



**HAL**  
open science

# Etude biogéochimique du transfert du sélénium dans un système eau-plante-atmosphère : conséquences sur la physiologie du *Zea mays* subsp. *mays* (L.)

Melanie Longchamp

## ► To cite this version:

Melanie Longchamp. Etude biogéochimique du transfert du sélénium dans un système eau-plante-atmosphère : conséquences sur la physiologie du *Zea mays* subsp. *mays* (L.). Biodiversité et Ecologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66418 . tel-00833227

**HAL Id: tel-00833227**

**<https://theses.hal.science/tel-00833227>**

Submitted on 12 Jun 2013

**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.



Sujet de la thèse :

**Etude biogéochimique du transfert du sélénium dans un  
système eau-plante-atmosphère : conséquences sur la  
physiologie du *Zea mays* subsp. *mays* (L.)**

Soutenance prévue le 12 septembre 2012

devant le jury composé de :

Mr CHAILLOU Sylvain	Rapporteur	Professeur, INRA-AgroParisTech, Versailles
Mr GAUTHIER Arnaud	Rapporteur	Professeur, Université Lille1, Villeneuve d'Ascq
Mr MOUCHEL Jean-Marie	Examinateur	Professeur, Université Paris VI, Paris
Mr THIRY Yves	Examinateur	Chercheur, ANDRA, Châtenay-Malabry
Mr MARIOTTI André	Directeur de thèse	Professeur, Université Paris VI, Paris
M <sup>me</sup> ROUELLE Maryse	Encadrant	Maitre de Conférences, Université Paris VI, Paris
Mr ANGELI Nicolas	Invité	Ingénieur de Recherche, INRA, Nancy



## REMERCIEMENTS

Au terme de cette expérience, je tiens à remercier les personnes qui ont rendu possible l'élaboration de ce manuscrit.

J'adresse tout d'abord mes remerciements à Monsieur André MARIOTTI, directeur de thèse, de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail au sein du laboratoire de Biogéochimie et Ecologie des Milieux Continentaux (BioEMCo).

Je remercie sincèrement Madame Sylvie DERENNE de m'avoir accueillie dans son équipe Géochimie Organique et Minérale (GOME) et d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions.

Un grand merci à Madame Maryse CASTREC-ROUELLE pour son encadrement quotidien, ses nombreux et précieux conseils, sa disponibilité et ses encouragements prodigués tout le long de ces années.

Je suis très honorée que Monsieur Sylvain CHAILLOU, Monsieur Arnaud GAUTHIER, Monsieur Jean-Marie MOUCHEL, Monsieur Yves THIRY, Monsieur André MARIOTTI, Madame Maryse CASTREC-ROUELLE et Monsieur Nicolas ANGELI aient accepté d'être membres de mon jury et je tiens à leur exprimer ma reconnaissance pour l'attention qu'ils ont portés à mon travail.

Je souhaite également exprimer ma reconnaissance à Monsieur Nicolas ANGELI pour son encadrement non officiel mais bien réel. Ses conseils et ses critiques constructives m'ont permis de progresser dans de nombreux domaines. Sa « zénitude » et sa gentillesse ont rendu ces années d'autant plus agréables.

Je remercie chaleureusement Monsieur Arnaud GAUTHIER pour m'avoir intégré à son équipe Géochimie des milieux miniers et industriels (Pôle GEMIn' du Laboratoire Génie Civil et géo-Environnement (LGCgE) durant cette année, et c'est avec joie que je poursuis cette aventure l'année prochaine.

J'exprime mes sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué à ce travail :

- Monsieur Thierry BARIAC, Monsieur Philippe BIRON et Madame Patricia RICHARD pour leur accueil chaleureux au sein de leur équipe, pour la surveillance et au final l'obtention de beau plant de maïs ainsi que pour les analyses isotopiques
- Madame MICCHIELLI Marylène pour le temps passé ensemble sur l'ICP-OES
- Monsieur Emmanuel AUBRY et Madame Elisabeth PILLET-HUCHET pour les analyses effectuées

Je tiens à remercier tous les autres membres de l'équipe GOME :

- L'ensemble des collègues et maintenant amis avec qui j'ai partagé de nombreux moments de joies, de fous rires (dédicace au rire de Mathilde), de « Sugar Baby Love attitude » (il se reconnaîtra), de séances shopping (merci Jiji), de mots du jour, de café-coca-bière-papotages en fin de journée, de pauses bonbons, de découvertes culinaires et désaltérantes (plus ou moins réussies d'ailleurs), des soirées, journées barbecue et week-end dépaysants (dédicace à Coco et Clémentine et à la glace clown de bourgogne) ...
- Ma consœur de bureau, Priscillia, pour sa bonne (et parfois mauvaise) humeur avec qui je ne compte plus les moments d'angoisse, de colère, de frustrations, de dépression (« ça marche pas ☹ ») et bien sûr de joies, d'allégresse et de béatitude (« ça marche ☺ ») passés dans l'aquarium.
- « Madame Marie » et « Madame Katell », modèles spirituels pour nous pauvres thésards.
- A Béatrice, Joëlle et Christelle toujours présentes pour répondre aux questions de novices.

Merci enfin à ma famille, à Romain et ma belle-famille pour leur soutien et leurs encouragements durant toutes ces années.

## RESUME

Le sélénium est un antioxydant et un oligo-élément pour les animaux et les humains. Néanmoins, l'intervalle de concentration entre carence et toxicité est particulièrement étroit. Ce métalloïde allotropique est introduit indirectement dans la chaîne alimentaire via son accumulation dans les plantes alimentaires. La littérature sur ce sujet est encore restreinte et incomplète, s'effectuant traditionnellement sur des plantes modèles et en présence de fortes concentrations en sélénium. Cette thèse porte sur le transfert du sélénium dans une plante de grande culture, le *Zea mays*, et les conséquences de cette accumulation sur la physiologie de la plante à travers l'étude de l'accumulation des cations essentiels (calcium, magnésium, fer, zinc, manganèse, cuivre).

Pour cela, des expérimentations en milieu contrôlé (cultures en hydroponie) ont été réalisées pour obtenir un ensemble d'échantillons analysés ensuite par des techniques d'analyse adéquates et sensibles (HPLC, CRC-ICP-MS, ICP-OES ou SAA-GF). Diverses modalités influençant le transfert du sélénium dans la plante ont ainsi été étudiées : la concentration et la forme du sélénium source ainsi que le stade de développement de la plante. Les résultats de cette étude ont montré que l'absorption racinaire, la concentration au sein de la plante et de ces différents organes, le degré de métabolisation ainsi que celui de la volatilisation du sélénium, et par conséquent les apports en sélénium pour les populations animales et humaines, sont fortement influencés par les trois facteurs énoncés. De plus, cette étude a mis en évidence que l'accumulation et la distribution des cations au sein des plantes dépendent du sélénium - principalement à forte concentration. Ces effets peuvent être associés au déséquilibre du système de détoxification des espèces oxygénées réactives des cellules végétales, en cohérence avec le caractère ambivalent du sélénium évoqué dans la littérature : antioxydant ou pro-oxydant selon sa concentration.



## ABSTRACT

Selenium is an antioxidant and an oligo-element for animals and humans. However, the concentration range between deficiency and toxicity is particularly narrow. This metalloid allotropic is introduced indirectly in the food chain via its accumulation in food plants. The literature on this subject is still restricted and incompleted, and traditionally realised on model plants and in presence of selenium in high concentrations. This thesis is about selenium transfer in a plant crop, *Zea mays*, and consequences of this accumulation on physiological plant through essential cations accumulation study (calcium, magnesium, iron, zinc, manganese, copper).

For this, experiments in a controlled atmosphere chamber (hydroponic conditions) were performed to obtain samples then analyzed by appropriate analytical and sensitive techniques (HPLC, CRC-ICP-MS, ICP-OES or AAS-GF). Various factors influencing selenium transfer in plants have been studied: concentration and form of selenium source and stage of plant development. The results of this study showed that root absorption, concentration within the plants and their tissues, degree of selenium metabolization and volatilization, and therefore selenium intake in animals and humans, are strongly influenced by those three factors. Furthermore, this study showed that accumulation and distribution of cations within the plants depend on selenium -mainly at high concentrations. These effects may be associated with the system imbalance of reactive oxygen species detoxification in plant cells, consistent with the ambivalent nature of selenium mentioned in the literature: antioxidant or prooxidant depending on its concentration.





## SOMMAIRE

REMERCIEMENTS .....	i
RESUME/ABSTRACT.....	iii
SOMMAIRE .....	vii
Liste des figures .....	xv
Liste des tableaux .....	xviii
Liste des abréviations .....	xx
<b>CONTEXTE GENERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>3</b>
<b>1. GENERALITES SUR LE SELENIUM.....</b>	<b>5</b>
1.1. <u>Propriétés physico-chimiques du sélénium</u> .....	5
1.1.1. Présentation de cet élément atypique .....	5
1.1.2. Spéciation de sélénium dans l'environnement.....	6
1.2. <u>Cycle biogéochimique du sélénium dans l'environnement</u> .....	8
1.2.1. Sources naturelles et anthropiques du sélénium .....	8
1.2.1.1. Origines naturelles du sélénium .....	8
1.2.1.2. Apports anthropiques et utilisations du sélénium.....	9
1.2.2. Flux de sélénium entre les principaux compartiments du cycle .....	11
1.2.3. Le sélénium dans les eaux naturelles, les sols et l'atmosphère.....	13
1.2.3.1. Les eaux et les sols .....	13
1.2.3.2. L'atmosphère .....	15
1.3. <u>Le sélénium au sein du réseau trophique</u> .....	15
1.3.1. Des producteurs aux consommateurs.....	15
1.3.2. Le sélénium et la santé humaine .....	17
1.3.2.1. Les apports en sélénium .....	17
1.3.2.1.1. Les 3 voies d'absorption en sélénium : pulmonaire, cutanée et digestive .....	17
1.3.2.1.2. Les apports alimentaires en sélénium .....	19
1.3.2.1.3. Apports journaliers recommandés .....	20
1.3.2.2. Rôles physiologiques du sélénium .....	22

1.3.2.2.1. Etat physiologique et effets pharmacologiques .....	23
1.3.2.2.2. Réponses biologiques de l'organisme en cas de carence en sélénium .....	25
1.3.2.2.3. Réponses biologiques de l'organisme en cas d'excès en sélénium .....	26
1.3.3. Le sélénium chez les animaux .....	27
<b>2. LE SELENIUM CHEZ LES PLANTES SUPERIEURES .....</b>	<b>29</b>
2.1. <u>Sélénium : oligoélément essentiel pour les plantes ?</u> .....	30
2.2. <u>Classification des plantes</u> .....	30
2.3. <u>Métabolisme du sélénium chez les plantes supérieures</u> .....	31
2.3.1. Généralités .....	31
2.3.2. Effet sur la croissance .....	33
2.3.3. L'absorption racinaire .....	34
2.3.4. L'accumulation et la métabolisation .....	36
2.3.4.1. Accumulation dans la plante entière.....	36
2.3.4.2. Accumulation et distribution du sélénium dans les différents organes de la plante.....	36
2.3.4.3. Cinétiques d'accumulation dans différents organes de la plante en fonction de la concentration en sélénium .....	37
2.3.4.4. Processus de métabolisation du sélénium dans la plante.....	38
2.3.4.4.1. Les voies de métabolisation.....	38
2.3.4.4.2. Spéciation et taux de métabolisation du sélénium.....	39
2.3.4.4.3. Cas particuliers des plantes accumulatrices.....	41
2.3.5. Les grains et semences .....	43
2.3.6. Bilan sur le sélénium dans la plante supérieure .....	44
2.4. <u>Amélioration de la valeur nutritive des plantes vis-à-vis du sélénium</u> .....	45
2.5. <u>Le sélénium et la nutrition minérale de la plante</u> .....	46
2.5.1. Les cations majeurs .....	47
2.5.1.1. Le calcium .....	47
2.5.1.2. Le magnésium.....	48
2.5.2. Les oligoéléments : fer, zinc, manganèse et cuivre.....	49
2.5.2.1. Le fer.....	50
2.5.2.2. Le zinc .....	50

2.5.2.3. Le manganèse .....	51
2.5.2.4. Le cuivre .....	52
<b>3. LE MAÏS : UNE PLANTE AGRO-ALIMENTAIRE .....</b>	<b>52</b>
3.1. <u>Ecophysiologie du maïs</u> .....	52
3.1.1. Morphologie d'un plant de maïs et structure des différents organes .....	52
3.1.1.1. Morphologie générale .....	52
3.1.1.2. Tissus caractérisant les différents organes végétatifs .....	54
3.1.1.3. Conséquences d'un métabolisme en C4 sur le cycle du soufre .....	54
3.1.1.4. Composition des grains de maïs .....	55
3.1.2. Cycle du développement de la plante de <i>Zea mays</i> .....	55
3.1.2.1. Les différentes phases du cycle .....	55
3.1.2.2. Cinétiques d'accumulation en fonction des phases de développement .....	57
3.2. <u>Utilisation du maïs dans la filière agro-alimentaire et industrielle</u> .....	59
3.2.1. Production mondiale et nationale du maïs .....	59
3.2.2. Utilisation agro-alimentaire et industrielle .....	59
3.2.2.1. Alimentation animale .....	59
3.2.2.2. Alimentation humaine .....	60
3.2.2.3. Utilisation industrielle .....	60
<b>4. OBJECTIFS DE L'ETUDE .....</b>	<b>61</b>
4.1. <u>Conclusion de l'étude bibliographique</u> .....	61
4.2. <u>Problématiques, démarche expérimentale mise en œuvre et organisation du manuscrit</u> .....	62
 <b>CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>65</b>
<b>1. INSTRUMENTATION ET TECHNIQUES D'ANALYSE UTILISES .....</b>	<b>67</b>
1.1. <u>Méthodes de dosage élémentaire</u> .....	67
1.1.1. Plasma d'argon .....	67
1.1.2. Détection optique : spectrométrie d'émission optique à plasma d'argon induit (ICP-OES, JY 2000) : dosage du calcium, magnésium, fer, zinc, cuivre, manganèse et sélénium .....	68
1.1.2.1. Principe de l'absorption et émission atomique .....	68
1.1.2.2. Spécificités de l'ICP-OES (JY 2000) et mise au point .....	69

1.1.3. Détection de masse : spectrométrie de masse couplée à un plasma à induction et une cellule de réaction/collision (CRC-ICP-MS, Thermo X Series II) .....	70
1.1.3.1. Principe de l'ICP-MS .....	70
1.1.3.2. Spécificités de l'ICP-MS et mise au point du protocole .....	71
1.2. <u>Méthodes de dosage moléculaire basées sur la séparation des composés</u> .....	73
1.2.1. Principe de la chromatographie ionique.....	73
1.2.2. Séparation et dosage des anions .....	73
1.2.3. Séparation et dosage des formes inorganiques du sélénium : séléniate et sélénite .....	74
1.2.3.1. Séparation des formes inorganiques de sélénium.....	74
1.2.3.2. Dosage des fractions inorganiques du sélénium : spectrométrie d'absorption atomique avec four graphique (SAA-GF, UNICAM 989 QZ) ...	74
<b>2. CULTURE DU MAÏS</b> .....	76
2.1. <u>Culture en hydroponie</u> .....	76
2.1.1. Solution d'Hoagland modifié.....	76
2.1.2. Expériences réalisées .....	77
2.2. <u>Chambres de culture</u> .....	79
2.2.1. RUBIC I (Laboratoire BioEMCo, équipe « Impact des changements globaux sur les transferts H <sub>2</sub> O, CO <sub>2</sub> , solutés et particulaires »).....	79
2.2.1.1. Conditions de culture.....	79
2.2.1.2. Bilan de flux .....	80
2.2.1.2.1. Bilan en eau .....	80
2.2.1.2.2. Bilan en sélénium : volatilisation.....	81
2.2.2. Chambre de culture (CDC) à Jussieu (Laboratoire BioEMCo, équipe GOME)..	82
2.2.3. RUBIC V (Laboratoire BioEMCo, équipe « Impact des changements globaux sur les transferts H <sub>2</sub> O, CO <sub>2</sub> , solutés et particulaires »).....	83
2.3. <u>Production de biomasse</u> .....	83
2.3.1. Stade de développement.....	83
2.3.2. Surface foliaire .....	84
2.3.3. Biomasse fraîche et sèche .....	84
<b>3. PRE-TRAITEMENTS DES ECHANTILLONS</b> .....	85
3.1. <u>Minéralisation par voie humide en milieu fermé</u> .....	85

3.2. <u>Mise au point d'une méthode d'extraction conservant la spéciation du sélénium dans un échantillon : extraction enzymatique</u> .....	86
3.2.1. Introduction .....	86
3.2.2. Experimental .....	88
3.2.2.1. Materials and reagents .....	88
3.2.2.2. Samples .....	88
3.2.2.3. Procedures .....	88
3.2.3. Results and discussion .....	89
3.2.3.1. Certified reference material .....	89
3.2.3.2. <i>Zea mays</i> samples .....	90
<b>4. TEST STATISTIQUES UTILISES</b> .....	92
<b>CHAPITRE 3 : TRANSFERT, ACCUMULATION ET SPECIATION DU SELENIUM CHEZ LE ZEA MAYS</b> .....	93
<b><i>PARTIE A : CULTURES DES PLANTS DE ZEA MAYS JUSQU'AU STADE GENERATIF</i></b> .....	95
<b>1. EXPERIENCES A FAIBLES CONCENTRATIONS (10 et 50 µg/L) EN SELENIUM</b> .....	95
1.1. Results .....	95
1.1.1. Biomass production and tolerance toward selenium .....	95
1.1.2. Comparison of selenite and selenate uptake and accumulation in <i>Zea mays</i> ...	97
1.1.3. Interaction between selenate and selenite .....	102
1.2. <u>Discussion</u> .....	103
1.2.1. Metabolic pathways of selenium in <i>Zea mays</i> .....	103
1.2.2. Interactions between selenite and selenate in <i>Zea mays</i> .....	105
1.2.3. Selenium diet .....	105
1.3. <u>Conclusion</u> .....	106
<b>2. EXPERIENCES A FORTE CONCENTRATION (1000 µg/L) EN SELENIUM</b> ..	107
2.1. <u>Résultats</u> .....	107
2.1.1. Production de biomasse et tolérance envers le sélénium .....	107
2.1.2. Absorption et accumulation du séléniate et sélénite dans le <i>Zea mays</i> : effet de la forme du sélénium inorganique .....	109

2.1.3. Interaction entre séléniate et sélénite .....	113
2.2. <u>Discussions</u> .....	113
2.2.1. Effet sur la croissance .....	114
2.2.2. Métabolisme du séléniate et sélénite.....	114
2.2.3. Interaction entre les deux formes inorganiques de sélénium .....	116
<b>3. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SELENIUM SUR SON</b>	
<b>METABOLISME AU STADE GENERATIF DU ZEA MAYS : CONCLUSIONS...</b>	116
3.1. <u>Métabolisme du séléniate et du sélénite</u> .....	116
3.2. <u>Interaction séléniate/sélénite</u> .....	119
<b><i>PARTIE B : CULTURES DES PLANTS DE ZEA MAYS JUSQU'AU STADE</i></b>	
<b><i>REPRODUCTEUR : OBTENTION DE GRAINS MATURES</i></b> ..... 121	
<b>1. EXPERIENCES A FORTE CONCENTRATION (1000 µg/L) EN SELENIUM ..</b> 121	
1.1. <u>Results</u> .....	121
1.1.1. Biomass production.....	121
1.1.2. Uptake and accumulation of selenium total in <i>Zea mays</i> .....	123
1.1.3. Se species in <i>Zea mays</i> .....	126
1.2. <u>Discussion</u> .....	127
1.2.1. Crop growth of <i>Zea mays</i> .....	127
1.2.2. Uptake, accumulation and speciation of selenium in <i>Zea mays</i> .....	128
1.2.3. Enrichment of <i>Zea mays</i> en selenium to humans and livestock food .....	130
<b>2. INFLUENCE STADE DE DEVELOPPEMENT DU ZEA MAYS SUR</b>	
<b>L'ACCUMULATION DU SELENIUM : CONCLUSIONS</b> ..... 132	
2.1. <u>Séléniate</u> .....	132
2.2. <u>Sélénite</u> .....	133
<b><i>PARTIE C : LE METABOLISME DU SELENIUM CHEZ LE ZEA MAYS :</i></b>	
<b><i>CONCLUSION GENERALE</i></b> .....	
	136
<b>1. ZEA MAYS AU STADE GENERATIF</b> .....	
	136
<b>2. ZEA MAYS AU STADE REPRODUCTEUR : GRAINS MATURES</b> .....	
	138
<b>CHAPITRE 4 : LE SELENIUM INFLUENCE-T-IL L'ACCUMULATION DE</b>	
<b>CATIONS ESSENTIELS A LA PLANTE ?</b> .....	
	141

<b>1. EFFET DU SELENIUM SUR LE CALCIUM .....</b>	<b>143</b>
1.1. <u>Résultats</u> .....	143
1.1.1. Expérimentations au stade génératif .....	143
1.1.1.1. Effet du séléniate ou du sélénite .....	144
1.1.1.2. Effet d'un mélange séléniate/sélénite .....	146
1.1.2. Expérimentations au stade reproducteur .....	146
1.1.2.1. Effet du séléniate ou du sélénite .....	146
1.1.2.2. Comparaison stade génératif/stade reproducteur.....	148
1.2. <u>Discussion</u> .....	148
<b>2. EFFET DU SELENIUM SUR LE MAGNESIUM .....</b>	<b>150</b>
2.1. <u>Résultats</u> .....	150
2.1.1. Expérimentations au stade génératif .....	150
2.1.1.1. Effet du séléniate ou du sélénite .....	150
2.1.1.2. Effet d'un mélange séléniate/sélénite .....	154
2.1.2. Expérimentations au stade reproducteur .....	154
2.1.2.1. Effet du séléniate ou du sélénite .....	154
2.1.2.2. Comparaison stade génératif/stade reproducteur.....	155
2.2. <u>Discussion</u> .....	156
<b>3. EFFET DU SELENIUM SUR LE FER .....</b>	<b>158</b>
3.1. <u>Résultats</u> .....	158
3.1.1. Expérimentations au stade génératif .....	158
3.1.1.1. Effet du séléniate ou du sélénite .....	158
3.1.1.2. Effet d'un mélange séléniate/sélénite .....	161
3.1.2. Expérimentations au stade reproducteur .....	162
3.1.2.1. Effet du séléniate ou du sélénite .....	162
3.1.2.2. Comparaison stade génératif/stade reproducteur.....	163
3.2. <u>Discussion</u> .....	163
<b>4. EFFET DU SELENIUM SUR LE ZINC .....</b>	<b>164</b>
4.1. <u>Résultats</u> .....	164
4.1.1. Expérimentations au stade génératif .....	164
4.1.1.1. Effet du séléniate ou du sélénite .....	164
4.1.1.2. Effet d'un mélange séléniate/sélénite .....	167
4.1.2. Expérimentations au stade reproducteur .....	168



4.1.2.1. Effet du séléniate ou du sélénite .....	168
4.1.2.2. Comparaison stade génératif/stade reproducteur.....	169
4.2. <u>Discussion</u> .....	169
<b>5. EFFET DU SELENIUM SUR LE MANGANESE</b> .....	171
5.1. <u>Résultats</u> .....	171
5.1.1. Expérimentations au stade génératif .....	171
5.1.1.1. Effet du séléniate ou du sélénite .....	171
5.1.1.2. Effet d'un mélange séléniate/sélénite .....	174
5.1.2. Expérimentations au stade reproducteur .....	174
5.1.2.1. Effet du séléniate ou du sélénite .....	174
5.1.2.2. Comparaison stade génératif/stade reproducteur.....	176
5.2. <u>Discussion</u> .....	176
<b>6. EFFET DU SELENIUM SUR LE CUIVRE</b> .....	178
6.1. <u>Résultats</u> .....	178
6.1.1. Expérimentations au stade génératif .....	178
6.1.1.1. Effet du séléniate ou du sélénite .....	178
6.1.1.2. Effet d'un mélange séléniate/sélénite .....	181
6.1.2. Expérimentations au stade reproducteur .....	181
6.1.2.1. Effet du séléniate ou du sélénite .....	181
6.1.2.2. Comparaison stade génératif/stade reproducteur.....	182
6.2. <u>Discussion</u> .....	183
<b>7. INFLUENCE DU SELENIUM SUR L'ACCUMULATION DE CATIONS ESSENTIELS A LA PLANTE : CONCLUSIONS</b> .....	184
<b>CONCLUSION GENERALE DE L'ETUDE</b> .....	189
<b>1. SYNTHESE</b> .....	189
<b>2. PERSPECTIVES</b> .....	191
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	195
<b>ANNEXE 1</b> .....	205

## Liste des figures

**Figure 1.0.** Concentrations maximales ( $\mu\text{g/L}$ ) en sélénium dans les points d'eau souterraine du bassin de Paris et concentrations inférieures à une limite de quantification sur la période 1990-2008 pour les eaux de tous les réseaux de surveillance sauf celui des installations classées (Gourcy et al. 2009)

**Figure 1.1.** Tableau de Mendeleïev

**Figure 1.2.** Evolution de la quantité de sélénium utilisé (en tonnes) dans les différents secteurs entre 1975 et 2003 (U.S. Geological Survey 2005)

**Figure 1.3.** Répartition de sélénium utilisé (%) dans les différents secteurs en 2009 (George 2010)

**Figure 1.4.** Cycle global du sélénium entre les compartiments principaux (stocks de sélénium en T, en rouge) ainsi que les flux associés (en T/an, en violet), modifié d'après Haygarth (1994) et Nriagu (1989)

**Figure 1.5.** Variation de la spéciation du sélénium dans les eaux et les sols en fonction du pH, des conditions redox et des principaux composés minéraux et organiques (Fordyce 2005)

**Figure 1.6.** Processus et flux du sélénium au sein du système sol-plante-atmosphère, modifié d'après Rayman *et al.* (2008) et Théron *et al.* (1997)

**Figure 1.7.** Apports réels en sélénium ( $\mu\text{g/j/personne}$ ) en fonction des différents pays. (Zone encadrée : apports journaliers recommandés pour des adultes)(Rayman 2005)

**Figure 1.8.** Réponses physiologiques en fonction de la concentration en oligoéléments (Simonoff and Simonoff 1991)

**Figure 1.9.** Réactions de réduction du peroxyde d'hydrogène par le glutathion

**Figure 1.10.** Photos des patients atteints de la maladie de Kechan-Bech : (A) déformations des mains et (B) patiente atteinte versus non-atteinte (Tan 1989)

**Figure 1.11.** (A) Mouton atteint de la maladie du muscle blanc et (B) les conséquences sur la morphologie des muscles

**Figure 1.12.** Effets d'une intoxication en sélénium sur (A) les fœtus des oiseaux (Presser and Ohlendorf 1987) et (B) les sabots des équidés (photo témoin en haut)

**Figure 1.13.** Transformations métaboliques du sélénium dans une plante supérieure

**Figure 1.14.** Voies métaboliques du sélénium (versus soufre) dans les plantes supérieures. Schéma modifié d'après Hawkesford and Zhao (2007), Sors *et al.* (2005b) et Terry *et al.* (2000). Abréviations page xx

**Figure 1.15.** Morphologie aérienne d'un plant de *Zea mays* en fin de croissance. Figure modifiée d'après Cauderon (2012)

**Figure 1.16.** Les différentes phases du développement d'un plant de maïs. Figure modifiée d'après Cauderon (2012)

**Figure 1.17.** Formule de la somme de degré-jours ( $S_{DJ}$ ) (Tollenaar et al. 1979)

**Figure 1.18.** Vitesse d'accumulation du soufre ( $\text{kg/ha/jour}$ ) dans le maïs pendant l'ensemble du cycle de croissance (Karlen et al. 1988)

**Figure 1.19.** Vitesse d'accumulation du (A) magnésium ( $\text{kg/ha/jour}$ ) et du (B) fer dans le maïs pendant l'ensemble du cycle de croissance (Karlen et al. 1988)

**Figure 1.20.** Les fourrages destinés à l'alimentation animale produits annuellement en France (Association Générale des Producteurs de Maïs 2012)

**Figure 1.21.** Consommation moyenne d'aliments issus du maïs par habitant (Perrier Brusle 2010)

**Figure 2.1.** Processus intervenant dans un plasma d'argon à haute température

**Figure 2.2.** Interaction matière et rayonnement : variation des niveaux d'énergie des électrons externes d'un atome

**Figure 2.3.** Schéma général de l'appareillage de l'ICP-MS

**Figure 2.4.** Exemple de collision entre un dipôle Ar-Ar<sup>+</sup> et d'Hélium (gaz de la CRC)

**Figure 2.5.** Loi de Beer Lambert

**Figure 2.6.** Photos et description de la chambre RUBIC I (ouverte pour la prise de la photo)

**Figure 2.7.** Evolution de la signature isotopique de  $\delta^{18}\text{O-H}_2\text{O}$  des solutions nutritives

**Figure 2.8.** Quantité en sélénium dans les différents compartiments dans le système solution nutritive-plante-atmosphère (RUBIC I)

**Figure 2.9.** Formule de la surface foliaire d'un plant de *Zea mays*

**Figure 2.10.** Description détaillée du protocole de minéralisation des échantillons de plantes

**Figure 2.11.** Concentrations cibles (en plein) et mesurées (en traits diagonaux) des différents éléments dans les échantillons de référence : INRA V463 (blanc) et BCR 402 (en gris)

**Figure 2.12.** Efficiency (%) of different extraction in certified reference material, BCR 402

**Figure 2.13.** Efficiency (%) of protease hydrolysis on different maize tissues treated with selenate or selenite

**Figure 3.A.1.** Increase in leaf area (in cm<sup>2</sup>) of the maize plants in the 7 different treatments. A: Selenate/control treatment; B: Selenite/control treatment; C: Mix/control treatment. Values are average  $\pm$  SD

**Figure 3.A.2.** Dry biomass production (in g) of maize plants in the 7 different treatments

**Figure 3.A.3.** Selenium concentrations (in  $\mu\text{g/g DW}$ ) in whole maize plants in 6 different treatments (excluding controls):

**Figure 3.A.4.** Selenium concentrations (in  $\mu\text{g/g DW}$ ) in roots, stems or leaves of maize plants in 6 different treatments (excluding controls)

**Figure 3.A.5.** Selenium amount (in  $\mu\text{g}$ ) in roots, stems or leaves of maize plants in 6 different treatments (excluding controls)

**Figure 3.A.6.** Accumulation kinetics of selenium by roots or leaves of *Zea mays* plants in concentration sequence in 6 different treatments (excluding controls)

**Figure 3.A.7.** Evolution de la surface foliaire (cm<sup>2</sup>) des plants de maïs pour les 4 traitements

**Figure 3.A.8.** Production de biomasse sèche (%) dans les 10 traitements différents

**Figure 3.A.9.** Concentrations en sélénium ( $\mu\text{g/g MS}$ ) dans les plantes entières pour 9 traitements (excluant les traitements contrôles)

**Figure 3.A.10.** Concentrations en sélénium ( $\mu\text{g/g}$ ) dans les racines (A), les tiges (B) et les feuilles (C) dans les 9 traitements (excluant les traitements contrôles)

**Figure 3.A.11.** Répartition de la quantité de sélénium ( $\mu\text{g}$ ) dans la plante pour les 9 traitements (excluant les traitements contrôles)

**Figure 3.A.12.** Taux d'enrichissement en sélénium en fonction de la concentration en sélénium source dans les racines et les parties aériennes

**Figure 3.B.1.** Leaf area (in cm<sup>2</sup>) evolution (A) and length of each internodes (in cm) (B) of maize plants in the 3 different treatments

**Figure 3.B.2.** Dry biomass production (in g) of maize plants or of grains and number of grains by plant in the 3 different treatments

**Figure 3.B.3.** Selenium concentration (in  $\mu\text{g/g DW}$ ) in whole maize plant or in different tissues of maize plants in the 2 different treatments (roots, stems, leaves and grains)

**Figure 3.B.4.** Selenium amount (in  $\mu\text{g}$ ) in roots, stems, leaves and grain of maize plants in the 2 different treatments

**Figure 3.B.5.** Concentration en sélénium dans la plantes entières, les racines et les parties aériennes chez des plantes de 6 et de 14 semaines cultivées en présence de 1000  $\mu\text{g/L}$  de séléniat (en bleu) ou de sélénite (en rouge)

**Figure 3.C.1.** Métabolisme du sélénium chez le *Zea mays* au stade génératif en présence d'une faible concentration de sélénium source

**Schéma 3.C.2.** Métabolisme du sélénium chez le *Zea mays* au stade génératif en présence d'une forte concentration de sélénium source

**Schéma 3.C.3.** Métabolisme du sélénium chez le *Zea mays* au stade mature en présence d'une forte concentration de sélénium source

**Figure 4.1.** Accumulation du calcium (en %) dans la plante entière en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante

**Figure 4.2.** Accumulation du calcium (en %) dans les racines (A) ou les parties aériennes végétatives (B) en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante

**Figure 4.3.** Accumulation du calcium (en %) dans les grains en fonction de la forme du sélénium

**Figure 4.4.** Accumulation du magnésium (en %) dans la plante entière en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante

**Figure 4.5.** Accumulation du magnésium (en %) dans les racines (A) ou les parties aériennes végétatives (B) en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante

**Figure 4.6.** Accumulation du magnésium (en %) dans les grains en fonction de la forme de sélénium

**Figure 4.7.** Accumulation du fer (en %) dans la plante entière en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante

**Figure 4.8.** Accumulation du fer (en %) dans les racines (A) ou les parties aériennes végétatives (B) en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante

**Figure 4.9.** Accumulation du fer (en %) dans les grains en fonction de la forme du sélénium

**Figure 4.10.** Accumulation du zinc (en %) dans la plante entière en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante

**Figure 4.11.** Accumulation du zinc (en %) dans les racines (A) ou les parties aériennes végétatives (B) en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante

**Figure 4.12.** Accumulation du zinc (en %) dans les grains en fonction de la forme de sélénium

**Figure 4.13.** Accumulation du manganèse (en %) dans la plante entière en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante

**Figure 4.14.** Accumulation du manganèse (en %) dans les racines (A) ou les parties aériennes végétatives (B) en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante

**Figure 4.15.** Accumulation du manganèse (en %) dans les grains en fonction de la forme du sélénium

**Figure 4.16.** Accumulation du cuivre (en %) dans la plante entière en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante

**Figure 4.17.** Accumulation du cuivre (en %) dans les racines (A) ou les parties aériennes végétatives (B) en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante

**Figure 4.18.** Accumulation du cuivre (en %) dans les grains en fonction de la forme du sélénium

**Figure 4.19.** Processus de production d'espèces oxygénées réactives et systèmes de détoxification : importance des micronutriments et du sélénium

## Liste des tableaux

**Tableau 1.1.** Formes les plus communes de sélénium dans l'environnement (Ducros and Favier 2004, Ellis and Salt 2003, Fordyce 2005, Haygarth 1994, Rayman et al. 2008)

**Tableau 1.2.** Principaux minéraux et roches constitués de sélénium. Tableau modifié d'après Fordyce (2005) et Plant *et al.* (2003)

**Tableau 1.3.** Concentrations d'aliments selon leurs origines géographiques, d'après les données citées dans Combs (2001), Fordyce (2005), Kabata-Pendias and Pendias (2001), Pappa *et al.* (2006) et Rayman *et al.* (2008)

**Tableau 1.4.** Concentrations et spéciation du sélénium en fonction des différents groupes d'aliments, d'après les données citées dans FAO and WHO (2002), Fordyce (2005), Pappa *et al.* (2006), Rayman (2008) et Rayman *et al.* (2008)

**Tableau 1.5.** Principales sélénoprotéines dans l'organisme humain et leurs fonctions, synthèse à partir de Ducros and Favier (2004), Fordyce (2005), Navarro-Alarcon and Cabrera-Vique (2008) et Rayman (2000)

**Tableau 2.1.** Caractéristiques des méthodes de dosages des éléments à l'ICP-OES

**Tableau 2.2.** Abondance des isotopes stables du sélénium et leurs interférences isobariques ou polyatomiques avec d'autres éléments ou d'espèces polyatomiques

**Tableau 2.3.** Caractéristiques des paramètres de l'HPLC utilisés pour le dosage des anions

**Tableau 2.4.** Caractéristiques des paramètres utilisés pour la séparation des formes inorganiques de sélénium

**Tableau 2.5.** Caractéristique des paramètres de la méthode mise au point pour le dosage du sélénium par SAA-GF

**Tableau 2.6.** Caractéristiques du programme électrothermique mis au point pour le dosage du sélénium par SAA-GF

**Tableau 2.7.** Composition de la solution nutritive d'Hoagland modifiée utilisée pour l'ensemble des expérimentations

**Tableau 2.8.** Présentation des différentes modalités testées

**Table 3.A.1.** Translocation factor (concentration ratio of shoots to roots) according to concentrations and forms of selenium in the nutrient solution

**Tableau 3.A.2.** Production de la biomasse sèche (en %) des 3 organes (racines, tiges, feuilles) des plants de maïs dans les 4 traitements

**Tableau 3.A.3.** Taux d'enrichissement des plantes entières en fonction de la concentration de sélénium dans la solution nutritive

**Table 3.B.1.** Translocation factor 'roots-tops' (concentration ratio in tops to roots) and 'shoots-grains' (concentration ratio in shoots to grains) according to selenium forms in the nutrient solution

**Table 3.B.2.** Selenium species in maize after enzyme hydrolysis

**Table 3.B.3.** Species of selenium and Se bioavailable for animals in different tissues of plant in two selenium treatment (selenate and selenite)

**Tableau 4.1.** Facteurs de translocation « racines/parties aériennes » (FT « R/PA ») du calcium en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante

**Tableau 4.2.** Facteurs de translocation « racines/parties aériennes » (FT « R/PA ») et « parties aériennes végétatives/grains » (FT « PAV/G ») du calcium en fonction de la forme du sélénium source

**Tableau 4.3.** Facteurs de translocation « racines/parties aériennes » (FT « R/PA ») du magnésium en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante

**Tableau 4.4.** Facteurs de translocation « racines/parties aériennes » (FT « R/PA ») et « parties aériennes végétatives/grains » (FT « PAV/G ») du magnésium en fonction de la forme du sélénium source

**Tableau 4.5.** Facteurs de translocation « racines/parties aériennes » (FT « R/PA ») du fer en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante

**Tableau 4.6.** Facteurs de translocation « racines/parties aériennes » (FT « R/PA ») et « parties aériennes végétatives/grains » (FT « PAV/G ») du fer en fonction de la forme du sélénium source

**Tableau 4.7.** Facteurs de translocation « racines/parties aériennes » (FT « R/PA ») de zinc en fonction de la concentration de sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante

**Tableau 4.8.** Facteurs de translocation « racines/parties aériennes » (FT « R/PA ») et « parties aériennes végétatives/grains » (FT « PAV/G ») du zinc en fonction de la forme du sélénium source

**Tableau 4.9.** Facteurs de translocation « racines/parties aériennes » (FT « R/PA ») du manganèse en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante

**Tableau 4.10.** Facteurs de translocation « racines/parties aériennes » (FT « R/PA ») et « parties aériennes végétatives/grains » (FT « PAV/G ») du manganèse en fonction de la forme du sélénium source

**Tableau 4.11.** Facteurs de translocation « racines/parties aériennes » (FT « R/PA ») du cuivre en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante

**Tableau 4.12.** Facteurs de translocation « racines/parties aériennes » (FT « R/PA ») et « parties aériennes végétatives/grains » (FT « PAV/G ») du cuivre en fonction de la forme du sélénium source

## Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique	HomoCys : homocystéine
ADP : adénosine diphosphate	HPLC : chromatographie liquide à haute performance
APR : adénosine phosphosulfate réductase	ICP-OES : spectrométrie d'émission optique à plasma d'argon induit
APS : adénosine phosphosulfate	Km : constant de Mickaelis
APSe : adénosine phosphoséléniat	LDD : limite de détection
Ar : argon	LDQ : limite de quantification
ARNm : acide ribonucléique messenger	LOD : limit of detection
ARNt : acide ribonucléique de transfert	MeCys : méthylcystéine
ATP : adenosine triphosphate	Met : méthionine
ATPS : adenosine tri-phosphate sulfuryase	MetSO : méthionine sulfoxyde
Ca : calcium	Mg : magnésium
CCCP : carbonyle cyanide 3-chlorophenylhydrazone	Mn : manganèse
CDC: chamber de culture	MS : matière sèche
CGF : cellule de la gaine foliaire	MT : métalloprotéine
CM : cellule du mésophylle	NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
CRC-ICP-MS : spectrométrie de masse couplée à un plasma à induction et une cellule de réaction/collision	OMS : organisation mondiale de la santé
Cu : cuivre	PA : partie aérienne
Cys : cystéine	PAV : partie aérienne végétative
Cysth : cystathionine	PE : plante entière
DMDS : disulfure de diméthyle	Pyr-IRMS :
DMDS <sub>Se</sub> : dimethylseleniure	Q1 : 1 <sup>er</sup> quartile
DMS : sulfure de diméthyle	Q3 : 3 <sup>ème</sup> quartile
DMS <sub>Se</sub> : dimethydiseleniure	S : soufre
DW : dry weight	SAA-GF : spectrométrie d'absorption atomique avec four graphite
FAO : food and agriculture organization of the united nation	SD : standard deviation
Fd <sub>ox</sub> : ferredoxine oxydée	Se : sélénium
Fd <sub>red</sub> : ferredoxine réduite	SeCys : sélénocystéine
Fe : Fer	SeCysth : sélénocystathionine
FeEDDHA : Iron- Ethylenediaminedi-Q-hydroxyphenlyacetic acid	SeHomoCys : sélénohomocystéine
GGMeCys : $\gamma$ -glutamyle-méthylcystéine	SeMeSeCys : Se-methylsélénocystéine
GGSeMeSeCys : $\gamma$ -glutamyle-selenomethylselenocystéine	SeMet : sélénométhionine
GPx : glutathione peroxydase	SG : stade génératif
GSH: glutathion	SOD : superoxide dismutase
GSSeSG : diglutathion	SR: stade reproducteur
GSSG : glutathione oxydé	TMSe <sup>+</sup> : Trimethylselenium
H : hydrogène	TV : valeur théorique
He : helium	VIH : virus de l'immunodéficiency humaine
	Zn : zinc







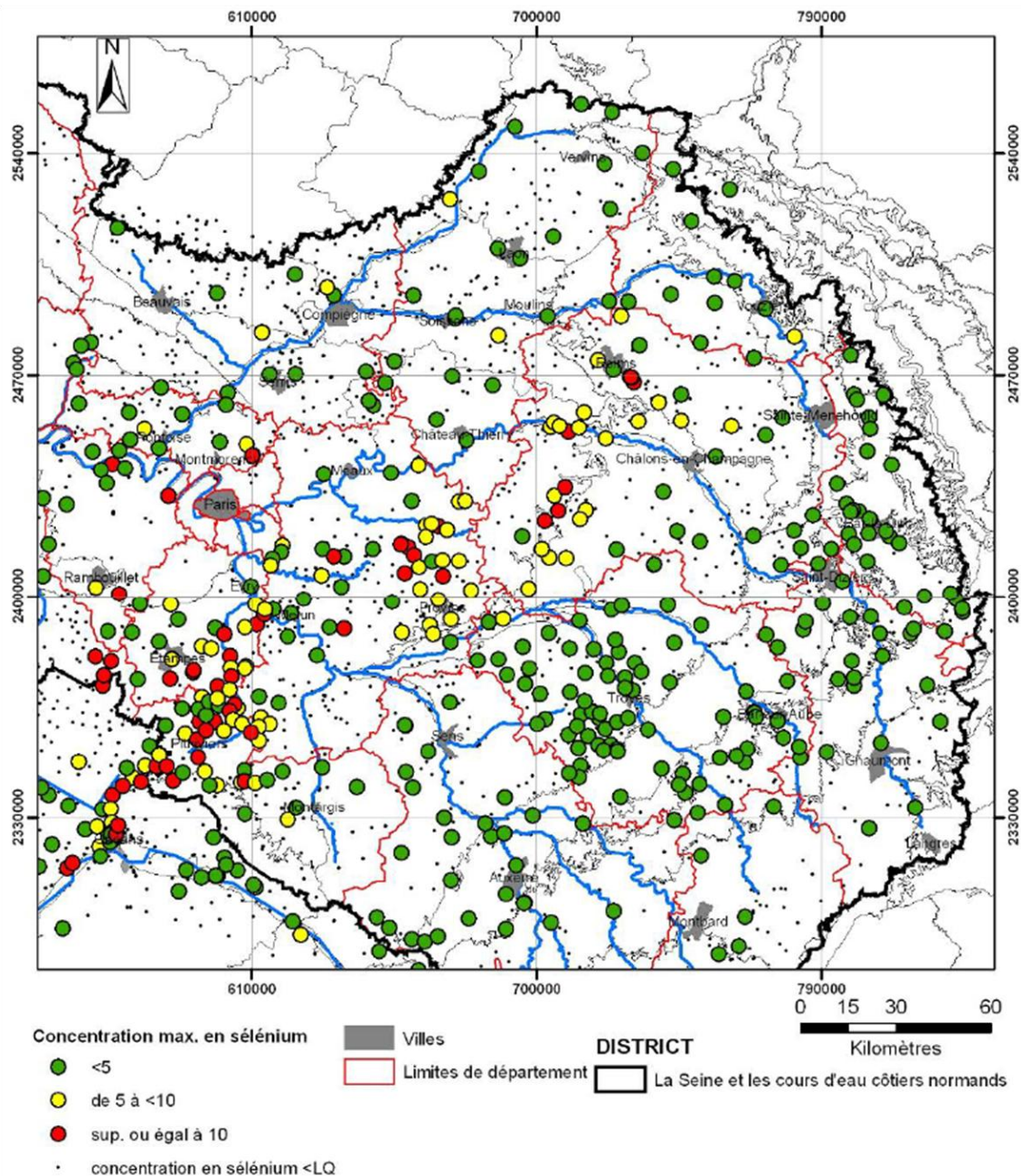
## CONTEXTE GENERAL DE L'ETUDE

Le sélénium est reconnu en tant qu'élément essentiel au métabolisme humain : il a un rôle d'antioxydant biologique très actif via un nombre important de protéines. Le sélénium est par ailleurs un élément ambivalent : carence et toxicité existant dans un intervalle de concentration particulièrement étroit. Contrairement à certaines régions naturellement riches en sélénium (en Chine, aux USA par exemples), les sols européens sont plutôt pauvres (Plant et al. 2003) et de ce fait les plantes s'y développant accumulent peu de sélénium. Or, les plantes de grandes cultures telles que les céréales sont une source essentielle de sélénium chez les animaux et les hommes. Ainsi dans les régions pauvres en sélénium, la ration journalière apportée par le bol alimentaire n'atteint pas la valeur optimale de 55 µg/j (Institute of medicine and Panel on dietary antioxidants and related compounds 2000, Kabata-Pendias and Mukherjee 2007, World Health Organization et al. 1996).

Les déficits et les carences font partie des préoccupations actuelles en santé humaine. L'évolution des pratiques agricoles, l'importation de matières premières plus riches en sélénium et l'utilisation plus directe de suppléments alimentaires comptent parmi les principales stratégies utilisées pour tenter de combler ce déficit. De nombreuses études portent de ce fait sur l'enrichissement en sélénium des producteurs primaires ou des organismes hétérotrophes via des fertilisants ou suppléments alimentaires. Le projet scientifique présenté ici a pour objectif d'analyser le transfert du sélénium dans une plante largement utilisée dans l'alimentation mondiale (animale et humaine) : le maïs. Ce transfert dépend de plusieurs facteurs qui seront étudiés : la concentration et la forme du sélénium source (la bio-assimilation et la toxicité de cet élément dépendent de sa concentration et sa spéciation) ainsi que le stade de développement de la plante.

Cette approche est d'autant plus importante qu'actuellement en France (principal producteur européen de maïs), la pression anthropique sur les nappes d'eaux est telle que les concentrations en sélénium dans quelques départements sont en augmentation. Les captages d'eau souterraine ayant une concentration en sélénium dépassant la norme d'eau potable, soit 10 µg/L (Fig 1.0), existent dans plusieurs départements notamment le Loiret, l'Eure-et-Loir, la Seine-et-Marne, l'Essonne, le Val d'Oise et la Marne (Chery 2006, Chery and Castrec-Rouelle 2004, Gourcy et al. 2009). Une origine avancée expliquant cette augmentation est l'oxydation de sulfures, riches en sélénium, principalement aux zones de battements des nappes (Vernoux et al. 1998). De ce fait, l'augmentation du sélénium dans les eaux de

captages de ces départements est un problème vis-à-vis du respect de la norme d'eau potable. Cette eau intervient directement sur le bol alimentaire (eau potable) et indirectement sur l'utilisation agricole (eau d'irrigation) : **cette augmentation serait néanmoins une bonne opportunité d'enrichir la teneur en sélénium dans les cultures en France, sachant que nos apports alimentaires sont légèrement inférieurs à ceux recommandés, soit 47  $\mu\text{g}/\text{j}$  en France.**



**Figure 1.0.** Concentrations maximales ( $\mu\text{g}/\text{L}$ ) en sélénium dans les points d'eau souterraine du bassin de Paris et concentrations inférieures à une limite de quantification sur la période 1990-2008 pour les eaux de tous les réseaux de surveillance sauf celui des installations classées (Gourcy et al. 2009)

# **CHAPITRE 1 :**

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**



# 1. GENERALITES SUR LE SELENIUM

## 1.1. Propriétés physico-chimiques du sélénium

### 1.1.1. Présentation de cet élément atypique

Le sélénium (Se) a été découvert en 1817 par les chimistes suédois Berzélius et Gahn lors de la préparation d'acide sulfurique à partir d'un minerai soufré, la pyrite. A partir du dépôt de couleur brune/rougeâtre, les scientifiques pensaient avoir isolé du tellure (du mot latin « *tellus* », la terre). Cependant, des études complémentaires leur ont permis de découvrir qu'il s'agissait en fait d'un nouvel élément qu'ils nommèrent alors « sélénium » du mot grec « *selhum* », la lune en opposition à la terre.

Cet élément atypique, de la famille des chalcogènes, est le seul non-métal qui ne soit pas un macroélément constituant la matière vivante (carbone, azote, oxygène, soufre, phosphore). Une de ses propriétés physiques intéressantes et spécifiques est sa semi-conductivité électrique photosensible, propriété largement exploitée dans l'industrie. De numéro atomique 34 et de masse atomique de 78,96 (g/mol), il se situe dans la 4<sup>ème</sup> période du tableau de Mendeleïev entre l'arsenic et le brome, et plus précisément dans le 16<sup>ième</sup> groupe entre le soufre et le tellure (Fig 1.1).

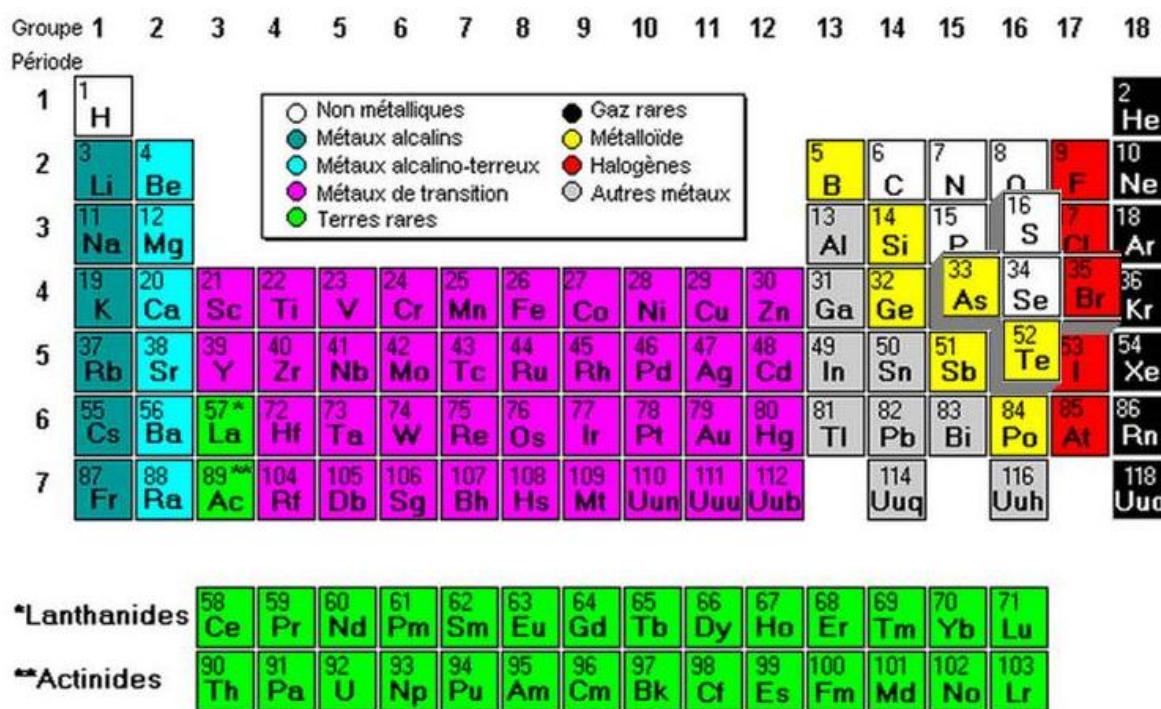


Figure 1.1. Tableau de Mendeleïev

Le sélénium possède des grandes similitudes chimiques avec le soufre (S) : le rayon ionique (S= 0,37 Å, Se=0,5 Å), la longueur et l'énergie de liaison S-S ou Se-Se et le potentiel de ionisation. Ses similitudes sont à l'origine des très nombreuses substitutions du soufre par le sélénium dans des minéraux sulfurés, telle que la pyrite, et dans de multiples molécules organiques, comme dans les acides-aminés telles que la méthionine ou cystéine (Plant et al. 2003).

### ***1.1.2. Spéciation du sélénium dans l'environnement***

Le sélénium existe sous 4 degrés d'oxydation dans l'environnement : le séléniate (Se +VI), le sélénite (Se +IV), le sélénium élémentaire (Se 0) et le séléniure (Se -II). Ces états d'oxydation sont homologues à ceux du soufre : le sulfate (S +VI), le sulfite (S +IV), le soufre élémentaire (S 0) et le sulfure (S -II). Le séléniate ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) et le sélénite ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) sont les formes inorganiques oxydées solubles et mobiles qui sont donc majoritaires dans les sols, sédiments et l'eau (Plant et al. 2003).

Le sélénium élémentaire est allotropique. Ces formes cristallines et amorphes sont insolubles : la plus courante (« sélénium gris ») est hexagonale de couleur gris métallique, tandis que le « sélénium rouge » est monocyclique de couleur rouge ; enfin la forme amorphe (« sélénium noir ») est de couleur brun-rouge et vitreux. Le Se (0) est insoluble et souvent associé à des composés soufrés.

La forme la plus réduite du sélénium (Se -II) est la forme des séléniures inorganiques ainsi que l'ensemble des composés organiques séléniés. Le séléniure précipite avec les éléments métalliques, formant ainsi des séléniures métalliques à faible solubilité.

Les principales formes de sélénium présentant un intérêt dans l'environnement par leur abondance, mobilité ou fonction sont présentées dans le tableau suivant (Tableau 1.1).

	Degré d'oxydation	Nom	Formule	Commentaire
Inorganique	Se (+VI)	Séléniate	$\text{H}_2\text{SeO}_4^-/\text{HSeO}_4^-/\text{SeO}_4^{2-}$	Forme la plus mobile, commune dans les sols, l'eau et les sédiments, facilement biodisponible pour les plantes
	Se (+IV)	Sélénite	$\text{H}_2\text{SeO}_3/\text{HSeO}_3^-/\text{SeO}_3^{2-}$	Forme soluble, commune dans les sols, facilement absorbée sur des particules solides
		Dioxyde de sélénium	$\text{SeO}_2$	Gaz produit par le volcanisme et combustion de fuel fossile, dissous dans l'eau sous forme de $\text{H}_2\text{SeO}_3^-$
	Se (0)	Sélénium élémentaire	$\text{Se}^0$	Forme insoluble, stable dans les environnements réducteurs
Organique	Se (-II)	Séléniure	$\text{Se}^{2-}$	Forme immobile, substituée au soufre dans les minéraux
		Séléniure d'hydrogène	$\text{H}_2\text{Se}$	Gaz produit par le volcanisme, la combustion de fuel fossile et par les microorganismes du sol, instable dans l'air et dans l'eau, s'oxyde en $\text{SeO}_2$
		Sélénodiglutathion	GSSeSG	Forme de transport cellulaire chez les mammifères
		Triméthylsélénium (TMSe <sup>+</sup> )	$(\text{CH}_3)_3\text{Se}^+$	Forme d'élimination par les organismes via les urines
		Diméthylséléniure (DMSe)	$(\text{CH}_3)_2\text{Se}$	Gaz volatil produit par les microorganismes du sol ou par les plantes
		Diméthyldiséléniure (DMDSe)	$(\text{CH}_3)_2\text{Se}_2$	
		Sélénocysteine (SeCys)	$\text{HSeCH}_2\text{CHNH}_2\text{COOH}$	Molécule considérée comme le 21 <sup>ème</sup> acide-aminé, très présentes dans les tissus des mammifères comme constituant des sélénoprotéines spécifiques
		Sélénométhionine (SeMet)	$\text{CH}_3\text{Se}(\text{CH}_2)_2\text{CHNH}_2\text{COOH}$	Acide aminé très présent chez les plantes et levures, intermédiaire de réaction ou forme de stockage
		Séléno protéines	Formules variées	Fonctions multiples

**Tableau 1.1.** Formes les plus communes de sélénium dans l'environnement (Ducros and Favier 2004, Ellis and Salt 2003, Fordyce 2005, Haygarth 1994, Rayman et al. 2008)



## 1.2. Cycle biogéochimique du sélénium dans l'environnement

### 1.2.1. Sources naturelles et anthropiques du sélénium

#### 1.2.1.1. Origines naturelles du sélénium

Le sélénium est un élément trace néanmoins ubiquiste sur notre planète avec une abondance moyenne dans l'écorce terrestre d'environ 0,05 mg/kg. En effet, environ 50 minéraux séléniés sont connus dont les principaux sont présentés dans le tableau 1.2

	Nom	Formule chimique
<b>Minéraux à bases de sélénium</b>	Tiemannite	HgSe
	Klockmannite	CuSe
	Berzelianite	Cu <sub>2</sub> Se
	Crooksite	(Cu,Ti,Ag) <sub>2</sub> Se
	Clausthalite	PbSe
<b>Minéraux où le sélénium se substitue au soufre</b>	Pyrite	FeS <sub>2</sub>
	Chalcopyrite	CuFeS <sub>2</sub>
	Pyrrhotite	FeS
	Sphalerite	ZnS

**Tableau 1.2.** Principaux minéraux et roches constitués de sélénium, modifié d'après Fordyce (2005) et Plant et al. (2003)

Le sélénium entre dans la composition de nombreuses roches sédimentaires – avec dans certains cas des concentrations en sélénium extrêmement élevées - telles que l'anhracite (jusqu'à 6500 mg/kg en Chine), certains schistes (0,1 - 675 mg/kg), les roches phosphatées (1 - 300 mg/kg) et certains charbons (entre 0,21 mg/kg en Australie et 10,7 mg/kg au USA). L'altération de l'ensemble des minéraux et des roches séléniées entraîne la formation de sols plus ou moins enrichis en sélénium (sols sélénifères ou séléniprives) dont une fraction est mobile et donc potentiellement biodisponible pour les organismes.

De plus, les éruptions volcaniques engendrent une quantité importante de poussières et de gaz riches en éléments traces, constituée d'environ 6 à 15 mg/kg de sélénium (Fordyce 2005). Et actuellement, la production globale de sélénium due au volcanisme est estimée entre 100 et 1800 tonnes de sélénium par an (Floor and Roman-Ross 2012, Haygarth 1994, Ihnat 1989, Plant et al. 2003).

1.2.1.2. *Apports anthropiques et utilisations du sélénium*

Les activités anthropiques créent des flux très importants de sélénium. Le facteur d'enrichissement de la biosphère (BEF), c'est-à-dire le ratio entre la production anthropique globale sur celle des sources dites naturelles, est de 17, ce qui signifie que le cycle du sélénium est très fortement anthropisé. Nous pouvons citer en comparaison les BEF du plomb (20) et du cuivre (24) beaucoup plus élevés que ceux de l'arsenic (1.7) ou du cadmium (9.6) (Haygarth 1994) par exemple.

Les sources anthropiques les plus importantes sont la combustion du charbon ainsi que les activités pyrométallurgiques (technique thermique d'extraction minier). Comme énoncé précédemment les roches sédimentaires d'origine organique sont très riches en sélénium et leur combustion est à l'origine de contamination en sélénium ponctuelle et localisée des sols et des eaux : par exemple, les études menées sur le sol de Park Grass (Rothamsted, UK) associent les fortes teneurs en sélénium dans le milieu à la combustion du charbon dans les années 1940-1970 (Haygarth 1994). De même, aux Etats-Unis, les procédés industriels d'extraction de cuivre sont à l'origine de l'émission de plus de 460 tonnes de sélénium entre 1987 et 1993 (Fordyce 2005).

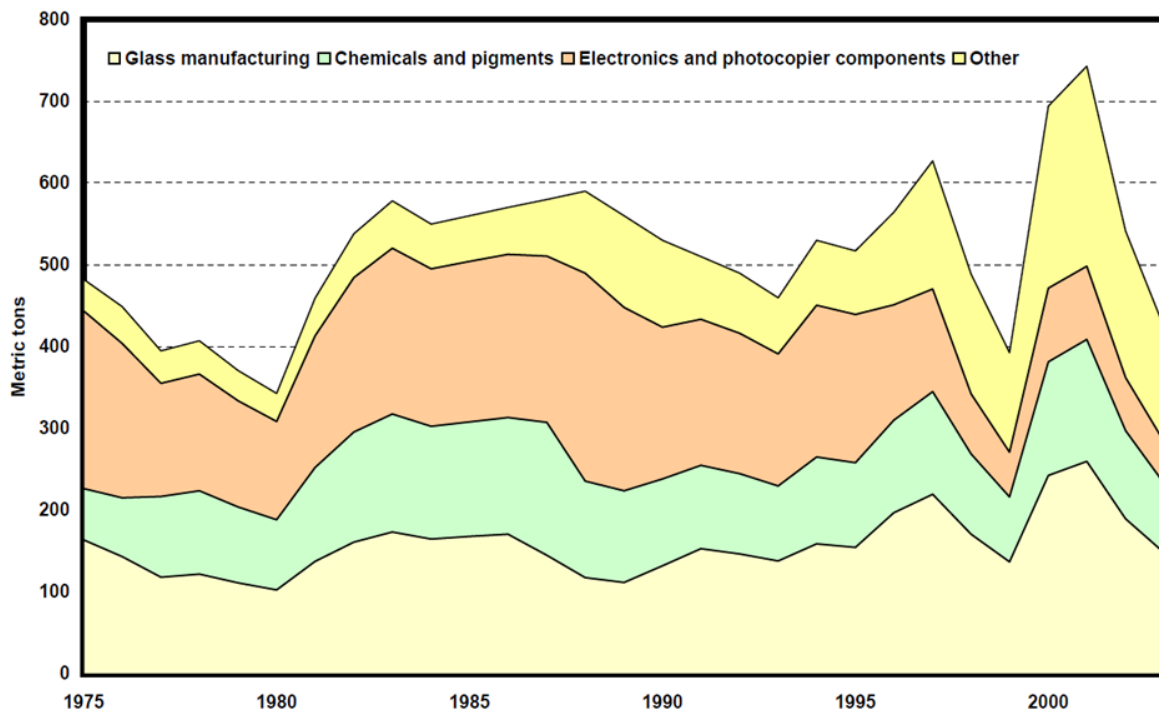
Dans l'industrie, cet élément est principalement utilisé pour ses qualités photovoltaïques et photoconductrices : il entre dans le processus de fabrication de cellules photovoltaïques dans les années 50-60 ainsi que dans les redresseurs de courant et de tambours de photocopieurs. Les améliorations technologiques ont permis de diminuer la quantité de sélénium dans ces domaines (Fig 1.2). Néanmoins, le sélénium reste encore employé comme couche isolante photoconductrice dans la xérogaphie (impression numérique). Les propriétés chimiques du sélénium sont également fortement exploitées dans l'industrie du verre et de céramique, où il permet la décoloration des couleurs vertes dues à la présence de fer. Le sélénium est par ailleurs utilisé pour la fabrication de pigment allant du jaune-orangé au marron. Au vue du prix et de la toxicité de son utilisation, ces pigments sont réservés à la coloration des matériaux spécifiques soumis à une forte chaleur, comme le plastique, le verre et les peintures. D'autre part, le sélénium est également utilisé en métallurgie lourde en vue d'améliorer les qualités d'usinabilité de certains matériaux et leur résistance à la corrosion (aciers inoxydables, plomb, cuivre ...).

En agriculture, en raison du caractère toxique du sélénium à forte concentration, c'est un composé utilisé dans la fabrication des insecticides et fongicides. De plus, certaines pratiques agricoles comme l'irrigation ou l'épandage de boues de station d'épuration enrichissent (et/ou

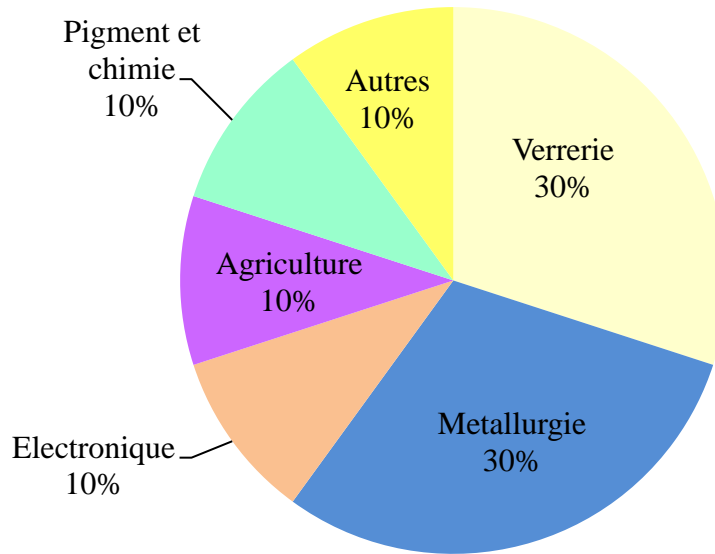
contaminent) indirectement les terres agricoles en sélénium. En France, le flux annuel de sélénium dû aux boues d'épandage est estimé à 11,6 g/ha/an (Robert and Juste 1997). La teneur limite en sélénium dans les boues est de 25 mg/kg aux Royaume-Unis alors qu'en France seule une norme sur un flux cumulé maximum apporté par les boues de 0,12 g/cm<sup>2</sup> pour les pâturages ou les sols de pH inférieurs à 6 existe. De plus, des apports spécifiques de sélénium via les insecticides/fongicides et les engrais participent à l'augmentation des concentrations de sélénium dans les champs cultivés. En effet, pour éviter les problèmes de déficience en sélénium dans certaines régions, les agricultures apportent aux cultures du sélénium sous forme d'engrais séléniés (15 g/t dans l'engrais NUTRISTAR© Selen (Kemira), par exemple).

Pour finir, l'utilisation médicale du sélénium comme fongicide (shampooing antipelliculaire), antioxydant cellulaire (crème ou complément alimentaire) ou lors de traitement thérapeutique est à l'origine d'un stock de déchets résiduels contaminés en sélénium.

La quantité de sélénium utilisée est variable selon les différents secteurs d'activités (Fig 1.2 et 1.3). La métallurgie et la verrerie sont les activités les plus consommatrices de sélénium avec à elles deux 60 % du sélénium utilisé dans l'industrie (Fig 1.2 et 1.3). Actuellement, l'utilisation agricole du sélénium représente tout de même 10 % du sélénium total utilisé (Fig 1.3).



**Figure 1.2.** Evolution de la quantité de sélénium utilisé (en tonnes) dans les différents secteurs entre 1975 et 2003 (U.S. Geological Survey 2005)



**Figure 1.3.** Répartition de sélénium utilisé (%) dans les différents secteurs en 2009 (George 2010)

### 1.2.2. Flux de sélénium entre les principaux compartiments du cycle

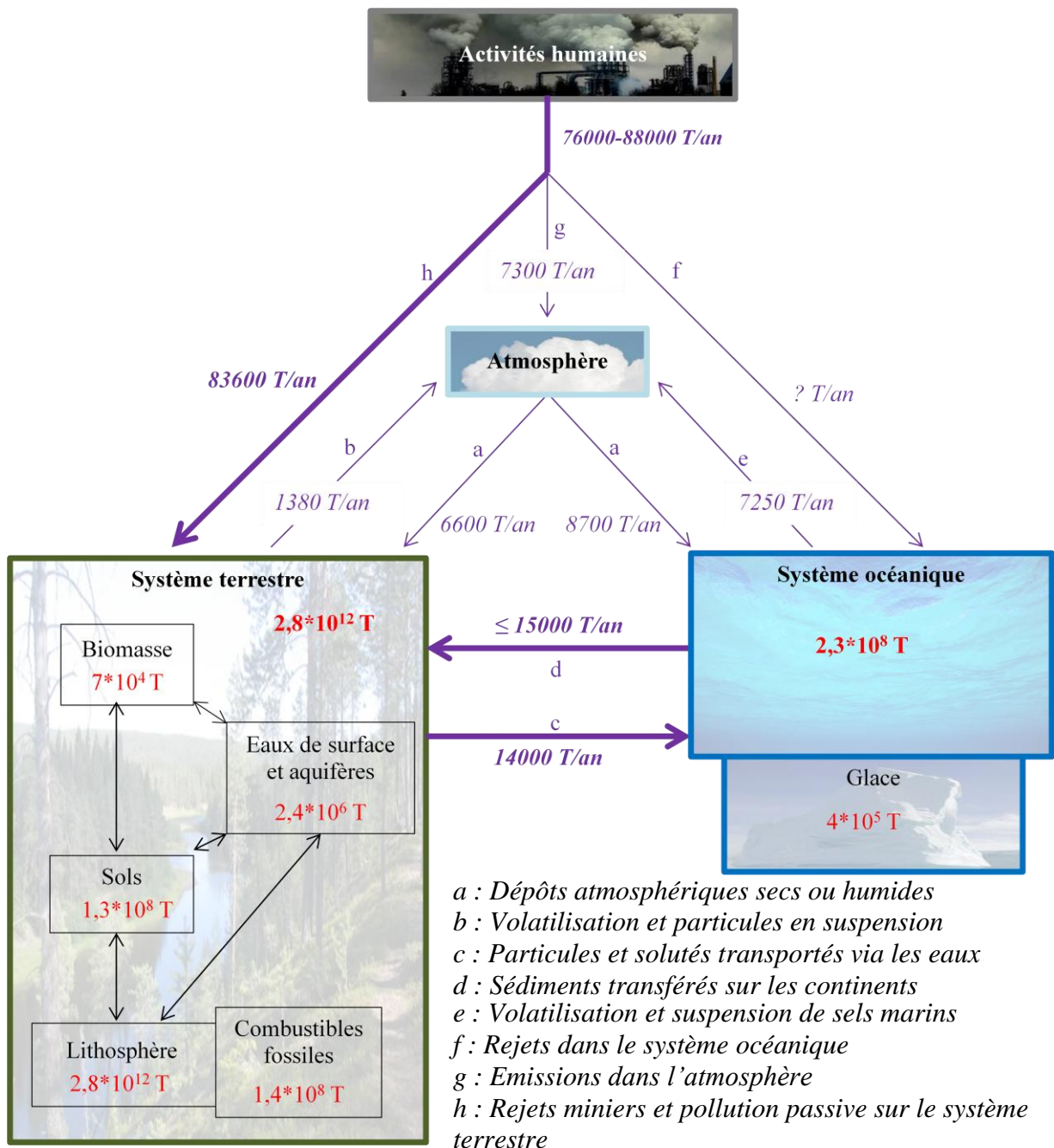
Les principaux réservoirs (figure 1.4) intervenant dans le cycle du sélénium ne génèrent pas la même quantité de sélénium : les activités anthropiques produisent de 76000 à 88000 tonnes de sélénium par an, tandis que les systèmes océanique et continental brassent respectivement 22250 et 15380 tonnes de sélénium par an et enfin le compartiment atmosphérique est à l'origine de dépôts de 15300 tonnes de sélénium par an (Haygarth 1994, Nriagu 1989).

Les activités anthropiques génèrent des rejets incorporés dans les écosystèmes à différents degrés : soit les rejets sont volatils ou sous forme d'aérosols et directement émis dans l'atmosphère, soit les rejets sont très solubles et transitent dans les hydrosystèmes terrestres et marins, soit les particules émises sont peu solubles (voire insolubles) et s'accumulent dans les sols, les sédiments et/ou sont incorporées dans la biomasse.

Des processus naturels, tels que la volatilisation du sélénium via la biomasse vivante, le volcanisme ou l'érosion émettent des composés séléniés dans l'atmosphère. Ces composés séléniés atmosphériques (d'origine naturelle ou anthropique) se déposent sous forme de particules sèches ou humides sur l'ensemble des surfaces et océaniques. Par rapport aux autres compartiments, le temps de résidence du sélénium dans l'atmosphère est extrêmement faible avec 45 jours en moyenne (Nriagu 1989). Il reste néanmoins plus élevé que celui des polluants métalliques (entre 3 et 15 jours).

Les flux d'eau du système continental vers l'océan ainsi que des sédiments du système océanique vers le continent sont associés à des flux importants de sélénium, soit environ 14500 tonnes par an (Haygarth 1994, Nriagu 1989).

Dans la suite de ce chapitre, nous nous focaliserons sur le cycle biogéochimique du sélénium dans la biosphère continentale de surface. Plusieurs compartiments constituent ce système : le sol, l'eau (nappes et rivières) ainsi que la biomasse végétale et animale.



**Figure 1.4.** Cycle global du sélénium entre les compartiments principaux (stocks de sélénium en t, en rouge) ainsi que les flux associés (en t/an, en violet), modifié d'après Haygarth (1994) et Nriagu (1989)

### ***1.2.3. Le sélénium dans les eaux naturelles, les sols et l'atmosphère***

#### *1.2.3.1. Les eaux et les sols*

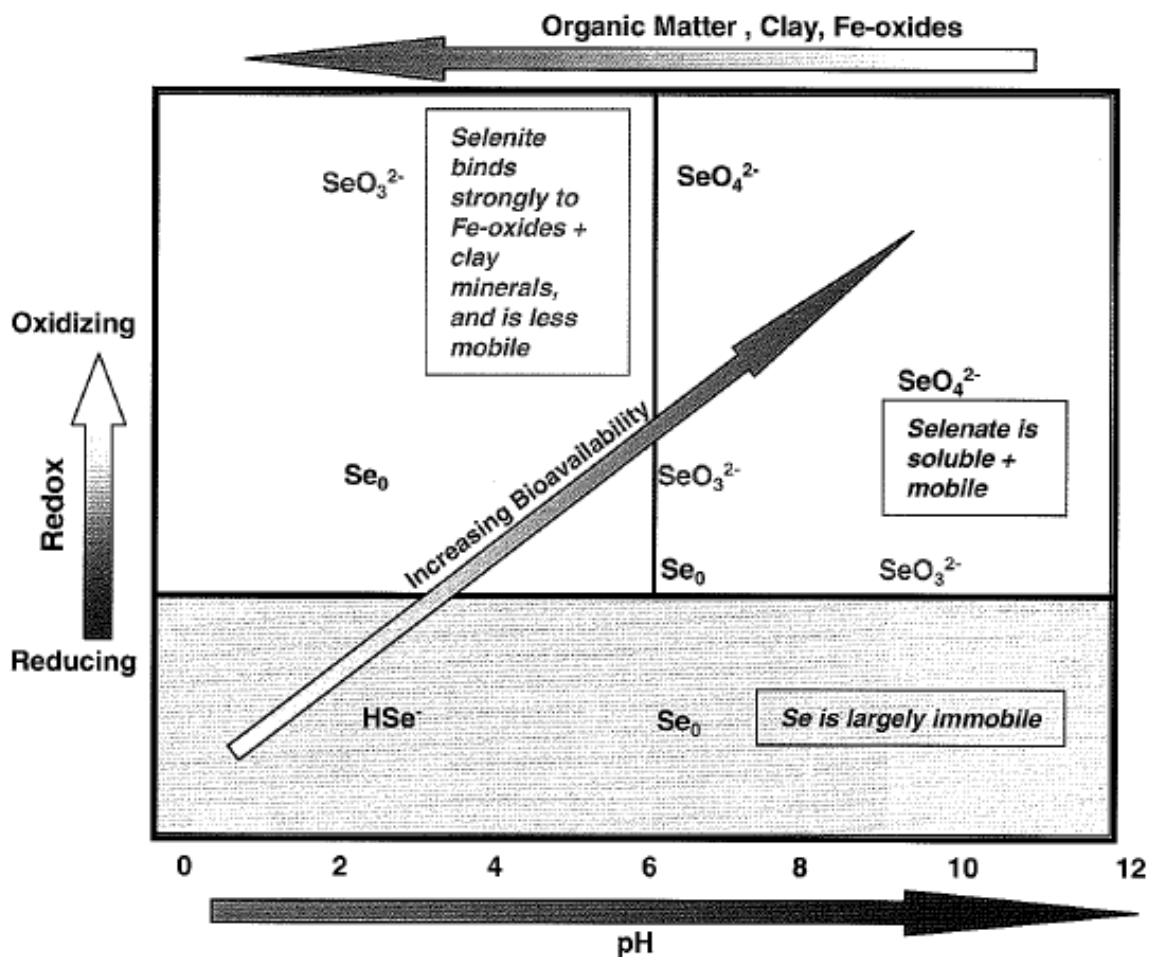
La concentration moyenne en sélénium dans les sols est d'environ 0,4 µg/g (Kabata-Pendias and Mukherjee 2007, Plant et al. 2003) mais reste très variable selon le type de sol. Par exemple, elle est en moyenne de 80 µg/g dans les sols riches en matière organique d'Irlande et seulement de 0,25 µg/g dans les sierozems d'Azerbaïdjan (sols calcaires pauvres en matière organique) (Berrow and Ure 1989, Plant et al. 2003). Nous pouvons distinguer deux types de sols. Les sols pauvres en sélénium, dits sols sélénoprives, possèdent des teneurs inférieures à 0,2 µg de Se /g (Dhillon and Dhillon 2004) : dans certaines régions de Chine et des USA, la concentration de sélénium ne dépasse pas 0,02 µg/g. Par opposition, les sols sélénifères ont des teneurs supérieures à 1,5 µg/g (Berrow and Ure 1989, Plant et al. 2003). En Irlande, la teneur en sélénium des sols peut varier de 1 à 1200 µg/g ; de même, les sols de certaines régions d'USA, d'Inde ou de Chine dépassent la concentration de 10 µg/g (Berrow and Ure 1989, Plant et al. 2003).

La concentration moyenne de sélénium dans les eaux naturelles est très faible, soit quelques ng/L. Comme pour les sols, la concentration dans l'eau reste très variable selon la région. En effet, la concentration dans les rivières et des lacs varie entre 0,06 et 400 µg/L et celle des eaux de pluies entre 0,02 et 1,75 µg/L (Kabata-Pendias and Mukherjee 2007, Plant et al. 2003). Les aquifères pauvres en sélénium contiennent par exemple 0,06 µg/l aux RU alors que dans certaines régions de Chine la concentration dans les aquifères peut dépasser 1000 µg/L (Kabata-Pendias and Mukherjee 2007, Plant et al. 2003) voire atteindre des valeurs exceptionnellement élevées telles que 6000 µg/L en Utah (USA).

Le sélénium étant toxique à des concentrations élevées, des normes ont été établies : en Europe (Norme européenne et française- Directive 98/83/CE puis décret N°2001-1220 du 20/12/2001), Australie, Canada et Japon, le seuil de potabilité en sélénium dans l'eau est fixé à 10 µg/l. Par contre, l'US EPA (Environmental Protection Agency en 1992) a fixé cette norme à une valeur 5 fois supérieure, soit 50 µg/l. A noter qu'il n'existe pas de norme pour l'eau d'irrigation : néanmoins, la concentration maximale dans les eaux d'irrigation recommandée par la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) est de 20 µg/L.

Le degré d'oxydation du sélénium présent dans les sols et les eaux dépend notamment des conditions d'oxydoréduction et du pH du milieu qui influent sur sa mobilité et sa

biodisponibilité (Fig 1.5). La distribution du sélénium entre les phases solides et aqueuses dépend également de la teneur en matière organique, en hydroxydes, en argiles et de la présence d'ions compétiteurs (Fig 1.5). Le séléniate est majoritairement présent dans les sols aérés, secs et alcalins. Cette forme est la plus soluble et possède une faible capacité à s'adsorber sur les particules de sols. Elle est considérée comme la plus biodisponible pour les plantes. La cinétique thermodynamique de réduction du séléniate en sélénite est lente ce qui permet au sélénite d'être stable et dominant dans les milieux légèrement oxydants. Le sélénite est une forme soluble mais peut facilement et rapidement s'adsorber sur des particules minérales, principalement sur les oxydes de fer, et/ou de la matière organique contrairement au séléniate. Le sélénium élémentaire et le séléniure sont majoritaires dans les milieux réducteurs. Ils forment quand à eux des composés stables dans ces environnements et donc potentiellement immobiles.



**Figure 1.5.** Variation de la spéciation du sélénium dans les eaux et les sols en fonction du pH, des conditions redox et des principaux composés minéraux et organiques (Fordyce 2005)

### 1.2.3.2. *L'atmosphère*

La concentration en sélénium atmosphérique est seulement de quelques ng/m<sup>3</sup> mais peut atteindre une dizaine de ng/m<sup>3</sup> dans la plupart des zones industrielles (Fordyce 2005). En France, l'arrêté du 02/02 1998 (J.O.N°52 du 03/03/1998) impose une concentration maximale de 1 ng/m<sup>3</sup> de rejets gazeux exprimés en Arsenic+Tellurium+Sélénium. Les constituants séléniés de l'atmosphère sont principalement des particules de faible diamètre (inférieur à 1 µm) et des molécules volatiles, dont les origines sont soit anthropiques (45 %) via la combustion du charbon, soit naturelles (55 %) via le volcanisme, l'érosion éolienne et l'activité biologique des organismes vivants. La biométhylation du sélénium par les microorganismes du sol, le phytoplancton principalement, mais aussi par les végétaux et animaux, contribuent massivement au flux de sélénium vers l'atmosphère. Les molécules gazeuses les plus représentées dans l'atmosphère sont le dimethylséléniure (DMSe) et le dimethyldiséléniure (DMDS<sub>e</sub>). Les gaz émis par les volcans et la combustion du charbon sont principalement le SeH<sub>2</sub> et SeO<sub>2</sub>. Cependant, le SeH<sub>2</sub> est rapidement oxydé dans l'atmosphère en SeO<sub>2</sub> et dissous en acide sélénieux en milieu humide (dans les eaux de pluie par exemple).

## 1.3. Le sélénium au sein du réseau trophique

### 1.3.1. *Des producteurs aux consommateurs*

Comme nous avons pu l'apercevoir dans le cycle global du sélénium, différents processus interviennent dans le transfert du sélénium des sols/eaux à l'atmosphère via les différents maillons du réseau trophique terrestre ; cet élément étant bioaccumulé dans l'ensemble des organismes végétaux ou animaux vivants.

Les formes de sélénium les plus solubles et donc les plus bio-disponibles, sont absorbées par les producteurs primaires, les plantes. Les quantités de sélénium bio-disponibles pour les plantes dépendent non seulement de la concentration totale de sélénium dans les sols mais aussi de la spéciation du sélénium, influencée directement par le pH et le potentiel redox du milieu, ainsi que par les paramètres intrinsèques au compartiment sol, comme la structure du sol et les teneurs et des composantes organiques et minérales (Chilimba et al. 2011, Coppin et al. 2009, Dhillon et al. 2010, Eich-Greatorex et al. 2007, Gissel-Nielsen 1971a, Johnson 1991, Kabata-Pendias and Pendias 2001, Zhao et al. 2005, Zhao et al. 2007). Le métabolisme des végétaux génère la production des molécules organiques séléniées, des acides aminés et de



nombreuses protéines, ainsi que des molécules volatiles (DMSe et DMDS<sub>e</sub>). Le métabolisme des plantes est complexe et sera plus finement détaillé dans le paragraphe 2.3.

Le sélénium ingéré par les consommateurs secondaires se répartit en 4 fractions fonctionnelles : (i) le sélénium dit « non bio-accessible » n'est pas absorbable via la paroi intestinale et est directement excrété via les fèces sans subir de modification ; (ii) la fraction « bio-accessible » du sélénium est soluble dans les intestins et a la capacité d'être absorbée à travers la muqueuse intestinale ; (iii) le sélénium « dit bio-disponible » est absorbé et transporté via le système sanguin jusqu'aux tissus et organes ; (iv) pour finir, la fraction de sélénium « dit bio-actif » est convertie en métabolites séléniés (Thiry et al. 2012). Comme pour tous les micronutriments, la capacité du sélénium à être bio-accessible, bio-disponible et/ou bio-actif dépend très fortement de sa spéciation chimique. Chez les hommes, la biodisponibilité du sélénium est évaluée à 75-95 % pour la SeMet et la Se Cys mais seulement à 45-70 % pour le sélénite et le séléniate (Nève 1997, Rayman et al. 2008, Thomson 2004, Thomson and Robinson 1986). De la même façon, chez les bovins, les ovins et les chevaux, le sélénite et le séléniate ont une biodisponibilité similaire (Podoll et al. 1992), plus faible que celle des acides aminés séléniés (Nicholson et al. 1991). Par exemple, les concentrations en sélénium dans le lait et le sang des vaches sont plus élevées si leur alimentation est plus riche en SeMet qu'en séléniate (Knowles et al. 1999).

Chez les animaux et les humains, le sélénium peut suivre plusieurs voies de métabolisation selon la forme initialement absorbée (Fig 1.6). Les molécules inorganiques sont réduites en H<sub>2</sub>Se. La forme de transport cellulaire du sélénium est principalement le sélénodiglutation. En cas d'apport organique de sélénium, une hydrolyse des protéines permet la libération d'acides-aminés, SeMet et SeCys. Les acides aminés provenant directement de l'alimentation ou des protéines hydrolysées, sont soit incorporés dans des protéines non-spécifiques, soit convertis en H<sub>2</sub>Se. Cette forme de sélénium est un paramètre clé dans le métabolisme du sélénium chez les animaux et les humains. A partir de H<sub>2</sub>Se, différentes voies métaboliques sont possibles dont la principale est la synthèse de sélénoprotéines spécifiques. Pour finir, le sélénium est excrété dans les fèces (sélénium non absorbé par les intestins) ou sous diverses formes méthylées via les urines et les poumons. Le pourcentage de sélénium excrété est équivalent lors d'une alimentation riche en sélénite ou en séléniate. Par contre, le sélénium est principalement éliminé par les fèces dans le premier cas et par les urines dans le second. L'excrétion de sélénium en présence de SeMet est plus faible qu'en présence de

formes inorganiques, et s'effectue principalement par les urines (Daniels 1996, Thomson and Robinson 1986).

**La spéciation en sélénium lors de son transfert dans les réseaux trophiques est donc essentielle. Ainsi non seulement la quantité de sélénium accumulée mais aussi la qualité du sélénium formé (c'est-à-dire la spéciation du sélénium) par les producteurs primaires, premier maillon de la chaîne, influencent l'assimilation du sélénium par les consommateurs.**

### *1.3.2. Le sélénium et la santé humaine*

#### *1.3.2.1. Les apports en sélénium*

##### *1.3.2.1.1. Les 3 voies d'absorption en sélénium : pulmonaire, cutanée et digestive*

La voie pulmonaire est négligeable et estimée à 4,2 ng/j (Mahapatra et al. 2001). De même, les apports en sélénium par voie cutanée sont normalement extrêmement faibles sauf en cas d'utilisation dermatologique lors de traitements antifongiques, de dermatoses séborrhéiques (inflammations cutanées) ou d'état pelliculaire du cuir chevelu.

La source majoritaire de sélénium est donc l'absorption digestive : son efficacité dépend des formes de sélénium présentes dans l'intestin (comme vu dans le paragraphe 1.3.1). L'eau potable ainsi que les boissons ont en général de faible teneur en sélénium, ce qui ne représente pas plus de 3 % des apports en sélénium (Barclay et al. 1995). La quasi-totalité du sélénium (environ 97 %) est fournie aux organismes via les **apports alimentaires**.

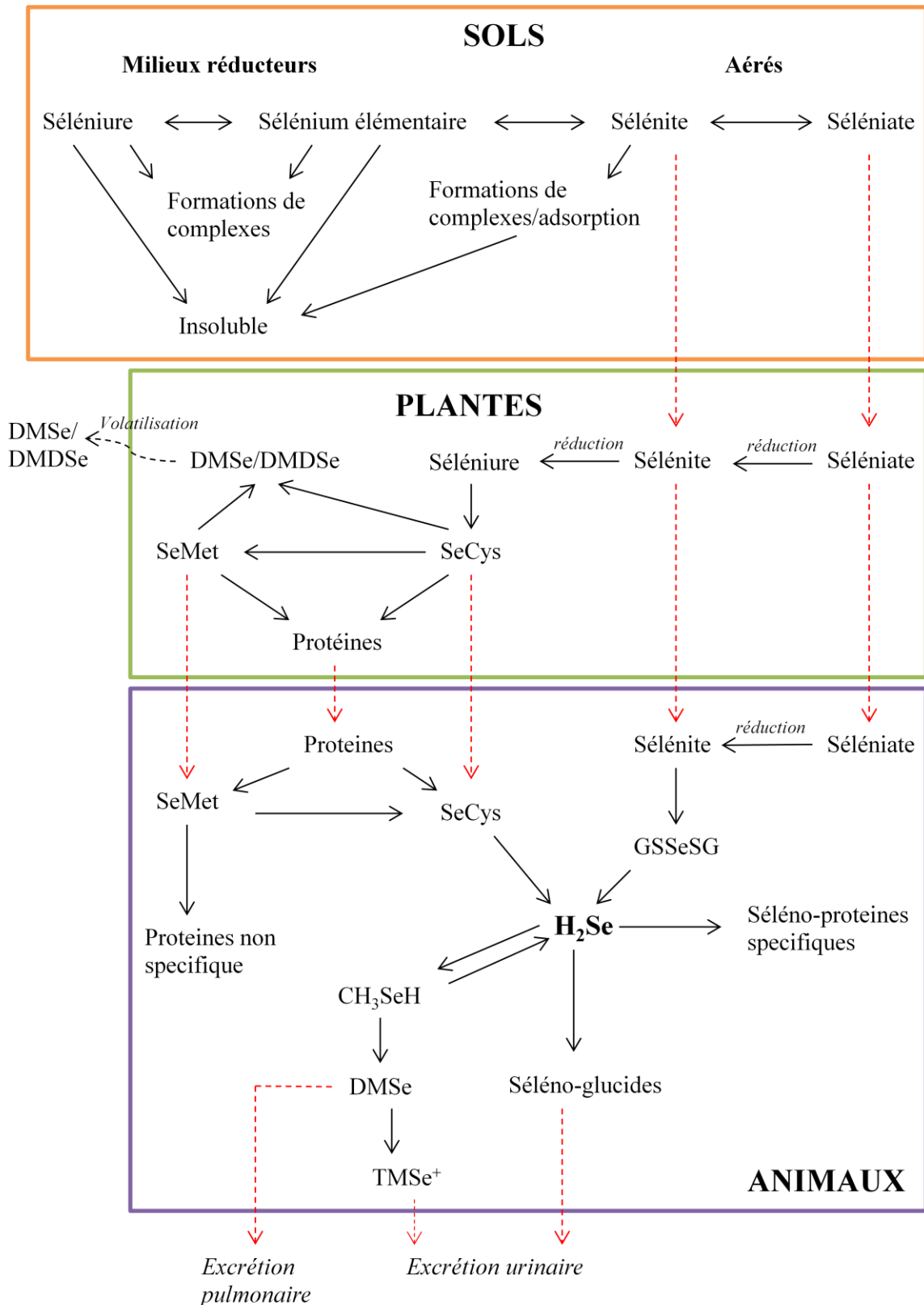


Figure 1.6. Processus et flux du sélénium au sein du système sol-plante-atmosphère, modifié d'après Rayman et al. (2008) et Théron et al. (1997)

---> : Transfert entre les différents niveaux trophiques

## 1.3.2.1.2. Les apports alimentaires en sélénium

Les concentrations et la spéciation en sélénium dans les apports alimentaires séléniés sont donc déterminantes et dépendent de trois facteurs :

- Les zones géographiques : selon leur richesse en sélénium, toutes les régions du globe ne sont pas égales face aux concentrations en sélénium dans leurs aliments. Notamment, la Chine et les USA ont des teneurs en sélénium dans leurs céréales et leurs viandes/poissons très hétérogènes (Tableau 1.3).

Groupe d'aliment	Zones	Concentration en sélénium (ng/g)	Pays
Céréales et dérivés	séléniprives	0,1-100	Chine, Sri Lanka, Finlande, Nouvelle-Zélande, Norvège, France
	sélénifères	10000-2000000	Chine, Venezuela, Colombie, Allemagne, USA
Viandes, poissons et dérivés	séléniprives	10-60	Finlande, Nouvelle-Zélande, Grèce, Allemagne
	sélénifères	2-4	USA, UK
Légumes/ fruits	sélénifères	350-475000	Chine, USA

**Tableau 1.3.** Concentrations en sélénium d'aliments selon leurs origines géographiques, d'après les données citées dans Combs (2001), Fordyce (2005), Kabata-Pendias and Pendias (2001), Pappa et al. (2006) et Rayman et al. (2008)

- La nature des aliments : les viandes, poissons et leurs produits dérivés sont les aliments les plus riches en sélénium (Tableau 1.4) ; ceux-ci représentent jusqu'à 44 % du sélénium en Grèce (Pappa et al. 2006). Il ne faut cependant pas négliger les céréales et leurs dérivés (principalement le pain) (Tableau 1.4), qui peuvent représenter jusqu'à 27 % des apports en sélénium alimentaires en Grèce par exemple (Pappa et al. 2006).
- Et enfin le régime alimentaire : il est différent selon le sexe, l'âge, la catégorie socioprofessionnelle, l'éducation, l'activité sportive ainsi que l'indice de masse corporelle.

Un dernier type d'apport doit également être pris en compte : soit pour suivre une stratégie curative concernant la santé de population dans des régions sensibles (en Chine par exemple), soit actuellement pour répondre à des effets de mode concernant les 'médicaments' et autres compléments alimentaires vitaminés largement relayés par les médias : de nombreux compléments alimentaires (comprimé, capsule ou sirop) sont consommés pour leurs effets antioxydants. Ceux-ci sont généralement des levures enrichies en sélénium ou du sélénite de sodium.

Groupe d'aliment	Spéciation	Concentration typique (ng/g)
Céréales et produits dérivés	SeMet	100 - 800
Viandes et œufs	SeCys	40-500
Poissons, fruit de mer	Seleniate	60-1500
Laitages	-	4-300
Légumes/fruits	Seleniate/SeMet	1-100

**Tableau 1.4.** Concentrations et spéciation du sélénium en fonction des différents groupes d'aliments, d'après les données citées dans *FAO and WHO (2002)*, *Fordyce (2005)*, *Pappa et al. (2006)*, *Rayman (2008)* et *Rayman et al. (2008)*

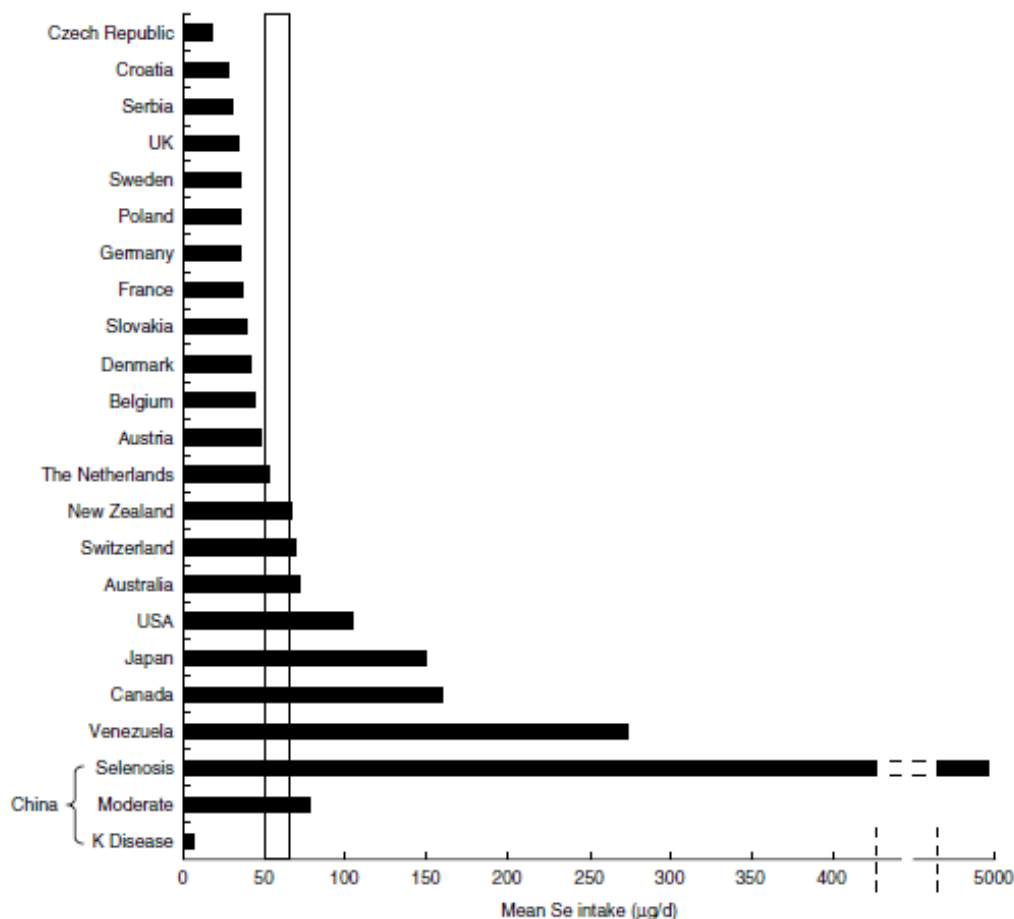
#### 1.3.2.1.3. Apports journaliers recommandés

La gamme de concentration dans laquelle le sélénium est bénéfique est étroite et variable selon les espèces. Pour l'homme, elle se situe entre à 0,2 et 1 µg par gramme de masse corporelle (Adam and Rouelle-Debet 2002). Les apports journaliers recommandés en sélénium pour un adulte varie entre 55 et 70 µg par jour (Institute of medicine (U.S) and Panel on dietary antioxidants and related compounds 2000, Kabata-Pendias and Mukherjee 2007, World Health Organization et al. 1996). Ces valeurs dépendent de l'âge et du sexe de l'individu : les besoins sont plus faibles chez les enfants de moins de 14 ans (Institute of medicine (U.S) and Panel on dietary antioxidants and related compounds 2000) ; et les femmes, 55 µg/j, ont des besoins légèrement inférieurs aux hommes, 70 µg/j (Institute of medicine (U.S) and Panel on dietary antioxidants and related compounds 2000).

Selon les pays, ces apports recommandés ne sont souvent pas atteints ou sont au contraire beaucoup trop importants (Fig1.7). Par exemple, au Japon, Venezuela, Canada, Chine, ils

sont élevés avec des valeurs de l'ordre de 100 $\mu\text{g}/\text{j}$ , contrairement à la Nouvelle Zélande ou dans certaines régions de Chine où ils sont de l'ordre de 20 à 30  $\mu\text{g}/\text{j}$ . En Europe, ces apports peuvent varier de 30  $\mu\text{g}/\text{j}$  en Angleterre à 73  $\mu\text{g}/\text{j}$  en Espagne (Food and agriculture organization and World Health Organization 2002, Navarro-Alarcon and Cabrera-Vique 2008, Pincemail et al. 1999, Thiry et al. 2012). En France, ces apports en sélénium sont estimés à 47  $\mu\text{g}/\text{j}$  (Food and agriculture organization and World Health Organization 2002, Simonoff and Simonoff 1991).

La teneur moyenne en sélénium dans un corps humain adulte varie entre 3 et 14,6 mg (World Health Organization 1987). Dans la grande majorité des cas, la teneur en sélénium dans le sang (en moyenne de 0,2 mg/L) (World Health Organization 1987, World Health Organization et al. 1996) est positivement corrélée au niveau de sélénium dans l'alimentation humaine.

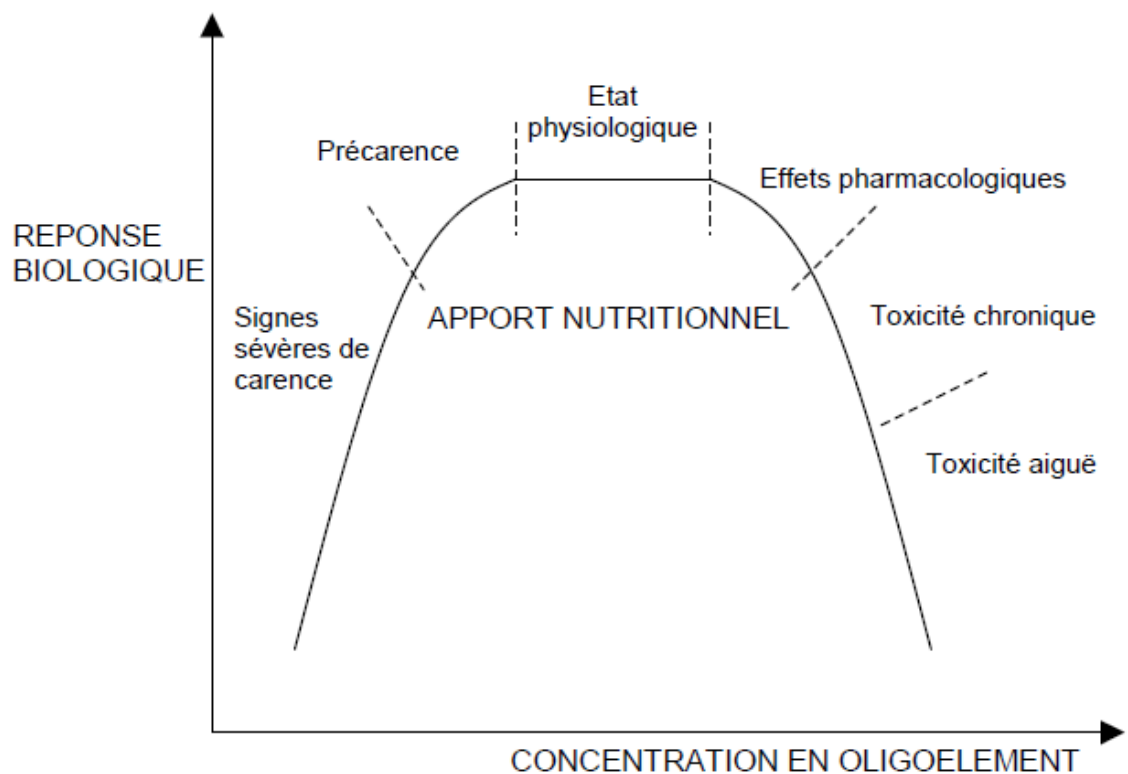


**Figure 1.7.** Apports réels en sélénium ( $\mu\text{g}/\text{j}/\text{personne}$ ) en fonction des différents pays. (Zone encadrée : apports journaliers recommandés pour des adultes)(Rayman 2005)

### 1.3.2.2. Rôles physiologiques du sélénium

Les réponses de l'organisme face à un élément dépendent de sa concentration mais également de sa spéciation. Ce second paramètre a été jusqu'à présent peu étudié (essentiellement en raison de verrous analytiques) malgré son importance vis-à-vis des effets toxiques qu'il peut provoquer sur les organismes (Fig 1.8).

Pour un adulte, la dose de sélénium pour un bon état physiologique varie entre 55 et 70  $\mu\text{g}/\text{j}$  (Institute of medicine (U.S) and Panel on dietary antioxidants and related compounds 2000, World Health Organization et al. 1996). La dose pharmaceutique se situe à environ 200  $\mu\text{g}/\text{j}$  (Ducros and Favier 2004, Rayman 2008). La dose toxique de sélénium est atteinte à partir de 400  $\mu\text{g}/\text{j}$  (Institute of medicine (U.S) and Panel on dietary antioxidants and related compounds 2000, World Health Organization et al. 1996). Pour finir, une personne est carencée en sélénium si elle consomme moins de 30  $\mu\text{g}/\text{j}$  (Ducros and Favier 2004, World Health Organization et al. 1996).



**Figure 1.8.** Réponses physiologiques à la concentration des apports en oligoéléments (Simonoff and Simonoff 1991)

## 1.3.2.2.1. Etat physiologique et effets pharmacologiques

Le sélénium est un oligo-élément pour les animaux et les humains qui intervient essentiellement dans les défenses antioxydants, la protéine anti-oxydante la plus connue étant la glutathion peroxydase (GP<sub>x</sub>). Elle protège les cellules contre les peroxydes et le peroxyde d'hydrogène (Fig 1.9) ou les peroxydes organiques. L'activité de la GP<sub>x</sub> nécessite la présence d'un substrat : le glutathion (GSH). Cette molécule est synthétisée à partir de glutamate, de cystéine (Cys) et de glycine.



**Figure 1.9.** Réactions de réduction du peroxyde d'hydrogène par le glutathion

*GSH* : glutathion réduit ; *GSSG* : glutathion oxydée

Le glutathion est aussi une forme de stockage, de transport de soufre réduit et comme nous l'avons vu il intervient dans la réduction et le transport du sélénium. Il est également le précurseur de phytochelatan intervenant dans la détoxification des cellules en métaux lourds (cadmium par exemple).

Le sélénium joue également un rôle dans le métabolisme thyroïdien et dans la régénération de la vitamine C. Cet élément est aussi un constituant de la myosine (protéine musculaire) et à faible dose stimule le système immunitaire et pancréatique. Il est essentiel dans la fertilité masculine en participant à la synthèse de la progestérone et à la spermatogenèse. 23 sélénoprotéines spécifiques et leurs rôles ont été identifiés chez les mammifères (Tableau 1.5); 22 protéines contiennent un sélénium dans leur site actif et une, la sélénoprotéine-P plasmatique, en contient 10.

A des doses pharmacologiques (sup à 200 µg/j), le sélénium perturberait le développement des cellules cancéreuses et inhiberait la prolifération du VIH (virus de l'immunodéficience humaine) et de l'hépatite B et C. A de telles doses, il est également utilisé dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde, de l'asthme, de la pancréatite (Ducros and Favier 2004, Rayman 2008).

Le sélénium intervient également dans la détoxification des xénobiotiques et de certains éléments trace ou métaux lourds (arsenic, mercure, cadmium, tellurium) (Fordyce 2005). Pour finir, le sélénium est antagoniste au cuivre et au soufre en inhibant l'assimilation de ces éléments (WHO, 1987, 1996 ; dans Fordyce, 2005).



Noms des sélénoprotéines	Fonctions
<b>Glutathion peroxydases (GPx) :</b> -GPx-1 cytosolique -GPx-2 gastro-intestinale -GPx-3 plasmatique et extracellulaire -GPx-4 hydroperoxyde phospholipidique	-Enzymes antioxydants -Détoxification : réduction du peroxyde d'hydrogène ou des hydroperoxydes lipidiques et phospholipidiques en substances non dangereuses -Réduction de la propagation des dommages oxydatifs à des biomolécules nobles (lipides, lipoprotéines et acide désoxyribonucléique (ADN)) -Maintien de l'intégrité membranaire -GPx-4 dans les noyaux spermatiques : protège contre le dommage oxydatifs
<b>Désiodases :</b> -5'DI -5'DII -5'DIII	-Essentiel dans l'action des hormones thyroïdiennes
<b>Thioredoxines réductases :</b> -TR1 -TR2 -TR3	-Régulation de plusieurs procédés cellulaires d'oxydoréduction -Réduction du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) -Régénération de la vitamine C et E -Stimulation de la croissance des cellules (tumorales y comprises) -Intervention dans la synthèse d'ADN -Associées aux cellules épithéliales de l'endothélium vasculaire -Rôle de transporteur (supposé)
<b>Sélénoprotéines P</b>	-Antioxydant extracellulaire : élimination des peroxynitrites (produit dans les sites inflammatoires) -Activité peroxydase spécifiques des phospholipides
<b>Sélénoprotéines synthétase</b>	-Catalyse la synthèse du sélénomono-phosphate (précurseur de la SeCys) -Incorporation de la SeCys dans les sélénoprotéines
<b>Sélénoprotéines W</b>	-Dans les tissus musculaires -Rôle antioxydant dépendant de la glutathion
<b>Sélénoprotéines R</b>	-Méthionine R sulfoxyde réductase à cofacteur zinc : réduction des méthionines sulfoxydes (MetSO) incluses dans des protéines, en méthionines (Met)
<b>Sélénoprotéines de 15 kDa</b>	-Dans Cellules épithéliales glandulaires prostatique -Intervient dans l'activité glutathion peroxydase et sa synthèse
<b>Sélénoprotéines de 18 kDa</b>	-Dans mitochondrie -Rôle non identifié

*Tableau 1.5. Principales sélénoprotéines dans l'organisme humain et leurs fonctions, synthèse à partir de Ducros and Favier (2004), Fordyce (2005), Navarro-Alarcon and Cabrera-Vique (2008) et Rayman (2000)*

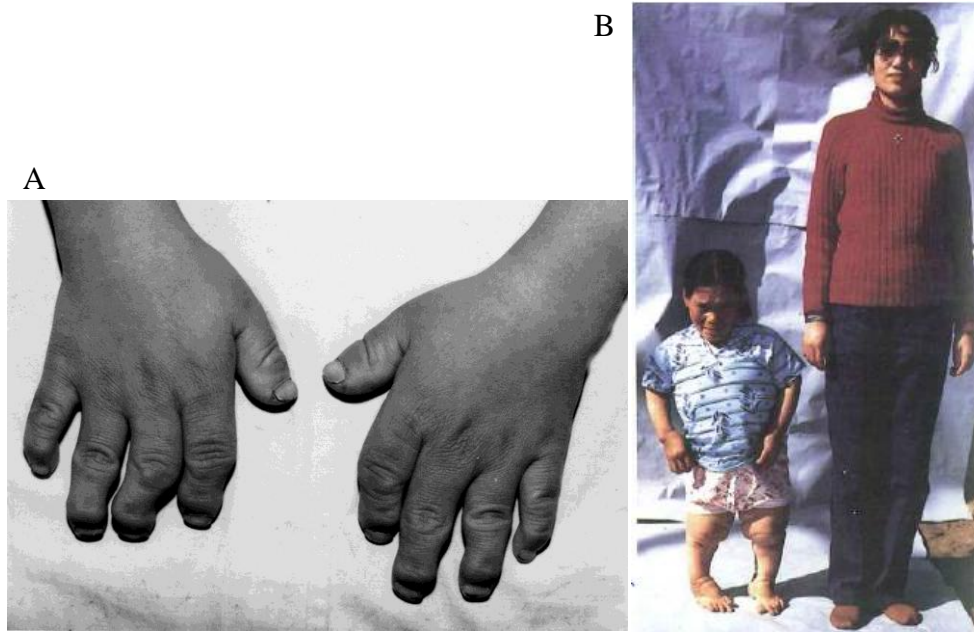
1.3.2.2.2. Réponses biologiques de l'organisme en cas de carence en sélénium

Actuellement de nombreuses études scientifiques se focalisent sur les conséquences d'une carence légère en sélénium. Elles visent à améliorer la compréhension des multiples rôles du sélénium dans l'organisme. Une carence modérée en sélénium est souvent observée chez des patients ayant (Ducros and Favier 2004, Fordyce 2005, Rayman 2000, Rayman 2008):

- Une diminution de l'immunocompétence
- Développé un cancer : la déficience en sélénium serait une cause ou une conséquence du développement de cellules tumorales
- Développé des maladies cardiovasculaires, notamment l'infarctus du myocarde
- Un déclin des fonctions cognitives, tel que la maladie d'Alzheimer
- Des troubles de la reproduction : fausses couches et baisse de la fertilité masculine
- Des troubles thyroïdiens tels que le développement de goitre et hypoéchogénicité de la glande
- Augmentation de la toxicité des xénobiotiques et de certains métaux lourds

Chez l'homme, une déficience importante en sélénium entraîne des dystrophies musculaires, osseuses ou des difformités embryonnaires. Dans le paragraphe suivant, les deux maladies les plus connues caractéristiques d'un manque en sélénium : la maladie de Keshan et la maladie de Kashin-Beck, sont abordées :

- La maladie de Keshan entraîne la mort de 1000 personnes par an. C'est une cardiomyopathie endémique qui affecte principalement les enfants et les femmes. Cette maladie se manifeste par une insuffisance cardiaque aiguë ou en un élargissement chronique du cœur modéré ou sévère et pouvant s'avérer fatal. Elle se manifeste dans les régions sélénoprives où la consommation journalière est très faible de l'ordre de 10 à 15  $\mu\text{g}/\text{j}$  (Fordyce 2005).
- La maladie de Kashin-Beck est une ostéoarthropathie endémique (retard dans le développement des pieds et des mains) à l'origine de déformations des articulations affectées (Fig 1.10). Elle est caractérisée par une ostéoarthrite dégénérative chronique qui invalide les personnes affectées. Elle touche les articulations périphériques et la colonne vertébrale par l'apoptose des tissus du cartilage. Dans un cas extrême, cette maladie peut se caractériser par un nanisme (Fig 1.10). Les résultats de nombreuses études suggèrent que la maladie de Kashin-Beck est multifactorielle : un déficit en sélénium ainsi qu'en iode semble être lié à cette maladie.



**Figure 1.10.** Photos des patients atteints de la maladie de Kechan-Bech : (A) déformations des mains et (B) patiente atteinte versus non-atteinte (Tan 1989)

#### 1.3.2.2.3. Réponses biologiques de l'organisme en cas d'excès en sélénium

Les cas de sélérose (excès de sélénium) sont moins répandus que ceux liés à une déficience en sélénium. La valeur précise de la dose nocive en sélénium pour les humains est encore incertaine mais cependant, l'organisation mondiale de la santé (OMS) préconise un apport maximum de 400  $\mu\text{g}/\text{j}$  par adulte (World Health Organization et al. 1996). Il a été proposé en France que la dose limite de sécurité soit réduite à 150  $\mu\text{g}/\text{j}$  (Martin 2000).

La toxicité du sélénium chez l'homme dépend de sa forme chimique. Mais il n'existe pas à ce jour de consensus sur le degré de toxicité des différentes formes de sélénium. Cependant, d'après l'OMS, les formes inorganiques seraient plus toxiques que les formes organiques. De plus, au sein des formes inorganiques, le sélénite serait plus néfaste que le séléniate (Dodig and Cepelak 2004).

Lors d'une intoxication aiguë, la dose létale 50 (entraînant la létalité de 50 % de la population) est estimée entre 0,5 et 1 g sous forme de sélénite ou séléniate de sodium (Thérond et al. 1997). Ce type d'intoxication entraîne des irritations bronchiques et dermiques, des troubles intestinaux (vomissements, diarrhée, douleur), des troubles cardiaques, une odeur spécifique de la peau et de l'haleine (odeur alliagée), des anomalies des cheveux et ongles, des neuropathies périphériques ainsi qu'une irritabilité et une fatigue exacerbées.

Lors d'une intoxication chronique, de très nombreux symptômes peuvent se manifester :

- Des signes neurologiques centraux (épisodes convulsifs), périphériques (polynévrites, multinévrites) ainsi que des paralysies partielles
- Des symptômes de la sphère oto-rhino-laryngologique : rhinite chronique, épistaxis, parfois anosmie
- Des pneumonies et présences de fluides dans les poumons
- Des troubles gastro-intestinaux : nausées, vomissements, diarrhées, dyspepsie, douleurs gastriques voire anorexie
- Des troubles cutané-phanériens : lésions érythémateuses de la peau et du cuir chevelu, fragilité et sécheresse voire perte capillaire, fragilité unguéale (mouchetage, stries horizontales, changement de couleur, cassure voire la perte des ongles)
- D'une odeur alliacée de l'haleine et de la sueur (goût alliacé)
- Une mauvaise santé dentaire (caries, décoloration) voire une perte des dents
- Une forte asthénie, irritabilité, instabilité émotionnelle, dépression
- Une diminution de la mobilité des spermatozoïdes
- L'augmentation de plusieurs cancers comme pancréatique ou de la peau

Les effets néfastes du sélénium peuvent être dus à des interférences avec le métabolisme du soufre (inhibition de systèmes enzymatiques lors des remplacements des groupements thiols -SH dans protéine par des groupements -SeH) ou à une inhibition de la glutathion par le sélénite (entraînant l'augmentation de radicaux libres) (Thérond et al. 1997).

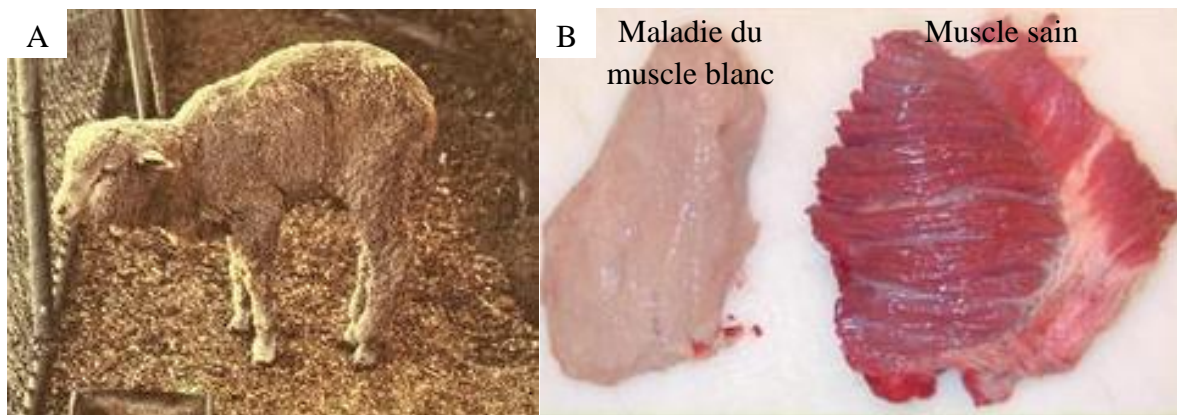
### ***1.3.3. Le sélénium chez les animaux***

Les animaux domestiques ont besoin de 3 à 6 fois plus de sélénium que l'homme (Kabata-Pendias and Mukherjee 2007). Comme pour les humains, la source de sélénium provient en très grande majorité de leur alimentation.

Pour le bétail et la volaille, le fourrage (environ 78 %) et les concentrés (environ 20 %) constituent la base de leur alimentation. Les plantes fourragères utilisées sont diverses : l'herbe, les légumineuses ainsi que l'ensemble des parties aériennes de céréales telles que le maïs ou le sorgho... Les concentrés sont des compléments du fourrage riches en énergie et/ou en protéines. Les graines de céréales telles que le blé, l'orge le maïs en sont les principaux composants. Certaines protéagineuses (pois, lupin...), oléagineux (soja, colza, tournesol...) et coproduits des industries agro-alimentaires sont parfois utilisées. Les plantes

les plus exploitées pour leurs apports nutritionnels sont le maïs, l'orge et le blé. Cependant, le blé reste surtout utilisé pour l'alimentation humaine : si sa proportion dans une ration du bétail est trop élevée, elle peut entraîner des indigestions. La proportion entre ces 3 céréales dans l'alimentation animale dépend également des fluctuations des prix du marché.

Tout comme les humains, les animaux peuvent souffrir des symptômes de carence ou de toxicité en sélénium. Une déficience en sélénium provoque de multiples symptômes : apoptose hépatique, diathèse exsudative, fibrose du pancréas, faiblesse et dystrophie musculaire, réduction de la croissance, chétivité et réduction de la fertilité. La maladie la plus connue est celle du « muscle blanc » (Fig 1.11.A) : il s'agit d'une dystrophie musculaire (Fig 1.11.B) importante entraînant une diminution de l'alimentation et des complications cardiaques voire la mort. Afin de lutter contre le manque de sélénium, des suppléments séléniés alimentaires sont largement apportés à l'alimentation animale. Ces suppléments sont introduits soit directement à l'animal par voie injectable ou orale soit indirectement par application de sélénium sur les pâtures ou les champs de plantes destinées à l'alimentation animale.



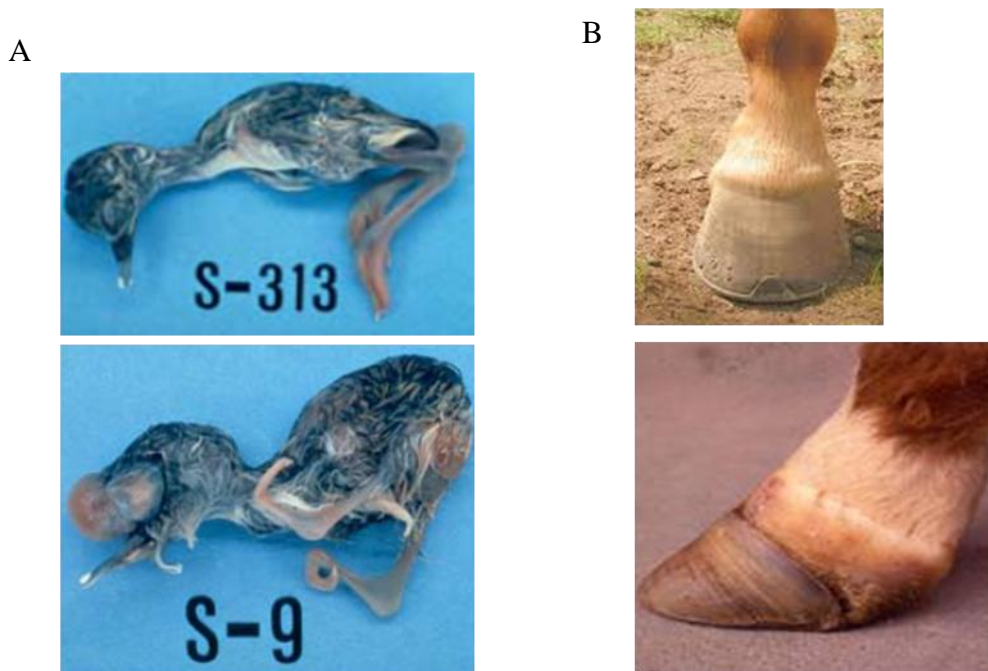
**Figure 1.11.** (A) Mouton atteint de la maladie du muscle blanc et (B) les conséquences sur la morphologie et l'aspect des muscles

Un apport excessif de sélénium chez les animaux peut entraîner :

- Des troubles intestinaux : vomissements, douleurs abdominales, diarrhées
- Grossissement et gonflement du pancréas, du foie, des reins du cœur
- Troubles respiratoires, essoufflements et spasmes tétaniques
- Réduction de la fertilité, malformation fœtale (Fig 1.12.A), mort fœtale
- Prostration
- Odeur haleine (ail)

Deux maladies particulières sont décrites :

- La maladie alcaline : elle fait suite à un empoisonnement chronique par l'ingestion de plantes riches en sélénium (5 à 40 mg/kg) et provoque une perte de vitalité, une forte maigreur, un pelage rugueux, la desquamation des sabots (Fig 1.12.B), une érosion des articulations et des os, une cirrhose du foie
- Le syndrome des « blind staggers » ou « animaux titubants » entraîne des affaiblissements et atteintes musculaires (y compris respiratoires) ainsi qu'une cécité totale.



**Figure 1.12.** Effets d'une intoxication en sélénium sur (A) les fœtus des oiseaux (Presser and Ohlendorf 1987) et (B) les sabots des équidés (photo témoin en haut)

## 2. LE SELENIUM CHEZ LES PLANTES SUPERIEURES

Les plantes représentent un maillon essentiel comme voie d'entrée du sélénium dans le réseau trophique. Elles en sont une source indispensable aussi bien dans l'alimentation humaine qu'animale. Les céréales en sont un exemple privilégié : leur teneur en sélénium est plus élevée que dans les autres plantes alimentaires (légumineuses, par exemple) et elles sont la base de l'alimentation animale et humaine dans certains pays (le riz en Bangladesh ou le maïs au Malawi, par exemple).

## **2.1. Sélénium : oligoélément essentiel pour les plantes ?**

La question de l'essentialité du sélénium chez les plantes supérieures n'est pas résolue et reste encore à ce jour très controversée (Eshdat et al. 1997, Läuchli 1993, Terry et al. 2000). Aucune expérience n'a pu réellement mettre en évidence le besoin de sélénium pour la croissance des plantes (Terry et al. 2000). Pour les animaux et les plantes le sélénium remplace le soufre dans les acides aminés. Cependant chez les plantes, les protéines peuvent être constituées indifféremment d'acides aminés contenant du soufre ou du sélénium (Brown and Shrift 1982).

Certaines études (Drotar et al. 1985, Kuroda et al. 1992, Stadtman 1996) ont essayé d'identifier chez les plantes des protéines Se-dépendantes spécifiques, comme cela est le cas chez les animaux. Elles ont mis en évidence une activité similaire au GP<sub>x</sub> des animaux. Cependant, la composition des GP<sub>x</sub> des plantes n'est pas clairement établie. Certaines études concluent qu'il s'agit d'une sélénoprotéine similaire aux animaux (SeCys dans leur site actif) (Criqui et al. 1992, Sabeh et al. 1993) alors que d'autres démontrent que Cys est présente dans le site actif (Eshdat et al. 1997, Faltin et al. 1998). Cependant, une GP<sub>x</sub> animale mutée, contenant des Cys à la place des SeCys, a une activité enzymatique beaucoup plus faible que la GP<sub>x</sub> native (Axley et al. 1991, Eshdat et al. 1997). Le sélénium ne semblerait donc pas être un micronutriment indispensable aux plantes.

## **2.2. Classifications des plantes**

Après des recherches effectuées aux USA, l'organisme North American Flora a proposé une classification des plantes selon leur comportement vis-à-vis du sélénium (Brown and Shrift 1982) :

- Les plantes non-accumulatrices ont une teneur en Se inférieure à 25 µg/g de matière sèche (MS)
- Les plantes accumulatrices peuvent contenir de 25 à 1000 µg de Se par gramme de MS
- Les plantes hyper-accumulatrices accumulent plusieurs milliers de µg de Se par gramme de MS

Plus récemment, les limites et les termes désignant ces trois classes ont été légèrement modifiés (Broadley et al. 2006, Dhillon and Dhillon 2003, Ellis and Salt 2003, White et al. 2004) -classification utilisée dans la suite du manuscrit- :

- Les plantes non-accumulatrices contiennent jusqu'à 100 µg de Se par gramme de MS
- Les plantes indicatrices accumulent entre 100 et 1000 µg de Se par gramme de MS
- Les plantes accumulatrices peuvent contenir jusqu'à 40000 µg de Se par gramme de MS

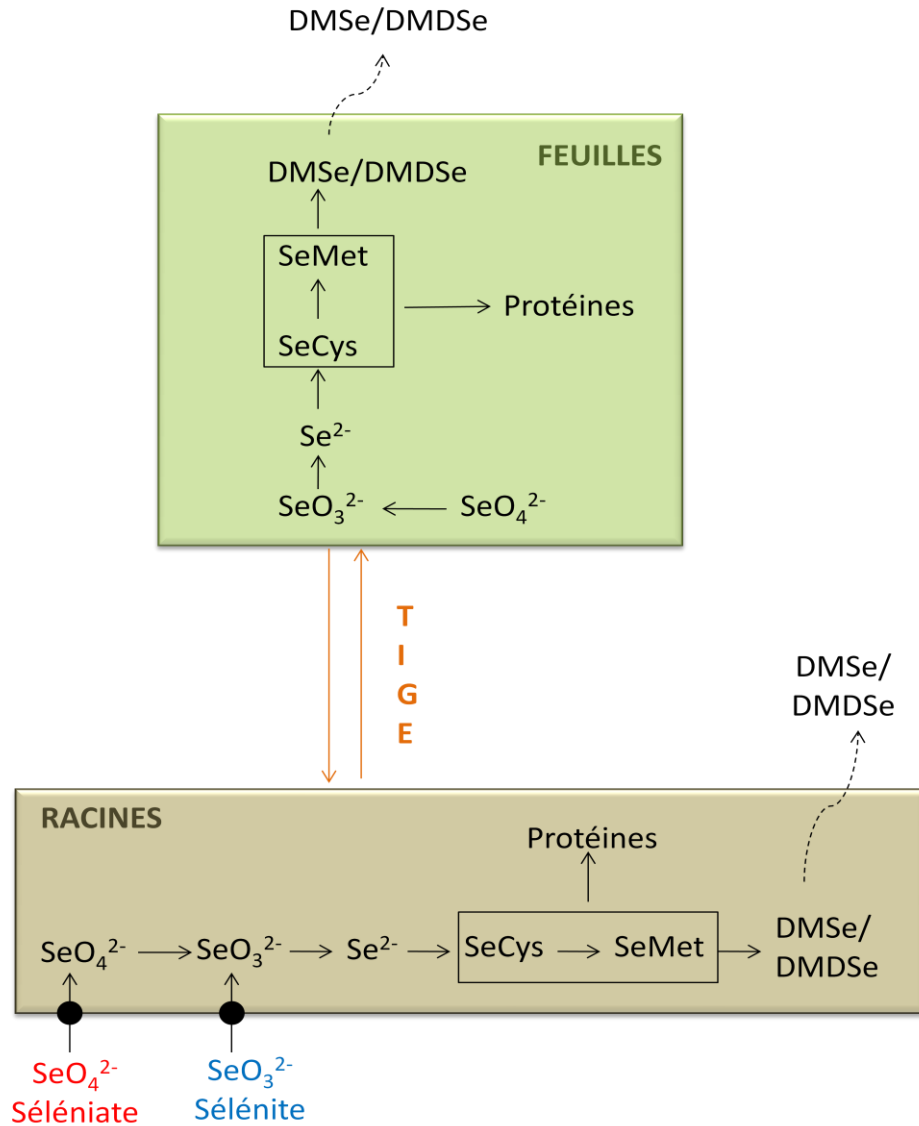
A la base de ces deux classifications, les plantes ont été récoltées sur une zone riche en sélénium, comme par exemple dans les régions Ouest des USA. **Ni la concentration, ni la spéciation** du sélénium présent dans le milieu de culture ne sont précisées. Ainsi dans ces classifications, les conditions de cultures non spécifiées amènent un biais quant aux limites entre des différentes classes de plantes. Cependant, comme nous allons le mettre en évidence dans les paragraphes suivants, ces deux conditions de culture sont déterminantes dans le métabolisme d'accumulation du sélénium dans les plantes.

### **2.3. Métabolisme du sélénium chez les plantes supérieures**

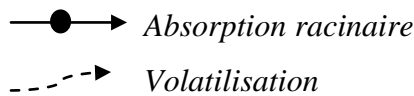
#### ***2.3.1. Généralités***

Comme l'ensemble des éléments disponibles dans la solution du sol, le sélénium est absorbé via le système racinaire. Puis, le sélénium absorbé peut suivre différentes voies métaboliques (Fig 1.13) : (i) la translocation des racines aux parties aériennes (c'est-à-dire tiges, feuilles et appareils reproducteurs); (ii) la métabolisation des formes inorganiques en sélénoacides aminés, tels que SeMet et SeCys, qui pourront composer l'ensemble des chaînes protéiques, (iii) la biométhylation et volatilisation des composés sélénométhylés tels que le DMSe et le DMDSé. Les deux derniers processus peuvent s'effectuer aussi bien dans les racines que dans les parties aériennes des plantes.





**Figure 1.13.** Transformations métaboliques du sélénium dans une plante supérieure



Les études sur les voies métaboliques du sélénium dans les plantes (Arvy 1993, De Souza et al. 1998, Hopper and Parker 1999, Läuchli 1993, Li et al. 2008, Liu and Gu 2009, Mazej et al. 2008, Sors et al. 2005a, Terry and Zayed 1994, Terry et al. 2000, White et al. 2004, Ximenez-Embun et al. 2004, Zayed et al. 1998, Zhang et al. 2006, Zhang et al. 2003) sont principalement effectuées :

- Avec des plantes dites « accumulatrices » ou « indicatrices », telles que la moutarde indienne (plante accumulatrice modèle pour de nombreux éléments traces et ainsi que

pour le sélénium), le brocoli, ou des plantes à visées nutritionnelles comme le blé ou le riz

- Sur des plantes récoltées au stade végétatif
- Dans des systèmes de culture en hydroponie
- En présence d'une concentration élevée en sélénium, généralement supérieure à 2  $\mu\text{M}$  (soit environ 150  $\mu\text{g/L}$ ) de sélénium dans la solution nutritive

Seules les études sur l'accumulation du sélénium dans les grains de céréales sont généralement effectuées en monolithes de sol ou en champ en présence de fertilisant (Broadley et al. 2010, Cubadda et al. 2010, Kapolna et al. 2007, Mbagwu 1983, Moore et al. 2010, Smrkoj et al. 2007, Smrkoj et al. 2005, Stibilj et al. 2004).

L'ensemble de ces recherches a permis d'étayer les hypothèses sur le métabolisme du sélénium dans la plante. En dépit de ces nombreuses études, il n'existe pas encore de consensus sur les différentes voies du sélénium dans la plante, voire beaucoup d'études aboutissent à des résultats contradictoires. En effet, de nombreux paramètres semblent influencer le métabolisme du sélénium dans la plante parmi lesquels la spéciation et la concentration en sélénium source ainsi que la classe de la plante (« non-accumulatrice », « indicatrice » ou « accumulatrice ») seraient déterminants. **Dans la suite du manuscrit, l'ensemble des mécanismes d'absorption, accumulation, translocation et la métabolisation va être détaillé avec une attention particulière concernant l'influence de trois paramètres : la classe de la plante, la concentration ainsi que la spéciation du sélénium source.** En effet, la mobilité élevée du séléniate comparée au sélénite semble jouer un rôle clé dans l'absorption, la translocation et la métabolisation du sélénium dans la plante.

### *2.3.2. Effet sur la croissance*

La production de biomasse végétale est d'autant plus réduite que la concentration en sélénium est importante. La biomasse du lupin diminue de 30 % lorsque la concentration en sélénium est multipliée par 5 (soit entre une culture à 1 mg/L et 5 mg/L) (Ximenez-Embun et al. 2004). Il est de même pour la biomasse du ray-grass qui diminue de 25 % si la concentration en sélénite dans la solution de culture augmente de 150 à 800  $\mu\text{g/L}$ , et de 50 % si la concentration en séléniate dans la solution de culture augmente de 400 à 2000  $\mu\text{g/L}$  (Hopper and Parker 1999).

A même concentration, le sélénite entraîne une diminution de production de biomasse plus élevée que le séléniate. A même concentration (400 ou 800 µg/L), le séléniate n'affecte pas la biomasse du trèfle-fraise alors que le sélénite la diminue d'environ 15 %.

La croissance d'une plante accumulatrice, la moutarde indienne, est moins affectée que celle des plantes non-accumulatrices, comme le tournesol. En effet, cultivée avec du sélénite ou du séléniate (1 ou 5 mg/L), la biomasse de la moutarde indienne est peu affectée (soit une diminution au maximum de 20 %) alors que dans les mêmes conditions celle du tournesol diminue de 40 à 60 % (Ximenez-Embun et al. 2004).

D'autre part, en présence de sélénite seulement, la production végétale des parties aériennes est altérée (moins 30 % environ) alors que les racines ne présentent pas de différence avec des plantes témoins (cultivées sans sélénium) (Hopper and Parker 1999).

Pour finir, la durée d'exposition au sélénium est un paramètre très important : pour mettre en évidence un éventuel effet néfaste sur la production végétale, la plante doit créer une partie de sa biomasse durant l'absorption de sélénium.

### ***2.3.3. L'absorption racinaire***

La voie d'entrée du sélénium dans la plante s'effectue principalement par les racines. Le mécanisme d'absorption racinaire du séléniate est bien documenté. Plusieurs études (Cruz-Jimenez et al. 2005, Hopper and Parker 1999, Shibagaki et al. 2002, Sors et al. 2005a, Terry et al. 2000, Zhang et al. 2006) montrent que l'absorption du séléniate diminue pour des concentrations en sulfate élevées et en présence d'inhibiteurs du métabolisme (Li et al. 2008). En accord avec ces recherches et en raison de propriétés chimiques très similaires entre le sulfate et le séléniate, l'absorption du séléniate s'effectuerait via les transporteurs racinaires actifs du sulfate (Arvy 1993, Hopper and Parker 1999, Li et al. 2008, Terry et al. 2000, Zayed et al. 1998). Deux transporteurs sont impliqués dans l'absorption du sulfate :

- Les transporteurs dits de "haute affinité" sont exclusivement synthétisés dans les racines et possèdent une constante de Michaelis ( $K_m$ ) de 7-10 µM de sulfate (Leustek and Saito 1999, Shibagaki et al. 2002, Terry et al. 2000). Leur expression est influencée par la concentration en sulfate dans le milieu : la teneur en acide ribonucléique messager ( $ARN_m$ ) associée à ce transporteur est d'autant plus élevée que la concentration en sulfate diminue (Leustek and Saito 1999).

- Les transporteurs dits de « faible affinité » présents dans les racines et dans les feuilles, possèdent une  $K_m$  de 100  $\mu\text{M}$  de sulfate et ne sont pas sensibles à la concentration de sulfate dans le milieu (Leustek and Saito 1999, Terry et al. 2000).

Les études sur l'expression des gènes des transporteurs de « haute-affinité » et « faible-affinité » ont démontré que la surexpression des transporteurs de « haute-affinité » augmente l'absorption de séléniate dans la moutarde indienne, ce qui n'est pas le cas pour les transporteurs de « faible-affinité ». D'autre part, la présence de séléniate dans un milieu nutritionnel pauvre au sulfate provoque une forte augmentation de l'expression des gènes des transporteurs de « haute-affinité » (Yoshimoto et al. 2002). L'ensemble de ces résultats supporte l'hypothèse que l'absorption du séléniate est effectuée via les transporteurs de « haute-affinité » de sulfate dans les plantes.

Les mécanismes d'absorption du sélénite ne sont pas aussi bien documentés et moins bien compris que celui du séléniate. Bien qu'aucun consensus n'existe sur l'absorption du sélénite, deux hypothèses sont néanmoins avancées :

- Absorption principalement passive. L'absorption du sélénite diminue de seulement 20 % en présence d'inhibiteur du métabolisme (l'hydroxylamine) et augmente légèrement en présence de glucose (Arvy 1993). L'application d'inhibiteurs de l'activité des aquaporines ( $\text{HgCl}_2$  et  $\text{AgNO}_3$ ) entraîne une forte diminution de l'accumulation du sélénite (Zhang et al. 2006). Arvy (1993) conclut qu'une faible partie est transportée activement mais que la majorité du sélénite est absorbée passivement via des cotransporteur  $\text{H}^+$ -hexose. Zhang *et al.* (2006) émet l'hypothèse que le sélénite est absorbé via des aquaporines.
- Absorption via des transporteurs actifs. Certaines études effectuées sur le blé, le ray-grass et le trèfle-fraise, montrent que plus la concentration en sulfate est élevée plus l'absorption du sélénite diminue (Hopper and Parker 1999, Li et al. 2008). De plus, Li *et al.* (2008) montrent que l'inhibiteur du métabolisme CCCP (carbonyle cyanide 3-chlorophenylhydrazone) provoque une diminution de l'absorption de 80 % du sélénite. Les données tendent à montrer que le sélénite est absorbé via les transporteurs actifs à phosphate.

### 2.3.4. *L'accumulation et la métabolisation*

#### 2.3.4.1. *Accumulation dans la plante entière*

La grande majorité des études montre que la quantité du sélénium accumulée dans la plante est supérieure en présence de séléniate qu'en présence de sélénite dans le milieu nutritif. Pour des concentrations supérieures à 2  $\mu\text{M}$  de sélénium dans la solution nutritive, l'accumulation du sélénium dans les plantes entières traitées avec du séléniate est 2 à 4 fois plus élevée que celle des plantes traitées avec du sélénite, et ceci pour plusieurs variétés de plantes : la moutarde indienne, le brocoli, le lupin blanc, le tournesol, la betterave et des fougères (De Souza et al. 1998, Srivastava et al. 2007, Terry et al. 2000, Ximenez-Embun et al. 2004, Zayed et al. 1998). Ainsi, le ratio séléniate/sélénite (concentration en sélénium dans la plante entière traitée avec du séléniate/celle traitée avec du sélénite) dans la plante entière varie entre 1,4 et 14,4 (Li et al. 2008, Srivastava et al. 2007, Ximenez-Embun et al. 2004).

Cependant, quelques résultats sont en contradiction avec ce postulat. Les études de Zayed *et al.* (1998) sur le riz exposé à 20  $\mu\text{M}$  de sélénium et de Li *et al.* (2008) sur le blé exposé à 10  $\mu\text{M}$  de sélénium montrent que l'accumulation en sélénium dans la plante entière est similaire qu'elle soit cultivée avec du séléniate ou du sélénite. Pour finir, seules les recherches de Zhang *et al.* (2003) et de Srivastava *et al.* (2007) concluent que les traitements avec du sélénite peuvent entraîner une accumulation plus élevée en sélénium dans les plantes que les traitements avec du séléniate, respectivement dans le soja (quelles que soient les concentrations en sélénium utilisées (entre 2 et 100  $\mu\text{M}$ ) ou dans les fougères (traitées avec 20 mg/L soit 253  $\mu\text{M}$ ). Dans ce dernier cas, le ratio séléniate/sélénite varie entre 0,4 et 0,8 selon les espèces de fougères.

#### 2.3.4.2. *Accumulation et distribution du sélénium dans les différents organes de la plante*

L'accumulation du sélénium n'est pas homogène dans l'ensemble de la plante mais dépend des organes étudiés : racines ou parties aériennes (soit les tiges et les feuilles au stage végétatif).

Avec du séléniate comme source de sélénium, la concentration du sélénium est plus élevée dans les parties aériennes que dans les racines. Le ratio parties aériennes/racines (concentration en sélénium dans les parties aériennes/ celle dans les racines) varie de 1,3 à 17,2 (De Souza et al. 1998, Li et al. 2008, Terry et al. 2000, Zayed et al. 1998). Ces études ont

été réalisées pour des concentrations en séléniate inférieures ou égales à 20  $\mu\text{M}$  pour plusieurs variétés de plantes. Non seulement le type mais également l'âge de l'organe influent sur la concentration en sélénium : d'après l'étude de De Souza *et al.* (1998), les feuilles jeunes sont plus riches en sélénium que les feuilles âgées. La feuille la plus jeune de la moutarde indienne accumule environ 10 fois plus de sélénium que la feuille la plus vieille. Néanmoins, De Souza *et al.* (1998) montre que chez la moutarde indienne, ce ratio est inférieur à 1 lorsque la concentration en séléniate varie entre 50 et 200  $\mu\text{M}$ . Il est en de même pour certaines fougères cultivées avec 20 mg/L (soit 253  $\mu\text{M}$ ) de séléniate (Srivastava *et al.* 2007). Chez le soja, Zhang *et al.* (2003) montre que quel que soit la concentration en séléniate en solution (entre 0,22 et 100  $\mu\text{M}$ ) la concentration en sélénium dans les racines est supérieure à celle des parties aériennes.

Si la source de sélénium est du sélénite, le ratio parties aériennes/racines est toujours inférieur à 1 ; il varie entre 0,04 et 0,47 (Arvy 1993, De Souza *et al.* 1998, Li *et al.* 2008, Srivastava *et al.* 2007, Terry *et al.* 2000, Ximenez-Embun *et al.* 2004, Zayed *et al.* 1998). Le sélénium reste donc en majorité dans les racines et est très peu transféré vers les parties aériennes. Cependant, les feuilles jeunes restent plus riches en sélénium que celles plus âgées ; la concentration dans la feuille la plus jeune est 1,6 fois plus élevée que celle de la feuille la plus âgée (De Souza *et al.* 1998). La différence de comportement de ces deux espèces anioniques s'explique par leur mobilité, le séléniate étant plus mobile que le sélénite.

A notre connaissance seul Li *et al.* (2008) ont étudié l'interaction entre le sélénite et le séléniate. Après avoir cultivé du blé en présence de 5  $\mu\text{M}$  de sélénite et de 5  $\mu\text{M}$  de séléniate conjointement, l'accumulation de sélénium dans la plante entière n'est pas affectée. Cependant, la distribution du sélénium dans la plante montre une interaction entre le sélénite et le séléniate. Lors d'un traitement mixte séléniate/sélénite, l'efficacité de la translocation du sélénium est plus faible que celle attendue obtenue par exposition au séléniate seul ou au sélénite seul.

#### 2.3.4.3. *Cinétiques d'accumulation dans différents organes de la plante en fonction de la concentration en sélénium*

Les cinétiques d'accumulation du sélénium nous renseignent sur la toxicité et la modification éventuelle du métabolisme en fonction de la concentration en sélénium dans le milieu. D'après l'étude de De Souza *et al.* (1998) effectuée sur la moutarde indienne, l'allure générale de la cinétique d'accumulation du séléniate dans les racines est linéaire pour des

concentrations dans le milieu variant entre 0,02 et 200  $\mu\text{M}$  de séléniate. La tendance globale de la cinétique d'accumulation du séléniate dans les parties aériennes est exponentielle. Elle est décrite par l'auteur comme linéaire pour des concentrations inférieures à 20  $\mu\text{M}$ , puis atteint un plateau entre 20 et 50  $\mu\text{M}$ , avant d'augmenter exponentiellement pour des concentrations supérieures à 50  $\mu\text{M}$  de séléniate. Ceci montre une modification du métabolisme de la plante entre les faibles et fortes concentrations affectant principalement l'accumulation du sélénium dans les parties aériennes.

Les résultats de De Souza *et al.* (1998), Li *et al.* (2008) et Zhang *et al.* (2006) sont identiques : la cinétique de l'accumulation du sélénite dans les racines est de type micéolienne-mendes. La présence d'un plateau, atteint à différentes concentrations selon les plantes étudiées, montre le caractère toxique du sélénite par rapport au séléniate. Plusieurs explications ont été proposées : soit une étape de la métabolisation du sélénite est saturée soit une rétroaction négative sur l'absorption racinaire du sélénite. Comme pour le séléniate, chez la moutarde indienne pour des concentrations inférieures à 20  $\mu\text{M}$ , les cinétiques d'accumulation dans les racines et les feuilles sont linéaires. Dans les racines, le taux d'accumulation est environ deux fois plus rapides pour les racines traitées au sélénite que celles traitées au séléniate alors que dans les feuilles le taux d'accumulation des feuilles traitées au séléniate est environ 3 fois plus rapides que celles traitées au sélénite.

Cependant, le temps de croissance des plantes en présence de sélénium est à nouveau un paramètre important. En effet, Zhang *et al.* (2003) a étudié les cinétiques d'accumulation entre 0 et 100  $\mu\text{M}$  chez le soja sur une durée de 24 H contre 7 jours pour De Souza *et al.* (1998). Il obtient des cinétiques d'accumulation linéaires en présence du séléniate et sélénite. Aucune modification ou toxicité n'a pu être mise en évidence en 24 H de croissance.

#### 2.3.4.4. *Processus de métabolisation du sélénium dans la plante*

##### 2.3.4.4.1. Les voies métaboliques

Au vue de la ressemblance chimique entre le soufre et le sélénium, l'ensemble de processus métaboliques du sélénium (Fig 1.14) est très proche voire similaire à celui du soufre (Läuchli 1993, Leustek and Saito 1999). Ces processus ont été identifiés lors d'expérimentations réalisées principalement sur des bactéries, des extraits purifiés de plantes ou chez des plantes transgéniques.

Les premières étapes cellulaires sont des réductions :

- Tout d'abord, le séléniate est réduit en adénosine phosphoséléniate (APSe) par l'adénosine triphosphate sulfurylase (ATPS) et d'adénosine triphosphate (ATP). Des études effectuées *in vitro* et sur des moutardes indiennes transgéniques (surexpression de l'ATPS) montrent que cette enzyme est responsable de la réduction du sulfate et du séléniate et surtout que cette étape est limitante dans la voie de métabolisation du sélénium (Leustek et al. 1994, Pilon-Smith et al. 1999).
- L'APSe est ensuite réduit en sélénite puis en séléniure. Deux hypothèses sur le mode de réduction sont actuellement avancées : (i) une réduction non-enzymatique accompagnée de la glutathion (GSH) réductase, via la formation d'un composé sélénite-glutathion ( $GS-SeO_3^{2-}$ ). Ces réactions ont été identifiées *in vitro*, chez *E.Coli* et dans le chloroplastes des petit-pois (Muller et al. 1997, Ng and Anderson 1978) ; (ii) une réduction enzymatique par l'APSe réductase et la sulfite réductase (Sors et al. 2005b). Cependant, il n'a pas été mis en évidence que ces deux enzymes pouvaient réduire le séléniate *in vivo*.

Le premier acide aminé formé est la SeCys. Tout comme la formation de cystéine à partir de sulfure, l'enzyme cystéine synthase est capable de synthétiser la SeCys à partir de séléniure ou GS-séléniure ( $GS-Se^-$ ) dans des extraits de feuilles. Une forte concentration de séléniure inhibe la formation de Cys et le sulfure inhibe la synthèse de SeCys. Il existe une compétition entre le séléniure et le sulfure envers cette enzyme (Dawson and Anderson 1988, Ng and Anderson 1978). Puis par analogie avec la synthèse de Met, la SeMet est produite à partir de la SeCys via la sélénocystathionine (SeCysth) et la sélénohomocystéine (SehomoCys).

Ces deux sélénoamino-acides ont deux devenir possibles :

- L'incorporation dans les protéines qui se réalise par substitution non-spécifique aux acides aminés, Cys et Met (Brown and Shrift 1981, Brown and Shrift 1982).
- La formation de composés volatils méthylés. De nombreuses voies de biométhylation sont étudiées entraînant l'intervention de multiples enzymes. La SeMet peut être méthylée et convertie en DMSe (Lewis et al. 1974). D'autre part, la SeMet ou la SeCys peuvent être les précurseurs de la *Se*-méthylsélénohomocystéine (SeMeSeCys) qui est convertie en DMSe (Meija et al. 2002).

#### 2.3.4.4.2. Spéciation et taux de métabolisation du sélénium

Dans les plantes traitées au séléniate, la concentration du séléniate représente entre 50 et 90% du sélénium total de la plante (De Souza et al. 1998, Li et al. 2008, Mazej et al. 2008,



Ximenez-Embun et al. 2004, Zayed et al. 1998). Le séléniate est majoritairement dans le parenchyme des feuilles matures (Pickering et al. 2000). De plus, quelques traces de SeMet, SeCys, SeMeSeCys et sélénite ont été identifiées (Li et al. 2008, Mazej et al. 2008, Ximenez-Embun et al. 2004) et sont principalement localisées dans le parenchyme des feuilles jeunes (Pickering et al. 2000). La SeMet peut représenter entre 6 et 20 % du sélénium dans les feuilles de tournesol (Mazej et al. 2006, Mazej et al. 2008, Ximenez-Embun et al. 2004).

Dans les plantes traitées au sélénite, la production de composés séléniés organiques est plus élevée que dans celles traitées au séléniate (De Souza et al. 1998, Li et al. 2008, Ximenez-Embun et al. 2004). Ces composés organo-séléniés peuvent représenter entre 80 et 98 % de la concentration totale de sélénium dans la plante (Ximenez-Embun et al. 2004). Différents composés dont les principaux sont le SeMet et SeMetSeCys sont détectés dans l'ensemble des tissus de la plante (De Souza et al. 1998, Li et al. 2008, Montes-Bayon et al. 2006, Pedrero et al. 2007, Ximenez-Embun et al. 2004). La SeMet représente entre 6 et 30 % du sélénium total des racines alors que la SeMetSeCys peut atteindre 50 % dans les feuilles (Pedrero et al. 2007, Ximenez-Embun et al. 2004). Des traces de sélénite sont également détectées (Li et al. 2008, Pedrero et al. 2007, Ximenez-Embun et al. 2004). Li *et al.* (2008) montrent que le sélénite ou les composés organiques issus de la métabolisation du sélénite inhibent le transfert de séléniate vers les feuilles via le xylème.

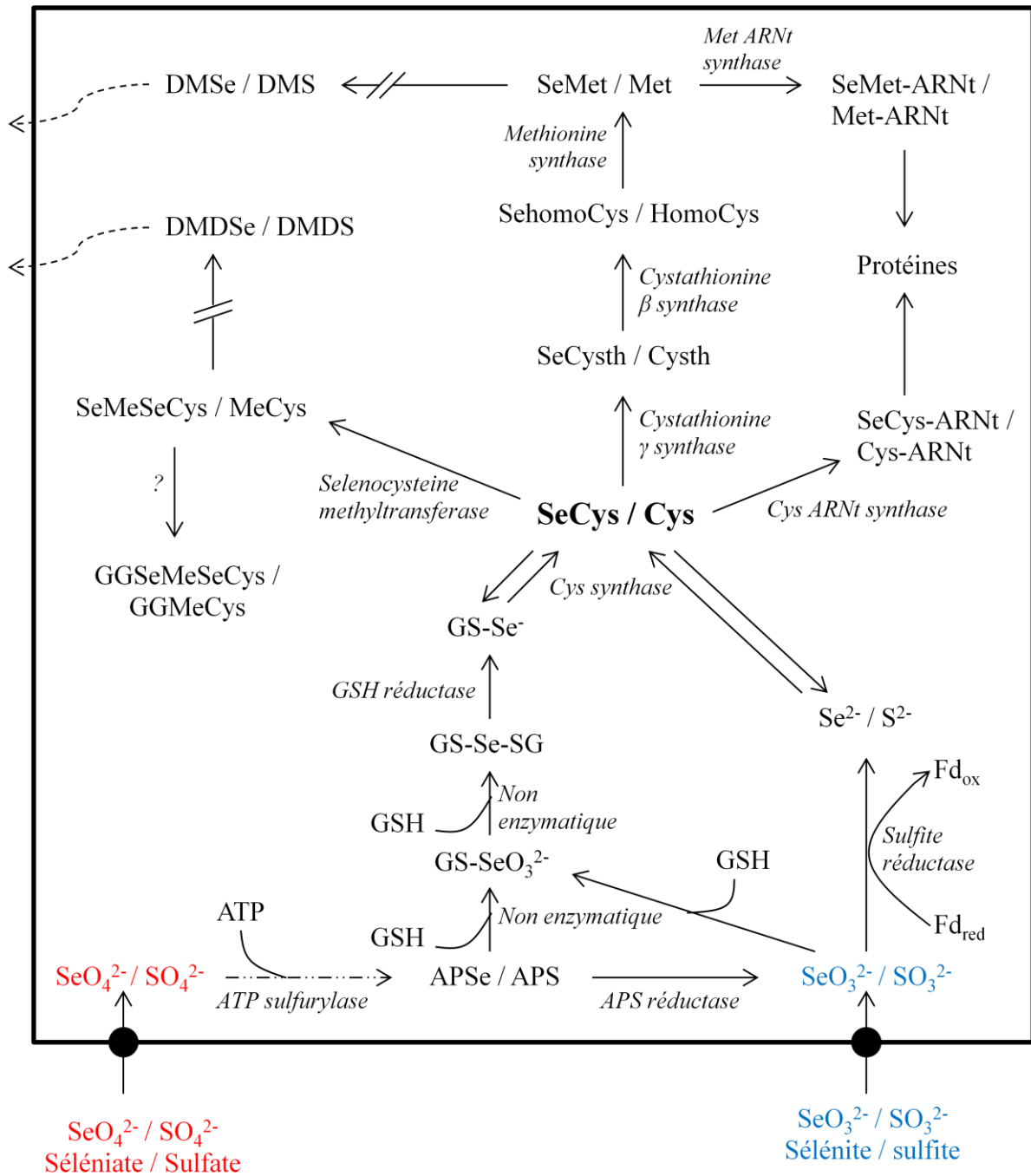
Pour finir, le taux de volatilisation peut être influencé par plusieurs paramètres :

- D'abord la forme chimique : le taux de volatilisation avec du sélénite comme source de sélénium est 1,3 à 3 fois plus élevé qu'avec du séléniate (De Souza et al. 1998, Terry et al. 1992, Zayed et al. 1998, Zayed and Terry 1994).
- Puis la concentration : ce taux augmente avec la concentration de sélénium dans le milieu (De Souza et al. 1998)
- La présence d'anions compétiteurs tels que les sulfates : plus la concentration en sulfate dans le milieu augmente plus le taux de volatilisation des plantes traitées avec du séléniate diminue ; cela n'affecte pas en revanche celui des plantes traitées au sélénite (Zayed et al. 1998, Zayed and Terry 1992).
- Enfin le type de plantes : toutes les espèces de plante n'ont pas la même capacité à volatiliser le sélénium : environ 2 µg de Se par g et par jour pour la moutarde indienne et le brocoli, environ 400 µg/g/j pour l'orge et le maïs, et aux alentours de 250 µg/g/j pour la betterave ou le haricot (De Souza et al. 1998, Terry et al. 1992).

2.3.4.4.3. Cas particuliers des plantes accumulatrices

Les plantes accumulatrices tolèrent mieux le sélénium car elles ont mis en place différents mécanismes afin de lutter contre ces effets toxiques. L'activité de l'enzyme cystathionine- $\beta$ -lyase est plus faible chez les plantes dites « accumulatrices » alors que celle de l'enzyme sélénocysteine méthyltransferase est plus élevée (Neuhierl and Boeck 1996, Peterson and Robinson 1972, Sors et al. 2005a). Ainsi, cette classe de plantes produit une quantité faible de SeMet mais importante de SeMeSeCys ou de SeCysth. La voie de synthèse de DMDSe est donc favorisée. Un dipeptide spécifique peut être synthétisé à partir du SeMet, le  $\gamma$ -glutamyle-sélénomethylsélénocysteine (GGSeMeSeCys) (Nigam et al. 1969, Terry et al. 2000). De cette façon, le taux de sélénoprotéines produites est très faible ; le métabolisme de la plante est donc moins perturbé.

Un autre processus permet une discrimination du SeCys lors de la synthèse de protéines. L'enzyme responsable de l'intégration de la cystéine, cysteinyl-acide ribonucléique de transfert (Cys-ARNt) synthase, ne reconnaît pas le SeCys comme substrat. Ce sélénoamino-acide n'est donc pas présent dans les protéines (Burnell and Shrift 1979, Terry et al. 2000).



**Figure 1.14.** Voies métaboliques du sélénium (versus soufre) dans les plantes supérieures. Schéma modifié d'après Hawkesford and Zhao (2007), Sors et al. (2005b) et Terry et al. (2000). Abréviations page xx.

- ▶ Absorption racinaire
- - - - -▶ Etape limitante du métabolisme
- - - - -▶ Volatilisation

### 2.3.5. *Les grains et semences*

Contrairement aux études sur l'absorption, l'accumulation et la métabolisation dans les racines et les feuilles, les recherches effectuées sur l'accumulation du sélénium dans les grains ou les semences sont principalement réalisées en sol (pots ou en champ) (Broadley et al. 2010, Chilimba et al. 2011, Cubadda et al. 2010, Eurola et al. 1991, Hammer et al. 1996, Kapolna et al. 2007, Lyons et al. 2004, Mbagwu 1983, Sager and Hoesch 2006). Seule l'étude de Lyons *et al.* (2009) sur la production de grains par *Brassica rapa* (le navet) en présence de sélénite est effectuée dans des conditions d'hydroponie. Dans les expériences réalisées en sol, le sélénium est soit présent naturellement soit enrichi artificiellement ; les concentrations et les formes de sélénium biodisponibles pour les plantes sont rarement connues.

Quelles que soient les conditions de culture des plantes, la biomasse des graines et du reste de la plantes n'est pas négativement affectée par la présence de sélénium (Broadley et al. 2010, Cubadda et al. 2010, Lyons et al. 2009, Mbagwu 1983, Singh 1991). Pour *Brassica rapa*, le sélénite (0,05  $\mu\text{M}$  en solution) est même bénéfique pour le nombre de grains : chaque plante traitée au sélénite produit 43 % plus de graines que les plantes témoins, sans que le poids des graines ne soit modifié (Lyons et al. 2009).

D'après la littérature, la concentration accumulée par les grains de blé, de riz ou de maïs enrichis en sélénium varie entre 10 et 3000 ng/g de Se (Chilimba et al. 2011, Eurola et al. 1991, Gupta and Winter 1989, Lyons et al. 2009, Lyons et al. 2004, Mbagwu 1983, Sager and Hoesch 2006, Singh 1991). Seuls les grains de blé récoltés dans la région sélénifère de Nawanshahr-Hosshiarpur en Inde, possèdent des concentrations en sélénium très élevées, entre 29 et 185  $\mu\text{g/g}$  (Cubadda et al. 2010). Chilimba *et al.* (2011) a montré que la concentration accumulée dans les grains de maïs ne dépendait pas de la concentration de sélénium totale dans le sol, ni de celle de la fraction extractible au  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , ni de la teneur en matière organique, par contre cette valeur augmente avec le pH. Ces résultats sont contradictoires avec l'étude de Singh et al. (1991) : la teneur dans les grains de blé est élevée lorsque le pH diminue. D'autre part, dans certaines études (Mbagwu 1983, Sager and Hoesch 2006, Singh 1991), l'augmentation de la quantité d'amendement en sélénium est associée à un accroissement de l'accumulation de sélénium dans les graines ; mais cette tendance n'a pas été vérifiée dans d'autres cas (Gupta and Winter 1989, Singh 1991). Le sélénium dans le grain de blé est principalement localisé dans les protéines entourant les granules d'amidon, dans les cellules de l'endosperme et d'aleurone (Lyons et al. 2004, Moore et al. 2010). Quelques rares

recherches portent sur la forme de sélénium versus l'accumulation dans les grains : dans les cultures de blé et d'orge fertilisées avec des granules de sélénium, la concentration des grains traités au séléniate est plus élevée que celle des grains traités au sélénite (Gissel-Nielsen 1986, Gupta and Winter 1989, Singh 1991).

D'après Cubadda *et al.* (2010), Mbagwu (1983) et Gissel-Nielsen (1986), les grains accumulent autant, voire plus de sélénium que les parties végétatives aériennes (tiges et feuilles) quelle que soit la forme de sélénium apportée. Le ratio « grains/parties végétatives aériennes » (concentration de sélénium dans les grains sur celle dans les parties végétatives aériennes) varie entre 1,1 et 2,4 pour le blé, le maïs et l'orge. Cependant, dans les navets traités au sélénite en hydroponie, ce ratio (0,6) est inférieur à 1.

Quelles que soient les conditions de culture (formes ou concentrations en sélénium, conditions de culture) le sélénium dans les grains est en grande majorité sous forme de composés organiques. Cubadda *et al.* (2010) a détecté en moyenne seulement 6 % de séléniate. L'espèce majoritaire dans les grains est la SeMet: sa proportion varie entre 21 % et 90 % du sélénium total (Cubadda *et al.* 2010, Kapolna *et al.* 2007, Lyons *et al.* 2004, Smrkolj *et al.* 2007, Smrkolj *et al.* 2005). Smrkolj *et al.* (2007) a détecté jusqu'à 40 % de SeMeSeCys et 23 % de composés séléniés non identifiés dans le haricot.

### ***2.3.6. Bilan sur le sélénium dans la plante supérieure***

Pour conclure sur les voies métaboliques de sélénium chez les plantes :

- Le séléniate semble être moins toxique que le sélénite pour la croissance des plantes. Il est peu métabolisé en molécules organiques et étant très mobile, il est facilement transféré vers les feuilles.
- Au contraire, le sélénite est plus toxique pour le développement de la plante. Moins mobile que le séléniate, il est rapidement métabolisé en sélénoamino-acides et est principalement stocké dans les racines.
- Pour finir, les grains semblent être un organe privilégié de stockage du sélénium, sous forme de SeMet.

Nous rappelons néanmoins que tous les processus énoncés dans les paragraphes précédents sont des conclusions tirées d'expériences réalisées dans des conditions très variables concernant la forme et/ou la concentration en sélénium, le temps de croissance des plantes en présence de sélénium, l'âge aussi bien que les espèces des plantes.

#### **2.4. Amélioration de la valeur nutritive des plantes vis-à-vis du sélénium**

Actuellement, la moitié de la population mondiale souffre de malnutrition : manque de fer, zinc, calcium, magnésium, cuivre, iode et sélénium. Pour lutter contre ces manques nutritionnels, plusieurs solutions sont employées. Les apports peuvent être corrigés en diversifiant la provenance et la variété des aliments, en ingérant des suppléments alimentaires minéraux, via la fortification alimentaire ou la biofortification des cultures. Les pratiques agraires actuelles ont pour but ultime de produire assez d'aliments sains suffisamment nutritifs pour l'ensemble de la population. Pour ce faire, deux stratégies sont mises en avant : l'augmentation des rendements des cultures et l'amélioration des concentrations en micronutriments efficaces pour la population (Zhao and McGrath 2009). La biodisponibilité du sélénium dans la rhizosphère, la concentration et la forme de sélénium accumulé mais également la distribution du sélénium dans la plante sont les paramètres étudiés dans ce cas : l'objectif étant d'avoir un maximum de sélénium situé dans les parties végétales consommées par les animaux et les humains. Il existe deux stratégies de biofortification : la biofortification agronomique et la biofortification génétique (Broadley et al. 2006, Hawkesford and Zhao 2007, White and Broadley 2009). La biofortification agronomique consiste à adapter les pratiques agricoles pour accroître la concentration du sélénium dans les parties consommables de la plante. La biofortification génétique consiste à sélectionner des plantes génétiquement adaptées à l'accumulation de sélénium dans les parties consommables ou à la fabrication de plantes transgéniques. Elle a l'avantage d'utiliser peu de fertilisants agricoles.

Les stratégies de biofortification agronomique reposent sur l'application de fertilisant et/ou sur la solubilisation et la mobilisation des éléments minéraux dans le sol (modification du pH, potentiel redox par exemple). Nous nous concentrerons sur le premier point. Pour enrichir les fourrages et les grains en sélénium plusieurs techniques sont actuellement testées :

- Utilisation de fertilisant liquide (Broadley et al. 2010, Yang et al. 2003)
- Utilisation de fertilisant solide du type superphosphate, PK ou NPK ou amendement de sol naturellement riche en sélénium (Broadley et al. 2010, Eurola et al. 1991, Gissel-Nielsen 1971b, 1986, Singh 1991)
- Application foliaire (Chen et al. 2002, Fang et al. 2008, Gissel-Nielsen 1975, 1986, Hu et al. 2002, Poggi et al. 2000, Smrkoj et al. 2007, Smrkoj et al. 2005, Stibilj et al. 2004, Yang et al. 2003)

- Imbibition des graines dans une solution riche en sélénium avant le semis (Gissel-Nielsen 1975, Smrkoj et al. 2007)

Dans tous les cas, l'utilisation de ces techniques entraîne l'augmentation du sélénium dans la plante et notamment dans les graines. Par exemple, en Finlande, des fertilisants de séléniate de sodium sont appliqués sur les cultures de blé et de riz depuis 1984. Suite à ces ajouts, les concentrations en sélénium ont augmenté d'un facteur 20 à 30 (Euroola et al. 1991). D'après Broadley *et al.* (2010), l'application d'un fertilisant liquide est plus efficace que d'un fertilisant solide. Ces fertilisants ainsi que l'imbibition des grains avant semis restent moins efficaces qu'une application foliaire (Gissel-Nielsen 1986, Smrkoj et al. 2007, Yang et al. 2003). En effet, une application d'une solution de 10 mg/L de séléniate est 3,3 fois plus efficace que l'imbibition des graines dans cette même solution (Smrkoj et al. 2007). De plus, la concentration en sélénium dans du riz traité par application foliaire de séléniate est 36 % plus élevée que celle du riz traité par application foliaire de sélénite (Chen et al. 2002). L'application foliaire semble être la technique la plus efficace, bien qu'elle soit aussi très polluante pour l'environnement en particulier pour les sols, les eaux souterraines et superficielles.

## **2.5. Le sélénium et la nutrition minérale de la plante**

La présence d'éléments traces métalliques affecte l'accumulation de macronutriments et de micronutriments nécessaires au bon fonctionnement métabolique de la plante (Kabata-Pendias and Pendias 2001). Comme présenté dans le paragraphe sur le métabolisme du sélénium dans la plante, le sélénium peut interférer sur le métabolisme d'autres éléments, notamment sur celui du soufre (Cruz-Jimenez et al. 2005, Hopper and Parker 1999, Zayed and Terry 1992, 1994).

De plus, le sélénium est un antioxydant chez l'homme. Chez les plantes, le séléniate aurait deux rôles antinomiques selon sa concentration : des études réalisées sur sol avec des apports faibles en sélénium (Hartikainen et al. 2000, Xue et al. 2001) montrent qu'il jouerait un rôle d'antioxydant principalement lors de la sénescence des plantes (Xue et al. 2001) alors que pour des apports plus élevés, le sélénium serait un pro-oxydant (Hartikainen et al. 2000) ; la quantité des dérivés d'oxygène réactifs augmente dans les cellules et provoque l'oxydation des protéines, de l'ADN et des lipides membranaires. La perméabilité membranaire augmente et l'ensemble du métabolisme de la plante est donc modifié.

Peu d'études ont été réalisées sur l'effet du sélénium sur l'accumulation des cations essentiels à la croissance de la plante et quand ils existent les résultats ne sont pas univoques. Ces différentes études sont réalisées sur des cellules végétales de pervenche (Arvy et al. 1995), sur des plantes herbacées (fétuque, trèfle blanc, moutarde ou fougère) (Fargasova et al. 2006, Feng et al. 2009, Kopsell et al. 2000, Wu and Huang 1992) ou du maïs (Hawrylak-Nowak 2008, Pazurkiewick-Kocot et al. 2003) cultivés en hydroponie. La forme du sélénium source est essentiellement du sélénite (Arvy et al. 1995, Fargasova et al. 2006, Feng et al. 2009, Hawrylak-Nowak 2008, Pazurkiewick-Kocot et al. 2003), dans peu de cas du séléniate (Arvy et al. 1995, Kopsell et al. 2000) et aucune étude n'a été réalisée en présence d'un mélange de sélénite et séléniate ; parfois elle n'est tout simplement pas renseignée (Wu and Huang 1992). Seule l'étude sur des cellules végétales d'Arvy *et al.* (1995) compare l'effet du séléniate et du sélénite sur l'accumulation des cations essentiels. Pour finir, les expérimentations sont effectuées à concentrations extrêmement variables (de 1 µg/L à 10 mg/L). **Pourtant, la forme ET la concentration en sélénium ne sont pratiquement jamais étudiées conjointement. De plus, dans l'ensemble des études citées les plantes ne sont qu'à un stade juvénile de leur développement.**

Nous allons donc dans un premier temps revenir sur les fonctions et accumulation des différents éléments, tel que les macroéléments (calcium, magnésium) et les micronutriments (fer, zinc, cuivre et manganèse). L'énumération des fonctions ne sera pas exhaustive : uniquement celles pouvant éventuellement interférer avec le soufre et donc le sélénium seront présentées. Puis nous discuterons sur les possibles interactions du métabolisme de ces éléments pour la plante avec celui du sélénium.

### **2.5.1. Les cations majeurs**

#### **2.5.1.1. Le calcium**

Le calcium (Ca) est un cation divalent qui joue un rôle essentiel dans l'intégrité, la stabilité et le bon fonctionnement des membranes et des organites. Il participe donc au maintien structurel de nombreuses enzymes membranaires comme les ATPases. Il participe également à la balance anions-cations et l'osmorégulation des cellules en agissant comme contre-ion des anions organiques ou inorganiques. Le calcium est un messager secondaire dans certaines réponses hormonales et aux facteurs environnementaux.



Concernant l'effet du sélénium sur le calcium, en présence de séléniate et quelque soit la concentration (entre 1 µg/l et 9 mg/L) dans la solution nutritive, l'accumulation de calcium n'est pas modifiée (Arvy et al. 1995, Kopsell et al. 2000). Il en est de même pour les cellules végétales cultivées avec du sélénite (entre 1 et 100 µg/L) (Arvy et al. 1995). Cependant, une étude effectuée sur la fougère (Feng et al. 2009) montre que lorsque les plantes sont cultivées en hydroponie à des concentrations inférieures à 2 mg/L de sélénite, la teneur en calcium diminue dans les feuilles et les racines. Cependant, lorsque la concentration en sélénite dépasse 2 mg/L, la concentration en calcium augmente dans la plante (Feng et al. 2009, Wu and Huang 1992). Il en est de même dans les parties aériennes de maïs cultivé avec plus de 4 mg/L de sélénite (Hawrylak-Nowak 2008). Cette augmentation s'effectue principalement au niveau des racines de la fougère (cultivée avec plus de 2 mg/L de sélénite) (Feng et al. 2009) et aussi du maïs (cultivée avec seulement 40 µg/L de sélénite) (Pazurkiewick-Kocot et al. 2003). Le sélénium entraîne, selon sa concentration en solution nutritive, une modification différentielle de l'accumulation du calcium dans les racines et les feuilles des plantes.

#### 2.5.1.2. *Le magnésium*

Le magnésium (Mg) intervient dans l'activité photosynthétique en tant qu'atome central de la chlorophylle et le coenzyme des carboxylases. L'activité de plusieurs enzymes nécessite la présence de magnésium comme par exemple la glutathion synthase responsable de la synthèse du glutathion ou des ATPases responsables de la phosphorylation d'ATP. En effet, il a été mis en évidence que le complexe Mg-ATP, plutôt que l'ATP libre, est le substrat des ATPases. De plus, le magnésium est indispensable à la phosphorylation de l'adénosine diphosphate (ADP) en ATP. Cet élément est donc indispensable pour l'ensemble des processus nécessitant de l'énergie comme la réduction du séléniate ou la synthèse de protéines et d'amidon.

Dans la fêtuque et le trèfle blanc, la présence de 2 mg/L de sélénium n'entraîne pas de modification d'accumulation de magnésium (Wu and Huang 1992). Les cultures de cellules végétales montrent également que pour des concentrations inférieures à 100 µg/L, le séléniate n'affecte pas l'accumulation du magnésium (Arvy et al. 1995). Au contraire, Kopsell *et al.* (2000) a mis en évidence que la concentration en magnésium augmentait quadratiquement avec la concentration en séléniate (entre 3 et 9 mg/L).

L'effet du sélénite sur la concentration du magnésium est aussi divergeant. L'étude de Hawrylak-Nowak (2008) montre que le sélénite n'a pas d'effet sur l'accumulation du magnésium quelque soit sa concentration (entre 0,4 et 8 mg/L). Une autre travail (Arvy et al.

1995) met en évidence une influence positive d'un faible enrichissement en sélénite (à 20 et 100 µg/L). L'étude de Feng *et al.* (2009) montre que l'accumulation du magnésium fluctue en fonction de la concentration en sélénite. Dans les racines, elle diminue légèrement pour des concentrations entre 1 et 2 mg/L de sélénite puis remonte à sa concentration initiale en magnésium entre 5 et 20 mg/L de sélénite. Au contraire, dans les feuilles, elle augmente entre 1 et 5 mg/L de sélénite puis décroît jusqu'à sa concentration initiale

### ***2.5.2. Les oligoéléments : fer, zinc, manganèse et cuivre***

Les métalloprotéines (MT) sont des protéines contenant un ou plusieurs cations métalliques comme le fer (Fe), le zinc (Zn), le cuivre (Cu) ou le manganèse (Mn). Dans ces complexes, le métal peut avoir trois fonctions : catalytique, co-catalytique et structurale. Il peut se lier à différents acides aminés comme l'histidine, la glutamine, l'asparagine mais principalement la cystéine. Les MT ont de multiples fonctions. La principale est leurs activités enzymatiques dans les réactions d'oxydoréduction. Par exemple, les cytochromes de fer ou de cuivre sont des coenzymes indispensables dans la chaîne respiratoire. Une MT très importante est la superoxyde dismutase (SOD) catalysant la dismutation du superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène. Elle protège ainsi les cellules des effets néfastes des superoxydes dus à leur caractère très oxydant. Plusieurs ions peuvent être cofacteurs de cette enzyme : le fer, l'association cuivre-zinc et le manganèse (Marschner 1995, Prochazkova *et al.* 2001). Chez le maïs les trois cofacteurs coexistent au sein des cellules chlorophylliennes : la Fe-SOD est localisée dans le chloroplaste, la Mn-SOD dans les mitochondries et la CuZn-SOD dans les chloroplastes et le cytosol (Alscher *et al.* 2002, Prochazkova *et al.* 2001). Certaines MT ont pour fonction de protéger la plante contre l'excès de métaux. Ces molécules sont riches en Cys. Lorsque la molécule est réduite, les complexes tétraédriques (quatre Cys + le cation métallique) se forment : la cellule est ainsi protégée contre la toxicité de ce cation. Cependant, si les MT sont oxydées, un pont disulfure (-S-S-) se forme et libère le cation. Les MT luttent contre la toxicité des cations métalliques mais peuvent servir également à stocker certains de ces cations, zinc ou cuivre, dans les tissus en croissance.

Chaque cation métallique possède également des fonctions spécifiques dans la plante.

### 2.5.2.1. *Le fer*

Le fer (Fe) est un micronutriment indispensable aux plantes ; il peut même être considéré comme un macroélément. Le fer a un rôle central et double vis-à-vis des radicaux libres dans les plantes. A l'état libre, il participe à la formation des radicaux hydroxyles et des anions superoxydes via la réaction de Fenton. D'autre part, il est un constituant de nombreuses enzymes antioxydantes : catalase, ascorbate peroxydase ou la ferro-SOD. Le fer est un constituant de groupement catalytique de nombreuses MT enzymatiques dans les processus d'oxydoréduction : dans des enzymes antioxydantes comme catalase, ascorbate peroxydase ou ferro-SOD ou dans les ferrédoxines. Par exemple, les ferrédoxines sont des protéines fer-soufre qui participent au transfert des électrons, notamment lors de la réduction du sélénite (ou sulfite) en séléniure (sulfure) via la sulfite réductase (Beinert 2000).

L'effet du sélénium sur l'accumulation du fer est différent selon les études. En présence de faible concentration en séléniate (inférieure à 100 µg/L) aucune influence du séléniate sur la concentration en fer n'est observée (Arvy et al. 1995) ; cependant elle diminue si la concentration en séléniate dépasse 3 mg/L (Kopsell et al. 2000).

Chez la fougère, en présence de sélénite à une concentration supérieure à 1 mg/L, la concentration en fer dans les racines diminue d'environ 50 % (Feng et al. 2009). Dans les feuilles, où la concentration en fer est beaucoup plus faible que dans les racines, la teneur en fer diminue en présence de 1 et 2 mg/L de sélénite ; puis elle retrouve sa valeur initiale quand la concentration en sélénite augmente (entre 5 et 20 mg/L)(Feng et al. 2009). Au contraire, à 2 mg/L de sélénium chez la fétuque et le trèfle blanc et à moins de 100 µg/L de sélénite chez les cellules végétales de pervenche, le sélénium ne modifie pas l'accumulation en fer (Arvy et al. 1995, Wu and Huang 1992).

### 2.5.2.2. *Le zinc*

Les MT de zinc (Zn) interviennent dans la réplication et la transcription de l'ADN et la régulation des gènes. Par exemple, Le zinc permet la formation d'un motif caractéristique dans les protéines, le doigt de zinc qui est une zone d'interaction protéine/ADN privilégiée. D'autre part, comme pour le magnésium, dans les feuilles il existe des pyrophosphatases inorganiques (pompe à proton) Zn-dépendantes. Le zinc joue également un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité des membranes : le zinc effectue des liaisons des phospholipides et des groupements sulfhydryles des sulfolipides des membranes. Il permet aussi de lutter contre

les radicaux superoxydes ou les hydroxyles qui provoquent l'augmentation de la perméabilité membranaire (Cakmak and Marschner 1988, Cakmak et al. 1989).

Il a été démontré *in vitro* à partir de MT de zinc animal que les liaisons zinc-soufre peuvent être oxydées par différents composés organiques sélénées, comme par exemple les GP<sub>x</sub>, chlorure de benzènesélényle ou d'acide benzènesélénylique (Chen and Maret 2001, Jacob et al. 1999). Cependant, aucune expérience n'a encore mis en évidence cette oxydation au sein d'organisme.

Dans la littérature (Arvy et al. 1995, Fargasova et al. 2006, Feng et al. 2009, Wu and Huang 1992), l'effet du sélénium sur l'accumulation du zinc est variable. 2 mg/L de sélénium n'affecte pas la teneur en zinc dans la fêtuque (Wu and Huang 1992). Entre 4 et 20 µg/L de séléniat, la concentration en zinc dans des cellules cultivées en milieu aqueux augmente ; lorsque la concentration en séléniat augmente (100 µg/L), celle du zinc diminue et redevient identique à une culture contrôle (sans sélénium) (Arvy et al. 1995). A des concentrations en sélénite inférieure à 100 µg/L, l'accumulation en zinc est accrue (Arvy et al. 1995). Au contraire, pour des concentrations supérieures à 1 mg/L, une diminution en zinc est constatée dans la moutarde (Fargasova et al. 2006), le trèfle blanc (Wu and Huang 1992) et dans les racines de la fougère (Feng et al. 2009).

#### 2.5.2.3. *Le manganèse*

Le manganèse (Mn) se substitue ou participe aux réactions où le magnésium intervient. Les liaisons ATP-manganèse sont quatre fois plus fortes que celles ATP-magnésium. Il intervient dans les deux phases de la photosynthèse : il participe au transfert d'électrons dans la chaîne photosynthétique et à plusieurs réactions du cycle de Calvin. La synthèse de protéines et de lignine a également besoin de cet élément.

Les études de Wu and Huang (1992) (à 2 mg/L de sélénium) et d'Arvy *et al.* (1995) (entre 1 et 100 µg/L de sélénite ou de séléniat), le sélénium ne modifie pas l'accumulation du manganèse dans la plante entière ou dans des cellules végétales. Cependant, dans la fougère, 1 et 2 mg/L de sélénite entraîne une diminution de manganèse seulement dans les racines. Pour des concentrations en sélénite supérieures à 5 mg/L, la teneur en manganèse redevient identique aux plantes cultivées sans sélénium (Feng et al. 2009).

#### 2.5.2.4. *Le cuivre*

Les MT constituées de cuivre (Cu) sont responsables du transfert d'électrons dans les chaînes respiratoire et photosynthétique via les cytochromes et les plastocyanines. La lignification des parois des cellules végétales nécessite deux enzymes cuivre-dépendantes.

Comme pour le manganèse, dans l'étude de Wu *et al.* (1992) sur la fétuque et trèfle blanc, le sélénium (à 2 mg/L) ne modifie pas l'accumulation du cuivre dans la plante entière. La même constatation est réalisée sur des cellules végétales cultivées avec du séléniate ou du sélénite à faible concentration (entre 1 et 100 µg/L) (Arvy *et al.* 1995). En revanche, pour des concentrations supérieures à 1 mg/L de sélénite, la concentration en cuivre diminue seulement dans les feuilles chez la moutarde (Fargasova *et al.* 2006) et seulement dans les racines chez la fougère (Feng *et al.* 2009).

### 3. LE MAÏS : UNE PLANTE AGRO-ALIMENTAIRE

Le maïs, *Zea mays* L., est une plante essentielle dans l'alimentation animale et humaine. C'est une plante tropicale en C4 ayant une croissance rapide qui produit une grande quantité de matière sèche en un temps restreint. Cependant, elle demande une grande quantité d'eau pendant la période de croissance. **Au vu de son importance dans la chaîne alimentaire, de ses caractéristiques (détaillées dans les paragraphes suivants) et du faible nombre de résultats/études sur son accumulation en sélénium (Chilimba *et al.* 2011, Mbagwu 1983), le maïs sera la plante modèle de notre étude.**

#### 3.1. Ecophysiologie du maïs

##### 3.1.1. *Morphologie d'un plant de maïs et structure des différents organes*

###### 3.1.1.1. *Morphologie générale*

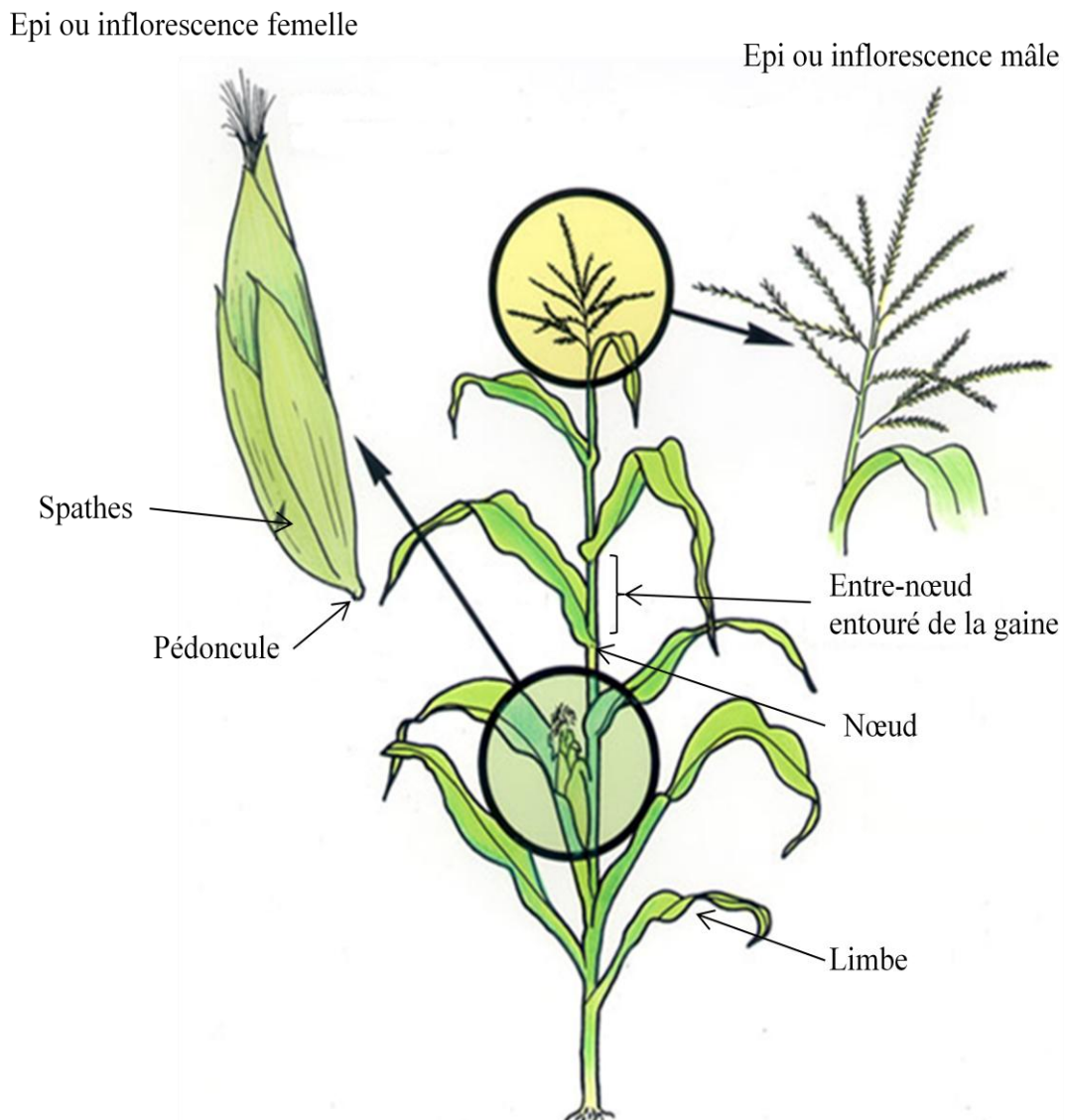
Le système aérien d'un plant de maïs mature (Fig 1.15) est constitué d'un empilement de phytomères composés de :

- Une tige qui est une alternance entre un nœud (court, visible et compact) et un entre-nœud (plus ou moins allongé).
- Une feuille insérée au sommet de l'entre-nœud. Chaque feuille est composée d'une gaine foliaire, d'une ligule et d'un limbe. La gaine foliaire est peu chlorophyllienne, entoure les entre-nœuds et participe essentiellement au

soutien de la tige. Le limbe est photosynthétique et le lieu principal des échanges atmosphériques.

- Un bourgeon axillaire éventuellement, qui pourra donner un épi ou une talle suivant sa position
- De racines adventives éventuellement (notamment des premiers entre-nœuds)

Le système racinaire est composé de racines primaires (la racine séminale issue de la radicule et les racines adventives issues de la base d'un entre-nœud) et de racines secondaires.



**Figure 1.15.** Morphologie aérienne d'un plant de *Zea mays* en fin de croissance. Figure modifiée d'après Cauderon (2012)

*3.1.1.2. Tissus caractérisant les différents organes végétatifs*

L'ensemble des organes végétatifs possède des faisceaux conducteurs (xylème et phloème), du parenchyme (chlorophyllien et/ou non) et un épiderme. Cependant, la composition de certains tissus dépend de l'organe où ils se situent (racines, tiges ou feuilles). Les racines sont caractérisées par les cellules, l'hypoderme et l'endoderme, possédant une bande de Carparry : structure rubanée constituée d'un mélange de cellulose et de subérine (Ferguson and Clarkson 1975, Schreiber et al. 1999). Cette caractéristique constitue une barrière aux ions qui oblige la migration par la voie apoplasmique.

Les tiges et les gaines des feuilles possèdent les cellules des couches superficielles fortement sclérifiées (riches en lignine), afin d'obtenir une bonne rigidité.

Les limbes des feuilles de maïs sont fins et recouverts d'une couche cireuse, la cuticule. L'épiderme et la cuticule sont transparents afin de laisser traverser la lumière jusqu'au mésophylle. Les faisceaux conducteurs sont entourés d'une couche de cellules de la gaine fasciculaire (CGF) puis d'une couche de mésophylle (CM) dans lesquelles le métabolisme est actif et où se réalise la photosynthèse par exemple. Les cellules sont moins lignifiées que les tiges et les racines et ne contiennent pas de subérine.

*3.1.1.3. Conséquences d'un métabolisme en C4 sur le cycle du soufre*

A la différence des plantes en C3, comme le blé, les plantes en C4, comme le maïs, possèdent des stomates sur les deux faces des limbes des feuilles. Les caractéristiques de ces plantes sont que le premier produit formé par la photosynthèse est une molécule en C4 (oxaloacétate) et que les deux phases de la photosynthèse, la phase photochimique et la phase non photo-dépendante, ne réalisent pas dans la même cellule. La phase photochimique se produit dans les CM et la phase non photo-dépendante dans les CGF. Le cycle du soufre en est affecté. Il a été montré que l'ATPS et l'APR se localisent presque exclusivement dans les CGF des feuilles de maïs (Schmutz and Brunold 1984), et la sulfite réductase et la Cys synthase dans les CGF et MC (Burgener et al. 1998, Schmutz and Brunold 1984) et la GSH synthase prédomine dans les CM (Burgener et al. 1998). Il existe donc un transport sous forme de soufre réduit, principalement sous forme de Cys, entre des BSC vers les MC (Burgener et al. 1998). De plus, l'activité de l'ATR dans les feuilles est plus élevée dans les plantes en C4 que celles en C3 (Koprivova et al. 2001).

#### *3.1.1.4. Composition des grains de maïs*

Les grains de céréales comme le blé et le maïs, se composent de trois parties :

- Les téguments représentent 5 % de la matière sèche du grain
- L'embryon ou le germe constitue 10 % de la MS et est riche en lipides
- L'albumen (85 % de la MS) est constitué des cellules de l'endosperme qui accumule l'amidon (sous forme de grains d'amidon) et des protéines (notamment dans une couche d'aleurone en périphérie de l'albumen).

Les grains, et notamment la couche à aleurone, sont riches en acide phytique, connu pour son rôle d'antioxydant chez l'homme. L'acide phytique est une substance de réserve de phosphore et se lie fortement avec le calcium, le magnésium et des oligo-éléments et/ou éléments traces. La concentration en acide phytique est plus élevée pour les grains de maïs que pour les grains de blé (Egli et al. 2003).

#### *3.1.2. Cycle de développement de la plante de Zea mays*

##### *3.1.2.1. Les différentes phases du cycle*

Les stades « repères » de la croissance de la plante sont (Fig 1.16) :

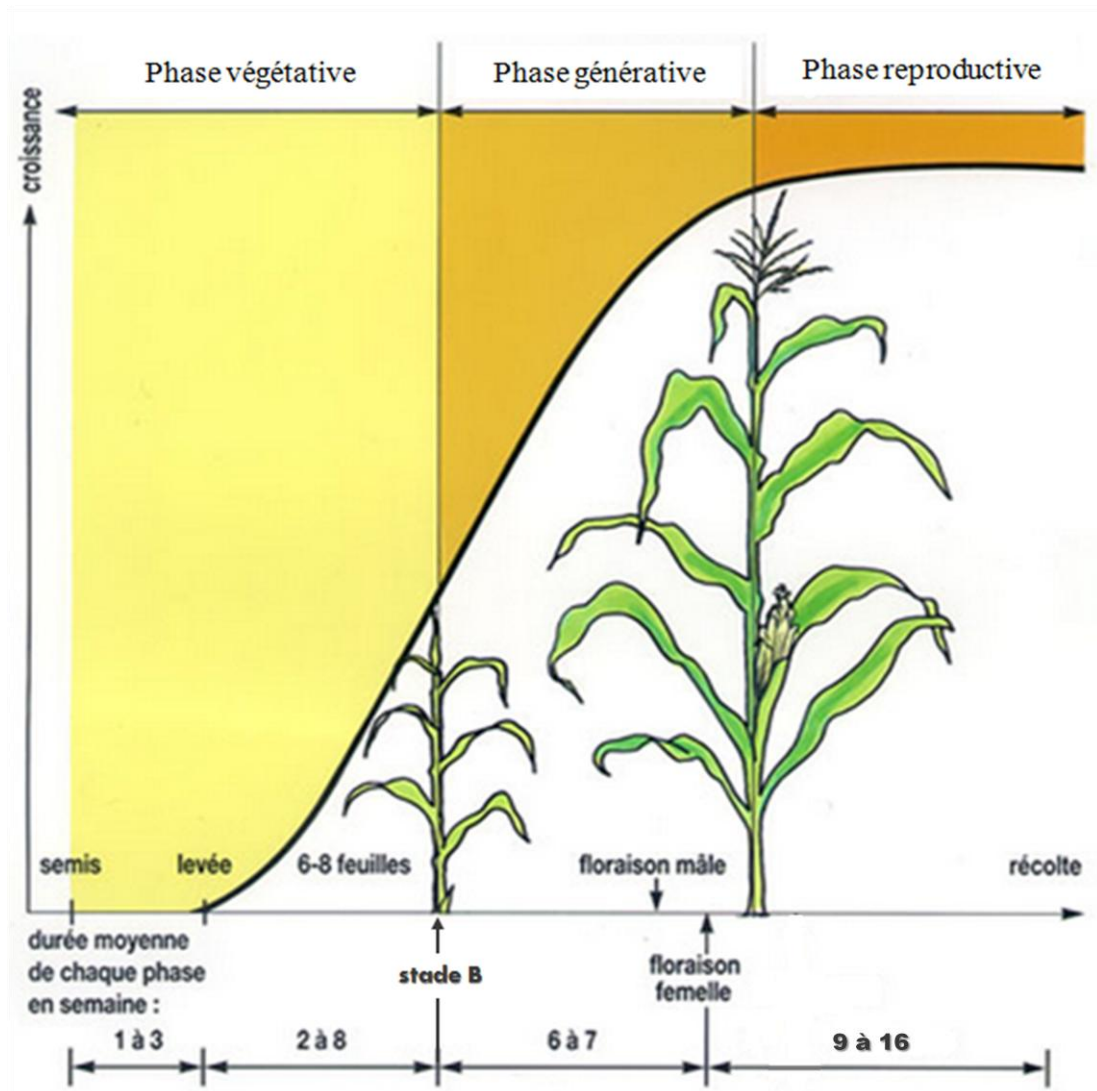
- Le stade de la levée : apparition de la première feuille
- Les stades foliaires et racinaires : nombre de feuilles déployées ou ramifications des racines
- Le stade B : initiation de la panicule à partir du bourgeon apical (cette phase n'est visible qu'après dissection de la plante)
- Initiation de l'épi : allongement du dôme d'un bourgeon axillaire. Cette phase est difficile à localiser : elle se produit lorsque 55 à 60 % des feuilles sont visibles
- Sortie de la panicule
- Floraison mâle : début de la libération du pollen
- Floraison femelle : soies hors des spathes et de la gaine foliaire des feuilles de l'épi
- Les repères post-floraison : il n'y a plus de formation de nouveaux organes. Les stades de développement post-floraison sont donc établis à partir de la croissance des grains qui se divise en trois phases :
  - Phase de latence : tous les grains ont un l'embryon formé mais n'ont pas accumulé d'amidon
  - Phase de remplissage : les grains d'amidon se remplissent



- Phase de dessèchement ou déshydratation : les grains perdent de l'eau (diminution jusqu'à 40 % d'humidité). La maturité du grain est atteinte lorsque les cellules de la base du grain brunissent ; il y a apparition du point noir

Le cycle de développement du maïs est découpé en 3 phases (Fig1.16) :

- La phase végétative : de la germination au stade B.
- La phase générative : du stade B à la fécondation. Durant cette phase l'appareil végétatif et reproducteur croissent en même temps
- La phase reproductive : de la fécondation à la maturité



Source : Arvalis-institut du végétale

**Figure 1.16.** Les différentes phases du développement d'un plant de maïs. Figure modifiée d'après Cauderon (2012)

L'estimation de la durée des phases de développement est basée sur le calcul des sommes de degré-jours (Fig 1.17). Selon la variété, la phase végétative varie entre 300 et 485 degrés-jours, puis la phase générative peut atteindre entre les 800 et 1125 degrés-jour

$$S_{DJ} = \sum_{i=1}^n \frac{T_M + T_m}{2} - T_s$$

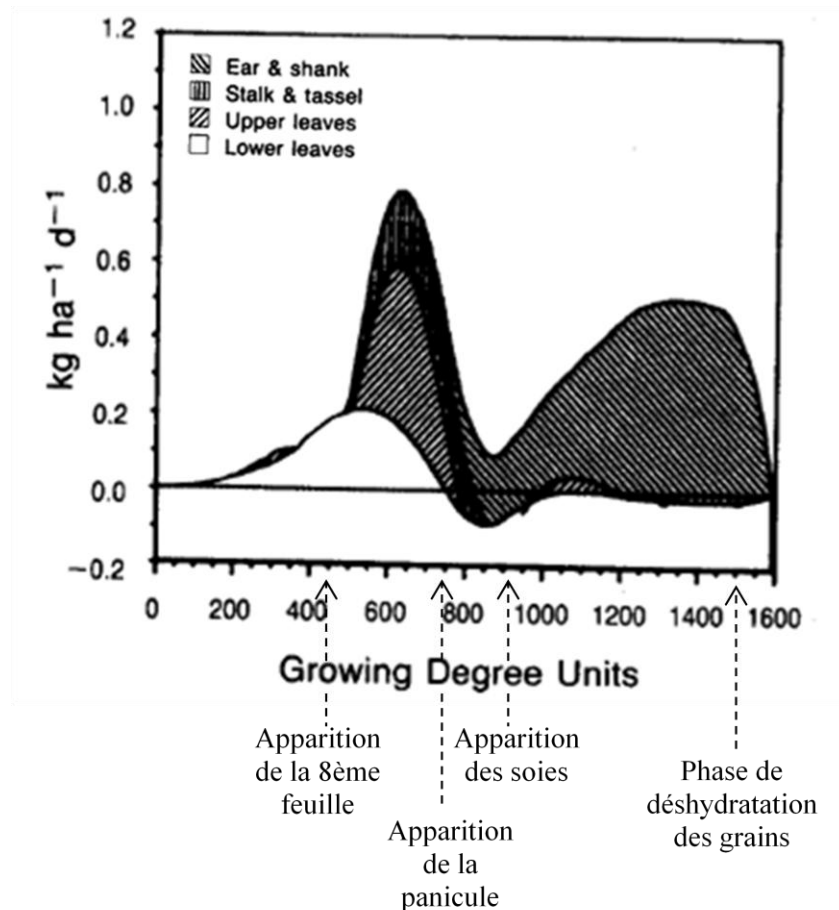
**Figure 1.17.** Formule de la somme de degré-jours ( $S_{DJ}$ ) (Tollenaar et al. 1979)

$n$  : nombre de jours ;  $T_M$  : température maximale journalière ;  $T_m$  : température minimale journalière ;  $T_s$  : température seuil, 6°C pour le maïs

### 3.1.2.2. Cinétique d'accumulation en fonction des phases de développement

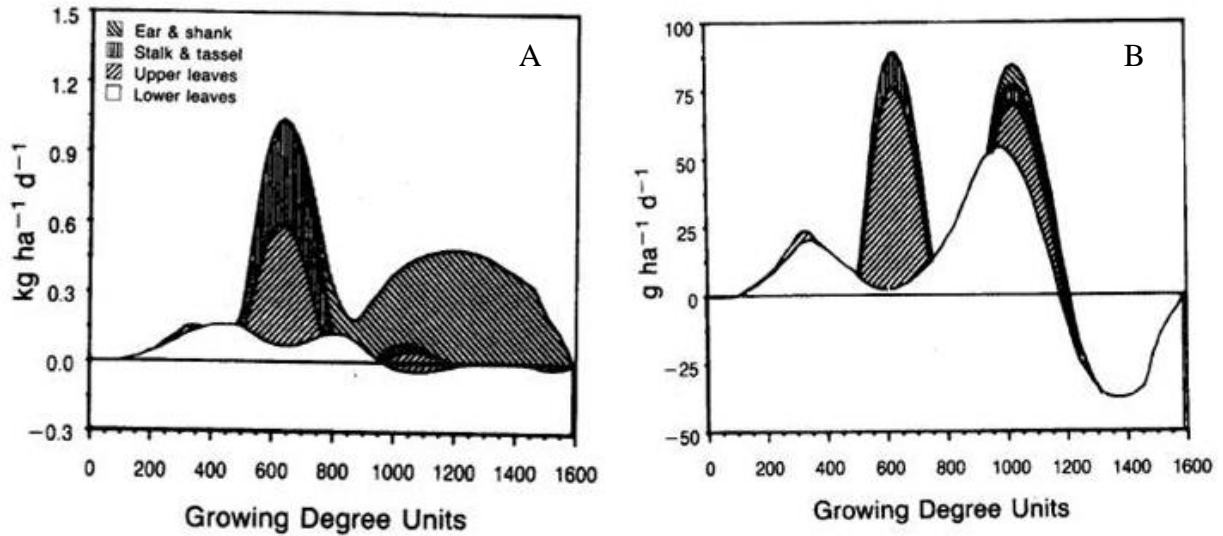
La vitesse d'accumulation des éléments dépend fortement des stades de développement de la plante. Pendant les phases de croissance intense des organes de la plante, les vitesses d'accumulation de l'ensemble des éléments sont les plus élevées.

Le soufre s'accumule principalement pendant la phase générative et durant la phase de remplissage des grains. La vitesse d'accumulation diminue très fortement pendant le stade de floraison mâle et femelle ; et lorsque la phase de déshydratation des grains commence elle diminue de nouveau, jusqu'à devenir nulle (Fig 1.18) (Blake-Kalff et al. 1998, Buchner et al. 2004, Karlen et al. 1988, Leustek 2002, Sunarpi and Anderson 1997). De plus, la réduction du sulfate est maximale pendant l'expansion foliaire. A la fin de la phase générative, l'activité de ATPS diminue jusqu'à être nulle. L'activité de la Cys synthase diminue d'environ 50 % à la fin de la phase générative (Schmutz and Brunold 1982). Après la phase générative, la réduction du sulfate est donc fortement ralentie mais la synthèse de cystéine et de protéines est encore effectuée.



**Figure 1.18.** Vitesse d'accumulation du soufre (kg/ha/jour) dans le maïs pendant l'ensemble du cycle de croissance (Karlen et al. 1988)

Le calcium est principalement accumulé à la fin de la phase végétative et pendant la phase générative. Par la suite, la vitesse d'accumulation est très faible et constante (Karlen et al. 1988). Pour le magnésium, le cuivre, le manganèse et le zinc, les profils de cinétique d'accumulation sont similaires (Fig 1.19). La majorité de ces éléments est accumulée pendant la phase générative. Une forte diminution de l'accumulation à l'apparition de la panicule puis après la fécondation la vitesse augmente pour atteindre entre 30 et 50 % de la vitesse maximale. Comme pour le soufre, à la fin du remplissage des grains la vitesse chute rapidement jusqu'à devenir nulle (Karlen et al. 1988). La cinétique d'accumulation du fer est caractérisée par deux pics d'égale vitesse, l'un pendant la phase générative et l'autre pendant le phase de remplissage des grains (Karlen et al. 1988).



**Figure 1.19.** Vitesse d'accumulation du (A) magnésium (kg/ha/jour) et du (B) fer dans le maïs pendant l'ensemble du cycle de croissance (Karlen et al. 1988)

### 3.2. Utilisation du maïs dans la filière agro-alimentaire et industrielle

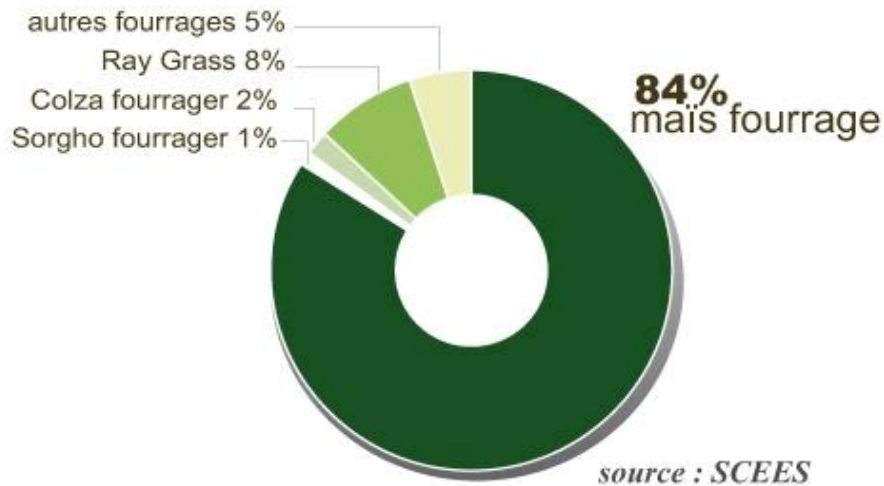
#### 3.2.1. *Production mondiale et nationale du maïs*

Le maïs est la céréale la plus cultivée au niveau mondial. En 2010, elle représente 47 % de la production mondiale des céréales soit 826 millions de tonnes alors que celle du blé est de 37 %, soit 653 millions de tonnes (Association Générale des Producteurs de Blé et autres céréales 2012a). Les principaux producteurs sont les USA et la Chine qui représentent à eux deux 66 % de la production mondiale (Association Générale des Producteurs de Blé et autres céréales 2012a). La France est au 7<sup>ème</sup> rang mondial et 1<sup>er</sup> en Europe avec 14 millions de tonnes produits en 2010, ce qui représentent environ 3.2 millions d'hectares cultivés (soit 9 % de la surface agricole utile)(Association Générale des Producteurs de Blé et autres céréales 2012b).

#### 3.2.2. *Utilisation agro-alimentaire et industrielle*

##### 3.2.2.1. *Alimentation animale*

Le maïs est le principal aliment des bovins, ovins, porcs et volailles. Il peut être apporté sous diverses formes : en fourrage qui constitue la ration de base pour leur alimentation (Fig 1.20), en grains humides ou secs, en granulés ou farine.



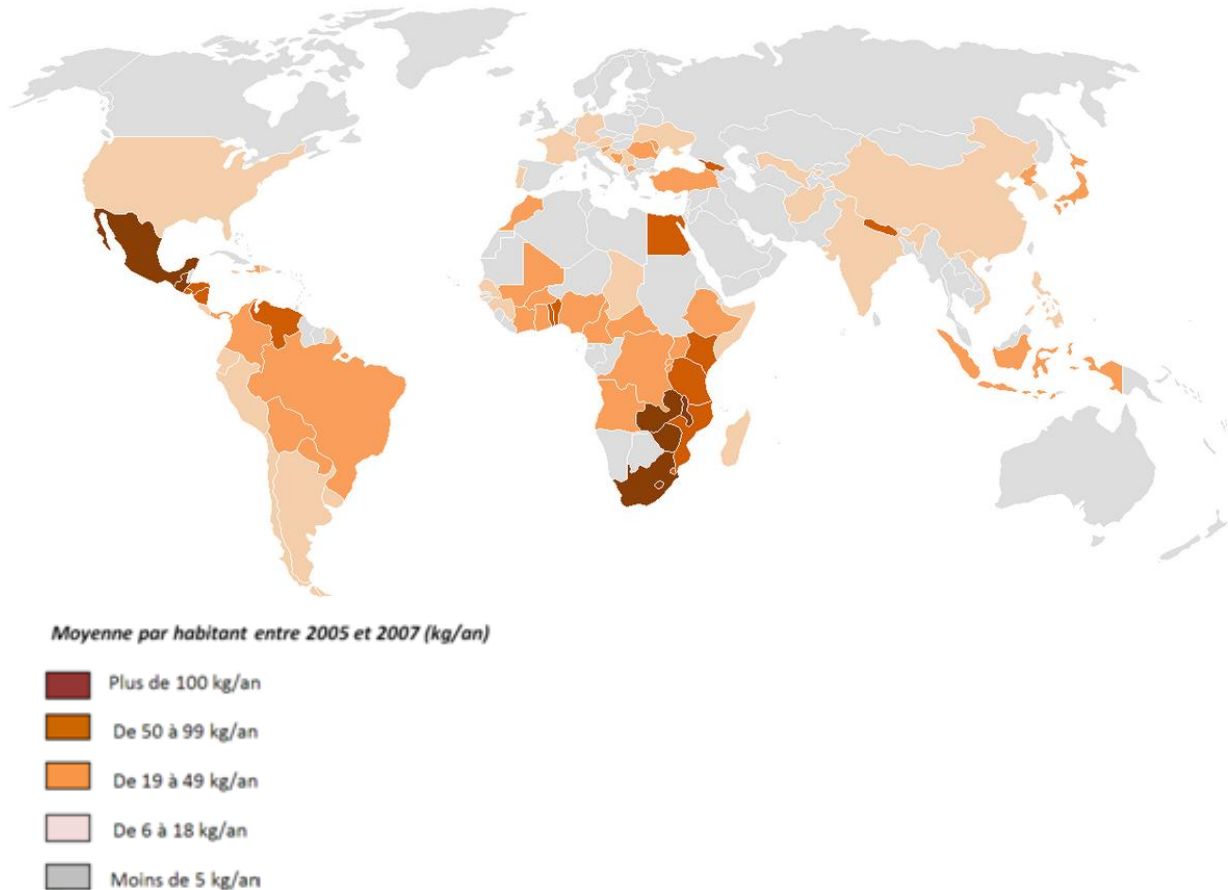
**Figure 1.20.** Les fourrages destinés à l'alimentation animale produits annuellement en France (Association Générale des Producteurs de Maïs 2012)

#### 3.2.2.2. Alimentation humaine (Fig 1.21)

Le grain de maïs est très riche en amidon (plus de 60 %). En amidonnerie, après avoir été extrait, l'amidon entre dans la composition de nombreuses préparations alimentaires comme les soupes, potages, sauces, crèmes glacées, desserts, chocolats ou produits diététiques. Des dérivés de la production d'amidon, les sucres, sont fortement utilisés dans la production de produits sucrés principalement en boulangerie, biscuiterie, confiserie, confiture, produits laitiers, boissons. En semoulerie, le maïs moulu (semoules) est utilisé pour des spécialités culinaires et pour la fabrication de la bière en complément du malt. La distillation du maïs produit de l'alcool utilisé seul dans le gin ou en mélange dans certains whiskys ou bourbons.

#### 3.2.2.3. Utilisation industrielle

Hormis les pratiques agro-alimentaires, l'industrie fabrique divers produits à partir d'amidon : des médicaments ou antibiotiques en pharmacie, du carton ou glaçage en papeterie, des produits de beauté, des colles ainsi que des matériaux de construction. L'huile de maïs (dérivée des produits de l'amidonnerie) peut être utilisée en fonderie, savonnerie, pharmacie ou en une huile de table légère appréciée pour ses qualités diététiques. Pour finir, les rafles sont également valorisées dans l'industrie en tant qu'apports agricoles pour améliorer la qualité des sols. Elles sont également utilisées pour le raffinage d'huiles minérales, la synthèse des résines employées dans les matériaux anticorrosifs, la fabrication de moules de fonderies, de colles ainsi que des produits cosmétiques et pharmaceutiques.



*Figure 1.21. Consommation moyenne d'aliments issus du maïs par habitant (Perrier Brusle 2010)*

#### 4. OBJECTIFS DE L'ETUDE

##### 4.1. Conclusion de l'étude bibliographique

Les plantes jouent un rôle essentiel dans le transfert du sélénium dans le réseau trophique en tant qu'interface entre le sol et les consommateurs primaires.

Cette étude bibliographique a mis en exergue que les conclusions avancées sur le métabolisme du sélénium au sein des plantes sont établies sur des recherches réalisées avec des conditions de culture extrêmement variables. **Cependant, des paramètres liés au milieu de culture, soient la concentration et la forme du sélénium source, la présence ou non d'autres éléments compétiteurs (sulfate, par exemple) et le temps de croissance de la plante en présence de sélénium ainsi que les paramètres spécifiques à la plante tels que l'espèce et l'âge de la plante peuvent fortement influencer la réponse métabolique des plantes vis-à-vis du sélénium.** Or, la majorité des conclusions établies sur le métabolisme du

sélénium se base sur des expérimentations réalisées à des concentrations en sélénium supérieures à 150 µg/L, avec une forme unique en solution (sauf Li *et al.* (2008), sur des plantes modèles telles que la moutarde indienne connue pour être une plante accumulatrice en éléments traces métalliques ou des plantes herbacées à culture accommodante et rapide et pour finir sur des stades de développement végétal juvéniles.

La quasi-totalité du sélénium (environ 97 %) étant fournie aux organismes via les apports alimentaires, quelques études ont été réalisées sur des plantes à valeur nutritive pour les animaux et les humains. En raison de l'importance de leurs graines dans l'alimentation mondiale, les céréales sont les plantes les plus étudiées dont les principales sont le blé et le riz. Afin de palier au manque de sélénium dans certaines populations, plusieurs modes de biofortification des plantes alimentaires en sélénium ont été développés. Actuellement, elles sont réalisées en pot ou directement en champ rendant les conclusions sur les réponses physiologiques propres à la plante vis-à-vis sélénium difficiles à élaborer.

D'autre part, les effets du sélénium sur la physiologie de la plante sont encore peu connus. Des recherches ont établi un lien étroit entre la concentration en sélénium et équilibre cellulaire oxydatif. De plus, l'absorption et l'accumulation du sélénium sont modifiées par d'autres nutriments (comme le sulfate) et modifient notamment ceux des cations essentiels (calcium, magnésium, fer, zinc, manganèse et cuivre). En raison de leurs similitudes, l'influence du sélénium sur le sulfate, et réciproquement, reste la plus étudiée. Les quelques études sur le sélénium et son interaction sur d'autres éléments essentiels ont des résultats très variables voire contradictoires. **De plus, les conséquences de la forme ET de la concentration en sélénium sur l'accumulation des cations essentiels ne sont jamais étudiées conjointement.**

#### **4.2. Problématiques, démarche expérimentale mise en œuvre et organisation du manuscrit**

Cette étude vise dans un premier temps à comprendre les effets couplés de différents paramètres modifiant le métabolisme du sélénium dans la plante. Les grandes questions scientifiques associées sont :

- Les conclusions générales sur l'accumulation et la métabolisation du sélénium tirées des expériences sur des plantes modèles sont-elles applicables à une plante particulière de grande culture ayant un impact international sur l'alimentation : LE MAÏS ?

- Le métabolisme du sélénium dépend-il du stade de développement de la plante ? Les grains de maïs accumulent-ils du sélénium ? La concentration et spéciation du sélénium dans les grains dépendent-elles de la concentration et de la forme du sélénium source ?
- Les faibles concentrations en sélénium (inférieures à 150 µg/L) entraînent-elles une modification de l'absorption, accumulation et métabolisation du sélénium ?
- Les comportements de deux formes de sélénium source (séléniate ou sélénite) à faibles concentrations sont-ils toujours différents ?
- Existe-il des interférences métaboliques lorsque deux formes en sélénium source (séléniate et sélénite) sont présentes dans le milieu ? Si oui, sont-elles spécifiques aux organes de la plante (racines, tiges, feuilles) et sont-elles dépendantes de la concentration en sélénium dans le mélange ?

Les paramètres testés sont les suivants :

- La concentration en sélénium dans le milieu nutritif : forte pour des traitements à 1000 µg/L ; et très faible pour des traitements à 10 et 50 µg/L qui correspondent aux normes d'eau potable en Europe et aux USA ainsi qu'aux concentrations actuellement mesurées dans de nombreux captages d'eau d'Ile de France.
- ET la forme inorganique en sélénium dans le milieu nutritif : séléniate ou sélénite qui sont les formes inorganiques les bio-disponibles dans l'eau et les sols
- ET un mélange de ces deux formes inorganiques en sélénium dans le milieu nutritif
- ET deux stades de développement du maïs

L'originalité de cette étude réside, de plus, dans le fait de coupler ces expérimentations visant à améliorer la compréhension du métabolisme du sélénium dans une plante de grande culture, à celles visant à appréhender l'influence du sélénium sur l'accumulation des cations divalents essentiels (calcium, magnésium, fer, zinc, manganèse, cuivre).

- La concentration ainsi que la forme du sélénium source influencent-elles l'accumulation des cations dans la plante ? Si oui, cette influence est-elle spécifique à l'organe étudié (racines, tiges, feuilles, grains) ?
- Le stade de développement des plantes peut-il modifier l'effet du sélénium sur l'accumulation des cations ? Le grain du maïs garde-t-il une bonne qualité nutritionnelle vis-à-vis des cations (par rapport à celle d'un grain sans sélénium) ?



- L'accumulation des cations permet-elle de déceler le caractère ambivalent du sélénium : antioxydant ou pro-oxydant ?

Ainsi et contrairement à la littérature, les effets de la concentration et de la forme en sélénium source ainsi que le stade de croissance du maïs seront étudiés conjointement. Ils pourront donc être associés aux conclusions sur le métabolisme du sélénium déduites précédemment.

Pour répondre à l'ensemble des problématiques, le premier objectif visé pendant cette thèse est la mise au point voire le développement de matériels et méthodes adaptés. Dans un premier temps, les plants de *Zea mays* seront cultivés dans des chambres à atmosphère contrôlée, dont une a été construite entièrement au cours de cette étude (et en collaboration avec une autre doctorante). Ce matériel permet d'assurer la bonne croissance des plantes, en évitant toute contamination extérieure au système, et dans le cas de chambre fermée d'analyser les produits de la volatilisation des plantes. Le milieu nutritif est une solution hydroponique nous assurant d'étudier exclusivement le processus inhérent à la physiologie de la plante.

Le métabolisme du sélénium sera étudié à travers sa concentration dans chaque organe de la plante (racines, tiges, feuilles et grains), son taux de volatilisation ainsi que, lorsque ceci est possible, de son degré de métabolisation. L'accumulation des cations sera mesurée dans les différents organes du maïs. L'adaptation ou/et le développement de techniques analytiques permettront (i) de minéraliser la totalité des éléments d'un échantillon végétal, (ii) d'extraire le sélénium en conservant sa spéciation dans l'échantillon ainsi que (iii) de doser l'ensemble des éléments via des techniques sensibles et spécifiques. L'ensemble de ces matériels et méthodes est présenté dans le chapitre 2.

Les chapitres 3 et 4 seront consacrés respectivement au métabolisme du sélénium dans le *Zea mays* et à l'influence du sélénium sur l'accumulation des cations essentiels à la plante. Pour finir, les conclusions générales ainsi que les perspectives de cette étude seront présentées.

**CHAPITRE 2 :**

**MATERIELS ET METHODES**



## 1. INSTRUMENTATION ET TECHNIQUES D'ANALYSE UTILISEES

Afin de répondre à l'ensemble des analyses à effectuer, plusieurs méthodes ont été utilisées et adaptées aux spécificités des échantillons durant cette étude : les concentrations des éléments cibles, la matrice (notamment l'acidité ou la présence d'interférents) et les volumes de l'échantillon. En effet, plusieurs types d'interférences existent : (i) interférences physico-chimiques dues à la viscosité de l'échantillon, à la complexité de la matrice ou à la vitesse de formations de composés ou (ii) interférences spécifiques au mode de détection (spectrales ou isobariques). Il a donc été nécessaire de les corriger par une mise au point des méthodes utilisées.

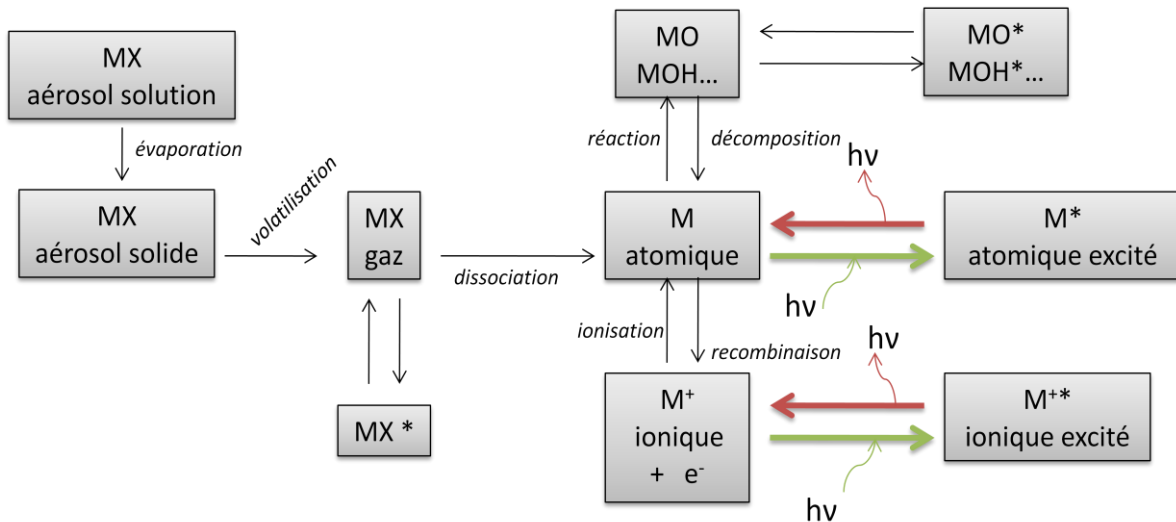
L'ensemble des techniques est quantitative ; une gamme étalonnage réalisée dans la même matrice (acidité) est nécessaire afin de limiter les éventuels biais lors du dosage. Les étalons sont fabriqués à partir de solutions certifiées mono-élémentaires. Les gammes d'étalonnage sont validées par le dosage d'un échantillon d'eau certifiée, le TM 26,3 ou TMDA 64/64,2 (selon la sensibilité de la méthode).

### 1.1. Méthodes de dosage élémentaire

#### 1.1.1. *Plasma d'argon*

La première étape de ces méthodes est l'atomisation et l'ionisation des éléments obtenus à partir de l'échantillon liquide.

Sous l'effet d'un champ électromagnétique, un plasma (gaz argon (Ar) ionisé électriquement neutre) est produit à une température élevée (6000 à 8000 °C). L'échantillon est introduit sous forme d'aérosol dans le plasma où il subit une série de réactions décrites dans la figure 2.1. Le plasma a donc pour rôle de produire et d'exciter des ions et atomes du nébulisat. Puis plusieurs types de détection des atomes et ions peuvent être utilisés. Dans cette étude, les détections optique et massique sont employées.

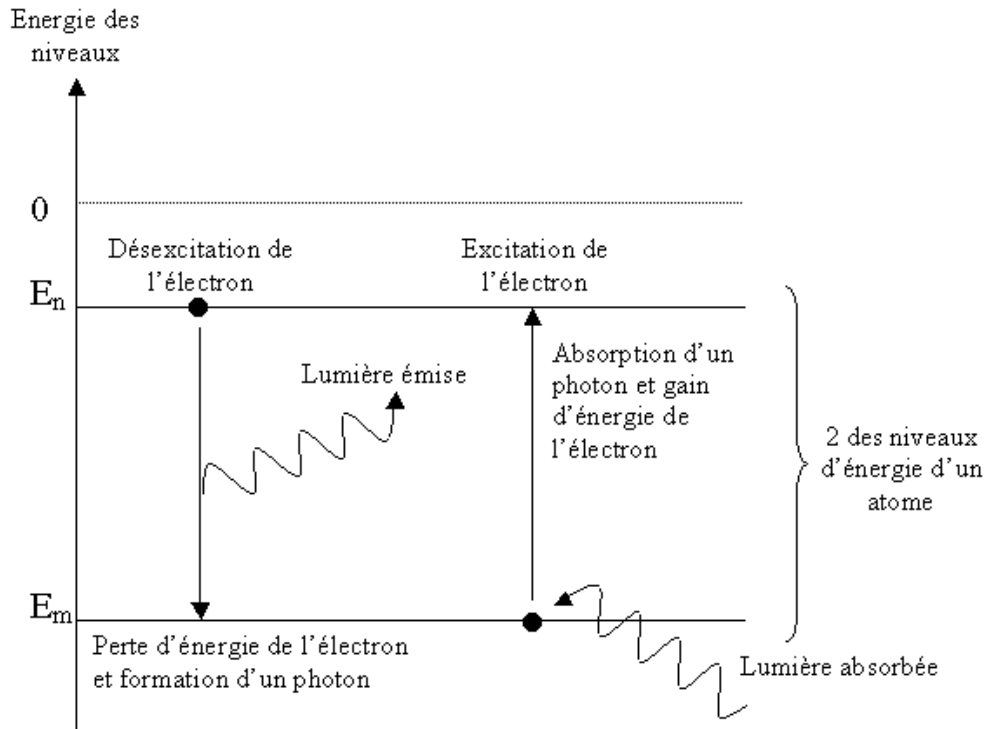


**Figure 2.1.** Processus intervenant dans un plasma d'argon à haute température

**1.1.2. Détection optique : spectrométrie d'émission optique à plasma d'argon induit (ICP-OES, JY 2000) : dosage du calcium, magnésium, fer, zinc, cuivre, manganèse et sélénium**

**1.1.2.1. Principe de l'absorption et émission atomique**

La spectrométrie atomique est basée sur le fait que les atomes et les ions à l'état fondamental peuvent, sous l'effet d'une température élevée, absorber ou émettre des photons (Fig 2.2.). Cela est dû au passage d'un de ses électrons externes d'une orbital atomique à une autre (Fig 2.2). Dans les deux cas, l'intensité de photons (émis ou absorbés) est proportionnelle à la concentration de l'élément en solution.



**Figure 2.2.** Interaction matière et rayonnement : variation des niveaux d'énergie des électrons externes d'un atome

#### 1.1.2.2. Spécificités de l'ICP-OES (JY 2000) et mise au point

L'ensemble des photons émis à très haute température est séparé selon leur longueur d'onde par un monochromateur ; puis un courant électrique mesurable et proportionnel à la concentration de l'élément dans l'échantillon est créé via un photomultiplicateur. Avec cet appareil, plusieurs éléments peuvent être dosés en analyse séquentielle dans un même échantillon. Pour le dosage d'un seul élément dans un échantillon, le volume minimum de 5 mL de solution est nécessaire. De plus, cette méthode d'analyse permet d'obtenir des limites de détection (LDD) basses (tableau 2.1) avec des domaines de linéarité des gammes d'étalonnage élevées (1 à 2 ordres de grandeur).

Néanmoins, chaque élément étant susceptible d'émettre à plusieurs longueurs d'onde, il est nécessaire d'évaluer les interférences spectrales potentiellement existantes. Pour ce faire, le protocole ci-après a été suivi pour la mise au point des analyses en ICP-OES :

- Pour chaque élément, le spectre d'une solution mono-élémentaire a été réalisé. A partir de ce spectre et des données de la littérature, une raie spécifique a été choisie par éléments (Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, Mn et Se) (Tableau 2.1).

- Pour des interférences suspectées, des solutions bi-élémentaires, contenant l'élément à doser à rapport de concentration majeurs/traces, sont alors analysées afin de vérifier que l'interférent ne modifie pas la concentration mesurée de l'élément à doser.
- Dans notre cas, au vue des proportions entre les éléments, les interférences spectrales sont négligeables.
- Pour finir, l'incrément (pas de mesure de l'intensité en nm) a été optimisé pour chaque élément afin d'améliorer le lissage de la surface du pic.

Pour chaque élément et à partir des droites d'étalonnage réalisées, les limites de détection ont été calculées (Tableau 2.1).

	Ca	Mg	Zn	Fe	Mn	Cu	Se
<b>Longueur d'onde (nm)</b>	317,933	280,270	213,856	238,204	257,610	324,754	196,026
<b>Incrément (nm)</b>	0,0037	0,003	0,0031	0,0029	0,003	0,0037	0,0035
<b>LDD (µg/L)</b>	70	50	8	12	2	11	50
<b>Etalon le plus bas*</b>	2	1	0,1	0,05	0,05	0,01	0,1
<b>Etalon le plus haut*</b>	40	15	3	10	2	1	3

**Tableau 2.1.** Caractéristiques des méthodes de dosages des éléments à l'ICP-OES

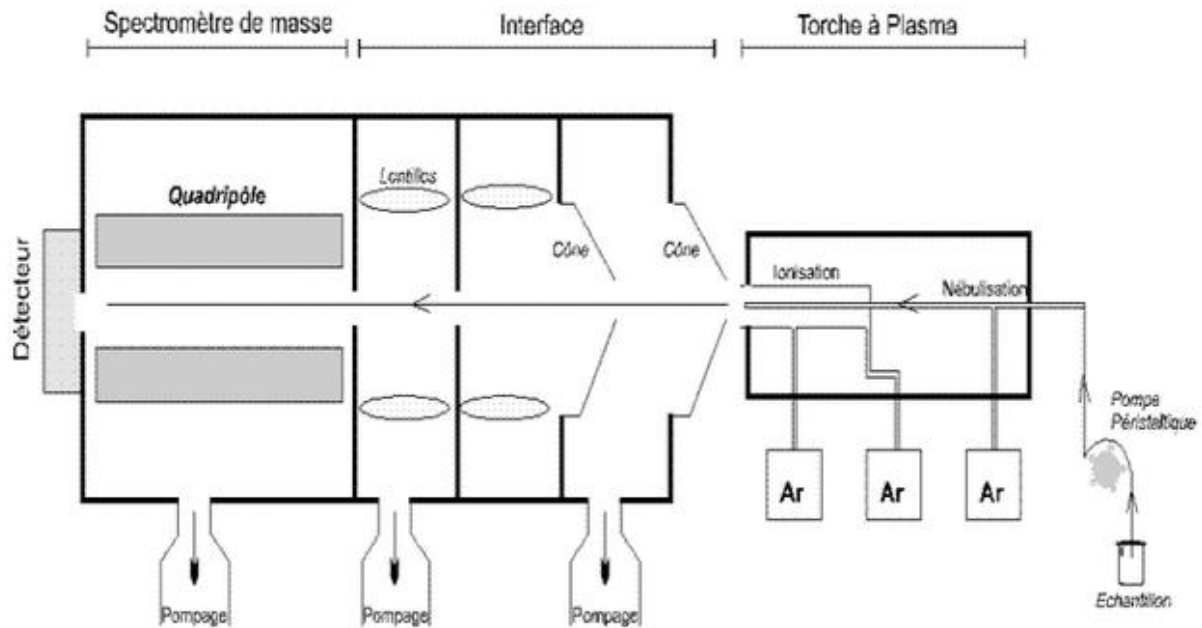
\* Il s'agit des étalons les plus régulièrement usités (en mg/L)

### **1.1.3. Détection de masse : spectrométrie de masse couplée à un plasma à induction et une cellule de réaction/collision (CRC-ICP-MS, Thermo X Series II)**

#### **1.1.3.1. Principe de l'ICP-MS**

Le principe de la spectrométrie de masse réside dans la séparation, l'identification et la quantification de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ). C'est une méthode où une torche à plasma à très haute température (entre 8000 et 10000 °C) générant les ions (Fig 2.1) est couplée à un spectromètre de masse quadripolaire qui sépare et quantifie les rapports masse/charge (Fig 2.3). La torche à plasma est à pression atmosphérique ambiante alors que le spectromètre de masse fonctionne à pression d'environ 2,5 mbars. L'interface, constituée de deux cônes a pour fonction de transférer une partie du plasma d'ions vers une chambre sous vide où les ions seront focalisés. Les ions du plasma sont transférés vers un ensemble de lentilles, nommé optique ionique, qui élimine les charges

négatives et les photons et améliore la focalisation du faisceau. La séparation des ions selon leur charge et leur masse se réalise dans la cellule quadripolaire. Sous l'effet du champ électrique imposé, les ions sont donc séparés dans la cellule quadripolaire et transmis au détecteur. Il s'agit d'un multiplicateur d'électrons qui amplifie le signal par formation d'électrons secondaires. Le nombre d'électrons créés est proportionnel à la concentration de l'élément en solution et est traduit en nombre d'impulsions (nombre de « coups »).



**Figure 2.3.** Schéma général de l'appareillage de l'ICP-MS

#### 1.1.3.2. Spécificité de l'ICP-MS et mise au point du protocole

Afin de limiter le biais analytique lié à la déviation du signal au cours d'une série analytique (jusqu'au 8h d'analyse), une solution d'Indium (à environ 1  $\mu\text{g/L}$ ) est utilisée en tant que standard interne. Le mélange entre l'Indium et l'échantillon s'effectue avant la nébulisation. La correction est directement appliquée sur la concentration de l'élément dans l'échantillon par le logiciel.

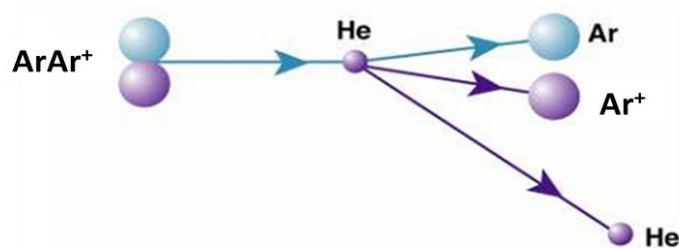
Ce mode d'analyse sera utilisé pour doser uniquement le sélénium dans les échantillons à faible concentration en sélénium ( $< 150 \mu\text{g/L}$ ) ayant un volume de 5 ml minimum. Des interférences isobariques ou polyatomiques, c'est-à-dire de recouvrement de masse, peuvent cependant exister ; ce qui est le cas lors du dosage du sélénium. Les isotopes stables du sélénium les plus abondants et donc les plus utilisés sont le  $^{78}\text{Se}$  et  $^{80}\text{Se}$ . Or à ces masses, le sélénium interfère avec des éléments ou des espèces polyatomiques non détruits dans la torche à plasma (Tableau 2.2).



Analyte (isotope stable)	Abondance (%)	Interférences isobariques ou polyatomiques
<sup>74</sup> Se	0.9	
<sup>76</sup> Se	9.3	
<sup>77</sup> Se	7.6	<sup>40</sup> Ar <sup>37</sup> Cl, <sup>40</sup> Ca <sup>37</sup> Cl
<sup>78</sup> Se	23.8	<sup>78</sup> Kr, <sup>40</sup> Ar <sup>38</sup> Ar
<sup>80</sup> Se	<b>49.6</b>	<b><sup>40</sup>Ar<sup>40</sup>Ar, <sup>1</sup>H<sup>79</sup>Br, <sup>80</sup>Kr, <sup>40</sup>Ca<sup>40</sup>Ar</b>
<sup>82</sup> Se	8.7	<sup>82</sup> Kr, <sup>1</sup> H <sup>81</sup> Br

**Tableau 2.2.** Abondance des isotopes stables du sélénium et leurs interférences isobariques ou polyatomiques avec d'autres éléments ou d'espèces polyatomiques

Dans nos échantillons, le krypton et le brome sont absents. Cependant, le gaz vecteur constitutif du plasma est l'argon, il est donc nécessaire d'éliminer les dipôles Ar-Ar<sup>+</sup> et Ca-Ar<sup>+</sup>. Pour ce faire, une cellule de réaction/collision (CRC) est positionnée après l'optique ionique. Le mélange de gaz (Hydrogène et Hélium, H<sub>2</sub>/He, 8/92 %) engendre des collisions et/ou de réactions (Fig 2.4) au sein du faisceau ionique éliminant ainsi les interférences isobariques et polyatomiques. Le flux de gaz dans la cellule doit donc être assez élevé pour éliminer les interférences mais pas trop pour ne pas fragmenter l'ensemble des atomes. Dans notre cas, pour doser le sélénium, la masse 80 a été choisie pour sa sensibilité plus élevée que la masse 78 et le flux d'H/He est situé entre 6,5 et 6,9 ml/min. Suite à ces mises au point, la limite de détection obtenue pour le sélénium est de 50 ng/L.



**Figure 2.4.** Exemple de collision entre un dipôle Ar-Ar<sup>+</sup> et d'Hélium (gaz de la CRC)

## 1.2. Méthodes de dosage moléculaire basées sur la séparation des composés

### 1.2.1. Principe de la chromatographie ionique

Le principe de la chromatographie ionique est de séparer les ions selon leur poids moléculaire, leur charge et leur hydrophobicité. La phase mobile composée de l'échantillon et de l'éluant circule sur une phase fixe constituée d'une résine échangeuse d'ions. L'affinité de l'ion avec la phase fixe dépend des propriétés précédemment énoncées. Ainsi chaque ion possède un temps de rétention spécifique. Après avoir été séparés, les ions peuvent être dosés via différentes méthodes de détection (conductimétrique, optique ou massique). Au laboratoire, seule la détection conductimétrique est couplée « on-line » avec la chromatographie ionique.

### 1.2.2. Séparation et dosage des anions

La séparation et le dosage des anions (fluore, bromure, chlore, nitrate, nitrite, sulfate, phosphate) sont réalisés par la technique de chromatographie liquide à haute performance (HPLC, détection conductimétrique, Dionex DX 500). Les caractéristiques de la méthode sont présentées dans le tableau 2.3.

Paramètres	Caractéristiques des paramètres
Phase fixe	Colonne échangeuse d'ions, AS 12, 4*200 mm
Phase mobile	2,7 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + 0,3 NaHCO <sub>3</sub>
Débit de la phase mobile	Isocratique à 1,5 mL/min
Volume échantillon	50 µl
Température de la colonne	20 °C

*Tableau 2.3. Caractéristiques des paramètres de la chromatographie échangeuse d'ions utilisée pour le dosage des anions*

### 1.2.3. Séparation et dosage des formes inorganiques du sélénium : séléniate et sélénite

#### 1.2.3.1. Séparation des formes inorganiques de sélénium

L'optimisation du dosage de séléniate et sélénite via HPLC (Dionex ICS 3000, détection conductrimétrique) n'a pas permis d'obtenir une LDD suffisamment faible (LDD = 0,5 mg/L) pour doser directement ces ions dans les échantillons.

Afin de déterminer la concentration des formes inorganiques de sélénium (séléniate et sélénite), l'HPLC (Dionex, ICS 3000) est utilisé comme première étape uniquement pour séparer et collecter les deux fractions (séléniate et sélénite). Les caractéristiques de la méthode sont détaillées dans le tableau suivant (tableau 2.4)

Paramètres	Caractéristiques
Phase fixe	Colonne échangeuse d'ions, AS15, 4*250 mm
Phase mobile	30 mM de KOH
Débit de la phase mobile	Isocratique à 1ml/min
Volume échantillon	200 µl
Température de la colonne	30 °C

**Tableau 2.4.** Caractéristiques des paramètres utilisés pour la séparation des formes inorganiques de sélénium

L'utilisation de solutions standards de séléniate (Sodium selenate anhydrous sigmaalutra, Sigma Aldrich) et de sélénite (Sodium selenite 99 %, Sigma Aldrich) a permis de définir le temps de rétention de ces deux ions : 9,1 min pour le sélénite et 14,8 min pour le séléniate. Les fractions de séléniate ou sélénite (volumes inférieurs à 3 ml) sont collectées manuellement en sortie de la cellule de conductimétrie.

#### 1.2.3.2. Dosage des fractions inorganiques du sélénium : spectrométrie d'absorption atomique avec four graphite (SAA-GF, UNICAM 989 QZ)

Les volumes des fractions et les concentrations en sélénium sont trop faibles pour doser le sélénium par ICP-OES et par ICP-MS dans ces échantillons. Le sélénium dans ces fractions sera donc dosé par spectrométrie d'absorption atomique avec four graphite (SAA-GF).

Le principe de l'absorption atomique a été décrit paragraphe 1.1.2.1. Avec la SAA-GF, l'atomisation des éléments de l'échantillon se produit au sein d'un tube graphite (le four)

chauffé à haute température (2500 °C) par effet Joule. Un faible volume d'échantillon liquide (entre 20 et 30 µl généralement) est introduit dans le four qui sera chauffé par un programme électrothermique. Celui comprend au minimum 4 étapes : séchage, prétraitement ou décomposition, atomisation et nettoyage du four. A chaque étape, montée et palier de température doivent être soigneusement choisis afin d'optimiser le rendement d'obtention des atomes à l'état fondamental. Durant l'étape d'atomisation, l'intensité de photons absorbés est quantifiée et est proportionnelle à la densité d'atomes présents selon la loi de Beer-Lambert (Fig 2.5).

$$I(\lambda, X) = I_0(\lambda) \cdot e^{-\alpha X r}$$

**Figure 2.5.** Loi de Beer-Lambert

*I<sub>0</sub>* : intensité de la lumière incidente ; *I* : intensité de la lumière sortante ; *α* : coefficient d'absorption (1/m) ; *X* : longueur du trajet optique (m) ; *r* : densité de l'entité absorbante, atomes ou molécules, dans le milieu (en mol/m<sup>3</sup>)

Cette technique est sélective car les éléments à doser absorbent leur raie de résonance. Ainsi, les interférences spectrales sont faibles à quelques exceptions près bien connues sur cette méthode d'analyse peu récente. L'autre avantage de cette méthode est qu'elle nécessite un volume d'échantillon très faible : 100 µl par élément

Néanmoins, de fortes interférences physico-chimiques peuvent perturber le dosage du sélénium. Elles altèrent la densité de la vapeur atomique ou sa vitesse de formation dues aux différents processus de dissociation, oxydoréduction et d'ionisation pouvant se produire lors du chauffage. Afin de minimiser ces interférences, outre l'optimisation du programme électrothermique, des modificateurs de matrice (c'est-à-dire des agents chimiques permettant de faciliter la décomposition de la matrice ou la stabilité atomique de l'élément à doser) peuvent être mélangés à l'échantillon. Après avoir testés plusieurs programmes électrothermiques (les températures, les durées des paliers et des montées ; tableau 2.5) et modificateurs de matrice (types et volumes), le protocole le plus adapté (tableau 2.6) a été sélectionné pour le dosage du sélénium des échantillons (limite de quantification (LDQ) = 1,5 µg/L). Ce mode d'analyse sera utilisé pour doser le sélénium uniquement dans les fractions inorganiques de sélénium séparé via l'HPLC (Dionex ICS 3000). Ce système « off-line », HPLC-SAA-GF, permet d'obtenir une LDQ de 20 µg/L de sélénium en solution pour chacune des formes inorganiques. Cela signifie que la limite de détection dans les échantillons de plante est de 5 µg/g, ce qui est satisfaisant pour notre étude.

Paramètres	Caractéristiques du paramètre
<b>Four</b>	ELC (Extended Lifetime Coated)
<b>Volume de travail</b>	20 µL
<b>Modificateur 1</b>	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> à 2 %, 2 µL
<b>Modificateur 2</b>	Pd à 0,1 %, 2 µL

*Tableau 2.5. Caractéristiques des paramètres de la méthode mise au point pour le dosage du sélénium par SAA-GF*

Etape	Température (°C)	Montée (s)	Palier (s)
<b>Séchage</b>	90	5	15
	120	5	15
<b>Décomposition</b>	1000	20	5
<b>Atomisation</b>	2400	0	3
<b>Nettoyage</b>	2700	0	3

*Tableau 2.6. Caractéristiques du programme électrothermique mis au point pour le dosage du sélénium par SAA-GF*

## 2. CULTURE DU MAÏS

### 2.1. Culture en hydroponique

#### 2.1.1. *Solution d'Hoagland modifiée*

Dans le milieu naturel, le transfert des éléments entre le sol et les plantes est la résultante de : (i) processus physico-chimiques affectant la biodisponibilité de l'élément dans les sols via des réactions d'adsorption, de complexation, de diffusion, d'oxydoréduction, favorisées ou non par des microorganismes ; (ii) et d'autres processus inhérent à la physiologie de la plante tel que l'absorption racinaire, les organes cibles et la métabolisation spécifique de l'élément. La culture en hydroponie, permet d'étudier exclusivement les processus dus au métabolisme de la plante influençant le transfert des nutriments. Les expérimentations effectuées sur chacun des processus individualisé sont les premières étapes nécessaires à la compréhension du transfert d'un élément dans un milieu plus complexe néanmoins naturel : l'écosystème sol.

La solution nutritive, très couramment utilisée, est une solution d'Hoagland diluée composée de l'ensemble des nutriments essentiels à la croissance des plantes modèles (tableau 2.7).

Sels utilisés	Concentration en $\mu\text{M}$
<b>KNO<sub>3</sub></b>	3000
<b>Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O</b>	2720
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	2000
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	980
<b>NaCl</b>	200
<b>MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	700
<b>FeEDDHA (6%)</b>	46
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	24
<b>MnSO<sub>4</sub></b>	13
<b>ZnSO<sub>4</sub></b>	6
<b>CuSO<sub>4</sub></b>	1,5
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O</b>	0,04

**Tableau 2.7.** Composition de la solution nutritive d'Hoagland modifiée utilisée pour l'ensemble des expérimentations

Durant les expérimentations, les solutions nutritives sont entièrement renouvelées toutes les deux semaines afin (i) d'éviter les carences nutritives éventuelles, (ii) de conserver un rapport entre les nutriments relativement constants et (iii) d'éliminer des exsudats potentiellement toxiques. Pour s'en assurer, deux fois par semaine une aliquote de la solution nutritive est prélevée et analysée (anions et cations). Le dosage des éléments dans les solutions nutritives a été réalisé par ICP-OES (pour Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, Mn et Se), par CRC-ICP-MS (pour les concentrations faibles en sélénium) et par HPLC (chlore, sulfate, phosphate, nitrate).

### 2.1.2. Expériences réalisées

Afin de répondre aux problématiques (Chapitre 1, paragraphe 4), la concentration et la forme du sélénium source ainsi que le stade de développement de la plante au moment de la récolte sont les variables de nos expériences. Les 15 modalités sont présentées dans le tableau suivant 2.8. Dans les expériences en phase générative, le sélénium est ajouté à la solution nutritive au stade 5 feuilles des plantes, soit 4 semaines après le début de la germination. L'expérience est ensuite maintenue 2 semaines en présence de sélénium avant récolte des plantes. Dans l'expérience en phase reproductive, le sélénium est ajouté à la solution nutritive

à partir du stade 5 feuilles des plantes jusqu'à la fin de la croissance de la plante (soit 17 semaines après le début de la germination).

Ainsi toutes les deux semaines lors du changement de solution les concentrations en sélénium et de l'ensemble des nutriments redeviennent celles présentes initialement.

Stade de développement	Concentration en sélénium	Forme du sélénium source	Appellation	Nombre de plante
Phase générative Plantes « jeunes »	10 µg/L (0,12 µM)	Séléniate	Se <sup>VI</sup> -T <sub>10</sub>	5
		Sélénite	Se <sup>IV</sup> -T <sub>10</sub>	
		Séléniate/sélénite (50/50)	Se <sup>IV+VI</sup> -T <sub>10</sub>	
		Sans sélénium (Contrôle)	C-T <sub>10</sub>	
	50 µg/L (0,63 µM)	Séléniate	Se <sup>VI</sup> -T <sub>50</sub>	
		Sélénite	Se <sup>IV</sup> -T <sub>50</sub>	
		Séléniate/sélénite (50/50)	Se <sup>IV+VI</sup> -T <sub>50</sub>	
		Sans sélénium (Contrôle)	C-T <sub>50</sub>	
	1000 µg/L (12 µM)	Séléniate	Se <sup>VI</sup> -T <sub>1000</sub>	10
		Sélénite	Se <sup>IV</sup> -T <sub>1000</sub>	
		Séléniate/sélénite (50/50)	Se <sup>IV+VI</sup> -T <sub>1000</sub>	
		Sans sélénium (Contrôle)	C-T <sub>1000</sub>	
Phase reproductive Plantes « matures »	-----	Séléniate	Se <sup>VI</sup> -T	5
		Sélénite	Se <sup>IV</sup> -T	
		Sans sélénium (Contrôle)	C-T	

**Tableau 2.8.** Présentation des différentes modalités testées. Les codes couleur et appellations seront repris dans les figures et tableaux ci-après ainsi que dans les chapitres suivants du manuscrit : Se<sup>VI</sup>-T (en bleu) ; Se<sup>IV</sup>-T (en rouge) ; Se<sup>IV+VI</sup>-T (en vert)

Les concentrations des formes inorganiques du sélénium dans les solutions nutritives ont été suivies, via le système « off-line » HPLC-SAA-GF, dans les expérimentations à 50 et 1000 µg/L : aucune oxydation du sélénite en séléniate n'a été mise en évidence. La forme de sélénium ajoutée initialement dans la solution nutritive est donc inchangée tout le long de l'expérimentation.

## **2.2. Chambres de culture**

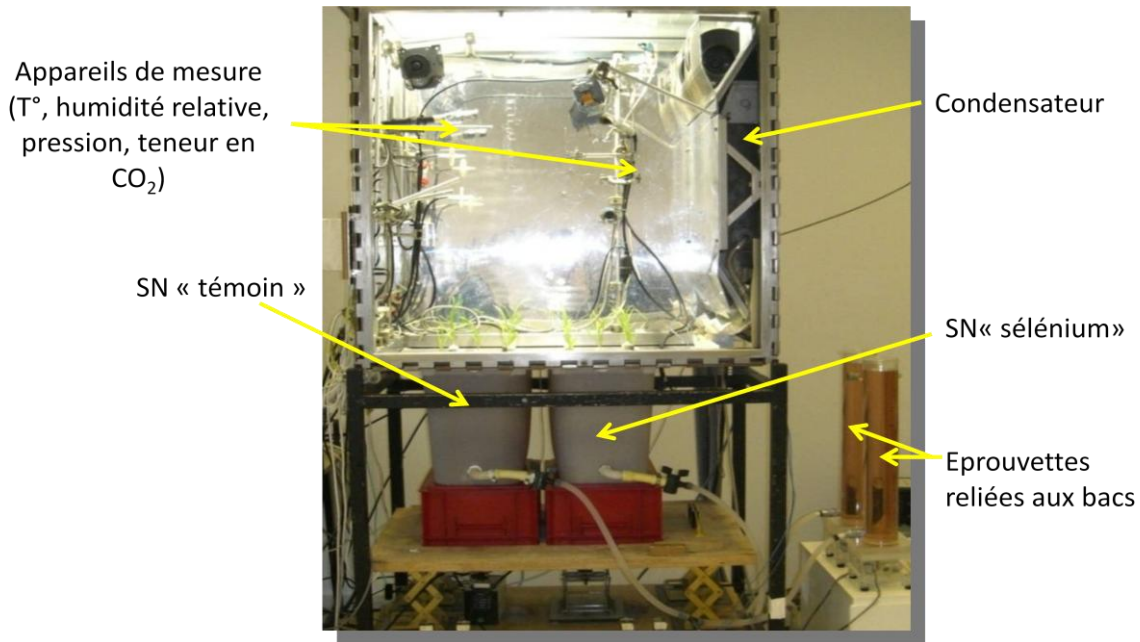
### ***2.2.1. RUBIC I (Laboratoire BioEMCo, équipe « Impacts des changements globaux sur les transferts H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, solutés et particulaires »)***

Le sélénium pouvant être métabolisé sous formes organiques volatiles, les premières expériences (1000 µg/L au stade génératif) ont été réalisées dans une chambre permettant de contrôler l'ensemble des flux eau-plante ainsi que plante-atmosphère.

#### *2.2.1.1. Conditions de culture*

Lorsque les plantules de *Zea mays* subsp. *mays* (L.) sont au stade « 2 feuilles » (soit environ 12 jours après semis dans un bac sous lumière appropriée), elles sont transférées au sein de la chambre de culture, RUBIC I (Fig 2.6), en système hydroponique. Les variations de volume de la solution nutritive sont suivies par des éprouvettes étalonnées. RUBIC I est une chambre de 0,5 m<sup>3</sup> entièrement scellée, développée pour les études des variations isotopiques de l'eau (Bariac et al. 1991). L'éclairage est fourni par 4 ampoules OSRAM HQI-BT (4\*400 W) sur une photopériode de 8 H. Tout au long de la culture, la température de l'air a été réglée à 25°C le jour et 18 °C la nuit ; l'humidité relative 70 %. Ces deux paramètres sont mesurés à l'aide de sondes (Vaisala HMP-45). L'humidité relative est contrôlée via un condensateur à point de rosée (thermo-Neslab Merlin-150). Toute vapeur d'eau excédentaire est condensée (d'où des échantillons nommés « condensats ») et recueillie avec un échantillonneur d'eau (CITP 37000). La concentration de CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère de la chambre est de 400 ppmv. La pression atmosphérique dans RUBIC I est en légère surpression afin d'éviter des contaminations l'extérieures. Enfin, un enregistrement des données (température, humidité, concentration en CO<sub>2</sub>, pression) est réalisé toutes les 10 min à l'aide des interfaces de périphériques analogiques (6B11).



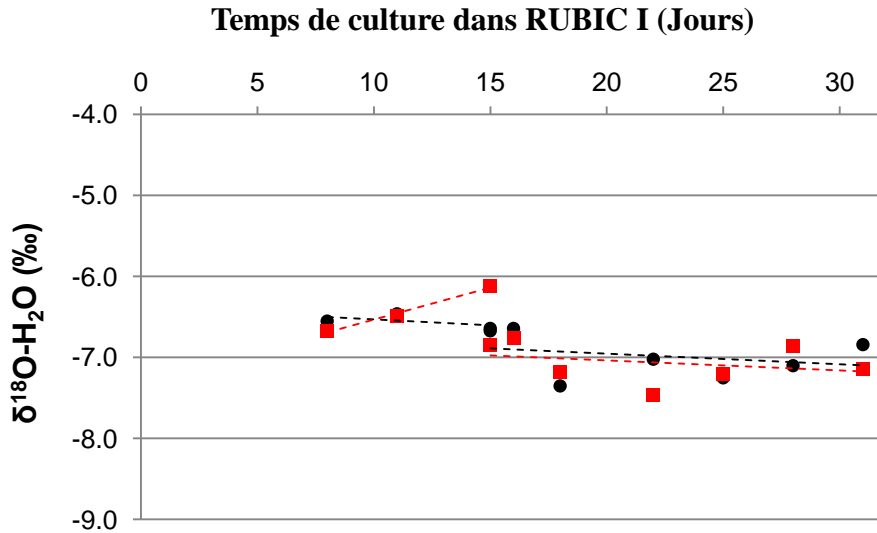


**Figure 2.6.** Photos et description de la chambre RUBIC I (ouverte pour la prise de la photo)

#### 2.2.1.2. Bilan de flux

##### 2.2.1.2.1. Bilan en eau

Un des objectifs de l'utilisation de RUBIC I était de quantifier la volatilisation du sélénium. Pour ce faire, dans un premier temps, nous avons vérifié qu'aucun flux d'eau ne sortait du système (chambre + solution). Lors des expérimentations dans RUBIC I toutes les entrées-sorties d'eau ont été quantifiées : les entrées d'eau ( $130 \pm 2$  L ; via les solutions nutritives initiales) et la somme des volumes d'eau immobilisée (dans les plantes et les volumes de solutions nutritives en fin d'expérience) et extraite (prélèvements et condensats) du système ( $127 \pm 1,5$  L) ne sont pas significativement différentes. Les volumes des solutions nutritives initiales et finales, des prélèvements et des condensats sont mesurés via la pesée de ces échantillons. La mesure du volume d'eau stockée par les plantes sera décrite paragraphe 2.3.3. De plus, la signature isotopique de l'eau,  $\delta^{18}\text{O-H}_2\text{O}$  (Pyr-IRMS, OPTIMA, GV Instrument, analyses effectuées par l'équipe « Impacts des changements globaux sur les transferts (H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, solutés) et particulières » laboratoire BioEMCO), suivie dans les bacs contenant une solution nutritive sans ou avec sélénium (Fig 2.7), est stable durant les 4 semaines de culture ( $-6.9 \pm 0.4$  ‰). Il n'y a pas d'enrichissement isotopique de l' $\delta^{18}\text{O-H}_2\text{O}$ . Par conséquent, il n'y a pas de perte due à l'évaporation de la solution nutritive. La chambre de culture RUBIC I peut donc être considérée comme close et appropriée pour quantifier les flux et donc la volatilisation d'élément tel que le sélénium.



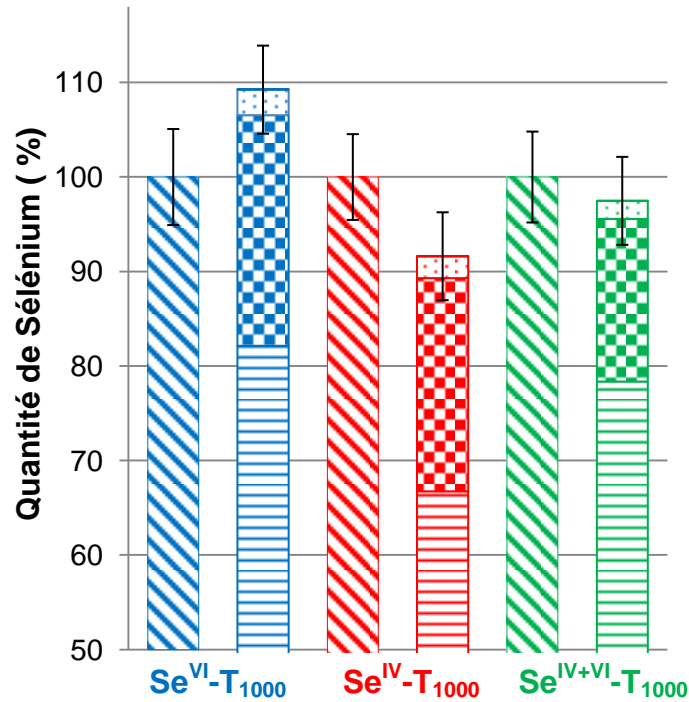
**Figure 2.7.** Evolution de la signature isotopique de  $\delta^{18}\text{O-H}_2\text{O}$  des solutions nutritives : sans sélénium (point, en noir) et avec du sélénium (carré, en rouge)

#### 2.2.1.2.2. Bilan en sélénium : volatilisation

Comme pour les flux d'eau, l'entrée de sélénium (solution nutritive initiale) et la quantité du sélénium immobilisé et extrait du système (solution nutritive finale, plantes, condensats, prélèvements) ne sont pas significativement différentes dans les  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}_{1000}$ ,  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$  et  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}_{1000}$  (Fig 2.8). L'obtention de concentration en sélénium dans les plantes sera décrite dans paragraphe 3.1.1.

A partir de la concentration en sélénium dans les condensats (mesurée par CRC-ICP-MS), la quantité de sélénium volatilisé par les plantes a été calculée : elle ne représente que 0,1% du sélénium ajouté dans le  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$ , et 0,02 % du sélénium dans les  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}_{1000}$  et  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}_{1000}$ . Ainsi durant ses expérimentations, les taux de volatilisation des plantes sont respectivement de 12 ng de sélénium par g de masse sèche (MS) et par jour pour le  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$  1 ng/g MS /j pour les  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}_{1000}$  et  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}_{1000}$ . Ces taux de volatilisation sont extrêmement faibles et négligeables par rapport aux quantités de sélénium accumulé dans les plantes (Fig 2.8) et aux données de la littérature (De Souza et al. 1998, Terry et al. 1992, Zayed et al. 1998). Des plantes cultivées avec 20  $\mu\text{M}$  de sélénite ou de séléniate en hydroponie (soit 1,6 fois plus que cette expérimentation) ont des taux de volatilisation entre 30 de 4000 fois plus élevés (De Souza et al. 1998, Terry et al. 1992, Zayed et al. 1998).

Pour conclure, au vu de ces résultats, la volatilisation du sélénium par le maïs dans l'ensemble de nos expériences est considérée comme une voie négligeable de la métabolisation du sélénium.



**Figure 2.8.** Quantité en sélénium dans les différents compartiments dans le système solution nutritive-plante-atmosphère (RUBIC I) : solutions nutritives initiales (traits diagonaux) ; solutions nutritives finales (traits horizontaux) ; plantes (damier) ; prélèvements (pointillés) ; condensats (plein) ; Se<sup>VI</sup>-T<sub>1000</sub> (en bleu) ; Se<sup>IV</sup>-T<sub>1000</sub> (en rouge) ; Se<sup>IV+VI</sup>-T<sub>1000</sub> (en vert)

### 2.2.2. Chambre de culture (CDC) à Jussieu (Laboratoire BioEMCo, équipe GOME)

Afin de répondre au besoin de culture à un débit plus élevé mais avec les mêmes conditions de température et d'humidité que RUBIC I, une nouvelle chambre de culture au sein de l'équipe GOME a été élaborée et construite. La volatilisation étant considérée comme négligeable, il n'y a pas de dispositif permettant de récupérer les condensats.

De même que pour les expériences réalisées dans RUBIC I, lorsque les plantules de *Zea mays* subsp. *mays* (L.) sont au stade « 2 feuilles » (soit environ 12 jours après la mise à germer), elles sont transférées au sein de la chambre de culture, CDC, en système hydroponique. L'éclairage est assuré par deux lampes à décharges d'halogénures métalliques de 400 W (Growth spectra, MH400W, E40) sur une photopériode de 8 H. La chambre est située dans une pièce climatisée assurant une température de 25 °C le jour et 18 °C la nuit. L'humidité est stabilisée, via la ventilation de la CDC, vers 70 %.

**2.2.3. RUBIC V (Laboratoire BioEMCo, équipe « Impacts des changements globaux sur les transferts H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, solutés et particulaires »)**

Afin de cultiver des plants de maïs jusqu'à maturité des grains, il était nécessaire d'utiliser une chambre de culture dimensionnée à cet effet sachant qu'à ce stade de maturité les plantes peuvent atteindre 2 m de hauteur. La chambre RUBIC V (Servathin, France) de 9 m<sup>3</sup> est entièrement scellée, également développée pour les études isotopiques de l'eau. L'éclairage est assuré par 15 ampoules de 400 W (w Philips Son-T Agro). La température de l'air est de 25 °C le jour et 18 °C la nuit sous une photopériode de 8 H. L'humidité de l'air est contrôlée par un condensateur à point de rosée, afin de maintenir une valeur consigne de 70 % d'humidité relative. Au-delà de ce point de consigne, la vapeur d'eau excédentaire est condensée et recueillie à l'aide d'un échantillonneur d'eau (Isco l'eau 3700). La concentration de CO<sub>2</sub> est réglée à 400 ppmv. La chambre est en légère surpression (+ 20 Pa) afin d'éviter toute entrée d'air. L'ensemble des données a été enregistrées par un ordinateur avec un pas de temps de 10 min.

Durant cette expérience, les trois modalités de culture (sans sélénium, avec séléniate et avec sélénite) sont développées en même temps dans RUBIC V. Le bilan d'eau n'a pas pu être réalisé pour des questions techniques et pratiques (notamment l'ouverture de la porte pour les changements réguliers des solutions nutritives, celles-ci étant dans la chambre contrairement à la chambre RUBIC I où les solutions sont en dessous et donc en dehors de la chambre). Cependant les concentrations en sélénium dans les condensats ont néanmoins été analysées (par CRC-ICP-MS) : les résultats montrent que le taux de volatilisation des plantes est du même ordre de grandeur que l'expérience dans RUBIC I (soit quelques ng de sélénium /g de MS/ jour). La volatilisation est donc également négligeable pour les plantes matures de *Zea mays*.

**2.3. Production de biomasse**

**2.3.1. *Stade de développement***

A partir des conditions de culture, les sommes des degré-jours ont été calculées. La récolte des plantes dites « jeunes » est effectuée environ 45 jours après le début de la germination, soit à environ 700 degré-jours correspondant donc à la phase générative avant l'apparition d'appareil reproducteur. Les plantes « jeunes » sont donc dans une phase intense d'accumulation d'éléments.

La récolte des plantes dites « matures » se produit à la fin de la maturation des grains soit 120 jours après le semis, ce qui correspond à 1860 degré-jours.

### 2.3.2. Surface foliaire

Le poids de la biomasse en fin d'expérience et dans des conditions optimales de cultures, est un bon indicateur de la toxicité du sélénium. Cependant un autre paramètre permet de suivre la production végétale dans le temps sans détruire la plante : la surface foliaire. **A notre connaissance, aucune étude portant sur la toxicité du sélénium sur les plantes n'a suivi ce paramètre tout le long d'une expérimentation.**

Afin de suivre la croissance des plantes durant les expériences, une méthode non-destructive a été employée : la mesure de la surface foliaire. Cette méthode consiste à mesurer à intervalles réguliers, les longueurs et largeurs de chaque feuille des plants de maïs afin de calculer la surface foliaire de chaque plante via la formule suivante (Fig 2.9) (Fakorede et al. 1977, Ruget et al. 1996):

$$\text{Surface foliaire} = \sum_{i=1}^n (L_i * l_i * 0,75)$$

**Figure 2.9.** Formule de la surface foliaire d'un plant de *Zea mays*

*L*: longueur de la feuille (en cm) ; *l* : largeur de la feuille (cm); *i* : nombre de feuille par plante

### 2.3.3. Biomasse fraîche et sèche

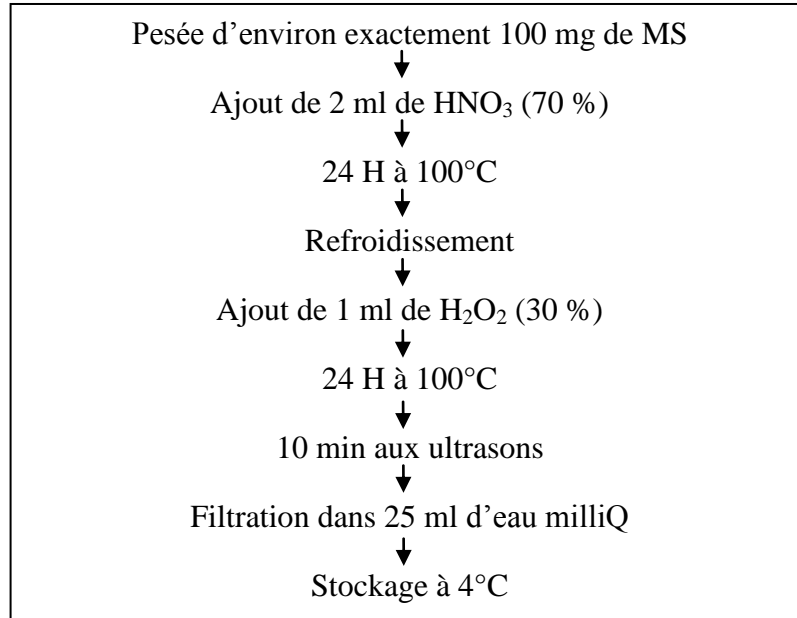
Au moment de la récolte des plantes, les différents organes de la plante sont séparés et pesés (masse fraîche) : racines, tige, feuilles et grains. Les racines sont rincées trois fois avec de l'eau déminéralisée ; la concentration en sélénium dans l'eau de rinçage des racines est inférieure à la limite de détection de l'ICP-MS.

Les échantillons de plantes sont ensuite lyophilisés et pesés ; la MS par organes est ainsi obtenue. La différence entre la masse fraîche et la MS correspond au volume d'eau stockée par les plantes (utilisé pour bilan en eau paragraphe 2.2.1.2.1). Finalement, les échantillons sont broyés à l'aide un broyeur automatique en agate afin d'obtenir des échantillons de poudre fine et homogène.

### 3. PRE-TRAITEMENTS DES ECHANTILLONS

#### 3.1. Minéralisation par voie humide en milieu fermé

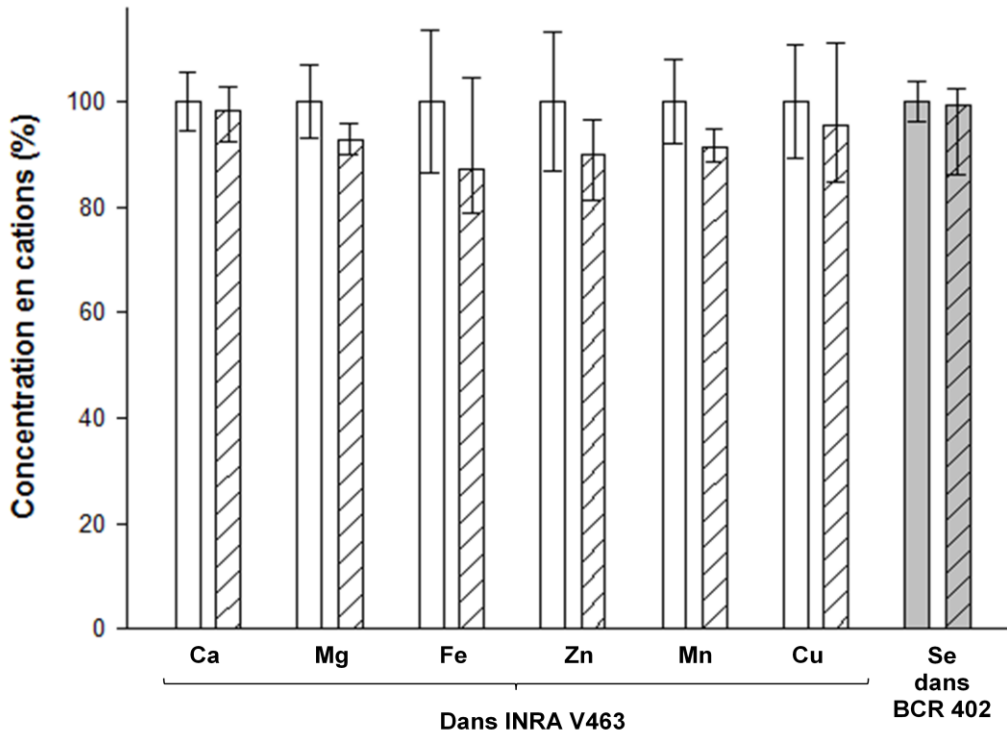
Le protocole de minéralisation est présenté dans la figure 2.10.



**Figure 2.10.** Description détaillée du protocole de minéralisation des échantillons de plantes

L'ensemble des échantillons minéralisés est dosé par ICP-OES (pour le Ca, Mg, Fe, Zn, Cu Mn et Se) et par ICP-MS/CRC (pour les concentrations faibles en sélénium). La limite de détection en sélénium dans les plantes est de 0,01 µg/g. Dans les plantes cultivées sans sélénium (C-T<sub>10</sub>, C-T<sub>50</sub> et C-T<sub>1000</sub>), la médiane des concentrations en sélénium est de 0,1 (0,09 ; 0,11) µg/g, ce qui est très inférieur à l'ensemble des concentrations en sélénium dans les plantes traitées avec du sélénium. Cette valeur correspond au bruit de fond du sélénium dû à l'ensemble du procédé expérimental : culture des plants, traitements des échantillons et techniques d'analyse.

Dans chaque série d'échantillons minéralisés, un échantillon de référence de plante certifié en sélénium (white clover, BCR 402), un échantillon de référence interne en calcium, magnésium, fer, zinc, cuivre et manganèse (INRA maïs V463) ainsi qu'un « blanc » (sans échantillon de plantes) subissent les mêmes étapes de traitements/conditionnement que les échantillons. Les concentrations de l'ensemble des éléments analysés dans les deux échantillons de référence sont similaires aux valeurs cibles (Fig 2.11). La minéralisation par voie humide est donc considérée comme totale : elle met en solution l'intégralité des éléments mesurés.



**Figure 2.11.** Concentrations cibles (en plein) et mesurées (en traits diagonaux) des différents éléments dans les échantillons de référence : INRA V463 (blanc) et BCR 402 (en gris)

### **3.2. Mise au point d'une méthode d'extraction conservant la spéciation du sélénium dans un échantillon : extraction enzymatique**

Les résultats de ce paragraphe sont intégralement présentés sous le format d'un article soumis dans « Analytical and Bioanalytical Chemistry », à l'exception des numéros de tableaux et figures, changés afin de respecter le suivi de numérotation de ce manuscrit.

#### ***3.2.1. Introduction***

Selenium is an essential micro-nutrient for animals and humans. Despite plants being the major pathway for selenium introduction in the food chain, this element does not appear to be an oligo-element for plants (Terry et al. 2000, Thomson 2004). All of the processes involved in selenium flux into the food chain strongly depend on its speciation. Therefore, the total selenium, as well as the selenium species in different compartments of the ecosystem, are key parameters to assess selenium impact on ecosystems and on human and animal health.

The naturally-occurring trace element Se, chemically similar to sulfur, has two inorganic oxidized forms namely selenite (+IV) and selenate (+VI). These forms are more soluble,

mobile and easily absorbed by plants. In addition, the inorganic form can (i) be stocked in different tissues of plants or (ii) can be reduced in selenide (-II) and metabolized in selenoamino acids, as selenomethionine or selenocystein which remain free or are incorporated in proteins (Sors et al. 2005) : the absorbed forms of selenium determine intra-plant selenium dynamics.

Analysis of total selenium and its species in plant samples requires hyphenated analytical technique combining a method of separation (HPLC for example) followed by sensitive detection method (CRC-ICP-MS for example). The current study focuses on the first step of the speciation preparation: the extraction process. Acid digestions are commonly used to determine total Se in samples, but the mixture of acids is very oxidant and alters Se speciation in the biological samples. Therefore, other methods are investigated to preserve Se speciation including: (i) water extraction for soluble Se (Larsen et al. 2006, Mazej et al. 2006, Smrkolj et al. 2005, Tan and Marchall 1997) and (ii) enzymatic hydrolysis, mostly with unspecific enzymes to extract Se compounds more or less bonded to organic molecules (protein principally). Regarding the enzymatic hydrolysis, various protocols are present in the literature: (i) some enzymes, as protease, lipase, cellulase or drilase principally, can be used alone, mixed, or in sequential extraction; (ii) the mass proportion of samples versus enzymes varies although Mazej *et al.* (2006) and Smrkolj *et al.* (2005) show that enzyme hydrolysis efficiency was not affected by enzyme mass; (iii) and various no-chlorophyll tissue samples were used to control the quality of the extraction as reference yeast sample (Kotrebai et al. 1999, Polatajko et al. 2005, Sannac et al. 2009), garlic (Kotrebai et al. 1999, Larsen et al. 2006, Montes-Bayon et al. 2006), seeds (Smrkolj et al. 2005) or flour (Diaz Huerta et al. 2003). Mazej *et al.* (2008) only have tested protease hydrolysis on chlorophyll tissues.

Considering all of the previous protocols on a large variety of samples, efficiencies of enzymatic hydrolysis vary between 70 and 130 %. Origins of these variations are not clearly identified: that come from enzymes or mass sample/enzyme used, or vegetal tissue tested. Knowing the importance of Se speciation in its intake in the food chain, the current issue aims (i) at explaining the origin of such heterogeneity and (ii) at presenting an efficient extraction method without altering original speciation in *Zea mays* samples (an essential plant for human and animal food). To do this, the results of various protocols of enzymatic hydrolysis were first compared to the most classical acid digestion using a reference material plant (BCR 402). Then, various types of maize tissues of heterogeneous composition (for example in content of chlorophyll, lignin, suberin, cellulose) were tested with the most efficient enzymatic hydrolysis.



### 3.2.2. Experimental

#### 3.2.2.1. Materials and reagents

A certified reference material plant, (white clover, BCR 402), containing  $6.7 (\pm 0.25) \mu\text{g/g}$  of Se was used to tested different enzymatic extractions. To carry out enzymatic hydrolysis, protease type XIV ( $\geq 3.5$  units/mg solid from *Streptomyces griseus*, Sigma Aldrich), lipase type VII ( $\geq 700$  units/mg solid from *Candida rugosa*, Sigma Aldrich) or cellulase ( $\geq 5000$  units/g solid from *Trichoderma viride*, Sigma Aldrich) were solubilized in Tris-HCl buffer (at 30 mM, pH=7, Rockland).  $\beta$  Mercaptoethanol molecular biology grade 99.8 %, (Calbiochem) is diluted to obtain 0,1% v:v in samples.

For sample digestion  $\text{HNO}_3$  (70 %, trace analysis grade, Fisher scientific) and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (about 30 %, AnalaR NORMAPUR, VWR PROLABO) are employed.

#### 3.2.2.2. Samples

After germination of *Zea mays*, seedlings were transplanted into a hydroponic system with a modified Hoagland nutrient solution in controlled atmosphere chamber. The nutrient solutions were supplemented with  $12 \mu\text{M}$  of selenium (i.e. 1 mg/L of Se) with  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  or  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ . Around 14 weeks after germination, at maturity of grain maize, all the plants (5 for each treatment) were harvested and the roots rinsed. Then, the leaves, stems, roots and grains were separated, freeze-dried and ground with an automatic agate mortar and dry weights (DW) were measured.

#### 3.2.2.3. Procedures

*Acid digestion.* Plant material (about 100 mg DW) was digested in 2 mL of  $\text{HNO}_3$  (70 %) at  $100^\circ\text{C}$  for 24 h. Then after cooling, 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 %) was added and the samples were reheated at  $100^\circ\text{C}$  for 24 h. Finally samples were filtered in 25 mL and stored at  $4^\circ\text{C}$ .

*Water and Tris-HCl extractions.* For these extractions, about 100 mg DW sample with 5 mL of milliQ water or Tris-HCl (30 mM) were heated for 24 H at  $37^\circ\text{C}$  (DigiPREP Jr, 24 Position) under regular agitation. Samples were introduced 10 min in ultrasonic bath, and then were centrifuged at 4000 rpm during 30 min (Eppendorf, centrifuge 5810). The surnageants were filtered and stored at  $4^\circ\text{C}$  with 0.1% of mercaptoethanol to avoid oxidation. Selenium in those samples was measured quickly.

*Enzymatic hydrolysis.* About 100 mg DW sample was submitted to different enzymatic extractions: (i) P: 20 mg of protease, (ii) P+L: 20 mg of protease and 10 mg of lipase, (iii)

P+L+C: 20 mg protease, 10 mg of lipase and 20 mg of cellulase, (iv) P+L/C: it is series extraction which in first step 20 mg of protease and 10 mg of lipase and in second step 20 mg cellulase. For each modality, controls with enzymes and without samples were realized. All samples were incubated in 5 ml of Tris-HCl buffer for 24H at 37°C (DigiPREP Jr, 24 Position) under regular agitation. After, samples were introduced 10 min in ultrasonic bath, and were centrifuged at 4000 rpm during 30 min (Eppendorf, centrifuge 5810). The supernatants were filtered and stored at 4°C with 0.1% of mercaptoethanol to avoid oxidation. Samples were measured quickly.

*Instrumentation.* Selenium concentration in the digested tissues samples was determined either by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES, JY 2000, LOD: 50µg/L) or by inductively coupled plasma mass spectroscopy (CRC-ICP-MS, Thermo X Series II, LOD: 50 ng/L) depending on the magnitude of expected concentrations. A blank and a reference material (water, TMDA-64) were included in each batch of samples.

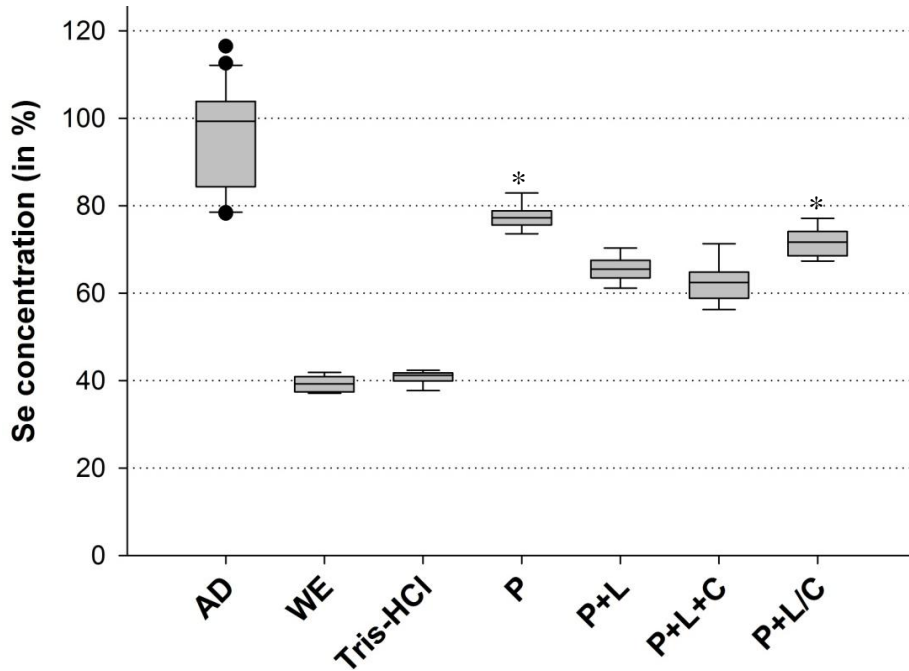
### 3.2.3. Results and discussion

#### 3.2.3.1. Certified reference material

Total selenium is extracted in plant samples with acid digestion. With this method, Se concentration measured in BCR 402 (6.7 µg/g (5.8; 6.9) of Se) is not different from target certified value. P+L and P+L+C hydrolysis yields are significantly lower than that of acid digestion, whereas those of P and P+L/C are similar.

Enzymatic hydrolyses have better efficiencies than water and Tris-HCl extractions which have the lowest yields, around 40 %. The presence of enzymes instead of Tris-HCl buffer clearly improves the extraction yield. On the other hand, a mixture of different enzymes has a negative effect on the extraction efficiencies (Fig 2.12): to use a mixture of several enzymes, sequential extractions are probably necessary.

This study shows that protease hydrolysis, 77 % (77; 78) has the highest efficiency of those tested (Fig 2.12). This efficiency is similar to extraction results on chicory and garlic (Larsen et al. 2006, Mazej et al. 2006, Mazej et al. 2008) and slightly lower than on yeast which is a simpler biological organism. Furthermore, the hydrolysis extraction with protease yields the best returns to solubilise total selenium without altering the original speciation in samples; so this protocol was chosen to extract Se species in *Zea mays* samples.



**Figure 2.12.** Efficiency (%) of different extraction in certified reference material, BCR 402. Box and whisker plots show 10<sup>th</sup>, 25<sup>th</sup>, 50<sup>th</sup>, 75<sup>th</sup>, 90<sup>th</sup> and the furthest data (in black points)

\*Extractions not significantly different with acid digestion (Kruskal and Wallis test with alpha 0.05).

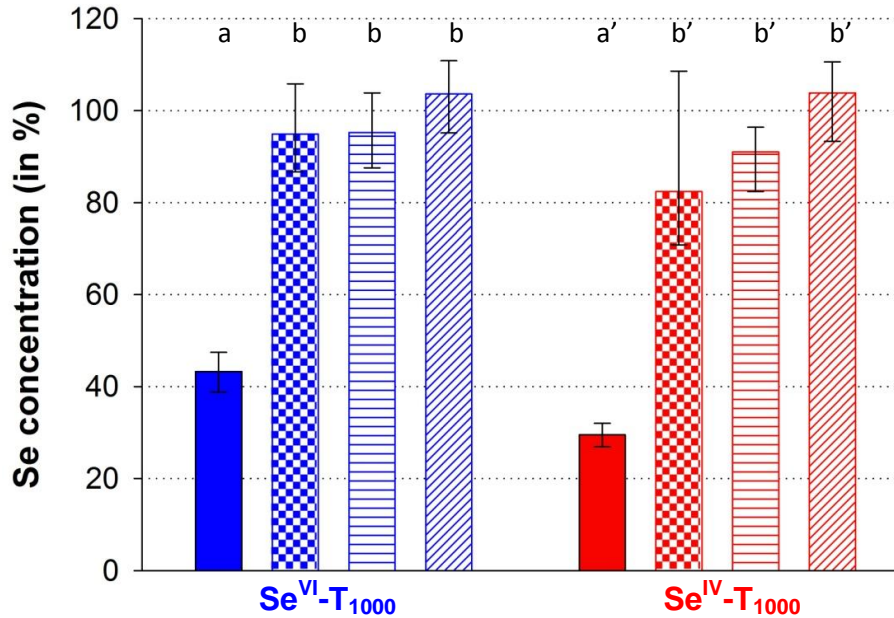
AD: Acid digestion; WE: water extraction; Tris-HCl: Tris-HCl extraction; P: protease hydrolysis; P+L: protease and lipase hydrolysis; P+L+C: protease, lipase and cellulase hydrolysis; P+L/C: sequential extraction with protease and lipase then cellulose

### 3.2.3.2. Zea mays samples

Different tissues of maize treated with selenate or selenite in the nutrient solution are submitted to protease extraction. Figure 2.13 shows that efficiencies of the protease hydrolysis for maize stems, leaves and grains are similar (on average 95 %) and similar to acid digestion, whatever the inorganic Se forms in nutrient solution. In top tissues, this hydrolysis gives a good representativeness of Se speciation in samples unlike for roots, where efficiency does not exceed 50 %. Selenium seems to be more extractable in tops of maize than in roots. Moreover, for roots treated with selenate, efficiency of hydrolysis is higher than for roots treated with selenite (Fig 2.13): Se for roots treated with selenite seems more strongly linked than Se for roots treated with selenate. Roots are complex tissues which can be notably constituted by strongly suberized cells (Schreiber et al. 1999) known to be an important Se metabolization site (Terry et al. 2000), mainly when the Se form source is selenite. Thus, selenium in roots, especially those treated with selenite, is (i) less extractable (probably Se

protein complex) or (ii) less accessible for enzymes (probably trapped in ultra-structure complex as suberin).

To conclude, analysis of Se speciation in grains or forage, consumed by humans or animals, was produced by protease hydrolysis.



**Figure 2.13.** Efficiency (%) of protease hydrolysis on different maize tissues treated with selenate or selenite: Roots (in plain); stems (in checker board); leaves (in light horizontal); grain (in wide upward diagonal). Values are medians (lower: 10<sup>th</sup> percentile; upper: 90<sup>th</sup> percentile). a, b, a' et b': results of Kruskal and Wallis test with alpha 0.05

Les expérimentations présentées dans cet article sont focalisées sur le rendement des extractions enzymatiques effectuées sur différents organes de maïs. Par la suite, le dosage des différentes formes inorganiques du sélénium s'effectuera via HPLC-SAA-GF « off line », seulement dans les échantillons issus des extractions enzymatiques avec protéase.

Pour les modalités en phase générative (Tableau 2.8), la MS des racines est faible et de l'ordre de 100-150 mg. De ce fait et en raison du seuil de détection de la méthode HPLC-SAA-GF « off line », les extractions enzymatiques (suivies de la détermination de la concentration des formes inorganiques) n'ont été réalisées que sur les échantillons de plantes issus de l'expérience réalisée en phase reproductrice : dans cette dernière expérimentation de longue durée, des quantités conséquentes d'échantillons récoltés ainsi que des concentrations en sélénium suffisantes permettent la mise en œuvre de ce type d'extraction. Pour finir, la concentration des formes organiques est la différence entre le sélénium total dans l'échantillon (obtenu par minéralisation) et la somme des deux formes organiques.

#### 4. TESTS STATISTIQUES UTILISÉS

Les tests statistiques réalisés sur l'ensemble des résultats sont des tests non-paramétriques étant donné le nombre d'individus toujours inférieur à 30 (10 ou 5 plantes). Ainsi les tests de Wilcoxon-Mann-Whitney (test bidirectionnel,  $\alpha = 0,05$ ) et de Kruskal et Wallis (test bidirectionnel,  $\alpha = 0,05$ ) ont été utilisés pour comparer deux ou plusieurs groupes respectivement. Ces tests calculent la valeur P, probabilité que la différence entre les groupes soit aléatoire. Si la valeur de P est inférieure à 5 % alors les groupes sont considérés comme statistiquement différents. Dans les figures, les résultats des tests statistiques sont représentés par des lettres a, b, et c.

Dans cette étude, les valeurs ont été présentées sous forme de médiane (1<sup>er</sup> quartile (Q1); 3<sup>ème</sup> quartile (Q3)).

**CHAPITRE 3 :**

**TRANSFERT, ACCUMULATION ET  
SPECIATION DU SELENIUM CHEZ  
LE *ZEA MAYS***



***PARTIE A:***  
***CULTURES DES PLANTS DE ZEA MAYS JUSQU'AU***  
***STADE GENERATIF***

**1. EXPERIENCES A FAIBLES CONCENTRATIONS (10 et 50 µg/L) EN SELENIUM**

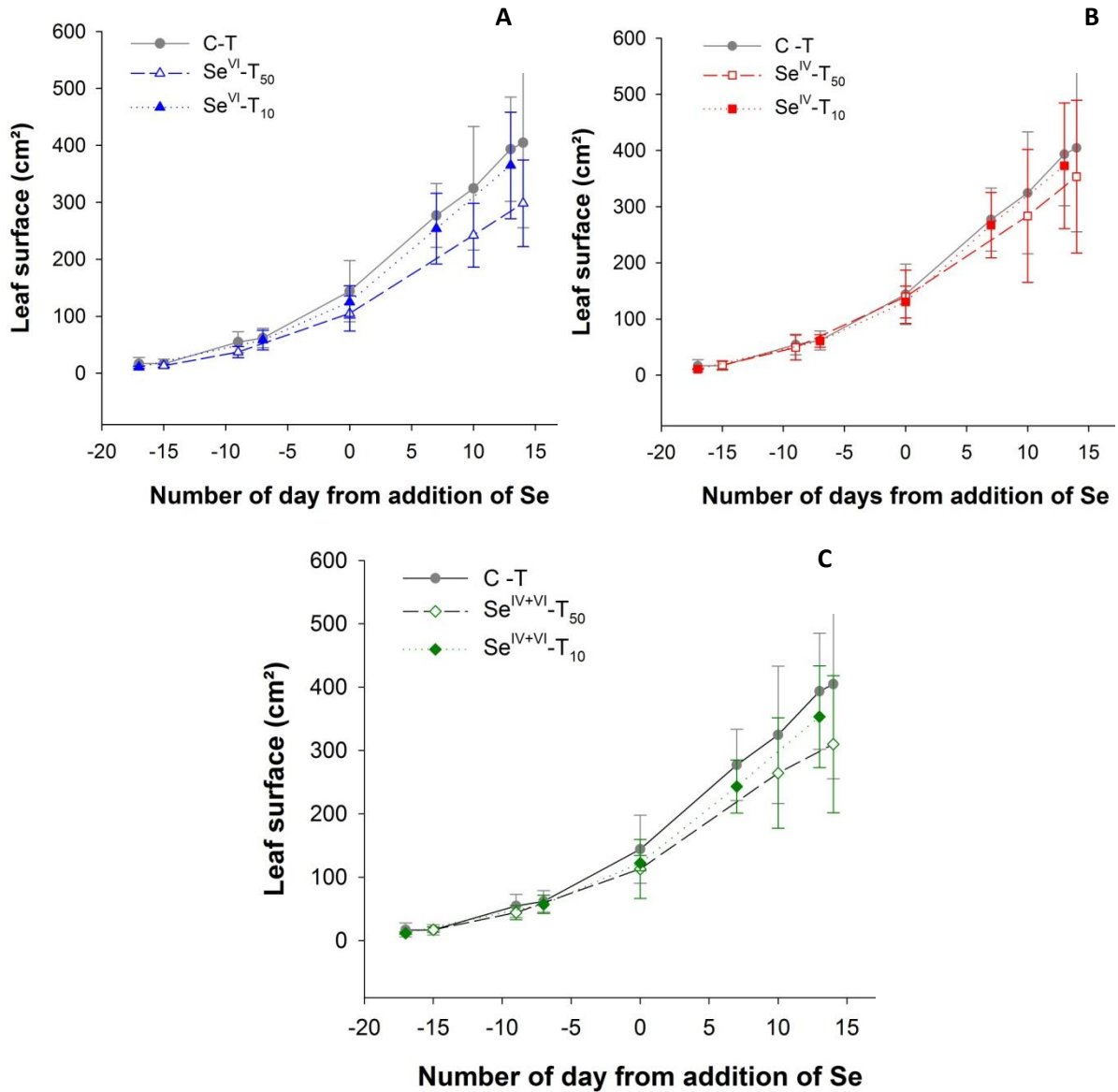
Cette première partie sera consacrée aux résultats des expériences précédemment décrites, les données et les discussions sur les deux expériences réalisées au stade génératif des plantes (chambre de culture de Jussieu) à faibles concentrations en sélénium (10 et 50 µg/L) et en présence de différentes formes de sélénium source (séléniate, sélénite ou mixte séléniate/sélénite) sont présentées. Ces données et résultats sont publiés dans la revue *Plant and Soil* (Longchamp et al. 2012), article intégralement présenté en annexe 1. Seuls les résultats et discussions de cet article sont repris et présentés tels quels, ci après, à l'exception des numéros de tableaux et figures, changés afin de respecter le suivi de numérotation de ce manuscrit.

**1.1. Results**

***1.1.1. Biomass production and tolerance toward selenium***

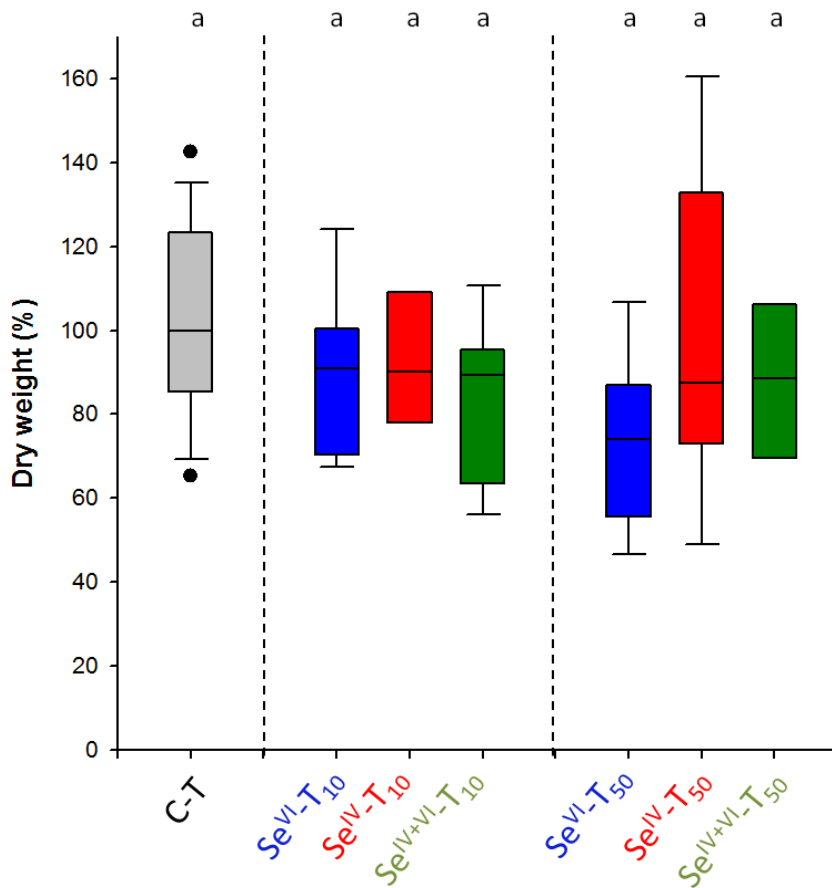
To monitor the canopy biomass for each of the seven treatments (C-T, Se<sup>IV</sup>-T, Se<sup>VI</sup>-T and Se<sup>IV+VI</sup>-T), leaf area was calculated (Fig 3.A.1). In all treatment conditions, the change in leaf area was exponential and never reached a plateau. Whatever form (selenite or/and selenate) or concentration (10 or 50 µg/L) supplied, Se had no statistically negative effect on leaf area.





**Figure 3.A.1.** Increase in leaf area (in cm<sup>2</sup>) of the maize plants in the 7 different treatments. A: Selenate/control treatment; B: Selenite/control treatment; C: Mix/control treatment. Values are average  $\pm$  SD

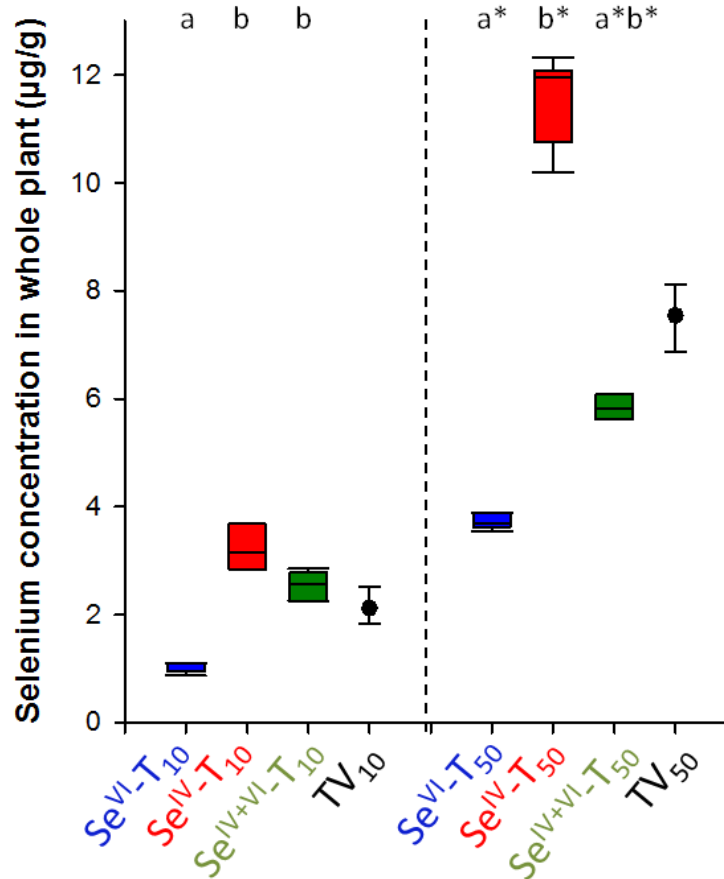
Biomass production is presented in Figure 3.A.2. The dry weights of the maize plants at the end of the experiment were not significantly different. Similarly, no difference in dry weights of the roots, stems or leaves was found among all the treatment conditions (data not shown).



**Figure 3.A.2.** Dry biomass production (in g) of maize plants in the 7 different treatments: C-T (in gray); Se<sup>IV</sup>-T (in blue); Se<sup>VI</sup>-T (in red); Se<sup>IV+VI</sup>-T (in green). Box and whisker plots show 10<sup>th</sup>, 25<sup>th</sup>, 50<sup>th</sup>, 75<sup>th</sup>, 90<sup>th</sup> and the furthest data (in black points). a: results of the Kruskal and Wallis test

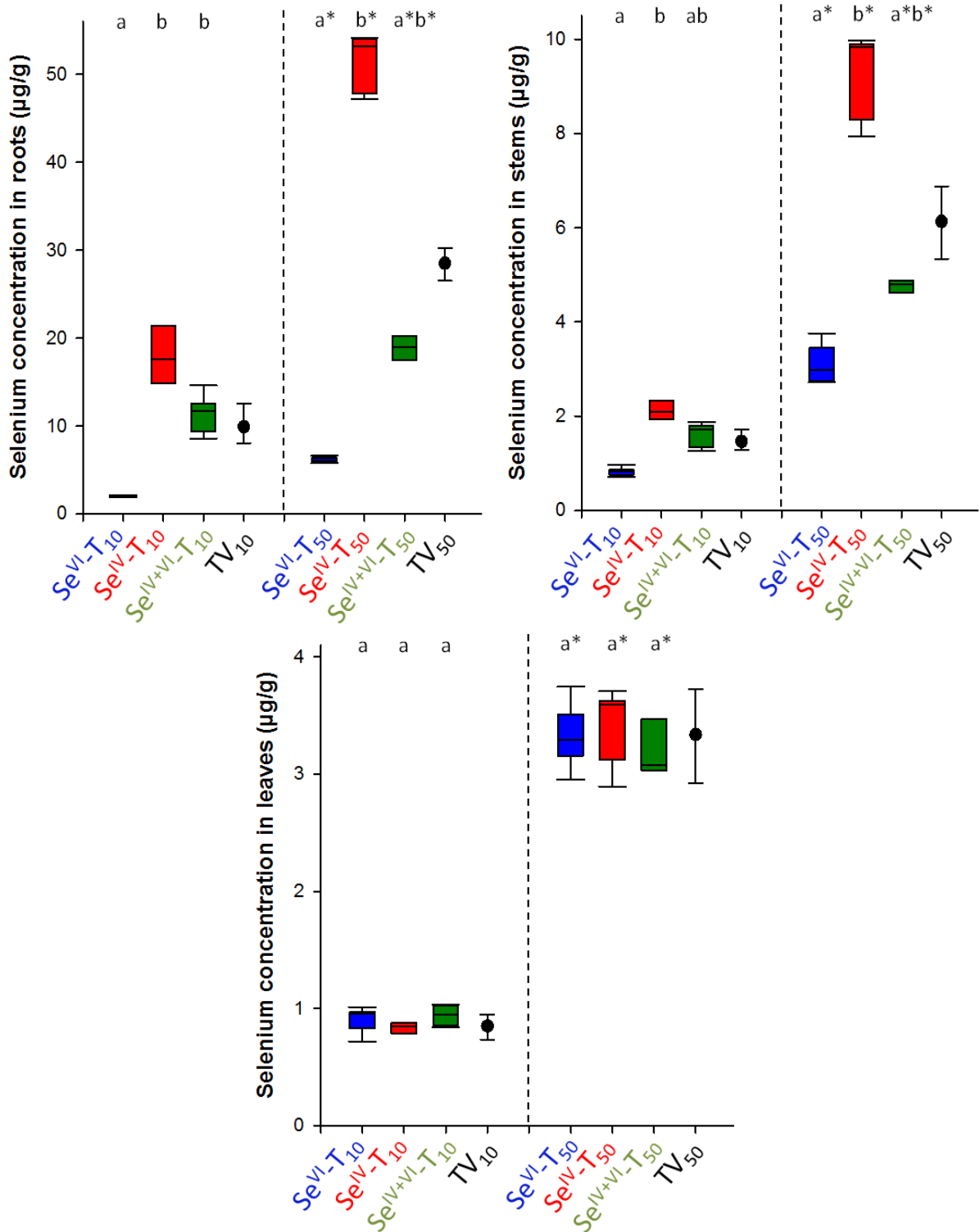
### 1.1.2. Comparison of selenite and selenate uptake and accumulation in *Zea mays*

Se concentrations in the dry samples from a given plant were analyzed separately for each tissue type (roots, stems and leaves), the sum of which gave the total Se concentration for that plant. The median Se concentration of the plants is presented in Figure 3.A.3. For both Se nutrient solution concentrations, Se plant concentrations for the Se<sup>IV</sup>-T (selenite treatments 2 and 5) were higher (188% and 223% in 10 µg/L and 50 µg/L respectively) than for the Se<sup>VI</sup>-T (selenate treatments 1 and 4).



**Figure 3.A.3.** Selenium concentrations (in µg/g DW) in whole maize plants in 6 different treatments (excluding controls):  $Se^{VI}$ -T (in blue);  $Se^{IV}$ -T (in red);  $Se^{IV+VI}$ -T (in green). A theoretical average (●) was calculated from measured values in  $Se^{IV}$ -T and  $Se^{VI}$ -T. a, b, a\* and b\*: results of Kruskal and Wallis test

Figure 3.A.4 shows that Se concentrations in the different plant tissues strongly depended on the Se-forms supplied. Se concentrations in the roots and stems only were also higher for the  $Se^{IV}$ -T compared to the  $Se^{VI}$ -T. However, notwithstanding the inorganic form of Se supplied, Se concentrations in the leaves remained similar (around 0.9 µg/g in 10 µg/L treatments and 3.3 µg/g in 50 µg/L treatments). Translocation factors (concentration ratio of shoots to roots) (Table 3.A.1) were lower when the plants were treated with selenite than with selenate.

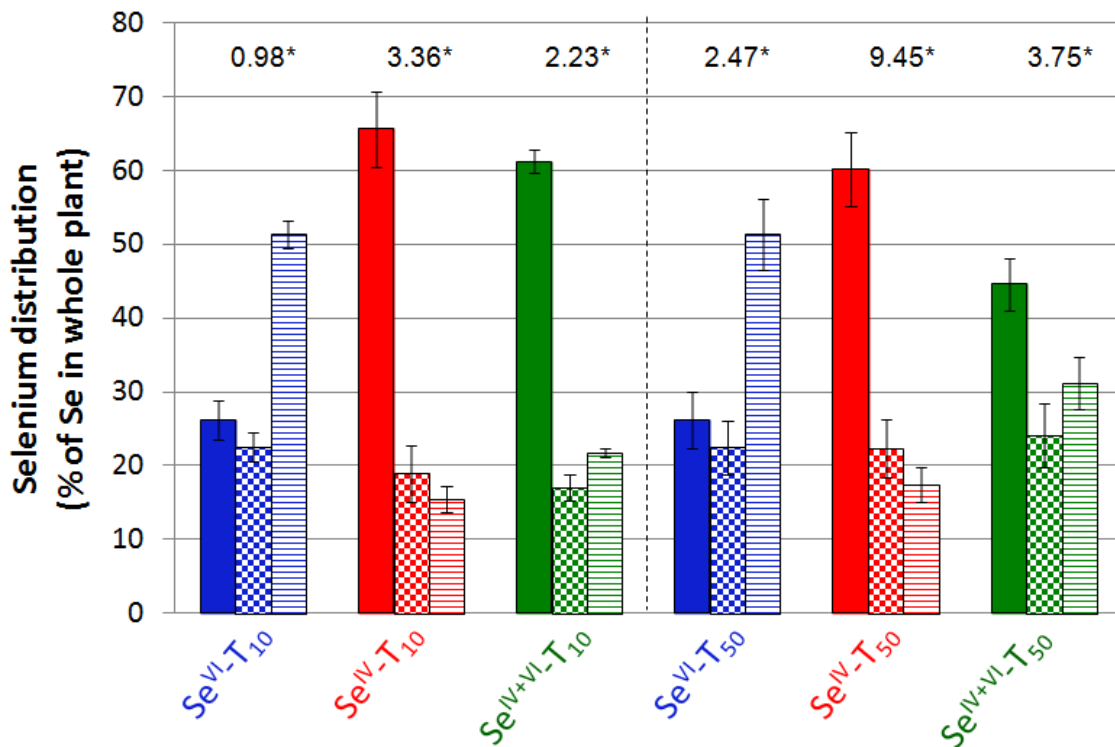


**Figure 3.A.4.** Selenium concentrations (in µg/g DW) in roots, stems or leaves of maize plants in 6 different treatments (excluding controls):  $Se^{IV}-T$  (in gray);  $Se^{VI}-T$  (in dark gray);  $Se^{IV+VI}-T$  (in white). A theoretical average (●) was calculated from measured values in  $Se^{IV}-T$  and  $Se^{VI}-T$ . a, b, a\* and b\*: results of Kruskal and Wallis test

	Se concentration in hydroponic solution	
	10 µg/L	50 µg/L
Se <sup>VI</sup> -T	0.43 (0.38; 0.43)	0.49 (0.49; 0.58)
Se <sup>IV</sup> -T	0.07 (0.06; 0.08)	0.1 (0.1; 0.11)
Se <sup>IV+VI</sup> -T	0.1 (0.09; 0.11)	0.2 (0.19; 0.21)

**Table 3.A.1.** Translocation factor (concentration ratio of shoots to roots) according to concentrations and forms of selenium in the nutrient solution. Values are median (Q1; Q3)

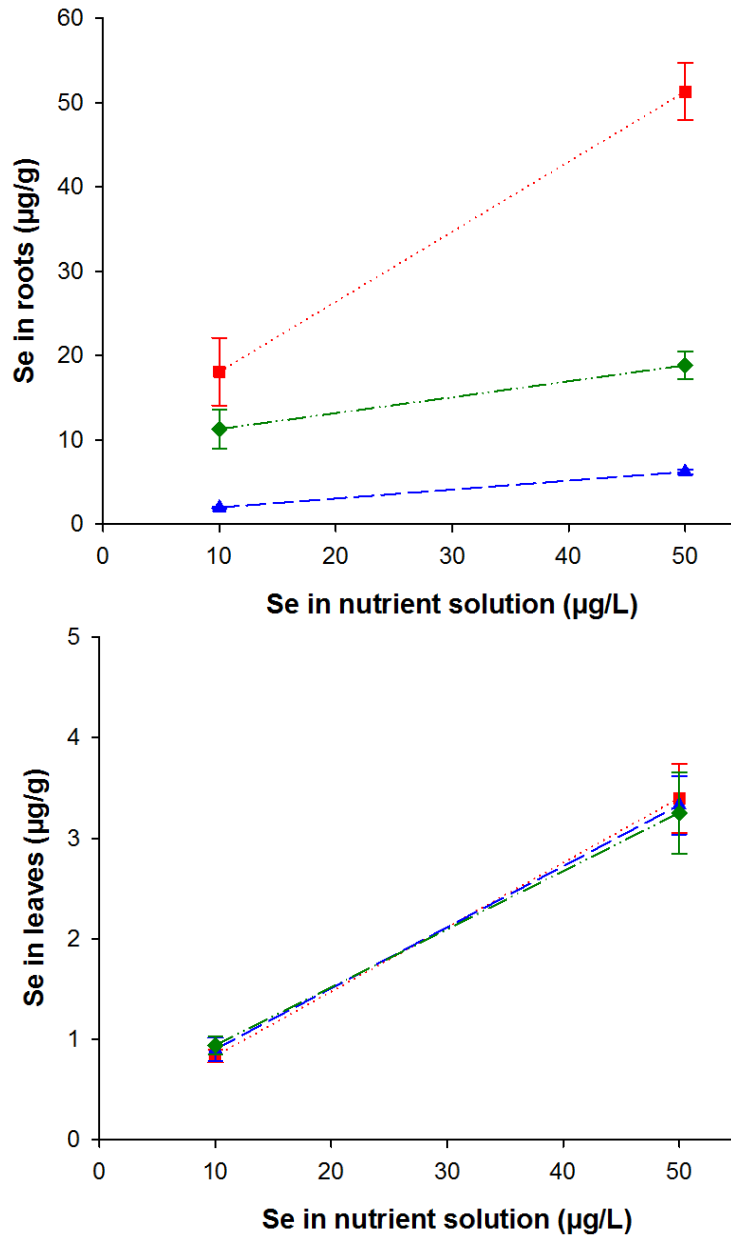
The allocation of Se in plants is summarized in Figure 3.A.5. For both Se<sup>VI</sup>-T and Se<sup>IV</sup>-T, Se allocations were independent of the Se concentrations in the nutrient solution. For the Se<sup>IV</sup>-T, Se content in roots was around 63 % of total plant Se whereas only 16 % and 20 % was found in leaves and stems respectively. However, for the Se<sup>VI</sup>-T, the allocation of Se among the 3 tissue types differed dramatically: the Se amount in leaves represented about 50% of total plant Se compared to about 25% in roots and stems.



\*Total Se content in µg per plant

**Figure 3.A.5.** Selenium amount (in µg) in roots, stems or leaves of maize plants in 6 different treatments (excluding controls): Se<sup>VI</sup>-T (in blue); Se<sup>IV</sup>-T (in red); Se<sup>IV+VI</sup>-T (in green); roots (in plain); stems (in checker board); leaves (in light horizontal)

Se plant concentrations were significantly higher for the  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}_{50}$ , and  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{50}$  than for the  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}_{10}$  and  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{10}$  (3.4 and 3.8 times respectively). Likewise, Se concentrations in different tissues increased with external Se concentrations (Fig 3.A.6). In roots enriched with selenite, the rate of accumulation is about eight times faster compared to roots enriched with selenate, whereas in shoots, the rate of accumulation is similar in plants enriched with selenate and selenite.



**Figure 3.A.6.** Accumulation kinetics of selenium by roots or leaves of *Zea mays* plants in concentration sequence in 6 different treatments (excluding controls):  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$  (red square and dotted line);  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}$  (blue triangle and dashed line);  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}$  (green diamond and mixed line). Values are average  $\pm$  SD

### 1.1.3. Interaction between selenate and selenite

Se plant concentration (Fig 3.A.3) for the  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$  treatments was higher (22% in the 10  $\mu\text{g/L}$  treatment and 111% in the 50  $\mu\text{g/L}$  treatment) than for the mixtures  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}$ . Inversely, Se plant concentrations for the  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}$  were higher (136% in the 10  $\mu\text{g/L}$  treatment and 53% in the 50  $\mu\text{g/L}$  treatment) than for  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}$ . Se plant concentrations are therefore best described as  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T} > \text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T} > \text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}$  whatever the concentration of Se supplied. As was the case for total plant concentrations, Se concentrations in roots and stems (Fig 3.A.4) were higher for the  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$  than for the  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}$ , which in turn was higher than for the  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}$ . On the other hand, leaf Se concentrations were similar for the  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}$ ,  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}$  and  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$  for both concentrations supplied. Translocation factors (Table 3.A.1) are best described as  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T} > \text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T} > \text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$  for both concentrations of supplied Se. Se allocation (Fig 3.A.5) for the  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}$  was similar to  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$ , Se being mainly stored in the roots; however, root Se content represented 61% for the  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}_{10}$  and only 44% for the  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}_{50}$ .

For both Se concentrations in the nutrient solution, a theoretical value of Se (TV) was calculated (average and its variation) for the  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}$  and  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$  treatments based on actual measured plant or tissues concentrations. This TV represented the concentration of Se in plants when there was no interaction between selenite and selenate and was compared to the co-exposure treatment results. In  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}_{10}$  plants, Se concentration did not differ from the TV, but in the  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}_{50}$  plants, it was 34% lower than the TV. Such a feature is also observed in roots and stems: Se concentrations for the  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}_{10}$  were equal to the TVs; whereas for the  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}_{50}$ , the concentrations were lower than the TVs (52% and 30% in roots and stems respectively).

Total plant Se concentration for the  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}_{50}$  was only 2.2 times higher compared to the Se concentration for the  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}_{10}$ . This enrichment factor of  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}$  is significantly lower than in  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$  and  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}$  plants. In  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}$  roots, the rate of accumulation was about four times slower than in  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$  roots but about twice faster than in  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}$  roots ; whereas in shoots, the rate of accumulation was similar in  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}$  and  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$  or  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}$  plants (Fig 3.A.6).

## 1.2. Discussion

### 1.2.1. *Metabolic pathways of selenium in Zea mays*

Leaf area characterizes the canopy of an ecosystem which is the preferred site for exchange between plants and the atmosphere. Biomass production is directly associated with light interception by the canopy, which is also related to leaf area (Gitelson et al. 2003, Maddonni and Otegui 1996). Changes in leaf area are characterized by: 1) a linear increase associated to the growth stage and biomass production by the plant, and 2) a stationary stage associated to the reproductive stage of plant during which biomass production is slowed, sometimes sharply (Gitelson et al. 2003, Maddonni and Otegui 1996). In this study, the maize plants were harvested during the growth stage before any decrease in biomass production. Based on the exponential change of leaf area and dry biomass measured in the present experimentations, we found that neither selenate nor selenite is harmful to plant growth at concentrations not exceeding 0.63  $\mu\text{M}$ . Our results are similar to previous studies which showed that at low Se concentrations (2  $\mu\text{M}$  of selenite), and whatever form of Se supplied, the biomass production of strawberry clover and perennial ryegrass (Hopper and Parker 1999) were not affected. However, at higher concentrations (Hopper and Parker 1999, Ximenez-Embun et al. 2004), both selenite and selenate decrease biomass production, i.e. 20% for white lupine and 40% for sunflowers in a selenite treatment (12  $\mu\text{M}$  of selenite) (Ximenez-Embun et al. 2004) and 10 % for strawberry clover in a selenate treatment (10  $\mu\text{M}$  of selenate) (Hopper and Parker 1999).

In this discussion, Se volatilization has not been taken into account. In fact, in another experiment (data not presented) with 12  $\mu\text{M}$  of Se in the nutrient solution (i.e. 50 or 100 times higher than the concentration used in the present study), we found that *Zea mays* does not significantly volatilize Se.

Selenium accumulation in plants depends on the species of Se available. In the literature, results on Se metabolism in plants are not homogenous. With 20  $\mu\text{M}$  of Se added, Se accumulation from selenate was two to four times higher than from selenite in Indian mustard, broccoli, sugarbeet, white lupine and sunflowers (De Souza et al. 1998, Ximenez-Embun et al. 2004, Zayed et al. 1998). Zayed *et al.* (1998) and Li *et al.* (2008) found a similar accumulation for two Se forms in rice (supplied with 20  $\mu\text{M}$  of Se) and wheat (supplied with 10  $\mu\text{M}$  of Se). According to Zhang *et al.* (2003), Se accumulation from selenite is higher than from selenate in soybean, independent of Se concentrations in the nutrient solution. According to Li *et al.* (2008), this discrepancy is mainly due to differences in phosphate concentrations in the nutrient solution: high concentrations of phosphate (i.e. 100  $\mu\text{M}$ ) must



have suppressed the selenite uptake. However, in our study, though phosphate concentrations were as high as in most hydroponic experiments (0.95 mM of phosphate), Se accumulation in plants supplied with selenite was higher than with selenate. Our results clearly show that at low concentrations of Se in the hydroponic solution, selenite is more accumulated than selenate in *Zea mays*, without any detrimental effects on plant growth. Maize, like ferns (Srivastava et al. 2007) and cereals, varies in its ability to accumulate Se from different Se forms.

As for the distribution of Se within the tissues of the plants, at low concentrations of Se in the nutrient solution, our data show that the activity of root absorption is eight times lower with selenate than with selenite. The mechanism of selenate absorption via sulfate transporters has been well documented. Two types of transporters are involved in the process of root sulfate absorption: high affinity transporters ( $K_m$  for sulfate of 7-10  $\mu\text{M}$ ), and low affinity transporters ( $K_m$  for sulfate 100  $\mu\text{M}$ ). Studies on the over-expression of high-affinity or low-affinity transporter genes have demonstrated that only the over-expression of high transporters increases selenate accumulation in Indian mustard (Terry et al. 2000). These results support the view that selenate uptake is mediated by high-affinity sulfate transporters in plants. This expression gene is strongly up regulated in plants deprived of external sulfate: low sulfate conditions and/or the presence of selenate in the nutrient solution induced an increase in high-affinity transporter gene expression (Terry et al. 2000, Yoshimoto et al. 2002). In our experiment, *Zea mays* was grown in normal nutrient conditions (0.72 mM sulfate); soil solutions typically contain about 0.5 mM sulphate (Hopper and Parker 1999). The mechanisms of selenite uptake have not been documented as well as for selenate and are less well understood. Several studies have suggested that plant uptake of selenite is via passive diffusion (Arvy 1993, Sors et al. 2005); but this hypothesis has been refuted by Li *et al.* (2008) and Hopper and Parker (1999) who support the view that selenite uptake is active but is inhibited by phosphate and metabolic inhibitors. In the present study, despite the high phosphate concentration in nutrient solution (0.95 mM of phosphate), selenite uptake remains higher than selenate.

For leaves, the results are totally different: for both inorganic forms of Se supplied, the Se concentrations in the leaves are similar and vary only with Se concentration levels in the nutrient solution. Similar results have been reported by Zhang *et al.* (2003). These data provide evidence for the singularity of Se pathways in *Zea mays* supplied with low Se concentrations: there appears to be a nearly exclusive form of Se which is translocated into leaf blades, probably an organic form metabolized in the roots and/or leaf sheaths. Selenate is

less metabolized into an organic Se form than selenite. Indeed, the reduction of selenate into selenite is the rate-limiting step in selenate metabolism in plants (De Souza et al. 1998, Li et al. 2008, Terry et al. 2000). In *Zea mays* at low concentrations of Se supplied, organoselenium compounds, which are less toxic (Terry et al. 2000), are metabolized and stored in roots and/or leaf sheaths more effectively when plants treated with selenite as opposed to selenate. According to the literature (De Souza et al. 1998, Li et al. 2008, Terry et al. 2000), Se translocation from root to shoot was higher in plants enriched with selenate. In fact, in selenate supplied plants, the translocation factor varied between 1.5 and 17 but in selenite supplied plants, it was consistently less than 0.5. In the literature, this has been explained by the high mobility of selenate compared to selenite resulting in high Se levels in leaves. However, in this study, Se allocation was mainly controlled or limited by root absorption.

### ***1.2.2. Interactions between selenite and selenate in Zea mays***

Interactions between selenite and selenate depend on the Se concentration in the nutrient solution. With 0.12  $\mu\text{M}$  of Se added, total plant accumulation, and more particularly root absorption, were not affected by either Se form. With a higher concentration of Se supplied (0.63  $\mu\text{M}$ ), selenate inhibited the accumulation of selenite. The selenium concentrations in roots as well as the rate of Se accumulation show that this decrease was mainly due to the inhibition of root selenite absorption. This can be explained by the metabolism of selenate in plants : the reduction of the selenate into selenite is a limiting step (Pilon-Smits et al. 1999). At 0.12  $\mu\text{M}$  for both Se forms supplied, the saturation threshold of the enzyme is not reached; so the rate of reduction is high: selenate is reduced into selenite and then to organoselenium compounds. At 0.63  $\mu\text{M}$  for both Se forms supplied, the enzyme may not completely reduce selenate uptake by the roots; in this case, selenate would have a negative effect (direct and/or indirect) on root selenite absorption.

This result is not consistent with Li *et al.* (2008) who conclude that the presence of selenite decreases selenate uptake and xylem transport. The two studies cannot be compared; in fact, Li *et al.* (2008) used high concentrations of Se supplied (10  $\mu\text{M}$ ) which therefore induced higher Se accumulation in plants with supplied selenate than with supplied selenite.

### ***1.2.3. Selenium diet***

Our findings indicate that even at low concentrations and with only slight increases in Se in the nutrient solution, Se content in maize (leaves, stems and roots) could be enhanced

without toxic effect. Such slight changes should therefore be taken into account to improve Se density in mammals' diets via the food chain.

Following root uptake, the Se is redistributed in varying degrees to the aerial parts of the plant which are often of greater interest in the food chain. Our study shows that selenite supplementing is the most effective way to accumulate Se in the shoots (part of the maize plant consumed as forage). Moreover, according to the literature (Li et al. 2008, Terry et al. 2000, Ximenez-Embun et al. 2004), selenoamino-acid production is high (about 40% of the total Se in the plant). These organic Se forms are more efficiently assimilated by animals and humans than inorganic forms (Rayman 2008). However, interactions between selenite and selenate exist and influence their absorption. Their assimilation also greatly depends on the Se concentrations supplied. Maize ranks first among cereals produced worldwide with 824 million tons in 2010/2011 (Le Stum 2011); maize plants are consumed as grains or used as forage for animals. It therefore seems crucial to investigate the possible enrichment of *Zea mays* to counteract Se deficiencies in mammal's diets.

To this end, the hydroponics experiment provided a useful starting point without extrapolating results from hydroponics culture to field conditions. Nevertheless, to date the rare results on selenium accumulation in maize realized in field, concluded that Se accumulation in *Zea mays* is generally weak, i.e. between 50 and 500 ng/g, in Se poor soils or with fly-ash amendment (Chilimba et al. 2011, Mbagwu 1983). In the present study, even with the low Se concentration chosen in the nutrient solution, maize could accumulate more than 500 ng/g in all the vegetative tissues of the plants.

### **1.3. Conclusion**

At low concentrations of Se supplied (i.e. 0.12  $\mu\text{M}$  and 0.63  $\mu\text{M}$  of Se), plant biomass production does not decrease. Se plant concentrations are higher with selenite rather than selenate added to the nutrient solution. In the selenate supplied experiment, Se was principally translocated to leaves whereas in the selenite supplied experiment, it mainly accumulated in the roots. Moreover, at 0.63  $\mu\text{M}$  of Se, selenate seems to inhibit selenite root absorption. The difference between our results and the literature can mainly be explained by the difference in Se concentrations in the nutrient solution used: typically, supplied Se concentrations are high; whereas in our study, we kept Se concentrations close to levels typically found in soil solutions.

## 2. EXPERIENCES A FORTE CONCENTRATION (1000 µg/L) EN SELENIUM

Dans cette seconde partie, nous présenterons et discuterons d'abord des résultats des expérimentations réalisées au stade génératif des plantes (RUBIC I) (paragraphe 2.1). Ensuite (paragraphe 2.2), nous comparerons les résultats des expérimentations effectuées à faible (paragraphe 1) et forte concentrations en sélénium.

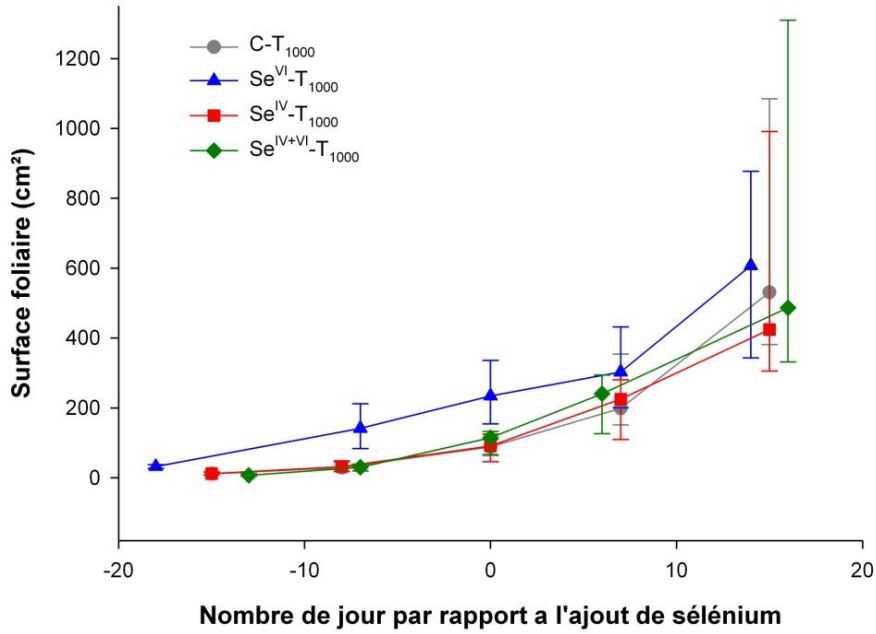
Pour visualiser l'ensemble des résultats de ce stade génératif, les figures présentées dans ce paragraphe (Fig 3.A.8, 3.A.9, 3.A.10, 3.A.11) sont les figures publiées dans l'article précédent (Longchamp et al. 2012) implémentées des résultats des expérimentations à 1000 µg/L

### 2.1. Résultats

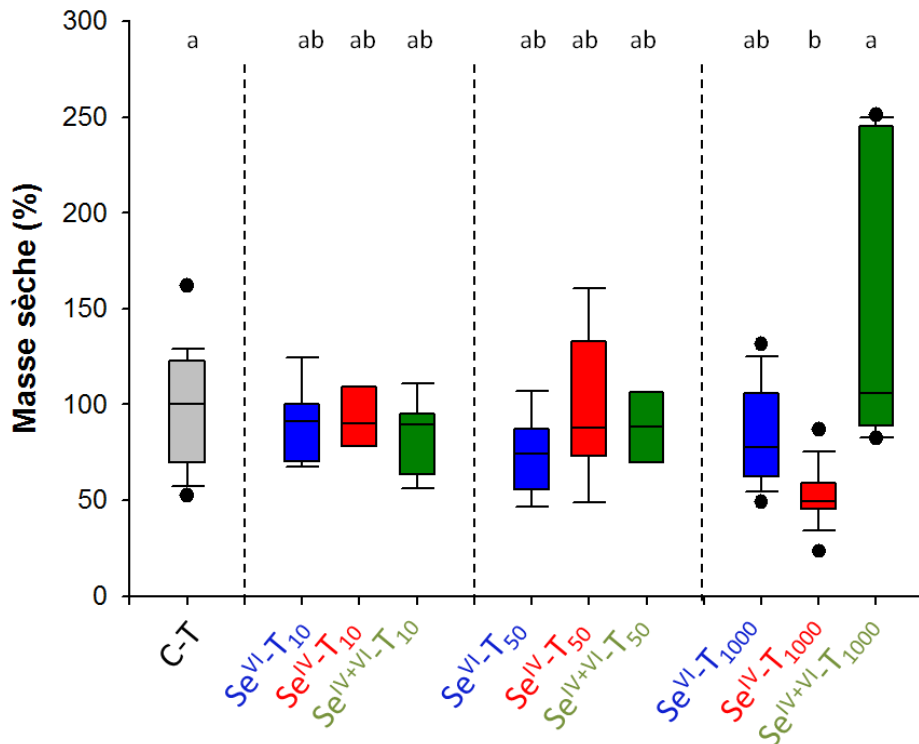
#### 2.1.1. *Production de biomasse et tolérance envers le sélénium*

Pour chacun des 4 traitements, la biomasse de la canopée a été suivie tout le long de l'expérience grâce à la mesure de la surface foliaire (Fig 3.A.7). Pour l'ensemble des traitements, l'évolution de la surface foliaire est exponentielle et n'atteint pas de plateau. D'après les résultats présentés (Fig 3.A.7), les surfaces foliaires des plantes traitées au sélénium ( $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}_{1000}$ ,  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$  et  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}_{1000}$ ) ne sont pas différentes de celles des plantes témoins (C-T<sub>1000</sub>).

La production de la biomasse après récolte est présentée sur la figure 3.A.8 pour les différents traitements. Les masses sèches des plants de maïs des  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}_{1000}$  et  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}_{1000}$  ne sont pas significativement différentes de celles des plants témoins. Par contre, les plantes du  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$  ont en moyenne une biomasse sèche 51 % plus faible que celles des plantes témoins.



**Figure 3.A.7.** Evolution de la surface foliaire ( $cm^2$ ) des plants de maïs pour les 4 traitements. Les points représentent les médianes, les barres les 10<sup>ème</sup> percentile et 90<sup>ème</sup> percentile



**Figure 3.A.8.** Production de biomasse sèche (%) dans les 10 traitements différents: C-T (en gris);  $Se^{IV}$ -T (en bleu);  $Se^{IV}$ -T (en rouge);  $Se^{IV+VI}$ -T (en vert). Les boîtes et moustaches représentent les 10<sup>ème</sup>, 25<sup>ème</sup>, 50<sup>ème</sup>, 75<sup>ème</sup>, 90<sup>ème</sup> percentiles et les valeurs extrêmes (en points noirs). a et b: résultats du test de Kruskal and Wallis

Les masses sèches de chaque organe des plantes sont présentées dans le tableau 3.A.2. Par rapport aux plantes témoins, la biomasse des tiges et des feuilles des plantes du  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$  diminuent respectivement de 63 % et 42 %. Contrairement à ces deux organes, pour les racines aucune différence de biomasse entre les différents traitements n'est observée.

	Contrôle	Séléniate	Sélénite	Mix
<b>Racines</b>	100 <sup>ab</sup> (90; 126)	145 <sup>ab</sup> (94;176)	82 <sup>a</sup> (63;94)	177 <sup>b</sup> (129; 193)
<b>Tiges</b>	100 <sup>a'c'</sup> (55; 122)	60 <sup>a'b'</sup> (44; 78)	37 <sup>b'</sup> (34; 44)	151 <sup>c'</sup> (104; 259)
<b>Feuilles</b>	100 <sup>a*</sup> (78; 134)	94 <sup>a*b*</sup> (65; 104)	58 <sup>b*</sup> (51; 66)	100 <sup>a*</sup> (82; 264)

*Les valeurs sont les médianes (Q1; Q3)*

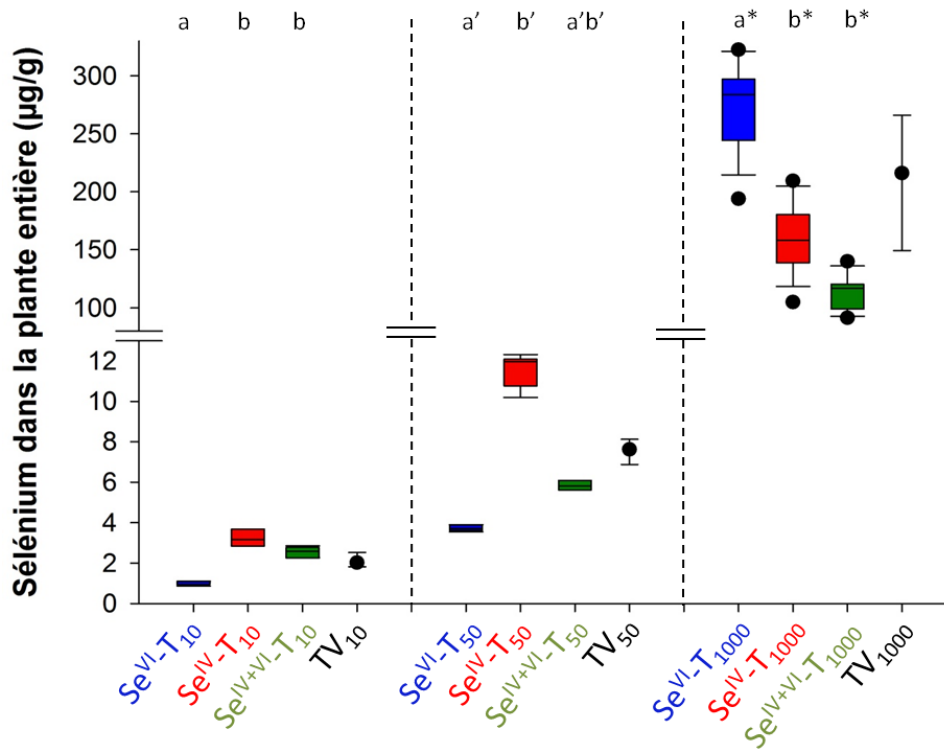
**Tableau 3.A.2.** Production de la biomasse sèche (en %) des 3 organes (racines, tiges, feuilles) des plants de maïs dans les 4 traitements : C-T<sub>1000</sub>,  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}_{1000}$ ,  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$  et  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}_{1000}$ . a,b ,a',b',c',a\* et b\* : résultats des tests de Kruskal and Wallis

### **2.1.2. Absorption et accumulation du séléniate et sélénite dans le *Zea mays* : effet de la forme du sélénium inorganique**

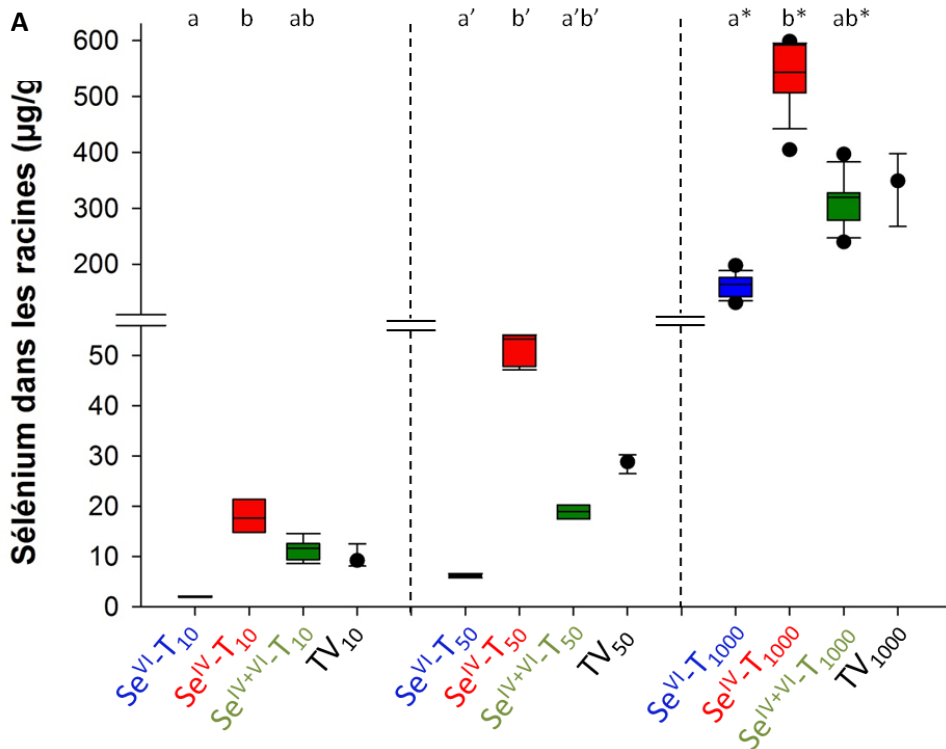
Les plantes témoins ayant une concentration en sélénium inférieure à la limite de détection de l'ICP-OES : les résultats ne sont pas présentés sur les figures suivantes.

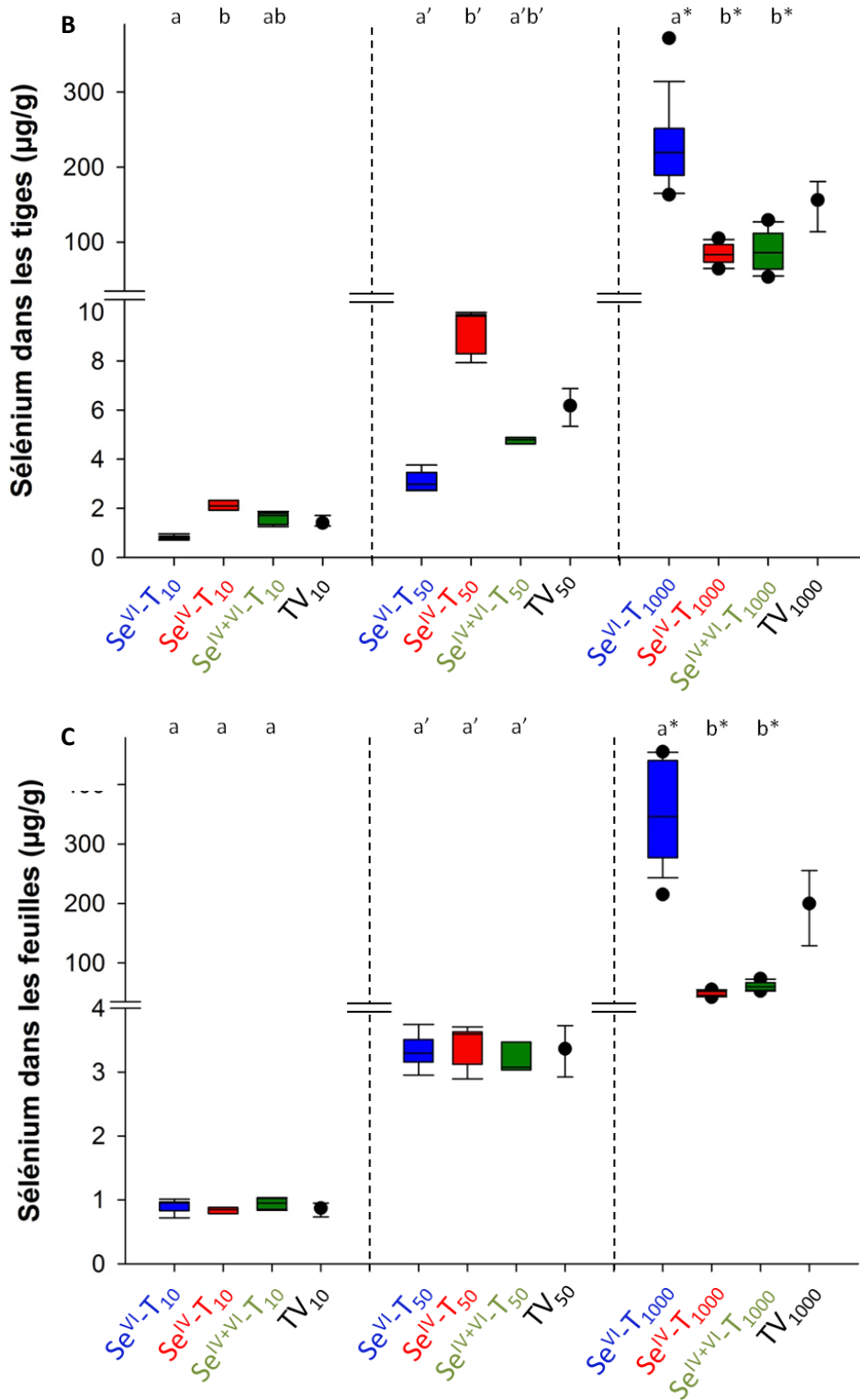
La concentration en sélénium dans la plante entière (Fig 3.A.9) est 77 % plus élevée dans les plantes du  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}_{1000}$  que dans celles du  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$ .

Comme pour la plante entière, la concentration en sélénium dans les différents organes (Fig 3.A.10) dépend fortement des conditions de traitement. En effet, la concentration en Se dans les racines est 234 % plus élevée pour le  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$  que pour le  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}_{1000}$ . Au contraire, les tiges et les feuilles du  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}_{1000}$  ont 170 % et 570 % plus de sélénium que celles du  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$ .



**Figure 3.A.9:** Concentrations en sélénium ( $\mu\text{g/g MS}$ ) dans les plantes entières pour 9 traitements (excluant les traitements contrôles) :  $Se^{VI}-T$  (en bleu) ;  $Se^{IV}-T$  (en rouge)  $Se^{IV+VI}-T$  (en vert). Moyennes théoriques (  $\bullet$  ) calculées à partir des valeurs mesurées dans  $Se^{VI}-T$  et  $Se^{IV}-T$ . a,b, a',b',a\* et b\*: résultats des tests de Kruskal and Wallis



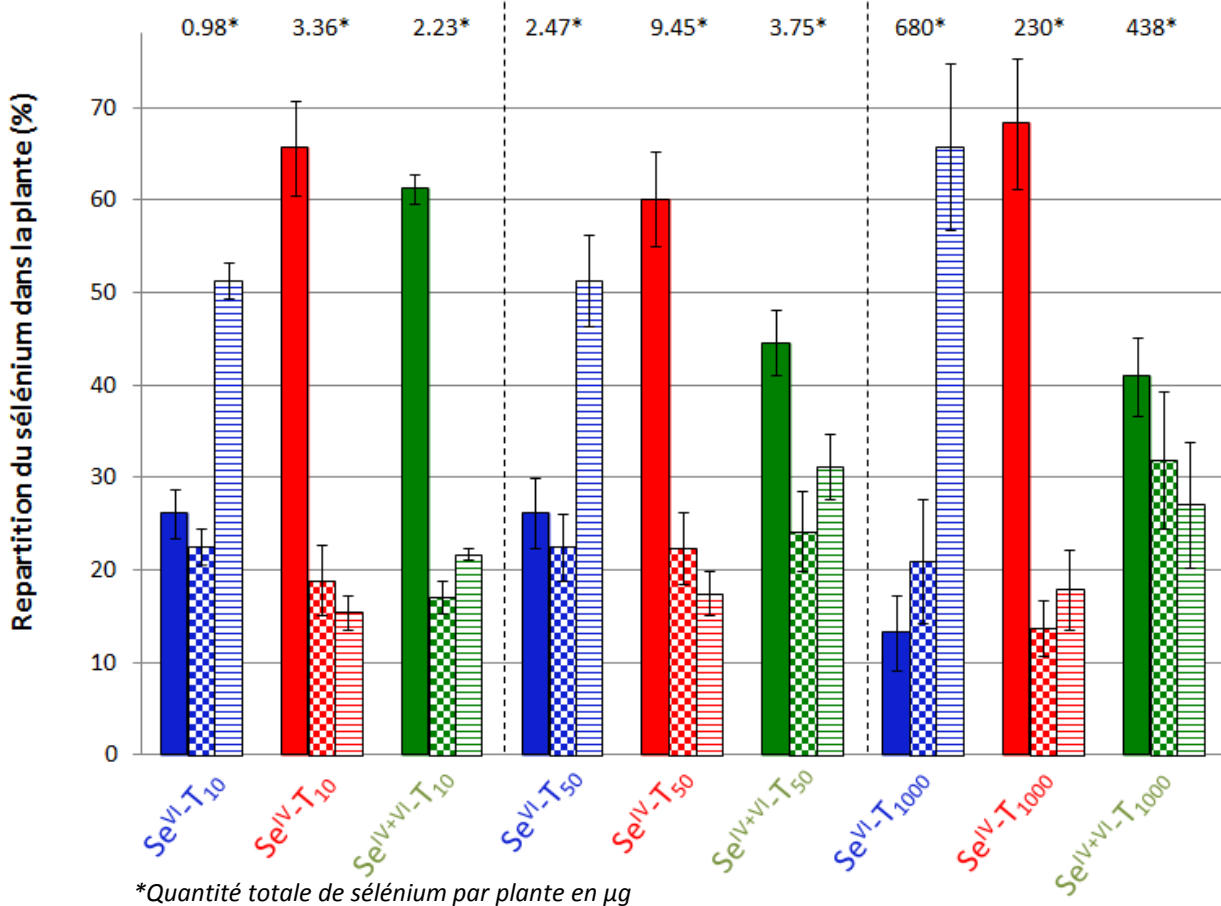


**Figure 3.A.10.** Concentrations en sélénium ( $\mu\text{g/g}$ ) dans les racines (A), les tiges (B) et les feuilles (C) dans les 9 traitements (excluant les traitements contrôles) :  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}$  (en bleu) ;  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$  (en rouge)  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}$  (en vert). Moyennes théoriques (  $\bullet$  ) calculées à partir des valeurs mesurées dans  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}$  et  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$ . a,b,a',b',a\* et b\*: résultats des tests de Kruskal and Wallis



Le facteur de translocation « racine/partie aérienne » (ratio entre la concentration de sélénium dans les parties aériennes et de celle dans les racines) est 17 fois plus élevé pour les plantes du  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}_{1000}$  (1.91 (1.77 ; 2.07) que pour celles du  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$  (0.11 (0.11 ; 0.12)).

La répartition du sélénium dans les plantes est présentée dans la figure 3.A.11. Les quantités de sélénium accumulé dans la plante entière (indiquées en haut de la figure 3.A.11 en  $\mu\text{g}$ ) dépendent de la forme chimique de sélénium dans la solution nutritive et augmente avec la concentration en sélénium source. De plus, les quantités de sélénium accumulé dépendent également des organes cibles (racines, tiges, feuilles). Pour le  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}_{1000}$ , la quantité de sélénium dans les racines ne représente que 14 % du sélénium total alors qu'elle atteint 62 % dans les feuilles. La répartition du sélénium pour le  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$  est inversée : la quantité de Se est plus élevée dans les racines, avec 72 % du Se total, comparée aux 13% et 15% dans les tiges et les feuilles respectivement.



**Figure 3.A.11.** Répartition de la quantité de sélénium ( $\mu\text{g}$ ) dans la plante pour les 9 traitements (excluant les traitements contrôles) :  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}$  (en bleu) ;  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$  (en rouge) ;  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}$  (en vert) ; racines (en plein) ; tiges (en damier) et feuilles (en traits horizontaux)

### 2.1.3. Interaction entre séléniate et sélénite

Dans ce traitement ( $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}_{1000}$ ) correspondant à un mélange 50/50 de séléniate/sélénite), la concentration en sélénium dans la plante entière n'est pas significativement différente de celle des plantes du  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$ , mais cependant 59 % plus faible que celle des plantes du  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}_{1000}$  (Fig 3.A.9). Les concentrations en sélénium dans les tiges et feuilles sont similaires dans les  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$  et  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}_{1000}$ . Toutefois, les tiges et feuilles du  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}_{1000}$  accumulent respectivement 61 % et 82 % moins de sélénium que celles du  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}_{1000}$  (Fig 3.A.10). La concentration en sélénium dans les racines est 72 % plus élevée dans celles du  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$  comparée au  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}_{1000}$ , elle-même 94 % plus élevée que les racines du  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}_{1000}$  (Fig 3.A.10).

Le facteur de translocation « racine/partie aérienne » des plantes du  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}_{1000}$ , soit 0,2 (0,2 ; 0,3), est légèrement plus élevé (2,2 fois) de celui des plantes du  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$ ; cependant, il est 8 fois plus faible que celui des plantes du  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}_{1000}$ .

En ce qui concerne la répartition du sélénium, dans les plantes du  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}_{1000}$ , les différences entre les 3 organes (racines, tiges, feuilles) sont moins marquées (Fig 3.A.11) ; néanmoins, le sélénium est principalement stocké dans les racines de la plante comme pour celles du  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$ .

Une valeur théorique ( $\text{TV}_{1000}$ ) de concentration en sélénium a été calculée (moyenne et ses valeurs extrêmes) à partir des mesures des  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}_{1000}$  et  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$  des organes et de la plante entière. Cette valeur théorique représente la concentration en sélénium dans les plantes s'il n'existait pas d'interaction entre séléniate et sélénite ; cette  $\text{TV}_{1000}$  a été comparée aux valeurs expérimentales provenant du  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}_{1000}$ . Nous pouvons remarquer que dans ces plantes entières, la concentration en sélénium est inférieure de 47 % à la  $\text{TV}_{1000}$  (Fig 3.A.9). Cette caractéristique est aussi observée dans les tiges et les feuilles où les concentrations mesurées en sélénium sont respectivement 44 % et 70 % par rapport aux  $\text{TV}_{1000}$  (Fig 3.A.10).

## 2.2. Discussion

Suite aux mesures effectuées sur les condensats pour les 3 traitements au sélénium, la volatilisation des plantes est extrêmement négligeable. Elle ne sera donc pas intégrée à l'ensemble des discussions.

### **2.2.1. Effet sur la croissance**

La surface foliaire est le site préférentiel des échanges gazeux entre les plantes et l'atmosphère. Au début de la croissance d'une plante, la surface foliaire croît exponentiellement (Gitelson et al. 2003, Maddonni and Otegui 1996), comme cela est le cas dans notre étude. Nous avons récolté les plantes pendant la phase de croissance (stade génératif), avant que leurs surfaces foliaires n'atteignent un plateau - voir diminuent- signe que les plantes entrent en stade reproducteur. Terry *et al.* (1992) ont mesuré une surface foliaire moyenne de  $351 \pm 47$  cm<sup>2</sup> après trois semaines de culture, dont une semaine avec 20 µM de séléniate : cette valeur correspond aux valeurs obtenues pour l'ensemble des traitements avec une concentration de 13 µM (1000 µg/L). Comme pour le tournesol, la moutarde indienne et le trèfle-fraise (Hopper and Parker 1999, Ximenez-Embun et al. 2004), le séléniate n'affecte pas la production de biomasse du maïs. Dans le cas du Se<sup>IV</sup>-T<sub>1000</sub>, la diminution de 37 % de la biomasse du maïs est plus élevée que celle de la moutarde indienne et du lupin blanc (0 and 20 % respectivement), mais reste similaire à celle du tournesol soit 40% (Ximenez-Embun et al. 2004). La production de biomasse de chaque organe du *Zea mays* du Se<sup>IV</sup>-T<sub>1000</sub> est équivalente à celle du trèfle-fraise (cultivée à 10 µM de sélénite) : la biomasse des racines n'est pas affectée par le sélénite alors que celles des parties aériennes diminue de 40 % (Hopper and Parker 1999). Cette étude montre que seul le sélénite à 1000 mg/L est toxique pour la croissance du maïs : il est à l'origine d'un stress sur le développement du système aérien, lieu d'un métabolisme intense lié à un flux de nutriments important.

### **2.2.2. Métabolisme du séléniate et sélénite**

La concentration de sélénium dans la plante entière dépend de la forme de sélénium fournie aux plantes. La grande majorité des études montre que le ratio séléniate/sélénite (concentration en sélénium dans les plantes entières traitées au séléniate/celle traitées en sélénite) est supérieur à 1, quelle que soit la concentration en sélénium disponible pour les plantes (De Souza et al. 1998, Srivastava et al. 2007, Ximenez-Embun et al. 2004, Zayed et al. 1998) ; ceci signifie que le séléniate est à l'origine d'une accumulation en sélénium dans la plante entière plus importante que le sélénite. Cependant, dans certains cas ce ratio est très proche de 1, comme pour le riz (cultivée avec 20 µM de Se) (Zayed et al. 1998), voire inférieur à 1, comme pour le soja et certaines fougères (cultivées en présence de 0,2 à 250 µM de Se) (Srivastava et al. 2007, Zhang et al. 2003). Dans la présente étude réalisée à 12,5 µM de Se, le maïs possède un ratio de 1,8, ce qui est inférieur à des plantes telles que la moutarde

indienne ou le brocoli (Ximenez-Embun et al. 2004, Zayed et al. 1998) considérées comme hyperaccumulatrices de sélénium. Donc cette étude montre qu'à forte concentration en sélénium (1000 µg/L soit 12,5 µM en Se) chez le *Zea mays*, le sélénite est plus toxique que le séléniate car l'accumulation en sélénium dans la plante est moindre et est associée à un effet néfaste sur la croissance de la plante.

D'après la littérature (Arvy 1993, Li et al. 2008, Sors et al. 2005, Terry et al. 2000), le séléniate est absorbé via les transporteurs de sulfate à haute affinité alors que le sélénite serait absorbé soit par diffusion passive via des cotransporteurs H<sup>+</sup>-hexoses ou des aquaporines (Arvy 1993, Zhang et al. 2006) soit à travers les transporteurs à phosphate (Li et al. 2008). Les concentrations en sulfate ou en phosphate influencent donc l'absorption du séléniate ou du sélénite respectivement (Arvy 1993, Hopper and Parker 1999, Li et al. 2008, Zhang et al. 2006). La concentration en sulfate (0,72 µM) dans nos solutions nutritives est proche de celle trouvée dans les sols communs (0,5 µM) (Hopper and Parker 1999). En ce qui concerne le phosphate, la concentration utilisée dans nos expérimentations (0,95 mM), comme dans l'ensemble des études effectuées en hydroponie, est supérieure à la concentration naturelle moyenne dans les sols (2 µM) (Hopper and Parker 1999), et ce afin d'éviter une carence en phosphate chez les plantes. Avec de telles concentrations, Li *et al.* (2008) suggère que l'absorption du sélénite est négativement affectée. Les résultats de la présente expérimentation montrent que, au contraire, l'absorption racinaire du sélénium en présence de sélénite chez le *Zea mays* reste 3,3 fois plus élevée qu'en présence de séléniate.

D'après les concentrations en sélénium dans les parties aériennes, les facteurs de translocation ainsi que la répartition de sélénium dans la plante, en présence de séléniate l'organe préférentiel de stockage du sélénium est la feuille, alors qu'en présence de sélénite le sélénium est préférentiellement stocké dans les racines. Cette conclusion est en accord avec la grande majorité des résultats publiés (De Souza et al. 1998, Li et al. 2008, Srivastava et al. 2007, Ximenez-Embun et al. 2004, Zayed et al. 1998, Zhang et al. 2003). Par exemple, le facteur de translocation « racines/ partie aérienne » pour le traitement séléniate chez le maïs est proche de ceux de la moutarde indienne (De Souza et al. 1998, Ximenez-Embun et al. 2004), du riz (Zayed et al. 1998) et du maïs traité avec 20 µM de séléniate (Terry et al. 1992). De même, pour le Se<sup>IV</sup>-T, ce facteur de translocation du maïs est similaire à celui du blé (0,13) traité avec 5 µM de sélénite (Li et al. 2008).

Les différences d'accumulation et de répartition du sélénium dans le *Zea mays* entre les 2 traitements (Se<sup>VI</sup>-T et Se<sup>IV</sup>-T), s'expliquent par les différences de mobilité et d'assimilation des 2 formes inorganiques. Le séléniate est la forme inorganique considérée comme la plus

mobile mais également la moins bien métabolisée (De Souza et al. 1998, Li et al. 2008, Terry et al. 2000, Ximenez-Embun et al. 2004). En effet, la première étape de la métabolisation du séléniate en acide-aminés dans les plantes est sa réduction en sélénite : cette étape est limitante (De Souza et al. 1998, Li et al. 2008, Terry et al. 2000). Le séléniate reste donc principalement sous cette forme initiale fortement mobile : il est donc facilement transféré dans les feuilles via le xylème. Le sélénite, plus métabolisé et moins mobile, reste principalement dans les racines et seule une faible quantité du sélénium est transférée vers les parties aériennes.

### **2.2.3. Interactions entre les deux formes inorganiques de sélénium**

Pour le  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}_{1000}$ , l'accumulation en sélénium dans la plante entière est similaire à celle du  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$  ; mais contrairement à celui-ci, la présence d'un mélange séléniate/sélénite dans le milieu nutritif n'est pas nocive pour la croissance des plantes. Cependant, la concentration de sélénium accumulée est inférieure à celle attendue ( $\text{TV}_{1000}$ ) : il existe donc une inhibition de l'accumulation en sélénium dans la plante en présence des deux formes d'espèces inorganiques oxydées du sélénium dans le milieu à forte concentration (ici 500  $\mu\text{g/L}$  pour chaque forme). Cette inhibition ne semble pas s'exercer sur l'absorption racinaire; au contraire, l'accumulation en sélénium dans les parties aériennes n'est pas aussi élevée que celle attendue ( $\text{TV}_{1000}$ ). Ce résultat ainsi que le faible facteur de translocation « partie aérienne/racine » des plantes du  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}_{1000}$ , indiquent que le sélénite semble inhiber la translocation du séléniate vers les feuilles. Cette conclusion est en accord avec les études de Li *et al* (2008) effectuées sur le blé à 10  $\mu\text{M}$  de sélénium (avec 50 % de séléniate et 50 % de sélénite). Son étude a montré que la concentration en séléniate transportée dans le xylème est beaucoup plus faible dans les plantes traitées avec un mélange qu'avec du séléniate seul.

## **3. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SELENIUM SUR SON METABOLISME AU STADE GENERATIF DU ZEA MAYS : CONCLUSIONS**

### **3.1. Métabolisme du séléniate et du sélénite**

D'après les figures 3.A.9, 3.A.10 et 3.A.12 et en accord avec plusieurs études précédentes (De Souza et al. 1998, Li et al. 2008, Ximenez-Embun et al. 2004, Zhang et al. 2006, Zhang et al. 2003), les concentrations en sélénium dans la plante entière ainsi que dans les 3 organes (racines, tiges et feuilles) augmentent avec la concentration en sélénium ajouté dans la

solution nutritive. Les taux d'enrichissement dépendent également de la forme de sélénium présent en solution. Le tableau 3.A.3 présente les taux d'enrichissement en sélénium dans les plantes entières en fonction des concentrations de sélénium source (10, 50 ou 1000 µg/L).

	Se <sup>VI</sup> -T	Se <sup>IV</sup> -T	Se <sup>IV+VI</sup> -T
<b>R 10/50*</b>	6,5 (6,1-7,6)	22 (15,6-23,9)	8,1 (6,8-9,9)
<b>R 50/1000**</b>	29,5 (20-33,6)	15,5 (9,7-21)	11,7 (9-14,2)

Les valeurs sont les médianes avec les minimum et maximum

\*R 10/50 : taux d'enrichissement dans les plantes entières entre celles traitées à 10 µg/l et celles traitées à 50 µg/L

\*\*R 50/1000 : taux d'enrichissement dans les plantes entières entre celles traitées à 50 µg/l et celles traitées à 1000 µg/L

**Tableau 3.A.3.** Taux d'enrichissement des plantes entières en fonction de la concentration de sélénium dans la solution nutritive

Nous pouvons remarquer que les taux d'enrichissement des plantes entières des Se<sup>VI</sup>-T augmentent fortement avec la concentration de séléniate en solution contrairement à ceux des Se<sup>IV</sup>-T (Tableau 3.A.3). En effet, à faible concentration en sélénium source, le sélénite entraîne une accumulation plus élevée dans les plantes entières que le séléniate alors que pour une forte concentration l'inverse est observé (Fig 3.A.9 et 3.A.10). Cette inversion peut être expliquée par une modification des profils d'accumulation du sélénium dans la plante en fonction de la concentration en sélénium source.

Pour les traitements en présence de séléniate, les taux d'enrichissement en sélénium des organes en fonction de la concentration dans la solution nutritive suivent les mêmes tendances que ceux des plantes entières (Fig 3.A.12). Pour Se<sup>VI</sup>-T<sub>1000</sub>, les taux d'enrichissement R<sub>50/1000</sub> des racines et des parties aériennes sont plus élevés que les R<sub>10/50</sub>. Ils augmentent donc avec la concentration en séléniate source. Cette tendance est d'autant plus prononcée dans les parties aériennes. En effet, les facteurs de translocations «racines/ parties aériennes » augmentent avec la concentration en séléniate source, avec une moyenne de 0,46 pour les Se<sup>VI</sup>-T<sub>10/50</sub> et de 1,91 pour le Se<sup>VI</sup>-T<sub>1000</sub>. Ainsi, le pourcentage en sélénium dans les parties aériennes est seulement de 73 % en moyenne pour les Se<sup>VI</sup>-T<sub>10/50</sub> contre 87 % pour le Se<sup>VI</sup>-T<sub>1000</sub>. Zhang *et al.* (2003) a obtenu cette même tendance sur le soja cultivé en hydroponie : pour une concentration de 17 µg/L en séléniate, le facteur de translocation est de 0,072 chez le soja, puis il augmente régulièrement avec la concentration en séléniate source, jusqu'à atteindre 0,465 en présence de 780 µg/L de séléniate.

Ces données cumulées à l'évolution des facteurs de translocation et de la répartition énoncées précédemment étayent l'hypothèse suivante : lorsque la concentration en sélénium dans les racines atteint une valeur seuil – estimée entre 50 µg/L et 1000 µg/L de séléniate d'après les résultats des trois concentrations testées - alors le séléniate est transféré massivement dans les feuilles sans subir de processus de métabolisation ; en rappelant ici que la réduction du séléniate en sélénite est une étape très limitante dans le métabolisme du sélénium chez les plantes. L'étude de De Souza *et al.* (1998) montre que chez la moutarde indienne les cinétiques d'accumulation du séléniate dans les racines et parties aériennes sont linéaires pour des concentrations inférieures à 20 µM, puis le taux d'enrichissement diminue entre 20 et 50 µM, avant d'augmenter exponentiellement pour des concentrations supérieures à 50 µM de séléniate. L'évolution globale des taux d'enrichissement est donc similaire à la celle obtenu durant ce travail ; la valeur seuil dans les racines semble néanmoins être plus faible chez le *Zea mays* que chez la moutarde indienne, d'autant plus que cette dernière est considérée comme une plante accumulatrice en sélénium donc moins sensible au forte concentration en sélénium.

Pour les traitements en présence de sélénite, les taux d'enrichissement des racines ainsi que des parties aériennes diminuent avec l'augmentation de la concentration en sélénite source (Fig 3.A.12). Nous avons également constaté que les facteurs de translocations « racines/parties aériennes » (en moyenne 0,09) ainsi que la répartition (en moyenne 65 % de sélénium stocké dans les racines) sont constants quelle que soit la concentration en sélénite source (Fig 3.A.11). Ces résultats sont cohérents avec ceux de Zhang *et al.* (2003) qui n'observent également pas d'évolution des facteurs de translocation entre 0,22 µM et 100 µM de sélénite dans la solution nutritive.

Ces données cumulées à l'évolution des facteurs de translocation, de la répartition ainsi que la diminution de la biomasse visible seulement dans le  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$  étayent l'hypothèse suivante : le sélénite à forte concentration devient toxique pour la plante ce qui entraîne une diminution de la vitesse d'accumulation du sélénium par rapport aux expérimentations à faibles concentrations. Ces résultats sont identiques à ceux de De Souza *et al.* (1998), Li *et al.* (2008) et Zhang *et al.* (2006) : dans les deux cas des cinétiques de type mickealienne-mendes ont été identifiées. Deux explications ont été proposées : en présence d'une forte concentration en sélénite soit une étape de la métabolisation du sélénite devient limitante soit l'absorption racinaire du sélénite est inhibée. En contradiction avec tous ces résultats, Zhang *et al.* (2003) obtient des cinétiques d'accumulation linéaires en présence du séléniate et sélénite pour des concentrations entre 0,2 et 100 µM. Il attribue cette différence au faible temps de croissance

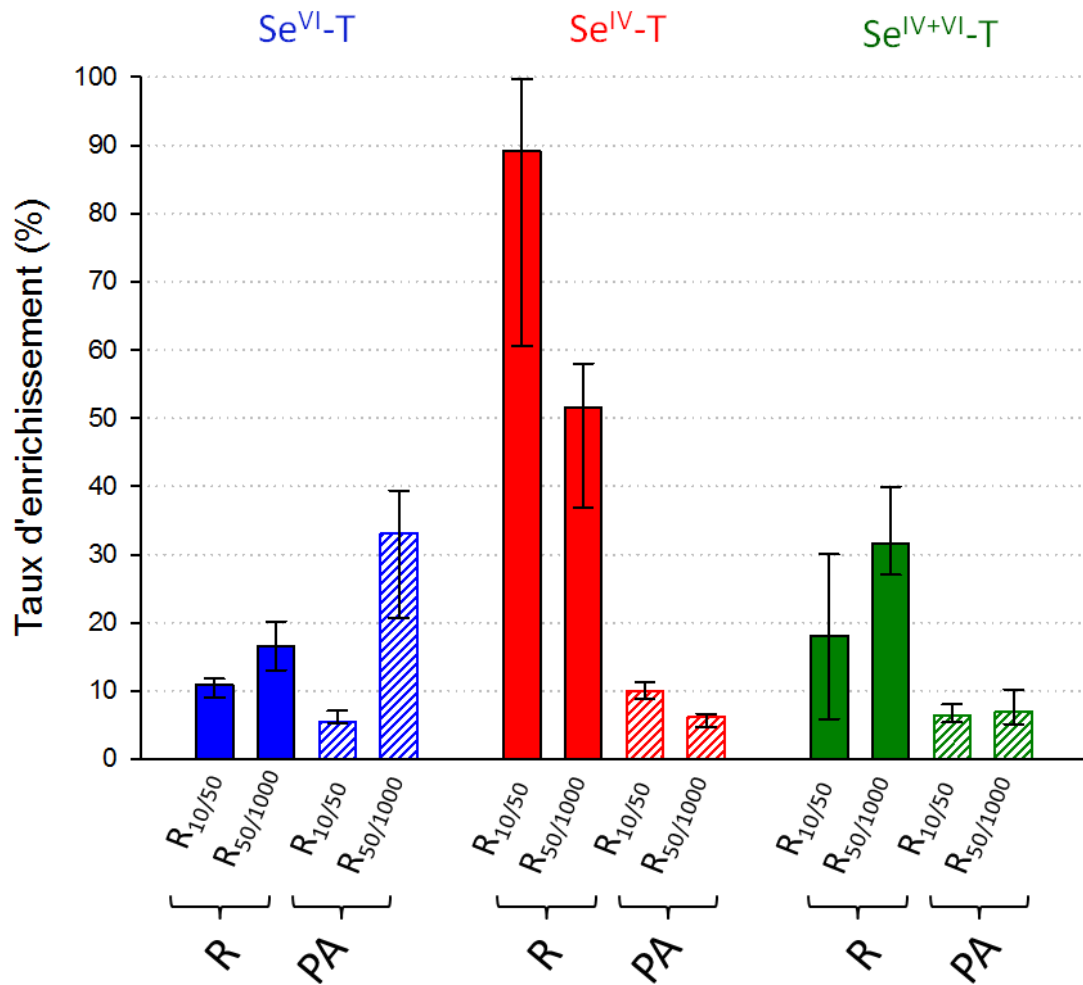
des plantes en présence de sélénium, 24 H contre 7 jours pour De Souza *et al.* (1998) et 15 jours dans notre étude. Après 24 H en présence de sélénium, les conséquences des adaptations métaboliques des plantes sont moindres voire non visibles quelle que soit la concentration en sélénium.

### **3.2. Interactions séléniate/sélénite**

L'évolution des taux d'enrichissement des  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}$  dans la plante entière, présentés dans le tableau 3.A.3, est similaire aux  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$  :  $R_{10/50}$  est inférieur à  $R_{50/1000}$ . De plus, comme montrer dans la figure 3.A.9, pour les  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}_{50}$  et  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}_{1000}$ , les concentrations en sélénium dans les plantes entières n'atteignent pas les  $\text{TV}_{50}$  et  $\text{TV}_{1000}$  : le séléniate et le sélénite ont donc une interaction négative.

Cependant, cet effet ne semble pas être la conséquence de mêmes processus biochimiques. Dans les racines, le séléniate semble inhiber l'absorption du sélénite seulement à la concentration de 50  $\mu\text{g/L}$  et cet effet n'est plus visible à 1000  $\mu\text{g/L}$  (Fig 3.A.10). Dans les racines, les taux d'enrichissement des  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}$  n'augmentent que très légèrement avec la concentration du sélénium source (Fig 3.A.12). La suraccumulation observée dans les racines en présence de séléniate à forte concentration semble masquer son effet négatif sur l'absorption du sélénite. Au contraire, dans les feuilles, les taux d'enrichissement dans les parties aériennes des  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}$  sont constants avec l'augmentation de sélénium dans la solution nutritive (Fig 3.A.12). Le sélénite inhibe donc le transfert du séléniate vers les feuilles seulement dans les expérimentations à 1000  $\mu\text{g/L}$  (Fig 3.A.10), c'est-à-dire seulement quand la translocation séléniate vers feuilles devient intense.





**Figure 3.A.12.** Taux d'enrichissement en sélénium en fonction de la concentration en sélénium source dans les racines et les parties aériennes :  $Se^{VI-T}$  (en bleu) ;  $Se^{IV-T}$  (en rouge) ;  $Se^{IV+VI-T}$  (en vert) ; racines (R ; en plein) ; parties aériennes (PA ; en traits obliques)

***PARTIE B:***  
***CULTURES DES PLANTS DE ZEA MAYS JUSQU'AU***  
***STADE REPRODUCTEUR : OBTENTION DE GRAINS***  
***MATURES***

**1. EXPERIENCES A FORTE CONCENTRATION (1000 µg/L) EN SELENIUM**

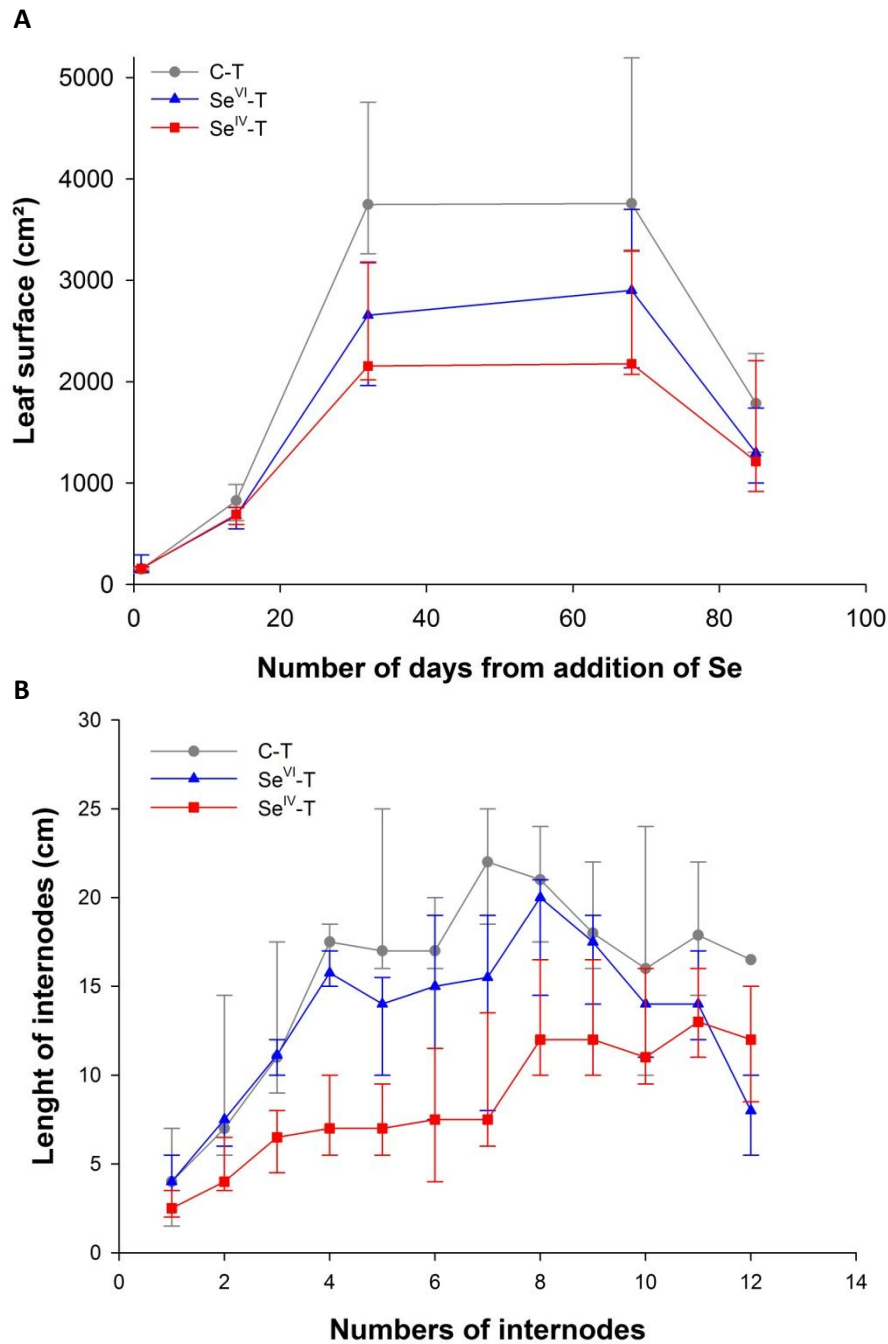
Seront discutés dans ce paragraphe les résultats obtenus en présence de séléniat ou sélénite à 1000 µg/L à deux stades de culture : stade génératif et stade reproducteur. Elles ont fait d'objet d'un article soumis en juin 2012 dans le journal International Environment. Seuls les résultats et discussions de cet article sont repris et présentés tels quels ci après, à l'exception des numéros de tableaux et figures, changés afin de respecter le suivi de numérotation de ce manuscrit.

**1.1. Results**

***1.1.1. Biomass production***

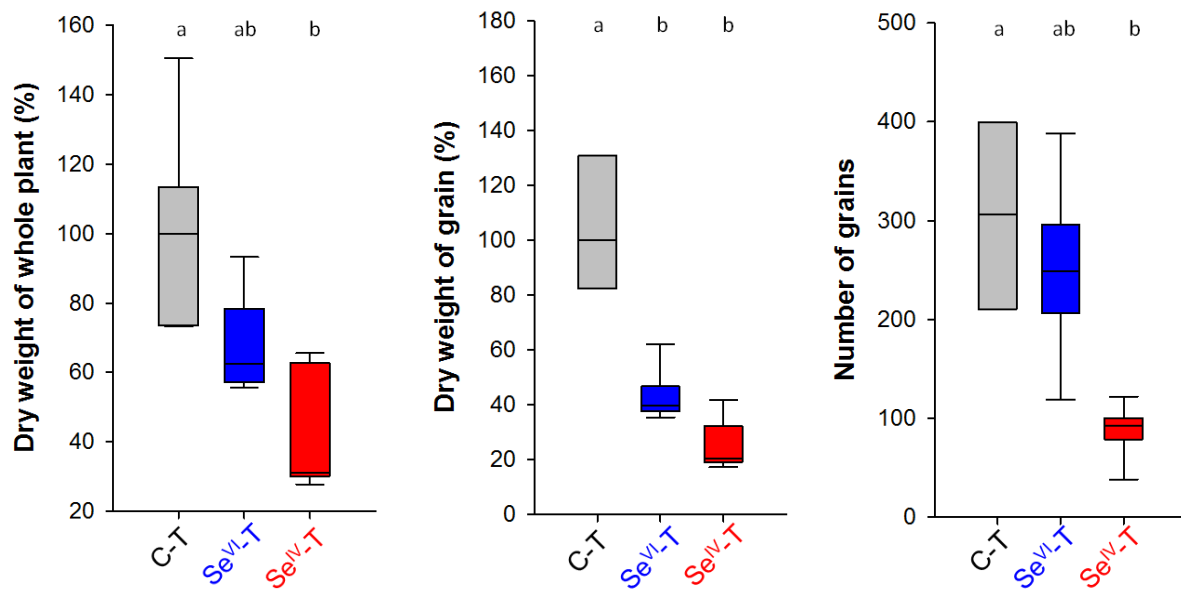
Leaf area enables to monitoring aerial biomass production all along plant development. Change in leaf area usually follows 3 successive stages: 1) a growing stage where aerial biomass production is exponential, 2) a reproductive stage where foliar development becomes weak or null, and 3) finally shoots (i.e. stems and leaves) senescence stage when grains are mature (Gitelson et al. 2003, Maddonni and Otegui 1996). In the 3 treatments of our experiment, change in leaf area followed the 3 stages previously cited and the plant harvest was made only when the third stage had been reached to ensure having the the best mature grains. During the first and third stages (before the 20<sup>th</sup> day and after the 75<sup>th</sup>, respectively), there was no significant difference in the leaf areas among the 3 treatments (Fig 3.B.1.A). However during the reproductive stage (between 30<sup>th</sup> and 70<sup>th</sup> days), the leaf area of Se<sup>IV</sup>-T plants was on average 42 % smaller than for control plants. Otherwise, at the end of experiment, the length of internodes of each plant was measured (Fig 3.B.1.B). For the Se<sup>IV</sup>-T, the internodes N°3 to N°9 were on average 2.3 (1.7; 2.5) times shorter than those of control

plants. The most important difference was measured for the seventh internode, 2.9 times smaller in the Se<sup>IV</sup>-T plants compared to the control plants: it could be noted that the internodes affected by selenite supplied corresponded to those developed during the vegetative stages.



**Figure 3.B.1.** Leaf area (in cm<sup>2</sup>) evolution (A) and length of each internodes (in cm) (B) of maize plants in the 3 different treatments. Values are median (lower: 10<sup>th</sup> percentile; upper: 90<sup>th</sup> percentile)

Moreover, still for the  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$ , the biomass production of plants (Fig 3.B.2) as well as the biomass production of shoots (data not shown) was about 70 % lower than the control plants. For grains, notwithstanding the selenium forms supplied, their dry weights decreased compared to the control plants, i.e. 60 % and 80 % in the  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}$  and  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$  plants respectively (Fig 3.B.2). However, the grain number produced by each plant (Fig 3.B.2), decreases significantly (70%) with selenite supplied. Biomass allocation was affected by selenium; finally ratios grains dry weights to shoots dry weights were lower for both selenium treatments than for the C-T. In fact, grain biomass for the C-T represented 33 % of aerial biomass, but decreased down to 21 % in presence of selenium in nutrient solution.

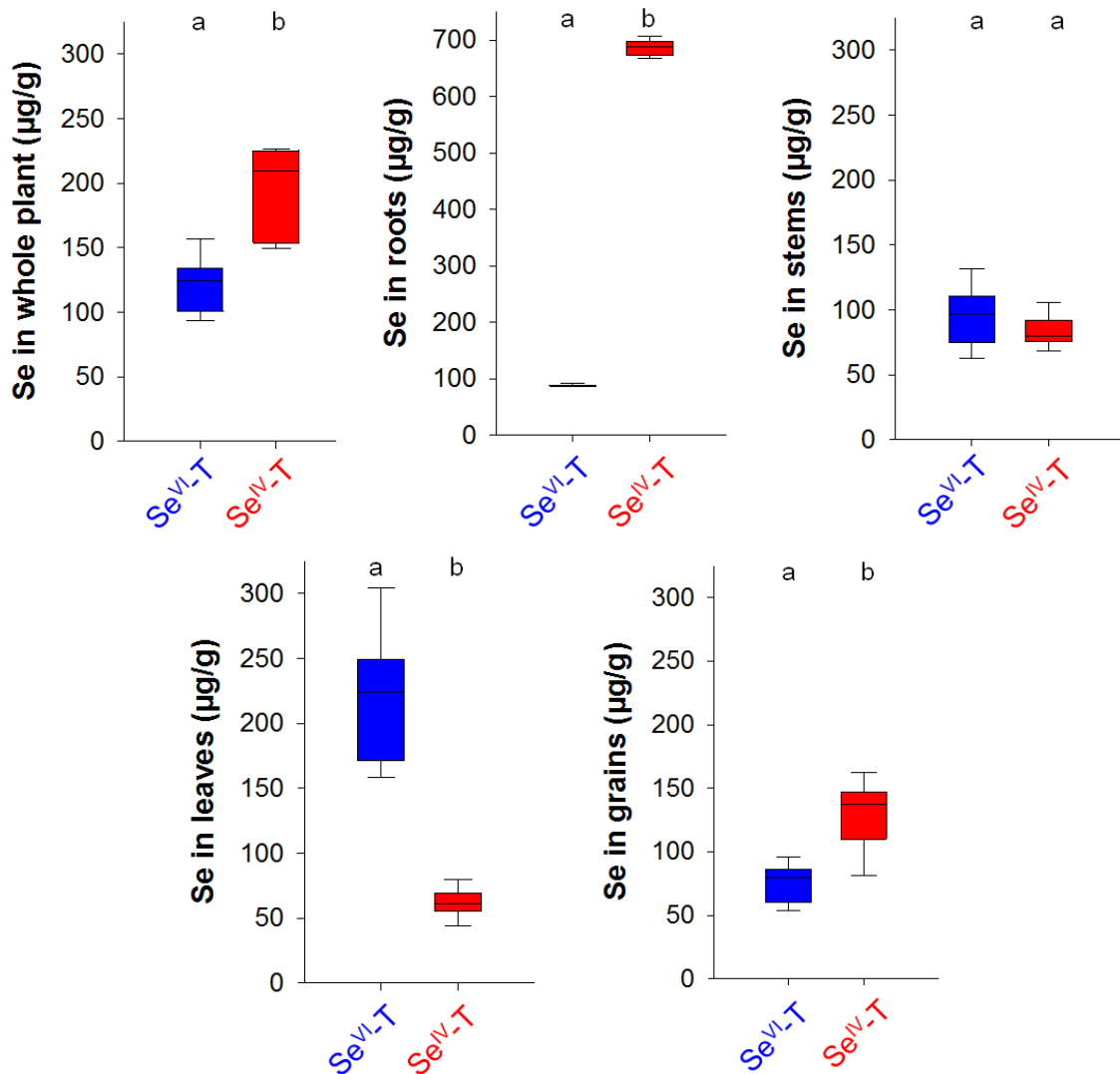


**Figure 3.B.2.** Dry biomass production (in g) of maize plants or of grains and number of grains by plant in the 3 different treatments: C-T (in points);  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$  (in gray);  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}$  (in dark gray);  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}$  (in white). a: results of Kruskal and Wallis test

### 1.1.2. Uptake and accumulation of selenium total in *Zea mays*

The whole Se concentration in the plant is taken as the sum of the Se concentration in each tissue for that plant (Fig 3.B.3). The supply of selenite versus selenate had a significant effect on the distribution of selenium in the whole plants and between the tissues of maize: for the whole plant, selenium was 68% more accumulated for the  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$  than for the  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}$  plants. As for details, similarly but in a larger amount, root Se concentrations were much more (675%) greater for the  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$  than the  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}$  plants; and grain Se concentrations were 1.7 times higher, i.e. 73 %, for the  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$  than for the  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}$  plants. Inversely, for the  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$ , leaf

Se concentrations were 73 % lower than for the  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}$ . Notwithstanding the inorganic form of selenium supplied Se concentrations in stems were similar.



**Figure 3.B.3.** Selenium concentration (in  $\mu\text{g/g}$  DW) in whole maize plant or in different tissues of maize plants in the 2 different treatments (roots, stems, leaves and grains):  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$  (in gray);  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}$  (in dark gray). a, b: results of Kruskal and Wallis test

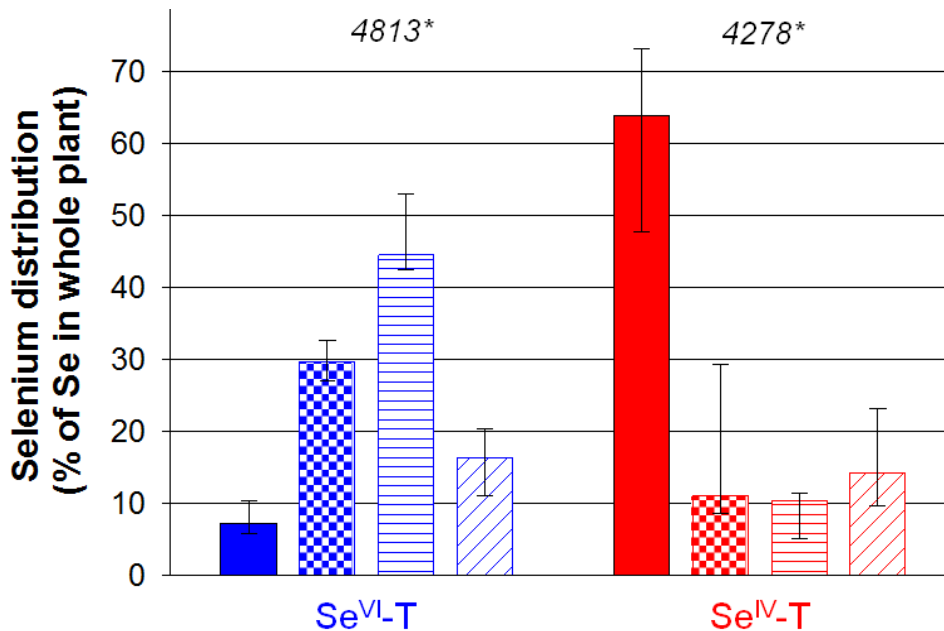
After uptake into the roots, selenium could be redistributed to various degrees to the aerial parts of the plants. Two translocation factors were calculated for both selenate and selenite treatments: a translocation factors ‘root-tops’ (concentration ratio in tops (i.e. stems + leaves + grains) to roots) and a translocation factors ‘shoot-grains’ (concentration ratio in grains to shoots) (Table 3.B.1). For the  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$ , Se concentrations were 90 % greater in grains than in shoots (72  $\mu\text{g/g}$  (66; 80)) whereas for the  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}$ , Se concentrations in grains were 47% lower than in shoots (151  $\mu\text{g/g}$  (114; 154)). As a consequence the translocation factors ‘root-tops’

were 91 % lower for the  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$  than for the  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}$ . On the contrary, in  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}$  plants, the translocation factors ‘shoot-grains’ were 75 % higher for the  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$  than for the  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}$ .

Se amounts allocated in tissues not only depend on Se concentration but also on the biomasses that could greatly vary from one tissue to another. Then, Se quantities in each tissue are important information for selenium intake of each plant. Se amount stocked in whole plants was similar for the  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$  (4278  $\mu\text{g}$  (4031; 5452) and  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}$  (4813  $\mu\text{g}$  (3833; 5418). For the  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}$ , tops Se amount represented more than 90 % of total plant Se, with around 50 % of total plant Se in leaves (Fig 3.B.4). The Se allocation among the 3 tissues for the  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$  differed dramatically: tops Se amount was low (about 40 % of total plant Se) whereas around 60 % of total plant Se was in roots. Whatever Se-form in nutrient solution, grains Se content represented 15 % of the total plant Se.

	‘Roots-tops’	‘Shoots-grains’
$\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}$	1.45 (1.16; 1.49)	0.51 (0.49; 0.53)
$\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$	0.13 (0.12; 0.13)	2.03 (1.66; 2.09)

**Table 3.B.1.** Translocation factor ‘roots-tops’ (concentration ratio in tops to roots) and ‘shoots-grains’ (concentration ratio in shoots to grains) according to selenium forms in the nutrient solution. Values are median (Q1; Q3)



**Figure 3.B.4.** Selenium amount (in  $\mu\text{g}$ ) in roots, stems, leaves and grain of maize plants in the 2 different treatments:  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$  (in gray);  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}$  (in dark gray); roots (in plain); stems (in checker board); leaves (in light horizontal); grain (in wide upward diagonal)

**1.1.3. Se species in *Zea mays***

Efficiencies of enzyme extraction vary with tissues. For tops, they were higher than 90 % but only at about 35 % for roots. Neither selenate nor selenite has been detected in all plant tissues for the Se<sup>IV</sup>-T (Table 3.B.2): the selenium was then completely metabolized into organic forms (Table 3.B.3). Inversely, in presence of selenate in nutrient solution, no trace of selenite was detected; although selenate was identified in roots, stems and leaves of *Zea mays*: percentage of selenate was higher in stems and leaves, 51 and 37 % respectively, than in roots with only 9 %. Moreover, shoots Se-organic concentration was similar for both treatments even if Se amount was higher for selenate treatment (Table 3.B.3). Finally, whatever Se-form supplied, 95 % of grain selenium was converted into organoselenium compounds. Although organic selenium concentrations in grains were 73 % higher for the Se<sup>IV</sup>-T than for the Se<sup>VI</sup>-T, their Se amounts were similar (Table 3.B.3).

	Efficiency of enzyme hydrolysis (%) <sup>a</sup>	Selenate-treatment			Selenite-treatment		
		Se species (%) <sup>ab</sup>			Se species (%) <sup>ab</sup>		
		Selenate	Selenite	Se-organic <sup>bc</sup>	Selenate	Selenite	Se-organic <sup>bc</sup>
<b>Roots</b>	36 ± 8	9 ± 2	ND	91	ND	ND	≥ 95
<b>Stems</b>	89 ± 13	51 ± 13	ND	49	ND	ND	≥ 95
<b>Leaves</b>	93 ± 6	37 ± 9	ND	63	ND	ND	≥ 95
<b>Grains</b>	104 ± 7	ND	ND	≥ 95	ND	ND	≥ 95

**Table 3.B.2.** Selenium species in maize after enzyme hydrolysis

<sup>a</sup> % of Se species according to Se extract in acid digestion

<sup>b</sup> LOD of Se species = 5 %

<sup>c</sup> Percentage Se-organic is difference between 100 and sum of inorganic species

Values are average ± SD

		Selenate-treatment			Selenite-treatment	
		Species se				
		Selenate	Se-org	Se bioavailable	Se-org	Se bioavailable
<b>Roots</b>	<b>µg/g</b>	8 (6; 9)	80 (79; 81)	79 (79; 80)	688 (675; 694)	620 (607; 625)
	<b>g</b>	32 (24; 36)	318 (313-323)	314 (312; 316)	2709 (2656; 2731)	2438 (2390; 2458)
<b>Shoots</b>	<b>µg/g</b>	57 (56; 72)	82 (70; 94)	109 (80; 133)	72 (66; 80)	65 (59; 72)
	<b>g</b>	1674 (1200; 1830)	2077 (2031; 2194)	2784 (2340; 2968)	838 (786; 1522)	755 (707; 1309)
<b>Grains</b>	<b>µg/g</b>	ND	79 (63; 83)	71 (56; 75)	137 (119; 142)	123 (107; 128)
	<b>g</b>	ND	713 (556; 887)	641 (500; 798)	543 (525; 739)	488 (472; 665)
<b>Tops</b>	<b>µg/g</b>	40 (38; 53)	77 (66; 90)	105 (87; 109)	86 (86; 88)	77 (77;80)
	<b>g</b>	1674 (1200; 1830)	2633 (2458; 3081)	3284 (2724; 3766)	1578 (1308; 2753)	1420 (1177; 2477)
<b>Whole plants</b>	<b>µg/g</b>	36 (36; 49)	77 (68; 89)	94 (79; 98)	209 (154; 227)	188 (139; 204)
	<b>g</b>	1707 (1224; 1867)	2942 (2770; 3403)	3581 (3284; 4067)	4309 (4016; 5408)	3878 (3615; 4867)

**Table 3.B.3.** Species of selenium and Se bioavailable for animals in different tissues of plant in two selenium treatment (selenate and selenite)

## 1.2. Discussion

### 1.2.1. Crop growth of *Zea mays*

According to dry weight of plants or tissues and leaf area, at high selenium concentration (1 mg/L) the inorganic selenium form supplied are harmful for *Zea mays* growth. In selenite treatment, developments of all tissues are affected: dry forage biomass as well as quantity (number) and quality (dry weight) of grains decrease. This selenite toxicity effect has already been observed in white lupine and in sunflower for example, with decreases of biomass at 20 % and 40 % respectively (with 12 µM of selenite) (Ximenez-Embun et al. 2004). These results differed from data on *Brassica rapa* (Lyons et al. 2009), indeed at very low selenium concentration (0.05 µM of selenite) in hydroponic solution, plant biomass and dry weight of each grain were not affected, moreover grains number increased by 43 % for each plant. In selenate treatment, vegetative tissues of *Zea mays* were not affected, according to literature published on different varieties of crops (such as maize and wheat) or other plants (such as



pumpkin, buckwheat, dry beans ...) fertilized with different techniques (selenate foliar application, selenate liquid or solid addition in soils, or fly-ash amendment) (Broadley et al. 2010, Cubadda et al. 2010, Mbagwu 1983, Smrkolj et al. 2005, Stibilj et al. 2004). However, contrary to Mbagwu (1983) and Broadley *et al.* (2010), grain biomass decrease when supplied with high selenate concentration even if the number of grains doesn't follow the same way. Selenate does not seem to influence the quantity of grains but seems to inhibit their normal filling.

### ***1.2.2. Uptake, accumulation and speciation of selenium in Zea mays***

As selenium volatilization from plant tissues may also provide a mechanism of Se decrease, all along the current experimentations with 12  $\mu\text{M}$  of selenium in the nutrient solution, some condensate samples were collected to control a potential selenium volatilization. Se concentrations measured in those condensate samples (data not published) show that *Zea mays* does not significantly volatilize selenium: so in the subsequent discussions, the Se-volatilization has been neglected.

Although selenate is the most mobile Se-form, total selenium accumulated in *Zea mays* is more considerable in presence of selenite with such Se concentration (12  $\mu\text{M}$ ) in the nutrient solution. However, even if significant toxicity was revealed by the biomass production, accumulated Se contents in whole plant are similar in both selenate and selenite treatments. Ours results differed from a majority of studies that concluded that accumulation for selenate supplied is higher than for selenite supplied (De Souza et al. 1998, Terry et al. 2000, Ximenez-Embun et al. 2004, Zayed et al. 1998). However, some researches on rice, wheat or soybean show that selenite can be accumulated as much as and (Li et al. 2008, Zayed et al. 1998) even more (Zhang et al. 2003) than selenate. The current results cannot be directly compared to any previously data because unlike our experiments, numbers of studies are carried out on young plants to compare accumulation and speciation of selenium in different tissues (roots, stems and leaves) as a function of inorganic Se form supplied studies. Among those Lyons *et al.* (2009) realized hydroponic growing of *Brassica rapa* where total Se concentrations in roots, shoots and also seeds were measured but only with sodium selenite at very low concentration (0.05  $\mu\text{M}$  of Se); that is 240-fold less than in our experiments.

For the selenite treatment, most of the selenium is accumulated in roots. In Li *et al.* (2008), Terry *et al.* (2000), De Souza *et al.* (1998) and Ximenez *et al.* (2004), translocation factor 'roots-tops' (i.e. 0.5) is slightly over our result (i.e. 0.13), which is quite similar to those of Lyons *et al.* (2008) (i.e. 0.08). These two very similar results are the only results

from experiments carried out until reproductive stage in a hydroponics system. Development stage of plant seems to influence the root storage capacity of selenium: root uptake and accumulation appears to increase in line with increasing the maturity of plants. Moreover, for the selenite treatment, organoselenium compounds production is greater than for selenate the treatment: in whole plants, no trace of inorganic Se form has been detected. In several papers, selenite traces have been detected in roots or shoots but their percentages are always less 7 %; so selenium in plants is overwhelmingly organoselenium compounds. Regarding for the selenate treatment, most of the Se taken up by *Zea mays* supplied with selenate was translocated and accumulated in the tops of plants, especially in the leaves; much less was accumulated in roots. In the current study, translocation factor 'roots-tops' (i.e. 1.45) is the same order of magnitude as factors previously published (i.e. 1.5-17) (De Souza et al. 1998, Li et al. 2008, Terry et al. 2000). Selenate is less metabolized than selenite in whole plant. This result is coherent with the fact that the reduction of selenate into selenite is the rate-limiting step in selenate metabolism in plants (De Souza et al. 1998, Li et al. 2008, Terry et al. 2000). Selenate absorbed by roots is metabolized in organic selenium compounds (that represents only 9% of selenium total in roots) or/and is quickly translocated in tops of plants. The selenate percentage in leaves (37 %) is lower than in stems (51 %), which seem to indicate that selenate is also metabolized in leaves. Mazej *et al.* (2008) and Li *et al.* (2008) show that on average 60 to 100 % of Se in leaves and roots are selenate. In the results presented in Ximenez *et al.* (2004) in I mustard, the selenate form represents 30 % in roots and 90 % in shoots; moreover in sunflower the selenate percentage in leaves (35 %) is similar to that in *Zea mays* and is also lower than in stems (97 %). So, in our study, the metabolization rate higher than in the literature could probably be attributed to the difference of the development stage, more advanced in our case. This increase of metabolization of selenate in fully developed mature plants could be explained by 1) increase of enzymatic reaction (increase of amount synthesized or activity rate of enzyme), or/and 2) decrease of selenate absorption at reproductive stage involving a more important selenate proportion metabolized.

In literature, the Se accumulated in grains is principally studied in wheat or rice (Broadley et al. 2010, Cubadda et al. 2010, Eurola et al. 1991, Lyons et al. 2004); but little data of selenium accumulated in *Zea mays* grains are presented in the literature (Chilimba et al. 2011, Mbagwu 1983). Moreover, studies on grains or seeds are usually carried out in soil (pot or yield) naturally or manually enriched with selenate or solid amendment, but with very little information on selenium soluble in water, bioavailable for plants (Broadley et al. 2010, Chilimba et al. 2011, Cubadda et al. 2010, Eurola et al. 1991, Kapolna et al. 2007, Lyons et al.

2004, Mbagwu 1983, Smrkoj et al. 2007, Smrkoj et al. 2005, Stibilj et al. 2004). So, our results were principally compared to other plant species growing in soil conditions. In our hydroponic system, selenium concentrations obtained in *Zea mays* grains (93 - 226 µg/g) are much higher compared to the majority of studies (Eurola et al. 1991, Lyons et al. 2009, Lyons et al. 2004, Mbagwu 1983, Smrkoj et al. 2005, Stibilj et al. 2004). For example, in maize grains in Malawi, Se concentrations were only 45 to 500 ng/g of Se (Chilimba et al. 2011), and winter wheat grains (Broadley et al. 2010) can accumulated up to 2.6 µg/g. Only grains of wheat harvested in the Nawanshahr-Hosshiarpur region (India) had Se concentrations similar to ours with 29 and 185 µg/g (Cubadda et al. 2010). These differences are probably due to the growing conditions: soils or hydroponic solution. In our study, the hydroponic experiments allow us to study process of uptake roots and translocation to shoots which cannot be clearly identified in soil conditions due to its chelating character. In fact, the absorption of nutrients, and especially oligo-elements, in plants strongly depends on the transfer process of the elements from the bulk soil into the roots. Finally, a last hypothesis could explain that grains maize accumulated more selenium than wheat: the phytic acids (as chelating compounds for trace elements) concentrations in grains maize are higher than in wheat grains (Egli et al. 2003).

### ***1.2.3. Enrichment of *Zea mays* on selenium to humans and livestock food***

Unlike many researches, we were able to compare, in the same experimental conditions, both selenate and selenite uptake in maize: variation in the inorganic chemical form of supplied Se greatly influenced the ability of grains to accumulate Se.

With selenate supplied, maize grains with the lowest Se concentrations accumulated less selenium than other tissue of maize. However, with granular fertilization of selenate, Gissel-Nielsen (1986) shows Se concentrations in barley grains were equal or slightly higher than Se concentration in barley straw. Inversely, for our selenite treatment, according to the literature (Cubadda et al. 2010, Mbagwu 1983), Se concentrations are lower in shoots than in grains. In our study, the Se concentrations in the grains are twice as great as those of shoots, which is slightly higher than Cubadda *et al.* (2010) and Mbagwu (1983) (around 1.15 times). In the same manner, in field experiment and with different methods of Se application (granular fertilization and foliar application), Se concentration in barley grains treated with selenite was on average 1.6 times greater the straw (Gissel-Nielsen 1986). Thus, with the selenite supplied, grains seem to be the second best tissue for selenium storage after roots. The use of selenite fertilizer can be attractive because (i) after roots, Se is principally accumulated in grains; (ii)

selenite mobility -lower than selenate- allows to enrich soil in Se at each fertilization, therefore in the long term, plants grown on this soil will be enriched in Se without the use Se-fertilizers; (iii) the low selenite mobility also allows to limit the selenium dispersion in surrounding environment. Moreover, another technique using selenite, foliar application, seems to be more effective than granular selenite fertilization for soybean (Yang et al. 2003) but this was not confirmed for rice (Hu et al. 2002). So, it would be interesting in the future to test this technology on maize.

To improve the nutritional intake of Se in the diet, the selenium content ingested is important but the quality and quantity of bioavailable Se is a key factor. According to Thomson (2004) the bioavailable Se amounts to humans is evaluated at 90 % for the organoselenium compounds and 50 % for selenite or selenate. On basing of this data, we calculate bioavailable Se for humans or for animals in *Zea mays* in our experiment.

Despite growing highly variable conditions (species, concentrations and techniques of selenium supplied), all previous published results (Cubadda et al. 2010, Kalpona et al. 2007, Smrkolj et al. 2007, Smrkolj et al. 2005), including ours, show that selenium in grains is overwhelmingly organoselenium compounds. In addition, Kalpona *et al.* (2007), Cubadda *et al.* (2010) and Smrkolj *et al.* (2005) show that selenomethionine, the most bioavailable form to humans and animals, represents around 80 % of the total selenium in grains of sesame, wheat and pumpkin respectively. Consequently, the evaluation of bioavailable Se to humans is elementary because bioavailable Se represents 90 % of Se total in grains. Selenium contents produced in grains per plant remains similar, 713 (556; 887) and 543 (525; 740)  $\mu\text{g}$  of Se in selenate and selenite treatment (at 1 mg/L) respectively (Table 3.B.3). So, per plants, the bioavailable Se quantity in grains does not differ from inorganic Se form supplied (Table 3.B.3). However, despite a decrease of grain biomass for the selenite treatment at 1 mg/L, the total Se concentration in grains are higher than in the presence of selenite. In yield with granular Se fertilization, Se concentration in wheat or barley grains were higher with selenate than selenite fertilizer (Gupta and Winter 1989, Singh 1991). This difference is very probably due to bioavailable Se into soil. Selenite in soil has lower mobility and so bioavailable for plants compared to selenate. However, selenite allows to enrich soil in the long term and to avoid pollution of environment. The current results show that, at equal ration (grain mass), despite an observed decrease of biomass grains production, the grains treated with selenite supply 73 % more bioavailable selenium than those treated with selenate (Table 3.B.3). Selenite supplied is the best treatment to enrichment grains in bioavailable Se to animals and humans.

Whether in the context of nutrition, contamination of the food chain or toxicity, other plant tissues are often of greater interest than roots. All aerial parts of plants (stems + leaves + grains) were then used as forage for livestock. To evaluate the bioavailable Se in our *Zea mays* to animals it is necessary to take into account not only the Se content or concentration but also the Se speciation of aerial tissues of each plant. In selenite treatment, biomass production of tops decreases but 95 % selenium is organoselenium compounds (the best bioavailable Se form) whereas in selenate treatment, biomass production of tops is more significant but selenium is either organoselenium compounds or selenate (less bioavailable). So, as reported by Se content and speciation in tops, we conclude that plants treated with selenate supply 148 % more bioavailable selenium content compared to those treated with selenite (Table 3.B.3). However, at equal ration (grain mass), tops treated with selenite or selenate supply the same quantity of selenium bioavailable (Table 3.B.3).. Thus, since selenate treatment does not affect shoot biomass, it is the best supplement to enrichment forage in bioavailable Se to animals.

## **2. INFLUENCE DU STADE DE DEVELOPPEMENT DU ZEA MAYS SUR L'ACCUMULATION DU SELENIUM : CONCLUSIONS**

Nous comparerons dans ce paragraphe les expérimentations réalisées en présence de séléniate ou de sélénite à 1000 µg/L en solution hydroponique au stage génératif (partie A, paragraphe 2 ; plantes dites jeunes) à celles réalisées au stade reproducteur (Partie B paragraphe 1 ; plantes dites matures).

### **2.1. Séléniate**

Pour les traitements au séléniate, la concentration de sélénium dans les plantes entières matures et les différents organes est 56 % plus faible que dans les jeunes plantes (Fig 3.B.5). Les racines et parties aériennes des plantes matures accumulent respectivement 46 % et 60 % moins de sélénium que celles des plantes jeunes (Fig 3.B.5). De plus, le facteur de translocations « racines/ parties aériennes » des plantes matures (1,45 (1,16 ; 1,49)) est plus faible que celui des jeunes plantes (1,91 (1,77 ; 2,07)). L'accumulation du sélénium diminue avec l'âge de la plante ; cette diminution est d'autant plus marquée pour les parties aériennes. Ainsi lors de la phase de croissance des plantes, le séléniate est fortement absorbé ; puis le taux d'absorption diminue et le sélénium préalablement accumulé est dilué dans la biomasse formée dans la phase de reproduction. Ceci expliquerait que le pourcentage de séléniate

métabolisé dans notre étude (soit 90 % et 63 % dans les racines ou feuilles matures) soit supérieur à ceux mentionnés dans la littérature. Notre hypothèse est donc que dans des plantes en phase de reproduction, le flux de séléniate absorbé diminue alors que celui du séléniate métabolisé ne subit pas une telle diminution, voire une potentielle augmentation ; donc le stock de composés organo-séléniés augmente par rapport à celui du séléniate.

Sunarpi and Anderson (1997) et Karlen *et al.* 1988 montrent que le taux d'accumulation en soufre évolue lors du développement de la plante. Il observe un fort taux d'accumulation de sulfate pendant la phase de croissance de la plante de soja et de maïs. Cependant, lorsque la croissance des parties végétatives et le remplissage des grains est terminée et que la déshydratation des grains commencent, la teneur en soufre absorbée par jour par les plantes diminue très fortement. Ces études montrent que les organes en cours de croissance ont des besoins en soufre plus élevés que les organes matures (Blake-Kalff *et al.* 1998, Buchner *et al.* 2004, Karlen *et al.* 1988, Leustek 2002, Sunarpi and Anderson 1997). Ainsi le séléniate semble subir cette même diminution d'accumulation du fait de ses similitudes avec le sulfate dans les voies d'absorption (les transporteurs racinaires de sulfate).

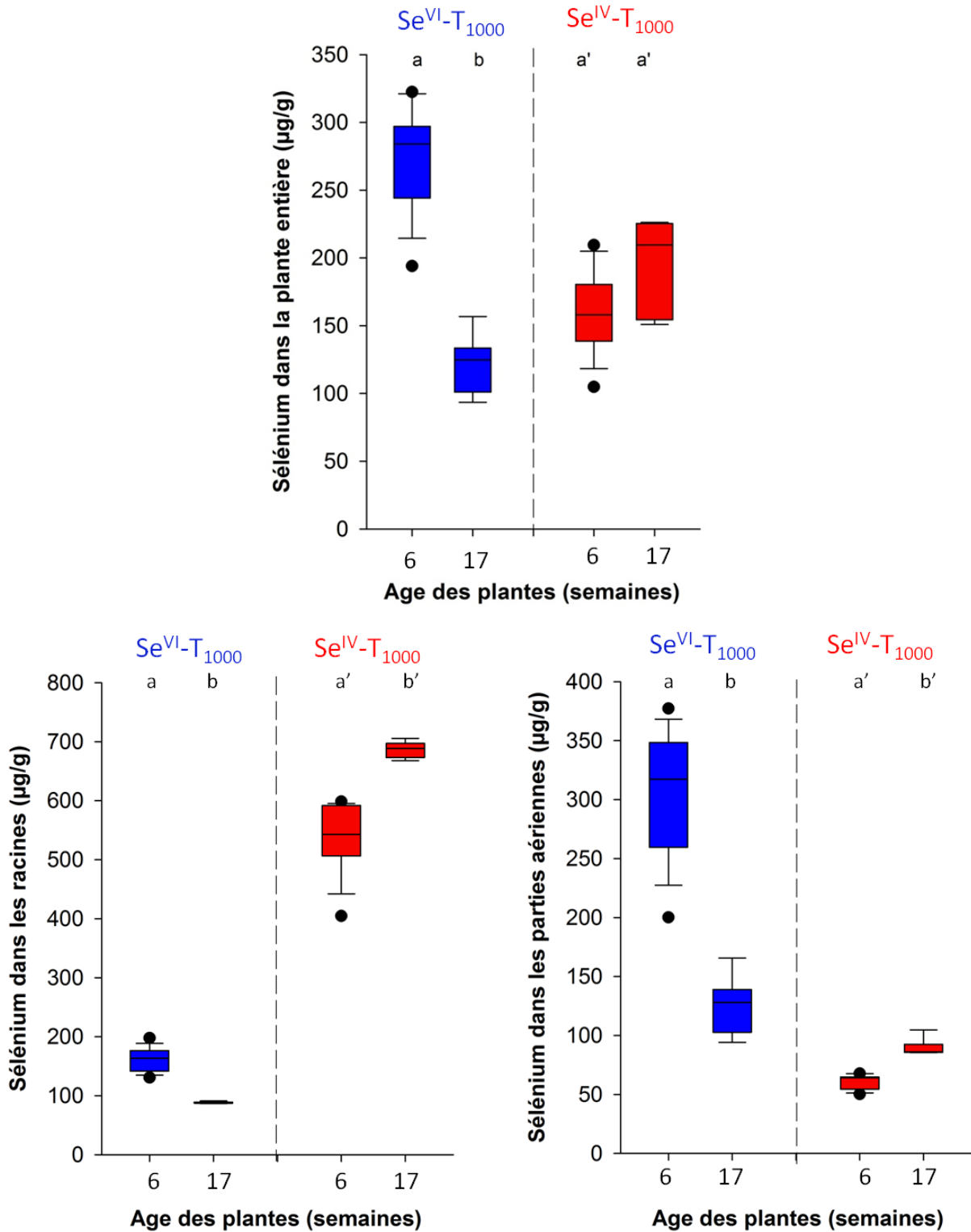
## **2.2. Sélénite**

Contrairement aux traitements au séléniate, la concentration en sélénium dans les plantes matures et jeunes est similaire (Fig 3.B.5) dans les traitements au sélénite. Cependant, dans les racines ou dans les parties aériennes la concentration en sélénium est respectivement 27 % et 35 % plus élevée dans les plantes matures que dans les jeunes plantes. En effet, chez une plante âgée le rapport entre la biomasse aérienne et racinaire est plus élevé que chez une jeune plante ; donc chez les plantes matures l'influence de la concentration en sélénium dans les feuilles sur la concentration dans la plante entière est plus élevée que dans les jeunes plantes. De plus, dans les plantes traitées avec du sélénite, la concentration en sélénium dans les parties aériennes est plus faible que dans les racines. C'est pourquoi la différence de concentration en sélénium entre les plantes jeunes et matures dans les organes (racines et parties aériennes) n'entraîne pas de différence de concentration dans la plante entière. D'autre part, la répartition et les facteurs de translocation « racines/ parties aériennes » sont similaires chez les plantes jeunes et matures.

Donc contrairement au séléniate, en présence de sélénite dans la solution nutritive, le taux d'accumulation de sélénium tend à augmenter. La régulation de ce taux d'accumulation peut soit s'effectuer directement au niveau de l'absorption racinaire soit indirectement à travers une augmentation du taux de métabolisation. Les études menées sur le métabolisme du soufre

(Buchner et al. 2004, Leustek 2002, Sunarpi and Anderson 1997, Tabe and Droux 2001) mettent en évidence que pendant la phase de post-floraison, la concentration en sulfate dans les feuilles et des grains diminuent en association avec une augmentation de molécules soufrés organiques (comme de la méthionine). De plus, l'activité de certaines enzymes des voies métaboliques du soufre (comme l'ATP sulfurylase ou l'ATP reductase) diminue dans les feuilles mais croît dans les grains. La métabolisation du soufre est donc plus élevée pendant la phase de maturation des grains. Le sélénium ayant des voies de métabolisation similaires voire identiques au soufre sera de la même façon fortement métabolisé et accumulé dans les grains à cette période de développement de la plante. L'augmentation de l'activité métabolique du soufre et donc du sélénium pendant la maturation provoquerait indirectement l'augmentation de l'absorption du sélénite. Le séléniate n'ayant pas la même voie d'absorption racinaire que le sélénite, ne subit pas cette augmentation du taux d'accumulation dans les plantes matures.

L'ensemble de ces résultats explique pourquoi au stade génératif le séléniate entraîne une accumulation en sélénium supérieure au sélénite et cela s'inverse chez les plantes matures.



**Figure 3.B.5.** Concentrations en sélénium dans la plantes entières, les racines et les parties aériennes chez des plantes de 6 et de 14 semaines cultivées en présence de 1000  $\mu\text{g/L}$  de séléniate (en bleu) ou de sélénite (en rouge). a,b,a',b',a\* et b\*: résultats des tests de Kruskal and Wallis

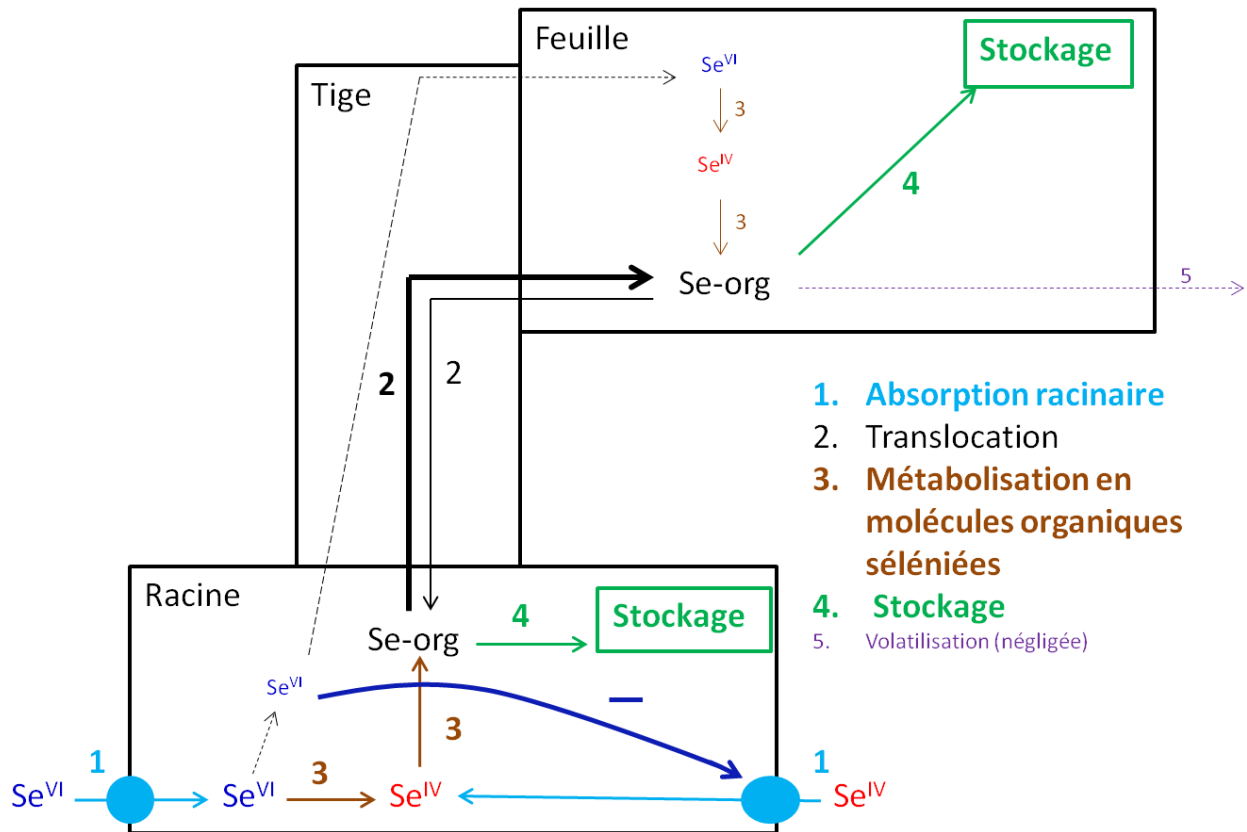


***PARTIE C:***  
***LE METABOLISME DU SELENIUM CHEZ LE ZEA***  
***MAYS : CONCLUSION GENERALE***

**1. ZEA MAYS AU STADE GENERATIF**

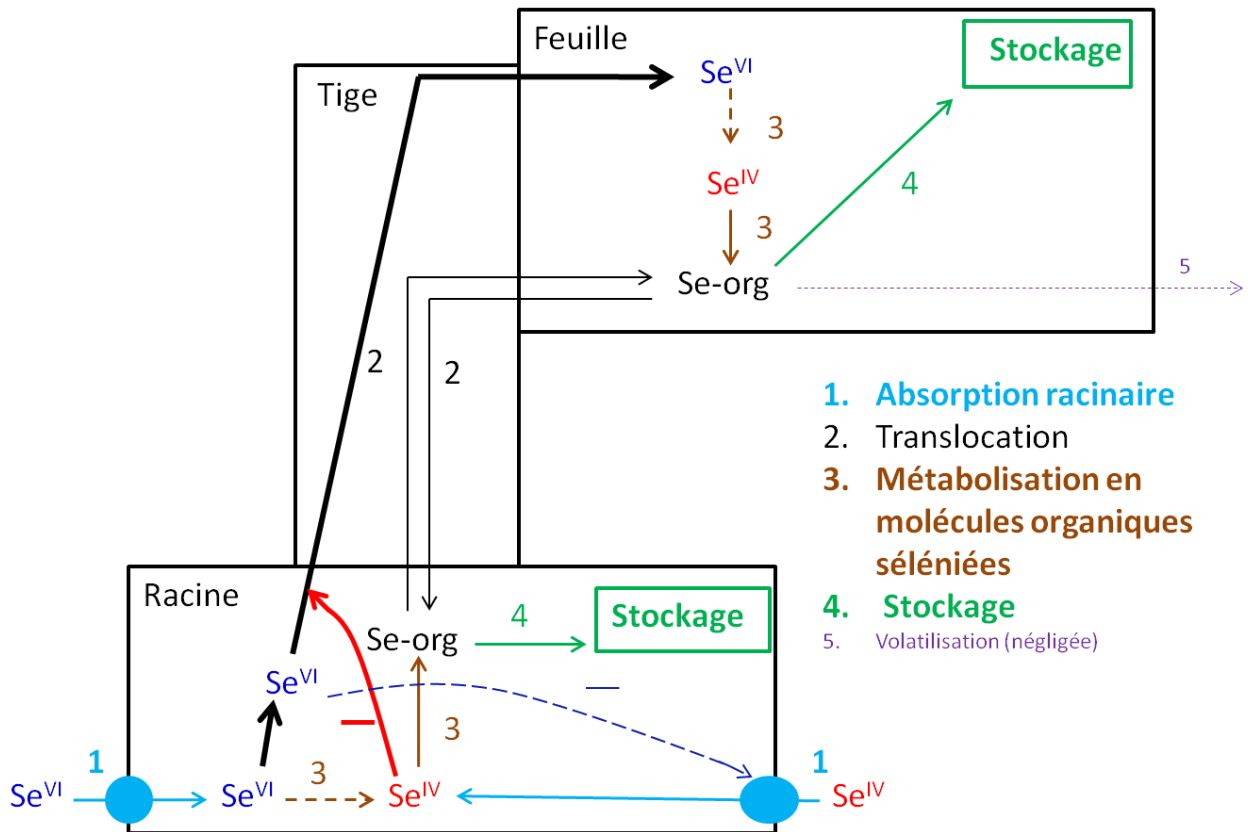
D'après l'ensemble des résultats acquis étayés des postulats de la littérature, nous pouvons établir des hypothèses plus précises sur le métabolisme du sélénium chez le *Zea mays* au stade génératif, schématiquement représentées sur la figure 3.C.1 pour les faibles concentrations et sur la figure 3.C.2 pour une concentration élevée en sélénium dans le milieu nutritif.

Quand les concentrations dans le milieu nutritif sont faibles (10 et 50 µg/L dans notre étude, Fig 3.C.1), la majeure partie du séléniate, tout comme le sélénite est métabolisée en composés organiques séléniés. La réduction de séléniate en sélénite ne semble pas, dans ce cas, être une étape limitante dans le métabolisme du séléniate. Ainsi, une forme prédominante de sélénium, un composé organique sélénié probablement, est transféré vers les feuilles. La concentration dans les feuilles est donc identique quelle que soit la forme en sélénium dans le milieu nutritif. Le transfert de séléniate vers les feuilles sans subir de transformation est donc négligeable tout comme la volatilisation du sélénium via les feuilles. A des concentrations en sélénium extrêmement faibles, dans notre étude 10 µg/L, il ne semble pas y avoir d'interaction entre le séléniate et le sélénite. A une concentration légèrement plus élevée (50 µg/L dans notre étude), le stock disponible de séléniate non métabolisé dans les racines augmente légèrement entraînant de ce fait une inhibition de l'absorption du sélénite.



**Figure 3.C.1.** Métabolisme du sélénium chez le *Zea mays* au stade génératif en présence d'une faible concentration de sélénium source. Les traits en gras sont les processus majoritaires et ceux en pointillé minoritaires. La flèche en bleu foncé symbolise les interactions entre séléniate et sélénite

Quand la concentration dans le milieu nutritif est élevée (1000  $\mu\text{g/L}$  dans notre étude, Fig 3.C.2), la réduction du séléniate en sélénite devient une étape très limitante dans le métabolisme du séléniate. Par conséquent, le stock disponible de séléniate dans les racines augmente, à l'origine de son transfert massif vers les feuilles. La concentration en sélénium accumulée dans la plante entière ainsi que dans les feuilles devient plus importante en présence de séléniate que de sélénite en solution. La volatilisation du sélénium reste négligeable. Dans ce cas, l'inhibition de séléniate sur l'absorption du sélénite est masquée par la forte absorption de séléniate dans les racines. Cependant, le sélénite inhibe fortement la translocation du séléniate vers les feuilles entraînant une diminution de l'accumulation en sélénium dans la plante entière et dans les feuilles si les deux formes oxydées inorganiques de sélénium sont présents dans le milieu nutritif.



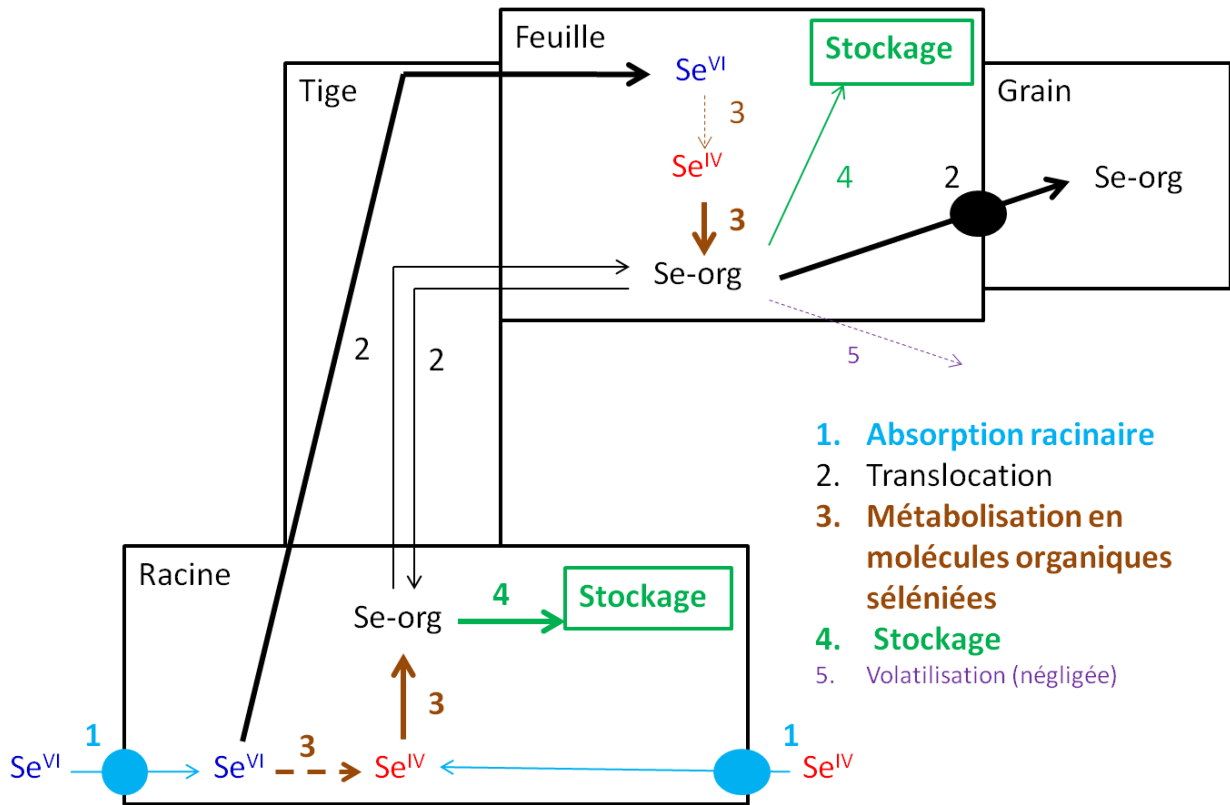
*Schéma 3.C.2. Métabolisme du sélénium chez le *Zea mays* au stade génératif en présence d'une forte concentration de sélénium source. Les traits en gras sont les processus majoritaires et ceux en pointillé minoritaires. Les flèches en rouge et en bleu foncé symbolisent les interactions entre séléniate et sélénite*

## 2. ZEA MAYS AU STADE REPRODUCTEUR : GRAINS MATURES

L'expérience réalisée à 1000 µg/L au stade mature permet de confirmer en partie les hypothèses énoncées précédemment sur les voies métaboliques du sélénium à forte concentration au stade génératif (Fig 3.C.3), à savoir le séléniate est moins métabolisé que le sélénite. Après son absorption, une faible proportion du séléniate est métabolisée dans les racines, tandis que la majorité du séléniate est transféré vers les feuilles sous forme de séléniate. De nouveau, dans les feuilles le séléniate peut soit être réduit et transformé en composé organique soit rester sous sa forme initiale. Les feuilles restent le lieu de stockage préférentiel du sélénium si le séléniate est la forme source. Concernant le sélénite, celui-ci est rapidement et entièrement métabolisé dans les racines. En effet, dans l'ensemble des organes de la plante, aucune trace de sélénium inorganique n'a été détecté ; le sélénium est donc

transféré et stocké sous forme de composés organiques séléniés. Dans ce cas, les racines sont le lieu de stockage principal du sélénium.

Dans les grains, seuls des composés organiques séléniés y sont accumulés. Ainsi, le sélénite plus rapidement et facilement métabolisé par la plante entraîne une accumulation de sélénium dans les grains plus élevée que le séléniat.



**Schéma 3.C.3.** Métabolisme du sélénium chez le *Zea mays* au stade mature en présence d'une forte concentration de sélénium source. Les traits en gras sont les processus majoritaires et ceux en pointillé minoritaires

Les variations du métabolisme du sélénium chez le *Zea mays* en fonction de la forme et la concentration en sélénium source ainsi que du stade de développement de la plante, ont été identifiées, quantifiées et schématisées. Dans le chapitre suivant, les effets de ce métabolisme sur l'accumulation des cations essentiels dans les plantes sont présentés.



## **CHAPITRE 4 :**

# **LE SELENIUM INFLUENCE-T-IL L'ACCUMULATION DE CATIONS ESSENTIELS A LA PLANTE ?**



## Chapitre 4 : Le sélénium influence-t-il l'accumulation de cations essentiels à la plante ?

Dans ce chapitre, nous présenterons et discuterons de l'effet du sélénium sur l'accumulation dans les plantes entières et ses différents organes (racines, tiges, feuilles, grains) des cations essentiels à la croissance de la plante : calcium, magnésium, fer, zinc, manganèse, cuivre. Comme pour le chapitre précédent, différents facteurs pouvant influencer leurs accumulations ont été étudiés : la concentration (10, 50 et 1000  $\mu\text{g/L}$ ) et la forme du sélénium source (séléniate, sélénite et mélange séléniate/sélénite) ainsi que le stade de développement de la plante (stade génératif et reproducteur).

Afin de faciliter la comparaison et la lecture des graphiques, les concentrations sont normées à partir de la médiane du traitement témoin respectif de chaque expérience. De plus, afin de visualiser l'influence d'un mélange de séléniate et sélénite sur l'accumulation d'un élément, une valeur théorique (TV) de l'accumulation de cet élément est calculée à partir des traitements à une seule forme du sélénium source (séléniate ou sélénite), et ceci pour chaque concentration en sélénium utilisée et dans les différents organes des plantes.

D'autre part, les plantes témoins entre le stade génératif et le stade reproducteur ont des concentrations en cations très différentes dues aux modifications métaboliques lors de la croissance d'une plante. Dans cette étude, nous nous intéressons à l'influence du sélénium sur l'accumulation de cations essentiels en fonction du stade de développement. Ainsi, lorsqu'une différence est statistiquement mise en évidence entre les pourcentages d'accumulation du cation des deux stades de développement, un facteur (qui correspond au ratio entre le pourcentage d'un cation accumulé dans la plante (ou un organe spécifique) au stade reproducteur et ce pourcentage au stade génératif) est calculé (nommé F « SR/SG »). Si le ratio est supérieur à 1, le sélénium entraîne un enrichissement du cation plus important au stade reproducteur que génératif ; inversement si le ratio est inférieur à 1, le sélénium provoque un appauvrissement relatif au stade reproducteur par rapport au stade génératif. L'écart absolu du facteur par rapport à 1 est d'autant plus élevé que l'effet d'enrichissement ou d'appauvrissement est important.

### 1. EFFET DU SELENIUM SUR LE CALCIUM

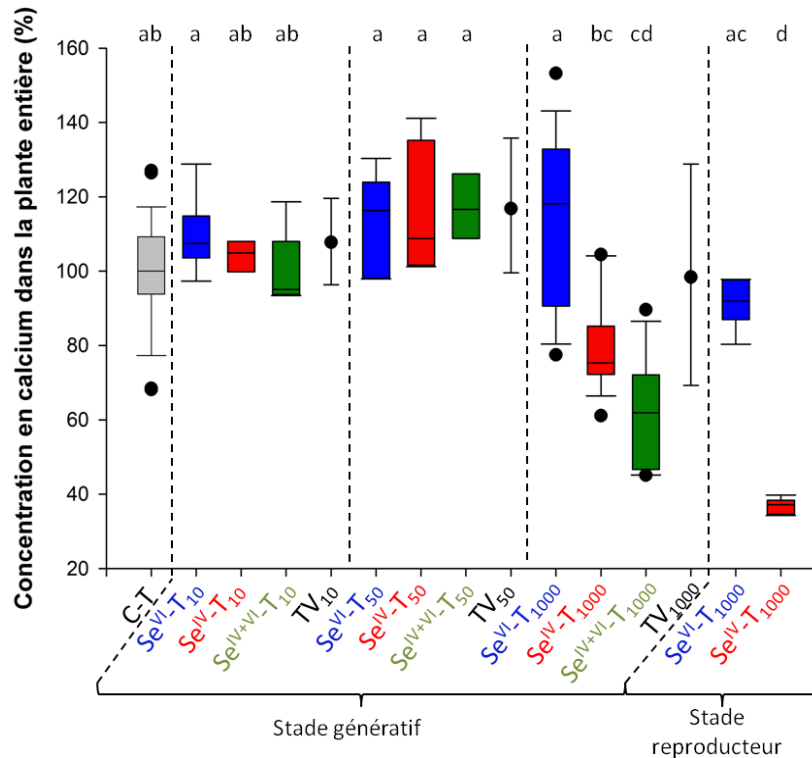
#### 1.1. Résultats

##### 1.1.1. *Expérimentations au stade génératif*



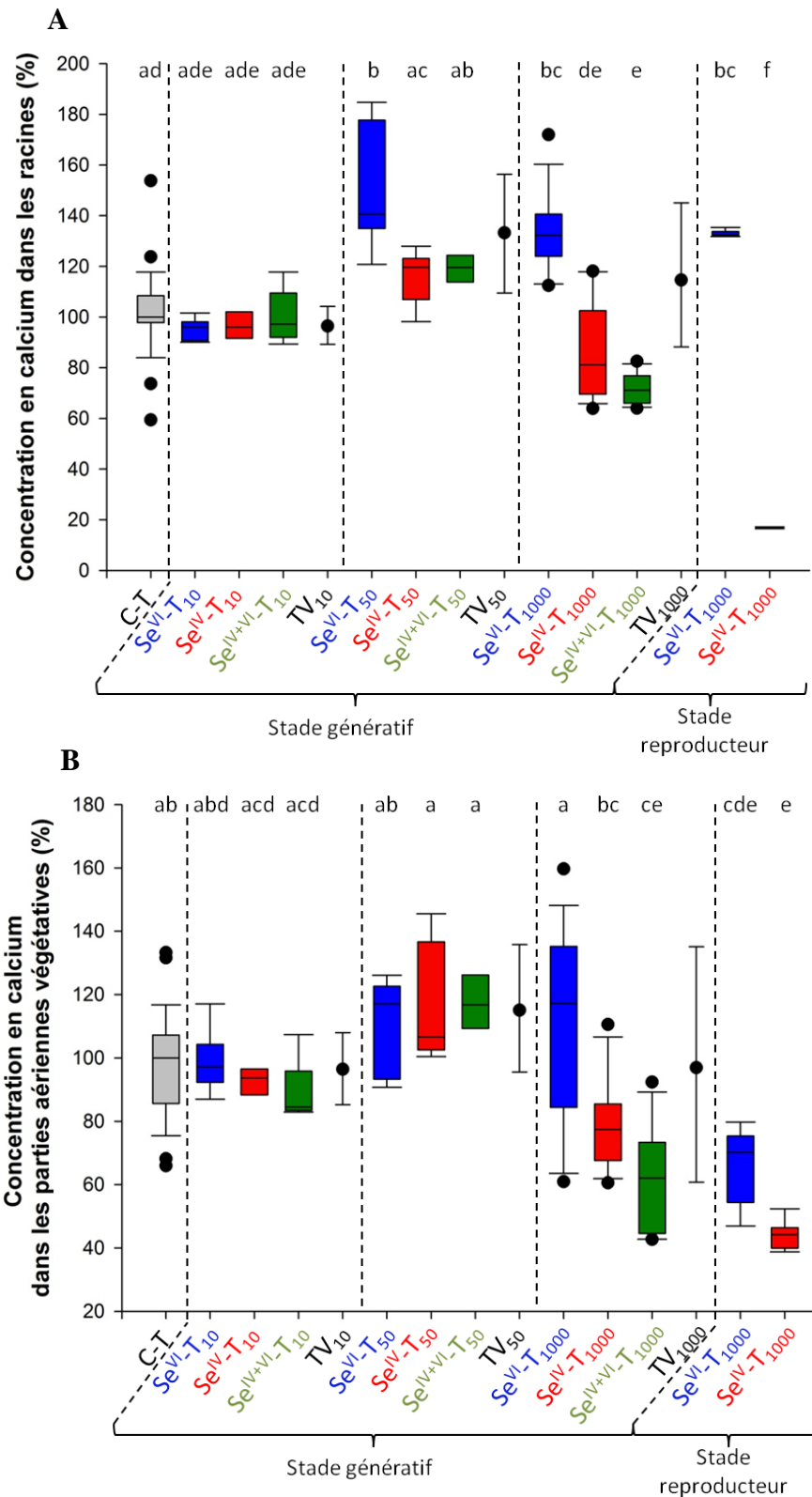
1.1.1.1. Effet du séléniate ou du sélénite

Etant donnée la dispersion des concentrations en calcium, globalement aux faibles concentrations en sélénium (10 et 50  $\mu\text{g/L}$ ) et indépendamment des deux formes utilisées, les concentrations en calcium dans les plantes entières (PE) et dans les parties aériennes (PA) sont similaires au calcium des plantes témoins (Fig. 4.1). Néanmoins une différence plus marquée existe à 1000  $\mu\text{g/L}$  pour les PE et PA : en présence de sélénite, les concentrations en calcium sont plus faibles qu'en présence de séléniate (Fig 4.2.B).



**Figure 4.1.** Accumulation du calcium (en %) dans la plante entière en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante : C-T (en gris) ; Se<sup>VI</sup>-T (en bleu) ; Se<sup>IV</sup>-T (en rouge) ; Se<sup>IV+VI</sup>-T (en vert) ; TV (point noir). a, b c et d: résultats du test de Kruskal and Wallis

Concernant les racines, les concentrations en calcium traitées avec 50 et 1000  $\mu\text{g/L}$  de séléniate sont plus élevées que celles du témoin (C-T) et que celles du traitement sélénite (Fig 4.2.A). Néanmoins, les facteurs de translocations « racines/parties aériennes » (ratio de la concentration en calcium dans les parties aériennes et de celle dans les racines) sont identiques indépendamment des concentrations et des formes du sélénium source (Tableau 4.1).



**Figure 4.2.** Accumulation du calcium (en %) dans les racines (A) ou les parties aériennes végétatives (B) en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante : C-T (en gris) ;  $Se^{VI}$ -T (en bleu) ;  $Se^{IV}$ -T (en rouge) ;  $Se^{IV+VI}$ -T (en vert) ; TV (point noir). a, b, c, d, e et f: résultats du test de Kruskal and Wallis

Traitements	FT « R/PA »
C-T	1,26 <sup>abc</sup> (0,96 ; 1,57)
Se <sup>VI</sup> -T <sub>10</sub>	1,58 <sup>ac</sup> (1,46 ; 1,62)
Se <sup>IV</sup> -T <sub>10</sub>	1,53 <sup>abc</sup> (1,40 ; 1,59)
Se <sup>IV+VI</sup> -T <sub>10</sub>	1,37 <sup>abc</sup> (1,32 ; 1,38)
Se <sup>VI</sup> -T <sub>50</sub>	1,12 <sup>abc</sup> (1,11 ; 1,42)
Se <sup>IV</sup> -T <sub>50</sub>	1,72 <sup>a</sup> (1,50 ; 1,73)
Se <sup>IV+VI</sup> -T <sub>50</sub>	1,63 <sup>ac</sup> (1,60 ; 1,65)
Se <sup>VI</sup> -T <sub>1000</sub>	0,88 <sup>bc</sup> (0,71 ; 1,09)
Se <sup>IV</sup> -T <sub>1000</sub>	1,04 <sup>abc</sup> (0,95 ; 1,14)
Se <sup>IV+VI</sup> -T <sub>1000</sub>	0,84 <sup>c</sup> (0,76 ; 1,08)

**Tableau 4.1.** Facteurs de translocation « racines/parties aériennes » (FT « R/PA ») du calcium en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante. a, b et c: résultats du test de Kruskal and Wallis

#### 1.1.1.2. Effet d'un mélange séléniate/sélénite

Pour les Se<sup>IV+VI</sup>-T<sub>10</sub> et Se<sup>IV+VI</sup>-T<sub>50</sub>, les concentrations en calcium dans PE et les organes ne sont pas différentes de celles des traitements temoins, séléniate-seul, sélénite-seul ou au TV (Fig 4.1,4.2). A plus forte concentration (1000 µg/L), aucune différence n'existe dans l'accumulation du calcium entre le Se<sup>IV+VI</sup>-T<sub>1000</sub> et le Se<sup>IV</sup>-T<sub>1000</sub> (Fig 4.1, 4.2).

Par contre, les concentrations en calcium dans les PE et les organes du Se<sup>IV+VI</sup>-T<sub>1000</sub> sont inférieures à celles du traitement contrôle, moins 37 %, 29 % et 38 % respectivement (Fig 4.2) et en moyenne 47 % plus faibles que celles du Se<sup>VI</sup>-T<sub>1000</sub> (Fig 4.2). Les facteurs de translocation « racines/parties aériennes » des Se<sup>IV+VI</sup>-T sont identiques à ceux du C-T (Tableau 4.1). Seule la concentration en calcium dans les racines cultivées avec le mélange à 1000 µg/L est significativement inférieure à la TV<sub>1000</sub> (Fig 4.2).

### 1.1.2. Expérimentations au stade reproducteur

#### 1.1.2.1. Effet du séléniate ou du sélénite

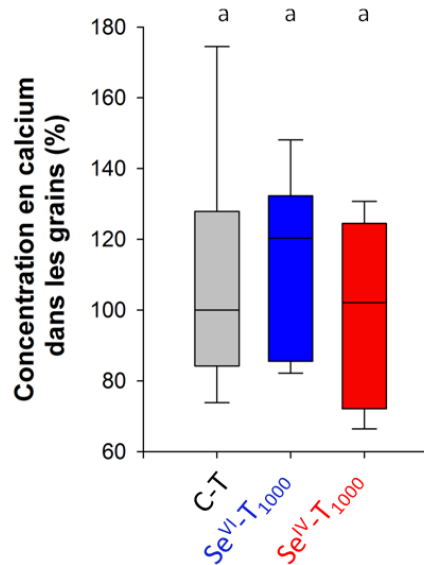
Dans les PE matures, l'accumulation du calcium en présence de séléniate est identique à celle du C-T (Fig 4.1). En présence de sélénite cette accumulation diminue fortement par rapport à celle du C-T et du Se<sup>VI</sup>-T<sub>1000</sub>, soit respectivement moins 63 % et 60 % (Fig 4.1). En

présence de séléniate, la concentration en calcium dans les racines matures est supérieure (32 %) à celle du C-T. Mais en présence de sélénite, les racines accumulent beaucoup moins de calcium que celles cultivées sans sélénium ou avec séléniate, respectivement moins 83 % et 87 % (Fig 4.2). La concentration en calcium dans les parties aériennes végétatives (PAV, i.e. tiges et feuilles) diminue en présence de sélénium ; pour les PAV traitées avec du séléniate et du sélénite, une diminution de 30 % et 56 % respectivement est observée par rapport aux PAV témoins (Fig 4.2). Par contre, les concentrations en calcium dans les grains dans les trois traitements (C-T, Se<sup>VI</sup>-T<sub>1000</sub> et Se<sup>IV</sup>-T<sub>1000</sub>) sont identiques (Fig 4.3).

Le facteur de translocation « racines/parties aériennes » du traitement séléniate est inférieur au traitement contrôle alors que celui du traitement sélénite est supérieur (Tableau 4.2). Les facteurs de translocation « PAV/grains » sont plus faibles dans le C-T que dans les traitements avec sélénium (Tableau 4.2).

Traitements	FT « R/PA »	FT « PAV/G »
C-T	0,16 <sup>a</sup> (0,16 ; 0,18)	0.030 <sup>a'</sup> (0.023 ; 0.032)
Se <sup>VI</sup> -T <sub>1000</sub>	0,10 <sup>b</sup> (0,09 ; 0,11)	0.047 <sup>b'</sup> (0.039 ; 0.047)
Se <sup>IV</sup> -T <sub>1000</sub>	0,51 <sup>c</sup> (0,50 ; 0,53)	0.059 <sup>c'</sup> (0.049 ; 0.064)

**Tableau 4.2.** Facteurs de translocation « racines/parties aériennes » (FT « R/PA ») et « parties aériennes végétatives/grains » (FT « PAV/G ») du calcium en fonction de la forme de sélénium source. a, b, c, a' et b': résultats des tests de Kruskal and Wallis



**Figure 4.3.** Accumulation du calcium (en %) dans les grains en fonction de la forme du sélénium : C-T (en gris) ; Se<sup>VI</sup>-T (en bleu) ; Se<sup>IV</sup>-T (en rouge). a : résultats du test de Kruskal and Wallis

#### 1.1.2.2. Comparaison stade génétatif/stade reproducteur

En présence de séléniate, aucune différence de pourcentage d'accumulation du calcium dans les PE et dans les racines entre les deux stades de développement n'est remarquable. Au contraire avec du sélénite, le facteur « SR/SG » dans la PE est de 0,49 et celui des racines est de 0,21. Pour les PAV, ce facteur est de 0,58 quelle que soit la forme du sélénium dans la solution nutritive.

## 1.2. Discussion

Au stade génétatif du *Zea mays*, contrairement aux études de la littérature (Arvy et al. 1995, Kopsell et al. 2000), des concentrations supérieures à 50 µg/L de séléniate entraînent l'augmentation de la concentration en calcium mais exclusivement dans les racines et néanmoins sans modification des facteurs de transfert du calcium vers les parties aériennes. Malgré le fait que l'accumulation du calcium dans les racines soit sensible dès 50 µg/L de séléniate, elle n'est cependant pas proportionnelle à la concentration en séléniate. D'après les conclusions sur le métabolisme du séléniate (Chapitre 3), à partir de 50 µg/L de séléniate dans la solution nutritive, la réduction du séléniate en sélénite n'est pas totale dans la plante ; une partie du séléniate reste donc sous cette forme anionique. Le calcium étant connu pour participer (avec le potassium et le sodium) à la balance anions-cations et à l'osmorégularité

#### Chapitre 4 : Le sélénium influence-t-il l'accumulation de cations essentiels à la plante ?

des cellules, l'augmentation d'une forme anionique telle que le séléniate s'accompagne par compensation d'une augmentation d'un cation tel que le calcium. Cet effet n'est enregistré que dans l'organe où la concentration en sélénium est la plus élevée, soit les racines.

Au stade reproducteur, l'augmentation de l'accumulation du calcium dans les racines est identique à celle observée au stade génératif (32 %) : cette activation due au séléniate n'est donc pas modifiée au cours de la croissance de la plante. Cependant, cette activation de l'accumulation du calcium dans les racines ne se traduit pas par une augmentation dans les parties aériennes ; au contraire le transfert vers les parties aériennes est inhibé par le séléniate. Cette inhibition n'est visible qu'au stade reproducteur d'où un facteur « SR/SG » inférieur à 1 et n'est pas associé à une augmentation de la concentration en sélénium, puisque les plantes matures accumulent moins de sélénium que les plantes matures traitées au séléniate (Chapitre 3).

Concernant les traitements sélénite, il n'affecte pas l'accumulation du calcium au stade génératif quelle que soit sa concentration dans le milieu nutritif. Ces résultats sont en accord avec les études d'Arvy *et al.* (1995) mais contradictoires avec l'augmentation de calcium observée par Feng *et al.* (2009), Wu and Huang (1992), Hawrylak-Nowak (2008) et Pazurkiewick-Kocot *et al.* (2003).

Par opposition, au stade reproducteur le sélénite inhibe l'accumulation du calcium dans l'ensemble des organes végétatifs des plantes (racines et parties aériennes végétatives), d'où des facteurs « SR/SG » inférieurs à 1. De même, les fougères cultivées avec à des concentrations en sélénite inférieures à 2 mg/L voient également leur teneur en calcium diminuer (Feng *et al.* 2009). De plus, l'inhibition de l'accumulation du calcium due au sélénite est plus importante dans les racines que dans les PAV : le facteur de translocation du calcium des racines vers les parties aériennes est, de ce fait, plus élevé. Contrairement au séléniate, le transport intra-plante du calcium ne semble donc pas être inactivé mais au contraire activé par le sélénite ; la diminution de l'accumulation du calcium par le sélénite semble donc principalement due à une inhibition de l'absorption racinaire. D'après les résultats sur le métabolisme du sélénite (Chapitre 3), au stade reproducteur les concentrations en sélénium dans les racines et les parties aériennes végétatives sont plus élevées qu'au stade génératif. De plus, en présence de sélénite la concentration en sélénium dans les racines matures est plus importante que dans les parties aériennes végétatives matures. L'inhibition de l'accumulation du calcium la plus importante est donc associée à l'organe ayant la concentration en sélénium la plus élevée.

## Chapitre 4 : Le sélénium influence-t-il l'accumulation de cations essentiels à la plante ?

Au stade reproducteur, la différence majeure entre le métabolisme du séléniate et de sélénite dans la plante est le taux de métabolisation du sélénium : total pour le sélénite et partiel pour le séléniate (chapitre 3). L'inhibition de l'absorption du calcium due au sélénite au stade reproducteur serait donc due à l'augmentation de la concentration en composés organo-séléniés dans les racines alors que, comme au stade génératif, l'activation de l'accumulation du calcium dans les racines cultivées avec du séléniate, serait plutôt liée à la présence de la forme anionique oxydée, soit le séléniate.

Quelle que soit la source de sélénium (séléniate ou sélénite), la concentration en calcium dans les grains est identique à celle des grains témoins, malgré la diminution de l'accumulation du calcium dans les PAV. Pour cela, la translocation du calcium des PAV vers les grains est d'autant plus élevée que la concentration en calcium dans les PAV est faible.

Pour finir, au stade génératif alors qu'une forte concentration en sélénite n'affecte pas l'accumulation du calcium et que le séléniate à 1000 µg/L augmente celle-ci dans les racines, un mélange séléniate/sélénite (à 1000 µg/L) provoque une diminution de l'accumulation du calcium dans les racines ainsi que dans les parties aériennes. Cependant, la translocation des racines vers les parties aériennes n'est pas modifiée. L'absorption racinaire du calcium serait donc inhibée mais pas la translocation intra-plante. Les effets d'un mélange de sélénium source sur l'accumulation du calcium dans les plantes ne sont donc pas la somme des effets des deux formes seuls dans la solution nutritive.

## 2. EFFET DU SELENIUM SUR LE MAGNESIUM

### 2.1. Résultats

#### 2.1.1. *Expérimentations au stade génératif*

##### 2.1.1.1. *Effet du séléniate ou du sélénite*

L'accumulation du magnésium dans les PE et PA traitées à de faibles concentrations (10 et 50 µg/L) en séléniate ou en sélénite n'est pas différente de celle des plantes témoins (Fig 4.4 et 4.5.B). La présence de sélénite à des concentrations croissantes n'a aucun effet sur les concentrations en magnésium dans les racines qui restent identiques à celles de racines du C-T (Fig 4.5.A)

Les différences les plus marquées sont donc les suivantes :

Chapitre 4 : Le sélénium influence-t-il l'accumulation de cations essentiels à la plante ?

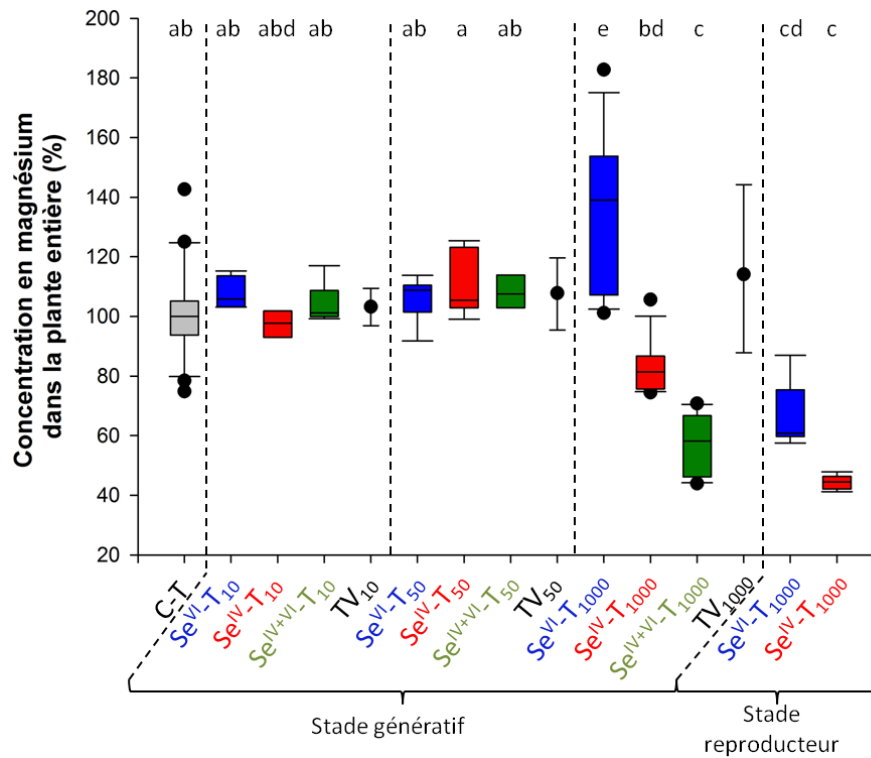
- A 1000 µg/L, la concentration en magnésium des PE du Se<sup>VI</sup>-T<sub>1000</sub> est 39 % et 70 % plus élevée que celle des plantes témoins et du Se<sup>IV</sup>-T<sub>1000</sub>, respectivement (Fig 4.4).
- Concernant à présent les racines, les concentrations en magnésium dans celles traitées avec 50 et 1000 µg/L de séléniate sont respectivement 38 % et 53 % plus élevées que les concentrations des racines témoins (C-T) et des racines du Se<sup>IV</sup>-T<sub>50</sub> et Se<sup>IV</sup>-T<sub>1000</sub>, respectivement plus 20 % et 72 % (Fig 4.5.A).
- Dans les PA traitées avec 1000 µg/L de séléniate, la concentration en magnésium est 25 % plus élevée que dans les PA témoins. Au contraire, avec 1000 µg/L de sélénite, l'accumulation du magnésium est plus faible que dans celles des C-T et Se<sup>VI</sup>-T<sub>1000</sub> (Fig 4.5.B).

Pour finir, les facteurs de translocation des traitements à faibles concentrations sont similaires à celui du C-T. Mais par contre à 1000 µg/L, quelle que soit la forme du sélénium source, les facteurs de translocation des racines vers les PA sont plus faibles que celui du C-T (tableau 4.3).

Traitements	FT « R/PA »
C-T	0,75 <sup>a</sup> (0,59 ; 1,02)
Se <sup>VI</sup> -T <sub>10</sub>	0,83 <sup>a</sup> (0,80 ; 0,88)
Se <sup>IV</sup> -T <sub>10</sub>	0,92 <sup>a</sup> (0,77 ; 1,03)
Se <sup>IV+VI</sup> -T <sub>10</sub>	0,97 <sup>a</sup> (0,83 ; 1,06)
Se <sup>VI</sup> -T <sub>50</sub>	0,80 <sup>a</sup> (0,72 ; 0,83)
Se <sup>IV</sup> -T <sub>50</sub>	1,00 <sup>a</sup> (0,89 ; 1,22)
Se <sup>IV+VI</sup> -T <sub>50</sub>	1,00 <sup>a</sup> (0,94 ; 1,06)
Se <sup>VI</sup> -T <sub>1000</sub>	0,47 <sup>b</sup> (0,39 ; 0,52)
Se <sup>IV</sup> -T <sub>1000</sub>	0,49 <sup>b</sup> (0,39 ; 0,55)
Se <sup>IV+VI</sup> -T <sub>1000</sub>	0,64 <sup>ab</sup> (0,61 ; 0,66)

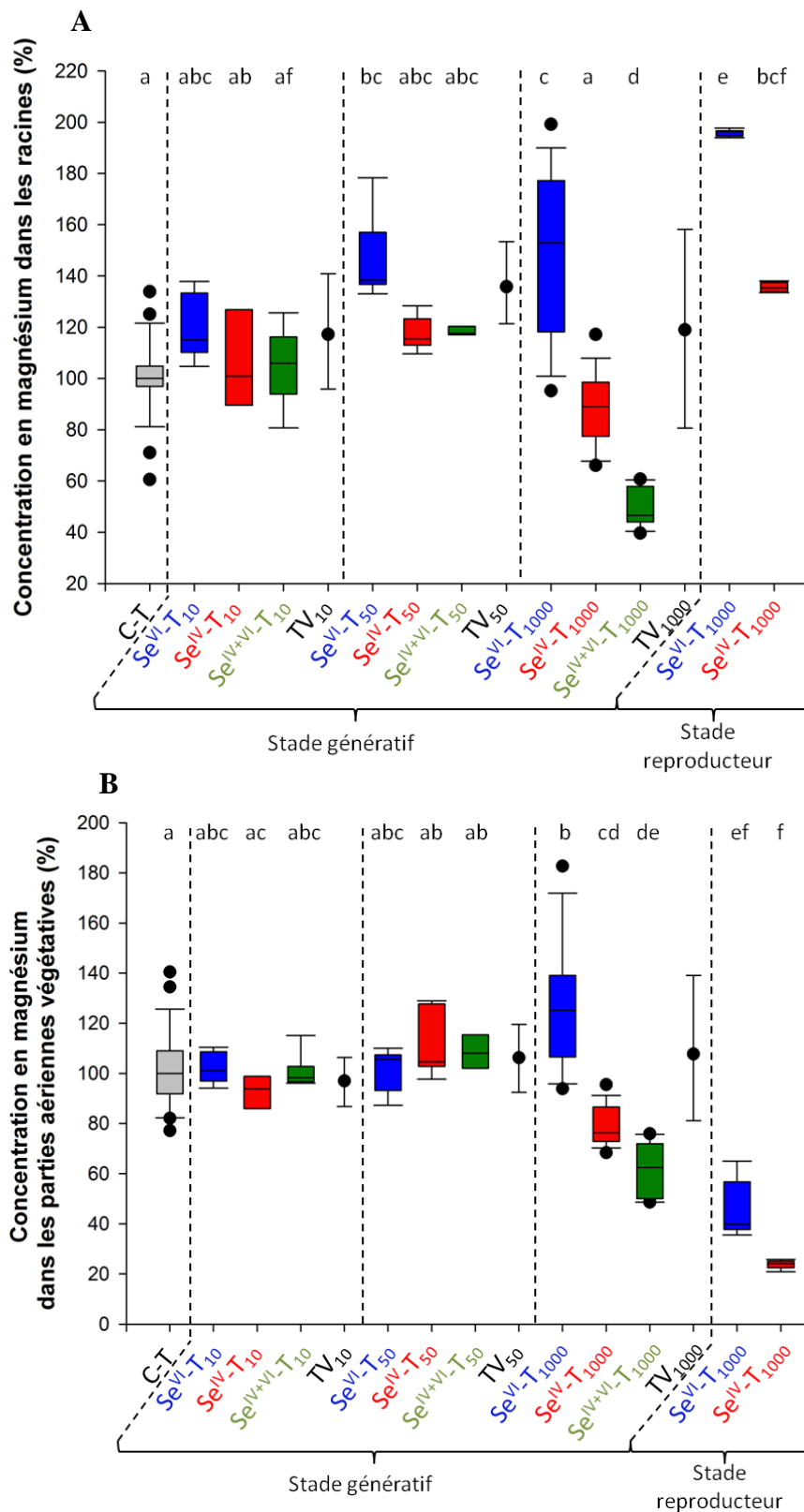
**Tableau 4.3.** Facteurs de translocation « racines/parties aériennes » (FT « R/PA ») du magnésium en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante. a et b: résultats du test de Kruskal and Wallis





**Figure 4.4.** Accumulation du magnésium (en %) dans la plante entière en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante : C-T (en gris) ; Se<sup>VI</sup>-T (en bleu) ; Se<sup>IV</sup>-T (en rouge) ; Se<sup>IV+VI</sup>-T ( en vert) ; TV (point noir). a, b c et d: résultats du test de Kruskal and Wallis

Chapitre 4 : Le sélénium influence-t-il l'accumulation de cations essentiels à la plante ?



**Figure 4.5.** Accumulation du magnésium (en %) dans les racines (A) ou les parties aériennes végétatives (B) en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante : C-T (en gris) ;  $Se^{VI}$ -T (en bleu) ;  $Se^{IV}$ -T (en rouge) ;  $Se^{IV+VI}$ -T (en vert) ; TV (point noir). a, b c, d, e et f: résultats du test de Kruskal and Wallis

## Chapitre 4 : Le sélénium influence-t-il l'accumulation de cations essentiels à la plante ?

### 2.1.1.2. *Effet d'un mélange séléniate/sélénite*

Dans le cas des plantes traitées avec un mélange de séléniate/sélénite à faibles concentrations (10 et 50  $\mu\text{g/L}$ ), l'accumulation du magnésium dans les différents organes et donc dans les PE n'est pas différente de celle des plantes témoins, traitées avec du séléniate seul ou du sélénite seul aux mêmes concentrations (10 ou 50  $\mu\text{g/L}$ ), ainsi que les  $\text{TV}_{10}$  et  $\text{TV}_{50}$  (Fig 4.4, 4.5.).

A 1000  $\mu\text{g/L}$  de sélénium, provenant d'un mélange de séléniate et de sélénite, l'accumulation dans les PE et les racines est de 30 à 70 % plus faible que celles des plantes témoins, traitées avec du séléniate ou du sélénite seul (Fig 4.4 et Fig 4.5.A).

Dans les PA, la concentration en magnésium du  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}_{1000}$  est inférieure de celles du C-T (moins 38 %) et du  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}_{1000}$  (moins 50 %), mais identique à celle du  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$  (Fig 4.5.B).

Donc, malgré ces variations de concentration dans les différents organes des plantes, les facteurs de transfert « R/PA » des trois traitements (10, 50 et 1000  $\mu\text{g/L}$  de sélénium) avec un mélange séléniate/sélénite sont identiques à ceux du traitement témoin (Tableau 4.3).

Pour finir, les concentrations en magnésium observées dans les PE, les racines et les PA dans le  $\text{Se}^{\text{IV+VI}}\text{-T}_{1000}$  sont respectivement 47 %, 60 % et 39 % inférieures aux valeurs théoriques calculées ( $\text{TV}_{1000}$ ).

### 2.1.2. *Expérimentation au stade reproducteur*

#### 2.1.2.1. *Effet du séléniate ou du sélénite*

Au stade reproducteur, quelle que soit la forme du sélénium source (séléniate et sélénite) l'accumulation du magnésium dans les PE matures ainsi que dans les PAV est plus faible que celle du traitement contrôle :

- Les concentrations en magnésium dans les PE traitées au séléniate ou au sélénite sont inférieures, respectivement de 39 % et 55 %, par rapport aux plantes témoins (Fig 4.4).
- Les PAV accumulent 60 % et 76 % moins de magnésium en présence de séléniate et sélénite respectivement, que sans sélénium dans la solution nutritive (Fig 4.5.B).

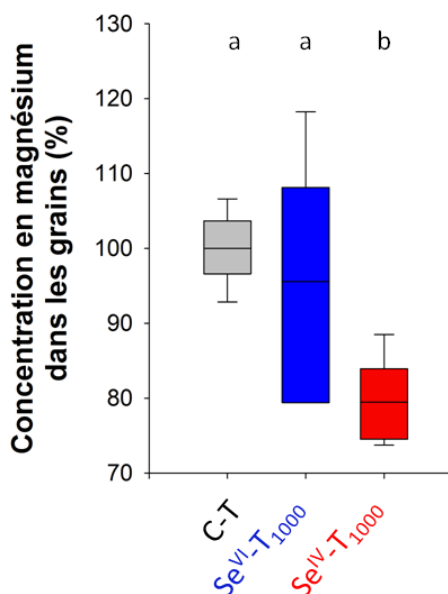
A contrario, l'accumulation du magnésium dans les racines matures dépend de la forme du sélénium :  $\text{C-T} < \text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000} < \text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}_{1000}$  (Fig 4.5.A). Les concentrations en magnésium dans les racines traitées avec du séléniate ou du sélénite à 1000  $\mu\text{g/L}$  sont respectivement 96 % et 35 % plus élevées que celles des racines témoins.

Les facteurs de translocation « R/PA » sont identiques quelle que soit la forme du sélénium source mais tous les deux plus faibles que celui du C-T (Tableau 4.4).

## Chapitre 4 : Le sélénium influence-t-il l'accumulation de cations essentiels à la plante ?

Les concentrations en magnésium dans les grains sont identiques pour le C-T et  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}_{1000}$  alors que celles dans les grains traités avec du sélénite sont inférieures de respectivement 21 % et 18 % (Fig 4.6).

Les facteurs de translocation « PAV/G » sont identiques quelle que soit la forme du sélénium source mais tous les deux plus élevés que celui du C-T (Tableau 4.4).



**Figure 4.6.** Accumulation du magnésium (en %) dans les grains en fonction de la forme du sélénium : C-T (en gris) ;  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}$  (en bleu) ;  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$  (en rouge). a et b : résultats du test de Kruskal and Wallis

Traitements	FT « R/PA »	FT « PAV/G »
C-T	1,83 <sup>a</sup> (1,81 ; 1,88)	0,49 <sup>a'</sup> (0,48 ; 0,56)
$\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}_{1000}$	0,51 <sup>b</sup> (0,49 ; 0,61)	1,07 <sup>b'</sup> (0,94 ; 1,25)
$\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$	0,50 <sup>b</sup> (0,49 ; 0,50)	1,60 <sup>b'</sup> (1,59 ; 1,99)

**Tableau 4.4.** Facteurs de translocation « racines/parties aériennes » (FT « R/PA ») et « parties aériennes végétatives/grains » (FT « PAV/G ») du magnésium en fonction de la forme du sélénium source. a, b, a' et b' : résultats des tests de Kruskal and Wallis

### 2.1.2.2. Comparaison stade génétatif/stade reproducteur

Pour les PE et les PAV et indépendamment de la forme du sélénium source, les facteurs « SR/SG » sont inférieurs à 1 : 0,44 et 0,55 pour les PE traitées respectivement au séléniate et sélénite ; pour les PAV, ce facteur est de 0,32 pour les deux traitements avec du sélénium (séléniate et sélénite). Au contraire, pour les racines ce facteur est supérieur à 1 avec 1,28 pour celles cultivées avec du séléniate et 1,52 pour celles cultivées avec du sélénite.

## 2.2. Discussion

Une concentration en séléniate de 10 ou 50 µg/L n'a pas d'effet visible sur l'accumulation du magnésium dans des plantes jeunes de *Zea mays* alors qu'à 1000 µg/L la présence de séléniate favorise une augmentation de la concentration en magnésium dans les plantes entières. Ces résultats sont en accord avec les études d'Arvy *et al.* (1995) et de Kopsell *et al.* (2000).

Au niveau des racines, le séléniate active l'accumulation globale du magnésium dans les plantes. En effet, à partir de 50 µg/L de séléniate le magnésium est sur-accumulé dans les racines ; la concentration dans les racines augmente avec les concentrations en séléniate dans le milieu nutritif. Néanmoins, la concentration en magnésium dans les parties aériennes ne suit pas la même variation : une augmentation de l'accumulation dans les parties aériennes est observée seulement avec 1000 µg/L de séléniate et elle est moins importante que celle observée dans les racines. D'après nos conclusions du chapitre 3 et la littérature, à partir de 50 µg/l et surtout avec 1000 µg/L de séléniate comme sélénium source, le stock de séléniate à réduire augmente ; cette réaction de réduction de séléniate en sélénite nécessite de l'énergie apportée sous forme d'ATP ; or justement un des rôles du magnésium est de participer à la synthèse d'ATP. Les racines étant le premier lieu de la réduction du séléniate, l'augmentation de magnésium dans les racines pourrait être due à une forte demande en ATP. Lorsque la concentration en séléniate (dans le traitement à 1000 µg/L) est trop élevée, il est alors transféré vers les feuilles qui deviennent le deuxième lieu de réduction du séléniate (chapitre 3), augmentant ainsi la demande en ATP et donc en magnésium. Néanmoins, malgré une augmentation de la concentration en magnésium dans les parties aériennes, le transfert de magnésium des racines vers ces parties aériennes est inhibé par le séléniate. Le séléniate à forte concentration active donc l'accumulation du magnésium dans l'ensemble de la plante mais inhibe son transfert vers les parties aériennes.

Au stade reproducteur et contrairement au stade génératif, le séléniate à forte concentration entraîne une inhibition de l'accumulation du magnésium dans les plantes entières. Cependant, l'influence du séléniate est différente selon les organes du *Zea mays*. L'accumulation du magnésium dans les racines est de nouveau fortement accrue par la présence de séléniate dans le milieu nutritif ; cette activation est même plus importante que dans le stade génératif. Les hypothèses sur cette augmentation sont les mêmes que celle du stade génératif : la présence de séléniate à forte concentration nécessite un apport accru d'ATP, et donc de magnésium, pour sa réduction. Cependant, la concentration en sélénium dans les racines matures est plus faible

que celles des racines jeunes. La forte augmentation de magnésium dans les racines au stade reproducteur ne serait pas due à une augmentation de la concentration en séléniate mais potentiellement à une augmentation du taux de réduction. En ce qui concerne les parties aériennes végétatives, le séléniate inhibe fortement le transfert de magnésium ; une inhibition plus intense que celle enregistrée au stade génératif.

Contrairement au séléniate, en présence de sélénite au stade génératif de la plante et quelle que soit sa concentration dans la solution de culture, l'accumulation du magnésium dans les plantes entières et dans les racines n'est pas modifiée. Néanmoins et tout comme le séléniate, à forte concentration en sélénite le transfert vers les parties aériennes est inhibé.

Au stade reproducteur, l'accumulation du magnésium dans les racines matures augmente en présence de sélénite et est plus élevée qu'au stade génératif, toujours en présence de sélénite. Nos études sur la spéciation du sélénium ont montré que la totalité du sélénite est métabolisé en composés organo-séléniés. La première réaction métabolique est une réduction catalysée soit par la sulfite réductase soit par l'intervention du glutathion. La synthèse de glutathion est réalisée par la glutathion synthase qui a pour cofacteur le magnésium. Lorsque la concentration en sélénite augmente dans les racines la demande en glutathion et donc la synthèse en glutathion nécessitant du magnésium augmente. Nous pouvons noter que l'activation de l'accumulation du magnésium dans les racines matures traitées au séléniate est plus importante que celles traitées au sélénite alors que la teneur en sélénium est plus élevée dans ces dernières. La réduction du séléniate nécessite dans un premier temps de l'ATP puis dans un deuxième temps du glutathion, tous deux dépendant du magnésium.

Quelle que soit la forme du sélénium source et à forte concentration, le transfert de magnésium des racines vers les parties aériennes végétatives est inhibé. L'intensité de l'inhibition est dépendante de la concentration en composés organo-séléniés dans les parties aériennes : similaire dans les traitements avec séléniate ou sélénite au stade reproducteur et plus élevée qu'au stade génératif.

Quelle que soit la forme du sélénium source, l'accumulation du magnésium dans les parties aériennes végétatives est inhibée. Néanmoins, sa translocation vers les grains est augmentée. Elle permet d'obtenir une concentration en magnésium dans les grains traités au séléniate similaire à celle des grains témoins. Cependant, la concentration en magnésium dans les parties aériennes végétatives traitées au sélénite était si faible que même l'augmentation de la translocation de magnésium ne permet pas d'atteindre la concentration observée dans les grains témoins.

Pour finir, un mélange séléniate/sélénite (à 1000 µg/L) provoque une forte diminution de l'accumulation du magnésium dans l'ensemble des plantes, entraînant même des concentrations plus faibles que la valeur théorique (TV<sub>1000</sub>) calculée. Il semble que les deux formes est une co-interaction négative sur l'accumulation du magnésium dans l'ensemble des organes du *Zea mays*.

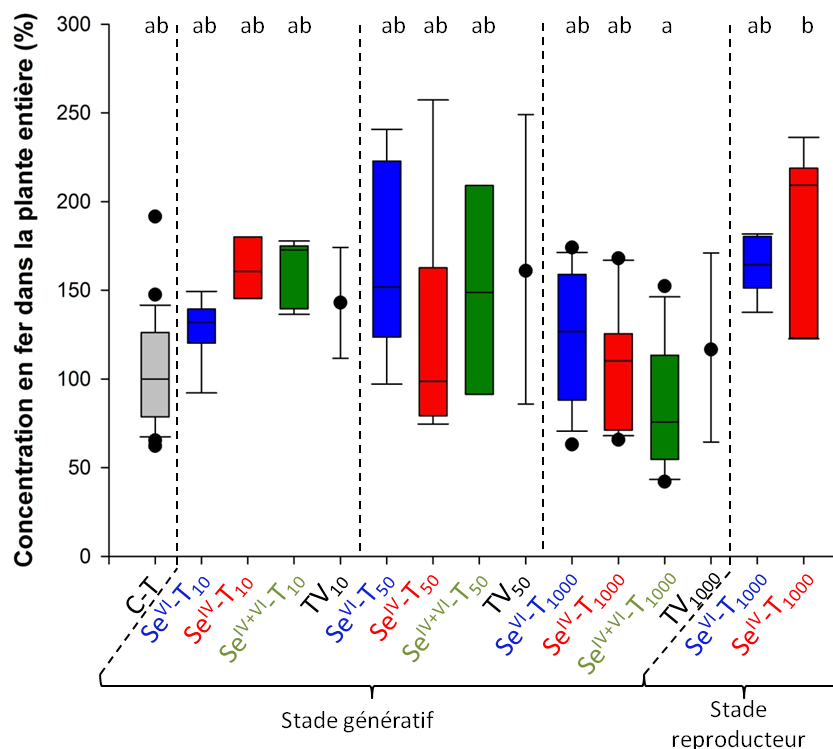
### 3. EFFET DU SELENIUM SUR LE FER

#### 3.1. Résultats

##### 3.1.1. Expérimentations au stade génératif

###### 3.1.1.1. Effet du séléniate ou du sélénite

Quelle que soit la concentration (10, 50 ou 1000 µg/L) et la forme du sélénium source (séléniate ou sélénite), les concentrations en fer dans les PE sont identiques non seulement entre elles mais également à celles des plantes témoins (Fig 4.7) : les concentrations sont globalement très dispersées.



**Figure 4.7.** Accumulation du fer (en %) dans la plante entière en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante : C-T (en gris) ; Se<sup>VI</sup>-T (en bleu) ; Se<sup>IV</sup>-T (en rouge) ; Se<sup>IV+VI</sup>-T ( en vert) ; TV (point noir. a et b : résultats du test de Kruskal and Wallis

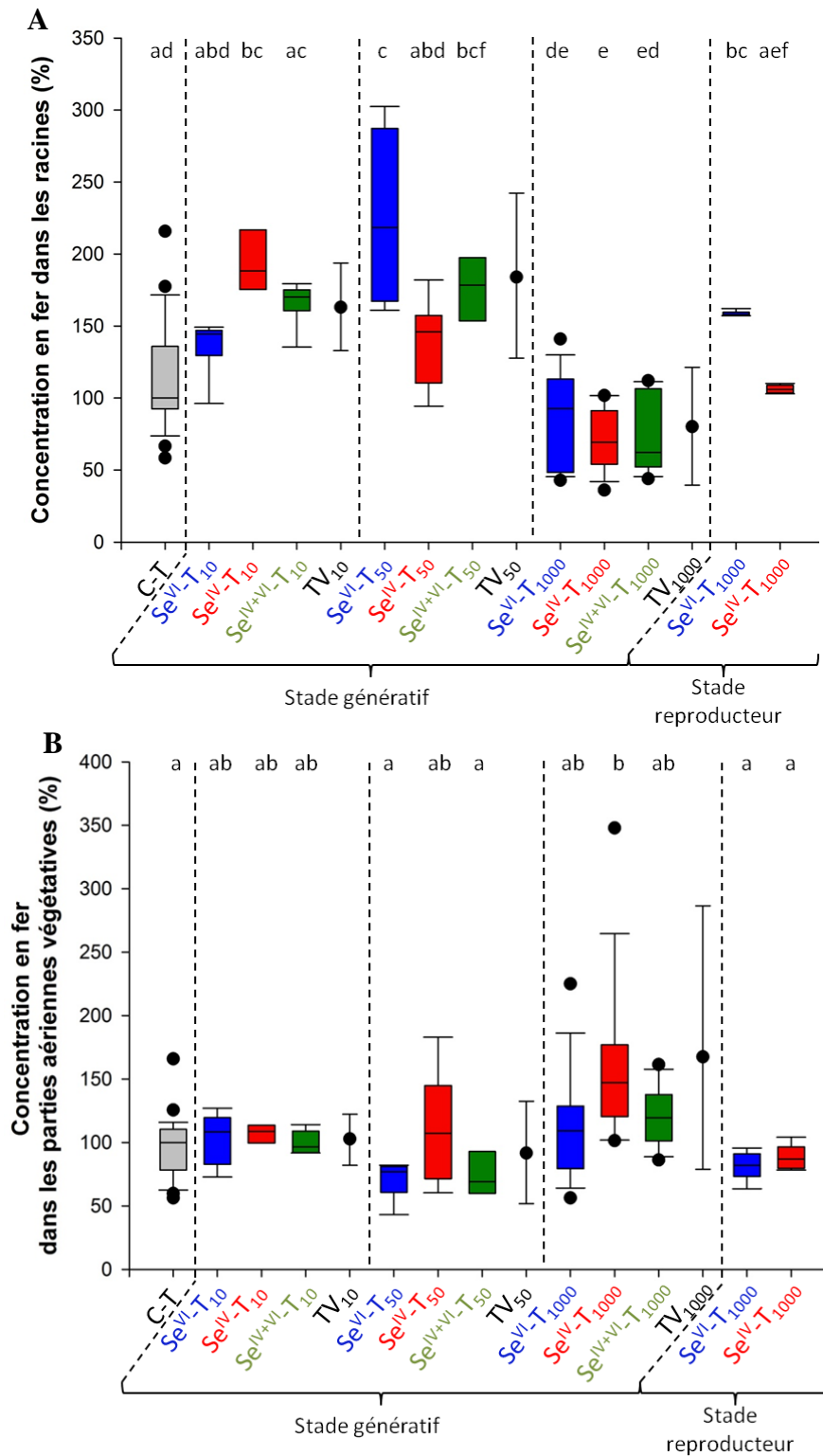
#### Chapitre 4 : Le sélénium influence-t-il l'accumulation de cations essentiels à la plante ?

Pour les racines, la concentration en fer n'est pas affectée par la présence de séléniate à 10 et 1000  $\mu\text{g/L}$  dans la solution nutritive (Fig 4.8.A). Cependant à 50  $\mu\text{g/L}$  de séléniate, l'accumulation du fer dans les racines est supérieure de 118 % à celle des racines témoins et de 50 % par rapport à celle des racines du  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{50}$  (Fig 4.8.A). En ce qui concerne les racines cultivées avec du sélénite, leurs concentrations en fer par rapport aux racines témoins dépendent fortement de la concentration en sélénite source : les concentrations en fer sont 88 % plus élevés avec 10  $\mu\text{g/L}$ , similaires avec 50  $\mu\text{g/L}$  et au contraire 31 % plus faibles avec 1000  $\mu\text{g/L}$  (Fig 4.8.A).

Pour les PA (Fig 4.8.B), la seule différence observée est la suivante : la présence de sélénite à 1000  $\mu\text{g/L}$  dans le milieu nutritif provoque une augmentation de 47 % de l'accumulation du fer par rapport au C-T.

Les facteurs de translocation « R/PA » des trois traitements avec du séléniate et les deux traitements au sélénite à basse concentration sont identiques à celui du C-T (Tableau 4.5). Au contraire, pour le  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$  ce facteur est supérieur à celui du C-T (Tableau 4.5).





**Figure 4.8.** Accumulation du fer (en %) dans les racines (A) ou les parties aériennes végétatives (B) en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante : C-T (en gris) ; Se<sup>VI</sup>-T (en bleu) ; Se<sup>IV</sup>-T (en rouge) ; Se<sup>IV+VI</sup>-T (en vert) ; TV (point noir). a et b : résultats du test de Kruskal and Wallis

Traitements	FT « R/PA »
C-T	0.015 <sup>ab</sup> (0.009 ; 0.023)
Se <sup>VI</sup> -T <sub>10</sub>	0.010 <sup>a</sup> (0.007 ; 0.010)
Se <sup>IV</sup> -T <sub>10</sub>	0.007 <sup>a</sup> (0.006 ; 0.007)
Se <sup>IV+VI</sup> -T <sub>10</sub>	0.007 <sup>a</sup> (0.007 ; 0.008)
Se <sup>VI</sup> -T <sub>50</sub>	0.003 <sup>a</sup> (0.003 ; 0.005)
Se <sup>IV</sup> -T <sub>50</sub>	0.011 <sup>a</sup> (0.010 ; 0.011)
Se <sup>IV+VI</sup> -T <sub>50</sub>	0.005 <sup>a</sup> (0.004 ; 0.007)
Se <sup>VI</sup> -T <sub>1000</sub>	0.036 <sup>bc</sup> (0.030 ; 0.050)
Se <sup>IV</sup> -T <sub>1000</sub>	0.056 <sup>c</sup> (0.047 ; 0.073)
Se <sup>IV+VI</sup> -T <sub>1000</sub>	0.057 <sup>c</sup> (0.031 ; 0.072)

**Tableau 4.5.** Facteurs de translocation « racines/parties aériennes » (FT « R/PA ») du fer en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante. a, b et c : résultats du test de Kruskal and Wallis

### 3.1.1.2. Effet d'un mélange séléniate/sélénite

La comparaison de la concentration en fer obtenue lors des Se<sup>IV+IV</sup>-T<sub>10, 50 et 1000</sub> à celle du C-T dans les PE, les racines et les PA (Fig 4.7, 4.8) ne met en évidence qu'une seule différence : les racines traitées avec le mélange de sélénium à 50 µg/L ont une concentration en fer 79 % plus élevée que celles du C-T (Fig 4.8.A).

Pour les trois concentrations testées, les concentrations en fer des PE cultivées avec un mélange de séléniate/sélénite sont identiques à celles des plantes cultivées avec du séléniate ou du sélénite uniquement (Fig 4.7). Il en est de même pour l'accumulation du fer dans les racines et les PA (Fig 4.8).

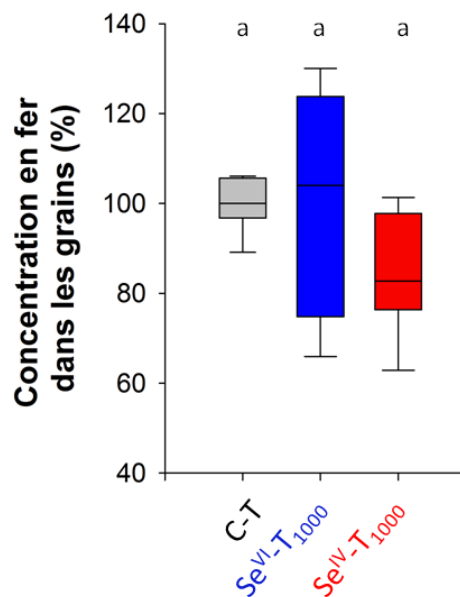
Les facteurs de translocation des deux traitements à basses concentrations avec un mélange de sélénium sont identiques à celui du témoin. Au contraire et comme pour les facteurs de translocation du Se<sup>VI</sup>-T<sub>1000</sub> et Se<sup>IV</sup>-T<sub>1000</sub>, ce facteur du Se<sup>IV+VI</sup>-T<sub>1000</sub> est supérieur à celui du témoin (Tableau 4.5)

### 3.1.2. Expérimentation au stade reproducteur

#### 3.1.2.1. Effet du séléniate ou du sélénite

Au stade reproducteur, pour les deux traitements avec sélénium (séléniate et sélénite), les concentrations en fer dans les PE et dans les PAV, sont identiques à celles du C-T (Fig 4.7 et 4.8.B). Concernant les racines matures, celles traitées avec du sélénite ont une concentration en fer similaire à celles témoins. Au contraire, la présence de séléniate dans le milieu entraîne une augmentation de la concentration en fer dans les racines matures de 58 % et 49 % par rapport à celles des racines témoins et traitées avec du sélénite respectivement (Fig 4.9.A). Le facteur de translocation « R/PAV » du  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$  est identique à celui du C-T ; tous deux inférieur à celui du  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}_{1000}$  (Tableau 4.6).

Les concentrations en fer dans les grains (Fig 4.9) ainsi que les facteurs de translocation « PAV/G » (Tableau 4.6) sont similaires dans les trois traitements : C-T,  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}_{1000}$  et  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$ .



**Figure 4.9.** Accumulation du fer (en %) dans les grains en fonction de la forme du sélénium : C-T (en gris) ;  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}$  (en bleu) ;  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$  (en rouge). a : résultats du test de Kruskal and Wallis

Traitements	FT « R/PA »	FT « PAV/G »
C-T	0,028 <sup>a</sup> (0,028 ; 0,029)	0,66 <sup>a'</sup> (0,60 ; 0,67)
Se <sup>VI</sup> -T <sub>1000</sub>	0,016 <sup>b</sup> (0,016 ; 0,017)	0,80 <sup>a'</sup> (0,51 ; 1,00)
Se <sup>IV</sup> -T <sub>1000</sub>	0,025 <sup>a</sup> (0,023 ; 0,027)	0,65 <sup>a'</sup> (0,49 ; 0,67)

**Tableau 4.6.** Facteurs de translocation « racines/parties aériennes » (FT « R/PA ») et « parties aériennes végétatives/grains » (FT « PAV/G ») du fer en fonction de la forme du sélénium source. a, b, a' et b': résultats des tests de Kruskal and Wallis

### 3.1.2.2. Comparaison stade génétatif/stade reproducteur

Quelle que soit la forme du sélénium dans le milieu nutritif, aucune différence de pourcentage d'accumulation du fer dans les PE entre les deux stades de développement n'est observée (Fig 4.7). Il en est de même pour les racines cultivées avec du sélénite (Fig 4.8.A) ainsi que les parties aériennes cultivées avec du séléniate (Fig 4.8.B). Le facteur « SR/SG » des racines traitées au séléniate est de 1,70 et celui des PAV traitées au sélénite de 0,59 (Fig 4.8).

## 3.2. Discussion

En présence de séléniate, l'accumulation du fer dans les PE et les PAV n'est pas affecté par la concentration en séléniate source et le stade de développement de la plante. Ces résultats corroborent ceux d'Arvy *et al.* (1995) qui ne montrent aucune influence du séléniate sur la concentration en fer à des concentrations en sélénium inférieures à 100 µg/L. Cependant, les plantes jeunes traitées avec 50 µg/L de séléniate et celles matures traitées avec 1000 µg/L de séléniate uniquement ont accumulé des concentrations en fer plus élevées dans leurs racines : cette augmentation est plus marquée au stade reproducteur.

Le sélénite quelle que soit sa concentration n'influence pas l'accumulation du fer dans les plantes entières jeunes ou matures, alors que paradoxalement, au stade génétatif des plants de *Zea mays*, la concentration en sélénite influence fortement l'accumulation du fer dans les racines : l'accumulation dans les racines est d'autant plus élevée que la concentration en sélénite est faible (10 µg/L) et inversement à forte concentration (1000 µg/L). Feng *et al.* (2009) ont également mis en évidence l'effet inhibiteur du sélénite à 1000 µg/L sur l'accumulation du fer dans les racines de fougères. Cependant, cette diminution ne semble pas être due à une diminution de l'absorption mais à une modification du transfert de fer vers les

parties aériennes : il augmente en présence de sélénite à 1000 µg/L. Ainsi l'accumulation dans les plantes entières n'est pas influencée, celle des racines diminue et à l'inverse elle augmente dans les parties aériennes. Au stade reproducteur, le transfert de fer des racines vers les parties aériennes végétatives n'est plus influencé par le sélénite. Ni la concentration en fer, ni son facteur de translocation dans la semence du *Zea mays* ne sont influencés par le séléniate ou le sélénite.

En revanche, aucune co-interaction entre le séléniate et le sélénite n'a été mise en évidence sur l'accumulation du fer dans le *Zea mays*.

Plusieurs études montrent une étroite relation entre le fer et le stress oxydatif (Marschner 1995, Tewari et al. 2005). Dans les organes déficients en fer, une diminution de l'activité de la catalase, de l'ascorbate peroxydase est observée et associée à une augmentation de l'activité de la SOD ainsi que des concentrations en anions superoxydes et du peroxyde d'hydrogène, signe d'un stress oxydatif pour les organes. Néanmoins, Tewari *et al.* (2005) n'observent pas d'augmentation de la peroxydation des lipides. En cas de forte accumulation du fer, cet élément catalyse, via la réaction de Fenton, la formation de radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles. Le sélénium, via son influence sur l'accumulation du fer dans les différents organes, contribue au déséquilibre de la régulation de la quantité de radicaux libres toxiques.

## 4. EFFET DU SELENIUM SUR LE ZINC

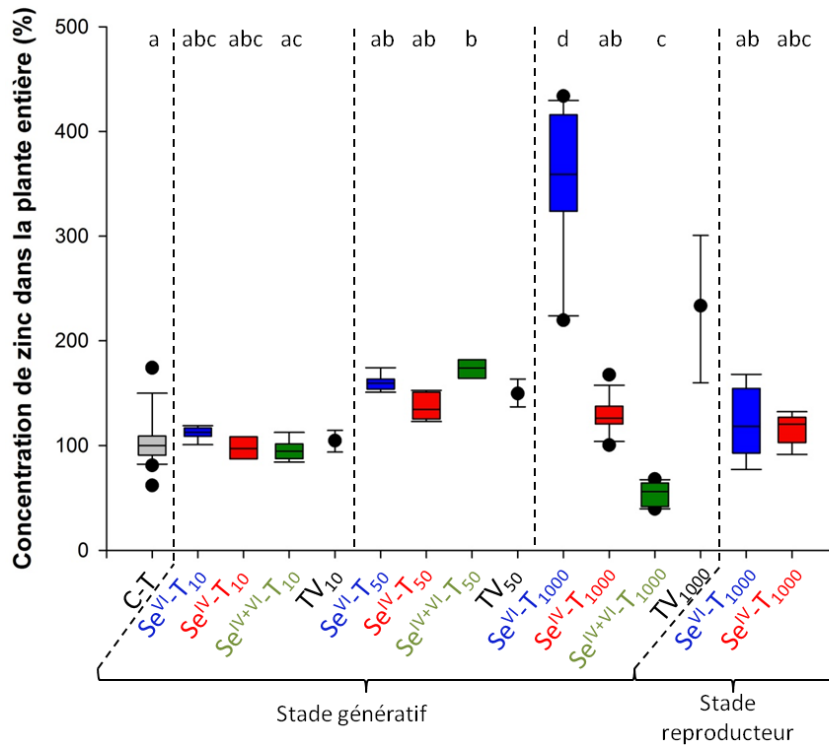
### 4.1. Résultats

#### 4.1.1. *Expérimentations au stade génératif*

##### 4.1.1.1. *Effet du séléniate ou du sélénite*

La plus basse des concentrations (10 µg/L) n'affecte pas l'accumulation du zinc dans l'ensemble des organes des plantes et donc dans les PE (Fig 4.10, 4.11). De plus, quelle que soit la forme du sélénium source, 50 µg/L de sélénium dans le milieu nutritif ne modifient pas la concentration en zinc dans les PE ainsi que dans les racines (Fig 4.10, 4.11.A).

Contrairement au sélénite, 1000 µg/L de séléniate provoquent une forte augmentation de l'accumulation du zinc dans la plante ; la concentration en zinc dans les PE du  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}_{1000}$  est 259 % et 185 % plus élevée que celle des plantes du C-T et du  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$  respectivement (Fig 4.10).



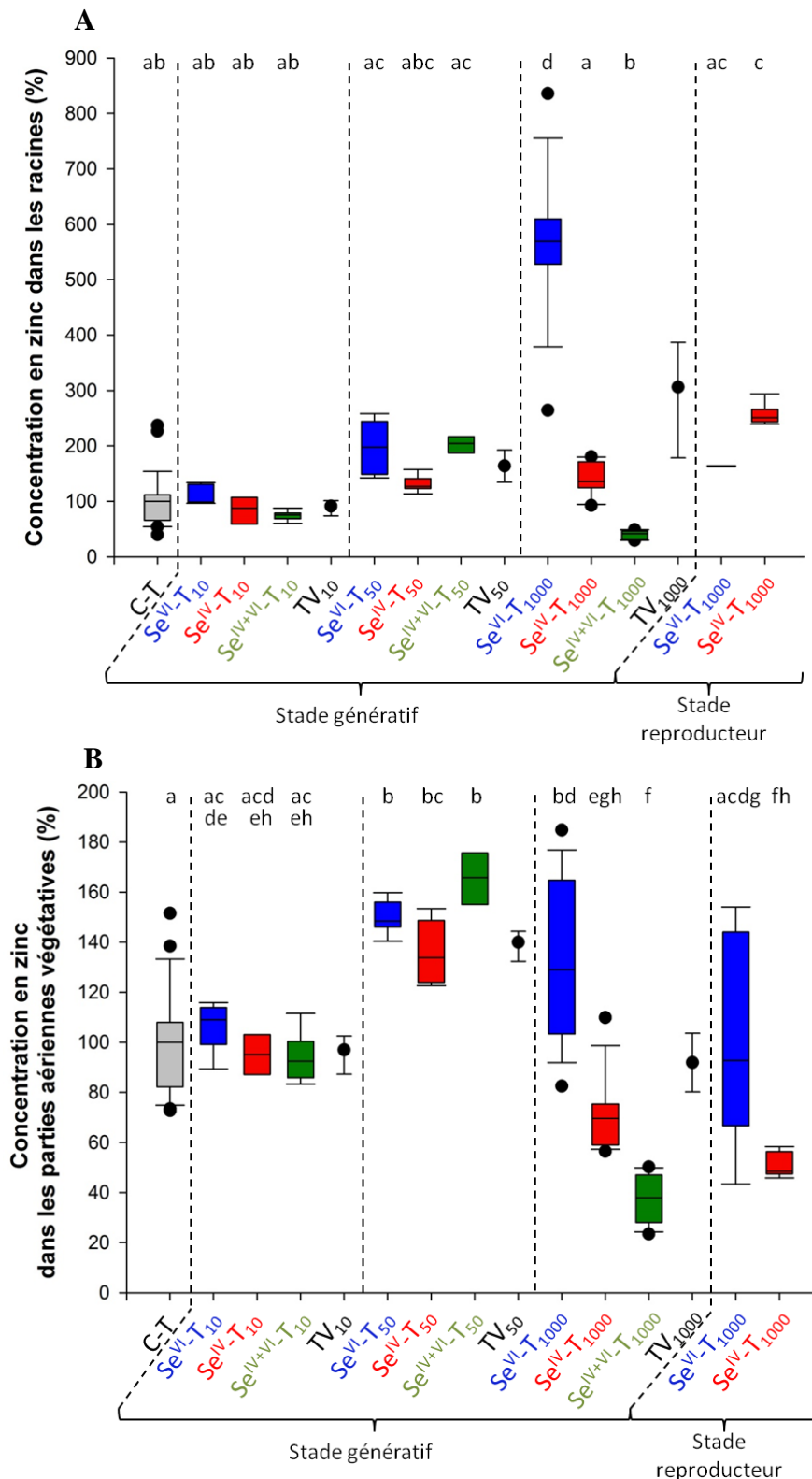
**Figure 4.10.** Accumulation du zinc (en %) dans la plante entière en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante : C-T (en gris) ;  $Se^{VI}$ -T (en bleu) ;  $Se^{IV}$ -T (en rouge) ;  $Se^{IV+VI}$ -T (en vert) ; TV (point noir). a, b et c : résultats du test de Kruskal and Wallis

De même que dans les PE, la concentration des racines traitées avec du séléniate à 1000  $\mu\text{g/L}$  est nettement supérieure à celle des racines traitées sans sélénium (+ 470 %) ou avec du sélénite à 1000  $\mu\text{g/L}$  (+ 318 %) (Fig 4.11.A).

Pour les PA, 50  $\mu\text{g/L}$  de séléniate ou de sélénite entraînent une augmentation de 40 % en moyenne de la concentration en zinc par rapport au C-T (Fig 4.11.B). A plus forte concentration en sélénium (1000  $\mu\text{g/L}$ ) le séléniate et le sélénite n'ont pas le même effet sur l'accumulation du zinc dans les PA : des augmentations de 29 % et de 85 % sont observées pour le  $Se^{VI}$ -T<sub>1000</sub> comparé au C-T et  $Se^{IV}$ -T<sub>1000</sub> respectivement ; et une diminution de 30 % est observée pour  $Se^{IV}$ -T<sub>1000</sub> comparé au C-T (Fig 4.11.B).

Pour finir, pour les concentrations faibles en sélénium dans le milieu nutritif (10 et 50  $\mu\text{g/L}$ ), le facteur de translocation « R/PA » est identique à celui du témoin (Tableau 4.7). A 1000  $\mu\text{g/L}$ , quelle que soit la forme du sélénium, ce facteur est inférieur à celui du témoin (Tableau 4.7).

Chapitre 4 : Le sélénium influence-t-il l'accumulation de cations essentiels à la plante ?



**Figure 4.11.** Accumulation du zinc (en %) dans les racines (A) ou les parties aériennes végétatives (B) en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante : C-T (en gris) ;  $Se^{VI}$ -T (en bleu) ;  $Se^{IV}$ -T (en rouge) ;  $Se^{IV+VI}$ -T (en vert) ; TV (point noir). a, b, c, d, e, f, g et h : résultats du test de Kruskal and Wallis

Traitements	FT « R/PA »
C-T	0.91 <sup>a</sup> (0.75 ; 1.45)
Se <sup>VI</sup> -T <sub>10</sub>	0.99 <sup>a</sup> (0.70 ; 1.05)
Se <sup>IV</sup> -T <sub>10</sub>	0.99 <sup>a</sup> (0.87 ; 1.23)
Se <sup>IV+VI</sup> -T <sub>10</sub>	1.13 <sup>a</sup> (1.09 ; 1.15)
Se <sup>VI</sup> -T <sub>50</sub>	0.71 <sup>ab</sup> (0.63 ; 0.93)
Se <sup>IV</sup> -T <sub>50</sub>	1.00 <sup>a</sup> (0.93 ; 1.02)
Se <sup>IV+VI</sup> -T <sub>50</sub>	0.79 <sup>a</sup> (0.76 ; 0.81)
Se <sup>VI</sup> -T <sub>1000</sub>	0.19 <sup>b</sup> (0.17 ; 0.25)
Se <sup>IV</sup> -T <sub>1000</sub>	0.48 <sup>b</sup> (0.40 ; 0.54)
Se <sup>IV+VI</sup> -T <sub>1000</sub>	0.80 <sup>ab</sup> (0.68 ; 0.91)

**Tableau 4.7.** Facteurs de translocation « racines/parties aériennes » (FT « R/PA ») de zinc en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante. a, b et c : résultats du test de Kruskal and Wallis

#### 4.1.1.2. Effet d'un mélange séléniate/sélénite

A 10 µg/L, les concentrations en zinc dans les différents organes des plantes traitées avec un mélange de sélénium sont similaires à celles des plantes du C-T, du Se<sup>IV</sup>-T<sub>10</sub>, du Se<sup>VI</sup>-T<sub>10</sub> et du TV<sub>10</sub> (Fig 4.10, 4.11).

A 50 µg/L, les concentrations en zinc dans les PE et les PA du Se<sup>IV+VI</sup>-T<sub>50</sub> sont similaires à celles des PE et des PA du Se<sup>VI</sup>-T<sub>50</sub> et Se<sup>IV</sup>-T<sub>50</sub> (Fig 4.10, 4.11) mais plus élevées de 74 % et 66 % respectivement par rapport aux plantes du C-T. Pour les PA du Se<sup>IV+VI</sup>-T<sub>50</sub>, la concentration en zinc mesurée est inférieure de 16 % à la TV<sub>50</sub> (Fig 4.10, 4.11).

A 1000 µg/L, l'accumulation du zinc dans l'ensemble des plantes traitées avec un mélange de sélénium est très inférieure à celle des trois autres traitements (C-T, Se<sup>VI</sup>-T<sub>1000</sub> et Se<sup>IV</sup>-T<sub>1000</sub>) et à la TV<sub>1000</sub> (Fig 4.10, 4.11).

Malgré toutes les modifications de l'accumulation du zinc en présence d'un mélange de séléniate/sélénite, les facteurs de translocation ne sont pas différents de celui du C-T (Tableau 4.7).

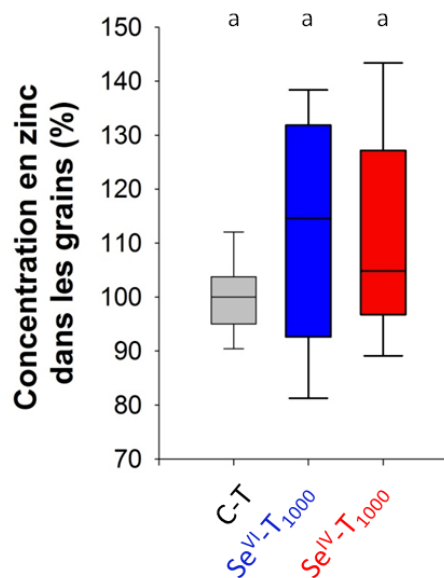


#### 4.1.2. Expérimentation au stade reproducteur

##### 4.1.2.1. Effet du séléniate ou du sélénite

L'accumulation du zinc dans les PE matures n'est pas modifiée par la présence de séléniate ou de sélénite. Il est en de même pour des différents organes traités avec du séléniate. Au contraire, pour le  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$ , la concentration en zinc dans les racines est plus élevée (plus 151 %) alors que celle dans les PAV est plus faible (moins 52 %) par rapport aux racines témoins. Les facteurs de translocation des racines vers les parties aériennes sont identiques pour le C-T et le  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}_{1000}$ , mais sont tous deux inférieurs à celui du  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$  (Tableau 4.8).

Quelle que soit la forme du sélénium source, la concentration en zinc dans les grains est identique à celle des grains témoins (Fig 4.12). Néanmoins, le facteur de translocation des PAV vers les grains est plus élevé pour les plantes traitées avec du sélénite que celui des plantes témoins ou traitées avec du séléniate (Tableau 4.8).



**Figure 4.12.** Accumulation du zinc (en %) dans les grains en fonction de la forme du sélénium : C-T (en gris) ;  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}$  (en bleu) ;  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$  (en rouge). a : résultats du test de Kruskal and Wallis

Traitements	FT « R/PA »	FT « PAV/G »
C-T	0,67 <sup>a</sup> (0,59 ; 0,69)	0.49 <sup>a'</sup> (0.43 ; 0.54)
Se <sup>VI</sup> -T <sub>1000</sub>	0,45 <sup>a</sup> (0,36 ; 0,62)	0.56 <sup>a'</sup> (0.40 ; 0.65)
Se <sup>IV</sup> -T <sub>1000</sub>	0,16 <sup>b</sup> (0,16 ; 0,18)	0.99 <sup>b'</sup> (0.89 ; 1.07)

**Tableau 4.8.** Facteurs de translocation « racines/parties aériennes » (FT « R/PA ») et « parties aériennes végétatives/grains » (FT « PAV/G ») du zinc en fonction de la forme du sélénium source. a et b, a' et b': résultats des tests de Kruskal and Wallis

#### 4.1.2.2. Comparaison stade génétatif/stade reproducteur

En présence de sélénite dans le milieu nutritif, aucune différence de pourcentage d'accumulation du zinc dans les PE entre les deux stades de développement n'est observée (Fig 4.10). Au contraire, le facteur « SR/SG » des PE traitées avec du séléniate est de 0,33.

Le facteur « SR/SG » des racines traitées au séléniate est inférieur à 1 (0,29) alors que celui des racines traitées avec du sélénite est supérieur à 1 (1,85) (Fig 4.11.A).

Pour finir, le stade de développement n'affecte pas le pourcentage d'accumulation du zinc dans les PAV quelle que soit la forme du sélénium source (Fig 4.11.B).

## 4.2. Discussion

Au stade génératif et en présence de séléniate à 50 µg/L, la concentration en zinc augmente uniquement dans les parties aériennes. Par contre, à forte concentration en séléniate l'accumulation du zinc progresse nettement dans l'ensemble de la plante. Ces résultats sont contraires aux observations d'Arvy *et al.* (1995) montrant une augmentation de zinc dans les cellules végétales cultivées avec des concentrations faibles en séléniate (inférieur à 20 µg/L). Dans notre étude, la forte accumulation du zinc dans les plantes entières est liée à d'une augmentation de l'absorption racinaire : ainsi la concentration en zinc dans les racines et dans les parties aériennes s'en trouve accru. Néanmoins, le transfert de zinc des racines vers les parties aériennes diminue avec le traitement au séléniate à forte concentration. Le zinc participe dans les cellules végétales à la détoxification des radicaux superoxydes. Cependant, à une concentration en zinc trop élevée dans les feuilles, il devient toxique et provoque une diminution de l'activité photosynthétique ; il entre en compétition et remplace le magnésium et le manganèse dans plusieurs mécanismes qui sont ainsi fortement inhibés (Van Assche and Clijsters 1986a, b). Ainsi lorsque la concentration en zinc devient trop élevée et donc toxique

#### Chapitre 4 : Le sélénium influence-t-il l'accumulation de cations essentiels à la plante ?

dans les feuilles, sa translocation est inhibée ; par conséquent, si l'absorption du zinc ne diminue pas alors celle-ci augmente dans les racines. Dans le cas du traitement à 50 µg/L de séléniate, l'accumulation du zinc dans les parties aériennes est accrue mais sans modification du facteur de translocation. Par contre à 1000 µg/L, la concentration en zinc dans les parties aériennes est élevée et le facteur de translocation diminue. L'absorption racinaire ne semble pas être régulée, du fait de la présence du séléniate et la concentration en zinc dans les racines augmente donc. Les concentrations toxiques en zinc dans les feuilles sont supérieures à 300 µg/g de MS d'après Marschner (1995) ce qui est le cas pour le traitement au séléniate à 1000 µg/L seulement, avec 355 (270 ; 426) µg/g.

Au stade reproducteur l'accumulation du zinc n'est pas modifiée contrairement au stade génératif. D'après les résultats du chapitre 3, la concentration en sélénium accumulée à partir du séléniate en solution est plus faible au stade reproducteur que génératif : l'influence du séléniate sur l'accumulation du zinc est donc visible exclusivement au stade génératif.

Concernant le sélénite et quelle que soit sa concentration, il n'affecte pas l'accumulation du zinc dans les plantes entières et dans les racines au stade génératif. Au contraire, des résultats publiés par Arvy *et al.* (1995), Fargasova *et al.* (2006) et Wu and Huang (1992) montrent des augmentations ou des diminutions en présence de sélénite. Néanmoins, tout comme dans le traitement avec du séléniate, en présence de 50 µg/L de sélénite, une augmentation en zinc dans les parties aériennes est observée. Mais contrairement au séléniate, à forte concentration en sélénite (1000 µg/L), la concentration en zinc dans les parties aériennes diminue.

Au stade reproducteur, les plantes matures cultivées avec du sélénite, comme les plantes jeunes, ne présentent pas de modification de leur accumulation globale du zinc mais une diminution de zinc dans les parties aériennes végétatives. Cependant, la concentration en zinc dans les racines matures est accrue. Ainsi pour les deux stades de développement, la diminution en zinc dans les parties aériennes végétatives est due à une inhibition du transfert des racines vers les parties aériennes végétatives. Cette inhibition est d'autant plus élevée que la concentration en sélénium est importante dans la plante : en effet en présence de sélénite les plantes accumulent plus de sélénium lors d'un stade de développement avancé.

La diminution de zinc dans les parties aériennes végétatives peut provoquer l'augmentation de radicaux superoxydes et hydroxyles entraînant l'augmentation de la perméabilité membranaire (Cakmak and Marschner 1988, Cakmak et al. 1989) et ainsi qu'une diminution de la croissance des feuilles, des grains et le raccourcissement des entre-nœuds (Marschner 1995). D'après les expérimentations de cette étude, seul le premier de ces symptômes a été

noté chez les plantes jeunes traitées au sélénite alors que les trois symptômes ont clairement été observés chez les plantes matures traitées au sélénite. Malgré cela, la teneur critique d'une déficience en zinc, 20 µg/g (Marschner 1995), n'est atteinte dans aucun des traitements effectués.

Quelle que soit la forme du sélénium dans la solution nutritive, l'accumulation du zinc dans des grains est identique aux plantes cultivées sans sélénium : lors du traitement avec du sélénite la translocation du zinc vers les grains est accrue.

Pour finir, le mélange de séléniate/sélénite à 50 µg/L de sélénium provoque une augmentation de la concentration en zinc dans les parties aériennes des plantes jeunes, ce qui est identique au traitement avec du séléniate ou du sélénite seul à 50 µg/L. Cependant, lors du traitement avec mélange de sélénium à forte concentration, une co-interaction négative vis-à-vis de l'accumulation du zinc dans l'ensemble des organes des plantes est observée.

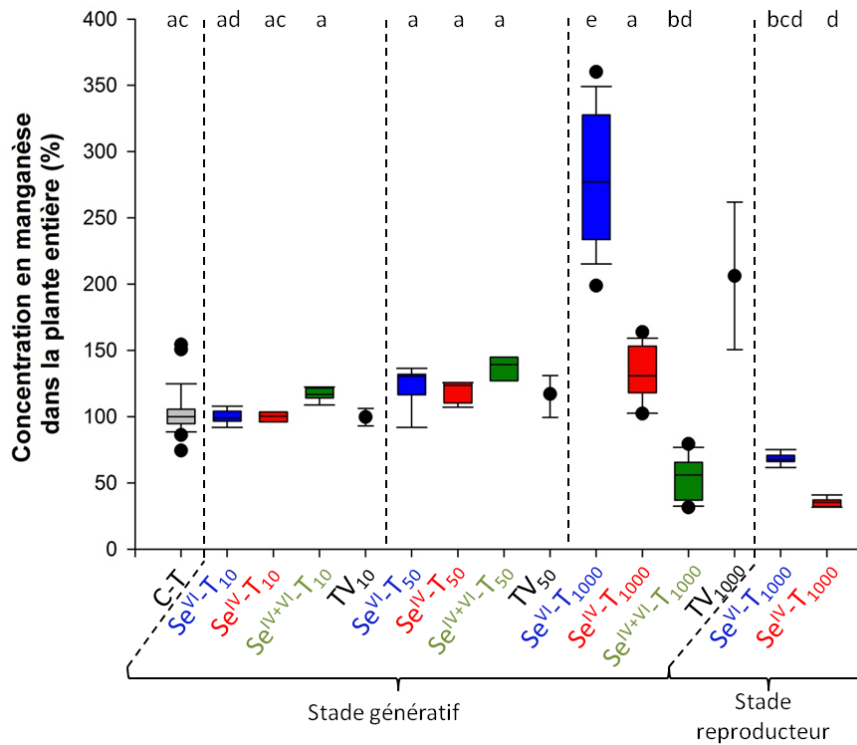
## 5. EFFET DU SELENIUM SUR LE MANGANESE

### 5.1. Résultats

#### 5.1.1. *Expérimentations au stade génératif*

##### 5.1.1.1. *Effet du séléniate ou du sélénite*

Dans le cas des deux traitements à faible concentration (10 et 50 µg/L), aucune différence sur l'accumulation du manganèse dans l'ensemble des organes des plantes traitées sans sélénium, avec séléniate et avec sélénite n'est observée (Fig 4.13, 4.14). Par contre, à forte concentration, la concentration en manganèse dans les PE cultivées en présence de séléniate est plus élevée que celles des plantes témoins ou cultivées avec du sélénite, (respectivement plus 177 % et 113 % (Fig 4.13) ; et contrairement au Se<sup>IV</sup>-T<sub>1000</sub> où l'accumulation du manganèse dans les PE est identique au témoin (Fig 4.13).

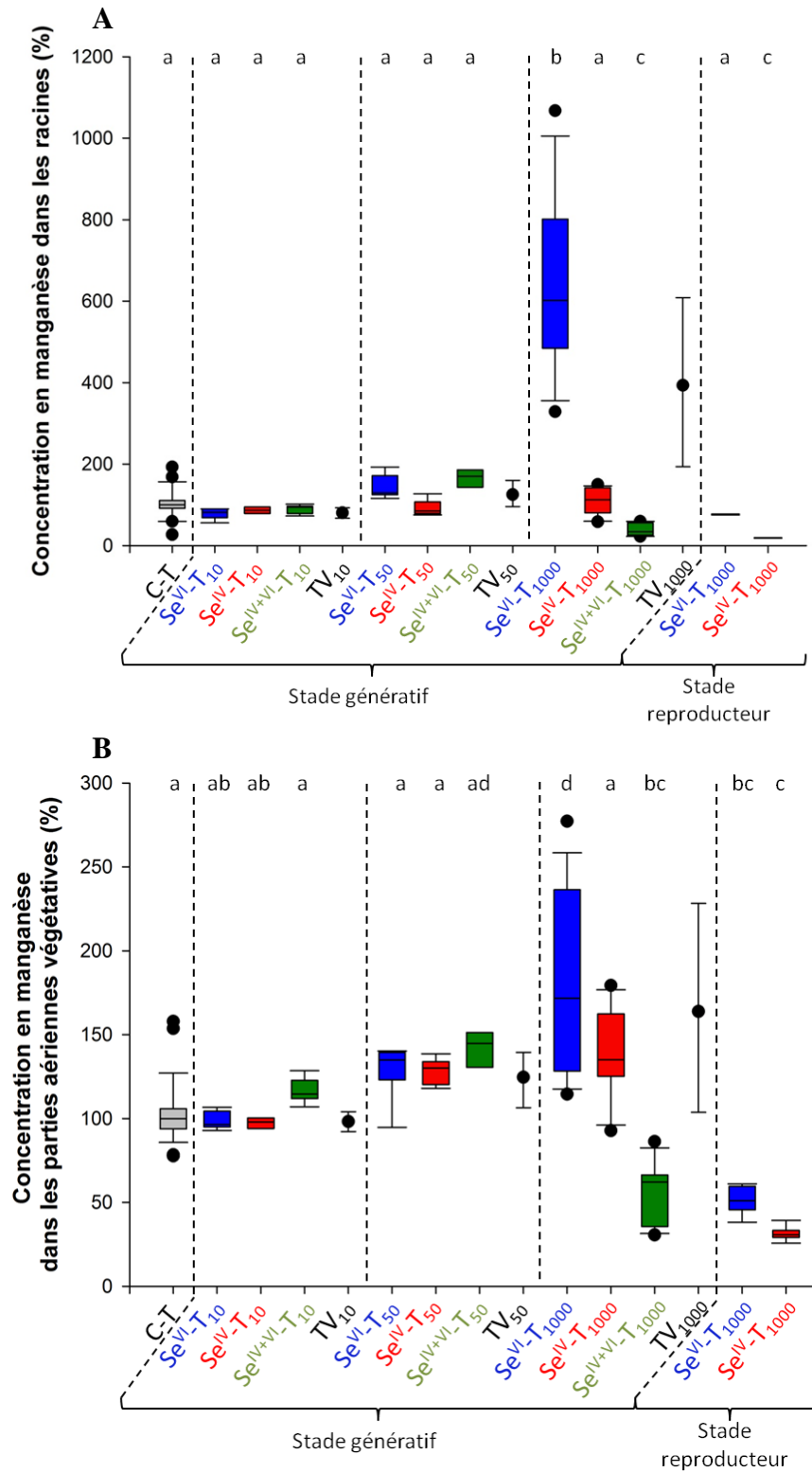


**Figure 4.13.** Accumulation du manganèse (en %) dans la plante entière en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante : C-T (en gris) ;  $Se^{VI}$ -T (en bleu) ;  $Se^{IV}$ -T (en rouge) ;  $Se^{IV+VI}$ -T (en vert) ; TV (point noir). a, b, c, d et e : résultats du test de Kruskal and Wallis

Pour les racines, tout comme pour les PE, la présence de séléniate à 1000  $\mu\text{g/L}$  provoque une forte augmentation de l'accumulation du manganèse par rapport aux racines témoins (plus 500 %) et aux racines traitées à forte concentration en sélénite, bien que les concentrations dans ces deux dernières soient similaires (Fig 4.14.A).

La concentration en manganèse dans les PA peut se décrire par la relation suivante :  $C-T < Se^{IV}-T_{1000} < Se^{VI}-T_{1000}$ . Les PA traitées au séléniate à 1000  $\mu\text{g/L}$  ont une concentration 71 % plus élevée que celle des PA témoins et 21 % plus élevée que celle des PA traitées au sélénite à 1000  $\mu\text{g/L}$ , elle-même supérieure de 35 % à celle des PA témoins.

Etant donné que le sélénite, indépendamment de sa concentration, ne modifie pas la concentration en manganèse dans l'ensemble des plantes, les facteurs de translocation « R/PA » sont similaires (Tableau 4.9). Il en est de même pour ceux des deux traitements au séléniate à faible concentration. Mais, pour le traitement à forte concentration en séléniate ce facteur est nettement inférieur à celui du C-T (Tableau 4.9).



**Figure 4.14.** Accumulation du manganèse (en %) dans les racines (A) ou les parties aériennes végétatives (B) en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante : C-T (en gris) ; Se<sup>VI</sup>-T (en bleu) ; Se<sup>IV</sup>-T (en rouge) ; Se<sup>IV+VI</sup>-T (en vert) ; TV (point noir). a, b, c et d : résultats du test de Kruskal and Wallis

Traitements	FT « R/PA »
C-T	1.46 <sup>a</sup> (1.04 ; 1.77)
Se <sup>VI</sup> -T <sub>10</sub>	1.82 <sup>a</sup> (1.50 ; 1.98)
Se <sup>IV</sup> -T <sub>10</sub>	1.56 <sup>a</sup> (1.49 ; 1.65)
Se <sup>IV+VI</sup> -T <sub>10</sub>	1.78 <sup>a</sup> (1.66 ; 1.84)
Se <sup>VI</sup> -T <sub>50</sub>	1.29 <sup>ab</sup> (1.28 ; 1.61)
Se <sup>IV</sup> -T <sub>50</sub>	2.34 <sup>a</sup> (2.07 ; 2.53)
Se <sup>IV+VI</sup> -T <sub>50</sub>	1.40 <sup>a</sup> (1.19 ; 1.60)
Se <sup>VI</sup> -T <sub>1000</sub>	0.34 <sup>b</sup> (0.27 ; 0.38)
Se <sup>IV</sup> -T <sub>1000</sub>	1.46 <sup>a</sup> (0.98 ; 2.00)
Se <sup>IV+VI</sup> -T <sub>1000</sub>	1.22 <sup>ab</sup> (1.07 ; 2.07)

**Tableau 4.9.** Facteurs de translocation « racines/parties aériennes » (FT « R/PA ») du manganèse en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante. a et b : résultats du test de Kruskal and Wallis

#### 5.1.1.2. Effet d'un mélange séléniate/sélénite

A faibles concentrations en sélénium (10 et 50 µg/L), les concentrations en manganèse dans les différents organes des plantes traitées avec un mélange de sélénium sont similaires à celles des plantes du C-T, du Se<sup>IV</sup>-T, du Se<sup>VI</sup>-T et du TV (Fig 4.13, 4.14).

A 1000 µg/L, l'accumulation du manganèse dans l'ensemble des plantes traitées avec un mélange de sélénium est nettement inférieure à celle des trois autres traitements (C-T, Se<sup>VI</sup>-T<sub>1000</sub> et Se<sup>IV</sup>-T<sub>1000</sub>) et à la TV<sub>1000</sub>.

Malgré toutes les modifications de l'accumulation du manganèse en présence d'un mélange de séléniate/sélénite, les facteurs de translocation ne sont pas différents de celui du C-T (Tableau 4.9).

### 5.1.2. Expérimentation au stade reproducteur

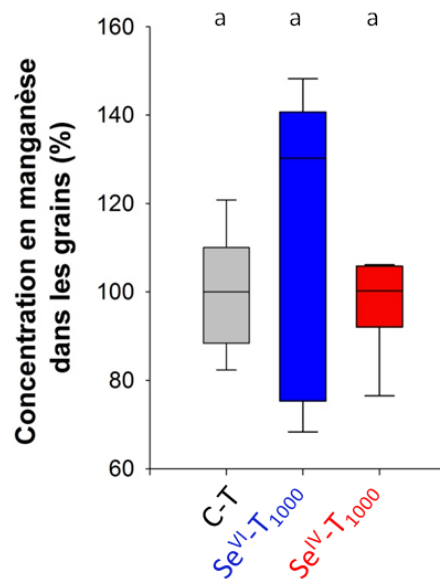
#### 5.1.2.1. Effet du séléniate ou du sélénite

En présence de séléniate, la concentration en manganèse dans les PE matures est similaire à celle des plantes témoins mais elle est inférieure de 68 % en présence de sélénite (Fig 4.13). Il en est de même au niveau des racines matures : celles cultivées avec du sélénite ont accumulé 81 % et 75 % moins de manganèse que celles témoins ou cultivées avec du séléniate, respectivement (Fig 4.14.A). Que la forme du sélénium source soit du séléniate ou

du sélénite, l'accumulation du manganèse dans les PA est respectivement 49 % et 69 % plus faible que celle des PA témoins (Fig 4.14.B).

Le facteur de translocation du  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}_{1000}$  est similaire à celui du C-T, alors que pour le  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$  le facteur est plus élevé (Tableau 4.10)

Les concentrations en manganèse dans les grains sont similaires dans les trois traitements (C-T,  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}_{1000}$  et  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$ ) (Fig 4.15). Néanmoins, les facteurs de translocation peuvent être décrits par la relation suivante :  $\text{C-T} < \text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}_{1000} < \text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$  (Tableau 4.10).



**Figure 4.15.** Accumulation du manganèse (en %) dans les grains en fonction de la forme du sélénium : C-T (en gris) ;  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}$  (en bleu) ;  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}$  (en rouge). a : résultats du test de Kruskal and Wallis

Traitements	FT « R/PA »	FT « PAV/G »
C-T	0,20 <sup>a</sup> (0,20 ; 0,21)	0,08 <sup>a'</sup> (0,07 ; 0,09)
$\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}_{1000}$	0,17 <sup>a</sup> (0,16 ; 0,20)	0,16 <sup>b'</sup> (0,10 ; 0,23)
$\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$	0,42 <sup>b</sup> (0,41 ; 0,45)	0,23 <sup>c'</sup> (0,22 ; 0,25)

**Tableau 4.10.** Facteurs de translocation « racines/parties aériennes » (FT « R/PA ») et « parties aériennes végétatives/grains » (FT « PAV/G ») du manganèse en fonction de la forme du sélénium source. a, b, a', b' et c': résultats des tests de Kruskal and Wallis



5.1.2.2. *Comparaison stade génétatif/stade reproducteur*

Quelles que soit les formes du sélénium source et les organes des plantes, tous les facteurs « SR/SG » sont inférieurs à 1. Pour respectivement le  $\text{Se}^{\text{VI}}\text{-T}_{1000}$  et le  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$ , ce facteur est de 0,24 et 0,27 dans les PE, de 0,13 et 0,17 dans les racines ainsi que de 0,30 et 0,23 dans les PAV.

**5.2. Discussion**

A faible concentration en solution nutritive, le séléniate ne provoque aucun effet sur l'accumulation du manganèse dans l'ensemble des organes des plantes au stade génétatif. Au contraire à concentration élevée en séléniate (1000  $\mu\text{g/L}$ ), une forte augmentation de l'accumulation du manganèse dans les plantes entières et donc de l'absorption racinaire est observée. Cette augmentation se traduit donc par un accroissement de la concentration en manganèse dans les racines ainsi que dans les parties aériennes. Néanmoins, cette augmentation est plus prononcée dans les racines : en effet, le transfert du manganèse vers les parties aériennes diminue lors du traitement avec du séléniate à 1000  $\mu\text{g/L}$ .

Au stade reproducteur, contrairement au stade génétatif, l'accumulation du manganèse dans les plantes entières ne subit pas de modification. Cette différence d'absorption de manganèse entre les deux stades de développement de la plante est associée à la concentration en séléniate dans les racines, plus faible au stade reproducteur (chapitre 3). Toutefois, l'inhibition du transfert de manganèse vers les parties aériennes est observée, entraînant une diminution de la concentration en manganèse dans les parties aériennes végétatives. Deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer l'inhibition du transfert de manganèse vers les parties aériennes : (i) tout comme le zinc, dans le cas des plantes cultivées jusqu'au stade génétatif, la concentration en manganèse dans les parties aériennes devient trop importante, son transfert est donc minimisé et l'absorption racinaire ne diminuant pas, le manganèse en « excès » est stocké dans les racines. Cette hypothèse n'est cependant pas applicable au stade reproduction puisque la concentration en manganèse est plus faible que les plantes témoins, d'où la seconde hypothèse : (ii) l'inhibition du transfert de manganèse est toujours présente dans un traitement au séléniate à haute concentration indépendamment du stade de développement de la plante ; néanmoins, au stade génétatif l'absorption racinaire étant plus importante qu'au stade reproducteur, la concentration en manganèse dans les parties aériennes ne diminue pas, voire comme dans notre cas elle augmente.

#### Chapitre 4 : Le sélénium influence-t-il l'accumulation de cations essentiels à la plante ?

Au stade génératif des plantes, le sélénite à basse concentration n'affecte pas l'accumulation du manganèse dans la plante, tout comme le séléniate. A concentration plus élevée en sélénite, aucune modification de la concentration en manganèse dans les plantes entières et dans les racines n'est observée contrairement au traitement effectué avec du séléniate. Seule l'augmentation de l'accumulation du manganèse dans les parties aériennes est identique pour deux traitements (séléniate et sélénite); elle est cependant moins prononcée en présence sélénite. Cette différence est probablement due à la variation de concentration en sélénium dans les parties aériennes entre les deux traitements : l'accumulation du sélénium dans cet organe est plus élevée en présence de séléniate à haute concentration que de sélénite (chapitre 3).

Au stade reproducteur, une forte inhibition de l'accumulation du manganèse dans les plantes entières est due à la présence de sélénite à haute concentration dans le milieu nutritif. Cette diminution est visible aussi bien dans les racines que dans les parties aériennes végétatives des plantes matures, bien qu'elle soit plus importante au niveau des racines. Cette baisse de l'absorption racinaire du manganèse est liée à l'augmentation de sélénium dans les racines matures par rapport aux racines jeunes traitées toutes deux avec du sélénite à forte concentration (chapitre 3). Toutefois, le manganèse étant un micronutriment essentiel à la photosynthèse (constituant du photosystème II de la chaîne de transfert des électrons), son facteur de transfert vers les parties aériennes augmente, sans pour autant compenser le manque de manganèse.

En présence de concentration en manganèse trop élevée, la plante peut développer de multiples symptômes dont, entre autres, un brunissement des feuilles et une diminution de l'absorption du calcium, magnésium et fer. La concentration toxique critique en manganèse pour les parties aériennes du *Zea mays* est de 200 µg/g (Marschner 1995). Malgré le fait que la concentration en manganèse dans les parties aériennes traitées avec 1000 µg/L de séléniate atteint une valeur de 202 µg/g (173 ; 233), aucun de ces symptômes n'a été mis en évidence dans notre expérimentation.

Au contraire, une déficience en manganèse dans les parties aériennes entraîne une diminution de la photosynthèse nette sans modification du taux de transpiration et respiration. Malgré les diminutions de manganèse dans les parties aériennes végétatives de plantes matures, la concentration en manganèse n'est jamais similaire à la concentration minimale critique (10 à 20 µg/g) (Marschner 1995).

En ce qui concerne les grains formés, ils présentent la même concentration en manganèse indépendamment du traitement effectué : sans sélénium, avec séléniate ou avec sélénite. Dans

les deux traitements au sélénium, ceci est le résultat d'une augmentation du transfert de manganèse des parties aériennes déficientes en ce micro-élément aux grains.

Pout finir, lors du traitement avec mélange de sélénium à forte concentration uniquement, une co-interaction négative vis-à-vis de l'accumulation du manganèse dans l'ensemble des organes des plantes est observée.

## 6. EFFET DU SELENIUM SUR LE CUIVRE

### 6.1. Résultats

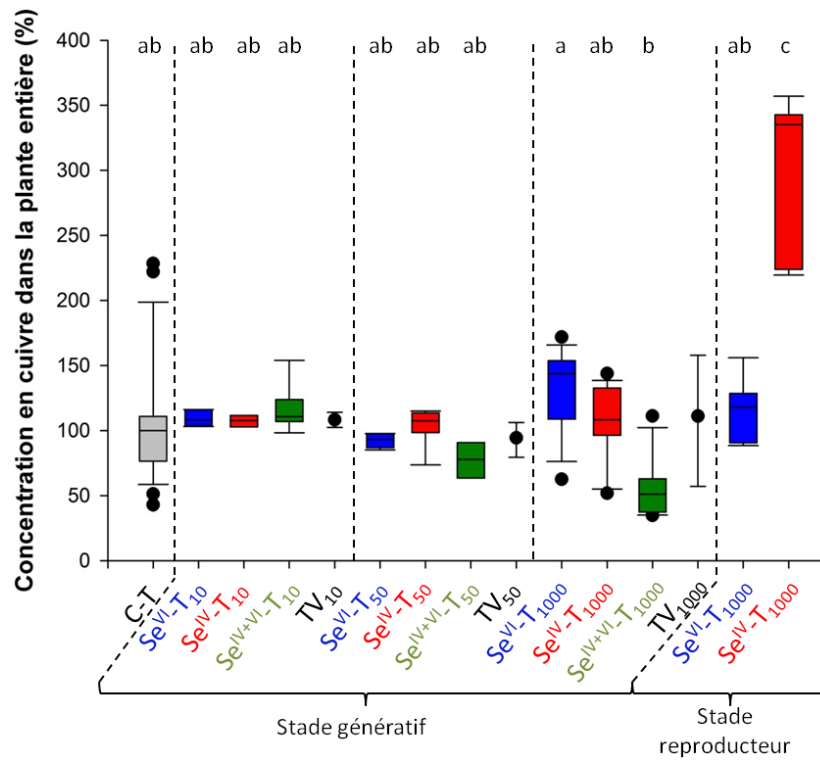
#### 6.1.1. *Expérimentations au stade génératif*

##### 6.1.1.1. *Effet du séléniate ou du sélénite*

Quelle que soit la forme unique du sélénium dans le milieu (séléniate ou sélénite), la concentration en sélénium source et les organes des plantes, les concentrations en cuivre sont similaires entre les différents traitements et au C-T (Fig 4.16, 4.17). De même, les deux formes du sélénium testées ainsi que leur concentration dans le milieu nutritif ne modifient pas le facteur de translocation des racines vers les PA comparé à celui du C-T (Tableau 4.11).

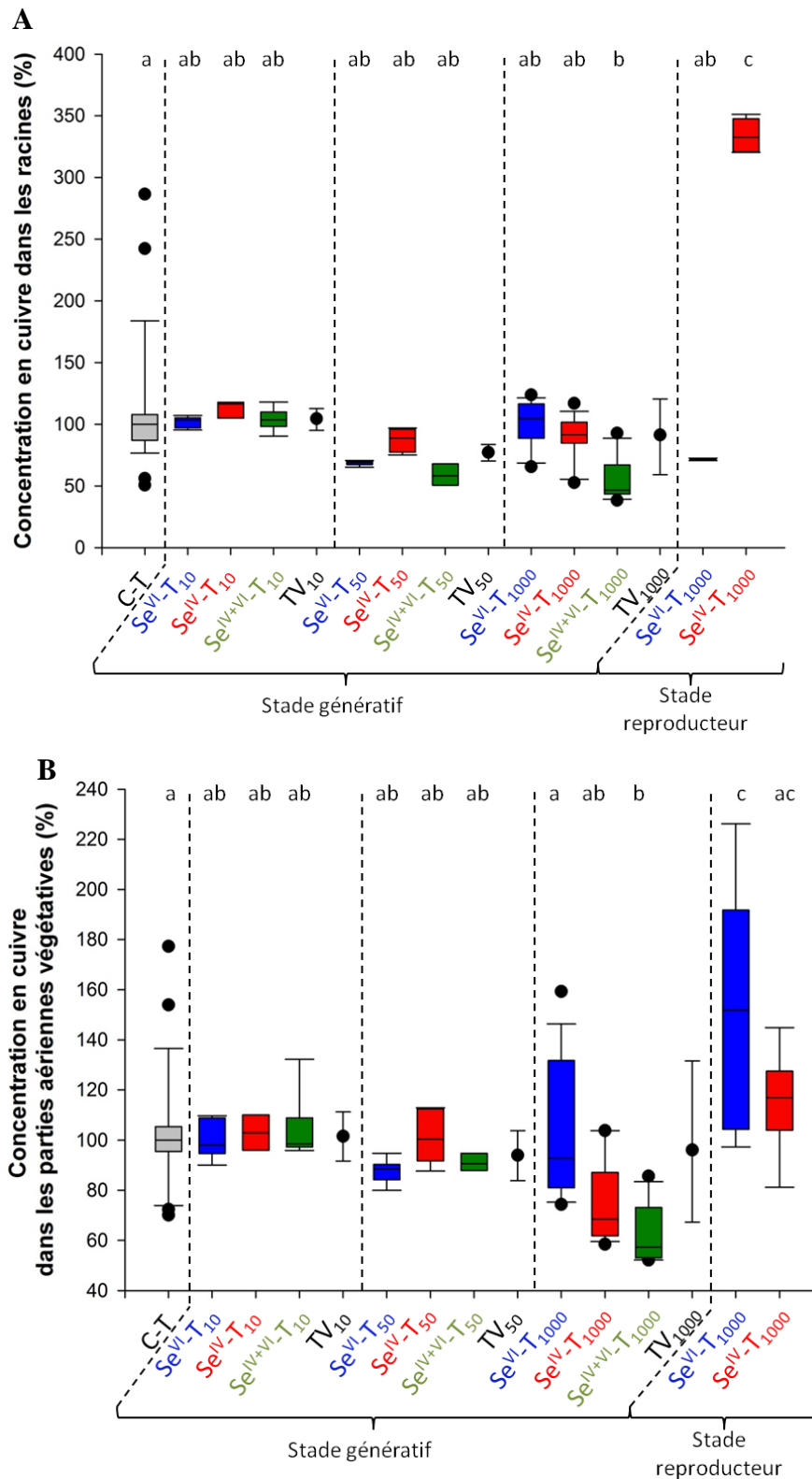
Traitements	FT « R/PA »
C-T	0.040 <sup>a</sup> (0.028 ; 0.051)
Se <sup>VI</sup> -T <sub>10</sub>	0.025 <sup>a</sup> (0.025 ; 0.028)
Se <sup>IV</sup> -T <sub>10</sub>	0.024 <sup>a</sup> (0.022 ; 0.026)
Se <sup>IV+VI</sup> -T <sub>10</sub>	0.025 <sup>a</sup> (0.024 ; 0.027)
Se <sup>VI</sup> -T <sub>50</sub>	0.047 <sup>a</sup> (0.044 ; 0.049)
Se <sup>IV</sup> -T <sub>50</sub>	0.041 <sup>a</sup> (0.041 ; 0.042)
Se <sup>IV+VI</sup> -T <sub>50</sub>	0.056 <sup>ab</sup> (0.051 ; 0.062)
Se <sup>VI</sup> -T <sub>1000</sub>	0.055 <sup>ab</sup> (0.046 ; 0.065)
Se <sup>IV</sup> -T <sub>1000</sub>	0.042 <sup>ab</sup> (0.037 ; 0.064)
Se <sup>IV+VI</sup> -T <sub>1000</sub>	0.064 <sup>b</sup> (0.061 ; 0.073)

**Tableau 4.11.** Facteurs de translocation « racines/parties aériennes » (FT « R/PA ») du cuivre en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante. a et b : résultats du test de Kruskal and Wallis



**Figure 4.16.** Accumulation du cuivre (en %) dans la plante entière en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante : C-T (en gris) ; Se<sup>VI</sup>-T (en bleu) ; Se<sup>IV</sup>-T (en rouge) ; Se<sup>IV+VI</sup>-T (en vert) ; TV (point noir). a, b et c : résultats du test de Kruskal and Wallis

Chapitre 4 : Le sélénium influence-t-il l'accumulation de cations essentiels à la plante ?



**Figure 4.17.** Accumulation du cuivre (en %) dans les racines (A) ou les parties aériennes végétatives (B) en fonction de la concentration en sélénium, de la forme du sélénium source et du stade de développement de la plante : C-T (en gris) ;  $Se^{VI}$ -T (en bleu) ;  $Se^{IV}$ -T (en rouge) ;  $Se^{IV+VI}$ -T (en vert) ; TV (point noir). a, b, c et d : résultats du test de Kruskal and Wallis

## Chapitre 4 : Le sélénium influence-t-il l'accumulation de cations essentiels à la plante ?

### 6.1.1.2. *Effet d'un mélange séléniate/sélénite*

Lors des traitements à faibles concentrations en sélénium (10 et 50 µg/L), les concentrations en cuivre dans les différents organes des plantes traitées avec un mélange de sélénium sont similaires à celles des plantes du C-T, du Se<sup>IV</sup>-T, du Se<sup>VI</sup>-T et du TV (Fig 4.16, 4.17).

A 1000 µg/L, l'accumulation du cuivre dans l'ensemble des plantes traitées avec un mélange de sélénium est similaire à celle du Se<sup>IV</sup>-T<sub>1000</sub> et à la TV<sub>1000</sub> (Fig 4.16, 4.17). Cependant, la concentration en cuivre dans les PE du Se<sup>IV+VI</sup>-T<sub>1000</sub> est inférieure de 64 % à celles des plantes traitées avec du séléniate (Fig 4.16). Dans les racines, elle est plus faible que les racines témoins (-53 %) (Fig 4.17.A). Pour finir dans les PA, elle est inférieure à celle des plantes témoins et traitées au séléniate, avec respectivement moins 43 % et 38 % (Fig 4.17.B).

Les facteurs de translocation des traitements avec un mélange de sélénium à faible concentration sont identiques à celui du C-T. Mais le facteur du Se<sup>IV+VI</sup>-T<sub>1000</sub> est plus élevé que celui du témoin (Tableau 4.11).

### 6.1.2. *Expérimentations au stade reproducteur*

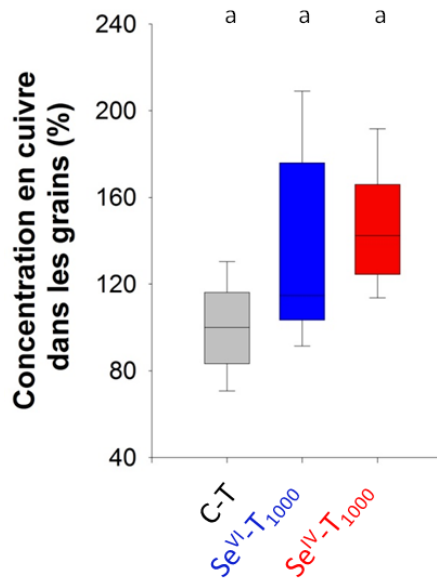
#### 6.1.2.1. *Effet du séléniate ou du sélénite*

Au stade reproducteur, la présence de sélénite dans le milieu de culture provoque une forte augmentation de l'accumulation du cuivre dans les PE ainsi que dans les racines par rapport aux plantes témoins et traitées au séléniate : elle est de 235 % dans les PE et de 184 % dans les racines en comparaison aux plantes témoins ainsi que de 133 % dans les PE et de 363 % dans les racines en comparaison aux plantes du Se<sup>VI</sup>-T<sub>1000</sub> (Fig 4.16, 4.17.A). Au contraire, le séléniate n'entraîne aucune modification d'accumulation du cuivre dans l'ensemble des plantes par rapport au C-T (Fig 4.16, 4.17).

Paradoxalement, les PAV traitées au sélénite possèdent une concentration en cuivre identique à celles témoins et traitées au séléniate. Ces dernières accumulent 52 % de plus que les PAV témoins.

Le facteur de translocation des racines vers les PA dépend de la forme du sélénium source : dans le cas du Se<sup>VI</sup>-T<sub>1000</sub> il est supérieur à celui du C-T alors que dans le cas du Se<sup>IV</sup>-T<sub>1000</sub> il est plus faible que le C-T (Tableau 4.12).

Les concentrations en cuivre dans les grains ainsi que les facteurs de translocation « PAV/G » sont similaires dans les trois traitements au stade reproducteur (Fig 4.18, Tableau 4.12).



**Figure 4.18.** Accumulation du cuivre (en %) dans les grains en fonction de la forme du sélénium : C-T (en gris) ; Se<sup>VI</sup>-T (en bleu) ; Se<sup>IV</sup>-T (en rouge). a : résultats du test de Kruskal and Wallis

Traitements	FT « R/PA »	FT « PAV/G »
C-T	0,12 <sup>a</sup> (0,11 ; 0,13)	0,24 <sup>a</sup> (0,23 ; 0,39)
Se <sup>VI</sup> -T <sub>1000</sub>	0,32 <sup>b</sup> (0,22 ; 0,33)	0,30 <sup>a</sup> (0,16 ; 0,38)
Se <sup>IV</sup> -T <sub>1000</sub>	0,05 <sup>c</sup> (0,05 ; 0,06)	0,30 <sup>a</sup> (0,29 ; 0,47)

**Tableau 4.12.** Facteurs de translocation « racines/parties aériennes » (FT « R/PA ») et « parties aériennes végétatives/grains » (FT « PAV/G ») du cuivre en fonction de la forme du sélénium source. a, b, c et a' : résultats des tests de Kruskal and Wallis

#### 6.1.2.2. Comparaison stade génétatif/stade reproducteur

L'effet du stade de développement sur l'accumulation du cuivre dans les PE ainsi que dans les racines est identique : pas d'influence en présence de séléniate en comparaison au C-T alors que le facteur « SR/SG » du Se<sup>IV</sup>-T<sub>1000</sub> est supérieur à 1, soit en moyenne 3,4 dans les PE et dans les racines.

Pour finir, dans les PAV seul le séléniate modifie l'accumulation du cuivre : le facteur « SR/SG » du Se<sup>VI</sup>-T<sub>1000</sub> est de 1,6.

## **6.2. Discussion**

Pour les plantes cultivées jusqu'au stade génératif, la présence de séléniate ou de sélénite dans le milieu nutritif ne provoque aucune modification de l'accumulation du cuivre indépendamment du type d'organes et de la concentration en sélénium en solution.

Au contraire, au stade reproducteur le sélénium influence la concentration en cuivre dans l'ensemble de la plante, différemment selon la forme du sélénium dans la solution nutritive. En présence de séléniate, la concentration en cuivre dans les parties aériennes végétatives est plus importante ; ceci est dû à une augmentation de sa translocation.

En présence de sélénite, l'accumulation du cuivre dans les plantes entières ainsi que dans les racines augmente. Néanmoins, cet accroissement n'est pas observé dans les parties aériennes végétatives : l'importante augmentation de l'absorption racinaire du cuivre en présence de sélénite est associée à une inhibition du transfert de cet élément vers les parties aériennes végétatives. Une trop forte concentration en cuivre dans les parties aériennes (la concentration toxique critique est d'environ 20-30  $\mu\text{g/g}$  (Robson and Reuter 1981) provoque une diminution de la croissance des racines et des parties aériennes, une augmentation de la peroxidase des lipides membranaires et peut ainsi entraîner une destructuration membranaire (Gutteridge and Wilkins 1983, Marschner 1995). Lors d'expérimentations réalisées avec un apport important en cuivre, la teneur en cuivre dans les racines augmente proportionnellement à la concentration en cuivre dans le milieu extérieur alors que le transfert vers les parties aériennes est fortement minimisé (Lexmond and Van der Vorm 1981). Il peut donc s'effectuer une régulation du transfert du cuivre intra-plante afin de contrôler la concentration en cuivre dans les parties aériennes, comme cela est le cas dans le traitement sélénite.

En ce qui concerne les grains de maïs, leur concentration en cuivre ainsi que le facteur de translocation vers les grains de cet élément sont indépendants du traitement effectué.

Pour finir, le mélange de sélénium au stade génératif des plantes ne modifie pas l'accumulation du cuivre dans les plantes entières. Toutefois, les racines et les parties aériennes accumulent moins de cuivre : il existe donc une co-interaction négative entre les deux formes du sélénium sur l'accumulation du cuivre dans les organes des plantes. Cette inhibition de l'accumulation du cuivre est moins importante pour les parties aériennes. En effet, le transfert en cuivre des racines vers les parties aériennes augmente afin de limiter la diminution en cuivre dans les organes chlorophylliens. Une déficience en cuivre, observée aux alentours de 1 à 5  $\mu\text{g/g}$  (Robson and Reuter 1981), provoque une diminution de la lignification et donc un mauvais transport de la sève brute. Cette limite n'est cependant jamais



atteinte quelle que soit l'expérimentation réalisée. L'effet d'un mélange de sélénium source sur l'accumulation du cuivre dans les plantes n'est donc pas la somme des effets des deux formes seules dans la solution nutritive.

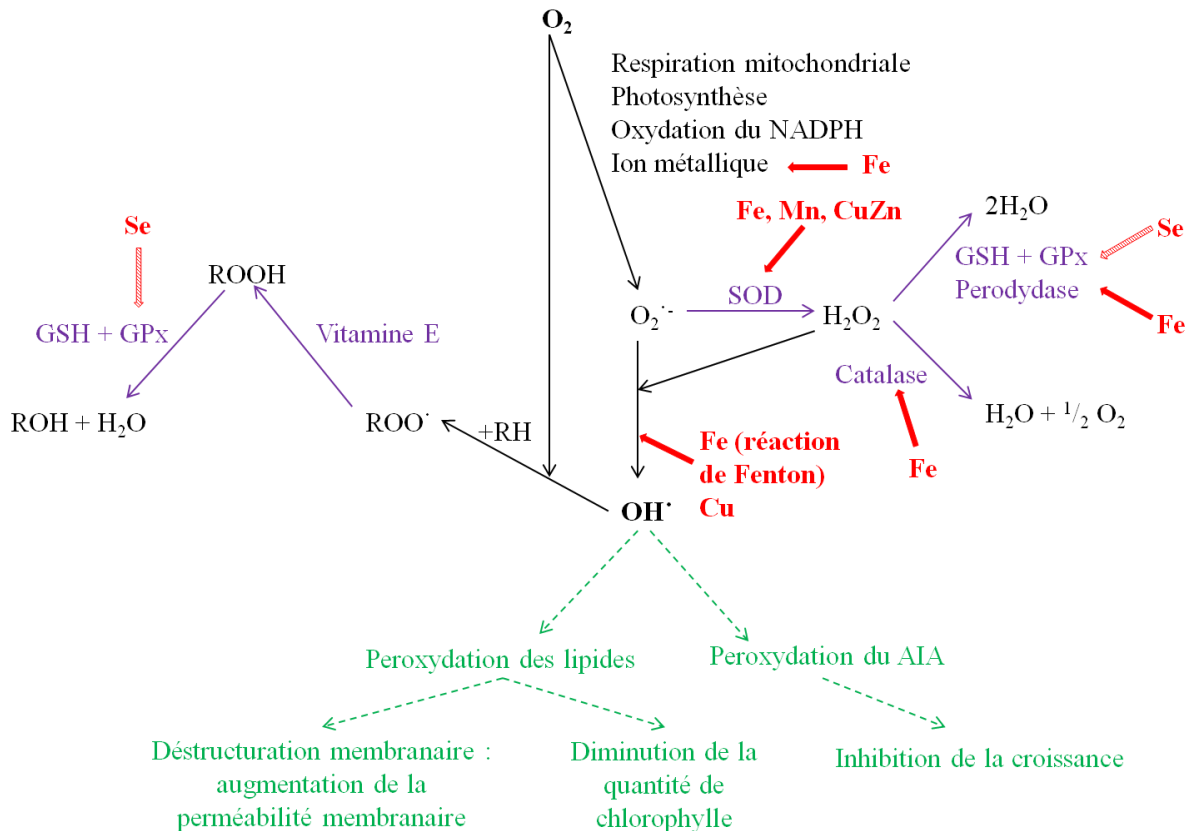
## **7. INFLUENCE DU SELENIUM SUR L'ACCUMULATION DE CATIONS ESSENTELS A LA PLANTE : CONCLUSIONS**

Le métabolisme d'une cellule végétale produit des espèces oxygénées réactives comme les superoxydes ( $O_2^{\cdot -}$ ), hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) ou des peroxydes d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), principalement lors de la photosynthèse (dans les chloroplastes) et de la respiration (dans les mitochondries). Ils provoquent une augmentation de la peroxydation des lipides, de l'oxydation des groupements thiols (-SH) et de l'acide indole 3-acétique (hormone de croissance). Ainsi l'ensemble du métabolisme de la plante est affecté, ce qui peut se traduire par une déstructuration de la membrane plasmique entraînant une augmentation de sa perméabilité, une diminution de la photosynthèse, une diminution voir l'arrêt de l'activité des enzymes groupements thiols dépendantes et une diminution de la croissance.

De multiples voies de détoxification de ces espèces oxygénées réactives existent au sein d'une cellule (Fig 4.19) : SOD, la catalase, les peroxydases, la vitamine E et bien sûr le glutathion.

La régulation des espèces oxygénées réactives est donc assurée par des enzymes antioxydantes ou des réactions d'oxydoréduction dépendantes de micronutriments : fer, zinc, manganèse, cuivre (Fig 4.19).

Le sélénium, via le pouvoir antioxydant de la glutathion peroxydase ( $GP_x$ ), participe également à la protection des cellules contre les peroxydes. D'après Hartikainen *et al.* (2000) et Xue *et al.* (2001), lorsque les plantes sont cultivées sur un sol légèrement enrichi en sélénium (à 0,1  $\mu g$  de séléniate par gramme de sol pour la laitue (Xue et al. 2001) et inférieur à 1  $\mu g/g$  pour le ray-grass (Hartikainen et al. 2000), la teneur en  $GP_x$  augmente alors que (i) celle de la SOD demeure inchangée voire décroît et que (ii) la peroxydation des lipides diminue. De plus, Hartikainen *et al.* (2000) a mis en évidence une corrélation positive ( $r = 0,99$ ,  $n=7$ ,  $p < 0,01$ ) entre la concentration en sélénium et l'activité de la  $GP_x$  chez le ray-grass.



**Figure 4.19.** Processus de production d'espèces oxygénées réactives et systèmes de détoxification : importance des micronutriments et du sélénium

- Réaction de formation d'espèces oxygénées réactives
- Réaction de détoxification d'espèces oxygénées réactives
- Réaction dépendante de
- - -→ Réaction favorisée par le sélénium
- - -→ Conséquences sur le métabolisme de la plante

Cependant, à plus forte concentration en séléniate soit à 1  $\mu\text{g/g}$  pour la laitue (Xue et al. 2001) et supérieure à 10  $\mu\text{g/g}$  pour le ray-grass (Hartikainen et al. 2000), la biomasse des plantes diminue et une augmentation anormale de la GPx et de la SOD ainsi qu'une augmentation de la peroxydation des lipides sont observées : les plantes sont soumises à un stress oxydatif. Le sélénium a un rôle ambivalent selon sa concentration : à faible concentration il a un caractère antioxydant alors qu'à forte concentration, le sélénium se révèle être plutôt pro-oxydant. Le rôle de la spéciation du sélénium source sur cette ambivalence reste très peu étudié : Hartikainen *et al.* (2000) et Xue *et al.* (2001) ont utilisé le séléniate comme source de sélénium et seule une étude sur des algues (Yokota et al. 1988) a montré une relation entre l'activité de la GPx et la concentration en sélénite.

## Chapitre 4 : Le sélénium influence-t-il l'accumulation de cations essentiels à la plante ?

Comme nous l'avons vu dans ce chapitre, le sélénium modifie l'accumulation des cations essentiels (différemment selon le cation), en fonction de sa forme et sa concentration ainsi que du stade de développement de la plante.

Le séléniate et le sélénite à forte concentration exclusivement provoquent une augmentation de l'accumulation du calcium et du magnésium, principalement dans les racines. Le calcium intervient dans le contrôle de l'osmorégulation et la balance anions-cations alors que le magnésium participe à la réduction des deux oxy-anions du sélénium. Ces deux éléments interviennent également dans le maintien de l'intégrité membranaire des tissus (Benson 1964, Tuna et al. 2007). Une forte augmentation conjointe de leurs concentrations peut également être un signe de dommage de l'intégrité membranaire résultant d'un stress oxydatif, ici dû à la forte concentration en sélénium. Ceci serait en accord avec le caractère pro-oxydant d'une forte concentration en sélénium (Feng et al. 2009, Hartikainen et al. 2000, Xue et al. 2001).

De plus, des effets directs ou indirects du sélénium sur l'accumulation des micronutriments comme le fer, zinc, manganèse et cuivre peuvent être associés soit au caractère antioxydant soit au caractère pro-oxydant du sélénium. En effet, une légère augmentation de zinc ou une modification de la concentration en fer améliore le système de détoxification des espèces oxygénées réactives (Fig 4.19) alors qu'une diminution de zinc, de manganèse, une trop forte concentration en cuivre ou une modification de la concentration en fer provoquent une diminution de la détoxification des espèces oxygénées réactives (Fig 4.19) entraînant des désordres métaboliques. Des conséquences de ce dérèglement oxydatif sont visibles lors des traitements à forte concentration en sélénite avec une diminution de la production de biomasse aérienne des tiges, des feuilles et également des grains. Cette étude a donc mis en évidence que le caractère pro-oxydant du sélénium lors de forte concentration est lié à des effets directs ou non sur l'accumulation des éléments, dérégulant ainsi l'équilibre oxydatif des cellules et perturbant ainsi le système de détoxification des espèces oxygénées réactives des cellules végétales.

D'autre part, les facteurs de transfert des racines vers les parties aériennes varient en présence de sélénium. Deux modifications métaboliques peuvent être mises en cause : (i) une influence directe du sélénium qui entraîne une sous-ou sur-accumulation dans les parties aériennes néfaste pour la plante ou (ii) une influence indirecte du sélénium qui engendre une diminution ou augmentation de l'accumulation de l'élément dans les racines, atténuée ou annulée dans les parties aériennes par la variation du facteur de transfert. Dans ce dernier phénomène la variation du transfert de l'élément vise à maintenir une concentration optimale

#### Chapitre 4 : Le sélénium influence-t-il l'accumulation de cations essentiels à la plante ?

du métabolisme cellulaire, intense dans les parties chlorophylliennes de la plante. Ce phénomène est encore plus visible au niveau du transfert vers les grains. Quelle que soit la concentration de l'élément dans les parties aériennes végétatives, la régulation du transfert des éléments vers les grains permet d'atteindre (ou d'approcher dans le cas du magnésium lors du traitement avec du sélénite à 1000 µg/L) une concentration similaire aux plants non soumis à un stress sélénié. Ainsi, indépendamment du stress subi par la plante, la semence produite est de bonne qualité en ce qui concerne les cations considérés dans cette étude.

Pour finir, indépendamment de l'effet du séléniate ou du sélénite seul sur l'accumulation des cations, un mélange de séléniate/sélénite dans le milieu de culture des plantes provoque une diminution globale de l'accumulation des cations (or le cas du fer), toutefois sans nuire à la bonne production végétale. Pour une plante au stade génératif, la qualité nutritionnelle en présence d'un mélange des deux formes oxydées du sélénium est minimisée. Ce mélange permet néanmoins de maintenir une bonne croissance végétale malgré une absorption moindre des cations essentiels.

Pour conclure, le métabolisme d'une plante, sa régulation ainsi que la relation entre ses différents éléments nutritionnels sont très complexes et malgré de nombreuses études ne sont pas encore complètement connus. Ainsi, sur la base de ces premières hypothèses concernant l'influence du sélénium sur le métabolisme des cations essentiels, des études plus approfondies et plus ciblées seront nécessaires afin d'améliorer la compréhension des mécanismes d'interaction. Cette étude a toutefois mis en évidence pour la première fois l'influence du séléniate et du sélénite sur l'accumulation des cations essentiels à la croissance de la plante.

## Chapitre 4 : Le sélénium influence-t-il l'accumulation de cations essentiels à la plante ?

# CONCLUSION GENERALE DE L'ETUDE

## 1. SYNTHÈSE

Cette étude s'inscrit dans une problématique actuelle concernant le sélénium : il s'agit d'identifier les facteurs contrôlant le transfert du sélénium dans des plantes destinées à l'alimentation animale et/ou humaine ainsi que de déterminer et de quantifier les modifications métaboliques liées. En effet, le sélénium est un élément essentiel au métabolisme des mammifères mais avec une gamme de concentrations entre carence et toxicité particulièrement étroite. La quantification ainsi que le contrôle des apports en sélénium dans l'alimentation humaine est un enjeu essentiel pour les populations déficientes ou contaminées en sélénium. Ceci passe par une amélioration de la compréhension du métabolisme des plantes alimentaires vis-à-vis du sélénium dans les différentes conditions de culture. Nous avons choisi d'étudier une plante de grande culture ayant un impact extrêmement important sur l'alimentation animale et humaine: le *Zea mays*.

Cette étude a nécessité des adaptations et des développements méthodologiques spécifiques afin de pouvoir analyser le métabolisme du sélénium chez le maïs, notamment :

- La fabrication et l'utilisation d'une chambre de culture à atmosphère contrôlée adaptée à la culture en solution hydroponique afin d'étudier exclusivement les processus dus au métabolisme de la plante
- Des techniques de minéralisation et d'extractions enzymatiques suivies de méthodes de dosage adaptées et sensibles à un élément trace

Cette étude s'est focalisée sur trois facteurs pouvant influencer le transfert et le métabolisme du sélénium chez le *Zea mays* : deux facteurs dépendants du milieu de culture que sont la concentration et la forme du sélénium source ainsi qu'un facteur intrinsèque à la plante à savoir le stade de développement. Ce projet a démontré que ces trois facteurs influencent :

- L'absorption du sélénium et donc la concentration du sélénium dans les plantes entières
- Le taux de métabolisation des formes inorganiques en composés organo-séliés
- Le taux de volatilisation des composés méthylés volatiles du sélénium
- La distribution du sélénium ainsi que de certaines de ses espèces inorganiques et organiques au sein des différents organes de la plante.

Ces variations métaboliques sont principalement liées au mode d'absorption racinaire, à la mobilité, la toxicité et la capacité des formes inorganiques à être réduites ; ces paramètres sont dépendants de la forme du sélénium source : le séléniate est plus mobile que le sélénite ; le sélénite semble être plus toxique que le séléniate ; le séléniate est absorbé dans la plante via les transporteurs racinaires à sulfate alors que le sélénite est absorbé soit passivement soit via les transporteurs racinaires à phosphate ; et enfin la réduction du séléniate en composés organiques nécessite plus d'énergie que celle du sélénite.

Ces trois facteurs vont donc affecter la quantité ainsi que la qualité (spéciation du sélénium) des apports en sélénium chez les mammifères, en rappelant ici que la spéciation du sélénium est un paramètre déterminant dans son assimilation intestinale mais malheureusement non pris en compte dans les normes alimentaires. Cette étude a mis en évidence que le *Zea mays* n'est pas une plante qui accumule fortement le sélénium comme les plantes dites « accumulatrices » telles que la moutarde indienne. Néanmoins, au vu de l'importance du maïs dans l'alimentation animale et humaine mondiale, ainsi que des concentrations et de la spéciation du sélénium accumulé au sein dans les parties aériennes (fourrage ou grains), le *Zea mays* peut participer à l'amélioration de la qualité nutritionnelle du sélénium des populations déficientes en cet élément.

De plus, l'originalité de cette étude est le couplage entre l'analyse du métabolisme du sélénium et son influence sur l'accumulation sur les cations essentiels à la plante. Les variations du métabolisme du sélénium dûes aux trois facteurs étudiés ici induisent de fortes variations d'accumulation des cations essentiels. L'influence du sélénium sur des cations peut être associée (i) directement à des caractéristiques de son métabolisme (sa concentration dans la plante entière et dans les différents organes, son facteur transfert des racines vers les parties aériennes ou son taux de métabolisation), soit (ii) indirectement par des processus de protection et/ou d'adaptation de la plante visant à maintenir un métabolisme (principalement dans les parties chlorophylliennes) et une croissance optimale via le contrôle du transfert des éléments entre des différents organes de la plante qui peut être soit minimisé pour éviter les concentrations trop élevées et donc toxiques dans les feuilles soit majoré afin de répondre aux demandes de l'activité cellulaire. Ce dernier processus est particulièrement visible au niveau des grains du maïs qui, indépendamment de la concentration des éléments dans les parties aériennes, ont une qualité nutritionnelle optimale.

Pour finir, cette étude a mis en évidence que le sélénium à forte concentration, principalement, influence l'accumulation des cations dans la plante pouvant entraîner un dérèglement du système de détoxification des espèces oxygénées réactives des cellules

végétales. Ainsi, le caractère ambivalent du sélénium antioxydant ou pro-oxydant entraîne et/ou provoque des changements de l'ensemble du métabolisme de la plante.

## 2. PERSPECTIVES

A l'issue de cette thèse, les perspectives de recherche concernant différentes thématiques sont les suivantes :

Tout d'abord, la poursuite du développement analytique est nécessaire afin de :

- Diminuer les limites de détection et le temps d'analyse des espèces inorganiques du sélénium (séléniate et sélénite) grâce notamment à la mise au point du couplage en ligne de l'HPLC-CRC-ICP-MS.
- Doser les différentes espèces organiques importantes et prédominantes comme par exemples SeMet, SeCys, SeCysSeMet, DMS<sub>2</sub>Se, DMDSe via l'HPLC-CRC-ICP-MS (couplage en ligne) ou la chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS).

Par ailleurs, plusieurs questions restent encore en suspens sur le métabolisme du sélénium dans les plantes et dans le *Zea mays* plus particulièrement. Afin de compléter cette étude, plusieurs expérimentations sont à réaliser entièrement ou sont à finaliser :

- Expérimentation de cultures en hydroponie jusqu'au stade reproducteur avec des concentrations faibles en sélénium ainsi qu'avec un mélange de différentes formes de sélénium.
- Expérimentations avec différentes proportions des formes inorganiques dans le mélange séléniate/sélénite dans la solution nutritive ou avec un ou plusieurs composés organo-séléniés comme forme potentiellement accessible de sélénium pour les plantes.
- Réalisation de cinétiques d'accumulation jusqu'au stade génératif et reproducteur, afin de mieux comprendre les variations métaboliques au cours de la croissance de la plante. Bien que les résultats ne soient pas actuellement exploitables, au cours de cette étude des plantes traitées avec du séléniate, du sélénite ou un mélange à 1000 µg/L ont été récoltées à pas de temps réguliers (quelques jours) jusqu'au stade génératif. Les échantillons de végétaux sont à ce jour lyophilisés mais restent à analyser.
- Enfin, la localisation du sélénium à l'échelle tissulaire dans les différents organes de la plante via un microscope électronique à balayage (MEB) couplé à un spectromètre à sélection d'énergie (EDS). Selon le métabolisme, y-a-t'il un tissu préférentiel de stockage du sélénium ? Si oui, ce tissu est-il le lieu d'un métabolisme intense, un tissu



structurel ou de stockage ? Durant cette étude, des plantes traitées avec du séléniate, du sélénite ou un mélange à 1000 µg/L ont été récoltées et sont en cours d'analyse via un MEB-EDS/WDS à l'INRA de Nancy.

D'autre part, les résultats de cette étude sur l'accumulation des cations essentiels à la plante influencée par le sélénium ouvrent des perspectives quant à leurs origines et/ou conséquences :

- L'étude couplée des activités enzymatiques (GSH, SOD) et des composés (lipides peroxydés, teneur en chlorophylle) impliqués dans le système de détoxification des espèces oxygénées réactives permettrait d'affiner et/ou de confirmer les conclusions de cette thèse et d'améliorer la compréhension du caractère pro-oxydant du sélénium à forte concentration.
- L'étude couplée de la localisation tissulaire du sélénium et des autres cations via un microscope électronique à balayage (MEB) couplé à un spectromètre à sélection d'énergie (EDS) ou un spectromètre à dispersion de longueur d'ondes (WDS) améliorerait la compréhension des relations sélénium/cations. Quelques corrélations (Test de Spearman,  $P < 0,05$ ), non présentées dans ce manuscrit car ne permettant pas d'étayer nos hypothèses, peuvent présager d'affinités chimiques préférentielles : par exemple entre le sélénite et le cuivre (dans les plantes entières du  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$   $r^2 = 80$ , dans les racines du  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$   $r^2 = 55$ ) ainsi que le sélénite et le fer (dans les feuilles du  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{50}$   $r^2 = 99$ , dans les feuilles du  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{-T}_{1000}$   $r^2 = 22$ ). En effet, de fortes affinités chimiques entre sélénite-cuivre, sélénite-fer sont observées naturellement dans les sols (Dhillon and Dhillon 1999) mais n'ont jamais été étudiées dans les plantes.

Pour finir, une autre approche thématique à développer serait le devenir biogéochimique du sélénium des systèmes plus complexes tels sol-plante-atmosphère ou au sein d'un réseau trophique simple :

- Des expérimentations en monolithes de sol dans une chambre à atmosphère contrôlée permettraient d'appréhender l'impact des paramètres physico-chimiques du sol sur le métabolisme du sélénium dans la plante. En effet, le type de sol et l'activité racinaire (rhizosphère) influencent la biodisponibilité des différentes formes de sélénium.
- Des études au champ permettraient de confirmer les postulats établis en laboratoire et surtout d'étudier le potentiel phytoremédiateur du *Zea mays*. Au vue de cette première étude, le *Zea mays* est capable de croître dans des conditions très enrichies en sélénium et d'accumuler du sélénium notamment dans les parties aériennes exportables dans l'industrie agro-alimentaire.

- Le sélénium étant essentiel à l'alimentation animale et humaine, l'étude couplée du transfert du sélénium dans un producteur primaire tel que le *Zea mays* suivi du transfert vers un consommateur primaire (par exemple la poule consommatrice de grains de maïs) permettrait de comprendre le devenir du sélénium au sein du réseau trophique simple.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adam C and Rouelle-Debet S (2002) Selenium 79 et environnement. IRSN
- Alscher RG, Erturk N and Heath LS (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot* 53:1331-1341
- Arvy M (1993) Selenate and Selenite Uptake and Translocation in Bean Plants (*Phaseolus vulgaris*). *J Exp Bot* 44:1083-1087
- Arvy MP, Thiersault M and Doireau P (1995) Relationships between selenium, micronutrients, carbohydrates, and alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* cells. *Journal of plant Nutrition* 18:1535-1546
- Association Générale des Producteurs de Blé et autres céréales (2012a) Monde-données globales et par pays sur le marché des céréales.  
<http://www.agpb.com/documentation-et-publications/recoltes/160-monde-donnees-globales-et-par-pays-sur-le-marche-des-cereales>. Accessed 04/2012
- Association Générale des Producteurs de Blé et autres céréales (2012b) Union européenne-production céréalière par pays membres.  
<http://www.agpb.com/documentation-et-publications/recoltes/161-union-europeenne-production-cerealiere-par-pays-membre>. Accessed 04/2012
- Association Générale des Producteurs de Maïs (2012) MAIZE'EUROP'.  
[http://www.agpm.com/pages/mais\\_fourrage.php](http://www.agpm.com/pages/mais_fourrage.php). Accessed 04/2012
- Axley M, Boeck A and Stadtman T (1991) Catalytic properties of an Escherichia coli formate dehydrogenase mutant in which sulfur replaces selenium. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88:8450-8454
- Barclay M, MacPherson A and Dixon J (1995) Selenium content of a range of UK foods. *J Food Compos Anal* 8:307-318
- Bariac T, Deleens E, Gerbaud A, Andre A and Mariotti A (1991) La composition isotopique ( $^{18}\text{O}$ ,  $^2\text{H}$ ) de la vapeur d'eau transpirée: étude en conditions asservies. *Geochim Cosmochim Acta* 55:3391-3402
- Beinert H (2000) Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. *J Biol Inorg Chem* 5:2-15
- Benson AA (1964) Plant membrane lipids. *Annual Review of Plant Physiology* 15:1-16
- Berrow ML and Ure AM (1989) Geological materials and soils. In: Ilnat M (ed) Occurrence and distribution of selenium. CRC Press, Boca Raton
- Blake-Kalff MMA, Harrison KR, Hawkesford MJ, Zhao FJ and McGrath SP (1998) Distribution of sulfur within oilseed rape leaves in response to sulfur deficiency during vegetative growth. *Plant Physiol* 118:1337-1344
- Broadley MR, Alcock J, Alford J, Cartwright P, Foot I, Fairweather-Tait SJ, Hart DJ, Hurst R, Knott P, McGrath SP, Meacham MC, Norman K, Mowat H, Scott P, Stroud J, Tovey M, Tucker M, White PJ, Young SD and Zhao FJ (2010) Selenium biofortification of high-yielding winter wheat (*Triticum aestivum* L.) by liquid or granular Se fertilisation. *Plant Soil* 332:5-18
- Broadley MR, White PJ, Bryson RJ, Meacham MC, Bowen HC, Johnson SE, Hawkesford MJ, McGrath SP, Zhao FJ, Breward N, Harriman M and Tucker M (2006) Biofortification of UK food crops with selenium. *Proc Nutr Soc* 65:169-181
- Brown TA and Shrift A (1981) Exclusion of selenium from proteins of selenium-tolerant *Astragalus* species. *Plant Physiol* 67:1051-1053
- Brown TA and Shrift A (1982) Selenium: toxicity and tolerance in higher plants. *Biol Rev* 57:59-84
- Buchner P, Takahashi H and Hawkesford MJ (2004) Plant sulphate transporters: co-ordination of uptake, intracellular and long-distance transport. *J Exp Bot* 55:1765-1773
- Burgener M, Suter M, Jones S and Brunold C (1998) Cyst(e)ine is the transport metabolite of assimilated sulfur from bundle-sheath to mesophyll cells in maize leaves. *Plant Physiol* 116:1315-1322
- Burnell J and Shrift A (1979) CysteinyI-tRNA synthetase from *Astragalus* species. *Plant Physiol* 63:1095-1097
- Cakmak I and Marschner H (1988) Enhanced superoxide radical production in roots of zinc-deficient plants. *J Exp Bot* 39:1449-1460

- Cakmak I, Marschner H and Bangerth F (1989) Effect of zinc nutritional status on growth, protein metabolism and levels of indole-3-acetic acid and other phytohormones in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Exp Bot* 40:405-412
- Cauderon A (2012) Le maïs : importance économique, amélioration génétique et production. <http://www.gnis-pedagogie.org/pages/mais/chap4/intro.htm>. Accessed 04/2012
- Chen L, Yang F, Xu J, Hu Y, Hu Q, Zhang Y and Pan G (2002) Determination of selenium concentration of rice in china and effect of fertilization of selenite and selenate on selenium content of rice. *J Agric Food Chem* 50:5128-5130
- Chen Y and Maret W (2001) Catalytic oxidation of zinc/sulfur coordination sites in proteins by selenium compounds. *Antioxid Redox Signaling* 3:651-656
- Chery L and Castrec-Rouelle M (2004) Les occurrences de sélénium dans les forages d'alimentation en eau de la région parisienne : origine et perspective d'études. 11 journées techniques de Comité Français d'Hydrologie de l'AIH - Géologie et hydrogéologie du bassin de Paris. Avancées et perspectives 16-17 novembre 2004.
- Chilimba A, Young S, Black C, Rogerson K, Ander E, Watts M, Lammel J and Broadley M (2011) Maize grain and soil surveys reveal suboptimal dietary selenium intake is widespread in Malawi. *Sci Rep* 72:
- Combs GF (2001) Selenium in global food systems. *Br J Nutr* 85:517-547
- Coppin F, Chabrouillet C and Martin-Garin A (2009) Selenite interactions with some particulate organic and mineral fractions isolated from a natural grassland soil. *Eur J Soil Sci* 60:369-376
- Criqui M, Jamet E, Parmentier Y, Marbach J, Durr A and Fleck J (1992) Isolation and characterization of a plant cDNA showing homology to animal glutathione peroxidases. *Plant Mol Biol* 18:623-627
- Cruz-Jimenez G, Peralta-Vodea JR, de la Rosa G, Meitzner G, Parsons JG and Gardea-Torresdey JL (2005) Effect of Sulfate on Selenium Uptake and Chemical Speciation in *Convolvulus arvensis* L. *Environ Chem* 2:100-107
- Cubadda F, Aureli F, Ciardullo S, D'Amato M, Raggi A, Acharya R, Reddy RAV and Prakash NT (2010) Changes in Selenium Speciation Associated with Increasing Tissue Concentrations of Selenium in Wheat Grain. *J Agric Food Chem* 58:2295-2301
- Daniels L (1996) Selenium metabolism and bioavailability. *Biol Trace Elem Res* 54:185-199
- Dawson J and Anderson JW (1988) Incorporation of cysteine and selenocysteine into cystathionine and selenocystathionine by crude extract of spinach. *Phytochemistry* 28:3453-3460
- De Souza MP, Pilon-Smits EAH, Mel Lytle C, Hwang S, Tai J, Honma TSU, Yeh L and Terry N (1998) Rate-Limiting Steps in Selenium Assimilation and Volatilization by Indian Mustard. *Plant Physiol* 117:1487-1494
- Dhillon K and Dhillon S (1999) Adsorption-desorption reactions of selenium in some soils of India. *Geoderma* 93:19-31
- Dhillon K and Dhillon S (2003) Distribution and management of seleniferous soils. *Adv Agron* 79:118-184
- Dhillon K and Dhillon S (2004) Pools of selenium in some Indian soils at field capacity and submerged moisture regimes. *Aust J Soil Res* 42:247-257
- Dhillon K, Dhillon S and Dogra R (2010) Selenium accumulation by forage and grain crops and volatilization from seleniferous soils amended with different organic materials. *Chemosphere* 78:548-556
- Diaz Huerta V, Hinojosa Reyes L, Marchante-Gayon JM, Fernandez Sanchez ML and Sanz-Medel A (2003) Total determination and quantitative speciation analysis of selenium in yeast and wheat flour by isotope dilution analysis ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 18:1243-1247
- Dodig S and Cepelak I (2004) The facts and controversies about selenium. *Acta Pharmaceutica* 54:261-276
- Drotar A, Phelps P and Fall R (1985) Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. *Plant Sci (Amsterdam, Neth)* 42:35-40
- Ducros V and Favier A (2004) Métabolisme du sélénium. *EMC-Endocrinologie* 1:19-28

- Egli I, Davidsson L, Juillerat M, Bearclay D and Hurrell R (2003) Phytic acid degradation in complementary foods using phytase naturally occurring in whole grain cereals. *J Food Sci* 68:1855-1859
- Eich-Greatorex S, Sogn TA, Ogaard AF and Aasen I (2007) Plant availability of inorganic and organic selenium fertilizer as influenced by soil organic matter content and pH. *Nutr Cycl Agroecosyst* 79:221-231
- Ellis DR and Salt DE (2003) Plants, selenium and human health. *Curr Opin Plant Biol* 6:273-279
- Eshdat Y, Holland D, Faltin Z and Ben-Hayyim G (1997) Plant glutathione peroxidases. *Physiol Plant* 100:234-249
- Euroala MH, Ekholm PI, Ylinen ME, Koivistoinen PE and Varo PT (1991) Selenium in Finnish foods after beginning the use of selenate supplemented fertilizers. *J Sci Food Agric* 56:57-70
- Fakorede MAD, Mulamba NN and Mock JJ (1977) A comparative study of methods used for estimating leaf area of mays (*Zea mays* L.) from non destructive measurements. *Maydica* 22:37-46
- Faltin Z, Camoin L, Ben-Hayyim G, Perl A, Beeor-Tzahar T, Strosberg A, Holland D and Eshdat Y (1998) Cysteine is the presumed catalytic residue of *Citrus sinensis* phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase over-expresses under salt stress. *Physiol Plant* 104:741-746
- Fang Y, Wang L, Xin Z, Zhao L, An X and Hu Q (2008) Effect of foliar application of zinc, selenium, and iron fertilizers on nutrients concentration and yield of rice grain in china. *J Agric Food Chem* 56:2079-2084
- Fargasova A, Pastierova J and Svetkova K (2006) Effect of SE-metal pair combinations (Cd, Zn, Cu, Pb) on photosynthetic pigments production and metal accumulation in *Synapis alba* L. seedlings. *Plant Soil and Environment* 52:8-15
- Feng R, Wei C, Tu S and Wu F (2009) Effect of Se in the uptake of essential elements in *Pteris vittata* L. *Plant Soil* 325:123-132
- Ferguson J and Clarkson D (1975) Ion transport and endodermal suberisation in the roots of *Zea mays* L. *New Phytol* 75:69-79
- Floor GH and Roman-Ross G (2012) Selenium in volcanic environments: A review. *Appl Geochem* 27:517-531
- Food and agriculture organization and World Health Organization (2002) Human Vitamin and Mineral Requirements: Report of expert Consultation. Chapter 15 Selenium. Food and agriculture organization, World Health Organization, Bangkok
- Fordyce F (2005) Selenium deficiency and toxicity in the environment. In: Selinus O, Alloway B, Centeno JA, Finkelman RB, Fuge R, Lindh U and Smedley P (ed) *Essentials of medical geology*. Elsevier, Amsterdam, pp 373-415
- George MW (2010) Selenium and tellurium. In: survey USG (ed) *Minerals Yearbook*. USGS science for a changing world, Washington
- Gissel-Nielsen G (1971a) Influence of pH and texture of the soil on plant uptake of added selenium. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 19:1165-1167
- Gissel-Nielsen G (1971b) Selenium content of some fertilizers and their influence on uptake of selenium in plants. *J Agric Food Chem* 19:564-566
- Gissel-Nielsen G (1975) Foliar application and pre-sowing treatment of cereals with selenite. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk* 138:97-105
- Gissel-Nielsen G (1986) Comparison of selenium treatments of crops in the field. *Biol Trace Elem Res* 10:209-213
- Gitelson AA, Vina A, Arkebauer TJ, Rundquist DC, Keydan G and Leavitt B (2003) Remote estimation of leaf area index and green leaf biomass in maize canopies. *Geophys Res Lett* 30:1248-1251
- Gourcy L, Winckel A and Brugeron A (2009) Origine du sélénium et compréhension des processus dans les eaux du bassin Seine-Normandie. Rapport d'avancement - phase 1. Rapport BRGM/RP-57344-FR
- Gupta UC and Winter KA (1989) Effect of selenate vs. selenite forms of selenium increasing the selenium concentration in forages and cereals. *Can J Soil Sci* 69:885-888

- Gutteridge JMC and Wilkins S (1983) Copper salt-dependent hydroxyl radical formation: Damage to proteins acting as antioxidants. *Biochim Biophys Acta* 759:38-41
- Hammer C, Kyriakopoulos A, Behne D, Gawlik D and Bratter P (1996) Protein-bound selenium in the seeds of coco de mono (*Lecythis ollaria*). *J Trace Elem Med Biol* 10:96-102
- Hartikainen H, Xue T and Piironen V (2000) selenium as an anto-oxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant Soil* 225:193-200
- Hawkesford MJ and Zhao FJ (2007) Strategies for increasing the selenium content of wheat. *J Cereal Sci* 46:282-292
- Hawrylak-Nowak B (2008) Effect of selenium on selected macronutrients in maize plants. *Journal Elementology* 13:513-519
- Haygarth PM (1994) Global importance and global cycling of selenium. In:W.T. Frankenberger JR SB (ed) *Selenium in the environment*. DEKKER, New York, pp 1-27
- Hopper JL and Parker DR (1999) Plant availability of selenite and selenate as influenced by the competing ions phosphate and sulfate. *Plant Soil* 210:199-207
- Hu Q, Chen L, Xu J, Zhang Y and Pan G (2002) Determination of selenium concentration in rice and the effect of foliar application of Se-enriched fertiliser or sodium selenite on the selenium content of rice. *J Sci Food Agric* 82:869-872
- Ihnat M (1989) Occurrence and distribution of selenium. CRC Press
- Institute of medicine (U.S) and Panel on dietary antioxidants and related compounds (2000) *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*. National Academies Press
- Jacob C, Maret W and Vallee B (1999) Selenium redox biochemistry if zinc-sulfur coordination sites in proteins and enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:1910-1914
- Johnson L (1991) Selenium uptake by plants as a function of soil type, organic matter content and pH. *Plant Soil* 133:57-64
- Kabata-Pendias A and Mukherjee AB (2007) *Trace Elements from Soil to Human*. Springer
- Kabata-Pendias A and Pendias H (2001) *Trace elements in soils and plants*. CRC Press, London
- Kapolna E, Gergely V, Dernovics M, Illés A and Fodor P (2007) Fate of selenium species in sesame seeds during simulated bakery process. *J Food Eng* 79:494-501
- Karlen D, Flannery R and Sadler E (1988) Aerial accumulation and partitioning of nutrient by corn. *Agron J* 80:232-242
- Knowles SO, Grace ND, Wurms K and Lee J (1999) Significance of Amount and Form of Dietary Selenium on Blood, Milk, and Casein Selenium Concentrations in Grazing Cows. *J Dairy Sci* 82:429-437
- Koprivova A, Melzer M, von Ballmoos P, Mandel T, Brunold C and Kopriva S (2001) Assimilatory sulfate reduction in C<sub>3</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>, and C<sub>4</sub> species of *Flaveria*. *Plant Physiol* 127:543-550
- Kopsell DA, Randle WM and Mills HA (2000) Nutrient accumulation in leaf tissue of rapid-cycling *brassica oleracea* responds to increasing sodium selenate concentrations. *Journal of Plant Nutrition* 23:927-935
- Kotrebai M, Birringer M, Tyson J, F, Block E and Uden PC (1999) Identification of the principal selenium compounds in selenium-enriched natural sample extracts by ion-pair liquid chromatography with inductively coupled plasma- and electrospray ionization-mass spectrometric detection. *Analytica communication* 36:249-252
- Kuroda H, Sagisaka S and Chiba K (1992) Collapse of peroxide-scavenging systems in apple flower-buds associated with freezing injury. *Plant Cell Physiol* 33:743-750
- Larsen EH, Lobinski R, Burger-Meyer K, Hansen M, Ruzik R, Mazurowka L, Rasmussen PH, Sloth JJ, Scholten O and Kik C (2006) Uptake and speciation of selenium in garlic cultivated in soil amended with symbiotic fungi (mycorrhiza) and selenate. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385:1098-1108
- Läuchli A (1993) Selenium in plants: Uptake, Functions, and Environmental Toxicity. *Bot Acta* 106:455-468
- Le Stum H (2011) *Association Générale des Producteurs de Blé et autres céréales*. IOP Publishing AGPB.
- [http://www.agpb.fr/fr/chiffre/recolte\\_monde.asp](http://www.agpb.fr/fr/chiffre/recolte_monde.asp). Accessed 13 december 2011

- Leustek T (2002) Sulfate metabolism. In: Meyerowitz CRSaEM (ed) *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville
- Leustek T, Murillo M and Cervantes M (1994) Cloning of a cDNA encoding ATP sulfurylase from *Arabidopsis thaliana* by functional expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol* 105:897-902
- Leustek T and Saito K (1999) Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiol* 120:637-643
- Lewis B, Johnson C and Broyer T (1974) Volatile selenium in higher plants. The production of dimethyl selenide in cabbage leaves by enzymatic cleavage of Se-methyl selenomethionine selenonium salt. *Plant Soil* 40:107-118
- Lexmond TM and Van der Vorm PDJ (1981) The effect of pH on copper toxicity to hydroponically grown maize. *Neth J Agric Sci* 29:217-238
- Li HF, McGrath SP and Zhao FJ (2008) Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. *New Phytol* 178:92-102
- Liu K and Gu Z (2009) Selenium Accumulation in Different Brown Rice Cultivars and Its Distribution in Fractions. *J Agric Food Chem* 57:695-700
- Longchamp M, Angeli N and Castrec-Rouelle M (2012) Selenium uptake in *Zea mays* supplied with selenate or selenite under hydroponic conditions. *Plant Soil* (in press)
- Lyons G, Genc Y, Soole K, Stangoulis J, Liu F and Graham R (2009) Selenium increases seed production in Brassica. *Plant Soil* 318:73-80
- Lyons G, Genc Y, Stangoulis J, Palmer L and Graham R (2004) Selenium distribution in wheat grain, and effect of postharvest processing on wheat selenium content. *Biol Trace Elem Res* 101:155-168
- Maddoni GA and Otegui ME (1996) Leaf area, light interception, and crop development in maize. *Field Crops Res* 48:81-87
- Mahapatra S, Tripathi RM, Raghunath R and Sadasivan S (2001) Daily intake of Se by adult population of Mumbai, India. *The Science of the Total Environment* 277:217-233
- Marschner H (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press, London
- Martin A (2000) Apports nutritionnels conseillés pour la population française.
- Mazej D, Falnoga I, Veber M and Stibilj V (2006) Determination of selenium species in plant leaves by HPLC-UV-HG-AFS. *Talanta* 68:558-568
- Mazej D, Osvald J and Stibilj V (2008) Selenium species in leaves of chicory, dandelion, lamb's lettuce and parsley. *Food Chem* 107:75-83
- Mbagwu J (1983) Selenium concentrations in crops grown on low-selenium soils as affected by fly-ash amendment. *Plant Soil* 74:75-81
- Meija J, Montes-Bayon M, Le Duc D, Terry N and Caruso JA (2002) Simultaneous monitoring of volatile selenium and sulfur species from Se accumulating plants (wild type and genetically) by GC/MS and GC/ICPMS using solid-phase microextraction for sample introduction. *Anal Chem* 74:5837-5844
- Montes-Bayon M, Molet MJD, Gonzalez EB and Sanz-Medel A (2006) Evaluation of different sample extraction strategies for selenium determination in selenium-enriched plants (*Allium sativum* and *Brassica juncea*) and Se speciation by HPLC-ICP-MS. *Talanta* 68:1287-1293
- Moore KL, Schroder M, Lombi E, Zhao FJ, McGrath SP, Hawkesford MJ, Shewry PR and Grovenor CRM (2010) NanoSIMS analysis of arsenic and selenium in cereal grain. *New Phytologist* 185:434-445
- Muller S, Heider J and Bock A (1997) The path of unspecific incorporation of selenium in *Escherichia Coli*. *Arch Microbiol* 168:421-427
- Navarro-Alarcon M and Cabrera-Vique C (2008) Selenium in food and the human body: A review. *Sci Total Environ*
- Neuhierl B and Boeck A (1996) On the mechanism of selenium tolerance in selenium-accumulating plants: purification and characterization of a specific selenocysteine methyltransferase from cultured cells of *Astragalus bisulcatus*. *Eur J Biochem* 239:235-238
- Nève J (1997) Selenium in nutrition and therapeutics. *Principles of Medical Biology Molecular and Cellular Pharmacology* 8C:985-994
- Ng B and Anderson JW (1978) Synthesis of selenocysteine by cysteine synthase from selenium accumulator and non-accumulator plants. *Phytochemistry* 17:2069-2074



- Nicholson J, McQueen R and Bush R (1991) Response of growing cattle to supplementation with organically bound or inorganic sources of selenium or yeast cultures. *Canadian Journal of Animal Science* 71:803-811
- Nigam S, Tu J and McConnell W (1969) Distribution of selenomethylselenocysteine and some other amino acids in species of *Astragalus*, with special reference to their distribution during the growth of *A. bisulcatus*. *Phytochemistry* 8:1161-1165
- Nriagu JO (1989) Global cycling of selenium. In: Ilnat M (ed) Occurrence and distribution of selenium. CRC Press, Boca Raton, pp 327-340
- Pappa E, Pappas A and Surai P (2006) Selenium content in selected foods from the Greek market and estimation of the daily intake. *Sci Total Environ* 372:100-108
- Pazurkiewick-Kocot K, Galas W and Kita A (2003) The effect of selenium on the accumulation of some metals in *Zea mays* L. plants treated with indole-3-acetic acid. *Cell Mol Biol Lett* 8:97-103
- Pedrero Z, Elvira D, Cámara C and Madrid Y (2007) Selenium transformation studies during Broccoli (*Brassica oleracea*) growing process by liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (LC-ICP-MS). *Analytica Chimica Acta* 596:251-256
- Perrier Brusle L (2010) Le maïs dans le monde: production, consommation et tensions sur les marchés.
- Peterson P and Robinson P (1972) Cystathionine and its selenium analogue in *Neptunia amplexicaulis*. *Phytochemistry* 11:1837-1839
- Pickering IJ, Prince RC, Salt DE and Georges GN (2000) Quantitative, chemically specific imaging of selenium transformation in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10717-10722
- Pilon-Smith E, Hwang S, Lytle CM, Zhu Y, Tai J-C, Bravo R-C, Chen Y, Leustek T and Terry N (1999) Overexpression of ATP Sulfurylase in Indian Mustard leads to increased selenate uptake, reduction, and tolerance. *Plant Physiol* 119:123-132
- Pincemail J, Neve J, Defraigne JO, Meurisse M and Limet R (1999) Antioxydants et prévention des maladies cardiovasculaires 4ème partie : le sélénium. *Medi sphère* 93:
- Plant JA, Kinniburgh DG, Smedley PL, Fordyce FM, Klinck BA, Heinrich D, Holland K and Turekian K (2003) Arsenic and Selenium. In: Lollar BS (ed) *Treatise on Geochemistry*. Elsevier, Oxford, pp 17-66
- Podoll K, Bernard J, Ullrey D, Debar S, Ku P and Magee W (1992) Dietary selenate versus selenite for cattle, sheep, and horses. *J Anim Sci* 70:1965-1970
- Poggi V, Arcioni A, Filippini P and Pifferi P (2000) Foliar application of selenite and selenate to potato (*Solanum tuberosum*): effect of a lignin agent on selenium content of tubers. *J Agric Food Chem* 48:4749-4751
- Polatajko A, Banas B, Encinar J and Szpunar J (2005) Investigation of the recovery of selenomethionine from selenized yeast by two-dimensional LC-ICP MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381:844-849
- Presser TS and Ohlendorf HM (1987) Biogeochemical cycling of selenium in the San Joaquin Valley, California, USA. *Environ Manag* 11:805-821
- Prochazkova D, Sairam RK, Srivastava GC and Singh DV (2001) Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Sci (Amsterdam, Neth)* 161:765-771
- Rayman MP (2000) The importance of selenium to human health. *The Lancet* 356:233-241
- Rayman MP (2005) Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proc Nutr Soc* 64:527-542
- Rayman MP (2008) Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. *Br J Nutr* 100:254-268
- Rayman MP, Infante HG and Sargent M (2008) Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. *Br J Nutr* 100:238-253
- Robert M and Juste C (1997) Stocks et flux d'éléments traces dans les sols du territoire. In: ADEME (ed) *Aspects sanitaires et environnementaux de l'épandage agricole des boues d'épuration urbaines*
- Robson AD and Reuter DJ (1981) Diagnosis of copper deficiency and toxicity. In: J.F. Loneragan ADR, and R.D. Graham (ed) *Copper in soils and plants*. Academic Press, London

- Ruget F, Bonhomme R and Chartier M (1996) Estimation simple de la surface foliaire de plantes de maïs en croissance. *Agronomie* 16:553-562
- Sabeh F, Wright T and Norton S (1993) Purification and characterization of a glutathione peroxidase from the *Aloa vera* plant. *Enzyme Protein* 47:92-98
- Sager M and Hoesch J (2006) Selenium uptake in cereals grown in lower Austria. *Journal of Central European Agriculture* 7:71-78
- Sannac S, Pannier F, Oster O, Labarraque G, Fisicaro P and Potin-Gautier M (2009) Validation of reference measurement procedure for the assessment of selenomethionine in nutritional supplements. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 24:237-241
- Schmutz D and Brunold C (1982) Regulation of sulfate assimilation in plants. XIII. Assimilatory sulfate reduction during ontogenesis of primary leaves of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol* 70:524-527
- Schmutz D and Brunold C (1984) Intercellular localization of assimilatory sulfate reduction in leaves of *Zea mays* and *Triticum aestivum*. *Plant Physiol* 74:866-870
- Schreiber L, Hartmann K, Skrabs M and Zeier J (1999) Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *J Exp Bot* 50:1267-1280
- Shibagaki N, Rose A, McDermott JP, Fujiwara T, Hayashi H, Yoneyama T and Davies JP (2002) Selenate-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* identify *Sultr1;2*, a sulfate transporter required for efficient transport of sulfate into roots. *Plant J* 29:475-486
- Simonoff M and Simonoff G (1991) *Le sélénium et la vie*, Paris
- Singh BR (1991) Selenium content of wheat as affected by selenate and selenite contained in a Cl<sup>-</sup> or SO<sub>4</sub><sup>-</sup> based MPK fertilizer. *Fertilizer Research* 30:1-7
- Smrkolj P, Osvald M, Osvald J and Stibilj V (2007) Selenium uptake and species distribution in selenium-enriched bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds obtained by two different cultivations. *European Food Research and Technology* 225:233-237
- Smrkolj P, Stibilj V, Kreft I and Kopolina E (2005) Selenium species determination in selenium-enriched pumpkin (*curcubita pepo* L.) seeds by HPLC-UV-HG-AFS. *Anal Sci* 21:1501-1504
- Sors T, Ellis D, Na G, Lahner B, Lee B, Leustek T, Pickering IJ and Salt DE (2005a) Analysis of sulfur and selenium assimilation in *Astragalus* plants with varying capacities to accumulate selenium. *Plant J* 42:785-797
- Sors TG, Ellis DR and Salt DE (2005b) Selenium uptake, translocation, assimilation and metabolic fate in plants. *Photosynth Res* 86:373-389
- Srivastava M, Ma QL and Cotruvo JA (2007) Uptake and distribution of selenium in different fern species. *Int J Phytoremediat* 7:33 - 42
- Stadtman T (1996) Selenocysteine. *Annu Rev Biochem* 65:83-100
- Stibilj V, Kreft I and Smrkolj P (2004) Enhanced selenium content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) and pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds by foliar fertilisation. *European Food Research and Technology* 219:142-144
- Sunarpi and Anderson JW (1997) Allocation of S in generative growth of soybean. *Plant Physiol* 114:687-693
- Tabe LM and Droux M (2001) Sulfur assimilation in developing lupin cotyledons could contribute significantly to the accumulation of organic sulfur reserves in the seed. *Plant Physiol* 126:176-187
- Tan J (1989) *The atlas of endemic diseases and their environments in the people's republic of china*, Beijing
- Tan Y and Marchall WD (1997) Enzymic Digestion-High-pressure Homogenization Prior to Slurry Introduction Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry for the Determination of selenium in Plant and Animal Tissues. *The Analyst* 122:13-18
- Terry N, Carlson C, Raab TK and Zayed A (1992) Rates of Selenium Volatilisation among crop Species. *J Environ Qual* 21:341-344
- Terry N and Zayed A (1994) Selenium volatilization by plants. In: Frankenberger JR and Benson S (ed) *Selenium in the environment*. Marcel Dekker, New York, pp 343-368
- Terry N, Zayed AM, De Souza MP and Tarun AS (2000) Selenium in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:401-432

- Tewari RK, Kumar P, Neetu and Sharma PN (2005) Signs of oxidative stress in the chlorotic leaves of iron starved plants. *Plant Sci (Amsterdam, Neth)* 169:1037-1045
- Thérond P, Malvy D and Favier A (1997) Toxicité du sélénium à doses pharmacologiques par voie oral. *Nutrition clinique et métabolisme* 11:91-101
- Thiry C, Ruttens A, De Temmerman L, Schneider Y and Pussemier L (2012) Current knowledge in species-related bioavailability of selenium in food. *Food Chem* 130:767-784
- Thomson C (2004) Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. *Eur J Clin Nutr* 58:391-402
- Thomson C and Robinson M (1986) Urinary and fecal excretions and absorption of a large supplement of selenium: superiority of selenate over selenite. *The american journal of Clinical Nutrition* 44:659-663
- Tollenaar M, Daynard T and Hunter R (1979) Effect of temperature on rate of leaf appearance and flowering date in maize. *Crop Sci* 19:363-366
- Tuna AL, Kaya C, Ashraf M, Altunlu H, Yokas I and Yagmur B (2007) The effects of calcium sulphate on growth, membrane stability and nutrient uptake of tomato plants grown under salt stress. *Environ Exp Bot* 59:173-178
- U.S. Geological Survey (2005) Selenium end-use statistics. IOP Publishing U.S. Geological Survey data series 140.  
<http://pubs.usgs.gov/ds/2005/140/>. Accessed 2012
- Van Assche F and Clijsters H (1986) Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with toxic concentration of zinc: effect on electron transport and photophosphorylation. *Physiol Plant* 66:717-721
- Vernoux JF, Barbier J and Chery L (1998) Les anomalies en sélénium dans les captages d'Ile-de-France (Essonne, Seine-et-Marne). Rapport BRGM R40114.
- White PJ, Bowen HC, Parmaguru P, Fritz M, Spracklen WP, Spiby RE, Meacham MC, Mead A, Harriman M, Trueman LJ, Smith BM, Thomas B and Broadley MR (2004) Interactions between selenium and sulfur nutrition in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 55:1927-1937
- White PJ and Broadley MR (2009) Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets-iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New physiologist* 182:49-84
- World Health Organization (1987) Selenium. In:WHO (ed) *Environ Health Criter*. WHO, Geneva
- World Health Organization, Food and Agriculture Organisation of the United nations and International Atomic Energy Agency expert group (1996) Selenium. In:WHO (ed) *Trace elements in human nutrition and health*. WHO, Geneva, pp 105-122
- Wu L and Huang Z (1992) Selenium assimilation and nutrient element uptake in white clover and tall fescue under the influence of sulphate concentration and selenium tolerance of the plants. *J Exp Bot* 43:549-555
- Ximenez-Embun P, Alonso I, Madrid-Albarran Y and Camara C (2004) Establishment of selenium uptake and species distribution in lupine, india mustard and sunflower plants. *J Agric Food Chem* 52:832-838
- Xue T, Hartikainen H and Piironen V (2001) Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing lettuce. *Plant Soil* 237:55-61
- Yang F, Chen L, Hu Q and Pan G (2003) Effect of the application of selenium on selenium content of soybean and its products. *Biol Trace Elem Res* 93:249-256
- Yokota A, Shigeoka S, Onishi T and Kitaoka S (1988) Selenium as inducer of glutathione peroxidase in low-CO<sub>2</sub>-grown *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 86:649-651
- Yoshimoto N, Takahashi H, Smith FW, Yamaya T and Saito K (2002) Two distinct high-affinity sulfate transporters with different inducibilities mediate uptake of sulfate in *Arabidopsis* roots. *Plant J* 29:465-473
- Zayed A, Lytle CM and Terry N (1998) Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Planta* 206:284-292
- Zayed A and Terry N (1992) Selenium volatilization in broccoli as influenced by sulfate supply. *Journal of Plant Physiology* 140:646-652
- Zayed A and Terry N (1994) Selenium volatilization in roots and shoots : effects of shoot removal and sulfate level. *Journal of Plant Physiology* 143:

- Zhang L, Shi W and Wang X (2006) Difference in selenite absorption between high- and low-selenium rice cultivars and its mechanism. *Plant Soil* 282:183-193
- Zhang Y, Pan G, Chen J and Hu Q (2003) Uptake and transport of selenite and selenate by soybean seedlings of two genotypes. *Plant Soil* 253:437-443
- Zhao C, Ren J, Xue C and Lin E (2005) Study on the relationship between soil selenium and plant uptake. *Plant Soil* 277:197-206
- Zhao F-J, Javier Lopez-Bellido F, Gray CW, Richard Whalley W, Clark LJ and McGrath SP (2007) Effects of soil compaction and irrigation on the concentrations of selenium and arsenic in wheat grains. *Sci Total Environ* 372:433-439
- Zhao FJ and McGrath SP (2009) Biofortification and phytoremediation. *Curr Opin Plant Biol* 12:373-380



**ANNEXE 1 :**

**Selenium uptake in *Zea mays* supplied with selenate or selenite under hydroponic conditions**