment", Jacobs, L. M., (Ed.), Soil Science Society of America, Inc. and American Society of Agronomy, Inc. 133-171.
- Ohlendorf, H.M. and Santolo G.M.** (1994) Kesterson Reservoir – Past, Present, and Future: an ecological risk assessment. In Frankenberger Jr., W.T., Benson, S. (Eds.), Selenium in the Environment. Marcel Dekker, New York, pp. 369-388.
- OMS** (2003) Révision des recommandations pour la qualité de l'eau http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/guidelines2/en/.
- Oremland, R.S.** (1994) Biogeochemical transformations of selenium in anoxic environments. In: Frankenberger Jr., W.T. and Benson, S. (Eds.), Selenium in the Environment. Marcel Dekker, New York, pp. 389-421.
- Oremland, R.S., Hollibaugh, J.T. Maest, A.S. Presser, T.S. Miller, L.G. and Culbertson, C.W.** (1989) Selenate reduction to elemental selenium by anaerobic bacteria in sediments and culture: biogeochemical significance of a novel, sulfate-independent respiration. Appl. Environ. Microbiol. 55, 2333-2343.
- Oremland, R.S., Steinberg, N.A., Presser, T.S. and Miller, L.G.** (1991) *In situ* bacterial selenate reduction in the agricultural drainage systems of western Nevada. Appl. Env. Micro. 57, 615-617.
- Oremland, R.S., Blum, J.S., Culbertson, C.W., Visscher, P.T., Miller, L.G., Dowdle, P. and F.E. Strohmaier** (1994) Isolation, growth, and metabolism of an obligately anaerobic, selenate- respiring bacterium, strain SES-3. Appl. Environ. Microbiol. 60(8), 3011-3019.

- Oremland, R.S., Blum, J.S., Bindi, A.B., Dowdle, P.R., Herbel, M. and Stolz, J.F.** (1999) Simultaneous reduction of nitrate and selenate by cell suspensions of selenium-respiring bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4385-4392.
- Oremland, R.S., Herbel, M.J., Blum, J.S., Langley, S., Beveridge, T.J., Ajayan, P.M., Sutto, T., Ellis, A.V. and Curran, S.** (2004) Structural and spectral features of selenium nanospheres produced by Se-respiring bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 52-60.
- Ostrowski, J., and Kredich, N.M.** (1989) Molecular characterization of the *cysJIH* promoters of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: regulation by CysB protein and N-acetyl-L-serine. *J. Bacteriol.* 171, 130-140
- O'Toole, D. and Raisbeck, M.F.** (1995) Pathology of experimentally induced chronic selenosis (alkali disease) in yearling cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 364-373.
- Painter, E.P.** (1941) The chemistry and toxicity of selenium compounds with special reference to the selenium problem. *Chem. Rev.* 28, 179-213.
- Pan, F., Natori, Y. and Tarver, H.** (1964) Studies on selenium compounds. II. Metabolism of selenomethionine and selenomethionine in rats. *Biochim. Biophys. Acta.* 9(93), 521-525.
- Peters, F., Rother, M. and Boll M.** (2004) Selenocysteine-containing proteins in anaerobic benzoate metabolism of *Desulfococcus multivorans*. *Journal of Bacteriology.* 186(7), 2156-2163.
- Peterson, P. J., Benson, L. M. and Zieve, R.** (1981) Metalloids, Chapter 8. *In: Effects of Heavy Metals Pollution on Plants*, Vol 1, Lepp, N. W. (Ed.), Applied Science, London.
- Pickering, I.J., Brown, G.E. and Tokunaga. T.K.** (1995) Quantitative speciation of selenium in soils using X-ray absorption spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 29, 2456-2459.
- Pickering, I., George, G., Van Fleet-Stalder, V., Chasteen, T. and Prince. R.** (1999) X-ray absorption spectroscopy of selenium-containing amino acids. *J. Biol. Inorg. Chem.* 4, 791-794.
- Pinsent, J.** (1954) The need for selenite and molybdate in the formation of formic dehydrogenase by members of the coli-aerogenes group of bacteria. *Biochem. J.* 57, 10-16.
- Ponce de Leon, C.A., Bayon, M.M., Paquin, C. and Caruso, J.A. Ponce de Leon** (2002) Selenium incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: a study of different incorporation methods. *Journal of Applied Microbiology.* 92, 602-610.
- Prange, A., Birzele, B., Hormes, J. and Modrow H.** (2005) Investigation of different human pathogenic and food contaminating bacteria and moulds grown on selenite/selenate and tellurite/tellurate by X-ray absorption spectroscopy. *Food Control.* 16, 723-728.
- Prescott, Harley, and Klein** (1995). *Microbiologie*, seconde edition française. De Boeck and Larcier (Eds), Bruxelles, pp. 1164.

- Quinn, N.W.T., Lundquist, T.J., Green, F.B., Zárate, M.A., Oswald, W.J. and Leighton, T.** (2000) Algal-bacterial treatment facility removes selenium from drainage water. *California Agriculture*. 54(6), 50-56.
- Rabenstein, D.L. and Tan, K.S.** (1988) ^{77}Se NMR studies of bis(alkylthio)selenides of biological thiols. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 26(12), 1079-1085.
- Ranjard, L., Prigent-Combaret, C., Nazaret, S. and Cournoyer, B.** (2002) Methylation of inorganic and organic selenium by the bacterial thiopurine methyltransferase. *J. Bacteriol.* 184, 3146-3149.
- Ranjard, L., Nazaret, S. and Cournoyer, B.** (2003) Freshwater bacteria can methylate selenium through the thiopurine methyltransferase pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(7), 3784-3790.
- Ranjard, L., Prigent-Combaret, C., Favre-Bonté, S., Monnez, C., Nazaret, S. and B. Cournoyer** (2004) Characterization of a novel selenium methyltransferase from freshwater bacteria showing strong similarities with the calicheamicin methyltransferase. *Biochimica and Biophysica Acta*. 1679, 80-85.
- Rayman, M.P.** (2000). The importance of selenium to human health. *The Lancet* 356(9225), 233-241.
- Ressler, T., Wong, J., Roos, J. and Smith, I.L.** (2000) Quantitative speciation of Mn-bearing particulates emitted from autos burning (methylcyclopentadienyl)manganese tricarbonyl-added gasolines using XANES spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 34, 950-958.
- Richardson, D.J., Bell, L.C., Moir, J.W.B. and Ferguson, S.J.** (1994) A denitrifying strain of *Rhodobacter capsulatus*. *FEMS Microbiology Letters*. 120(3), 323-328.
- Richardson, D.R.** (2005) More roles for selenoprotein P: local selenium storage and recycling protein in the brain. *Biochem. J.* 386, e5-7.
- Richter and Bergmann** (1993) **Richter, D., and Bergmann H.** (1993) Selenium uptake by wheat plants. In: M. Anke (ed.), *Mengen-Spurenelem.*, 13th Arbeitstag, Verlag MTV Hammerschmidt, Gersdorf, Germany.
- Riedel, G.F. and Sanders, J.G.** (1996) The influence of pH and media composition on the uptake of inorganic selenium by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 1577-1583.
- Robaux, V.** (2005) Assessment of the presence of selenium in drinking waters of the Essonne department : caracterisation and evolution. *Journal européen d'hydrologie*. 36(2), 93-106.
- Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G. and Hoekstra, W.G.** (1973) Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*. 179, 588-590.

- Roux, M., Sarret, G., Pignot-Paintrand, I., Fontecave, M., Covès, J.** (2001) Mobilization of selenite by *Ralstonia metallidurans* CH34. Appl. Environ. Microbiol. 67, 769-773.
- Roux, M. and Covès, J.** (2002) The iron-containing superoxide dismutase of *Ralstonia metallidurans* CH34. FEMS Microbiol Lett. 210, 129-133.
- Sabaty, M., Avazéri, C., Pignol, D. and Verméglio, A.** (2001) Characterization of the reduction of selenate and tellurite by nitrate reductases. Appl. Environ. Microbiol. 67, 5122-5126.
- Sapozhnikov, D.I.** (1937) The substitution of selenium for sulfur in the photoreduction of carbonic acid by purple sulfur bacteria. Mikrobiologiya. 6, 643-644.
- Sarathchandra, S.U. and Watkinson, J.H.** (1981) Oxidation of elemental selenium to selenite by *Bacillus megaterium*. Science. 211, 600-601.
- Sawers, G., Heider, J., Zehelein, E. and Böck, A.** (1991) Expression and operon structure of the *sel* genes of *Escherichia coli* and identification of a third selenium-containing formate dehydrogenase isoenzyme. J. Bacteriol. 173, 4983-4993.
- Schlegel, H. G., Kaltwasser, H. and Gottschalk, G.** (1961) Ein sumbersverfahren zur kultur wasserstoffoxidierender bakterien: wachstum physiologische untersuchungen. Arch. Mikrobiol. 38, 209-222.
- Schlekat, C.E., Dowdle, P.R., Lee, B.G., Luoma, S.N., and Oremland R.S.** (2000) Bioavailability of particle-associated selenium to the bivalve *Potamocorbila amurensis*. Environ. Sci. Technol. 34, 4504-4510.
- Schmidt, M., Siebert, W. and Bagnall, K.W.** (1973) The Chemistry of Sulphur, Selenium, Tellurium and Polonium, Volume 15, Pergamon Texts in Inorganic Chemistry, Pergamon Press, Rushcutters Bay.
- Schrauzer, G.N., White, D.A. and Schneider, C.J.** (1977) Cancer mortality correlation studies-III: statistical associations with dietary selenium intakes. Bioinorg. Chem. 7, 23-31.
- Schrauzer, G.N.** (2000) Selenomethionine: A Review of Its Nutritional Significance, Metabolism and Toxicity. J. Nutr. 130, 1653-1656, 2000.
- Schröder, I., Rech, S., Krafft, T. and Macy, J. M.** (1997) Purification and characterization of the selenate reductase from *Thauera selenatis*. J. Biol. Chem. 272, 23765-23768.
- Schwarz, K. and Foltz, C.M.** (1957) Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. J. Am. Chem. Soc. 79, 3292-3293.
- Schwintner, C., Sabaty, M., Berna, B., Cahors, S. and Richaud, P.** (1998) Plasmid content and localization of the genes encoding the denitrification enzymes in two strains of *Rhodobacter sphaeroides*. FEMS Microbiol. Lett. 165, 313-321.

- Séby, F., Potin-Gautier, M., Giffaut, E. and Donard, O.F.X** (1998). Assessing the speciation and the biogeochemical processes affecting the mobility of selenium from a geological repository of radioactive wastes to the biosphere. *Analysis*. 26, 193-198.
- Seko, Y., Saito, Y., Kitahara, J. and Imura, N.** (1989) Active oxygen generation by the reaction of selenite with reduced glutathione *in vitro*. *In: selenium in biology and medicine*, Wendel, A. (Ed.), pp 70-73.
- Sekowska, A., Kung, H.F. and Danchin, A.** (2000) Sulfur metabolism in *Escherichia coli* and related bacteria: facts and fiction. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2(2), 145-177.
- Shamberger, R.J.** (1985) The genotoxicity of selenium. *Mutation Research*. 154, 29-48.
- Shen, C.F., Yang and C.N., Ong** (1999) Sodium selenite-induced oxidative stress and apoptosis in human hepatoma HepG2 cells H.M., *International Journal of Cancer*. 81(5), 820-828.
- Silver, S. and Phung, L.T.** (1996) Bacterial heavy metal resistance: New Surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 753-789.
- Simonoff, M. and Simonoff, G.** (1991) Le sélénium et la vie. Centre National de la Recherche Scientifique. Masson (Ed.). Paris. 242 p.
- Sirko, A., Zatyka, M., Sadowy, E. and Hulanicka D** (1995) Sulfate and thiosulfate transport in *Escherichia coli* K-12: evidence for a functional overlapping of sulfate- and thiosulfate-binding proteins." *J. Bacteriol.* 177(14), 4134-4136.
- Sliwowski, M.X. and Stadtman, T.C.** (1988) Selenoprotein A of the clostridial glycine reductase complex: Purification and amino acid sequence of the selenocysteine-containing peptide. *Proc. Natd. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 368-371.
- Smith, F.W., Hawkesford, M.J., Prosser, I.M. and Clarkson, D.T.** (1995) Isolation of cDNA from *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a high-affinity sulfate transporter at the plasma membrane. *Mol. Gen. Genet.* 247, 709-715
- Sors, T.G., Ellis D.R. and Salt D.E.** (2005) Selenium uptake, translocation, assimilation and metabolic fate in plants. *Photosynthesis Research*. 86, 373-389.
- Spallholz J.E.** (1997) Free Radical generation by selenium compounds and their prooxidant toxicity. *Biomed. Environ. Sci.* 10, 260-270.
- Stadtman, T.C.** (1991) Biosynthesis and Function of Selenocysteine-containing Enzymes. *The Journal of biological chemistry*. 266(25), 16257-16260.
- Stadtman, T.C.** (1996) Selenocysteine. *Annu Rev Biochem*, 65, 83-100.
- Steinberg, N.A., Oremland, R.S.,** 1990. Dissimilatory selenate reduction potentials in a diversity of sediment types. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3550-3557.

- Stolz, J.F., Gugliuzza, T., Blum, J.S., Oremland, R. and Murillo, F. M.** (1997) Differential cytochrome content and reductase activity in *Geospirillum barnesii* strain SeS3. *Arch. Microbiol.* **167**, 1-5.
- Stolz, J.F. and Oremland, R.S.** (1999) Bacterial respiration of arsenic and selenium. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**: 615–627.
- Stolz, J.F., Basu, P., Oremland, R.S.** (2002) Microbial transformation of elements: the case of arsenic and selenium. *Int. Microbiol.* **5**, 201–207.
- Stolz, J.F., Basu, P., Santini, J.M. and Oremland, R.S.** (2006) Arsenic and selenium in microbial metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**, 107–130.
- Stortchevoi, A.A.** (2006) Misacylation of tRNA in prokaryotes: a re-evaluation. *Cellular and Molecular Life Sciences.* **63**, 820-831.
- Taghavi, S., Mergeay, M., Nies, D. and van der Lelie D.** (1997) *Alcaligenes eutrophus* as a model system for bacterial interactions with heavy metals in the environment. *Research in Microbiol.* **148**(6), 536-551.
- Takai, K., Hirayama, H., Sakihama, Y., Inagaki, F., Yamato Y. and Horikoshi K.** (2002) Isolation and metabolic characteristics of previously uncultured members of the order *Aquificales* in subsurface gold mine. *Applied and Environmental Microbiology.* **68**(6), 3046-3054.
- Tapiero, H., Townsend, D.M. and Tew, K.D.** (2003) The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomed. Pharmacother.* **57**, 134-144.
- Thompson-Eagle, E.T. and Frankenberger, Jr., W.T.** (1992) Bioremediation of soils contaminated with selenium. *Advances in Soil Science.* **17**, 261-310.
- Thomson, C.D. and Stewart, R.D.H.** (1974) The metabolism of [⁷⁵Se]selenite in young women. *Br. J. Nutr.* **32**, 47-57.
- Thomson, C.D. and Robinson, M.F.** (1986) Urinary and fecal excretions and absorption of a large supplement of selenium: Superiority of selenate over selenite. *Am. J. Clin. Nutr.* **44**, 659-663.
- Tian, J., Sinskey, A.J. and Stubbe, J.A.** (2005) Kinetic studies of Polyhydroxybutyrate granule formation in *Wautersia eutropha* H16 by Transmission Electron Microscopy. *Journal of bacteriology.* **187**(11), 3814-3824.
- Tomei, F.A., Barton, L.L., Lemanski, C.L., and Zocco, T.G.** (1992) Reduction of. selenate and selenite to elemental selenium by *Wolinella succinogenes*. *Can. J. Microbiol.* **38**, 1328-1333.
- Tomei, F.A., Barton, L.L., Lemanski, C.L., Zocco, T.G., Fink, N.H., Sillerud, L.O.** (1995) Transformation of selenate and selenite to elemental selenium by *Desulfovibrio desulfuricans*. *J. Indus. Microbiol.* **14**, 329-336.

- Torma, A. E. and Habashi, F.** (1972) Oxidation of copper (II) selenide by *Thiobacillus ferrooxidans*. Can. J. Microbiol. 18, 1780-1781.
- Tucker, J.D., Auletta, A., Cimino, M.C., Dearfield, K.L., Jacobson-Kram, D., Tice, R.R., Carrano, A.V.** (1993) Sister-chromatid exchange: second report of the Gene-Tox Program. Mutat. Res. 297, 101-180.
- Turner, D.C. and Stadtman, T.C.** (1973) Purification of protein components of the clostridial glycine reductase system and characterization of protein A as a selenoprotein. Arch. Biochem. Biophys. 154, 366-381.
- Turner, R.J., Weiner, J.H. and Taylor, D.E.** (1998) Selenium metabolism in *Escherichia coli*. Biometals. 11, 223-227.
- Uden, P.C., Boakye, H.T., Kahakachchi, C. and Tyson, J.F.** (2004) Selective detection and identification of Se containing compounds - review and recent developments. Journal of chromatography A. 1050, 85-93.
- Van Fleet Stalder, V., Gürleyük, H., Bachofen, R. and Chasteen, T.G.** (1997) Effects of growth conditions on production of methyl selenides in cultures of *Rhodobacter sphaeroides*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 19, 98-103.
- Vandamme, P. and Coenye, T.** (2004). Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54, 2285-2289.
- Vaneechoutte, M., Kämpfer, P., De Baere, T., Falsen, E. and Verschraegen, G.** (2004) *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts *et al.* 1990) comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 317-327.
- Vernet, P., Rigaudiere, N., Ghyselinck, N., Dufaure, J.P. and Drevet, J.R.** (1996) *In vitro* expression of a mouse tissue specific glutathione-peroxidase-like protein lacking the selenocysteine can protect stably transfected mammalian cells against oxidative damage. Biochem. Cell. Biol; 74, 125-131.
- Von Rosicky, T., Nies, D.H. and Saier, Jr., M.H.** (2005) Genomic analyses of transport proteins in *Ralstonia metallidurans*. Comp. Funct. Genom. 6, 17-56.
- Wagner, M., Sonntag, D., Grimm, R., Pich, A., Eckerskorn, C., Sohling, B. and Andreesen, J.R.** (1999) Substrate-specific selenoprotein B of glycine reductase from *Eubacterium acidaminophilum*. Biochemical and molecular analysis. Eur. J. Biochem. 260, 38-49.
- Watts, C.A., Ridley, H., Condie, K.L., Leaver, J.T., Richardson, D.J. and Butler, C.S.** (2003) 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. 228(2), 273-279.

- Watts, C.A., Ridley, H., Dridge, E.J., Leaver, J.T., Reilly, A.J., Richardson, D.J. and Butler, C.S.** (2004) Microbial reduction of selenate and nitrate: Common themes and variations. *Biochemical Society Transactions*. 33(1), 173-175.
- White, C., Wilkinson, S.C. and Gadd, G.M.** (1995) The role of microorganisms in biosorption of toxic metals and radionuclides. *Int. Biodeterioration Biodegradation*. 35, 17-40.
- White, P.J., Bowen, H.C., Parmaguru, P., Fritz, M., Spracklen, W.P., Spiby, R.E., Meacham, M.C., Harriman, M., Trueman, L.J., Smith, B.M., Thomas, B. and M.R. Broadley** (2004) Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*. 55(404), 1927-1937.
- Williams, M.J., Ogle, R.S., Knight, A.W. and Burau, R.G.,** (1994). Effects of sulfate on selenate uptake and toxicity in the green alga *Selenastrum capricornutum*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 27, 449-453.
- Wright, B.E.** (2004) Stress-directed adaptive mutations and evolution. *Molecular Microbiology*. 52(3), 643-650.
- Wu, J.Y., Siegel, L.M. and Kredich, N.M.** (1991) High-level expression of *Escherichia coli* NADPH-sulfite reductase: requirement for a cloned *cysG* plasmid to overcome limiting siroheme cofactor. *J. Bacteriol.* 173, 325-333.
- Wu, L.** (2004) Review of 15 years of research on ecotoxicology and remediation of land contaminated by agricultural drainage sediment rich in selenium *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 57, 257-269.
- Yaeger, M.J., Neiger, R.D., Holler, L., Fraser, T.L., Hurley, D.J. and Palmer, I.S.** (1998) The effect of subclinical selenium toxicosis on pregnant beef cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10, 268-273.
- Yan, L. Yee, J.A., Boylan, L.M. and Spallholz, J.E.** (1991) Effect of selenium compounds and thiols on human mammary tumor cells. *Biol. Trace Elem. Res.* 30(2), 145-162.
- Yan, L. and Frenkel, G.D.** (1992) Inhibition of cell attachment by selenite. *Cancer Research*. 52, 5803-5807.
- Yang, G., Yin S., Zhou, R., Gu, L., Yan, B., Liu, Y. and Liu Y.** (1989) Studies of safe maximal daily selenium intake in a seleniferous area in China. II. Relation between selenium intake and the manifestation of clinical signs and certain biochemical alterations in blood and urine. *Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health and Disease*. 3, 123-130.
- Yanke, L.J., Bryant, R.D. and Laishley E.J.** (1995) Hydrogenase I of *Clostridium pasteurianum* functions as a novel selenite reductase. *Anaerobe*. 1(1), 61-67.
- Yildiz, F.H., Davies, J.P. and Grossman, A.R.** (1994) Characterization of sulfate transport in *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur-limited and sulfur-sufficient growth. *Plant Physiol.* 104, 981-987.

- Zawislanski, P.T. and McGrath, A.E.** (1998) Selenium cycling in estuarine wetlands: overview and new results from the San Francisco Bay. *In*: Frankenberger Jr., W.T., Engberg, R.A. (Eds.), *Environmental Chemistry of Selenium*. Marcel Dekker, New York, pp. 223–242.
- Zhang, Y., Gladyshev, V.N.** (2005) An algorithm for identification of bacterial selenocysteine insertion sequence elements and selenoprotein genes. *Bioinformatics*. 21, 2580-2589.
- Zinoni, F., Birkmann, A., Stadtman, T.C. and Böck A.** (1986) Nucleotide sequence and expression of the selenocysteinecontaining polypeptide of formate dehydrogenase (formate-hydrogen-lyase-linked) from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 4650-4654.

Annexe



National Institute of Standards & Technology

Certificate of Analysis

Standard Reference Material® 1640

Trace Elements in Natural Water

This Standard Reference Material (SRM) is intended primarily for use in evaluating methods used in the determination of trace elements in fresh water. SRM 1640 is composed of natural fresh water collected from Clear Creek, CO, which has been filtered and stabilized with nitric acid at a concentration of 0.5 mol/L. A unit of SRM 1640 consists of approximately 250 mL of solution in a polyethylene bottle, which is sealed in an aluminized plastic bag.

Certified Values and Uncertainties: The certified values expressed as mass fractions and their expanded uncertainties are listed in Table 1 for 17 elements in SRM 1640. The certified values are equally weighted means of the results of two or more independent analytical methods or a single primary method. Each expanded uncertainty is based on a 95 % confidence interval for the mean and includes an allowance for differences between the analytical methods used and an allowance for solution stability [1].

Reference Values and Uncertainties: The reference values expressed as mass fractions and their expanded uncertainties are provided in Table 2 for an additional ten elements. The reference values are means from a single method or two or more equally weighted means of results of independent analytical methods for which there is insufficient information to meet NIST certification criteria. Each expanded uncertainty is based on a 95 % confidence interval for the mean and includes an allowance for differences between the analytical method used and an allowance for solution stability but may not include all sources of uncertainty [1].

Information Value: The upper limit information value for thallium, expressed as a mass fraction in Table 3, is an estimate based on the instrumental limit of detection and measurements from a single unit of SRM 1640.

The analytical methods used for the characterization of this SRM are given in Table 4. All values are reported as mass fractions [2].

NOTICE AND WARNINGS TO USERS

Expiration of Certification: This certification of this SRM lot is valid until **01 June 2008**, within the measurement uncertainties specified, provided the SRM is handled and stored in accordance with the instructions given in this certificate (see "Use"). However, the certification will be nullified if the SRM is contaminated or modified. Registration (see attached sheet) will facilitate notification.

Use: The SRM should be shaken before use because of potential water condensation. Samples should be analyzed at a room temperature of $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$. To prevent possible contamination of the SRM, pipettes should not be inserted into the bottle. After use, the bottle should be recapped tightly and returned to the aluminized bag, which should be folded and sealed with sealing tape. This precaution will protect the SRM from possible environmental contamination and long-term evaporation.

The mass fractions given in Tables 1 and 2 are expressed as microgram per kilogram or milligram per kilogram. These values can be converted to mass concentrations with units of nanograms per cubic centimeter or micrograms per cubic centimeter, respectively, by multiplying by the density. The density of SRM 1640 at $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ was measured to be $1.0015\text{ g/cm}^3 \pm 0.0005\text{ g/cm}^3$ (identical to grams per milliliter).

Coordination of the NIST technical measurements was under the direction of J.R. Moody of the NIST Analytical Chemistry Division.

Stephen A. Wise, Chief
Analytical Chemistry Division

Robert L. Watters, Jr., Chief
Measurement Services Division

Gaithersburg, MD 20899
Certificate Issue Date: 20 January 2006
See Certificate Revision History on Last Page

SRM 1640

Page 1 of 4

Statistical analysis of the experimental data was performed by W.F. Guthrie of the NIST Statistical Engineering Division.

The overall coordination of measurements performed by the U.S. Geological Survey National Water Quality Laboratory, Arvada, CO, and by laboratories that participate in the Standard Reference Water Program was under the direction of K. Long.

The support aspects involved in the issuance of this SRM were coordinated through the NIST Measurement Services Division.

Recognizing contamination at the microgram per kilogram level can be a serious problem, labware should be scrupulously cleaned and only high purity reagents employed. Sampling and manipulations, such as evaporations, should be done in a clean environment, such as a Class-100 clean hood.

Table 1. Certified Mass Fractions

Element	µg/kg	Element	µg/kg
Aluminum	52.0 ± 1.5	Iron	34.3 ± 1.6
Antimony	13.79 ± 0.42	Lead	27.89 ± 0.14
× Arsenic	26.67 ± 0.41	Manganese	121.5 ± 1.1
Barium	148.0 ± 2.2	Molybdenum	46.75 ± 0.26
× Beryllium	34.94 ± 0.41	× Selenium	21.96 ± 0.51
Boron	301.1 ± 6.1	Silver	7.62 ± 0.25
Cadmium	22.79 ± 0.96	Strontium	124.2 ± 0.7
Chromium	38.6 ± 1.6	Vanadium	12.99 ± 0.37
× Cobalt	20.28 ± 0.31		

Table 2. Reference Mass Fractions

Element	µg/kg	Element	mg/kg
Copper	85.2 ± 1.2	Calcium	7.045 ± 0.089
Lithium	50.7 ± 1.4	Magnesium	5.819 ± 0.056
Nickel	27.4 ± 0.8	Silicon	4.73 ± 0.12
Potassium	994 ± 27	Sodium	29.35 ± 0.31
Rubidium	2.00 ± 0.02		
× Zinc	53.2 ± 1.1		

Table 3. Information Mass Fraction

Thallium	<0.1 µg/kg
----------	------------

Source and Preparation of Material: A sample of about 3500 L of natural (fresh) water was obtained by the USGS at Clear Creek, CO. It was filtered through a 0.1 µm ultra filter and acidified with nitric acid. Analysis of the water by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS), before and after the stabilization process, showed that arsenic, beryllium, cobalt, selenium, and zinc were decreased in concentration during the stabilization process. These elements were adjusted to their original concentration levels by the addition of salts of the decreased elements. The stabilized solution was then pumped through an ultra filter, past a UV light source (for sterilization purposes), and then to a bottling station. At the bottling station, the bottles were rinsed with the sample and then filled.

Table 4. Methods Used for the Analysis of SRM 1640

Elements	Methods
Aluminum	DCP, ETAAS, ICP-AES, ICPMS
Antimony	ETAAS, Hyd-AAS, ICP-AES, ICPMS
Arsenic	ETAAS, Hyd-AAS, ICP-AES, ICPMS
Barium	DCP, ETAAS, ICP-AES, ICPMS, ID-ICPMS
Beryllium	ETAAS, ICP-AES, ICPMS
Boron	COLOR, ICP-AES, ICPMS, ID-TIMS
Cadmium	ETAAS, FAAS, IC, ICP-AES, ICPMS, ID-ICPMS
Calcium	DCP, FAAS, ICP-AES, ICPMS
Chromium	ETAAS, FAAS, IC, ICP-AES, ICPMS
Cobalt	ETAAS, ICP-AES, ICPMS
Copper	ETAAS, FAAS, IC, ICP-AES, ICPMS, ID-ICPMS
Iron	ETAAS, FAAS, ICP-AES, ICPMS, ID-TIMS
Lead	ETAAS, FAAS, IC, ICP-AES, ICPMS, ID-ICPMS
Lithium	ETAAS, FAAS, ICP-AES, ICPMS
Magnesium	DCP, FAAS, ICP-AES, ICPMS
Manganese	DCP, ETAAS, FAAS, ICP-AES, ICPMS
Molybdenum	ETAAS, ICP-AES, ICPMS, ID-ICPMS
Nickel	ETAAS, FAAS, ICP-AES, ICPMS, ID-ICPMS
Potassium	ETAAS, FAAS, FES, ICP-AES, ICPMS
Rubidium	ID-TIMS
Selenium	EAAS, Hyd-AAS, ICP-AES, ICPMS
Silicon	COLOR, ICP-AES, ICPMS
Silver	ETAAS, FAAS, ICP-AES, ICPMS, ID-ICPMS
Sodium	DCP, FAAS, FES, ICP-AES, ICPMS
Strontium	DCP, ETAAS, ICP-AES, ICPMS, ID-ICPMS
Thallium	ICPMS
Vanadium	ETAAS, ICP-AES, ICPMS
Zinc	FAAS, IC, ICP-AES, ICPMS, ID-ICPMS

Methods given in bold indicate that a single NIST primary method was used for certification.

Methods

COLOR	Colorimetry
DCP	Direct current plasma atomic emission spectrometry
ETAAS	Heated graphite atomizer (electrothermal) atomic absorption spectrometry
FAAS	Flame atomic absorption spectrometry
FES	Flame emission spectrometry
Hyd-AAS	Hydride generation-atomic absorption spectrometry
IC	Ion chromatography
ICP-AES	Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry
ICPMS	Inductively coupled plasma mass spectrometry
ID-ICPMS	Isotope dilution-inductively coupled plasma mass spectrometry
ID-TIMS	Isotope dilution-thermal ionization mass spectrometry

Contributing Laboratories and Analysts:

E.S. Beary, M.S. Epstein, K.E. Murphy, P.J. Paulsen, and G.C. Turk; NIST Analytical Chemistry Division, Gaithersburg, MD
Water Resources Division and approximately 70 laboratories participating in the Standard Reference Water Program, under the direction of K. Long; U.S. Geological Survey, Arvada, CO
P. Taylor, L. Van Nevel, I. Lapitajs, A. Kynartren, A. Held, U. Örnemark, and P. De Bièvre; Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgium
M. Morita; Regional Environmental Division of the National Institute for Environmental Studies, Japan Environmental Agency, Tsukuba, Japan

REFERENCES

- [1] ISO; *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*, ISBN 92-67-10188-9, 1st ed. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland (1993); see also Taylor, B.N.; Kuyatt, C.E.; *Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurements Results*, NIST Technical Note 1297, U.S. Government Printing Office: Washington, DC (1994); available at <http://physics.nist.gov/Pubs/>.
- [2] Taylor, B.N.; *Guide for the Use of the International System of Units (SI)*; NIST Special Publication 811, U.S. Government Printing Office: Washington, DC (1995).

Certificate Revision History: 20 January 2006 (This revision reflects an extension of the certification period); 17 March 2004 (This technical revision reports a change in the expiration date); 23 January 1998 (Revision reports the addition of an information value for thallium; 02 October 1997 (Original certificate date).

Users of this SRM should ensure that the certificate in their possession is current. This can be accomplished by contacting the SRM Program at: telephone (301) 975-6776; fax (301) 926-4751; e-mail srminfo@nist.gov; or via the Internet at <http://www.nist.gov/srm>.

RESUME

Le sélénium est un élément trace essentiel pour les organismes vivants mais à forte concentration, il est très toxique. Les oxyanions sélénite et séléniate sont les formes les plus toxiques et prédominantes dans l'environnement. Certains micro-organismes jouent un rôle prépondérant en contribuant au cycle naturel du sélénium. Notre modèle d'étude *Cupriavidus* (anciennement *Ralstonia*) *metallidurans* CH34, bactérie tellurique issue de biotopes contaminés en métaux, est connu pour résister au sélénite (forme soluble du sélénium, très toxique et bio-assimilable) en le réduisant en sélénium élémentaire (forme précipitée insoluble et peu toxique). Afin de mieux comprendre les mécanismes de réduction du sélénium par les bactéries, trois méthodes de spéciation ont été combinées (SAX (XANES et EXAFS), HPLC-ICP-MS et SDS-PAGE-PIXE) et normalisées par la quantification du sélénium accumulé dans les bactéries. Les analyses de spéciation ont mis en évidence l'existence de deux voies de réduction du sélénium chez *C. metallidurans* CH34 : une voie d'assimilation transforme le sélénite et le séléniate en sélénium organique, identifié comme de la sélénométhionine et conduit à son incorporation dans des protéines bactériennes. L'espèce organique sélénométhionine semble être incorporée dans les protéines de façon non spécifique (présence de protéines sélénées). Une voie de détoxification précipite le sélénite en nanoparticules de sélénium élémentaire. Cette voie de détoxification ne se met pas en place après une exposition au séléniate malgré sa présence comme espèce minoritaire par rapport à l'exposition sélénite. Du sélénodiglutathion est détecté dans des bactéries stressées par une exposition au séléniate en milieu limité en sulfate. Les bactéries exposées à du sélénite accumulent 25 fois plus de sélénium que lorsqu'elles sont exposées à du séléniate. L'étude de mutants résistants au sélénite, n'exprimant pas la protéine membranaire DedA, a montré que l'accumulation du sélénium après exposition au sélénite est diminuée comparé à la souche sauvage signifiant un probable lien entre la prise en charge du sélénite et la protéine DedA. Enfin, le séléniate semble emprunter la sulfate perméase de *C. metallidurans* CH34.

TITLE

Study of the *Cupriavidus metallidurans* CH34 resistance of selenite and selenate oxyanions: accumulation, localisation and transformation of selenium

ABSTRACT

Selenium is an essential trace element for the living organisms but it is very toxic at high concentration. Selenite and selenate oxides, soluble forms, highly toxic and bio-assimilable, are the most prevalent forms in the environment. Some soil micro-organisms play a dominant role and contribute to the natural cycle of selenium. Our study model, *Cupriavidus* (formerly *Ralstonia*) *metallidurans* CH34, a telluric bacterium characteristic of metal-contaminated biotopes, is known to resist selenite by reducing it into elemental selenium, an insoluble and less toxic form of selenium. In order to better understand the mechanisms of selenium reduction in the bacteria, three methods of speciation were combined (XAS (XANES and EXAFS), HPLC-ICP-MS and SDS-PAGE-PIXE). They were completed by the direct quantification of selenium accumulated in the bacteria. Speciation analyses highlighted the existence of two mechanisms of reduction of selenium oxides in *C. metallidurans* CH34. Assimilation transforms selenite and selenate into organic selenium, identified as selenomethionine and leads to its non-specific incorporation into bacterial proteins (presence of selenious proteins). Detoxication precipitates selenite in nanoparticles of elemental selenium. This way of detoxication is not set up after an exposure to selenate although it is nevertheless possible to detect elemental selenium but in very small amount compared to the exposure of selenite. Selenodiglutathion is detected in bacteria stressed by an exposure to selenate in medium limited in sulphate. Bacteria exposed to selenite accumulate 25 times more selenium than when they are exposed to selenate. The study of mutants resistant to selenite, which do not express the membrane protein DedA, showed that the accumulation of selenium after exposure to selenite is decreased compared with the wild strain meaning probable link between the transport of selenite and the DedA protein. Finally, selenate would use the sulphate permease pathway for entering *C. metallidurans* CH34.

DISCIPLINES : Microbiologie, biochimie et spéciation

MOTS-CLES

Sélénite, séléniate, sélénium, réduction, spéciation, détoxification, assimilation, sélénométhionine, sulfate perméase, protéine DedA, *Cupriavidus metallidurans* CH34.

Groupe Toxicologie humaine et environnementale - Laboratoire Pierre Süe – UMR CEA/CNRS 9956 – CEA Saclay – 91191 Gif-sur-Yvette cedex – France