



HAL
open science

Identification et quantification de métabolites séléniés dans l'urine humaine

Marlène Klein

► **To cite this version:**

Marlène Klein. Identification et quantification de métabolites séléniés dans l'urine humaine. Chimie. Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2010. Français. NNT: . tel-00601535

HAL Id: tel-00601535

<https://theses.hal.science/tel-00601535>

Submitted on 18 Jun 2011

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.

« C'est une chose de penser que l'on est sur le bon chemin, une autre de croire que ce chemin est le seul. »

Paulo Coelho, Sur le bord de la rivière Piedra, je me suis assise et j'ai pleuré.

A ma famille,
à la mémoire de mes grands parents

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier tous ceux qui ont rendu possible la réalisation de cette thèse et la participation des membres du jury pour l'évaluation des travaux.

Les travaux présentés ont été effectués au Laboratoire de Chimie Analytique BioInorganique et Environnement (LCABIE, UMR CNRS 5254 - IPREM) de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour. Je remercie Mme Martine Potin Gautier et M. Richard Lobinski de m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire.

Je remercie Mme Florence Pannier, Professeur à l'Université de Pau et des Pays de l'Adour qui a dirigé cette thèse, pour m'avoir laissé une grande liberté de travail et pour sa disponibilité.

Je remercie aussi Mme Maïté Bueno, Maître de Conférences à l'Université de Pau et des Pays de l'Adour et co-directrice de cette thèse, avec qui ce fut un grand plaisir de travailler. Je la remercie tout particulièrement pour sa gentillesse, son attention de tous les jours et sa bonne humeur. Je tiens aussi à la remercier pour sa patience (souvent mise à l'épreuve!) et sa persévérance pour me faire acquérir la rigueur scientifique.

Quiero agradecer al Pr. Carmen Cámara de la Universidad Computense de Madrid por sur reporte de esta tesis doctoral, y por venir.

Je suis également reconnaissante envers Mme Valérie Desauzier, Maître de recherche - HDR à l'Ecole des Mines d'Alès, d'avoir accepté de rapporter ce travail ainsi qu'à Mme Christelle Adam, chargée de recherche - HDR à l'IRSN, et Mme Martine Potin Gautier d'avoir accepté de faire partie du Jury de cette soutenance.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à tous ceux qui ont participé à ce travail :

Laurent Ouerdane, Maître de Conférences à l'Université de Pau et des Pays de l'Adour, pour son aide indispensable en spectrométrie de masse et ses nombreux conseils pour la réalisation de cette thèse. Ce fut un grand plaisir de travailler avec toi.

Hugues Preud'homme, Ingénieur d'étude au LCABIE, pour sa disponibilité et pour m'avoir formée aux joies de l'analyse en ICP-MS et triple quad.

Je remercie également Jérôme Frayret pour sa gentillesse, sa bonne humeur et son enseignement de l'astronomie. Rendez-vous pris au pic du Midi de Bigorre en compagnie de Sangria gratuite!! Monsieur Alain Castetbon, pour ses précieux conseils en chimie des solutions,

mais c'est sans oublier ceux sur la cueillette des champignons (souvent jaloués !!). Stéphane Dubascoux et Julien Héroult pour leur aide dans une multitude de petites de choses du quotidien d'un thésard qui font que l'on ne peut oublier leur soutien tout au long de cette expérience.

Je voudrais terminer en remerciant tous ceux que j'ai côtoyés au cours de ces trois années. Merci à tous pour vos sourires, vos rires et tous les bons souvenirs que nous avons partagés. Un clin d'œil au mousquetaire breton, américain, international pHd ! Merci pour ta bonne humeur et tes grands pétages de plombs qui ont égayé mon quotidien. A charge de revanche !

Une attention toutes particulière est portée à mes deux très chers collègues de bureau qui ont dû me supporter (et inversement !) tout au long de ces trois années.

Louloute, merci pour ton entrain (parfois un peu rude à 9h du mat !!), pour les matches de l'Aviron Bayonnais (Aupa Dax !!), pour ces soirées et week end passés ensemble... pour tout ce qui fait que tu es unique et que j'ai passé des moments inoubliables en ta compagnie. Mathieu, la dédicace tu ne m'en voudras pas, ira à tes fantastiques voyages dans les airs et les pauses cafés indispensables pour atterrir. Merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur. Merci à tous les deux pour tous nos grands moments de folie et pour votre soutien dans les baisses de régime.

Kasia, la meilleure des guides touristiques et la reine de la vodka à toutes les sauces, merci à toi pour ton aide et ton soutien. Merci pour les efforts que tu as dû faire pour qu'on puisse communiquer. C'est maintenant à mon tour de t'écrire un petit mot en polonais : Bardzo się cieszę, że spotkałam, dziękuję za dokonywanie mi odkryć Polska, przejdź do Kolobrzerg wokół wódki tabasco!!!

Un énorme merci à Sylvain pour ses encouragements et ces moments magiques du quotidien. Merci à toute la famille Mothes et en particulier à Yolande et Monette pour leur soutien, leur générosité, et l'inoubliable couscous !

Et enfin et surtout un grand merci à toute ma famille. Merci d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir soutenu, aidé et accompagné tout au long de ces années.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	2
LISTE DES TABLEAUX	4
LISTE DES ABREVIATIONS	5
INTRODUCTION GENERALE	7
Chapitre I : PROBLEMATIQUE SCIENTIFIQUE.....	11
I.A. A propos du sélénium	13
1. Généralités sur le sélénium	13
2. Le sélénium dans l'environnement.....	16
3. Rôle du sélénium dans l'organisme humain	22
I.B. Analyse de spéciation du sélénium dans l'urine.....	41
1. Etat actuel des recherches.....	41
2. Techniques analytiques	51
3. La spectrométrie de masse pour la détection et l'identification des composés du sélénium	79
4. BILAN : Enjeux de l'analyse du selenium dans l'urine et conditions analytiques.....	97
Chapitre II : ANALYSE DES FORMES SELENIEES DISSOUTES DANS L'URINE DE SUJETS NON SUPPLEMENTES	99
II.A. Optimisation de la séparation d'espèces séléniées par HPLC/ICP-MS et application à des échantillons d'urine humaine	101
1. Matériel et méthodes	101
2. Optimisation des conditions chromatographiques	108
3. Application à des échantillons d'urine	132
II.B. Extraction sur phase solide comme technique de préparation d'échantillon pour l'analyse de spéciation du sélénium dans l'urine.....	139
II.C. Identification d'un nouveau métabolite sélénié dans l'urine et le sang humains	165
II.D. Bilan sur l'analyse de formes séléniées dissoutes dans l'urine de sujets non supplémentés.....	175
Chapitre III : ANALYSE DES FORMES SELENIEES VOLATILES DANS L'URINE DE SUJETS NON SUPPLEMENTES	177
SYNTHESE GENERALE ET PERSPECTIVES.....	189
BIBLIOGRAPHIE	195

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Cycle biogéochimique du sélénium.....	16
Figure 2: Représentation schématique du métabolisme du sélénium chez les plantes.....	21
Figure 3: Apports séléniés quotidiens ($\mu\text{g}/\text{jour}$) dans différents pays.....	23
Figure 4: Répartition en pourcentage des apports alimentaires journaliers en sélénium.....	24
Figure 5: Apports quotidiens en sélénium et effets physiologiques correspondants.....	28
Figure 6: Métabolisme des espèces séléniées chez l'homme.....	35
Figure 7: Formation de l'ARNt-sélénocystyl chez les eucaryotes, acteur principal de l'incorporation spécifique de la sélénocystéine dans les protéines.....	36
Figure 8: Espèces séléniées dont la présence dans l'urine humaine normale a été confirmée.....	42
Figure 9: Mécanisme d'excrétion du sélénosucre majoritaire présent dans l'urine (SeGal).....	44
Figure 10: Schéma du système de microextraction sur phase solide (SPME) avec comme phase sorbante CAR/PDMS.....	60
Figure 11: Procédure de microextraction sur phase solide.....	60
Figure 12: Stratégie généralement utilisée pour l'identification des métabolites séléniés dissous par l'utilisation complémentaire de l'HPLC-ICPMS et de l'HPLC-ESI-MS/MS.....	78
Figure 13: Schéma de l'ICP/CCR/MS.....	80
Figure 14: Principe de l'électrospray en mode positif (ESI ⁺).....	85
Figure 15: Mécanisme de formations des ions pseudomoléculaires.....	87
Figure 16: Fonctionnement de la source d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI).....	88
Figure 17: Schéma d'un analyseur de masse quadripolaire.....	90
Figure 18: Représentation schématique d'un triple quadripôle en mode fragmentation.....	92
Figure 19: Différents modes de balayage utilisés par un triple quadripôle.....	93
Figure 20: Schéma du LTQ-Orbitrap.....	94
Figure 21: Coupe transversale de l'Orbitrap décrivant le mouvement des ions dans la cellule.....	96
Figure 22: Charge apparente de SeMet, SeCyst, SeIV, SeVI en fonction du pH.....	109
Figure 23: Chromatogramme d'un mélange d'étalons à $10 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ par espèce dans H ₂ O.....	111
Figure 24: Evolution de la rétention de composés séléniés en fonction du pH de la phase mobile.....	112
Figure 25: Evolution de la rétention des étalons séléniés en fonction de la concentration en acide heptafluorobutyrique (HFBA).....	114
Figure 26: Chromatogramme d'un mélange des étalons à $0.5 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ dans H ₂ O.....	115
Figure 27: Chromatogrammes d'un mélange des étalons à $0.5 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ dans urine diluée.....	116
Figure 28: Chromatogramme des étalons ($10 \mu\text{g}(\text{Se})/\text{L}$ par espèce) dans H ₂ O.....	117
Figure 30: Chromatogramme des étalons ($10 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ par espèce) dans urine diluée (1 : 9) dans HFBA 10 mM.....	120
Figure 31: Chromatogramme de MeSeOOH à $2 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ dans urine diluée (1 : 9) dans H ₂ O (trait plein noir) ; dans urine diluée (1 : 19) dans H ₂ O (trait gris);.....	120
Figure 32: Chromatogramme de MeSeOOH à $2 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ dans urine diluée (1 : 9) dans H ₂ O (trait gris) ; dans phase mobile (trait noir en pointillé) ; dans HFBA 10 mM (trait plein noir).....	121
Figure 33: Chromatogramme de l'étalon TMS ⁺ à $1 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ dans urine diluée.....	122
Figure 34: Chromatogramme d'un mélange des étalons TMS ⁺ et SeGal à $1 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ dans urine diluée (1 : 9) dans phase mobile.....	123
Figure 35: Gradient en MeOH, colonne C18.....	124
Figure 36: Chromatogrammes d'un échantillon d'urine diluée (1 : 9) dans phase mobile obtenus en mode isocratique (trait noir) et en mode gradient (trait gris).....	124
Figure 37: Gradient en MeOH, colonne PGC.....	125
Figure 38: Chromatogrammes d'un échantillon d'urine diluée (1 : 9) dans HFBA 10 mM obtenus en mode isocratique (trait noir) et en mode gradient (trait gris).....	125
Figure 39: Durée d'analyse et espèces analysées en fonction du mode chromatographique utilisé.....	128
Figure 40: Chromatogrammes d'un échantillon d'urine sans (trait noir) et avec (trait gris) ajout d'un mélange de TMS ⁺ et SeGal a) colonne C18 ; b) colonne PGC ; c) colonne échangeuse de cations.....	134
Figure 41: Chromatogrammes d'un échantillon d'urine dilué (1 : 9) dans a) H ₂ O b) 10 mM HFBA c) 20 mM HFBA d) 30 mM HFBA.....	135

Figure 42: Chromatogramme d'un ajout de TMSe^+ ($1 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$) (trait pointillés gris) dans urine diluée (1 : 9) dans 20mM HFBA (trait noir) (colonne PGC)..... 136

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Masse atomique et abondance isotopique et relative, des isotopes stables du sélénium.....	14
Tableau 2: Principales espèces chimiques sélénées présentes dans l'environnement.....	17
Tableau 3: Concentration en sélénium dissous ($\mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$) dans différentes eaux	19
Tableau 4: Teneurs en sélénium dans certains éléments provenant du marché français.....	24
Tableau 5: Sélénoprotéines connues présentes chez l'homme et leurs fonctions	29
Tableau 6: Apports journaliers en sélénium recommandés pour les différentes classes d'âge	31
Tableau 7: Toxicité de quelques espèces sélénées chez le rat.....	33
Tableau 8: Bilan et résultats des techniques d'extraction par SPE appliquées à l'étude des métabolites sélénés dans l'urine humaine.....	55
Tableau 9: Caractéristiques des principales fibres SPME disponibles.....	59
Tableau 10: Récapitulatif des techniques de chromatographie liquide utilisées pour la séparation de composés sélénés dissous dans l'urine.....	63
Tableau 11: Principales interférences isobariques et polyatomiques des isotopes du soufre et du sélénium rencontrés en spectrométrie de masse élémentaire ICPMS.....	84
Tableau 12: Résolution en fonction du temps passé par un ion dans l'Orbitrap.....	96
Tableau 13: Espèces sélénées étudiées commercialement disponibles.....	101
Tableau 14: Caractéristiques des réactifs utilisés pour les phases mobiles chromatographiques	103
Tableau 15: Paramètres de l'ICPMS pour l'analyse du sélénium.....	104
Tableau 16: Caractéristiques des colonnes HPLC.....	105
Tableau 17: Amélioration de la qualité de la séparation par ajout de HFBA 10 mM à l'échantillon	118
Tableau 18: Récapitulatif des conditions chromatographiques et des espèces séparées pour l'analyse d'un échantillon d'urine.....	127
Tableau 19: Performances analytiques, colonne C18.....	129
Tableau 20: Performances analytiques, colonne PGC	130
Tableau 21: Performances analytiques, colonne échangeuse de cations.....	131
Tableau 22: Pentes des droites d'étalonnage individuelles des composés sélénés.....	132
Tableau 23: Récapitulatif des temps de rétention des pics chromatographiques détectés dans différents échantillons urine dilués dix fois.....	134
Tableau 24: Concentrations en TMSe^+ , SeGal et sélénium total (en $\mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$) dans différents échantillons d'urine.....	137

LISTE DES ABREVIATIONS

Techniques analytiques

AAS :	spectrométrie d'absorption atomique
AE :	échange d'anions
AFS :	spectrométrie de fluorescence atomique
APCI-MS/MS :	spectrométrie de masse tandem à source d'ionisation chimique à pression atmosphérique
APGC-MS/MS :	spectrométrie de masse tandem à pression atmosphérique en phase gazeuse
CEx :	échange de cations
CC/R :	cellule de collision/réaction
DPCSV :	voltamétrie de redissolution cathodique pulsée
CE :	électrophorèse capillaire
ESI-MS/MS:	spectrométrie de masse tandem à source d'ionisation électrospray
FAAS :	spectrométrie d'absorption atomique de flamme
HG :	génératrice d'hydrures
HPLC :	chromatographie liquide à haute performance
GC :	chromatographie gaz
GC-APGC-QQQ :	chromatographie gaz à source à pression atmosphérique en phase gazeuse couplée à un triple quadropôle
ICPMS :	spectrométrie de masse à plasma induit
ICPAES :	spectrométrie d'émission atomique à plasma induit
MIP-AES :	spectrométrie d'émission atomique à plasma induit par micro-ondes
MS :	spectrométrie de masse
MS/MS :	spectrométrie de masse tandem
MW :	micro-ondes
PGC:	carbone graphitique poreux
RP :	phase inverse
SEC :	chromatographie d'exclusion stérique
SPE :	extraction sur phase solide
SPME :	microextraction sur phase solide
UV :	ultraviolet
VG:	génératrice de vapeur

Composés séléniés

AdoSeMet :	adénosylsélénométhionine
DMDSe :	diméthyldiséléniure
DMSe :	diméthylséléniure
DMSeS :	diméthylsélényl sulfure
MMeSe :	monométhyl séléniol
MeSeCyst :	méthylsélénocystéine
MeSeMet :	méthylsélénométhionine
MeSeOOH :	acide méthaneséléniénique
Se :	sélénium
SeIV :	sélénite
SeVI :	séléniate
SeCyst :	sélénocystine
SeMet :	sélénométhionine
SeGal :	séleno-méthyl-N-acétyl-sélenogalactosamine
SeGlu :	séleno-méthyl-N-acétyl-glucosamine
SeUr :	séléniourée
TMSe ⁺ :	ion triméthylsélénonium

INTRODUCTION GENERALE

Le sélénium (Se) est un oligoélément. Il est essentiel au bon fonctionnement de l'organisme. On le trouve dans l'alimentation, en fortes concentrations dans certains végétaux comme l'ail et le chou. La dose journalière recommandée est d'environ 70 $\mu\text{g}(\text{Se})/\text{jour}$ [1]. Depuis peu, son rôle dans la lutte contre le cancer ainsi que ses propriétés d'antioxydant sont reconnues. Actuellement, de nombreux compléments alimentaires enrichis en sélénium sont disponibles en vente libre et suscitent un grand engouement. Cependant, en raison de la marge de sécurité relativement étroite entre les aspects toxiques et bénéfiques de l'élément, et de la susceptibilité individuelle, l'utilisation des compléments alimentaires séléniés est remise en cause [2, 3]. En effet, à une dose à peine dix fois supérieure à la dose journalière recommandée de 55 $\mu\text{g}(\text{Se})/\text{j/pers}$ selon le Food and Nutritional Board, il peut, selon la forme chimique sous laquelle il est ingéré, devenir toxique. La toxicité ainsi que les mécanismes d'action du sélénium dépendent de la molécule ingérée.

Si les effets du sélénium sont maintenant reconnus, ses mécanismes d'action ainsi que les transformations métaboliques de ses composés dans le corps humain ne sont toujours pas bien déterminés. Il est nécessaire de mieux comprendre son métabolisme afin de contrôler les apports et ainsi adapter la dose et la forme à ingérer.

L'urine étant la principale voie d'excrétion du sélénium, l'étude de cette matrice semble appropriée à la caractérisation de métabolites. Le but de nos recherches est d'identifier et de quantifier les formes chimiques séléniées excrétées par des sujets non supplémentés afin de mieux comprendre les processus de métabolisation et de pouvoir mettre en évidence des biomarqueurs du niveau d'exposition.

L'analyse de spéciation du sélénium dans l'urine reste un challenge analytique pour trois raisons principales : la faible teneur en sélénium de l'échantillon (de 10 μg à 80 $\mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$), la complexité de la matrice (urée, protéines, concentrations en sodium et potassium de l'ordre de 50 à 150 $\text{mmol}.\text{L}^{-1}$ [4]) ainsi que le faible nombre d'étalons commercialement disponibles. Actuellement, de par sa grande sensibilité et capacité à détecter spécifiquement le sélénium, le spectromètre de masse à plasma induit (ICPMS), couplé à une technique séparative pour l'analyse de spéciation, est le détecteur le plus couramment utilisé pour l'étude de matrices complexes à faible teneur en élément. Toutefois, malgré ses performances, cette méthode de détection ne permet pas d'aboutir à l'identification structurale de composés inconnus. Pour y parvenir, une approche complémentaire utilisant la spectrométrie de masse moléculaire est donc également nécessaire.

La manipulation des échantillons d'urine, matrice biologique complexe, est particulièrement délicate pour l'analyse de spéciation. Depuis le prélèvement jusqu'à l'analyse, il est important de maintenir les espèces sous leur forme originelle.

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont ainsi consisté à développer des protocoles analytiques et à améliorer les techniques existantes pour la détermination des espèces sélénées dissoutes et volatiles présentes dans l'urine de sujets non supplémentés.

Le premier chapitre de ce mémoire présente une étude bibliographique introductive générale sur le sélénium. Un intérêt tout particulier est porté au métabolisme du sélénium chez l'homme et sur les formes chimiques détectées dans l'urine. Les avantages et inconvénients des méthodes analytiques utilisées pour les analyses de spéciation du sélénium relevées dans la littérature, y sont ensuite présentés. Pour finir, les principes des outils analytiques utilisés dans ce travail sont détaillés.

Les méthodes analytiques développées lors de cette thèse pour l'analyse des formes sélénées dissoutes rencontrées dans l'urine de sujets non supplémentés font l'objet du deuxième chapitre composé de trois parties. L'optimisation de la séparation des formes dissoutes de Se par couplage de la chromatographie liquide à l'ICPMS est exposée dans la première partie. Les conditions optimales sont alors appliquées à l'analyse d'échantillons d'urine et les performances analytiques dans la matrice d'étude sont étudiées.

Afin d'améliorer ces performances, une étape d'extraction et/ou de préconcentration de l'échantillon a été développée et fait l'objet de la deuxième partie. Elle est présentée dans l'article "*Solid phase extraction for selenium species determination in normal human urine*" soumis pour publication au journal Analytica Chimica Acta. La stabilité des composés d'intérêt au cours du traitement, fait également partie de l'étude.

La troisième partie présente l'utilisation de la spectrométrie de masse structurale en complément des techniques développées dans les parties précédentes afin d'identifier un nouveau composé. Ce travail est présenté dans l'article "*Identification in human urine and blood of a novel selenium metabolite, Se-methylselenoneine, a potential biomarker of metabolism in mammals of the naturally occurring selenoneine, by HPLC coupled to electrospray hybrid linear ion trap-orbital ion trap MS*" paru dans le journal Metallomics.

Le troisième chapitre de ce mémoire est consacré à l'analyse des composés sélénés volatils dans l'urine et à l'étude de leur stabilité. Différentes conditions de manipulations et de stockage des échantillons ont été comparées. Les résultats de ces travaux sont présentés dans l'article "*Study of volatile selenium metabolites stability in normal urine: effects of sample handling and storage conditions*" paru dans le Journal of Analytical Atomic Spectrometry.

Enfin, une conclusion générale sur les travaux présentés dans ce mémoire et les perspectives associées sont exposées dans le dernier chapitre.

Chapitre I

PROBLEMATIQUE SCIENTIFIQUE

I.A. A PROPOS DU SELENIUM

1. GENERALITES SUR LE SELENIUM

1.1 Historique sur le sélénium

Le sélénium a été découvert en 1817 par le chimiste suédois Jöns Jacob Berzelius en observant le résidu rougeâtre de préparation de l'acide sulfurique qui recouvrait le sol d'une manufacture. Quand il a observé le dépôt, Berzelius a constaté la présence d'une substance jusqu'alors inconnue avec des propriétés très proches de celles du tellure découvert peu de temps avant. Par analogie à « tellus » se rapportant à notre planète, il a nommé ce nouvel élément sélénium d'après le nom de la déesse grecque « séléne » (personnification de la lune).

Bien que Berzelius soit connu pour avoir caractérisé le sélénium, c'est Marco Polo qui, en 1295, a le premier observé l'aspect toxique de cet élément. Lors d'une de ses expéditions en Chine, il a décrit les effets d'une plante toxique, l'astragale, sur ses chevaux qui perdaient leurs sabots après l'avoir ingérée. Ce n'est que bien des années plus tard que les scientifiques ont découvert la capacité de cette plante à capter le sélénium présent dans le sol à des teneurs élevées et à l'accumuler jusqu'à une teneur toxique [5].

Il a fallu ensuite attendre les travaux de Schwartz et Foltz en 1957 [6] pour découvrir son rôle essentiel pour les êtres vivants par sa capacité de prévenir chez le rat diverses maladies de carence nutritionnelle (atrophie du foie, dystrophie musculaire...). Ces affections qui touchaient de nombreuses espèces animales, pouvaient avoir des conséquences économiques désastreuses [7] et sont aujourd'hui prévenues par un apport adéquat de sélénium dans les rations alimentaires des animaux d'élevage. La découverte de son essentialité pour les humains est liée à un épisode dramatique qui entraîna la mort de 57 habitants d'un village dans le comté de Keshan, province chinoise d'Heilongjiang, suite à une cardiomyopathie causée par une carence en sélénium. Enfants et femmes enceintes furent les victimes principales de cette maladie qui a entraîné la mort de 10 millions de sujets en un siècle [8, 9]. A partir de 1978, une supplémentation systématique en sélénite de sodium (Na_2SeO_3) a permis l'éradication presque totale de la maladie [10]. Une déficience en sélénium est également impliquée dans la maladie de Kashin Beck, une pathologie articulaire observée chez les enfants de 5 à 13 ans, en Chine du Nord, en Corée du Nord et au Tibet [11, 12]. Une analyse des sols a montré un appauvrissement important en

sélénium et donc un apport alimentaire journalier ($\leq 10 \mu\text{g}(\text{Se})/\text{jour}$) au minimum 5 fois plus faible que la dose journalière recommandée ($50 - 80 \mu\text{g}(\text{Se})/\text{jour}$) [13].

1.2. La chimie du sélénium

Le sélénium est classé parmi les éléments métalloïdes, *i.e.* dont les propriétés physiques et chimiques sont intermédiaires entre celles d'un métal et d'un non-métal, tout comme l'arsenic, le tellure et le bismuth (point de fusion : 217°C ; point d'ébullition : 685°C). Son poids atomique est de 78.96 et son symbole Se. De numéro atomique 34, il se situe à la ligne 4 du tableau périodique, groupe 16, entre le soufre et le tellure. Le sélénium peut exister sous formes organiques et inorganiques et sous cinq degrés d'oxydation : +VI (séléniate), +IV (sélénite), -II (sélénure), -I (disélénure) et 0 (Se élémentaire). Le sélénium possède 6 isotopes naturels stables dont les abondances sont présentées Tableau 1. Il comporte également plusieurs isotopes radioactifs produits de la fission nucléaire dont le ^{79}Se , émetteur de longue période (2.8×10^5 ans) ainsi que le ^{75}Se de période 119.8 jours, utilisé en tant que traceur [14].

Tableau 1: Masse atomique et abondance isotopique et relative, des isotopes stables du sélénium (d'après [15, 16])

Isotope	Masse atomique	Abondance naturelle (%)	Abondance relative (par rapport à ^{80}Se)
^{74}Se	73.92247	0.89	1.79
^{76}Se	75.91921	9.37	18.89
^{77}Se	76.91991	7.63	15.38
^{78}Se	77.91731	23.77	47.91
^{80}Se	79.91651	49.61	100.00
^{82}Se	81.91669	8.73	17.60

Les propriétés chimiques du sélénium sont proches de celles du soufre [17]. Les séléniures ressemblent aux sulfures en apparence, composition et propriétés. Le sélénium est facilement capable de se substituer au soufre pour former une grande variété de composés organiques séléniés, principalement dans les milieux biologiques. Les composés organiques avec des liaisons C-Se sont nombreux et incluent les séléniols (RSeH), les sélénoéthers (R_2Se et R_2Se_2), les composés mixtes soufrés (RSSeSR ou RSSeH) ainsi que les molécules présentant une activité biologique telles que les acides aminés, les sélénosucres et les sélénoprotéines. Le sélénium peut aussi former des halogénures (RSeX) en réagissant rapidement avec les ions fluorure et chlorure, le même type de réaction avec les ions bromure et iodure étant plus lente [18]. Le sélénium a également la propriété de réduire la toxicité de nombreux métaux tels que le

mercure, le cadmium, l'argent, le cuivre, l'arsenic par formation de complexes organométalliques [19]. Le sélénium réagit aussi avec l'oxygène pour former des oxydes, le plus stable étant le dioxyde de sélénium [18].

1.3. Le sélénium et les activités anthropiques

A l'heure actuelle, le sélénium est utilisé dans de nombreuses activités humaines parmi lesquelles on trouve le secteur de l'électronique et de la photographie grâce à ses propriétés semi-conductrices [20]. Il est également contenu dans les pigments qui sont utilisés dans les plastiques, le verre, les peintures, l'encre, les émaux, le caoutchouc [20]. On le trouve aussi comme catalyseur dans la préparation de composés pharmaceutiques (par exemple la cortisone), ainsi qu'en tant qu'ingrédient des shampoings antipelliculaires [21] et des fongicides [22].

Les différents usages du sélénium et de ses composés constituent une source de rejet dans l'atmosphère et autres compartiments de l'environnement. La combustion du charbon et autres carburants fossiles est également une source importante des composés séléniés dans l'atmosphère, et dans une moindre mesure l'incinération de papier, des pneus et des déchets municipaux [23]. L'estimation des émissions annuelles de sélénium dans l'air aux Etats-Unis en 1969-1971, 1978, et 1983 était respectivement de 900, 1240, et 1560 tonnes (Se)/an [24]. En 2005, la valeur moyenne de sélénium émise par la France est environ 100 fois inférieure à celle émise par les Etats Unis en 1983, soit 15 tonnes (Se)/an [25]. À l'échelle mondiale, on estime que les sources anthropiques introduisent entre 10 000 et 72 000 t (Se)/an dans les écosystèmes aquatiques, et entre 6 000 et 76 000 t (Se)/an dans les sols [26]. Du fait de sa bioaccumulation dans les organismes et de son aspect toxique à des concentrations à peine dix fois supérieures à celles recommandées, la teneur en sélénium dans les différents compartiments environnementaux est régulièrement surveillée.

D'un autre coté, l'aspect bénéfique du sélénium sur la santé humaine justifie son utilisation dans le domaine médical ou en tant que complément alimentaire pour l'Homme et les animaux. Bien que ses effets soient reconnus, les mécanismes d'action du sélénium sont actuellement toujours mal compris. La barrière entre ses aspects essentiel et toxique, très étroite, est facilement franchissable, d'où l'intérêt de recherches en protéomique et depuis peu en métabolomique afin de mieux adapter la dose et la forme à faire ingérer aux patients pour une efficacité optimale.

2. LE SELENIUM DANS L'ENVIRONNEMENT

2.1. Le cycle biogéochimique du sélénium

Le sélénium est distribué de manière hétérogène dans tous les compartiments environnementaux. Ce contraste de distribution a été fortement amplifié par les activités humaines. L'interaction entre les réservoirs environnementaux constitue le cycle biogéochimique du sélénium, représenté Figure 1. Afin de mieux déterminer la disponibilité et la toxicité de cet élément, il est nécessaire de connaître sa spéciation dans l'environnement. Les principales formes chimiques du sélénium rencontrées dans l'environnement sont présentées dans le Tableau 2. Les transformations, la mobilité et l'accumulation du sélénium dans l'environnement dépendent de plusieurs facteurs tel que le pH, les conditions rédox, la température, l'activité microbienne ou la présence d'éléments minéraux [20]. Les formes les plus communes dans les eaux de surface et les sols sont les sélénites $\text{HSeO}_3^- / \text{SeO}_3^{2-}$ (+IV) et sélénates SeO_4^{2-} (+VI). Ces formes inorganiques sont très solubles, mobiles, biodisponibles et potentiellement toxiques [27]. Les formes organiques séléniées (-II, -I) proviennent des réductions biologiques par méthylation du sélénium (diméthylséléniure, diméthyldiséléniure...) ou par assimilation dans la biomasse (acides aminés séléniés, métabolites) [28].

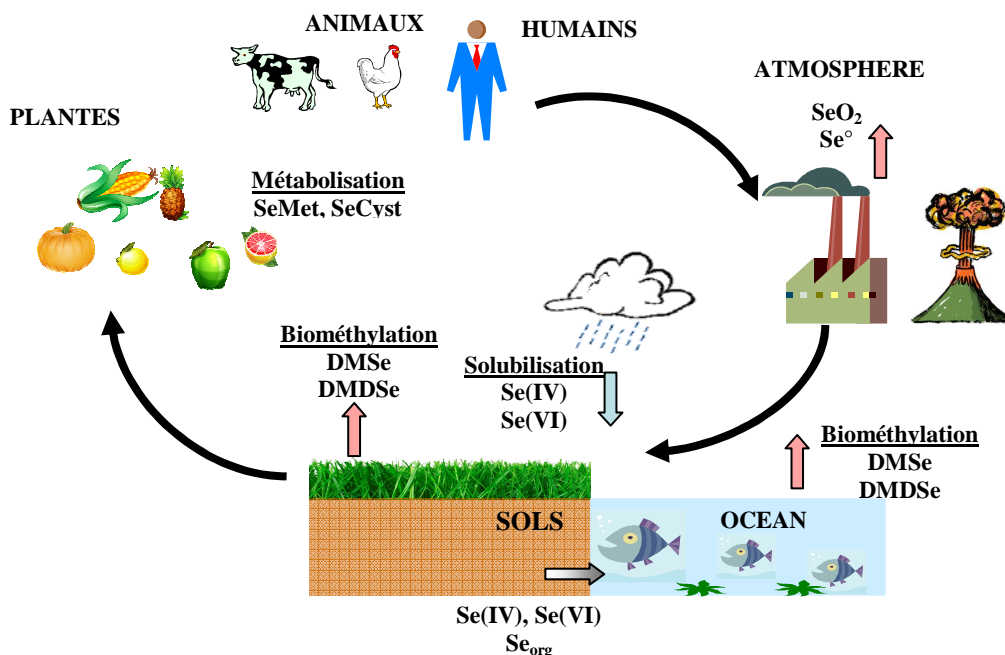


Figure 1: Cycle biogéochimique du sélénium
(d'après [29, 30])

Tableau 2: Principales espèces chimiques sélénées présentes dans l'environnement

Nom	degré d'oxydation	Formes chimiques brutes
Formes inorganiques		
Séléniure	-II	Se ²⁻
Sélénium élémentaire	0	Se ⁰
Dioxyde de sélénium	+IV	SeO ₂
Sélénite	+IV	HSeO ₃ ⁻ / SeO ₃ ²⁻
Séléniate	+VI	SeO ₄ ²⁻
Formes organiques		
<i>Formes méthylées</i>		
Méthylséléniol	-II	CH ₃ -SeH
Diméthylséléniure	-II	CH ₃ -Se-CH ₃
Diméthyldiséléniure	-I	CH ₃ -Se-Se-CH ₃
Ion Triméthylsélénonium	-II	(CH ₃) ₃ Se ⁺
<i>Acides aminés</i>		
Sélocystine	-I	HCOO-CH(NH ₂)-CH ₂ -Se-Se-CH(NH ₂)-COOH
Sélocméthionine	-II	H ₃ N ⁺ -CH(COO ⁻)-CH ₂ -CH ₂ -Se-CH ₃
<i>Métabolites</i>		
Se-méthylsélocméthionine	-II	H ₃ N ⁺ -CH(COO ⁻)-CH ₂ -CH ₂ -Se ⁺ -(CH ₃)
Séloccystéine	-II	H ₃ N ⁺ -CH(COO ⁻)-CH ₂ -SeH
Se-méthylséloccystéine	-II	H ₃ N ⁺ -CH(COO ⁻)-CH ₂ -Se-CH ₃
Séloccystamine	-I	H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -Se-Se-CH ₂ -CH ₂ -NH ₂
Séloccystathionine	-II	H ₃ N ⁺ -CH(COO ⁻)-CH ₂ -CH ₂ -Se-CH ₂ -CH(COO ⁻)-NH ₃ ⁺
Sélochomocystéine	-II	H ₃ N ⁺ -CH(COO ⁻)-CH ₂ -CH ₂ -Se-H
Se-adénosylsélochomocystéine	-II	H ₂ N-CH(COOH)-CH ₂ -CH ₂ -Se-CH ₂ -C ₄ H ₅ O ₃ C ₅ N ₄ -NH ₂

2.2. Le sélénium dans le sol

Le sélénium est le 69^{ème} élément par ordre d'abondance dans la croûte terrestre. Son taux moyen est de 0.09 µg(Se).g⁻¹ [31]. Les eaux d'infiltration et de surface, le climat et la topographie influencent la teneur en sélénium dans le sol tout comme certaines activités naturelles (éruptions volcaniques..) et humaines (émissions industrielles, utilisation de pesticides...). Les concentrations en sélénium dans les sols dépendent en partie du type de roche [32, 33]. Le sélénium est surtout concentré dans les sulfures minéraux (galène PbS, chalcopryrite CuFeS₂, pyrite FeS₂). Ainsi, dans les roches volcaniques, les concentrations peuvent atteindre 120 mg(Se).g⁻¹ tandis qu'elles varient de 0.47 à 8.1 µg(Se).g⁻¹ dans le charbon [34]. La plupart des sols contiennent entre 0.01 et 2 µg(Se).g⁻¹ [35]. Cependant des valeurs extrêmes peuvent être observées dans certaines parties du monde [36]. Des régions du Danemark, Nouvelle Zélande, Chine sont connues pour être des zones déficientes en sélénium (séléniprives). A l'inverse, des zones particulièrement riches en sélénium (sélénifères) ont été observées en Irlande, Australie, Canada, Colombie et Etats-Unis. Les écarts de concentration entre zones

séléniprives et sélénifères peuvent s'étendre de $0.1 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{g}^{-1}$ (Nouvelle Zélande) à $1200 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{g}^{-1}$ (Irlande) [37].

Les séléniures de métaux lourds et les sulfures de sélénium sont insolubles et prédominent dans les sols acides ou les sols contenant de grandes quantités de matière organique. Les sélénites de sodium et de potassium sont dominants dans des sols minéraux, de pH neutre et bien drainés. Les sélénites sont solubles, mais peuvent être fortement adsorbés par les minéraux du sol ou les matières organiques. Les séléniates, fortement solubles et donc très mobiles, prédominent dans les sols alcalins et oxydés [25].

2.3. Le sélénium dans l'eau

Le sélénium apparaît dans les eaux naturelles généralement à l'état de trace comme le résultat de procédés biogéochimiques tels que l'érosion des sols, la pluie et/ou les échanges avec l'atmosphère. Le lessivage des sols engendre des teneurs variables en fonction de la richesse des sols traversés et du pH de l'eau. La répartition des espèces et la concentration totale varient aussi selon la salinité, la température, la teneur en oxygène, les radiations solaires [38]. Les concentrations dans les eaux souterraines et superficielles sont généralement comprises dans une gamme $0.06 - 400 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ et sont habituellement supérieures aux teneurs présentes dans les eaux marines (de l'ordre de quelques dizaines de $\text{ng}.\text{L}^{-1}$) [39]. Dans les eaux potables, la teneur est le plus souvent très faible, inférieure ou égale à $1 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$. La limite légale de potabilité fixée à $10 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ par l'organisation mondiale de la santé (OMS) [40] est donc très rarement dépassée (sur 100 échantillons d'eau du robinet analysés aux Etats Unis, 99.5 ont une teneur en sélénium inférieure à $10 \mu\text{g}.\text{L}^{-1}$ [18]). Cependant, certaines sources hydrothermales, comme par exemple celles de la Roche-Posay, en contiennent des quantités importantes ($60 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$), ce qui leur confère des propriétés thérapeutiques. Les teneurs moyennes en sélénium mesurées dans différentes eaux sont rassemblées Tableau 3. Dans les eaux, le sélénium est essentiellement présent sous forme inorganique aux états d'oxydation +IV et +VI [41]. Cependant, dans les eaux potables, les séléniates sont majoritaires, sans doute du fait du traitement de désinfection par chloration [42, 43].

Tableau 3: Concentration en sélénium dissous ($\mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$) dans différentes eaux (d'après [39, 40])

Pays	Eau potable	Eau de rivière	Océans/Mers	Eau de mer
Belgique	0.05 - 0.37	< 0.05 - 1.78	Atlantique	0.028 - 0.162
France	< 2 - 10	0.15 - 10	Indien	0.044 - 0.170
Allemagne	< 0.12 - 5.3	0.14 - 5	Méditerranée	0.040 - 0.130
Pays-Bas	0.16	0.2 - 1.85	Pacifique	0.039 - 0.400
Royaume Uni	<1 - 3.3	< 1 - 3.3	Mer du Japon	0.023 - 0.110
U.S.A.	< 0.2 - 3.5	< 0.05 - 1.78	Mer du Nord	0.045 - 0.130

2.4. Le sélénium dans l'atmosphère

Le sélénium peut se trouver dans l'atmosphère sous forme gazeuse ou aérosol. Les sources qui contribuent à sa présence peuvent être d'origine naturelle (60%) ou anthropique (40%). La principale source anthropique de sélénium dans l'atmosphère est la combustion des énergies fossiles (cf. I.A. §1.3.). Les émissions volcaniques représentent la plus importante des sources naturelles, suivies des processus de biométhylation (via les bactéries, les algues, les plantes), qui libèrent des composés volatils du sélénium tels que le diméthylséléniure (DMSe) et le diméthyldiséléniure (DMDSé). Ces composés peuvent également être exhalés par les animaux et l'homme, ce qui correspond à l'un des modes d'élimination du sélénium [31]. Les teneurs en sélénium dans l'atmosphère sont également influencées par l'altitude et le climat [44]. La valeur limite tolérable la plus couramment citée pour de nombreux composés séléniés est de 0.2 $\text{mg}(\text{Se}).\text{m}^{-3}$ [45, 46]. La concentration moyenne de sélénium atmosphérique est évaluée à 0.04 $\text{ng}(\text{Se}).\text{m}^{-3}$ avec des variations entre 0.1 et 10 $\text{ng}(\text{Se}).\text{m}^{-3}$ dans la plupart des zones urbaines [1] et peut atteindre jusqu'à 500 $\text{ng}(\text{Se}).\text{m}^{-3}$ à proximité de certaines industries [47].

2.5. Le sélénium dans les plantes

L'homme et les animaux ont pour point commun leur régime alimentaire qui place les plantes comme source première de leur alimentation. La connaissance des composés séléniés présents dans les plantes est donc nécessaire avant d'étudier le métabolisme chez les êtres vivants.

Les plantes sont capables d'incorporer le sélénium (à partir du sol, de l'atmosphère, de l'eau) principalement en tant que sélénite ou séléniate, de le transporter, de le métaboliser et ainsi de le rendre disponible pour les animaux et les humains [48, 49]. Dans le cas des plantes

terrestres, les sélénates, principale source de sélénium dans les sols, sont plus facilement assimilés que les sélénites [50]. Par contre, en ce qui concerne les plantes aquatiques, il semblerait que les sélénites soient assimilés plus largement, plus rapidement et bioaccumulés plus facilement que les sélénates [51]. L'absorption du sélénium par la plante dépend principalement de la concentration et des formes physico chimiques de Se présentes dans le sol. Certaines propriétés du sol tels que le pH, la salinité, l'humidité, les conditions redox, le type de roches, la présence de sels minéraux (l'utilisation de fertilisants contenant du sulfate, du phosphore, ou de l'azote peut diminuer l'absorption du sélénium [31]), influencent la distribution et la disponibilité de Se [52-55]. La teneur en protéines de la plante est un autre facteur important qui influence la présence de sélénium dans la plante car Se a la faculté de pouvoir substituer le soufre dans les acides aminés [28]. La capacité d'absorber, d'accumuler et de métaboliser le sélénium diffère donc d'une espèce à une autre. Ainsi, selon ce critère, les plantes ont été classées en différents groupes :

- les plantes hyperaccumulatrices qui ne poussent que sur des sols très riches en sélénium. Elles accumulent entre 1000 et 10 000 $\mu\text{g}(\text{Se}).\text{g}^{-1}$. Dans cette catégorie on trouve entre autres *l'Astragalus* [56], *Oenopsis condensata* et *Stanleya pinnata* [49] ;
- les plantes accumulatrices secondaires qui poussent dans des sols avec des teneurs en sélénium très variables. Elles peuvent accumuler de 30 à 1000 $\mu\text{g}(\text{Se}).\text{g}^{-1}$. Dans cette catégorie on trouve les céréales, certaines plantes de la famille des crucifères avec par exemple le colza et le brocoli, ainsi que quelques espèces de *l>Allium* dont l'ail et l'oignon [57] ;
- Les plantes non-accumulatrices sont celles qui contiennent moins de 30 $\mu\text{g}(\text{Se}).\text{g}^{-1}$. C'est le cas de la plupart des plantes utilisées pour l'alimentation humaine ou animale (fourrage, légumes, fruits...) qui contiennent de 0.1 à 0.5 $\mu\text{g}(\text{Se}).\text{g}^{-1}$.

En ce qui concerne la métabolisation du sélénium par les plantes, il a été clairement établi que le sélénium et le soufre suivent des voies similaires utilisant les mêmes enzymes [54]. Il en résulte une compétition entre ces deux éléments à différents niveaux du métabolisme. Les sélénates sont absorbés par le transporteur des sulfates. Il existe donc une compétition d'absorption entre les sulfates et les sélénates. Après absorption, les sélénates sont transportés aux chloroplastes *via* la voie des sulfures. Ils sont transformés en adénosine 5'-phosphosélénate par l'Adénosine Tri Phosphate sulfurylase (ATP sulfurylase). Cette étape serait une des étapes limitant l'assimilation du sélénate [58]. Puis, l'adénosine 5'-phosphosélénate est réduite en sélénite puis en séléniure en présence de glutathion (GSH). La résultante de ce métabolisme est la production d'acides aminés séléniés, comme la sélénométhionine et la sélélocystéine, qui sont

ensuite incorporés dans les protéines. Contrairement au métabolisme des animaux, il n'existe pas chez les plantes de codon spécifique pour l'incorporation des acides aminés dans les protéines, les acides aminés sélénisés entrant alors en compétition avec leurs homologues soufrés (par exemple pour les céréales, la sélénométhionine est incorporée en compétition avec la méthionine [59]). La Figure 2 présente de façon simplifiée la route métabolique du sélénium dans les plantes telle que décrite par Whanger en 2003 [60]. Suite à une série d'étapes biochimiques, en particulier chez les plantes accumulatrices, une partie du sélénium absorbé est transformée en espèces méthylées volatiles [61]. Cette volatilisation, reconnue comme processus de détoxication [62], est appelée phytoremédiation [63]. Le produit principal de volatilisation est le diméthylsélénium (DMSe). Il peut être formé via deux chemins réactionnels différents : à partir de la méthylsélénométhionine (MeSeMet) [64] ou à partir du diméthylsélénioniopropionate (DMSeP) [54].

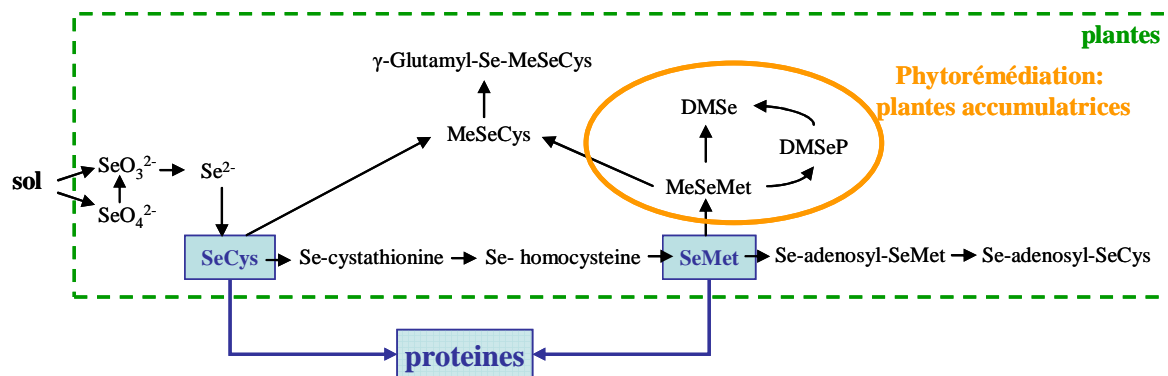


Figure 2: Représentation schématique du métabolisme du sélénium chez les plantes (d'après [60, 65])

3. ROLE DU SELENIUM DANS L'ORGANISME HUMAIN

3.1. Sources de sélénium et biodisponibilité.

a) Le sélénium dans la ration alimentaire

La majeure part des apports en sélénium à l'organisme se fait par le biais de la nourriture et dans une moindre mesure par la boisson [18]. Comme nous l'avons déjà mentionné, la teneur en sélénium rencontrée dans l'eau potable est faible (cf. I.A. §2.3.). Selon Simonoff et Simonoff [31], les concentrations en sélénium dans les boissons sont généralement inférieures à $3 \mu\text{g}(\text{Se})\cdot\text{L}^{-1}$ à l'exception de quelques boissons comme la bière, le gin et le jus d'orange pour lesquelles des valeurs pouvant aller jusqu'à $16 \mu\text{g}(\text{Se})\cdot\text{L}^{-1}$ ont pu être mesurées [31]. Une étude anglaise a estimé la contribution des apports en sélénium provenant de la boisson à environ 3% des apports quotidiens [53]. Dans des conditions d'alimentation équilibrée, l'apport sélénié par la boisson est donc considéré comme négligeable [40].

L'absorption de sélénium par le biais de la nourriture pour un adulte varie entre 11 et $5000 \mu\text{g}/\text{jour}$ (Figure 3). Ces valeurs peuvent facilement être corrélées avec les teneurs en sélénium dans les sols des mêmes régions ou pays (cf. I.A. §2.2.) [33, 66], mais dépendent aussi du régime alimentaire et de la façon de cuisiner les aliments (grillé, bouilli, au four) qui peut entraîner une diminution de la teneur en sélénium des aliments par solubilisation lors d'une cuisson à l'eau [67, 68] ou par volatilisation lors d'une cuisson à la poêle ou au four [68, 69].

L'apport moyen de sélénium par l'alimentation est généralement de 20 à $300 \mu\text{g}/\text{jour}$ [70]. En France, selon une étude menée par l'AFSSA en 2006 [71], l'apport moyen journalier est estimé à $42 \mu\text{g}(\text{Se})$ chez les adultes de plus de 15 ans et, à $31 \mu\text{g}(\text{Se})$ pour les enfants de 3 à 14 ans.

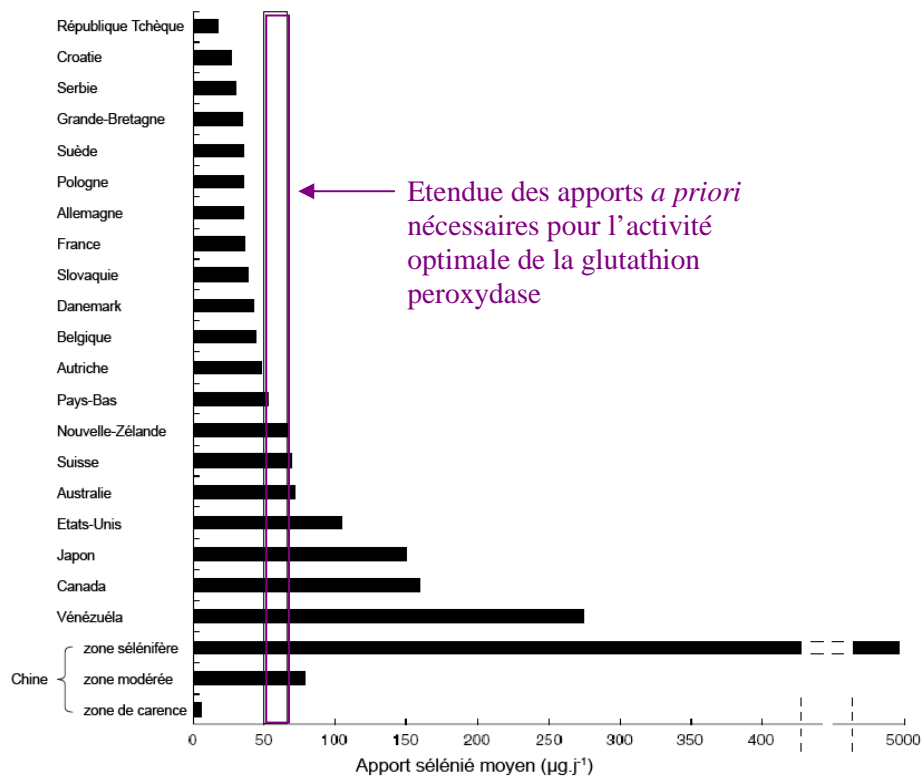


Figure 3: Apports séléniés quotidiens (µg/jour) dans différents pays (d'après Rayman M.P. [72])

Dans notre alimentation, le sélénium est généralement présent sous forme de sélénium organique associé aux protéines (acides aminés) [73]. Récemment, un nouveau composé, la sélénonéine (2-sélényl-*N*α, *N*α, *N*α-triméthyl-L-histidine, 3-(2-hydroséléno-1*H*-imidazol-5-yl)-2-(triméthylammonio) propanoate), a été identifié comme étant le composé organique sélénié majoritaire dans le sang du thon rouge [74]. D'une manière générale, les aliments riches en protéines sont riches en sélénium. La Figure 4 donne une idée du type d'aliment qui contribue le plus à l'apport sélénié tandis que le Tableau 4 donne une description de la teneur en sélénium dans différents aliments en France [75]. Certains aliments d'origine végétale possèdent des teneurs particulièrement élevées tels que l'ail, l'oignon et surtout les noix du Brésil (*Bertholletia excelsa* : 14.7 mg(Se).kg⁻¹ poids sec) [76]. En ce qui concerne la viande, les abats contiennent environ trois fois plus de sélénium que les muscles squelettiques.

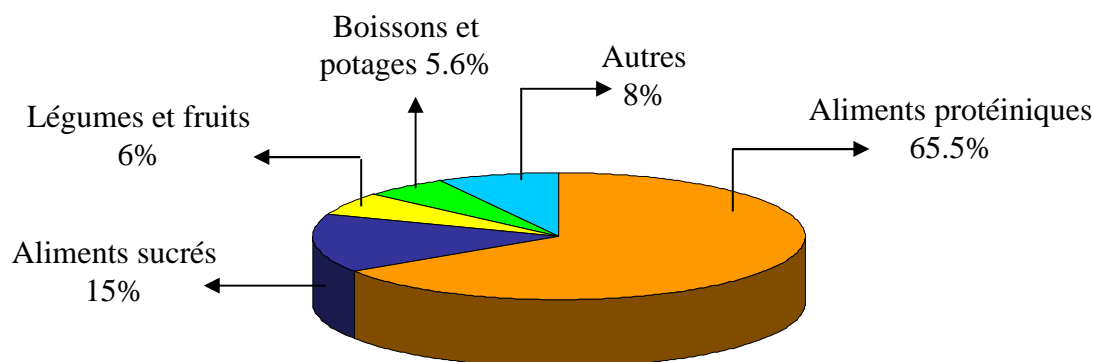


Figure 4: Répartition en pourcentage des apports alimentaires journaliers en sélénium (d'après Oster et Prellwitz [77])

Tableau 4: Teneurs en sélénium dans certains éléments provenant du marché français (d'après Simonoff et al. [75])

Aliments	[Se] en ng/g (humide)	Aliments	[Se] en ng/g (humide)
Viandes		Légumes et fruits	
Steack haché	62 ± 8	Poivron rouge	192 ± 21
Côtelette de Veau	78 ± 8	Courgette	10 ± 3
Foie de Veau	220 ± 6	Ail	82 ± 11
Rognon de Veau	180 ± 21	Pomme de terre	6 ± 2
Côtelette de Mouton	65 ± 7	Pomme	≤ 2
Jambon York	32 ± 3	Orange	13 ± 3
Blanc de poulet	47 ± 11	Produits laitiers	
Jaune d'œuf	237 ± 38	Lait frais entier	13 ± 3
Blanc d'œuf	63 ± 5	Lait écrémé	6 ± 2
Poisson		Yaourt	3 ± 2
Thon (boîte au naturel)	116 ± 24	Beurre	18 ± 10
Sole atlantique (frite)	423 ± 47	Camembert	15 ± 3
Saumon (boîte au naturel)	199 ± 7	Céréales et aliments dérivés	
Saumon fumé	244 ± 29	Spaghetti (cuites)	110 ± 5
Sardine à l'huile	132 ± 44	Pain blanc	78 ± 9
Moule (Bretagne)	297 ± 43	Muëсли	177 ± 23
Moule (Espagne)	364 ± 57	Champignons	
Huître (Arcachon)	90 ± 12	Boletus edulis (cèpe)	1393 ± 42
Huître (Bretagne)	83 ± 8	Lépiote	380 ± 19

Cependant, ce n'est pas tant la concentration totale en sélénium dans les aliments qui est importante, mais sa biodisponibilité qui va déterminer l'efficacité de cet élément sur l'organisme. Un aliment est réellement incorporé à l'organisme après avoir été digéré, c'est à dire dégradé physiquement et chimiquement pour que ses constituants puissent traverser la paroi

de l'appareil digestif, passer dans le sang pour être transportés jusqu'aux cellules où ils vont être utilisés et/ou emmagasinés. Cette incorporation va être influencée par la forme chimique et/ou physique du composé, l'ingestion d'autres composés et l'état physiologique de l'individu [78]. A titre d'exemple, la biodisponibilité du sélénium peut être inhibée par l'ingestion d'autres métaux, tel que le mercure présent dans les poissons [79], une déficience en vitamine B ou la présence excessive de composés soufrés [80]. Par contre, elle peut être exacerbée par la présence d'autres antioxydants tels les vitamines C et E [80]. L'absorption du sélénium à partir du tube digestif dépend de sa forme chimique. Le pourcentage moyen d'absorption du sélénium sous forme de sélénométhionine ou de séléniate de sodium est supérieur à 90%, alors que celui du sélénite de sodium ne représente que 60% de la dose totale ingérée [81, 82]. L'absorption dépend également de l'âge : selon Van Dael *et al.* [83], l'absorption du sélénite est de l'ordre de 70% chez l'adulte, et de 50% chez l'enfant. Pour le séléniate, cette différence est moindre et varie dans le sens opposé (91% environ chez l'adulte et 97% chez l'enfant).

La spéciation du sélénium, et de ce fait sa biodisponibilité, diffère selon le type d'aliment. La biodisponibilité dans la plupart des aliments d'origine végétale est importante (85-100%). Sauf quelques rares exceptions, elle est plus faible dans les produits d'origine animale : de 20 à 50% pour les produits de la mer [49] et de 10 à 15% pour les produits laitiers et viandes [84].

Ces valeurs variables de biodisponibilité, liées à la nature de l'aliment, l'état physiologique de l'individu (sexe, âge...) ainsi que l'interaction avec d'autres composés, soulignent l'importance de l'utilisation de biomarqueurs, tels que l'urine, pour étudier les effets des apports sur le corps humain.

b) Les compléments alimentaires

Une alimentation variée suffit généralement à satisfaire l'apport journalier recommandé en sélénium. Cependant, la variabilité de la géologie des sols, (cf. I.A. §2.2.), influence les teneurs en sélénium des produits carnés et végétaux consommés et peut ainsi conduire à un déficit de cet élément dans certaines régions du monde. La Figure 3 indique que les apports journaliers de sélénium en Europe et dans certaines parties de la Chine ne sont pas adaptés à une activité optimale de la glutathion peroxidase du plasma, enzyme antioxydante pouvant être impliquée dans la prévention contre le cancer. Cela pourrait également s'appliquer à d'autres pays pour lesquels les apports en sélénium ne sont pas connus, tels que la plupart des pays du continent africain et le Sud de l'Asie. Une étude récente de Xia *et al.* [85] a montré que l'expression complète de la sélénoprotéine P, responsable de la régulation des tumeurs

cancéreuses humaines [86], requiert un apport en sélénium plus important que celui défini pour l'expression optimale de la glutathion peroxydase. Les apports journaliers séléniés observés dans certaines parties du monde pourraient donc être insuffisants pour optimiser l'effet protecteur de cette sélénoprotéine.

Depuis ces dernières années une médiatisation importante des effets bénéfiques du sélénium en tant qu'antioxydant et thérapeutique dans la prévention de certaines maladies comme le cancer [87-89] ou le SIDA [90-92], a favorisé une consommation accrue de suppléments alimentaires, en vente libre dans les grandes surfaces. Cependant, du fait de la marge de sécurité relativement étroite entre ses aspects toxiques et bénéfiques, et de la susceptibilité individuelle, l'utilisation de compléments alimentaires séléniés à but préventif ou thérapeutique est remise en cause [2, 3]. Pour toute supplémentation, il faut tenir compte de la dose apportée, qui doit être inférieure ou égale aux apports nutritionnels recommandés (dictionnaire Vidal), et également de la forme chimique sous laquelle le sélénium est présent.

La forme la plus souvent rencontrée dans le commerce est une levure enrichie en sélénium organique (environ 90% du sélénium est incorporé pendant la phase de développement à la place des sulfures sous forme de séléénométhionine [93]). De la même manière le sélénium peut être incorporé dans des algues accumulatrices de Se telle que la spiruline qui est une micro algue constituée à 70 % de protéines végétales [93]. A plus faible coût, le sélénium peut également se trouver sous forme de comprimés contenant du sélénite de sodium.

Une étude de Clausen *et al.* montre l'influence de la forme séléniée supplémentée sur sa concentration totale mesurée dans le sang humain, i.e séléénométhionine > levure séléniée > séléniate > sélénite [94]. En effet, bien que l'absorption intestinale de la séléénométhionine soit proche de celle du séléniate, la séléénométhionine, incorporée de façon non spécifique dans les protéines serait une source métabolique moins disponible que les formes inorganiques et pourrait s'accumuler dans l'organisme, d'où une concentration dans le sang plus élevée suite à l'ingestion de SeMet par rapport à celle des formes minérales. Pour la prévention du cancer, les doses à ingérer sont estimées à 300 µg(Se)/jour pour les formes minérales et à 600 µg(Se)/jour pour les formes organiques [89].

3.2. Effets d'un apport en sélénium sur l'organisme humain

a) Le sélénium : un élément trace essentiel

Pour définir l'essentialité d'un élément, il faut que ce dernier réponde à une série de critères [95]:

- des apports insuffisants de l'élément provoquent des altérations dans le fonctionnement correct de l'organisme, effet réversible lorsque l'élément retrouve son niveau physiologique optimal ;
- l'organisme ne peut pas compléter son cycle vital sans cet élément ;
- l'élément possède une influence directe sur l'organisme et participe à des procédés métaboliques ;
- un élément essentiel ne peut pas être remplacé par un autre élément.

En plus des éléments constituant la matière organique (C, H, N, O) et des macroéléments (Na, Ca, Cl, K, Mg, P et S), certains éléments présents à faibles concentrations dans l'organisme ($\mu\text{g.L}^{-1}$ voire ng.L^{-1}) sont indispensables à la vie. Ils sont appelés éléments trace essentiels ou oligoéléments (*oligos* (en grec) = petit). Actuellement on considère que Co, Cr, Fe, F, Cu, Zn, I, Mn, Mo, Se, B, V, Ni, Br, Si et As font partie de ce groupe [95].

Pour la survie et le bon fonctionnement de l'organisme, un oligoélément doit être présent dans une gamme de concentrations donnée. Afin de maintenir une concentration constante, il existe chez tous les êtres vivants un phénomène d'autorégulation des procédés d'absorption, d'accumulation et d'élimination de cet élément connu sous le nom d'homéostasie. Cependant, si les apports ne permettent pas de maintenir cet équilibre, il peut apparaître une intoxication ou une déficience. D'où la phrase de P.A. Paracelse (1493-1541) "*Tout est poison, rien n'est poison, c'est la dose seulement qui fait le poison*".

Les doses de sélénium, limitant chacune des états physiologiques connus (de la carence à la toxicité) ne sont pas clairement définies à ce jour. Ces doses sont d'autant plus difficiles à justifier que l'état physiologique de chaque individu [96]: âge, sexe, poids, conditions de santé.... et surtout la spéciation sont des facteurs à prendre en compte. La relation dose-effet proposée par Théron *et al.* [97] pour Se est présentée Figure 5. Les rares cas d'intoxication décrits chez l'homme ne permettant pas une évaluation épidémiologique du risque, les résultats sont issus de données obtenues chez l'animal et extrapolées à l'homme.

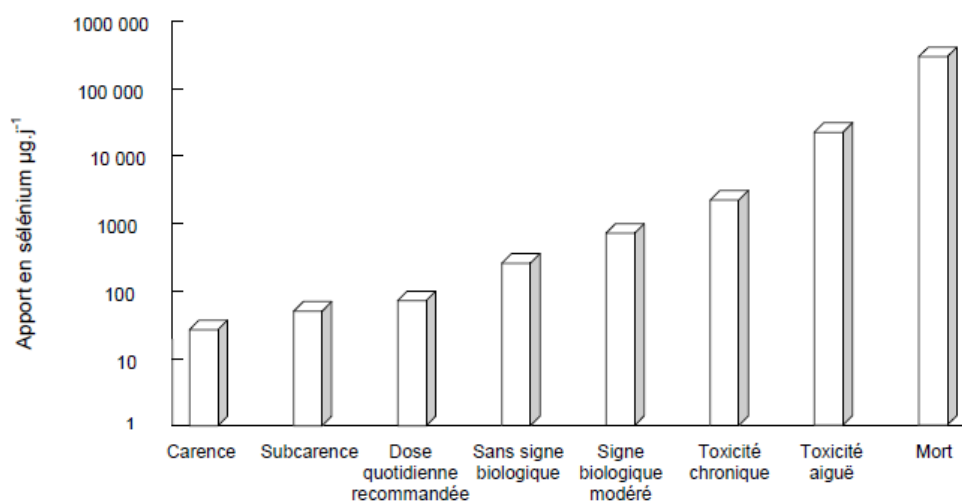


Figure 5: Apports quotidiens en sélénium et effets physiologiques correspondants (d'après Théron et al. [97])

Les deux propriétés antagonistes du sélénium, toxicité et essentialité, ont attiré l'attention de nombreux médecins, toxicologues et nutritionnistes d'autant plus que, comme indiqué Figure 5, la barrière entre ces deux aspects est étroite : une quantité à peine 10 fois supérieure à l'apport recommandé peut se révéler toxique par excès [98] et dans le sens inverse, une quantité 10 fois inférieure peut également engendrer des effets dramatiques dus à une carence [99].

b) Rôle des sélénoprotéines : essentialité et prévention contre certaines maladies

En tant qu'élément trace essentiel chez les humains et les animaux, le sélénium fait partie de sites biologiquement actifs d'un nombre important de protéines, en particulier celles qui sont impliquées dans les mécanismes antioxydants de défense (par ex. les glutathions peroxydases), le métabolisme hormonal de la thyroïde (par ex. les enzymes déiodinases) et le contrôle rédox des réactions intracellulaires (par ex thiorédoxines-réductases). Deux principales classes de protéines contenant du sélénium ont été identifiées [100]:

- **les sélénoprotéines** : protéines où le sélénium est incorporé de manière spécifique en tant que sélénocystéine (cf. I.A. §3.3.). Ce sont ces protéines qui confèrent au sélénium son rôle essentiel pour les êtres vivants. La synthèse des sélénoprotéines est strictement dépendante de la quantité de sélénium disponible. Un apport limité en sélénium ralentit la synthèse.

A l'heure actuelle environ 35 sélénoprotéines ont été identifiées. Certaines jouent un rôle non complètement élucidé [101]. Les mieux connues et leurs fonctions sont présentées Tableau 5.

Tableau 5: Sélénoprotéines connues présentes chez l'homme et leurs fonctions
(d'après Rayman M.P. [102])

Sélénoprotéines	Fonction
Glutathion peroxydase (GPx1, GPx2, GPx3, GPx4)	Enzyme antioxydante : élimine le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes de lipides et phospholipides [103-105] (4 groupes GPx's qui n'agissent pas au même endroit : cellulaire, plasmatique, hydroperoxyde phospholipidique, gastro-intestinale [106, 107])
Sélénoprotéine des mitochondries (spermatozoïdes)	Protection des cellules spermatiques en développement contre les lésions oxydatives et polymérisation en une protéine nécessaire à la stabilité et à la mobilité des spermatozoïdes [108]
Iodothyronine-déiodinase (ID)	Production et régulation de la concentration de l'hormone thyroïdienne [109, 110]
Thiorédoxine-réductase (TR)	Réduction des nucléotides lors de la synthèse de l'ADN, entretien de l'état rédox intracellulaire, capital pour la viabilité et la prolifération cellulaire, régulation de l'expression des gènes [103]
Sélénophosphate-synthétase (SPS2)	Nécessaire à la biosynthèse des sélénoprotéines [103]
Sélénoprotéine P (SeIP)	Décelée dans le plasma et associée aux cellules endothéliales. Semble protéger celles-ci contre les lésions dues au peroxyde d'azote [111-113]
Sélénoprotéine W	Nécessaire à la fonction musculaire [103]
Sélénoprotéine de la prostate	Décelée dans les cellules épithéliales. Semble exercer une fonction rédox [114]
Sélénoprotéine liée à l'ADN de spermatozoïdes	Activité similaire à celle du GPX. Décelée dans l'estomac et dans les noyaux des spermatozoïdes [114]
Sélénoprotéine de 18kDa	Décelée dans les reins et dans un grand nombre d'autres tissus. Préservée en cas de carence en sélénium [115]

- **les protéines sélénées** : protéines incorporant le sélénium de façon non spécifique. La sélénocystéine est incorporée au niveau du codon cystéine tandis que la sélénométhionine l'est au niveau du codon méthionine par mimétisme chimique. Le soufre est ainsi substitué par le sélénium, il y a compétition entre ces deux éléments. Les conséquences physiologiques de cette incorporation non spécifique restent peu claires [101]. Il a cependant été montré, chez la bactérie *Escherichia Coli*, que la présence de la sélénométhionine (plus hydrophobe que son analogue soufré) à la place de la méthionine au voisinage du site actif d'enzymes, peut influencer la cinétique de l'activité enzymatique [116, 117].

L'effet préventif éventuel du sélénium (ainsi que du zinc, de la vitamine C..) sur les dommages oxydatifs causés aux biomolécules (ADN, lipides, lipoprotéines) associés à la cancérogénèse et à l'athérosclérose, a été mis en évidence. Des apports insuffisants en vitamines et oligoéléments antioxydants seraient ainsi susceptibles de réduire les capacités de défense de l'organisme contre les agressions des dérivés activés de l'oxygène responsables du développement de certains cancers [118]. L'exemple le plus connu de cette fonction rédox est la réduction de peroxydes en substances non dangereuses (eau et alcool) par le biais de la sélénocystéine qui constitue le groupement actif de la glutathion peroxydase. Cette enzyme localisée à la fois dans le cytosol et les mitochondries a pour rôle de réduire un grand nombre de peroxydes [119]. Elle protège les membranes cellulaires, les acides nucléiques et les protéines contre la dégradation par les radicaux libres. La propriété antioxydante de Se permet ainsi de maintenir l'intégrité membranaire et par conséquent retarde le vieillissement cellulaire.

De plus, le sélénium est un immunomodulateur. A faible dose, il stimule le système immunitaire, mais à dose élevée, il l'inhibe. A dose physiologique, il permet de supprimer ou du moins de protéger contre les infections virales telles que le SIDA, en stimulant la formation des anticorps et l'activité de nombreuses cellules immunocompétentes [91, 120, 121]. Cependant les mécanismes réactionnels du métabolisme du sélénium qui permettent d'obtenir de tels effets bénéfiques sont toujours mal connus.

c) Doses physiologiques recommandées

Du fait de son essentialité, les organismes nationaux de santé publique ont donc établi l'apport journalier souhaitable en sélénium pour différentes classes d'âges. En France, d'après les recommandations du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique Française puis de l'Agence de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFFSA), les apports conseillés sont ainsi compris entre 50 et 80 $\mu\text{g}(\text{Se})/\text{jour}$ pour les sujets adolescents et adultes, soit un apport de $1 \mu\text{g}(\text{Se})/\text{jour}.\text{kg}^{-1}$ (poids corporel) [122] (Tableau 6) . Ces recommandations sont basées sur les quantités journalières de sélénium nécessaires pour optimiser les activités enzymatiques de la glutathion peroxydase.

Tableau 6: Apports journaliers en sélénium recommandés pour les différentes classes d'âge (d'après Martin A. [122])

Catégories	Âges	Apport nutritionnel conseillé (en µg/jour/individu)
Nourrissons	0-6 mois	15
	7-12 mois	20
Enfants	1-3 ans	20
	4-9 ans	30
	10-13 ans	40
Adolescents	14-18 ans	50
Adultes	19 ans et plus	50 à 80

d) Les effets d'une déficience en sélénium

Les fonctions des sélénoprotéines détectées dans le corps humain incluent la lutte contre les infections virales, la fonction immunitaire, la reproduction, la prévention de maladies cardiovasculaires, neurologiques et du cancer [102]. Un apport réduit et insuffisant de Se à l'organisme peut donc engendrer des dommages sur la santé plus ou moins importants en fonction du niveau de carence et de l'état physiologique de l'individu [123, 124]. Dans les années 70 - 80, deux effets endémiques d'une déficience sévère en sélénium ont été détectés dans des régions sélénoprives de Chine :

- la maladie de Keshan : cardiomyopathie liée à une anomalie du muscle du cœur qui causa la mort de plus de 10 millions d'individus. Un apport d'au moins 20 µg(Se)/jour semble nécessaire pour la prévention de la maladie de Keshan [8] ;
- la maladie de Kashin Beck : ostéoarthropathie caractérisée par l'atrophie, la dégénération et la nécrose du cartilage.

Ces deux maladies ont été éradiquées par supplémentation systématique de la population en sélénite de sodium.

D'autres effets d'une carence sévère en sélénium peuvent se produire lors de nutrition parentérale ou de déficience (suite à un dysfonctionnement gastro-intestinal par exemple) [125]. Le premier cas a été décrit en 1979 par Van Rij *et al.* [126] : après 30 jours de nutrition parentérale, la patiente se plaignait de myalgies de repos au niveau des membres inférieurs. La concentration en sélénium plasmatique de 25 µg(Se).L⁻¹ avant nutrition parentérale, s'est abaissée à 9 µg(Se).L⁻¹. Le traitement par injection intraveineuse de sélénométhionine (100 µg(Se)/jour) a permis la disparition des myalgies après une semaine de traitement [127].

e) Toxicité du sélénium

L'intoxication peut avoir lieu par voies orale ou respiratoire. L'intoxication par voie respiratoire concerne une partie ciblée de la population travaillant dans le milieu industriel (industrie métallurgique, lubrifiants, verre, peinture..). Ici seule l'intoxication la plus courante, celle par voie orale, sera détaillée. Cependant il est important de souligner que l'absorption par voie respiratoire de composés gazeux peut entraîner des signes cliniques de toxicité aigüe : congestion, hémorragies et œdèmes pulmonaires provoquant des difficultés respiratoires jusqu'à des spasmes d'asphyxie et la mort [18].

- *Toxicité aigüe :*

A partir des données obtenues chez le rat, la dose létale 50 (DL50), *i.e.* la dose provoquant la mort de 50% des rats, a été estimée entre 0.5 et 1 g de sélénium minéral (sélénite ou séléniate) chez l'homme [128]. L'intoxication aigüe chez l'homme est rare, tous les cas décrits dans la littérature sont d'origine accidentelle ou criminelle [129] et sont généralement la conséquence de prises de suppléments séléniés sans respect de la posologie. Les signes communs rapportés sont des vomissements, une diarrhée et une douleur abdominale [130]. Un patient âgé de 75 ans ayant absorbé 10 g de sélénite de sodium sous forme de cachets commandés par internet, est décédé 6 heures après l'ingestion, suite à un arrêt cardiaque [131]. Dans un autre cas, 13 sujets ayant absorbé un comprimé contenant 27 mg de Se sous forme de sélénométhionine (suite à une erreur de fabrication), ont présenté en plus des symptômes cités précédemment, une fatigue, une irritabilité, une perte des cheveux et ongles et, des neuropathies périphériques [132].

- *Toxicité chronique : sélénose*

Elle concerne les personnes habitant les zones sélénifères [133]. Elle est observée pour des doses journalières supérieures à 1 mg(Se)/jour pendant plus de deux ans. Les signes généralement rapportés lors d'une intoxication chronique sont les suivants [97, 134]:

- les plus fréquemment cités sont des signes cutanéophanéens : lésions érythémateuses de la peau et du cuir chevelu, fragilité et sécheresse voire perte capillaire, fragilité unguéale (signes décrits : mouchetage, stries horizontales, changement de couleur, cassure voire perte des ongles) ;
- les plus caractéristiques sont une odeur alliagée de l'haleine et de la sueur pouvant être associée à une anomalie du goût (goût métallique) ;

- d'autres signes peu spécifiques comme une fatigue, un désordre digestif avec nausées et vomissements, une dépression, une irritabilité, une instabilité émotionnelle, une perte de poids et une perte des dents ont été cités dans la littérature ;
- enfin, des signes neurologiques centraux (épisodes convulsifs), périphériques (polynévrites, multinévrites) peuvent apparaître.

Tous ces signes sont réversibles dès l'arrêt de la prise de sélénium.

La forme chimique sous laquelle se trouve le sélénium est un paramètre majeur à prendre en considération pour évaluer sa toxicité. De manière générale l'OMS considère que le sélénium inorganique est plus toxique que le sélénium organique. Cependant, certaines recherches présentent des résultats contradictoires quant à la toxicité de plusieurs espèces [81, 97]. Des expériences menées sur des rats ont permis de définir la dose létale pour 6 espèces séléniées différentes (Tableau 7).

*Tableau 7: Toxicité de quelques espèces séléniées chez le rat
(d'après Olson O.E. [135])*

Espèces séléniées	Toxicité chez le rat
Sélénite de sodium	Oral ; 10-jour LD ₅₀ ^a = 3.2 mg(Se)/kg Intrapéritonéal ; 48-h LD ₇₅ ^b = 3.5 mg(Se)/kg
Séléniate de sodium	Intrapéritonéal ; 48-h LD ₇₅ = 5.5 mg(Se)/kg
D,L-Sélénocystine	Intrapéritonéal ; 48-h LD ₇₅ = 4.0 mg(Se)/kg
D,L-Séléénométhionine	Intrapéritonéal ; 48-h LD ₇₅ = 4.25 mg(Se)/kg
Diméthylséléniure	Intrapéritonéal ; 24-h LD ₅₀ = 1600 mg(Se)/kg
Chlorure de triméthylsélénium	Intrapéritonéal ; 4-h LD ₅₀ = 49.4 mg(Se)/kg

^{a et b} : LD₅₀ et LD₇₅ sont les concentrations pour lesquelles la dose en sélénium est létale pour 50% et 75% des rats, respectivement.

Le Tableau 7 indique une toxicité à peu près similaire pour les formes inorganiques et les acides aminés séléniés. En comparaison, la toxicité du diméthylséléniure, proche de celle de l'aspirine (1200 mg.kg⁻¹) et celle du TMSel⁺, sont respectivement 400 à 10 fois inférieures. Cela étaye l'hypothèse de la méthylation en tant que processus de détoxication, le diméthylséléniure étant probablement plus efficace que l'ion triméthylsélénium [136].

3.3. Le métabolisme du sélénium dans le corps humain

Le sélénium présent dans le corps humain peut être associé à trois principales catégories : les protéines, les espèces séléniées autres que les protéines (métabolites..) et les acides aminés [137].

Une fois ingérées par le corps humain, les protéines animales ou végétales atteignent l'estomac où elles sont dégradées par les enzymes de la digestion qui libèrent les acides aminés (protéolyse). Le sélénium présent dans l'estomac, sous forme organique ou inorganique, est alors métabolisé en séléniure (Se^{2-}) dans les cellules de l'intestin, par différentes voies schématisées de façon simplifiée Figure 6:

- le séléniate est réduit en sélénite, le mécanisme n'étant toujours pas élucidé [138],
- le sélénite est transformé en séléniure par l'action de la séléno-glutathion (GSSeSG),
- la séléno-méthionine est transformée en séléno-homocystéine, en séléno-cystathion puis en séléno-cystine par trans-sulfuration. Ce processus de transformation n'est pas spécifique du sélénium. Il y a compétition entre le sélénium et le soufre [139],
- la séléno-cystine est transformée en séléniure par l'enzyme β -lyase.

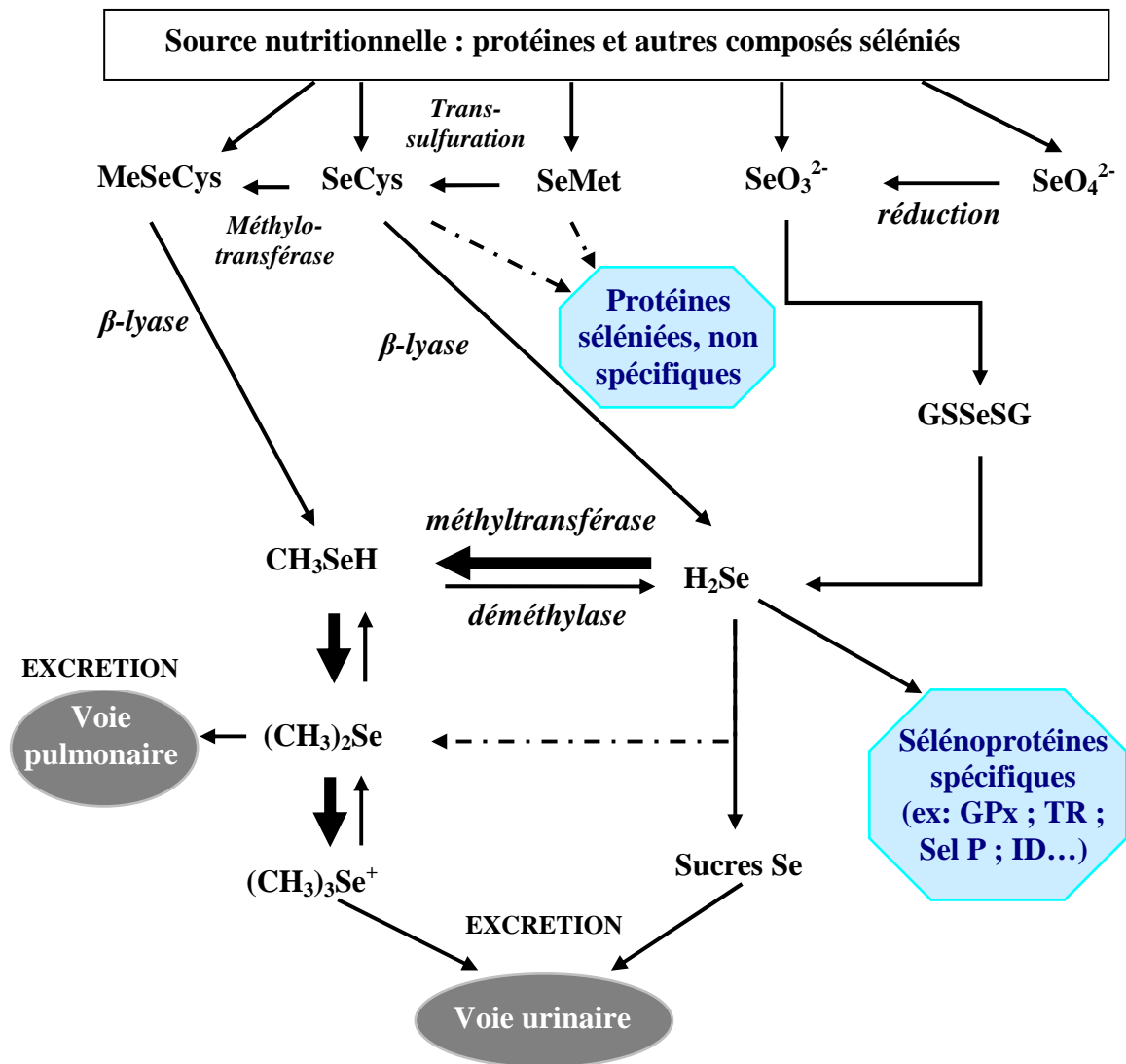


Figure 6: Métabolisme des espèces sélénées chez l'homme
(d'après Rayman M.P. [72])

(GSSeSG : sélénogluthation ; ID : Iodothyronine-déiodinase ; TR : Thiorédoxine-réductase ; Sel P : Sélénoprotéine P ; GPx : Glutathion peroxydase)

Le séléniure est ensuite transformé en séléno phosphate par l'action de l'enzyme séléno phosphate synthétase (ou SPS2) et de l'adénosine triphosphate (ATP) puis incorporé dans la chaîne polypeptidique des protéines via le codon uracil-guanine-adénine (UGA) de façon spécifique sous forme de sélénocystéine pour donner des séléno protéines [140]. La sélénocystéine n'existe pas en tant qu'acide aminé libre. Cette incorporation spécifique du sélénium, schématisée Figure 7, met en jeu la sérine comme précurseur. La première étape de la biosynthèse est l'incorporation de l'acide aminé sérine sur l'ARNtSec, catalysée par une sér yl-ARNt synthétase. Le sér yl est alors converti en sélénocystyl par l'enzyme sélénocystéine synthase. Les travaux de Xu *et al.* [141] et Yuan *et al.* [142] ont montré que cette enzyme est la

protéine SLA/LP (Soluble Liver Antigen/Liver Pancreas) identifiée précédemment en complexe avec l'ARNtSec chez des patients souffrant d'hépatite chronique auto-immune. Cette protéine utilise du sélénophosphate et un intermédiaire O-phosphoséryl-ARNtSec pour générer le Sec-ARNtSec.

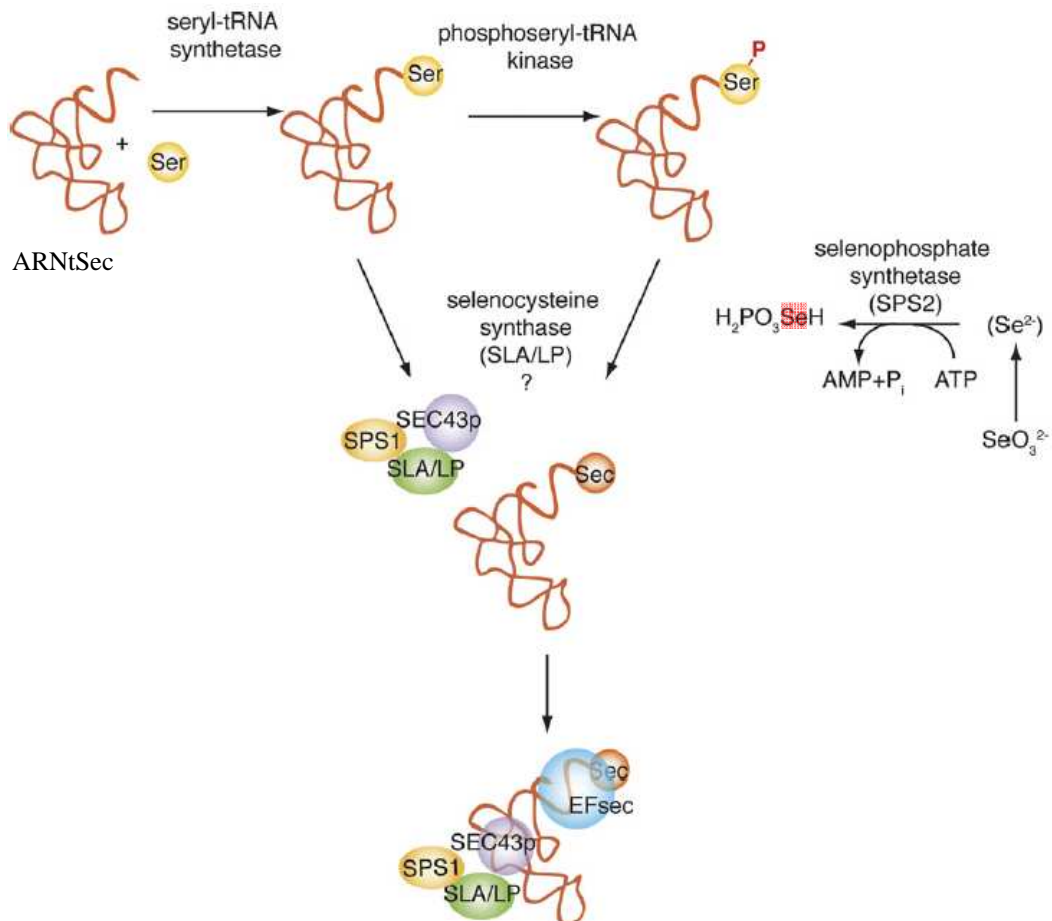


Figure 7: Formation de l'ARNt-sélénocystyl chez les eucaryotes, acteur principal de l'incorporation spécifique de la sélénocystéine dans les protéines (d'après Allmang et Krol [143])

L'incorporation de la sélénocystéine dans les protéines est un processus complexe, car il n'existe pas à proprement parler de codon spécifique pour cet acide aminé. Dans l'ARN messager, à la position correspondant à la sélénocystéine dans la protéine, on trouve un codon UGA, qui est normalement un codon stop, signal d'arrêt de la traduction. Cette reprogrammation du codon UGA est connue chez les procaryotes [144] et elle est en voie d'élucidation chez les eucaryotes [143]. L'incorporation spécifique du sélénium nécessite non seulement la présence de sélénocystéyl-ARNtSec mais également celle de la protéine Sel B, aussi appelée facteur d'élongation spécifique de la sélénocystéine, ainsi qu'une séquence sur l'ARNm, appelée

élément SECIS pour SElenoCysteine Insertion Sequence. L'élément SECIS est une structure secondaire en « tige-boucle » située directement après le codon UGA (en 3') dans la région codante de l'ARNm. Ces spécificités de l'ARNt permettent l'incorporation de la sélénocystéine dans la chaîne polypeptidique en formation, dont l'anticodon est complémentaire de UGA.

La sélénométhionine et la sélénocystine peuvent aussi être directement incorporées de façon non spécifique aux protéines en prenant la place de leurs homologues soufrés respectivement la méthionine et la cystine. Les conséquences physiologiques de cette incorporation non spécifique ne sont pas claires [101].

Outre l'incorporation dans les protéines, les séléniures ainsi que les autres formes séléniées ingérées, peuvent également être excrétés après méthylation par les voies respiratoires ou urinaires. La méthylation semble être une forme de détoxication. Selon Itoh et Suzuki [145] les formes méthylées excrétées par voie urinaire sont le sélénogalactose et l'ion triméthylsélénium et, lorsque la quantité en sélénium ingérée est trop importante, le sélénium est finalement éliminé sous forme de diméthylséléniure par les voies respiratoires [136].

3.4. La répartition du sélénium dans les différents tissus et fluides humains : biométrie

a) Intérêt de la biométrie

Un biomarqueur d'exposition est généralement défini comme un composé, ou un métabolite spécifique, présent dans des fluides humains ou des excréments facilement collectables. La biométrie consiste à mesurer le taux d'un biomarqueur dans les fluides biologiques humains comme le sang, l'urine ou le lait, ou dans les tissus comme les cheveux, les ongles et les graisses [146]. Cette mesure reflète le niveau d'exposition à une ou plusieurs substances chimiques, l'exposition pouvant être naturelle ou forcée comme par exemple suite à une supplémentation ou autre traitement. La toxicité du sélénium ainsi que son essentialité nécessitent un suivi de la quantité présente dans l'organisme. La biométrie apparaît alors parfaitement adaptée à l'étude du métabolisme de cet élément et devrait permettre d'établir une relation quantitative entre apports séléniés et teneurs en biomarqueur(s).

Cependant, des variations de concentration en biomarqueur peuvent être liées à différents facteurs autres que l'apport du composé étudié :

- analytiques : prélèvement (ponctuel à une heure donnée, groupé sur une journée), manipulation et stockage de l'échantillon avant analyse ;

- biologiques, physiologiques : inter-individus (différences liées aux caractéristiques individuelles, *i.e* âge, sexe, régime alimentaire, région) et intra-individus (variations physiologiques du métabolisme).

Différentes méthodes sont parfois employées pour caractériser physiquement et chimiquement la matrice et ainsi normaliser les résultats dans l'échantillon étudié. En ce qui concerne les échantillons d'urine, la détermination de la densité, du poids sec [147] et de la teneur en créatinine [148] de l'urine sont trois paramètres qui permettent d'aboutir à une normalisation.

b) Les concentrations en sélénium dans les tissus du corps humain

Dans l'organisme, la concentration en sélénium total dans différents tissus diminue dans l'ordre : reins > foie > rate > testicules > muscle cardiaque > poumon > cerveau [31, 82, 149]. Le taux de sélénium tissulaire est lié non seulement à la quantité de sélénium ingérée, mais également à la forme ingérée, et ce d'autant plus pour les organes situés en début du processus de métabolisation (reins, foie, rate sont les plus affectés). Les reins présentent généralement la concentration en sélénium la plus élevée du corps humain qui est d'environ $0.90 \text{ mg(Se).kg}^{-1}$. La teneur en Se dans la rate représente 60 à 70% de la teneur dans le foie représentant elle-même 30% du sélénium total présent dans l'organisme. L'activité enzymatique du foie joue un rôle primordial dans le métabolisme du sélénium (détoxification des substances peroxydatives...). La concentration en sélénium dans le foie varie de 0.2 (zones sélénoprives) à $1.7 \text{ mg(Se).kg}^{-1}$ poids sec (zones sélénifères). Les muscles squelettiques présentent une faible teneur en sélénium allant de 0.2 à $0.3 \text{ mg(Se).kg}^{-1}$ (poids sec) pour des personnes en bonne santé recevant une teneur en sélénium moyenne, *i.e* environ $40 \text{ }\mu\text{g(Se)/jour}$. Cependant, de par leur proportion dans l'organisme (environ 50% du poids corporel total), ils représentent la quantité la plus importante de sélénium contenu dans les tissus mous. Il est intéressant de noter que le muscle squelettique contient beaucoup moins de sélénium que le muscle cardiaque [31].

De toutes les concentrations tissulaires, la plus stable est celle dans les reins. En cas de déficience, la teneur en sélénium dans le foie et les muscles est fortement réduite alors que celle dans les reins est maintenue constante. Ainsi, les concentrations en sélénium dans les tissus ou organes, autres que les reins, reflètent le niveau d'exposition au sélénium. Les reins, quant à eux, régulent le métabolisme du sélénium et jouent un rôle majeur dans le processus de détoxification du corps humain. Comparée aux autres tissus, la quantité en sélénium présente dans les reins n'est pas dépendante des variations géographiques [150].

c) Voies d'excrétion du sélénium: intérêt de l'urine comme biomarqueur d'exposition

L'excrétion du sélénium est réalisée via l'urine, les fèces et l'air expiré. La transpiration et la salive sont des voies mineures d'excrétion du sélénium [151]. L'excrétion du sélénium dépend de plusieurs facteurs dont : la quantité de sélénium ingérée, l'état physiologique de la personne, le type d'aliments contenant Se (présence de composés qui inhibent l'absorption ou la métabolisation...) et la forme chimique sous laquelle le sélénium est ingéré.

L'excrétion du sélénium par le biais des voies respiratoires n'a lieu qu'en cas d'exposition à une forte concentration en sélénium. Une expérience menée sur des rats exposés à l'ingestion de doses de 2.2 - 5.4 mg(Se).kg⁻¹, a montré que 41 à 62 % du Se était excrété dans l'air expiré. Ce pourcentage est abaissé à 0.2 - 11% pour des doses ingérées dans la gamme 0.005 - 0.9 mg(Se).kg⁻¹ [152].

Pour en revenir à l'Homme, l'urine est la principale voie d'excrétion du sélénium. Environ 50 à 70% du sélénium ingéré est généralement éliminé par voie urinaire [28], bien qu'il existe des exceptions. En effet, une étude menée sur la concentration en sélénium urinaire de 7 sujets avant et après la prise de 200 mg de sélénite de sodium, a montré que seulement 15% du sélénium ingéré pouvait être excrété [153]. L'excrétion urinaire de sélénium, comprise entre 20 et 200 µg(Se)/jour pour des individus en bonne santé [154], peut être influencée par de nombreux facteurs pathologiques tels que le cancer, l'hypertension, l'épilepsie [155]. Il a été observé que l'élimination du sélénium par voie urinaire chez les femmes enceintes est diminuée [156]. L'activité musculaire semble également influencer l'excrétion urinaire du sélénium, la concentration en sélénium dans l'urine pouvant doubler suite à un effort physique [157]. Par marquage isotopique, Thomson et Steward [158] ont montré que suite à l'ingestion d'une faible dose de sélénite (0.01 mg), 6% étaient excrétés dans l'urine dans les 24 heures suivant la prise tandis que 64 à 67% étaient excrétés pour une dose de 1 mg. De la même manière, les teneurs mesurées dans les urines des habitants de Nouvelle Zélande (zones sélénoprives) sont inférieures à celles mesurées par exemple chez les Nord-Américains vivant sur des sols sélénifères [159]. L'élimination du sélénium par voie urinaire est réduite en cas de déficience et se trouve rapidement augmentée (dans les 24 heures suivant la prise) en cas d'intoxication du fait de l'autorégulation rénale ou homéostasie.

Des travaux plus récents ont porté sur l'influence de la forme chimique de Se ingérée [160, 161]. Ils ont ainsi montré que quelle que soit la forme séléniée ingérée (L-séléénométhionine, D,L-séléénométhionine, sélénite, noix du Brésil), le sélénium est majoritairement excrété dans les 4 à 10 heures qui suivent l'ingestion et, que le taux en sélénium

urinaire retrouve son niveau normal dans les 48 h qui suivent l'ingestion de 1 mg(Se). Ils ont également constaté que la forme chimique ingérée joue un rôle sur la vitesse d'excrétion, la teneur totale en sélénium et les formes chimiques excrétées. Les processus de métabolisation diffèrent selon la forme chimique ingérée. La toxicité, propre à chaque composé, en est également dépendante, d'où l'intérêt de l'analyse non pas de la concentration totale en sélénium dans l'urine mais de sa spéciation.

L'utilisation de l'urine comme matrice d'étude pour identifier des biomarqueurs d'exposition apparaît comme la plus adaptée pour mieux comprendre le devenir du sélénium ingéré, ainsi que les étapes de sa métabolisation afin de mieux contrôler les apports (forme chimique et quantité ingérée).

I.B. ANALYSE DE SPECIATION DU SELENIUM DANS L'URINE

1. ETAT ACTUEL DES RECHERCHES

A l'heure actuelle, les mécanismes biochimiques d'action des composés sélénisés sont mal connus. De nombreuses recherches sont en cours pour essayer d'identifier des espèces sélénisées caractéristiques de changements métaboliques pouvant délimiter l'aspect bénéfique de l'aspect toxique du sélénium.

En 2004, un état des lieux des recherches concernant les métabolites sélénisés présents dans l'urine a été fait par K. A. Francesconi et F. Pannier [162]. Cette étude critique des travaux publiés avant le développement des techniques de spéciation couplées, telles que la chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse à plasma induit (HPLC-ICPMS), et des techniques d'identification (spectrométrie de masse moléculaire), remet en cause certains résultats obtenus du fait des techniques analytiques utilisées et d'un manque d'interprétation des données. Parmi les quinze composés sélénisés rapportés dans la littérature comme métabolites urinaires, seulement cinq ont été rigoureusement confirmés.

Le rat a souvent été utilisé comme sujet d'étude. De manière générale le rat semble être un bon modèle pour étudier le métabolisme du sélénium chez l'homme, en particulier en ce qui concerne les métabolites urinaires car le comportement des composés paraît relativement similaire. Le métabolite sélénisé majeur présent dans l'urine humaine a tout d'abord été identifié dans l'urine de rat [163]. Les études sur le rat permettent donc de caractériser au préalable les différentes espèces sélénisées présentes dans l'urine avant de mener les études sur l'homme, plus délicates de par les faibles concentrations rencontrées et impossibles dans certains cas (*i.e.* analyse des organes ou supplémentation à dose toxique).

Dans le cadre de cette étude bibliographique nous nous limiterons aux résultats obtenus sur l'Homme et sur les rats ayant été supplémentés via leur alimentation, la supplémentation des rats par voie intraveineuse étant considérée comme trop éloignée des conditions classiques de supplémentation chez l'Homme et pouvant induire des voies métaboliques différentes.

La méthylation est le résultat d'un mécanisme de détoxification fonction de la dose et de la forme sélénisée ingérée. Les formes monométhylées du sélénium, telles que les sucres, sont

excrétées majoritairement suite à un apport sélénié insuffisant, normal ou toxique, tandis que la forme triméthylée, l'ion triméthylsélénonium (TMSe^+), semble être excrétée préférentiellement si la dose est toxique [145, 164]. La relation entre la quantité de ces espèces dans l'urine et l'état physiologique a longtemps semblé indiquer que ces espèces peuvent être utilisées comme des indicateurs d'exposition au sélénium. Cependant, en 1984, Robberecht et Deelstra [155] ont remis en cause les observations faites sur l'ion triméthylsélénonium avec l'argument que les travaux ont été menés sur un nombre trop faible d'échantillons, ne permettant pas de garantir l'exactitude et la reproductibilité des résultats. Aujourd'hui, soit 30 ans plus tard, ces critiques sont toujours d'actualité. Avec le développement des techniques couplées, telles que la chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse à plasma induit, et des techniques de spectrométrie de masse moléculaire, le métabolite sélénié majeur a été identifié comme étant le sucre méthyl 2-acétamido-2-déoxy-1-séléno- β -D-galactopyranoside (sélénosucre 1 : SeGal). Les métabolites mineurs confirmés (Figure 8) sont : le méthyl 2-acétamido-2-déoxy-1-séléno- β -D-glucopyranoside (sélénosucre 2 : SeGlu), le méthyl 2-amino-2-déoxy-1-séléno- β -D-galactopyranoside (sélénosucre 3), l'ion TMSe^+ ; le sélénite (SeIV) et la sélénométhionine (SeMet) (dans le cas d'une supplémentation avec SeMet). Des travaux récents [165] ont également mis en évidence la présence de composés séléniés volatils dans des urines normales, c'est à dire provenant de personnes non supplémentées, dont le diméthylséléniure (DMSe) et le diméthyldiséléniure (DMDSe). Cependant, à l'heure actuelle, de nombreux composés détectés dans l'urine n'ont toujours pas été identifiés.

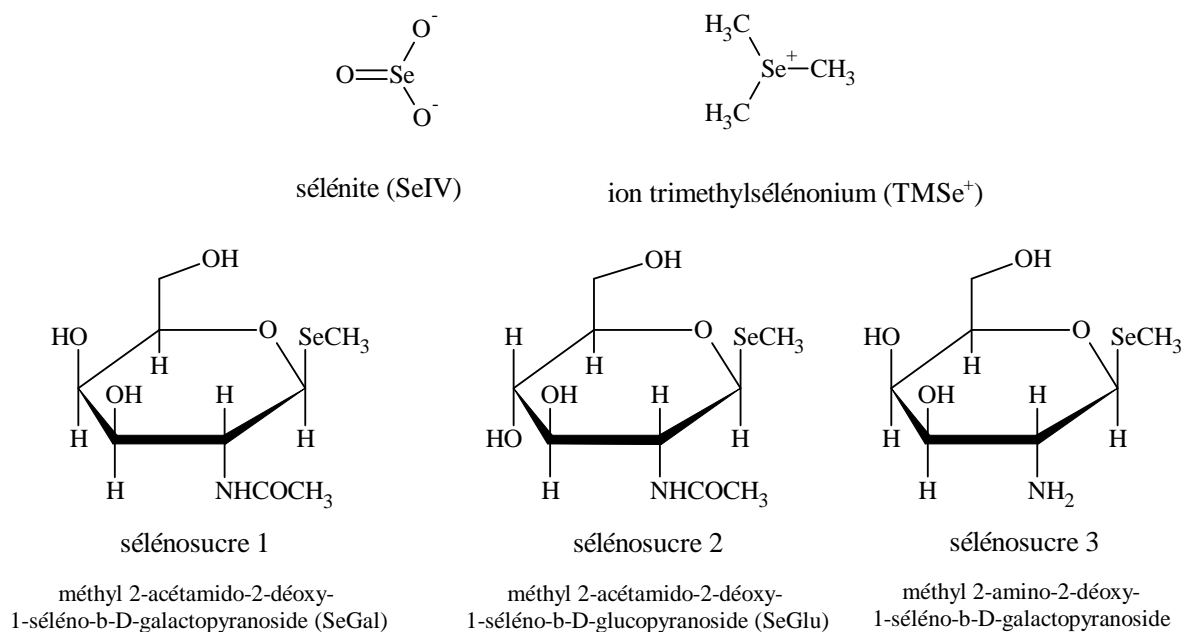


Figure 8: Espèces séléniées dont la présence dans l'urine humaine normale a été confirmée

1.1. Formes dissoutes

a) La présence aléatoire du TMSe^+

Depuis la découverte en 1969 par Byard [166] du premier métabolite sélénié, le cation TMSe^+ , dans l'urine de rats supplémentés avec du sélénite (^{75}Se), les recherches sur les composés séléniés présents dans l'urine se sont intensifiées. Les travaux suivant ceux de Byard ont permis de consolider l'hypothèse considérant TMSe^+ comme un des métabolites majeurs présents dans l'urine. Cette hypothèse est remise en cause en 1987 par Zaisel *et al.* [164] qui indiquent que TMSe^+ ne serait présent dans l'urine qu'après un apport excessif en sélénium. Avec l'introduction de nouvelles techniques plus sélectives du TMSe^+ , telles que l'HPLC-ICPMS, les données indiquant la présence de TMSe^+ dans l'urine sont plus rares et certains de ces résultats ont pu être remis en cause [162, 167] (manque d'expériences complémentaires [168-170], identification de TMSe^+ éluant dans le volume mort de la colonne [171, 172]). Depuis peu, Suzuki *et al.* ont montré que l'excrétion de TMSe^+ chez le rat dépend de l'âge [173]. Une forte variabilité de la teneur en TMSe^+ dans l'urine humaine (de 1 à 52% de la somme sélénosucres + TMSe^+) a également été mise en évidence sur 7 sujets ayant reçu une dose de 200 $\mu\text{g}(\text{Se})$ sous forme de sélénite [153]. Cette variabilité a récemment été confirmée par l'analyse HPLC-ICPMS et l'identification par spectrométrie structurale (MS/MS) de TMSe^+ dans l'urine de 5 patients atteints d'un cancer et soumis à une supplémentation quotidienne en L-sélénométhionine à forte dose (2 x 4000 $\mu\text{g}(\text{Se})/\text{jour}$ pendant 7 jours, puis 4000 $\mu\text{g}(\text{Se})/\text{jour}$ pendant 21 jours) [174]. La concentration en TMSe^+ variait de 1.2 à 8 $\mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ (soit 0.06 - 0.29% de la somme des espèces identifiées) à l'exception d'un patient pour lequel la concentration en TMSe^+ était de 332 $\mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ (11.4% de la somme des espèces identifiées). Cette étude a également permis d'observer une augmentation de la concentration des métabolites (sélénosucres et TMSe^+) dans l'urine dès le premier jour suivant la prise du traitement. Suite à cette supplémentation pouvant conduire à une intoxication (8000 $\mu\text{g}(\text{Se})/\text{jour}$ soit environ 130 fois la dose conseillée), le cation TMSe^+ n'est pas détecté dans l'urine en tant que métabolite majeur. Cette étude semble réfuter l'hypothèse, longtemps admise, que TMSe^+ soit le métabolite préférentiellement excrété lors d'une intoxication au sélénium [160, 174]. TMSe^+ n'apparaît donc pas comme un biomarqueur d'exposition au sélénium. Les causes de la variation inter-individus de la concentration en TMSe^+ excrétée dans l'urine sont toujours inconnues.

**b) La présence inconditionnelle du métabolite sélénié majeur :
le méthyl 2-acétamido-2-déoxy-1-séno-β-D-galactopyranoside (SeGal)**

Ogra et ses collaborateurs [163] ont, pour la première fois, mis en évidence la présence d'un sucre sélénié, un dérivé de la méthylsélényl N-acétylhexosamine, comme métabolite majeur dans l'urine de rats supplémentés via leur eau de boisson contenant du sélénite à $2 \mu\text{g}(\text{Se})\cdot\text{mL}^{-1}$. Les travaux de cette équipe ont ensuite permis par mesures spectrométrique (spectromètre de masse) et spectroscopique (résonance magnétique nucléaire), confirmées par synthèse chimique, l'identification précise du métabolite : méthyl 2-acétamido-2-déoxy-1-séno-β-D-galactopyranoside (SeGal) [175]. L'étude parallèle des métabolites présents dans le foie des rats a indiqué la présence de SeGal ainsi que de la forme glutathion soufrée conjuguée (sélénosucrose-SG). Le processus métabolique de formation du sucre sélénié SeGal a alors été proposé, Figure 9.

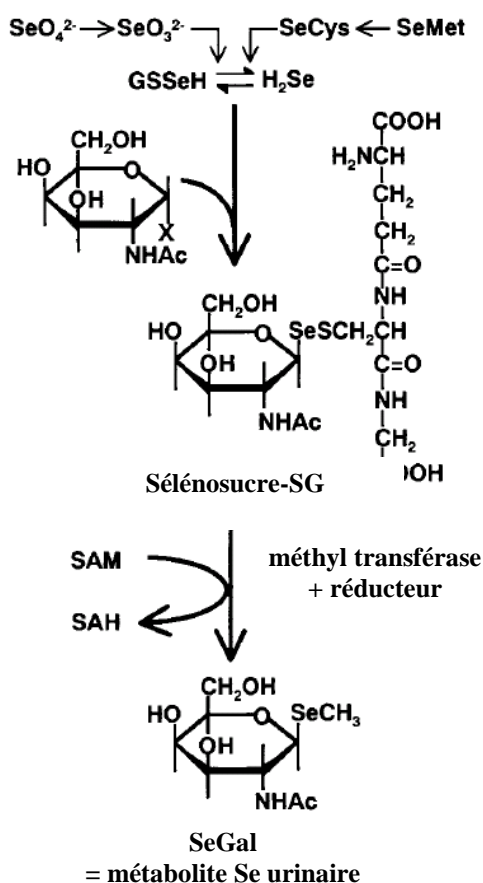


Figure 9: Mécanisme d'excrétion du sélénosucrose majoritaire présent dans l'urine (SeGal) (d'après Kobayashi et al. [175]).

GSSeH: GS-sélénopersulfure; SAM: S-adenosylméthionine; SAH : S-adenosylhomocystéine

La variation de l'intensité des deux composés sélénisés (SeGal et sélénosucrose-SG) en fonction du temps ainsi que l'introduction d'un inhibiteur de méthylation ont permis aux auteurs de conclure que le sélénosucrose-SG était un précurseur de SeGal. Un mécanisme de méthylation réductive semble donc avoir lieu au niveau du foie par réaction du sélénosucrose-SG avec un donneur méthyle (S-adénosylméthionine) pour former SeGal. La formation du sélénosucrose-SG semble être due à la réaction entre le GS-sélénopersulfure, sous produit de la réduction des espèces ingérées (SeCys, SeMet, formes inorganiques de Se) par la glutathion réductase (GSH) pour former le séléniure, et d'un sucre [176].

Gammelgaard *et al.* [177] ont par la suite mis en évidence la présence de SeGal dans l'urine humaine suite à une supplémentation avec de la levure sélénisée à une teneur de 200 µg(Se)/jour pendant 7 jours, puis de 500 µg(Se) le jour de la collecte. Par co-élution chromatographique avec le standard synthétisé au laboratoire et détection par spectrométrie de masse, Bendhal et Gammelgaard [178] ont détecté ce sélénosucrose en tant que métabolite majeur dans une urine normale, c'est-à-dire provenant d'une personne non supplémentée. Ils ont également détecté des traces de son diastéréoisomère, SeGlu (représentant 2% de la teneur en SeGal), après supplémentation avec 1000 µg(Se) sous la forme de levure sélénisée [179]. La présence d'un 3^{ème} sélénosucrose (sélénosucrose 3, cf. Figure 8) en tant que constituant mineur dans une urine humaine a été déterminée après ingestion ou non de compléments alimentaires (dose non indiquée) [178].

Suite à cette découverte et au développement de sa synthèse, le sélénosucrose 3 a également été quantifié par une autre équipe, dans l'urine de sujets n'ayant reçu aucun supplément, à des concentrations allant de 0.5 à 4 µg(Se).L⁻¹ [153, 160, 174, 180]. La reproductibilité des résultats ainsi que la qualité des analyses (3 séparations chromatographiques complémentaires et détection par spectrométrie de masse) permettent de valider la présence du sélénosucrose 3 comme métabolite sélénisé mineur dans l'urine normale, c'est-à-dire issue de sujets non supplémentés.

Au cours d'une expérience menée sur un volontaire ayant ingéré 1 mg de Se sous trois formes différentes (sélénite de sodium, DL-sélénométhionine, L-sélénométhionine), Kuehnelt *et al.* [160] ont suivi l'évolution de la quantité des trois sélénosucres dans l'urine pendant les 48 h suivant l'ingestion. Ils ont ainsi montré que la forme chimique excrétée ne dépend pas de la forme chimique ingérée, le métabolite final majeur excrété dans l'urine avant et après supplémentation étant SeGal. Sa concentration, quant à elle, dépend de la dose et de la forme ingérée (environ 80% du sélénium total excrété dans les 24 heures après ingestion de L-sélénométhionine ou sélénite et, environ 65% après ingestion de D,L-sélénométhionine). De manière générale, quelle que soit la forme ingérée, environ 9h après ingestion, les teneurs en

SeGlu dans l'urine ont augmenté d'un facteur 2 - 5, celles du sélénosucrose 3 d'un facteur 10 - 15, et celles de SeGal d'un facteur 100-200. Lors d'une autre étude portant sur des sujets atteints de cancer et supplémentés en L-sélénométhionine à de fortes concentrations (8 mg(Se)), les mêmes facteurs d'augmentation de la teneur en sélénosucres dans l'urine ont été observés [174].

c) La présence de composés mineurs ou à l'état de trace reste à élucider

Le bilan des recherches sur le sélénium dans l'urine de rat et/ou humaine réalisé en 2004 [162] a mis en évidence quinze métabolites dont dix ont été détectés par le biais d'analyses critiquées par manque d'information (données non présentées, nombre d'échantillons trop faible) ou de rigueur (un seul type de séparation, identification de pic éluant dans le volume mort). Au cours de ces 6 dernières années, la qualité et la précision des mesures se sont améliorées par l'utilisation plus courante de techniques couplées et de détecteurs structuraux tels que les spectromètres de masse moléculaire. La présence de certaines espèces a ainsi pu être consolidée mais aucune nouvelle espèce n'a été identifiée. Les données collectées au cours de ces 6 dernières années pour chaque métabolite sélénié détecté dans l'urine sont détaillées dans ce paragraphe.

Sélénite

Le sélénite a été détecté dans l'urine pour la première fois, en 2000, par Gammelgaard et Jons [181]. Ils ont rapporté les résultats d'analyse de 23 échantillons d'urine provenant de 11 volontaires non supplémentés, indiquant la présence de sélénite à des concentrations généralement inférieures à 5% du sélénium total ($[Se]_{tot} = 12.4 - 97.7 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$), à l'exception de deux échantillons pour lesquels la concentration de SeIV représentait 13% ($[Se]_{tot} = 55.9 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$) à 16% ($[Se]_{tot} = 36.5 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$) du sélénium total. Le nombre important d'échantillons analysés ainsi que la qualité de la technique analytique employée, la chromatographie ionique couplée directement à l'ICPMS (rétention de SeIV, $t_R = 6.7$ min, co-élution peu probable), garantissent les données obtenues et semblent ainsi indiquer la présence du sélénite en tant que métabolite mineur.

En 2004 l'analyse électrochimique d'un échantillon d'urine (sujet non supplémenté) par voltamétrie de redissolution cathodique à vagues carrées (Square Wave Cathodic Stripping Voltammetry : SQWCSV) a conduit à la détection de la sélélocystamine (représentant 43% du sélénium total) et du sélénite (36% du sélénium total) [182]. Les auteurs concluent que ces deux espèces sont majoritaires dans l'urine humaine. Ces résultats sont contradictoires avec les

nombreuses études ayant confirmé que SeGal est le métabolite majeur. La rigueur des résultats ainsi que la méthode utilisée peuvent être critiquées. Les auteurs ont dans un premier temps optimisé le protocole dans l'eau, matrice très différente de l'urine, pour que la sélénourée et la sélénocystamine soient séparées par voltamétrie. Leur méthode n'étant pas spécifique, ils ont montré que des composés soufrés et sélénés avaient un potentiel proche sans pour autant analyser un grand nombre d'étalons tels que les sucres sélénés par exemple. Avant les mesures voltamétriques, les espèces (sélénocystamine, sélénourée, SeIV et SeVI) sont séparées par extraction sur une cartouche d'échange cationique. La sélénocystamine est retenue sur la cartouche, son élution est obtenue avec l'acide chlorhydrique (HCl). Un ajout de HCl est également utilisé pour la détection du sélénite. Il se pourrait que ces différentes étapes et ajouts de réactifs dénaturent les composés. La conservation de l'intégrité des espèces après ce protocole n'a pas été vérifiée. Il manque également une vérification des résultats par des techniques plus spécifiques telle que l'HPLC-ICPMS ainsi que des applications à un plus grand nombre d'échantillons (provenant d'un seul volontaire) avant de pouvoir accepter que le sélénite et la sélénocystamine soient des métabolites majeurs.

Dans une étude de Hongwei *et al.* [183] mettant en oeuvre le couplage chromatographie en phase inverse/ ICPMS, le sélénite a été détecté dans une urine normale à une concentration de $0.9 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ représentant environ 2% des espèces quantifiées (la concentration totale en sélénium de l'urine n'étant pas précisée). Le type de chromatographie utilisé n'est pas adapté aux composés inorganiques, non retenus sur la phase stationnaire, et élués dans le volume mort de la colonne. Des ajouts dosés en SeIV ont montré que l'étalon co-élue avec le composé détecté mais de nombreux composés peuvent également éluer au temps mort.

Avec une méthode similaire à celle de Gammelgaard et Jons [181], Wang *et al.* [184] ont, en 2007, quantifié le sélénite dans deux échantillons d'urine (sujets non supplémentés) à des concentrations représentant 9% à 13% de la concentration totale en sélénium, égale respectivement à environ 37 et 21 $\mu\text{g}.\text{L}^{-1}$. La validité de la méthode est démontrée par le taux de recouvrement obtenu pour l'échantillon dopé en sélénite (environ 95%). De la même manière (taux de recouvrement proche de 100%), le sélénite a été quantifié à une concentration de $1.38 \pm 0.07 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ (3% du sélénium total) dans une urine avant supplémentation, cette concentration s'élevant à $1.84 \pm 0.03 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ (2% du sélénium total) après supplémentation (1 comprimé/jour pendant 7 jours) [185]. Il semblerait donc que la teneur en sélénite dans l'urine ne soit pas influencée par une augmentation de la dose de Se ingérée dans ces conditions de supplémentation (quantité et forme Se ingérée non précisées).

Les différents travaux de recherche effectués au cours de ces 6 dernières années semblent donc confirmer la présence du sélénite dans l'urine normale en tant que métabolite mineur. Sa détection dans l'urine est limitée par sa concentration, souvent proche des limites de détection analytiques [160, 186].

Sélénocystamine

Avant 2004, la sélénocystamine fut détectée au cours d'une seule étude fortement critiquée par Francesconi et Pannier [162]. Gammelgaard *et al.* [177] ont également indiqué ne jamais avoir détecté une espèce possédant les mêmes propriétés chromatographiques que la sélénocystamine dans l'urine. Depuis 2004, mise à part l'étude de Ochsenkühn-Petropoulou et Tsopelas [182], dont l'exactitude des résultats est mise en doute dans le paragraphe précédent, aucun autre travail n'a permis de démontrer la présence de sélénocystamine dans l'urine.

Séléniate

Le séléniate a été détecté dans des urines normales par Chatterjee *et al.* en 2003 [187] et 2004 [186]. Dans ces travaux réalisés par HPLC-ICPMS, les chromatogrammes font apparaître d'importantes interférences polyatomiques au temps de rétention du séléniate, ce qui remet en cause les données. En 2008, Kuo *et al.* [185] ont identifié le séléniate dans une urine normale et une urine collectée après supplémentation (1 comprimé/jour ; dose et forme Se non précisées) sur la base de son temps de rétention (HPLC-ICPMS). Des ajouts dosés ne sont pas reportés, et le pic attribué au séléniate n'est pas bien séparé de l'espèce majoritaire qu'ils supposent être le sélénosucre SeGal. Un seul type de séparation (chromatographie d'échange anionique) est utilisé. Les données sont donc insuffisantes pour pouvoir conclure sur la présence de SeVI dans l'urine.

Sélénométhionine

Certains auteurs ont identifié la sélénométhionine dans l'urine normale par co-élution chromatographique avec l'étalon [168, 169, 183, 185]. Cependant au cours de ces études, un seul type de séparation chromatographique est utilisé, ce qui est insuffisant pour confirmer une identification [162]. En effet, il a été clairement démontré que l'utilisation d'un seul type de séparation couplé à l'ICPMS ne permet pas d'aboutir à des résultats irréfutables [187]. Un pic initialement identifié par co-élution chromatographique dans un seul système comme étant de la sélénométhionine s'est avéré correspondre à un autre composé avec un autre type de séparation.

A l'heure actuelle aucune étude n'a permis de confirmer la présence de la sélénométhionine en tant que constituant de l'urine normale.

En revanche, la sélénométhionine a été identifiée comme un métabolite majoritaire dans les urines issues de sujets supplémentés avec des levures sélénées [160, 188], SeMet constituant également la forme sélénée majoritaire dans ces suppléments [137]. Dans l'étude réalisée par Kuehnelt *et al.* [160], une dose de 1 mg(Se) a été administrée à un volontaire sous deux formes différentes : D,L-sélénométhionine (mélange des deux isomères D et L) et L-sélénométhionine (isomère L pur). L'expérience a été doublée. Un suivi par HPLC-ICPMS sur une période de 48 heures après ingestion du supplément a révélé que la teneur en sélénométhionine dans les urines est plus importante après ingestion de D,L-sélénométhionine ([SeMet] = 20% [Se]_{tot} excrété) qu'après ingestion de L-sélénométhionine ([SeMet] < 0.5% [Se]_{tot} excrété). Il semblerait que la forme D de la sélénométhionine ne soit pas métabolisée contrairement à la forme L qui est, quant à elle, utilisée par le corps humain. Deux ans après, d'autres travaux concernant l'isomère L-sélénométhionine administré à fortes concentrations (2x4000 µgSe/jour pendant 7 jours et 4000 µgSe/jour pendant 21 jours) à des patients atteints de cancer ont permis la confirmation des résultats [174]. La sélénométhionine a alors été détectée par HPLC-ICPMS dans l'urine des patients comme métabolite mineur voire à l'état de trace. Cette forme sélénée est donc quasi-entièrement utilisée par l'organisme.

Autres composés

En ce qui concerne les autres espèces sélénées suspectées dans certains échantillons d'urine avant 2004 [162], *i.e.* sélénogluthation, sélénoéthionine, sélénocystéine, méthylsélénométhionine, séléno-urée, sélénoadénosylméthionine, méthylsélénol, méthylsélénocystéine, sélénocystine, aucune étude au cours de ces 6 dernières années n'a permis de les détecter dans l'urine. Ces espèces ne semblent donc pas constituer des métabolites sélénés dans l'urine (en particulier SeEt qui est un composé de synthèse).

Composés non identifiés

Selon la quantité et la forme sélénée ingérée, la teneur totale en sélénium de l'échantillon et la procédure analytique appliquée, entre deux et cinq composés sélénés qui ne correspondent à aucun étalon connu ont été détectés par HPLC-ICPMS dans l'urine humaine [153, 179, 180, 189, 190].

A l'heure actuelle il reste donc à élucider les causes de la variation inter-individus de la quantité de TMSe^+ dans les urines ainsi qu'à identifier de nombreux composés inconnus.

1.2. Formes volatiles

C'est en 2006 que Juresa *et al.* [191], dans le cadre d'une étude de stabilité des sélénosucres dans l'urine, ont identifié les formes volatiles DMSe , DMSeS et DMDSe dans des échantillons dopés en SeGal . L'identification a été obtenue par chromatographie gazeuse (GC) - spectrométrie de masse (MS). Les formes DMSe et DMDSe ont également été détectées par HPLC-ICPMS par comparaison avec les étalons. Faisant suite à cette étude, DMSe et DMSeS (supposé sur la base de son temps de rétention) ont été détectés dans l'urine humaine certifiée NIES CRM 18 par chromatographie liquide couplée à l'ICPMS [180]. Kresimon *et al.* [192] avaient précédemment détecté ces composés après dérivation avec du borohydrure de sodium, cette réaction préalable ne rendant pas compte des formes séléniées initialement présentes dans l'urine. Toutes ces études n'ont permis qu'une analyse qualitative de ces espèces dans l'urine mais indiquent pour la première fois la possibilité de métabolites séléniés volatils dans l'urine. Bueno et Pannier (2009) [165] ont optimisé une méthode d'analyse quantitative de ces espèces dans l'urine normale, basée sur une microextraction sur phase solide en mode espace de tête (HS-SPME) suivie d'une analyse par GC-ICPMS. A l'aide de cette technique, la teneur en DMSe de deux échantillons d'urine provenant de sujets non supplémentés a pu être déterminée dans la gamme 4.5 - 10.3 $\text{ng}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$. La quantification du DMDSe est apparue plus problématique, la réponse des ajouts n'étant pas la même pour les échantillons étudiés. Une estimation de sa concentration à 0.6 - 0.8 $\text{ng}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ est donnée pour les échantillons stockés 3 semaines au réfrigérateur. Parmi les deux autres composés séléniés inconnus également détectés, la présence de DMSeS est fortement suspectée sur la base de l'estimation de son point d'ébullition selon son temps de rétention.

Il est important de souligner que, dans cette étude, les auteurs ont indiqué des difficultés pour la quantification du DMDSe dans un des échantillons analysés présentant une teneur significative de composés volatils soufrés (m/z 34). Pour cet échantillon, les ajouts de DMDSe ne se sont pas traduits par une augmentation de l'aire du pic chromatographique correspondant, mais par l'augmentation de l'aire attribuée au pic de DMSeS observé lorsque l'analyse est réalisée quelques heures après l'ajout. Les auteurs ont ainsi supposé une réaction entre les composés soufrés et le DMDSe ajouté pour former du DMSeS .

A l'heure actuelle, seules trois études portant sur une faible quantité d'échantillons (4 au total) ont permis de détecter DMSe, DMDSe, et de supposer la présence de DMSeS dans l'urine humaine normale en tant que constituants présents à l'état de traces. L'origine de ces espèces n'est pas connue. Elles peuvent être des métabolites sélénés ou des produits de dégradation d'autres espèces sélénées présentes dans l'urine (sélénosucres). A l'inverse du DMSe, DMDSe n'a pas été détecté dans tous les échantillons d'urine. Afin de pouvoir conclure sur la présence de ces composés dans l'urine normale, des études futures sont à envisager sur un plus grand nombre d'échantillons. DMSeS n'a jusqu'alors été identifié que par rapprochement entre son temps de rétention et son point d'ébullition. Sa présence a donc besoin d'être vérifiée par spectrométrie de masse structurale. La structure d'un composé séléné détecté dans un des deux échantillons de l'étude menée par Bueno et Pannier [165] demeure également à élucider.

2. TECHNIQUES ANALYTIQUES

2.1. Conservation de l'échantillon

L'urine est une matrice biologique dans laquelle la spéciation du sélénium peut facilement évoluer au cours du temps du fait de réactions biotiques (présence de microorganismes provenant de la flore microbienne) et/ou abiotiques. Une étude de stabilité des sélénosucres dans l'urine a montré leur dégradation dès la troisième semaine de stockage à 4°C [191]. Il semble donc préférable d'analyser les échantillons rapidement après leur collecte ou dans le cas contraire de les conserver dans des conditions telles qu'il n'y ait pas d'évolution possible (par ex. -80°C ou lyophilisation). Le développement d'une technique analytique rapide peut également être utile pour minimiser la durée de stockage des échantillons.

2.2. Choix des techniques de préconcentration et extraction

L'urine est une matrice complexe (urée, protéines..) et particulièrement chargée en sels (concentrations en sodium et potassium de l'ordre de 50 à 150 mM) ce qui peut perturber l'analyse en particulier lorsque celle-ci est basée sur un couplage chromatographie-spectrométrie de masse (perturbation de la séparation, encrassement de la colonne chromatographique et du détecteur, variation de la sensibilité du signal) [4, 169].

a) Extraction et préconcentration des composés dissous

Pour l'analyse de composés dissous, la plupart des auteurs diluent l'urine 10 fois avant son injection en HPLC-ICPMS. Cependant, dans ces conditions, de nombreux composés, n'étant présents qu'à l'état d'ultra traces, ne sont pas détectés. Une solution consiste à purifier et/ou à préconcentrer l'échantillon avant son analyse. Un inventaire de toutes les techniques déjà testées pour la purification et/ou la préconcentration des espèces sélénées dissoutes dans l'urine est détaillé dans cette partie.

- **chromatographie préparative (extraction)** : actuellement, la technique la plus couramment utilisée est la chromatographie d'exclusion stérique (SEC). Les composés sont séparés en fonction de leur taille. La phase stationnaire utilisée est très robuste. Cette technique sert souvent comme première étape de purification [163, 175, 193]. Gammelgard *et al.* [177] ont ainsi diminué la quantité de matière organique (suivi du signal UV à 254 nm) de la fraction contenant SeGal.
- **élimination de l'urée par réaction avec l'uréase (extraction)** : l'urée est le constituant majeur de la matrice urine (environ 310 mmol.L⁻¹) [194]. Après une première étape de purification par chromatographie d'exclusion stérique et une extraction au méthanol comme technique complémentaire, Ogra *et al.* [163] ont ainsi éliminé 92% d'urée et 88% de Na⁺.
- **extraction à l'éther couronne (extraction)** : de cette manière plus de 90% de Na⁺ et K⁺ sont éliminés après 5 extractions consécutives de l'urine [168, 193]. L'éther couronne est connu pour sa capacité à solvater les cations. Les métaux alcalins sont alors complexés puis extraits dans le chloroforme.
- **lyophilisation ou évaporation sous flux de N₂ (préconcentration)** : techniques qui consistent à éliminer l'eau des échantillons. Elles sont utilisées pour préconcentrer les analytes, généralement en complémentarité des techniques d'extraction [195]. Elles peuvent être utilisées directement sur l'urine [178] mais le plus souvent, elles servent à préconcentrer les solutés présents dans les fractions collectées en sortie d'une colonne préparative telle que la SEC [193].
- **extraction au méthanol (extraction + préconcentration)** : l'affinité des composés organiques sélénés pour le méthanol rend possible leur extraction, souvent assistée par ultrasons. Une partie des sels présents dans l'urine est alors éliminée [163, 178, 179]. Le solvant est ensuite évaporé. Les analytes sont alors préconcentrés.
- **extraction sur phase solide (extraction + parfois préconcentration)** : cette technique consiste à filtrer à débit constant un échantillon liquide sur une phase stationnaire solide, judicieusement choisie et préalablement conditionnée. L'extraction sur phase solide (SPE) a été

développée dans les années 1980 comme complément ou en remplacement de l'extraction liquide/liquide [196]. En comparaison avec l'extraction liquide/liquide, la SPE est une technique plus rapide, plus simple et qui consomme moins de solvant. C'est à l'heure actuelle la technique d'extraction la plus couramment utilisée dans de nombreux domaines de la chimie: environnemental, pharmaceutique, clinique, alimentaire et industriel. Il existe deux types de conditionnement de la phase sorbante : le disque ou la cartouche. La cartouche offre un plus large choix de sorbants que le disque. Pour une utilisation en routine et à moindre coût, c'est la cartouche qui est privilégiée. Les disques offrent cependant des avantages pour des applications particulières. Ils sont utilisés en cas de présence de particules en suspension dans l'échantillon, pour filtrer de grands volumes d'échantillon (large surface de contact) rapidement (possibilité de débit plus élevé qu'avec une cartouche). Selon la nature du support d'extraction et celle des analytes, les objectifs possibles de la SPE sont [197]:

- élimination des interférents de la matrice (élimination des sels dans le cas de l'urine [172, 198]) ;
- préconcentration des analytes [169, 177, 188] ;
- séparation des composés présents dans l'échantillon [182] ;
- piégeage des analytes instables en milieu liquide ou facilement volatilisables ;
- réactions de dérivation des analytes à la surface du sorbant.

De nombreuses phases solides sont actuellement disponibles commercialement ce qui se traduit par un large panel d'applications de la SPE dans les laboratoires. On rencontre en général deux grandes familles de sorbants sur lesquels sont greffés des groupements fonctionnels:

- **les silices** : supports hydrophiles sur lesquels sont greffés des groupements hydrophobes de type C8 ou C18 (mode phase inverse) ; des groupements polaires de type CN ou Diols (mode phase normale) ; des groupements ioniques de type COOH (échange de cations) ou NH₂ (échange d'anions) ; des groupements hydrophobes et ioniques (mode mixte). La stabilité chimique de ces supports est moins importante que celle des polymères. Ils sont généralement stables pour un pH compris entre 2 et 7.5 et présentent une meilleure sélectivité que les polymères ;
- **les polymères** : le plus couramment utilisé est le polystyrène-divinylbenzène (PS-DVB) sur lequel peuvent être greffés des groupements fonctionnels tels que CH₂OH, COCH₃, SO₃H afin d'augmenter l'hydrophilie [197, 199]. Ces supports sont très stables chimiquement. Ils supportent des pH allant de 1 à 14. Ils sont moins sélectifs que les supports en silice greffée mais possèdent une capacité de charge bien plus importante du fait de leur haute surface

spécifique pouvant aller jusqu'à 30% de la masse totale de l'adsorbant contre 3 - 10% pour les supports en silice [200].

Le choix du support est très important car c'est lui qui contrôle les paramètres tels que la sélectivité, l'affinité et la capacité. Un bilan des supports utilisés ainsi que des résultats obtenus pour l'extraction des métabolites sélénés dans l'urine par SPE est présenté Tableau 8.

Tableau 8: Bilan et résultats des techniques d'extraction par SPE appliquées à l'étude des métabolites sélénisés dans l'urine humaine

Echantillon	Nature de la phase	Rétention des analytes	Commentaires	Espèces détectées	Technique d'analyse	Refs
Elimination par SPE des traces d'acide picrique utilisé pour l'extraction à l'éther de couronne						
Urine humaine pendant et après supplémentation avec SeMet	silice greffée triméthylaminopropyl (AE)	non, sauf SeIV et SeVI	- élimination de plus de 90% [Na ⁺] et [K ⁺] par extraction à l'éther de couronne Rendement du sélénium total : 87% extraction à l'éther 85% SPE	TMSe ⁺ , SeMet + 5 composés non identifiés	HPLC(CE _x)-ICP-MS	[168]
Urine humaine dopée (SeIV, SeVI, SeMet, SeEt, SeCyst)	silice greffée triméthylaminopropyl (AE)	non, sauf SeIV et SeVI	- élimination de 57% [K ⁺] par extraction à l'éther de couronne - stabilité des composés sélénisés pendant traitement	SeCyst, SeMet, SeEt + composés non identifiés	HPLC(AE)-ICP-MS HPLC(RP)-ICP-MS ESI-MS/MS	[193]
Elimination par SPE d'une partie de la matrice organique de l'urine						
Urine humaine dopée (SeIV, SeVI, SeMet, SeEt, SeCyst, TMSe ⁺)	silice greffée C18 (RP)	non	- dilution (2 : 5) dans eau milli-Q - Rendement d'environ 100% pour toutes les espèces	TMSe ⁺ (101%), SeCyst(94%), SeMet(98%), SeEt(95%), SeIV(99%), SeVI(98%), U1(97%), U2(102%) N.B : le rendement de chaque espèce est noté entre parenthèse	HPLC(AE)-ICP-MS	[172]
Urine humaine dopée (SeIV, SeVI, SeMet, SeEt, SeCyst, TMSe ⁺)	silice greffée C18 (RP)	non	- Rendement d'environ 100% pour toutes les espèces MAIS : toujours un important effet de matrice	SeIV, SeVI, SeCyst, SeMet, TMSe ⁺ + composés non identifiés	HPLC(AE)-MO-HG-AAS FI-MO-HG-AAS	[198]

Echantillon	Nature de la phase	Rétention des analytes	Commentaires	Espèces détectées	Technique d'analyse	Refs
Elimination par SPE des sels et préconcentration des analytes						
Urine humaine après supplémentation avec SeMet	polymère de N-vinylpyrrolidone et divinylbenzène	oui	- préconcentration n.d. - élimination de 50% Na ⁺ et K ⁺	Séparation sélective et préconcentration du métabolite majeur	HPLC(RP)UV/ICP-MS: (Chromatographie préparative) SEC-UV/ICPMS APCI-MS	[177]
Urine humaine pendant et après supplémentation avec SeMet	silice greffée C18 (RP)	oui	- préconcentration x10 - diminution des sels Rendement SeMet : 95%	TMSe ⁺ , SeMet, MeSeMet + composés non identifiés dont le métabolite majeur	HPLC(IP)-ICP-MS	[188]
Urine humaine	silice greffée C18 (RP) modifiée avec acide hexanesulfonique	oui	- préconcentration x20 - diminution des sels - rétention sélective des espèces cationiques (après ajout d'acide perchlorique)	SeMet, TMSe ⁺ , AdoSeMet + composés non identifiés dont le métabolite majeur	HPLC(IP) -ICP-MS ESI-MS	[169]

n.d : non défini

Modes SPE ou chromatographique :

CEx = Echange de cations

AE = Echange d'anions

RP = Phase inverse

IP = Chromatographie de paire d'ions

SEC = Chromatographie d'exclusion stérique

D'après cette synthèse bibliographique, nous constatons que pour la purification des échantillons d'urine, la SPE est utilisée selon 3 objectifs différents :

- le premier est un cas particulier d'utilisation car il consiste à éliminer les traces de réactifs utilisés pour l'extraction à l'éther couronne avec une phase stationnaire échangeuse forte d'anions [168, 193]. Diaz Huerta *et al.* [193] ont montré que le traitement n'affectait pas la nature de la sélénioéthionine (SeEt), sélénocystine (SeCyst), SeMet et SeGal. Cependant cette technique présente l'inconvénient d'éliminer également les composés anioniques séléniés, SeIV et SeVI, retenus sur la phase stationnaire échangeuse d'anions ;
- le second objectif est d'éliminer une partie de la matière organique contenue dans l'urine pour l'élimination de certains interférents pouvant perturber les analyses et une meilleure conservation des échantillons. Dans ce but, les auteurs ont utilisé des supports hydrophobes (silice greffée en C18) sur lesquels ils ont filtré l'échantillon dopé en SeIV, SeVI, SeMet, SeEt, SeCyst, TMSe^+ et l'ont collecté en sortie [172, 198]. Ils ont ainsi obtenu un rendement d'environ 100% pour toutes les espèces mais observent toujours un important effet de matrice ;
- le troisième objectif, le plus utilisé, consiste à retenir les composés d'intérêt sur la cartouche en vue de les préconcentrer tout en éliminant une partie de la matrice. Les métabolites séléniés présents dans l'urine sont de nature organique. Pour leur rétention, l'utilisation de supports pour lesquels l'eau présente une faible force éluante, c'est-à-dire les supports hydrophobes de type silice greffée C18 ou polymère mixte hydrophobe/hydrophile, sont utilisés. Dans ce cas les sels contenus dans l'urine ne sont pas retenus et ainsi éliminés.

Avec l'utilisation d'un support en silice greffé en C18, Gammelgaard *et al.* [188] ont obtenu la rétention du métabolite majeur et de composés séléniés inconnus avec un facteur de préconcentration de 10, ainsi que la diminution d'environ 50% de la concentration en sels de l'urine. Au cours de travaux menés par Wrobel *et al.* [169], ces auteurs ont constaté que l'adénosylsélénométhionine (AdoSeMet), ou TMSe^+ , formes séléniées cationiques, n'étaient pas retenues sur la cartouche modifiée avec l'acide hexanesulfonique au pH naturel de l'urine. Ils ont donc ainsi supposé que les espèces cationiques étaient piégées par de grosses molécules anioniques telles que l'acide urique empêchant, à pH naturel, la formation de paire d'ions avec les groupes hexanesulfonates présents sur la surface de la cartouche. En abaissant le pH avec les ions perchlorates, connus pour leur capacité à former des paires d'ions, ils ont ainsi réussi à substituer les grosses molécules anioniques par les ions perchlorates. Sous cette forme, les espèces séléniées pouvaient alors plus facilement interagir avec les groupements hexanesulfonates. Ils ont alors obtenu une diminution de la concentration en sels de l'échantillon

et sont parvenus à détecter AdoSeMet, TMSe^+ , SeMet ainsi que des composés inconnus dont le métabolite majeur.

Le problème majeur de toutes les techniques d'extraction est qu'elles font intervenir de nombreux réactifs et de nombreuses étapes pouvant conduire à une dégradation des espèces [163], une perte des espèces inorganiques [193], une oxydation comme par exemple celle des sélénosucres [201, 202] et/ou une contamination de l'échantillon, ce qui peut conduire à des résultats erronés. La procédure de prétraitement d'échantillon doit donc être la plus simple possible. Pour être validés, ces protocoles nécessitent un contrôle de la stabilité des espèces.

Parmi toutes les techniques de traitement d'échantillon, l'extraction sur phase solide (SPE) est certainement la plus simple d'utilisation.

b) Extraction des composés volatils

Pour l'analyse des composés organiques volatils dans l'urine, la technique de l'espace de tête statique ou dynamique « purge and trap » qui permet de préconcentrer les analytes, est couramment utilisée [203-205]. En mode statique, une partie de la phase gazeuse de l'échantillon chauffé et placé dans un réacteur fermé, est prélevée après obtention d'un équilibre. Dans ces conditions les analytes ne sont pas préconcentrés. En mode dynamique, la technique de « purge and trap » permet de préconcentrer les espèces par adsorption sur un support. L'entraînement des composés volatils à l'aide d'un gaz vecteur (généralement de l'hélium ou de l'azote) et leur piégeage dans un tube rempli de carbone ou de polymère organique poreux conduisent alors à des limites de détection de l'ordre du $\mu\text{g.L}^{-1}$ [206]. La récupération des analytes est réalisée à l'aide d'un solvant organique ou le plus souvent par un désorbeur thermique. Cette méthode peut être automatisée et convient particulièrement pour des analyses de routine. Avec un fonctionnement similaire, la technique du piégeage cryogénique suivi d'une désorption thermique a également été utilisée pour l'analyse de métabolites (cétones, terpènes, furanes, alcools, lactones, pyrrolles) dans l'urine [207, 208]. La technique du « purge and trap » et le piégeage cryogénique présentent l'avantage d'être généralement couplées directement à la chromatographie en phase gazeuse.

Toutefois l'analyse de composés volatils présents à l'état de traces, tels que les drogues, fait le plus souvent appel à la microextraction sur phase solide (SPME) comme technique d'extraction et de préconcentration [209-211].

Pour l'analyse des composés séléniés volatils dans des matrices biologiques, une technique de préconcentration et d'extraction est nécessaire du fait de la faible teneur des

analytes, généralement présents à des concentrations de l'ordre du $\text{ng}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$. Même si quelques auteurs utilisent le purge and trap [212, 213] ou le piégeage cryogénique [136], la technique la plus couramment utilisée est la microextraction sur phase solide [63, 214-219].

La SPME est une technique récente, initialement développée il y a une vingtaine d'années par l'équipe de Pawliszyn pour l'extraction de composés organiques [220]. Son atout majeur est de permettre l'extraction et la préconcentration des analytes pour ainsi détecter des espèces à des concentrations de l'ordre du $\text{ng}.\text{L}^{-1}$ [221]. En plus de cela, elle n'utilise pas de solvant. Elle est simple et rapide tant au niveau du prélèvement que de l'analyse.

Le système comporte une fibre en silice recouverte par un film de phase absorbante ou adsorbante. Les paramètres qui peuvent influencer la sorption sont: nature et épaisseur de la phase, mode d'extraction (espace de tête ou direct), temps d'extraction, agitation, température, volume d'échantillon, matrice (présence de sels, pH, force ionique), analyte.

Plusieurs phases existent comme les polymères de type gel que sont le polydiméthylsiloxane (PDMS) et le polyacrylate (PA). Il existe aussi des phases mixtes constituées de solides poreux de type divinylbenzène (DVB) ou Carboxen (CAR) fixées par le biais de polymères tels que le PDMS. A l'heure actuelle la société Supelco (Sigma Aldrich) propose cinq principaux types de phases de nature et de polarités différentes présentées dans le Tableau 9. D'autres types de phases existent et continuent d'être développées pour des applications spécifiques [221].

Tableau 9: Caractéristiques des principales fibres SPME disponibles (d'après Haberhauer et al. [222])

Type de fibre	Nature de la phase	Modes de sorption	Epaisseur de la phase (μm)	Volume de la phase (μL)
Polydiméthylsiloxane (PDMS)	gel	absorption	7 - 30 - 100	0.086 - 0.132 - 0.612
Polyacrylate (PA)	gel	absorption	85	0.521
Carbowax/divinylbenzène (CW/DVB)	gel/ solide poreux	adsorption	65	0.357
Carboxen/Polydiméthylsiloxane (CAR/PDMS)	gel/ solide micro-poreux	adsorption	75	0.436
Polydiméthylsiloxane /divinylbenzène (PDMS/DVB)	gel/ solide poreux	adsorption	65	0.357

Des études menées sur les composés volatils dans l'urine ont montré que la phase adsorbante de type carboxen-polydiméthylsiloxane (CAR-PDMS) était particulièrement efficace

en terme de sensibilité et de capacité à capter les petites molécules telles que les métabolites [165, 211, 223, 224]. De plus, par comparaison de trois types de fibres : PDMS, CAR-PDMS, PA pour l'analyse de DMSe et DMDSe, Dietz *et al.* ont montré que la fibre en CAR-PDMS affichait la plus importante efficacité d'extraction [216]. Dans ce cas, des microsphères poreuses de carbone (CAR) sont immobilisées sur un film liquide de PDMS. Les espèces viennent donc se fixer (physiquement ou chimiquement), sur ou dans les pores. L'extraction repose sur un processus d'adsorption. Les différentes composantes d'une fibre sont présentées Figure 10. Lors de l'étape d'extraction, la fibre est placée soit directement dans l'échantillon aqueux (extraction directe), soit dans l'espace situé au dessus de l'échantillon (extraction en espace de tête). Cette dernière est préconisée pour les composés volatils et les matrices chargées telles que les fluides biologiques afin de minimiser la sorption d'interférents présents dans la matrice. Dans le cas de l'extraction en mode espace de tête, le principe de la SPME est basé sur l'obtention d'un équilibre entre trois phases : la phase aqueuse, la phase gazeuse et la phase recouvrant la fibre. Lorsque l'équilibre est atteint la fibre est rétractée dans une protection en inox. L'aiguille de la seringue est alors introduite dans l'injecteur du chromatographe en phase gazeuse où les espèces sont désorbées thermiquement. Les étapes sont schématisées Figure 11.

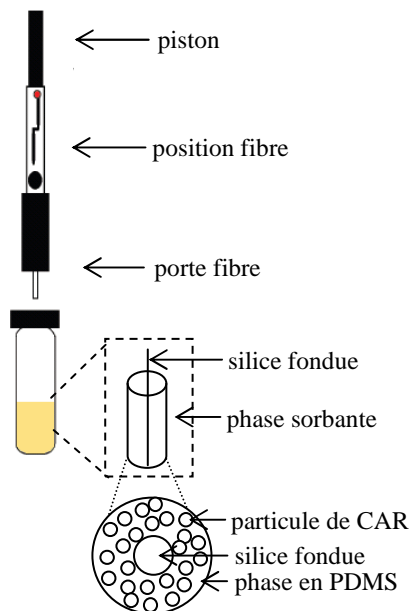


Figure 10: Schéma du système de microextraction sur phase solide (SPME) avec comme phase sorbante CAR/PDMS (d'après Supelco (Sigma Aldrich) [225])

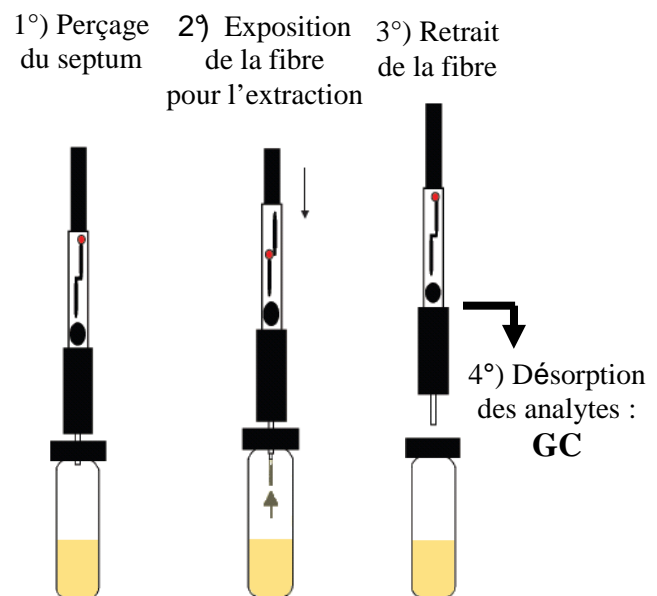


Figure 11: Procédure de microextraction sur phase solide (d'après Supelco (Sigma-Aldrich) [225])

Pour l'analyse de composés volatils sélénisés dans l'urine, la technique de choix est donc la microextraction sur phase solide en mode espace de tête avec une phase stationnaire en CAR-PDMS [165].

2.3. Choix de la technique de séparation

Différentes méthodes de séparation reposant sur les propriétés physiques ou chimiques des composés sont utilisées. Le choix de la technique et son optimisation sont des étapes nécessaires pour détecter le plus grand nombre de composés. En fonction de la méthode d'identification utilisée et donc du détecteur auquel cette technique est couplée (spectromètre de masse élémentaire ou moléculaire), la mise en place d'un autre mécanisme de séparation est parfois nécessaire pour assurer la bonne qualité des mesures.

Les techniques de séparation les plus couramment employées pour les analyses de spéciation sont : la chromatographie liquide haute performance (HPLC), la chromatographie en phase gazeuse (GC), l'électrophorèse capillaire (CE).

a) Séparation des composés dissous

La séparation par électrophorèse capillaire, réalisée dans un capillaire soumis à un champ électrique, est basée sur différentes propriétés des espèces en solution (conductivité, pKa...). Le temps d'analyse est court et la résolution est bonne. Cependant l'utilisation de l'électrophorèse est limitée à des matrices peu chargées, la ligne de base et les temps de rétention étant fortement perturbés par les constituants de la matrice [226]. Les limites de détection sont généralement supérieures à la dizaine de $\mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ même avec un détecteur très sensible tel que l'ICPMS [227, 228]. L'utilisation d'un nébuliseur à injection directe (MDIN) permet cependant d'atteindre des limites de détection inférieures au $\mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ [179]. Le couplage de l'électrophorèse capillaire avec des détecteurs spécifiques comme l'ICPMS reste tout de même assez délicat à mettre en œuvre [226]. Cette technique séparative a été utilisée par Gammelgaard et Bendahl [179] en couplage avec l'ICPMS pour identifier SeGlu dans l'urine après une chromatographie sur phase inverse comme technique préparative. La séparation était basée sur le fait que les sucres forment des complexes chargés avec le borate, complexes séparés selon leur rapport taille/charge par application du champ électrique. Toutefois, ce type de séparation reste relativement peu utilisé.

La chromatographie liquide, quant à elle, est simple d'utilisation et met à disposition un large éventail de mécanismes de rétention selon diverses propriétés physico-chimiques des composés : taille, polarité, solubilité, charges ioniques [229]. Ainsi cette technique est la plus couramment employée pour les analyses de spéciation des composés dissous, d'autant plus que son couplage avec un détecteur spécifique est aisé. Les mécanismes de séparation utilisés pour l'étude des métabolites sélénés dans l'urine sont présentés Tableau 10.

Tableau 10: Récapitulatif des techniques de chromatographie liquide utilisées pour la séparation de composés séléniés dissous dans l'urine

Type de colonne	Dimension colonne	Phase mobile	Durée (min)	Espèces séparées	Détecteur	LD absolues dans urine (en pg(Se))	Réf.
CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STERIQUE							
Shodex Asahipak GS-320 HQ	7.6x500mm	50mM tampon Tris-HCl, (pH=7.4) / 1mL.min ⁻¹ / 100µL <i>mode isocratique</i>	20	Se(VI) t _R = 12.3min Se(IV) t _R = 14min MMSe* ² t _R =16.9min TMSe ⁺ t _R =18.8min	UV ICP-MS	n.d.	[145, 230]
a) Shodex Asahipak GS-320 7G b) Shodex Asahipak GS320 HQ	a) 21.5x500mm b) 7.6x300mm	a) 10mM Tris-HNO ₃ , (pH=7.4) / 1mL.min ⁻¹ / 20µL b) 10mM formiate d'ammonium (pH=7.5 ou 9.5) / 0.5mL.min ⁻¹ / 10µL <i>mode isocratique</i>	25	a) sélénosucre 1 retenu : t _R =18min b) sélénosucre 1 retenu : t _R =23.9min	a) et b) ICP-MS b) ESI-MS	n.d.	[163]
a) Shodex Asahipak GS-320 HQ b) Shodex Asahipak GS 320A-M5D c) Shodex Asahipak GS- 320A-M8E	a) 7.6x300mm b) 0.5x150mm c) 0.8 x 250mm	50mM acétate d'ammonium (pH=6.5) a) 0.5mL.min ⁻¹ / 20µL b) 2.0µL.min ⁻¹ / 100nL c) 5.5µL.min ⁻¹ / 100nL <i>mode isocratique</i>	a) 28 b) 17 c) 22	a) sélénosucre 1 t _R ≈20min TMSe ⁺ t _R ≈26min + composés inconnus (15 - 20min) b) sélénosucre 1 t _R =13.4min TMSe ⁺ t _R =14.8min c) sélénosucre 1 t _R =17.9min TMSe ⁺ t _R =19.9min	ICP-MS	n.d.	[231, 232]
Shodex Asahipak GS- 320 HQ	7.6x500mm	50mM Tris-HNO ₃ , (pH=7.4) / 0.6mL.min ⁻¹ / 20µL	25	sélénosucre 1 t _R =19.4min TMSe ⁺ t _R =24,1min	ICP-MS (nebuliseur babington)	1000-6000	[173, 233- 237]

Type de colonne	Dimension colonne	Phase mobile	Durée (min)	Espèces séparées	Détecteur	LD absolues dans urine (en pg(Se))	Réf.
Shodex Asahipak GS-320 HQ	7.6x300mm	0.1% acide formique + 3% MeOH (t°c=40°c) / 0.6mL.min ⁻¹ / 100µL <i>mode isocratique</i>	40	sélénosucre 1 t _R ≈18min	UV ICP-MS	n.d.	[177]
Shodex RSpak NN-614	6.0x150mm	20mM phosphate d'ammonium dihydrogéné+ HCOOH ou H ₃ PO ₄ (pH=2.2 T°c=30°c) / 0.6mL.min ⁻¹ / 20µL <i>mode isocratique</i>	16	sélénosucre 1 t _R ≈5.3min sélénosucre 3 t _R ≈11.7min TMSe ⁺ t _R ≈13.9min	ICP-MS VG* ³ /ICP-MS (méthode sélective de TMSe ⁺)	TMSe ⁺ : 0.1	[160, 174, 238]
CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGE DE CATIONS							
Dionex Ionpac CS5	4x250mm	10mM acide oxalique + 20mM K ₂ SO ₄ (pH=3) + 2% MeOH / 1mL.min ⁻¹ / 100µL <i>mode isocratique</i>	8	SeIV t _R ≈1.5min SeVI + SeMet : coélution t _R ≈2min TMSe ⁺ t _R ≈3.8min	ICP-MS	TMSe ⁺ : 80	[167, 181]
Dionex Ionpac CS5	4x250mm	10mM acide oxalique + 20mM sulfate de potassium (pH=3) + 2% MeOH / 0.5mL.min ⁻¹ / 20µL <i>mode isocratique</i>	15	a) TMSe ⁺ t _R ≈10min SeMet t _R ≈8min b) TMSe ⁺ t _R ≈6min SeMet t _R ≈8min	ICP-MS	n.d.	[168]
SupelcosilLC-SCX	4.6x250mm	20mM pyridine + HCOOH (pH=1.9) / 1.5mL.min ⁻¹ / 100µL <i>mode isocratique</i>	8	SeVI t _R ≈2.2min TMSe ⁺ t _R ≈5min SeCyst t _R ≈2.8min SeMet t _R ≈3.3min SeEt t _R ≈3.7min	ICP-MS	n.d.	[187]

Type de colonne	Dimension colonne	Phase mobile	Durée (min)	Espèces séparées	Détecteur	LD absolues dans urine (en pg(Se))	Réf.
a) Hamilton PRP-X200 b) Zorbax 300-SCX	a) 4.1x250mm b) 4.6x150mm	a) 10mM pyridine + HCOOH (pH=1.6 T°c=30°c) / 1mL.min ⁻¹ / 20µL b) 7 ou 20mM pyridine + HCOOH (pH=2.1 T°c=30°c) / 1.5mL.min ⁻¹ / 20µL <i>mode isocratique</i>	10	a) sélénosucre 3 t _R ≈ 4min sélénosucre 1 t _R ≈7.8min TMSe ⁺ / sélénosucre 2 : retenus, t _R : n.d. b) sélénosucre 1 et 2 : non retenus TMSe ⁺ / sélénosucre 3 : retenus, t _R : n.d.	ICP-MS	≈10	[160]
Hamilton PRP-X200	4.1x250mm	10mM pyridine + HCOOH (pH=4 ou 5) / 1mL.min ⁻¹ / 20µL <i>mode isocratique</i>	15	pH=5 TMSe ⁺ t _R ≈7min sélénosucre 3 t _R ≈9min sélénosucre 1 t _R ≈11.2min pH=4 TMSe ⁺ t _R ≈5min sélénosucre 3 t _R ≈6.5min sélénosucre 1 t _R ≈16min	ICP-MS	≈10	[153, 174, 180, 195, 239]
CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGE D'ANIONS							
Spherisorb 5 ODS/AMINO	4.6x250mm	5mmol/dm ³ tampon phosphate (pH=2.8) / 1mL.min ⁻¹ / 100µL <i>mode isocratique</i>	8	TMSe ⁺ t _R ≈2.4min (+ 2 composés non identifiés)	ICP-MS	50	[172]
		Tampon phosphate (A)3.5mmol/dm ³ (B)7mmol/dm ³ (pH=6) / 1mL.min ⁻¹ / 100µL <i>mode gradient</i>	33	TMSe ⁺ t _R ≈2.9min (+ 2 composés non identifiés)			

Type de colonne	Dimension colonne	Phase mobile	Durée (min)	Espèces séparées	Détecteur	LD absolues dans urine (en pg(Se))	Réf.
Dionex Ionpac AG11-HC	2x250mm	25mM NaOH + 2% MeOH (pH=)/ 0.2mL.min ⁻¹ / 20μL <i>mode isocratique</i>	10	SeMet : non retenu SeVI t _R =6.7min SeIV t _R = 8.5min	ICP-MS	Se(IV) : 8 Se(VI) :16	[181]
Hamilton PRP-X100	4.6x250mm	100mM Tampon phosphate (pH=6,8) / 1.5mL.min ⁻¹ / 100μL <i>mode isocratique</i>	6	TMSe ⁺ t _R =1.9min: peu retenu SeCyst t _R =2.2min SeIV t _R =2.6min } coélution SeVI t _R =4.0min SeMet t _R =4.8min	MW* ⁻³ -HG* ⁻³ -AAS	TMSe ⁺ : 300 SeCyst : 400 SeIV : 300 SeVI : 500 SeMet : 800	[198]
Hamilton PRP-X100	4.1x100mm	10mM acide citrique + NH ₄ OH (pH=4,8) / 1,5mL.min ⁻¹ / 20μL <i>mode isocratique</i>	20	TMSe ⁺ t _R ≈7min sélénosucres 3 t _R ≈8.5min sélénosucres 1 t _R ≈12min	ICP-MS	6	[195]
Hamilton PRP-X100	4.1x250mm	citrate d'ammonium (de 0.5 à 20mM) + 2%MeOH (pH =3.7 à 8.0) / 1mL .min ⁻¹ / 200μL <i>mode gradient</i>	25	TMSe ⁺ t _R ≈2min: non retenu MeSeCyst t _R ≈3min SeMet t _R ≈5min SeIV t _R ≈7.5min sélénosucres 1 ? (espèce majoritaire) t _R ≈9min SeVI t _R ≈9.1min	ICP-MS	MeSeCyst : 2 SeMet : 6 SeIV : 2 SeVI : 4	[185]
Hamilton PRP-X100	4.1x100mm	10mM acide citrique + NH ₄ OH (pH=4.5 t ^o c=40°C) / 1.5mL.min ⁻¹ N.B : mélange avant nébulisation avec isopropanol/eau (1 :1) 0.02mL.min ⁻¹ / 20μL <i>mode isocratique</i>	10	SeIV retenu : t _R = n.d. SeVI retenu t _R =n.d. sélénosucres 1 t _R ≈4min sélénosucres 2 retenu t _R :n.d. TMSe ⁺ sélénosucres 3 t _R ≈1min } Non retenus	ICP-MS	10	[160]

Type de colonne	Dimension colonne	Phase mobile	Durée (min)	Espèces séparées	Détecteur	LD absolues dans urine (en pg(Se))	Réf.
Hamilton PRP-X100	4.1x250mm	carbonate d'ammonium (de 10 à 50mM) + 2%MeOH (pH=9.0) / 1mL .min ⁻¹ / 200μL <i>mode gradient</i>	30	SeIV t _R ≈8min sélénosucré 1 ? (espèce Majoritaire) t _R ≈10.2min : coélution avec SeVI	ICP-MS	SeIV : 2 SeVI : 4	[184]
CHROMATOGRAPHIE DE PHASE INVERSE							
Nucleosil C ₁₈	4x250mm	30 mM formiate d'ammonium + HCOOH (pH=5.0) + 5% méthanol / 0.75mL.min ⁻¹ / 50μL <i>mode isocratique</i>	12	SeVI,SeIV, SeCyst coélution t _R ≈3min SeCysta t _R ≈3.8min SeMet t _R ≈5.3min SeEt t _R ≈9.6min	ICP-MS	Se(IV) : 107 SeMet : 8 SeEt : 15	[240]
2x Luna C18 en série	2x100mm	200mM acetate d'ammonium + 5% MeOH / 0.2mL.min ⁻¹ / 12μL <i>mode isocratique</i>	15	TMSe ⁺ t _R ≈2.9min MeSeCyst t _R ≈3.5min SeCysta t _R ≈4.3min SeMet t _R ≈5.2min SeGal t _R ≈8.1min SeGlu t _R ≈10.5min SeEt t _R ≈12min	ICP-MS	n.d.	[178, 179]
Hypersil BDS C ₁₈	2x100mm	(A) 2% CH ₃ COOH (B) 90:10 MeOH : 2-propanol (de 1 à 55%) <i>mode gradient</i> / 0,1mL.min ⁻¹ / 50μL	20	SeMet t _R =4.2min SeCysta t _R =5.8min	ICP-MS MS/MS	n.d.	[241]
Atlantis dC18	4.6x150mm	20mM formiate d'ammonium + HCOOH (pH=3, t ^o c=30°c) + 3% MeOH / 1mL.min ⁻¹ / 20μL <i>mode isocratique</i>	10	sélénosucré 3 t _R ≈2.7min TMSe ⁺ t _R ≈3min SeMet t _R ≈ 4.7min sélénosucré 1 t _R ≈6.5min sélénosucré 2 t _R ≈8.7min	ICP-MS	≈10	[153, 160, 174, 180, 191]

Type de colonne	Dimension colonne	Phase mobile	Durée (min)	Espèces séparées	Détecteur	LD absolues dans urine (en pg(Se))	Réf.
XTerra MS C ₁₈	2.1x250mm	0.01% TEACl* ¹ (pH=4.5) + 2% MeOH / 1mL.min ⁻¹ / 10μL <i>mode isocratique</i>	13	sélénosucres 1 t _R ≈10.5min	ICP-MS	n.d.	[161]
XTerra MS C ₁₈	2.1x250mm	2% MeOH / 1mL.min ⁻¹ / 10μL <i>mode isocratique</i>	n.d.	SeCysta peu retenu : t _R n.d. sélénosucres 1 t _R =14.7min	ESI-MS/MS	MeSeCys : 11000-57000 SeMet : 680-1300 SeCyst : 130	[161]
Atlantis dC ₁₈	4.6x150mm	20mM formiate d'ammonium + HCOOH (pH=3 t ^o c=30°c) + 3%MeOH / 1mL.min ⁻¹ / 20μL <i>mode isocratique</i>	120	sélénosucres 3 t _R ≈2.7min TMS ⁺ t _R ≈3min SeMet t _R ≈ 4.7min sélénosucres 1 t _R ≈6.5min sélénosucres 2 t _R ≈8.7min DMS ₂ Se t _R ≈20min DMS ₂ Se ? t _R ≈74min DMDSe t _R ≈115min + de nombreux composés non identifiés	ICP-MS	≈10 (espèces dissoutes)	[191]
C18 BDS Hypersil	2.1x150mm	50% 80mM acétate d'ammonium (pH=6,7) + 10%MeOH / 0.2mL.min ⁻¹ / 20μL <i>mode isocratique</i>	8	sélénosucres 1 t _R =3.2min sélénosucres 2 t _R ≈3.7min	APCI-MS/MS	120-1800	[238]
Luna C18	15x250mm	10mM formiate d'ammonium (pH=7) + 5%MeOH / 10mL.min ⁻¹ / 1mL <i>mode isocratique</i>	25	composé majoritaire t _R =6min	UV ICP-MS	n.d.	[177]

Type de colonne	Dimension colonne	Phase mobile	Durée (min)	Espèces séparées	Détecteur	LD absolues dans urine (en pg(Se))	Réf.
Phase inverse modifiée Spherisorb C ₁₈ modifiée DDAB* ¹ (10 ⁻³ M)	4.6x210mm	acétate d'ammonium (de 0.01 à 0.1M) + 0.5% MeOH + 10 ⁻⁵ M DDAB* ¹ / 1mL.min ⁻¹ / 50µL <i>mode gradient</i>	14	SeCyst t _R =4.0min SeMet t _R =5.6min SeEt t _R = 8.8min SeIV t _R =11.4min SeVI t _R =12.2min SeUr t _R =4.9min TMSe ⁺ t _R =3.8min	MW* ³ -HG* ³ -ICP-MS	SeCyst: 265 SeMet: 51 SeVI: 115 SeUr: 80	[242]
CHROMATOGRAPHIE DE PHASE INVERSE AVEC APPARIEMENT D'IONS							
Hamilton PRP-1	4.6x150mm	5mM tetrabutylammonium phosphate (pH=7,6) + 3% MeOH / 1.7mL.min ⁻¹ / 200µL <i>mode isocratique</i>	10	TMSe ⁺ t _R =59s : non retenu SeIV t _R =2.2min SeVI t _R =8.2min	ICP-MS	TMSe ⁺ : 22 SeIV: 40 SeVI: 74	[171]
Luna C8	1x100mm	20% MeOH + a) 10mM HFBA* ¹ b) 3mM NFPA* ¹ / 0.05mL.min ⁻¹ / 3µL <i>mode isocratique</i> N.B.: pH urine ajusté à 2	a) 12 c) 18	a) TMSe ⁺ t _R ≈2.8min MeSeCyst t _R ≈3.8min MeSeMet t _R ≈4.9min SeMet t _R ≈9min b) MeSeCys t _R ≈5.6min TMSe ⁺ t _R ≈8.6min MeSeMet t _R ≈14.5min SeMet t _R ≈17min	ICP-MS	TMSe ⁺ , SeMet, [188] MeSeMet: 2.4-5.1	
LiChrosorb RP18	4.6x250mm	2,5mM sodium 1-butanesulfonate + 8mM TBAH* ¹ + 4mM acide malonique + HNO ₃ ou 20% NH ₄ OH (pH=4.5) + 0.05% MeOH / 1mL.min ⁻¹ / 20µL <i>mode isocratique</i>	20	SeVI t _R ≈3.2min SeUr t _R ≈4.5min TMSe ⁺ t _R ≈5.2min SeMet t _R ≈6.7min SeEt t _R ≈15.5min	ICP-MS	SeVI : 12 SeUr : 22 TMSe ⁺ :18 SeMet: 24 SeEt: 30	[170, 189]

Type de colonne	Dimension colonne	Phase mobile	Durée (min)	Espèces séparées	Détecteur	LD absolues dans urine (en pg(Se))	Réf.
C8 Altima	4.6x150mm	2mM acide hexanesulfonique + 0,4% CH ₃ COOH + 0,2% triéthylamine (pH=2.5) + MeOH (95 :5) / 0,9mL.min ⁻¹ / 100μL <i>mode isocratique</i>	11	SeMet t _R ≈3.3min MeSeMet t _R ≈3.8min TMSe ⁺ t _R ≈4.5min SeEt t _R ≈5.5min MeSeAdo* ² t _R ≈6.8min AdoSeMet* ² t _R ≈10min	ICP-MS	n.d.	[169]
Symmetry Shield RP18	3.9x150mm	0,1% HFBA* ¹ + MeOH (de 0.3% à 2%) / 1mL.min ⁻¹ / 100μL <i>mode gradient</i>	30	SeIV t _R ≈1.9min TMSe ⁺ t _R ≈ 2.3min SeCyst t _R ≈4min SeUr t _R ≈7min SeMet t _R ≈11.3min	ICP-MS	n.d.	[183]
Symmetry C ₈	4.6x250mm	13mM TBAH* ¹ + 1.3% MeOH + acide malonique (pH=5.7-5.8) / 1mL.min ⁻¹ / 50μL <i>mode isocratique</i>	45	TMSe ⁺ t _R ≈2.5min SeCyst t _R ≈2.8min SeMet t _R ≈4.8min SeIV t _R ≈6min sélénosucres 1 t _R =6.1min +2 composés non identifiés	ICP-MS	Dans urine synthétique TMSe ⁺ : 65 SeCyst : 35.5 SeMet : 50 SeUr : 75 SeIV : 65 SeEt : 50	[190]
Nucleosil C ₁₈	4x250mm	30 mM formiate d'ammonium + 5% MeOH + 10 mM TBAH* ¹ + HCOOH (pH=5.0) / 0.75mL.min ⁻¹ / 50μL <i>mode isocratique</i>	12	SeCyst t _R ≈3min SeMet t _R ≈4min SeEt t _R ≈5.6min Se(VI) t _R ≈9min	ICP-MS	Se(VI) 37.4 SeCyst : 20.4 SeMet: 7.0 SeEt : 11.2	[240]

Type de colonne	Dimension colonne	Phase mobile	Durée (min)	Espèces séparées	Détecteur	LD absolues dans urine (en pg(Se))	Réf.
Luna C8	1x100mm	0.2% HFBA* ¹ + 20% MeOH / 0.05mL.min ⁻¹ (1mm) / 3µL <i>mode isocratique</i>	20	sélénosucres 1 } sélénosucres 2 } coélution TMSe ⁺ t _R ≈3min MeSeCyst t _R ≈5min MeSeMet t _R ≈6min SeMet t _R ≈11.2min	ICP-MS (nébuliseur à injection directe)	Dans eau milli-Q ⁷⁸ Se TMSe ⁺ :1.5 MeSeCys: 1.5 SeMet: 3 sélénosucres 1 et 2 : 0.9	
Luna C8	2x100mm	0.2% HFBA* ¹ + 30% MeOH / 0.2mL.min ⁻¹ / 12µL <i>mode isocratique</i>	20	TMSe ⁺ t _R ≈2.7min MeSeCyst t _R ≈4min SeCysta t _R ≈12min SeMet t _R ≈7.5min sélénosucres 1 t _R ≈2min SeEt t _R ≈16min	ICP-MS (nébuliseur micro-concentrique)	Dans eau milli-Q ⁷⁸ Se [179] TMSe ⁺ :9.6 MeSeCyst:12 SeCysta: 14.4 SeMet: 12 sélénosucres 1 et 2 : 12 SeEt: 20.4	

n.d. : non défini

*¹ Réactifs phase mobile

DDAB : bromure de didodécyltriméthylammonium

TEABr: Bromure de tétraéthylammonium

TBAH: Hydroxyde de tétrabutylammonium

NFPA : Acide non-heptafluorobutyrique

HFBA : Acide heptafluorobutyrique

*² Composés séléniés

MMSe: monométhylsélénol

AdoSeMet : adénosylsélénométhionine

MeSeAdo : méthylsélénoadénosyl

*³ Techniques analytiques :

MW : Digestion assistée par micro-ondes

HG ou VG : génération d'hydrures

Le Tableau 10 montre que de nombreuses séparations chromatographiques ont été développées pour l'analyse du sélénium dans l'urine, les méthodes basées sur la chromatographie en phase inverse étant les plus utilisées. On peut distinguer deux grands types de séparations : par affinité avec la phase stationnaire (chromatographie de phase inverse, chromatographie d'échange d'ions) ou par taille (chromatographie d'exclusion stérique). Quel que soit le mécanisme de séparation, les sélénosucres, du fait de leur taille (environ 200 daltons) et des groupements d'atomes de différente nature (cycle carboné ; groupements OH, NH₂), sont généralement bien retenus sur la phase stationnaire. Les acides aminés ainsi que les espèces inorganiques du sélénium possèdent des propriétés acido-basiques. Les acides aminés peuvent se trouver sous forme zwitterionique, cationique et anionique. La forme sous laquelle ils se trouvent dépend du pH. Le pH de la phase mobile ou de l'échantillon est donc un paramètre important pour la séparation des espèces dans le cas d'affinité avec la phase stationnaire.

La **chromatographie d'exclusion stérique (SEC)** présente l'avantage d'être très robuste et de pouvoir supporter des matrices très chargées, cependant son pouvoir résolutif, relativement bas, fait qu'elle est généralement employée en tant que chromatographie préparative (cf. I.B. §2.2.). La SEC ne permet pas une séparation satisfaisante des espèces proches en taille telles que les différents acides aminés séléniés. Elle est cependant souvent utilisée pour la séparation entre TMS⁺ et les sélénosucres présents dans l'urine [160, 173, 231, 232, 235, 236, 238]. L'ordre d'élution est fonction du volume hydrodynamique des molécules. Plus il est élevé, plus l'élution de la molécule est rapide.

La **chromatographie d'échange d'anions** retient les composés anioniques en utilisant une phase stationnaire greffée de groupements fonctionnels positivement chargés. Les espèces couramment séparées sont SeIV, SeVI, SeMet et SeCys. La séparation est souvent réalisée à l'aide d'une colonne échangeuse forte (groupement R-N(CH₃)⁺) telle que l'Hamilton PRP-X100 [160, 185].

La **chromatographie d'échange de cations** retient les espèces positivement chargées, la phase stationnaire présentant des groupements fonctionnels chargés négativement, les plus courants étant les groupements sulfonates (R-SO₃⁻). Elle est particulièrement utile pour la rétention spécifique du TMS⁺ et des acides aminés [168, 186]. Cependant, pour l'analyse de formes inconnues dans des matrices biologiques et complexes comme l'urine, la chromatographie échangeuse d'ions, trop spécifique, n'est pas adaptée et donc peu utilisée.

La **chromatographie de phase inverse** est la technique la plus couramment utilisée pour la séparation de composés séléniés dans l'urine. Elle met en jeu des phases stationnaires apolaires. Il existe deux colonnes de même type dont les phases stationnaires diffèrent selon la

longueur de la chaîne alkyle (C8 ou C18) greffée à la surface. Plus le nombre de carbone fixé est important et plus la colonne est hydrophobe. L'urine est une matrice biologique, la majorité des composés sélénés présents sont de nature organique et possèdent des groupements hydrophobes. La chromatographie en phase inverse apparaît donc la mieux adaptée pour la rétention de ces composés. Un autre avantage est que la plupart des sels, non retenus, sont élués dans le volume mort. C'est donc une technique utilisée préférentiellement pour l'étude de matrices chargées en sels comme l'urine. Le pH de la phase mobile peut jouer un rôle important sur la rétention des analytes possédant des propriétés acido-basiques tels que la sélélocystine ou la sélélocéthionine, et ainsi changer la sélectivité de certains analytes. Cependant, la gamme de pH utilisée est limitée entre 3 et 8, le support en silice se solubilisant dans la phase mobile au-delà de ces valeurs [243]. En comparaison avec les phases stationnaires échangeuses de cations ou d'anions, la phase inverse permet la rétention des acides aminés sélénés et des deux sélélocucres SeGal et SeGlu [178, 179, 240].

Dans les différentes colonnes commercialisées, il existe des variantes d'une chromatographie en phase inverse classique, telles que la colonne Atlantis dC18 (Waters). Les caractéristiques physico-chimiques de la phase stationnaire de cette colonne telles que le « endcapping » (remplacement des groupements silanols libres par des groupements triméthylsilylés), la taille des pores de la silice, le type de ligand et la densité de greffage ont été optimisées pour assurer une stabilité pour de faibles pH (jusqu'à pH 2) et surtout une bonne rétention des composés organiques polaires tout en conservant une rétention modérée des composés apolaires [244]. De par ses propriétés hydrophiles et hydrophobes, cette colonne permet ainsi d'obtenir une séparation satisfaisante de TMSe^+ , SeMet et des trois sélélocucres présents dans l'urine [153, 160, 174, 180, 191].

Afin de mieux retenir les acides aminés, le cation TMSe^+ et les espèces inorganiques qui ont tendance à être élués près du volume mort de la colonne en phase inverse classique, une alternative consiste à utiliser un agent de paire d'ions. De cette manière, l'ajout d'hydroxyde de tétrabutylammonium (TBAH), agent cationique, permet une meilleure rétention des espèces inorganiques [171]. A l'inverse, l'utilisation d'acide heptafluorobutyrique (HFBA) ou d'acide nonafluoropentanoïque (NFPA) comme agent anionique permet une élution plus tardive du TMSe^+ et éventuellement des acides aminés [169, 188].

Des colonnes remplies d'une phase stationnaire en **carbone graphitique poreux** (PGC) ont également été utilisées pour la spéciation des espèces sélénées dans les eaux naturelles mais à l'heure actuelle, aucune application pour l'analyse des composés sélénés dans l'urine n'a été reportée. Le carbone graphitique poreux est composé d'un empilement de feuillets d'atomes de

carbone répartis selon un arrangement hexagonal. La PGC peut être assimilée à une immense molécule aromatique polynucléaire. Contrairement à la silice greffée octadécyl classique, l'absence de silanols à sa surface en fait un support idéalement hydrophobe [245]. La PGC fait également intervenir des interactions électroniques (transfert de charge donneur-accepteur) entre les groupements polarisés des solutés et la présence de bandes d'électrons π délocalisés à sa surface [246, 247]. Grâce à ses propriétés de planéité et d'hydrophobie, la PGC présente des sélectivités plus grandes qu'une phase C18 classique envers les isomères de systèmes aromatiques ou conjugués [248-250]. Un atout supplémentaire est sa stabilité chimique qui lui permet de tolérer des pH allant de 0 à 14, des hautes températures ou de fortes concentrations en sel. La phase PGC permet donc de séparer des composés polaires, apolaires ou encore des isomères géométriques. Les analytes sont retenus sur PGC par des interactions hydrophobes et électroniques [245].

Dans le cas de l'analyse de spéciation de Se, cinq composés organosélénés (méthylsélénocystine (MeSeCys), SeMet, SeEt, sélénocystamine (SeCysta), SeCys) ont été séparés avec une phase mobile composée d'acide heptafluorobutyrique et de méthanol [251]. Au laboratoire, une phase mobile composée d'acide formique a permis de séparer SeIV, SeVI, SeMet, SeCys et SeEt [252]. La phase PGC a également été utilisée par Lindemann et Hintelmann [253] pour séparer des biomolécules sélénées, présentes dans une levure, avec un gradient d'acide formique et de méthanol. Ces travaux montrent que cette phase stationnaire pourrait être une alternative intéressante aux phases couramment utilisées pour la séparation des composés inorganiques et organiques sélénés.

b) Séparation des composés volatils

La chromatographie en phase gazeuse permet de séparer les composés volatils et stables thermiquement tels que DMSe, DMDS_e et DMSeS. Pour l'analyse des composés volatils sélénés dans différentes matrices, composés pour la plupart apolaires, les colonnes avec une phase stationnaire apolaire, soit en polydiméthylsiloxane, apparaissent bien adaptées et sont couramment employées [219]. Les travaux de Dietz *et al.* [215] ont montré qu'une colonne de polarité intermédiaire (50% phényl-polyméthylsiloxane) permettait d'obtenir également la séparation de DMSe, DMDS_e et diéthylsélénure (DEtSe).

L'analyse simultanée des composés soufrés et sélénés peut s'avérer très intéressante sachant que ces espèces ont un comportement similaire et sont susceptibles d'interagir pour former des composés mixtes soufrés/sélénés [254]. Une colonne qui a déjà fait ses preuves pour

l'analyse des composés volatils sélénisés et soufrés dans l'urine, est une colonne en silice greffée en polydiméthylsiloxane (SPB1-sulfur), initialement conçue pour la séparation des composés volatils soufrés [165, 191]. Son importante épaisseur de phase (4 μ m) lui confère la capacité à séparer les composés volatils de faible poids moléculaire tels que DMSe, DMDS₂, et DMSeS. Dans le cas d'une analyse simultanée du soufre et du sélénium, le couplage avec un détecteur multiélémentaire est nécessaire. Parmi ces détecteurs, la spectrométrie de masse à plasma induit (ICPMS) et la spectrométrie d'émission atomique à plasma induit par micro-ondes (MIP-AES) offrent des limites de détection similaires, généralement plus faibles que tous les autres détecteurs [255].

2.4. Choix du détecteur

La faible teneur en sélénium dans l'urine de sujets non supplémentés (de 10 à 80 μ g(Se).L⁻¹ [28]) et la complexité de la matrice empêchent souvent la détection des espèces sélénisées qui sont présentes à des concentrations inférieures aux limites de détection analytiques. L'analyse du sélénium et de ses composés nécessite donc l'utilisation d'un détecteur très sensible. Par l'utilisation d'un système d'introduction spécial, tel que la génération d'hydrures, et d'une cellule de collision dont le principe de fonctionnement est expliqué dans la partie suivante (cf. I.B. §3.1.), la spectrométrie de masse à plasma induit (ICPMS) permet d'atteindre des limites de détection de l'ordre de quelques ng(Se).L⁻¹ [239]. De tous les détecteurs, l'ICPMS est de loin le plus sensible, d'un facteur 100 à 1000 par rapport à la spectrométrie d'émission atomique (ICP AES) [256]. Du fait de sa spécificité permettant de maîtriser les interférences liées à la matrice, l'ICPMS est le détecteur le plus couramment utilisé pour l'analyse de matrices environnementales et biologiques (Tableau 10). Ce détecteur présente également d'autres avantages:

- multiélémentaire, il permet la détection simultanée de plusieurs isotopes (correction de certaines interférences, dilution et traçage isotopique) ;
- il se couple aisément avec les techniques séparatives telles que l'HPLC ou la GC, ce qui permet de conserver l'intégrité des espèces entre la séparation et la détection.

D'autres détecteurs tels que la spectrométrie d'absorption atomique ou de fluorescence atomique (AAS ou AFS) ainsi que des techniques voltamétriques [182] possèdent des limites de détection généralement plus élevées mais peuvent parfois remplacer l'ICPMS (selon les concentrations étudiées). L'inconvénient de tous ces détecteurs est qu'ils ne permettent pas

d'aboutir à une identification structurale de la molécule détectée. En effet, l'identification et la quantification des composés sont réalisées par des ajouts dosés d'étalons à l'échantillon. L'identification par coélution avec les étalons est limitée par le nombre d'étalons disponibles et l'efficacité de la séparation. Dans le cas où l'étalon n'est pas disponible, la stratégie d'identification oblige la mise en œuvre d'autres outils analytiques.

Parmi ces outils complémentaires, des techniques d'ionisation « douce » couplées à la spectrométrie de masse dite « moléculaire » se sont développées à partir des années 90 pour permettre une identification structurale des composés. Le profil isotopique caractéristique de Se (^{74}Se : 0.89% ; ^{76}Se : 9.36% ; ^{77}Se : 7.63% ; ^{78}Se : 23.8% ; ^{80}Se : 49.6% ; ^{82}Se : 8.73%) facilite la détection des molécules contenant du sélénium lors de l'identification en masse. En tant qu'alternative à l'ionisation par plasma induit (ICP), on trouve donc l'ionisation par électrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) couplées généralement à la spectrométrie de masse tandem (MS/MS). Cependant, la spectrométrie de masse moléculaire présente également certains inconvénients. Les limites de détection obtenues sont généralement plus élevées que celles obtenues en ICPMS, ce qui nécessite une préconcentration des analytes avant analyse [257]. De plus, la technique n'étant pas spécifique d'un élément, la matrice a une influence très importante sur la détection, ce qui nécessite également une pureté d'échantillon maximale. Les travaux de Diaz Huerta *et al.* [193] ont ainsi montré l'influence du dessalement de la matrice sur le spectre de masse du métabolite majeur présent dans l'urine. La purification de l'échantillon peut se faire par séparations orthogonales (utilisation de différents mécanismes de séparation HPLC) couplées à l'ICPMS suivies de la collecte des fractions contenant les analytes d'intérêt avant analyse par spectrométrie de masse moléculaire. Une étude de Gammelgaard *et al.* [177] utilisant une combinaison de différentes techniques séparatives (chromatographie préparative de phase inverse, chromatographie d'exclusion stérique) et l'ICPMS comme détecteur, a finalement permis d'isoler SeGal pour son identification par APCI-MS/MS dans l'urine humaine. Il est également possible d'identifier les composés en utilisant le même mécanisme de séparation couplé soit à la spectrométrie de masse atomique, soit à la spectrométrie de masse moléculaire. Par le premier couplage, il est alors possible de déterminer les temps de rétention des composés contenant Se, le second couplage permettant ensuite d'obtenir la structure chimique du composé éluant à ce temps de rétention [163, 175, 258].

La résonance magnétique nucléaire (RMN) permet également l'identification structurale des composés. La RMN n'est utilisée qu'en fin de protocole car elle requiert une purification de l'échantillon plus importante ainsi qu'une concentration de l'analyte plus élevée que la spectrométrie de masse. Si c'est le cas, la RMN peut alors servir à discriminer les

diastéréoisomères et les énantiomères qui ne peuvent pas l'être par spectrométrie de masse moléculaire. La configuration du sélénosucrose majeur, initialement identifié en tant que Se-méthyl-N-acétylsélénohexosamine par ESI-MS-MS, a ainsi pu être élucidée par RMN comme étant Se-méthyl-N-acétylgalactosamine [175]. Si la purification de l'échantillon n'est pas suffisante, la RMN peut toutefois être employée pour la caractérisation d'un étalon de synthèse utilisé pour l'identification par HPLC-ICPMS, les diastéréoisomères ayant des propriétés chromatographiques différentes [163].

La stratégie généralement mise en œuvre pour l'identification des composés sélénés dissous est schématisée Figure 12. Comme première technique d'analyse, l'HPLC-ICPMS est utilisée afin de détecter le maximum de composés sélénés. Dans le cas où l'étalon correspondant au pic chromatographique détecté est disponible, ce dernier peut alors être identifié. L'identification par ajout dosé avec l'utilisation d'un seul mécanisme chromatographique n'est pas une technique fiable dans la mesure où, dans les échantillons naturels, en particulier l'urine, de nombreux composés inconnus peuvent coéluer avec l'étalon. Afin de vérifier les résultats, l'utilisation de plusieurs mécanismes de séparation est donc nécessaire. Dans le cas où l'étalon n'est pas disponible, l'identification par spectrométrie de masse structurale HPLC-ESI-MS/MS peut prendre le relais si la teneur en composé et la purification de l'échantillon sont satisfaisantes. Si c'est le cas, la structure du composé peut être élucidée. Afin de vérifier les résultats, une seconde méthode d'identification plus fiable, la RMN, mais qui demande des niveaux de purification et de préconcentration supérieurs à l'HPLC-ESI-MS/MS peut être utilisée. Si ces niveaux de qualité ne peuvent être atteints, il est également possible d'envisager la vérification des résultats obtenus par ESI-MS/MS en synthétisant le composé supposé identifié. Une fois la vérification de la structure de l'étalon achevée par RMN, il est alors possible d'identifier le composé par HPLC-ICPMS.

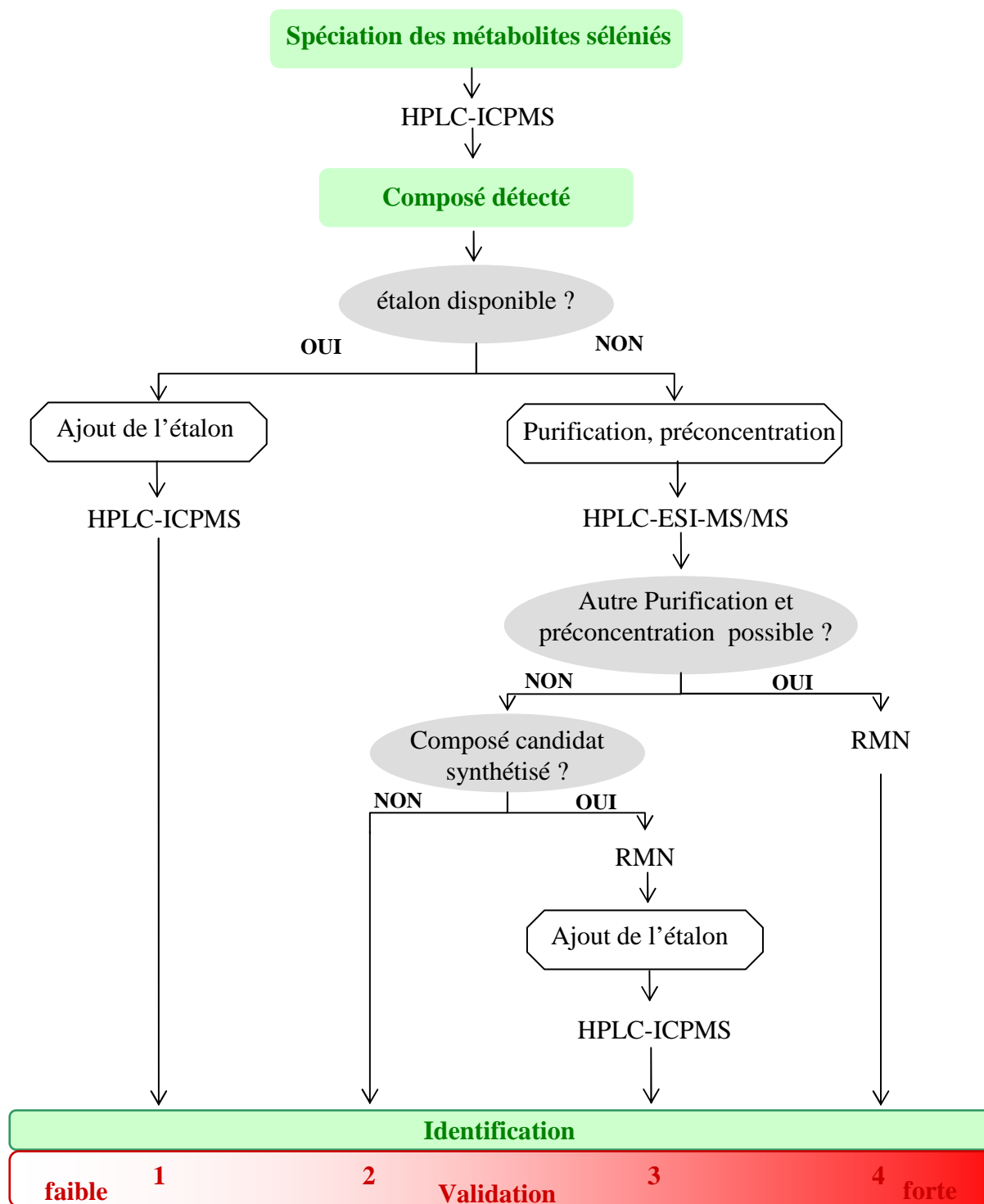


Figure 12: Stratégie généralement utilisée pour l'identification des métabolites sélénisés dissous par l'utilisation complémentaire de l'HPLC-ICPMS et de l'HPLC-ESI-MS/MS (d'après Ogra Y. [259])

3. LA SPECTROMETRIE DE MASSE POUR LA DETECTION ET L'IDENTIFICATION DES COMPOSES DU SELENIUM

Comme nous venons de le voir, la spectrométrie de masse est devenue, depuis une dizaine d'année, une technique incontournable pour l'étude des métabolites sélénés. Elle est couramment utilisée pour obtenir le poids moléculaire d'un composé ainsi que des informations sur sa structure chimique. Un spectromètre de masse est composé de 3 éléments : la source d'ionisation, l'analyseur de masse, le détecteur. Les analytes sont ionisés dans la source, puis par un système de vide, sont amenés jusqu'à l'analyseur où ils sont séparés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

Les systèmes d'ionisation courants sont l'ionisation à impact électronique (EI), l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI), le plasma induit (ICP), l'électrospray (ESI), ou l'ionisation/désorption par laser (MALDI).

A l'heure actuelle le quadripôle est l'analyseur de masse le plus couramment utilisé. Les instruments employés au cours de cette étude sont tous équipés avec ce type d'analyseur. Il existe également la trappe d'ions qui est un cas particulier d'analyseur quadripolaire et bien d'autres tels que le détecteur à temps de vol (TOF) employé par exemple par couplage avec la source MALDI pour l'analyse des protéines, le spectromètre de masse à secteur magnétique, la résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FT-ICR) ou encore l'Orbitrap.

Les détecteurs sont généralement des multiplicateurs d'électrons, des plaques incrustées de micro-canaux ou des barrettes de diodes.

3.1. Sources d'ionisation couplées à la spectrométrie de masse

Il existe deux types de spectrométries de masse. La spectrométrie de masse dite « élémentaire » et la spectrométrie de masse dite « moléculaire ». Ces deux types sont définis selon la source d'ionisation utilisée. La spectrométrie de masse moléculaire a pour but d'identifier la structure de composés cibles. Pour cela, l'emploi d'une source à ionisation douce est indispensable (ESI, APCI...). Elle permet une simple ionisation de la molécule sans casser les liaisons inter atomiques. Ce type de source est en opposition avec les sources d'ionisation dites destructives comme l'ICP. Avec ce type de source toute la matière introduite (solvant, matrice, analytes) est atomisée puis ionisée. Seule l'analyse élémentaire de l'échantillon est alors obtenue.

a) Détection du sélénium élémentaire par ICPMS

La spectrométrie de masse couplée au plasma induit a été introduite au milieu des années 1980. Au cours de ces 30 dernières années de nombreux développements ont amélioré ses performances, en particulier l'introduction des cellules de collision/réaction (CCR) pour la diminution des interférences, particulièrement gênantes pour l'analyse du sélénium. Chez certains constructeurs, le développement d'interfaces de couplage avec des techniques séparatives (GC-ICPMS ; EC-ICPMS..) a également permis une utilisation plus aisée et des domaines d'application plus étendus. A l'heure actuelle c'est le détecteur le plus couramment utilisé pour l'analyse de composés à l'état de trace dans diverses matrices. Capacité multiélémentaire (40 ou 60 éléments suivis lors d'une même analyse), rapidité, sélectivité, sensibilité (limites de détection de l'ordre de la dizaine du ng.L^{-1}), précision (écart type relatif généralement inférieur à 5%), gamme linéaire étendue (jusqu'à 9 ordres de grandeur) sont les atouts majeurs de l'ICPMS. En comparaison avec les techniques de spectrométrie de masse moléculaire, il est robuste et simple d'utilisation.

Principe et application de l'ICPMS pour l'analyse du sélénium

Brièvement, l'échantillon est atomisé et ionisé dans la torche à plasma. Les ions sont ensuite séparés par le quadripôle en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z). Les éléments constitutifs de l'ICPMS sont : le nébuliseur, la torche à plasma, l'interface, la cellule de collision/réaction (en option : ICP/CCR/MS), le filtre de masse quadripolaire, le détecteur. Le schéma général de l'appareil est présenté Figure 13.

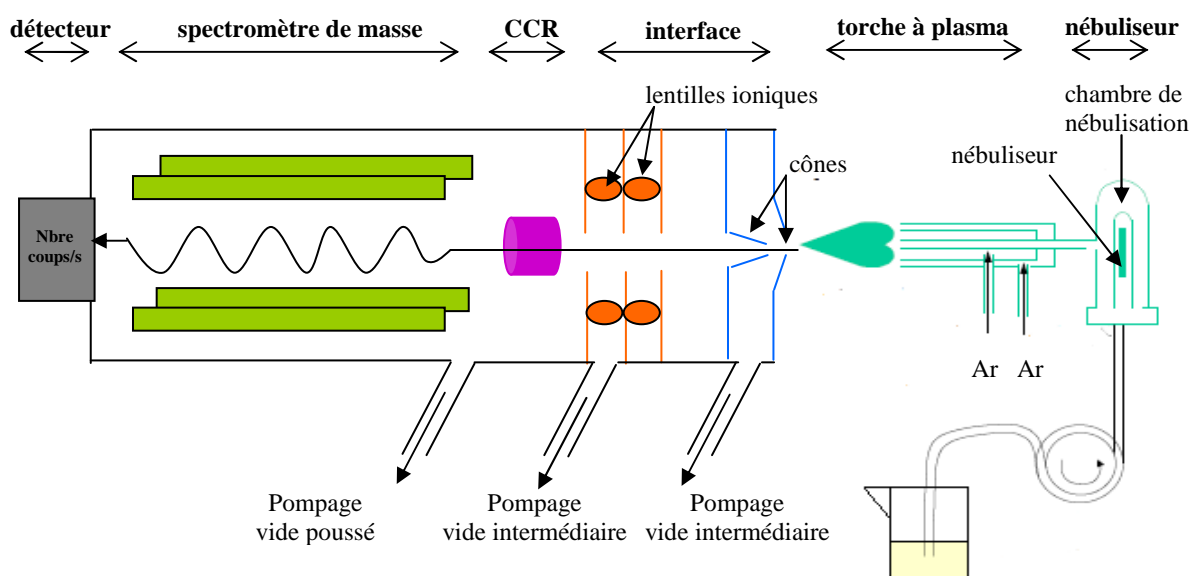


Figure 13: Schéma de l'ICP/CCR/MS
(d'après Nelms et al. [260])

1°) Le nébuliseur et la chambre de nébulisation: système d'introduction de l'échantillon qui transforme l'échantillon en aérosol et le transmet vers le plasma.

Seules les gouttelettes les plus fines sont injectées dans la torche grâce au tri effectué dans la chambre de nébulisation. Le reste est envoyé vers les déchets par un drain. Plus de 90% de l'aérosol est ainsi perdu. La chambre de nébulisation peut être une chambre de Scott (triage des gouttes par sédimentation ou gravité), une chambre cyclonique (triage des gouttes par force centrifuge) ou une chambre conique à bille (triage des gouttes par impact sur une bille).

Dans le cas d'un couplage avec la chromatographie gazeuse, la nébulisation n'est généralement pas utilisée, l'échantillon étant introduit à l'état gazeux.

Dans le cas d'un couplage avec l'électrophorèse capillaire, Gammelgaard *et al.* [179] ont comparé deux types d'introduction d'échantillon pour l'analyse du sélénium dans l'urine: le nébuliseur classique (micro concentrique : MCN) couplé à une chambre de nébulisation cyclonique et le nébuliseur à injection directe (MDIN) (cf. Tableau 10, page 66). Ils ont ainsi montré que la sensibilité de ce dernier était meilleure que celle du MCN, mais qu'il était cependant moins robuste pour l'analyse d'échantillons complexes. Des nébuliseurs à haute efficacité utilisés avec une chambre de nébulisation (HEN) ou insérés directement dans la torche de l'ICP (DIHEN) sont également utilisables. Ils produisent des aérosols plus fins et opèrent à des débits d'échantillons faibles (moins de $0.2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) ce qui est intéressant dans le cas où seulement une faible quantité d'échantillon est disponible [261]. Ils se bouchent par contre très facilement et donc ne sont pas utilisés pour l'analyse de matrices chargées telles que l'urine.

Dans le cas d'un couplage avec l'HPLC, une technique d'introduction par génération d'hydrures a parfois été utilisée pour l'analyse du sélénium dans diverses matrices [198, 262]. Ce système d'introduction est connu pour être plus performant qu'une nébulisation pneumatique, engendrant ainsi une augmentation de la sensibilité du détecteur. Ceci est dû à ce que transport, atomisation et ionisation, sont très efficaces pour les espèces hydrurées volatiles. Les composés sont rendus volatils par réaction chimique, généralement réalisée en milieu acide par ajout d'un réducteur, le plus souvent du borohydure de sodium. Ce dernier se décompose rapidement pour donner de l'hydrogène naissant, qui réduit l'analyte. La réaction a lieu au sein d'un séparateur gaz-liquide. Cette technique possède l'avantage d'éliminer une partie de la matrice puisque tous les éléments non volatilisables sont éliminés dans la phase liquide. Toutefois, dans le cas du sélénium, seul SeIV est hydrurable. Il est donc nécessaire de transformer l'ensemble des espèces séléniées en SeIV avant l'analyse, par une étape de réduction dans le cas de SeVI et de minéralisation dans le cas des espèces organiques.

Une alternative a été développée par Kuehlnet *et al.* [153, 180, 239] pour l'analyse du TMSe^+ dans l'urine humaine. Elle consiste, par traitement avec HCl et NaBH_4 , à former une espèce volatile (DMSe dans le cas de TMSe^+) qui sera transportée plus efficacement jusqu'au plasma. Cette méthode engendre, pour TMSe^+ , un abaissement significatif des limites de détection ($\text{LD} = 0.1 \text{ pg(Se)}$) permettant la détection du TMSe^+ dans l'urine à l'état d'ultra trace.

En 1994, Larsen et Sturup [263] ont observé un gain de sensibilité d'un facteur 3.5 à 4.5 sur l'intensité du signal du sélénium lors de l'ajout de 3% (v/v) de méthanol pour un bruit de fond identique à celui mesuré sans ajout de composé organique. Cet effet semble lié à l'efficacité du transport et/ou de la nébulisation de l'échantillon. Ainsi, les phases mobiles chromatographiques contiennent très souvent un faible pourcentage de méthanol (cf Tableau 10, page 66).

2°) La torche à plasma : système qui atomise et ionise les atomes.

Le plasma est un gaz ionisé constitué de particules positivement ou négativement chargées correspondant aux ions et électrons en constante collision. Ici, un plasma d'argon (gaz inerte provoquant peu de réactions chimiques et de faible coût) est généré à l'aide d'un champ magnétique induit par un courant électrique de haute fréquence circulant dans une spire et, d'une arrivée de flux d'argon. La torche est à pression atmosphérique. La température du plasma est d'environ 7500 K permettant l'atomisation de toute la matière. Le fort potentiel d'ionisation de l'argon (15.8 eV) permet une première ionisation de presque tous les atomes de la classification périodique des éléments. C'est le cas du sélénium dont le premier potentiel d'ionisation est de 9.75 eV. Cependant, comparé à celui des autres éléments, il est relativement élevé. Le degré d'ionisation (DI) qui représente le nombre d'ions de l'élément sur le nombre total d'entités du même élément (ions et atomes) est estimé pour le sélénium à 33% [260]. A titre de comparaison, les éléments qui possèdent un faible potentiel d'ionisation, ont un degré d'ionisation supérieur à 90%. Pour des conditions analogues de plasma et pour une abondance isotopique identique, la sensibilité pour le sélénium sera donc trois fois plus faible que pour ces éléments.

Il peut se poser un problème lorsqu'un élément possède un deuxième potentiel d'ionisation inférieur à celui de l'argon. Les ions doublement chargés peuvent alors être formés. C'est le cas des terres rares, quelques alcalino-terreux (Ba, Sr) et quelques éléments de transition (Ti, Sc). Le sélénium dont l'énergie de seconde ionisation est de 21.3 eV, ne peut pas engendrer ce type d'interférences.

3°) L'interface: système qui assure le transfert des ions créés dans le plasma à pression atmosphérique et à température élevée vers le spectromètre de masse à pression réduite (10^{-6} Torr) et à température ambiante.

L'interface est composée de deux cônes successifs: le cône externe est l'échantillonneur (le sampler), le cône interne est l'écorceur (le skimmer). Ils sont percés d'orifices de 1.3 et 0.5 mm respectivement. Ils ne permettent le passage que d'une petite partie de ce qui sort du plasma. A partir des cônes, un système de vide différentiel accélère les ions du plasma vers un ensemble de lentilles ioniques qui extrait les ions chargés positivement et les focalise vers un filtre de masse quadripolaire.

4°) La cellule de collision/réaction: système qui permet de supprimer les interférences polyatomiques.

L'inconvénient majeur de l'ICPMS est souvent la présence d'un grand nombre d'interférences qui peuvent perturber la détection. Elles sont détaillées pour le soufre et le sélénium dans le Tableau 11. Les interférences isobariques sont observées lorsque les isotopes de deux éléments distincts possèdent une différence de masse que l'analyseur ne peut pas discriminer. Les interférences de type polyatomiques sont dues à la combinaison d'atomes dans le plasma. Le sélénium et le soufre sont particulièrement concernés par ce type d'interférences. Les majoritaires sont les dimères $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$ et $^{40}\text{Ar}^{38}\text{Ar}$ qui interfèrent respectivement avec les isotopes les plus abondants du sélénium: ^{80}Se et ^{78}Se , et les dimères $^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ et $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ qui interfèrent avec les isotopes ^{32}S et ^{34}S du soufre empêchant ainsi leur détection [264]. Afin d'éliminer une partie de ces interférences, la cellule de collision/ réaction est commercialisée par différents constructeurs. La CCR est un multipôle pressurisé avec un ou plusieurs gaz dont on peut contrôler le débit et dont la radiofréquence est réglée en mode transparent (*RF only*) (cf. I.B. §3.3.). Le mécanisme de suppression de l'interfèrent, réactionnel ou collisionnel, est défini par le type de gaz utilisé. Le choix des gaz ajoutés dans la cellule dépend principalement du type de technologie utilisée (quadripôle, octopôle, hexapôle) et donc du constructeur. Cependant, des gaz de réaction comme l'hydrogène (H_2) ou de collision comme l'hélium (He) sont couramment employés car assez efficaces et polyvalents, sans trop affecter l'efficacité de transmission des ions [265]. Dans le cas où l'hydrogène est utilisé en tant que gaz réactionnel, les interférences entre le brome présent dans l'échantillon et l'hydrogène, entraînent la formation d'autres interférences ($^{79}\text{Br}^1\text{H}$ et $^{81}\text{Br}^1\text{H}$) pouvant perturber la mesure des isotopes ^{80}Se et ^{82}Se . Les isotopes ^{78}Se et ^{77}Se , moins interférés que ^{80}Se mais également moins abondants sont alors généralement utilisés pour mesurer le signal du sélénium. La cellule peut aussi fonctionner en

mode standard (ou sans gaz): aucun gaz n'entre dans la cellule qui agit simplement comme un guide d'ions.

Tableau 11: Principales interférences isobariques et polyatomiques des isotopes du soufre et du sélénium rencontrés en spectrométrie de masse élémentaire ICPMS (d'après [256, 265])

isotope	Interférences polyatomiques		Interférences isobariques
	interférences majeures	interférences possibles	
^{32}S	$^{16}\text{O}_2^+$	$^{14}\text{N}^{18}\text{O}^+$	
^{33}S	$^{16}\text{O}_2^1\text{H}^+$, $^{16}\text{O}^{17}\text{O}^+$	$^{14}\text{N}^{18}\text{OH}^+$, $^{15}\text{N}^{18}\text{O}^+$	
^{34}S	$^{16}\text{O}^{18}\text{O}^+$	$^{15}\text{N}^{18}\text{OH}^+$	
^{74}Se	$^{36}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+$	$^{37}\text{Cl}_2^+$, $^{40}\text{Ar}^{34}\text{S}^+$	$^{74}\text{Ge}^+$
^{76}Se	$^{36}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$, $^{38}\text{Ar}_2^+$	$^{40}\text{Ar}^{36}\text{S}^{+*}$, $^{31}\text{P}_2^{14}\text{N}^+$	$^{76}\text{Ge}^+$
^{77}Se	$^{36}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^1\text{H}^+$	$^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$	
^{78}Se	$^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$	$^{31}\text{P}_2^{16}\text{O}^+$,	$^{78}\text{Kr}^{+**}$
^{80}Se	$^{40}\text{Ar}_2^+$	$^1\text{H}^{79}\text{Br}^+$,	$^{80}\text{Kr}^{+**}$
^{82}Se	$^{40}\text{Ar}_2^1\text{H}_2^+$	$^1\text{H}^{81}\text{Br}^+$, $^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}_2^+$, $^{34}\text{S}^{16}\text{O}_3^+$	$^{82}\text{Kr}^{+**}$

* L'isotope ^{36}S a une abondance qui est trop faible (0.01%) pour être utilisé à des fins de quantification en ICP-MS. Il peut interférer avec l'isotope ^{76}Se via un ion polyatomique $^{40}\text{Ar}^{36}\text{S}^+$ mais également de manière très faible

** L'Argon plasmagène utilisé au laboratoire pour le fonctionnement des ICPMS est de qualité 5.0, soit une pureté de 99.9999%. C'est pourquoi les interférences isobariques dues au Kr sont négligeables.

5°) Le filtre de masse quadripolaire : système qui permet par combinaison de champs électriques de filtrer les ions en fonction de leur rapport masse/charge. Le principe est détaillé paragraphe 3.2. de la partie I.B.

6°) Le détecteur : système qui détecte et amplifie le signal des ions à la sortie du spectromètre de masse. Le plus couramment utilisé est la multiplicateur d'électrons. Il existe également le détecteur à cage de Faraday qui a une meilleure résolution mais qui est moins sensible [260].

b) L'électrospray (ESI)

Ce mode d'ionisation s'effectue à la pression atmosphérique et à température ambiante. Il est schématisé Figure 14.

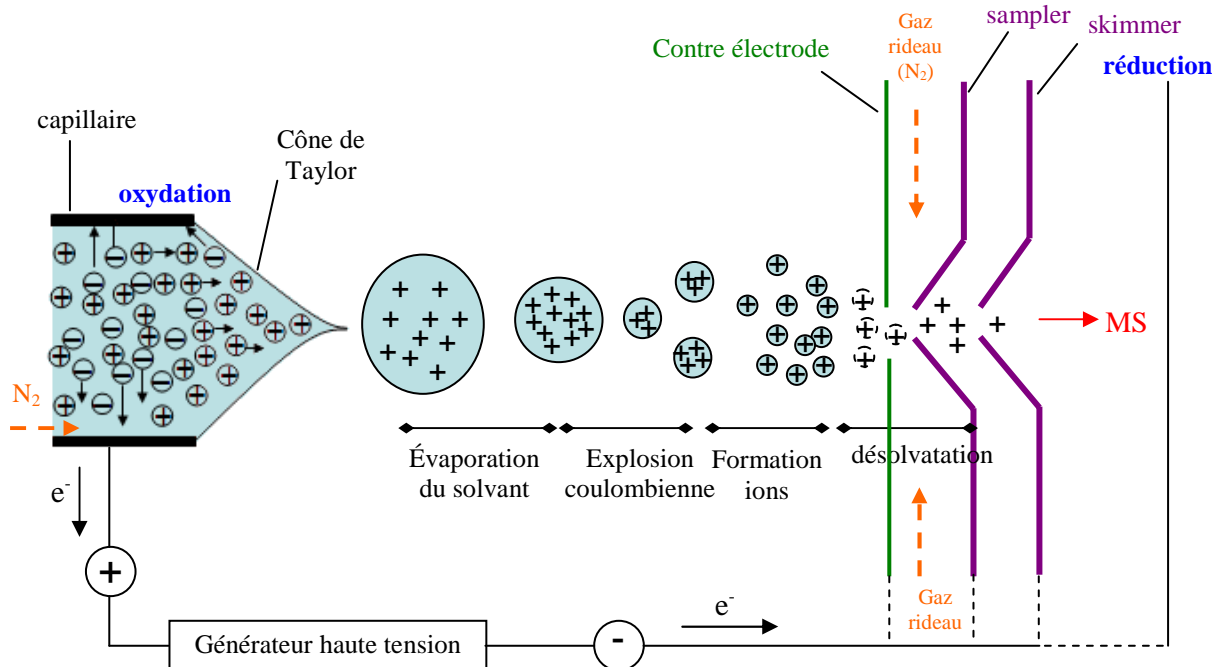


Figure 14: Principe de l'électrospray en mode positif (ESI^+)
(d'après Cobe R.B. [266])

Le principe peut être décrit en trois étapes :

- la production de gouttelettes chargées ;
- la diffusion des gouttelettes ;
- la formation d'ions en phase gazeuse

L'échantillon en solution est introduit par l'intermédiaire d'un capillaire dont l'extrémité traverse une aiguille métallique portée à un potentiel de plusieurs kilovolts (typiquement 3 à 5 kV). Il se forme alors un cône de Taylor. Dans ce cône, une discrimination des ions selon leur charge se crée selon la tension appliquée au capillaire : positive (ESI en mode positif) ou négative (ESI en mode négatif). En mode positif, le capillaire devient le siège d'oxydations où sont retenus les anions tandis que les cations sont repoussés dans l'extrémité du cône de Taylor et inversement en mode négatif. Par répulsion électrostatique, le cône finit par se disperser sous forme de microgouttelettes. Au fur et à mesure de l'évaporation du solvant sous l'effet de la température, la taille des gouttelettes diminue jusqu'à ce que la limite de Rayleigh soit atteinte

(taille critique où les répulsions coulombiennes entre les charges deviennent égales puis supérieures aux forces cohésives de la tension de surface du liquide). C'est à ce moment que la goutte explose en une multitude plus petites, ce phénomène est dénommé une explosion coulombienne. Ce processus perdure jusqu'à ce que les ions pseudomoléculaires soient complètement désolvatés. La charge positive est souvent un adduit de proton (H^+) mais peut aussi être un adduit de sodium (Na^+), de potassium (K^+) ou d'ammonium (NH_4^+). Dans ce cas, la dénomination des ions moléculaires est du type $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ et $[M+NH_4]^+$ respectivement. De plus, les ions pseudomoléculaires peuvent être le siège d'adduits multiples de charges positives conduisant à la formation d'espèces multichargées du type $[M+nH]^{n+}$ par exemple.

À quelques millimètres du capillaire est placée une contre-électrode qui permet de diriger le faisceau ionique vers l'interface, constituée généralement d'un orifice conique dont le diamètre est de l'ordre d'une centaine de micromètres. Un flux d'azote, dirigé le plus souvent à contre-courant du trajet des ions, joue un rôle prépondérant dans le processus de désolvatation et de déclusterisation puisqu'il permet d'éliminer les solvants résiduels et les agrégats de façon à ce que seuls les ions pseudomoléculaires en phase gazeuse puissent traverser l'orifice pour pénétrer dans un premier compartiment de l'appareil cette fois-ci non plus à pression atmosphérique mais sous pression réduite.

Le mécanisme de formation des ions pseudomoléculaires n'est pas encore tout à fait élucidé. A l'heure actuelle, deux modèles coexistent :

- Le **modèle de Dole** (1968) [267] appelé *Charged Residue Mechanism (CRM)* explique qu'une série d'explosions coulombiennes forme une « nano-gouttelette » contenant un seul ion pseudomoléculaire ;
- Le **modèle d'Irbane et Thomson** (1976) [268] appelé *Ion Evaporation Mechanism (IEM)* explique qu'une nanogouttelette d'environ 10 nm de rayon possède une tension de surface suffisamment élevée pour que des ions pseudomoléculaires s'en échappent spontanément par répulsion électrostatique.

Il semble admis aujourd'hui que le processus de transfert des ions pseudomoléculaires en phase gaz soit la résultante des deux modèles. Le **modèle de Fenn** (1990) [269] est un compromis tenant compte des deux mécanismes. Les deux étapes sont ainsi prises en compte (Figure 15):

- une succession d'explosions coulombiennes provoquent une diminution de la taille des gouttelettes ;
- désorption d'ions de la surface du liquide sous l'effet des répulsions électrostatiques

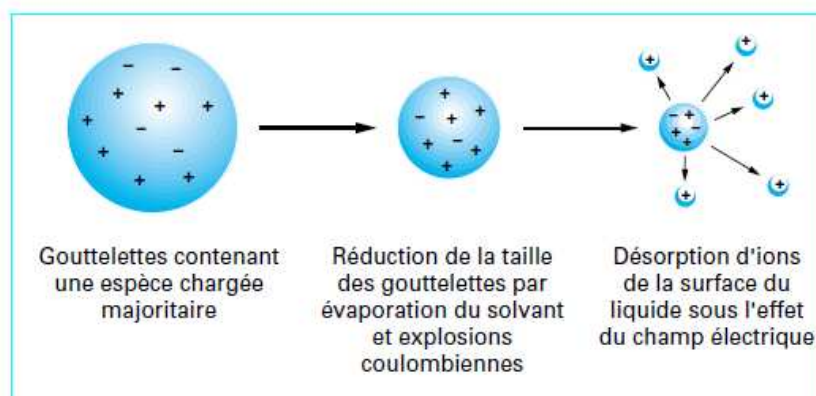


Figure 15: Mécanisme de formations des ions pseudomoléculaires (d'après Monegier B. [270])

L'ionisation dépend de paramètres physico-chimiques [271, 272] tels que le pK_a , le pH, la nature du solvant, le nombre de sites protonables (en mode positif) et leur accessibilité, de même que de la différence d'affinité protonique entre le soluté et la phase éluante. Il est ainsi souvent recommandé, en mode positif, de travailler en milieu acide (en ajoutant le plus souvent 0,1 % d'acide acétique ou encore en présence d'acétate d'ammonium de façon à favoriser dans ce cas des adduits du type $[M + NH_4]^+$ [273]). Les phases éluantes (comme l'acide, la base ou les tampons utilisés) doivent être relativement volatiles : les solvants les plus fréquemment utilisés sont des mélanges eau/acétonitrile ou eau/méthanol.

L'inconvénient majeur de cette source d'ionisation est la compétition de l'ionisation dans la source. Ainsi, des constituants de la matrice comme les sels ont tendance à absorber l'énergie fournie pour l'ionisation des analytes. De plus, l'affinité protonique permet à certaines molécules de capturer les protons nécessaires à l'ionisation plus facilement que d'autres, ce qui induit des ionisations préférentielles. C'est pourquoi les échantillons complexes comme l'urine doivent être suffisamment purifiés avant leur analyse par ESI. Le couplage avec la chromatographie peut permettre de répartir au cours du temps les espèces présentes au sein de l'échantillon et limiter cet effet de compétition ou de suppression.

c) L'ionisation chimique à pression atmosphérique: APCI

L'ionisation dans une source APCI est quasi exclusivement contrôlée par des réactions ion-molécule en phase gazeuse à pression atmosphérique, contrairement à une source ESI où des mécanismes d'ionisation en phase liquide et d'autres en phase gazeuse peuvent se superposer. Le couplage avec la chromatographie gazeuse est donc aisé. Comme pour les sources ESI actuelles, le nébuliseur chauffé de la source APCI est disposé de manière orthogonale à l'axe d'entrée du

spectromètre de masse, afin d'éviter d'obstruer son ouverture par des dépôts de sels non vaporisables, et de limiter l'aspiration de molécules neutres que le MS ne peut détecter. La source APCI est principalement utilisée pour les composés polaires ou relativement apolaires avec un poids moléculaire d'environ 1500 Da ou lorsque l'on travaille dans des gammes de débits élevés où l'efficacité de la source ESI est moins bonne. Cette source génère principalement des ions monochargés. Son fonctionnement est décrit Figure 16.

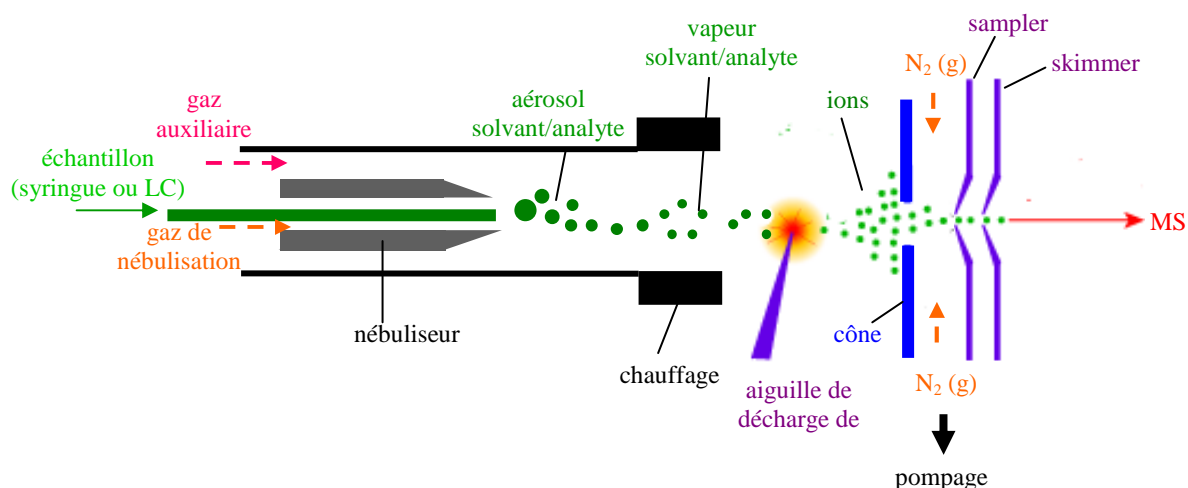


Figure 16: Fonctionnement de la source d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) (d'après [274, 275])

Principe

La source APCI est une chambre équipée d'un nébuliseur pneumatique à azote qui peut être chauffé à des températures élevées (jusqu'à 700 °C) pour former un aérosol. Sur le chemin du cône de nébulisation se trouve une pointe électrode qui une fois sous tension via une décharge corona ou couronne (décharge électroluminescente) émet des électrons ionisants. Dans le cas d'un couplage avec la chromatographie gaz, la nébulisation n'est pas nécessaire.

Une fois introduit, l'échantillon est nébulisé par un premier gaz (N₂ ou air) puis intégralement vaporisé par un apport brutal de chaleur. L'optimum du chauffage diffère selon la composition et les débits des solutions étudiées et doit être choisi au cas par cas. L'échantillon est alors intimement mélangé avec le gaz nébuliseur (ou gaz de transport), ce flux directif permet d'amener les analytes vers l'électrode à décharge où seront générés les ions via un processus en cascade de transfert de charge. Cette électrode est constituée d'une aiguille et d'une chambre de nébulisation qui sert de contre-électrode. L'aiguille portée à plusieurs kilovolts génère un courant d'électrons ionisants de quelques microampères. La valeur de la tension nécessaire dépend de la

distance entre l'aiguille et l'enveloppe de la source APCI, fixée par construction, et de la nature des vapeurs environnantes. Elle est de l'ordre de + 1 à + 6 kV selon les appareils, produisant un courant d'électrons de 1 à 5 μA , pour le mode APCI⁺. Un potentiel négatif est appliqué en mode APCI⁻. Cette décharge est une source constante d'électrons: elle ionise l'air ambiant puis une cascade de réactions ion-molécule aboutit à un plasma d'ions réactifs, *i.e.* un gaz ionisé, autour de la pointe de l'aiguille. Les ions radicalaires du plasma participent ensuite à des réactions chimiques qui donnent lieu à l'ionisation de l'analyte. En mode APCI⁺, un transfert de proton ou d'ions réactifs peut se produire pour former les ions moléculaires. En mode négatif, les ions moléculaires peuvent être produits par ajout d'un adduit ou par détachement d'un proton.

Les ions radicalaires présents dans le plasma en APCI⁺ sont principalement $\text{N}_2\bullet^+$, $\text{O}_2\bullet^+$, $\text{H}_2\text{O}\bullet^+$ et $\text{NO}\bullet^+$ et en APCI⁻ $\text{O}_2\bullet^-$, $\text{O}\bullet^-$, $\text{NO}_2\bullet^-$, $\text{NO}_3\bullet^-$, $\text{O}_3\bullet^-$ et $\text{CO}_3\bullet^-$. Ces ions primaires réagissent rapidement ($\sim 10^{-6}$ s) et transfèrent leur charge aux molécules de solvant pour produire des ions réactifs [275]. Ceux-ci réagissent ensuite avec l'analyte pour donner des ions selon les mécanismes de l'ionisation chimique. À 200 °C, avec $\text{N}_2(\text{g})$ comme gaz de transport et seulement de l'eau, l'agrégat le plus abondant est l'ion $(\text{H}_2\text{O})_2\text{H}^+$, avec $(\text{H}_2\text{O})_3\text{H}^+$, H_3O^+ , $(\text{H}_2\text{O})\text{NO}^+$ et $(\text{H}_2\text{O}_2)\text{NO}^+$ également présents [273].

3.2. L'analyseur de masse : le quadripôle

Le quadripôle permet de séparer les ions produits par la source en fonction de leur rapport m/z . Il est sans doute l'analyseur de masse le plus répandu. Seule une description succincte de son mode de fonctionnement est présentée ici. De plus amples détails sont fournis dans le livre de De Hoffmann et Stroobant [276] et l'encyclopédie de la spectrométrie de masse [277].

Le quadripôle est constitué de quatre barres cylindriques ou parfois hyperboliques, chacune mesurant généralement de quelques centimètres à la dizaine de centimètres, qui sont séparées en deux paires opposées (déphasées) et soumises à un courant continu (DC) de valeur U , et alternatif (RF) de valeur $V_{+/-}\cos(\omega)t$ (Figure 17).

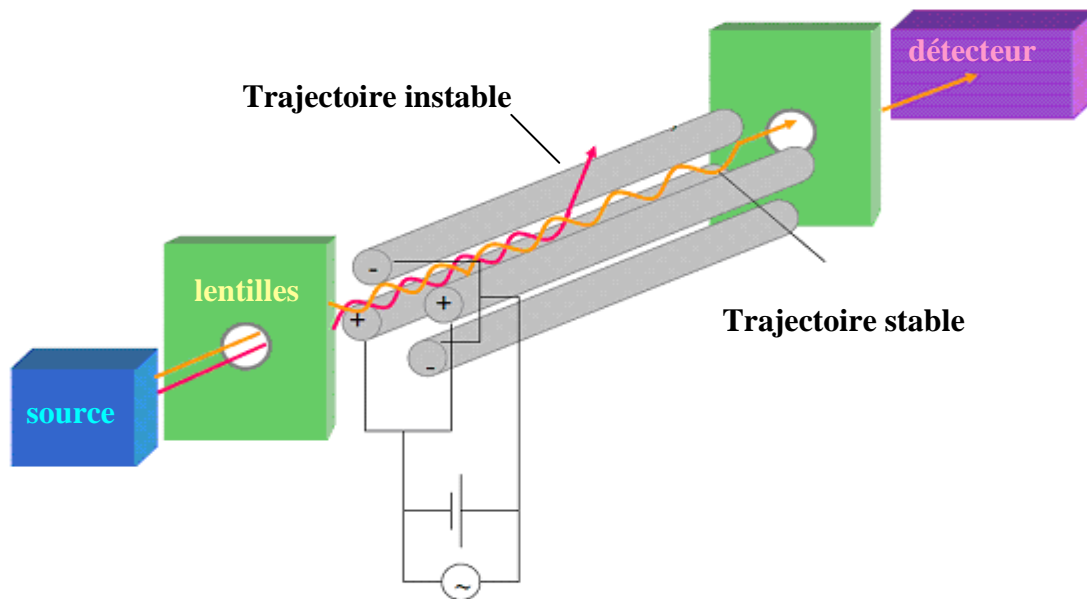


Figure 17: Schéma d'un analyseur de masse quadripolaire (d'après De Hoffman et Stroobant [276])

Les deux paires d'électrodes ont des tensions continues opposées et des tensions alternatives de même amplitude et de signe opposé. La fréquence angulaire ω , est fixée par le constructeur. La trajectoire d'un ion est oscillatoire. La valeur de la tension sinusoïdale (radio fréquence) permettant la stabilisation de la trajectoire d'un ion est décrite selon l'équation :

$$V(t)=U+V\cos(\omega)t$$

La trajectoire d'un ion dépend de sa masse, de sa charge, de U et de V. Pour qu'un ion de rapport m/z donné ait une trajectoire stable dans le quadripôle et qu'il puisse ainsi atteindre le détecteur, il faut que les paramètres U et V soient tels que l'amplitude radiale de la trajectoire de l'ion soit inférieure à la distance séparant les électrodes. En effet, le spectromètre de masse joue le rôle de filtre passe-haut en déviant les ions légers par la composante alternative V du courant. Ils viennent alors heurter les électrodes ou les parois internes du spectromètre ; ils se déchargent et sont entraînés par le système de pompage. De la même manière le quadripôle joue le rôle de filtre passe-bas en éliminant les ions lourds par la composante continue du courant. En combinant ces deux filtres, seuls les ions ayant le rapport m/z désiré seront transmis au détecteur. Dans la pratique, le quadripôle réalise donc un balayage en masse et fait varier simultanément les valeurs de U et de V tout en gardant le rapport U/V constant de manière à ce que les ions produits par la source soient stables à tour de rôle. Si la valeur de tension continue est nulle (soit $U = 0$), tous les ions de masse (m/z) supérieure à celle fixée par la valeur de V (tension discontinue) auront une trajectoire stable. Ce mode est appelé *RF-only*, ou mode « transparent ».

Il est principalement utilisé via un octopôle et permet de transmettre des ions d'une zone d'un spectromètre de masse à une autre dans un système en tandem (guide d'ions) ou de stabiliser la trajectoire des ions après collisions dans un système de cellule de collisions/réactions.

Le quadripôle a l'avantage d'avoir une vitesse de balayage rapide, d'être simple d'utilisation (optimisation rapide et simple), petit, et relativement peu coûteux. Cependant, ces analyseurs sont limités par leur résolution (de 0.1 à 1 uma).

3.3. Principe de la spectrométrie de masse en tandem MS/MS

La spectrométrie de masse moléculaire est une technique très performante pour déterminer la structure des composés mais elle peut être limitée par la complexité de la matrice au niveau de l'élucidation structurale et de sa gamme dynamique. De plus, l'analyse de grosses molécules, contenant de nombreux hétéroéléments, peut conduire à un spectre de masse souvent complexe et difficile à interpréter. Afin de résoudre en partie ces problèmes, la spectrométrie de masse en tandem MS/MS a été introduite dans les années 1970. Elle a été développée dans les années 1980 comme une aide à l'élucidation de la structure de composés inconnus et l'analyse d'échantillons complexes.

Le principe général est simple. La spectrométrie de masse en tandem est composée de différents analyseurs de masse mis en série [276]. Cela peut être une association de différentes combinaisons de secteurs magnétiques, électriques, quadripolaires ou de temps de vol.

Les appareils utilisés au cours de cette étude sont le triple quadripôle et le LTQ-Orbitrap; seules ces deux types de spectrométrie de masse tandem seront détaillées ici. De manière générale, la spectrométrie de masse en tandem consiste à sélectionner un ion à l'aide d'un premier analyseur de masse, à le transférer dans une cellule de collision afin d'obtenir une fragmentation du composé sélectionné puis à effectuer une deuxième spectrométrie de masse sur les fragments ainsi générés.

De façon plus détaillée, les ions formés dans la source entrent dans le premier analyseur (Q1, Figure 18). Parmi ces ions, un ion précurseur est sélectionné. Seuls les ions présentant le rapport m/z sélectionné "sortent" du premier analyseur. Ils entrent alors dans une zone libre de champ, où est placée une cellule de collision (q), contenant des molécules de gaz. Les collisions des ions précurseurs avec ces molécules de gaz augmentent l'énergie interne des ions pour les activer afin de provoquer leur décomposition [278]. Les ions précurseurs activés se dissocient en ions fragments, en rompant certaines liaisons chimiques dans la molécule. Les rapports m/z de ces fragments sont alors séparés dans le second analyseur (Q2). On obtient ainsi un spectre de

masse des ions fils (fragments) à partir de l'ion moléculaire sélectionné dans le premier analyseur de masse.

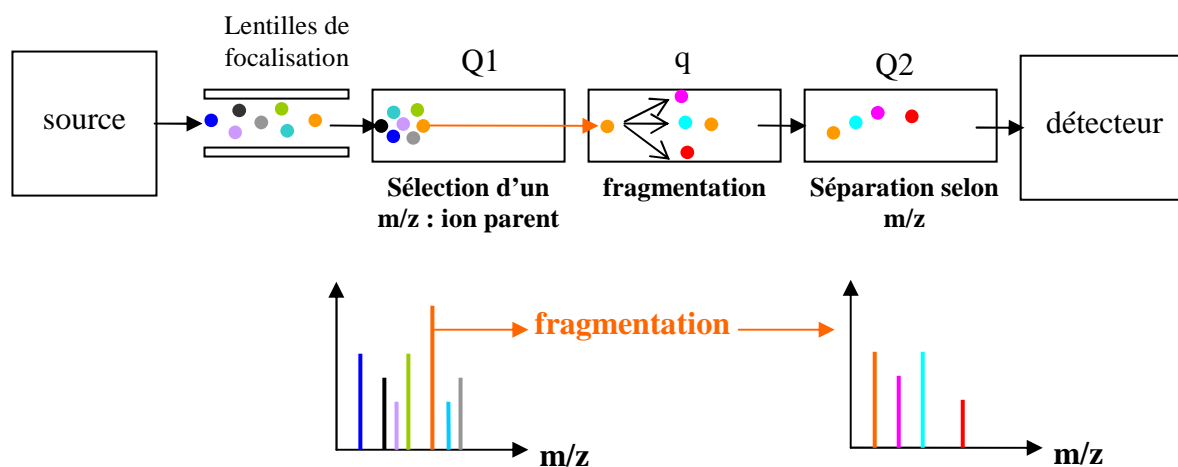


Figure 18: Représentation schématique d'un triple quadripôle en mode fragmentation

Il est possible de choisir différents modes de fonctionnement en fonction du but à atteindre. Pour connaître la composition de l'échantillon, le mode full scan est utilisé. La cellule de collision joue alors le rôle de guide d'ions, l'appareil effectue alors un balayage des m/z dans la gamme désirée. Tous les ions moléculaires présents dans cette gamme sont alors détectés. L'appareil est alors peu sensible. Pour élucider la structure d'une molécule, on utilise le mode de fragmentation présenté Figure 18. On sélectionne un ion précurseur qui sera ensuite fragmenté dans la cellule de collision. La détection de ses ions fragments par le balayage en masse du dernier quadripôle mène, après un lourd travail d'interprétation des résultats, à son identification structurale. Un moyen d'être plus sensible consiste à utiliser le mode SIR (Selected Ion Recording) c'est-à-dire à sélectionner un seul m/z dans le premier quadripôle, la cellule de collision ainsi que le dernier quadripôle laissant passer les quelques ions provenant du premier quadripôle. Le détecteur n'effectue donc pas de balayage en masse ce qui lui permet de passer plus du temps sur l'ion sélectionné et donc d'être plus sensible. Cependant, le plus sensible est le mode MRM (Multiple Reaction Monitoring). Avec ce mode, le premier quadripôle sélectionne un ion. Une fois dans la cellule de collision il est fragmenté. Les fragments arrivent dans le second quadripôle où seul un ion fils caractéristique de la molécule visée est sélectionné puis détecté. Cette méthode permet de ne détecter qu'un seul m/z précurseur et une transition particulière de ce précurseur qui aboutit à un fragment spécifique m/z de la molécule de départ. Cette sélectivité de la méthode est particulièrement utile pour l'analyse de composés présents

dans des matrices complexes tout en gardant l'aspect identité structurale en utilisant une transition qui en rend compte. Les différents modes de balayage sont schématisés Figure 19.

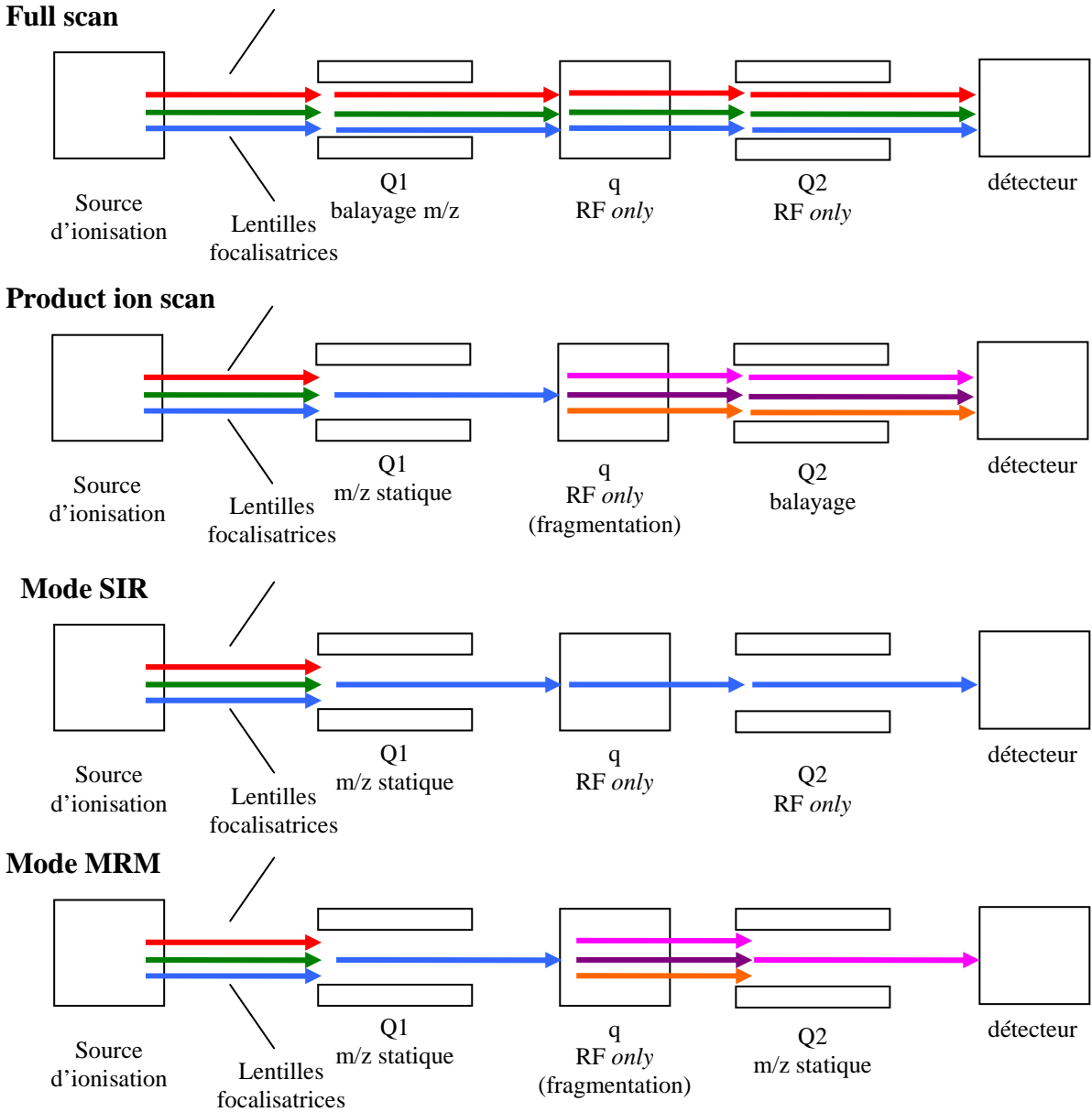


Figure 19: Différents modes de balayage utilisés par un triple quadripôle

3.4. Les trappes ioniques : Le détecteur hybride LTQ-Orbitrap

Inventé par Alexander Makarov, l'Orbitrap a été développé et construit par Thermo Masslab Ltd (Manchester, UK) [279, 280]. Cet analyseur de masse associe la fonction d'une trappe ionique 2D et le principe de détection par courant image utilisé en spectrométrie de masse à transformée de Fourier (FT-ICR). L'Orbitrap est de plus en plus utilisé dans l'identification de molécules biologiques. Il est très polyvalent et ses performances, soit à la fois sa justesse, sa précision et son pouvoir résolutif, sont généralement bien supérieures aux autres analyseurs de masse de type trappe ionique, quadripôle ou secteur magnétique. Les différentes parties du LTQ-Orbitrap utilisés au cours de cette étude sont décrites Figure 20.

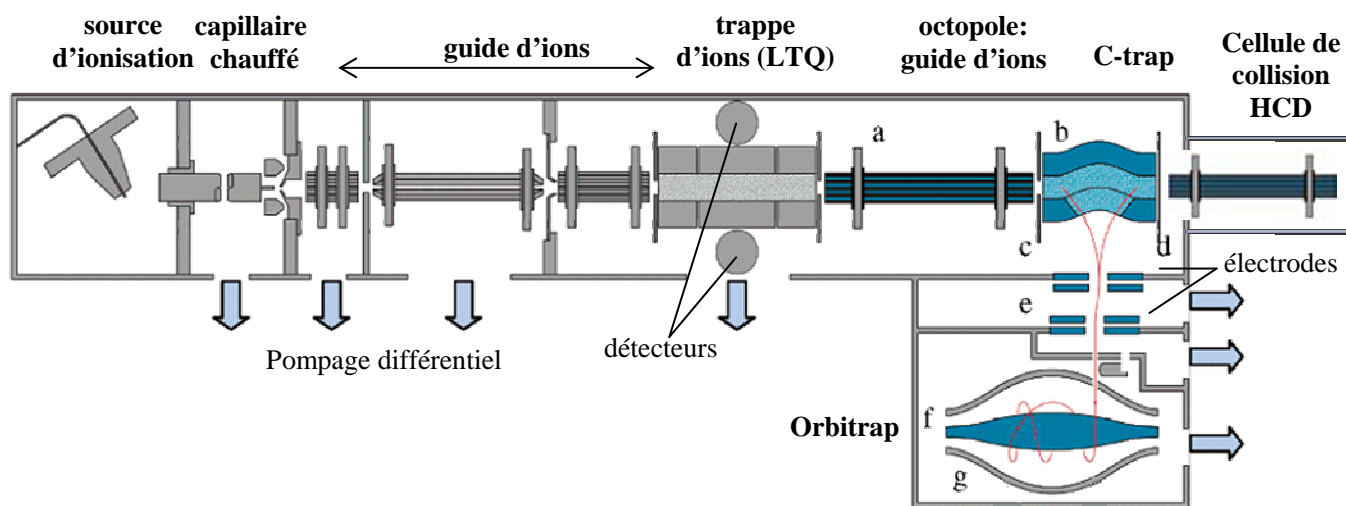


Figure 20: Schéma du LTQ-Orbitrap
(d'après Hu et al. [279])

Le LTQ-Orbitrap est composé de cinq éléments principaux:

- (1) la source d'ions
- (2) la trappe d'ions linéaire (LTQ linear quadrupole ion trap, marque de Thermo Electron)
- (3) le C-trap
- (4) la cellule de collision à haute énergie, HCD
- (5) l'Orbitrap

(1) La source d'ions utilisée au cours de cette étude est de type ESI. Il est également possible, si on le désire, de travailler en mode APCI.

(2) Une trappe ionique est un analyseur dérivé du quadripôle, à géométrie sphérique, et également à stabilité de trajectoire. Elle est constituée d'une électrode d'entrée et d'une électrode

de sortie (end cap electrode ou calotte), ainsi qu'une électrode annulaire (ring electrode ou électrode torique). La séparation des ions se fait par application d'un champ électrique oscillant, et contrairement au quadripôle, cet analyseur est fermé. En plus du mouvement hélicoïdal résultant de la stabilisation de leurs trajectoires selon les axes (x,y), il existe un mouvement de va-et-vient des ions suivant l'axe central z empêchant ainsi les ions de s'échapper.

Une trappe ionique linéaire peut être utilisée soit comme dispositif d'accumulation d'ions et donc couplée avec un autre analyseur pour la détection (cas de l'Orbitrap), soit comme un spectromètre de masse autonome de type MS avec en plus des avantages du quadripôle le filtrage des ions multichargés, ou de type MS^n avec la fragmentation des ions piégés par collision avec une pression partielle de gaz inerte (ici He). Par augmentation progressive de la tension alternative, les ions sont déstabilisés de façon successive et expulsés de la trappe, ce qui permet l'enregistrement des spectres. Au cours d'une étude sur les protéines, Riter *et al.* [281] ont montré que, en comparaison avec des trappes ioniques courantes, le LTQ offre l'avantage d'une vitesse de balayage très rapide ce qui améliore l'identification des molécules.

(3) Le C-trap est une trappe ionique en forme de C qui travaille en mode RF *only*. Placée juste avant l'Orbitrap elle permet d'accumuler les ions avant de les éjecter vers l'Orbitrap ou la cellule de collision HCD (Higher-Energy Collisional Dissociation). Elle permet également d'améliorer la précision de masse par recalibration interne en temps réel à partir de spectre MS et MS/MS d'un nombre défini d'ions connus de l'air ambiant.

(4) La cellule de collision à haute énergie, HCD, consiste en un octopole pressurisé avec de l'azote pour provoquer la fragmentation des ions y pénétrant. Les ions produits sont ensuite renvoyés vers la C-trap pour être analysés par l'Orbitrap. Ce système de fragmentation est utilisé car il permet d'obtenir des spectres MS^n similaires à ceux obtenus par des instruments à triple quadripôle (QqQ), c'est-à-dire des spectres où les ions fragments de petite masse peuvent aussi être observés contrairement à ceux obtenus avec une trappe à ions.

(5) L'Orbitrap est une toute nouvelle trappe linéaire qui a été conçue selon des principes d'astrophysique. Une description du mouvement des ions à l'intérieur de la cellule est présentée Figure 21. Ce n'est ni un champ de radiofréquence, ni un champ magnétique qui piège les ions, mais un champ électrostatique dirigé vers une électrode centrale. Cette attraction vers l'électrode centrale est compensée par une force centrifuge qui vient de la vitesse tangentielle des ions donnée au moment de l'injection (comme un satellite en orbite). Une électrode extérieure permet de maintenir les ions confinés dans ce piège. Le mouvement de type elliptique et orbital de chaque ion le long de l'axe central possède une fréquence oscillatoire qui lui est propre. Après mesure du courant induit sur des électrodes images de cette fréquence axiale des ions, un

traitement du signal via une Transformée de Fourier permet de déterminer le rapport m/z de l'ion [279]. Cette mesure est non destructive à l'opposé de la plupart des autres analyseurs de masse. On peut donc faire « cyclotroner » les ions sur de longues périodes (au delà de la seconde) afin d'accumuler le signal ce qui permet d'améliorer la justesse et la précision de la mesure du rapport m/z et surtout la résolution, d'où le nom Orbitrap.

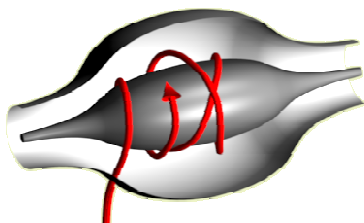


Figure 21: Coupe transversale de l'Orbitrap décrivant le mouvement des ions dans la cellule (d'après Makarov et al. [282])

L'Orbitrap possède de nombreux avantages :

- le premier, et le plus important, est sa capacité à pouvoir générer une très haute résolution qui rivalise avec celle de l'instrument FTICR (notamment sur les basses valeurs m/z) et qui dépasse souvent celle obtenue avec un analyseur Temps de Vol (Tableau 12) ;

Tableau 12: Résolution en fonction du temps passé par un ion dans l'Orbitrap (d'après Scigelova et Makarov [283])

Temps d'analyse dans l'Orbitrap (s)	Résolution (10% vallée à $m/z = 400$)
0.2	7 500
0.5	30 000
0.9	60 000
1.6	100 000

- l'Orbitrap est également un détecteur de masse de haute précision. En routine, il peut atteindre une précision de l'ordre du ppm (différence relative entre la masse réelle et la masse expérimentale exprimée en partie par million) en calibration externe et, une précision de moins de 0.5 ppm avec une calibration interne contre 3 ppm pour l'analyseur de masse à temps de vol [284] ;
- l'Orbitrap possède une large gamme dynamique de plus de 5000, ce qui correspond à une valeur 5 fois plus importante que pour un analyseur temps de vol [285] ;
- la gamme de masse de l'Orbitrap (m/z 70-4000) est supérieure à celle du FT-ICR (m/z 150-4000)

4. BILAN : ENJEUX DE L'ANALYSE DU SELENIUM DANS L'URINE ET CONDITIONS ANALYTIQUES

A l'heure actuelle, le métabolite majeur présent dans l'urine a été identifié comme étant le sélénosucrose SeGal. Cependant, certains résultats relatifs à la quantification de TMSe^+ ainsi que des formes volatiles restent à confirmer. La connaissance de l'ensemble des formes de Se dans l'urine est essentielle pour une meilleure compréhension du métabolisme de cet élément chez l'homme. L'identification des espèces inconnues est donc d'un intérêt majeur.

Le sélénium est présent à de faibles concentrations ($10 - 80 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$) dans l'urine de sujets non supplémentés [28]. Il est donc nécessaire de développer des méthodes analytiques robustes, sensibles et conservatrices de la spéciation. Nous avons vu dans la synthèse bibliographique que les techniques couplées, associant une technique de séparation avec un détecteur spécifique et sensible, permettent d'atteindre directement la quantification de plusieurs espèces. Depuis l'introduction de la cellule de collision/réaction, l'ICPMS est devenu le détecteur le plus approprié pour l'analyse élémentaire et de spéciation dans les matrices complexes, à faible teneur en élément. Les méthodes chromatographiques en phase liquide et gaz sont particulièrement bien adaptées à l'analyse des formes sélénées, respectivement dissoutes et volatiles dans l'urine. Néanmoins, même pour les couplages les plus sensibles (HPLC et GC-ICPMS), la comparaison des limites de détection avec les concentrations en sélénium relevées dans l'urine, montre que l'analyse de spéciation directe du sélénium est difficilement réalisable. Les méthodes de préconcentration et d'extraction, en amont de l'analyse, sont nécessaires. De plus, l'utilisation de techniques d'identification structurale des molécules, moins sensibles que l'ICPMS, nécessitent également une pureté optimale de l'échantillon.

En ce qui concerne la chromatographie liquide, différents mécanismes de rétention peuvent être mis en œuvre et permettent d'adapter la sélectivité en fonction des composés présents. L'optimisation des mécanismes de séparation en chromatographie liquide a été la première étape de nos travaux. Les conditions optimales définies ont été appliquées à l'étude des performances analytiques et à l'analyse d'échantillons d'urine.

L'amélioration des limites de détection analytiques et la purification de l'échantillon ont ensuite été envisagées par extraction sur phase solide. Ces protocoles ont permis une quantification plus aisée des métabolites SeGal et TMSe^+ , et la mise en évidence de nouveaux composés inconnus dont un a pu être identifié par spectrométrie de masse structurale. Par la

connaissance des fragments caractéristiques de cette molécule, une technique d'analyse directe de ce composé dans l'urine a pu être développée.

L'analyse des formes sélénées volatiles est rendue particulièrement délicate en raison des très faibles concentrations à mesurer, dans la gamme de quelques $\text{ng}(\text{Se})\cdot\text{L}^{-1}$. Dans ce type de matrice complexe, en plus de nécessiter une méthode analytique sensible, la détermination de la spéciation de Se est particulièrement dépendante des conditions de manipulation et de stockage de l'échantillon. Afin de s'assurer que la spéciation originelle des espèces sélénées est maintenue lors du stockage des échantillons, une étude de stabilité dans différentes conditions a été réalisée.

Chapitre II

**ANALYSE DES FORMES SELENIIEES DISSOUTES DANS
L'URINE DE SUJETS NON SUPPLEMENTES**

II.A. OPTIMISATION DE LA SEPARATION D'ESPECES SELENEES PAR HPLC/ICP-MS ET APPLICATION A DES ECHANTILLONS D'URINE HUMAINE

Trois mécanismes de séparation chromatographique, mettant en jeu des phases stationnaires différentes, ont été retenus pour leur complémentarité. L'urine contenant de nombreux composés inconnus, l'utilisation de ces trois mécanismes chromatographiques permet une identification fiable des composés.

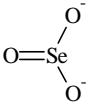
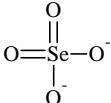
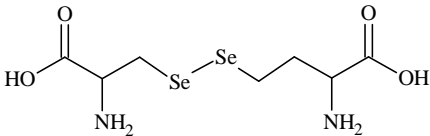
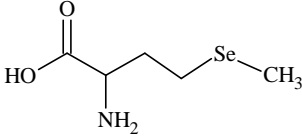
Une fois la séparation optimisée et les temps de rétention définis, les conditions chromatographiques sont appliquées à des échantillons d'urine pour évaluer les effets de matrice sur l'élution des étalons ainsi que les performances analytiques dans la matrice d'étude.

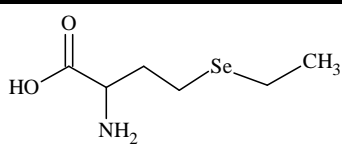
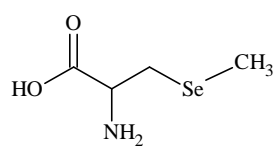
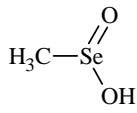
1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Réactifs et étalons

Afin de quantifier par la méthode des ajouts dosés les composés présents dans l'urine, il est nécessaire de disposer d'étalons. Les étalons commerciaux utilisés au cours de l'étude sont présentés, accompagnés de leur pKa [286, 287], Tableau 13.

Tableau 13: Espèces sélénées étudiées commercialement disponibles

Espèces	Formule chimique	pKa	fournisseur	pureté
sélénite de sodium (SeIV)		pKa ₁ = 2.7 pKa ₂ = 8.54	Aldrich	99%
séléniate de sodium (SeVI)		pKa ₁ < 0 pKa ₂ = 1.8	Aldrich	98%
Sélénio-D,L-cystine (SeCyst)		pKa ₁ = 1.68 pKa ₂ = 2.15 pKa ₃ = 8.07 pKa ₄ = 8.94	Aldrich	100%
Sélénio-D,L-méthionine (SeMet)		pKa ₁ = 2.19 pKa ₂ = 9.05	Aldrich	≥ 99%

Espèces	Formule chimique	pKa	fournisseur	pureté
séléno-D,L-éthionine (SeEt)		pKa ₁ ~ 2 pKa ₂ ~ 9	Aldrich	100%
Se-méthylséléno-L-cystéine (MeSeCyst)		n.d.*	Acros Organics	98%
Acide méthanesélinique (MeSeOOH)		n.d.*	Aldrich	95%
Diméthylsélénure (DMSe)	H ₃ C—Se—CH ₃	-	Aldrich	≥ 99%
Diméthyldisélénure (DMDSé)	H ₃ C—Se—Se—CH ₃	-	Aldrich	96%

*n.d : non défini

Du fait du faible nombre de composés disponibles commercialement, il a également fallu faire appel à la synthèse chimique de certaines formes sélénées susceptibles de se retrouver dans l'urine. L'ion triméthylsélénonium (TMSe⁺) et la méthylséléno-N-acétyl-D-glucosamine (SeGlu) ont été synthétisés à l'Institut Pluridisciplinaire de Recherche en Environnement et Matériaux (I.P.R.E.M., Pau, France), en collaboration avec Dr. Jean Marc Sotiropoulos de l'Equipe de Chimie Physique, selon les protocoles décrits par Wrobel *et al.* [169] et Traar *et al.* [288] respectivement. Le 1-méthylséléno-N-acétyl-D-galactosamine (SeGal), a été fourni par Dr. Y. Ogra (Université pharmaceutique de Showa, Japon).

Les étalons de travail non volatils sont préparés par dilution successives dans de l'eau milli-Q (Millipore Co., Bedford, MA, USA) à partir des solutions étalons à 1000 mg(Se).L⁻¹ stockées à 5°C. Les solutions étalons des composés volatils DMSe et DMDSé sont préparées à environ 5000 mg(Se).L⁻¹ dans le méthanol, et stockées à - 4°C. Les solutions de travail proviennent de dilutions successives de ces solutions étalons dans l'eau milli-Q.

Les réactifs employés pour la préparation des phases mobiles chromatographiques sont rassemblés Tableau 2. Par ailleurs, de l'acide nitrique HNO₃ (Instra, J.T.Backer) est utilisé pour l'analyse du sélénium total.

Tableau 14: Caractéristiques des réactifs utilisés pour les phases mobiles chromatographiques

Nom du composé	Formule chimique	pKa	Provenance	Pureté
Méthanol (MeOH)	CH ₃ OH	-	Fluka	≥ 99.9%
Ammoniaque	NH ₃	9.26	Prolabo	28%
Acide formique	HCOOH	3.80	Riedel-deHaën	98-100%
Formiate d'ammonium	HCOONH ₄	tampon : pH=6.53	Aldrich	≥ 99.995%
Acide heptafluorobutyrique (HFBA)	CF ₃ CF ₂ CF ₂ COOH	0,40	Fluka	≥ 99.5%
Acide acétique	CH ₃ COOH	4.80	Merck	100%
Pyridine	C ₅ H ₅ N	5.23	Sigma-Aldrich	≥ 99.8%

1.2. Echantillons

Les échantillons d'urine proviennent d'individus n'ayant absorbé aucun complément alimentaire et n'étant soumis à aucun régime alimentaire particulier. Ils sont collectés le matin, immédiatement après le lever, dans des flacons en polytétrafluoroéthylène (PTFE), puis filtrés à 0.45 µm (acétate de cellulose). Ils sont ensuite protégés de la lumière à l'aide de papier aluminium, placés au réfrigérateur (4°C) et analysés dans la journée pour éviter une dégradation des composés [191]. Pour empêcher que la matrice ne perturbe trop la séparation et n'endommage la colonne, l'urine est diluée dix fois quelques minutes avant son injection.

1.3. Description de l'appareillage

La technique de couplage HPLC-ICPMS comporte deux modules distincts reliés entre eux par un tube en polyétheréthercétone (PEEK) : la pompe HPLC et le détecteur de spectrométrie de masse à plasma induit.

a) Pompe HPLC

La pompe HPLC est le modèle 1100 de la marque Agilent. Elle est équipée d'un système de pilotage informatique. Elle comprend 4 voies d'entrées pour le solvant, un procédé de dégazage électronique ainsi qu'un injecteur automatique. Le volume d'injection est fixé à 100 µL et le débit de phase mobile à 1 mL.min⁻¹.

c) Le détecteur : ICP-MS

Le détecteur est un spectromètre de masse élémentaire. Il fait partie de la série 7500 de la marque Agilent. Il est équipé d'une cellule de collision / réaction.

Les paramètres du détecteur ICPMS sont détaillés Tableau 15. Ils varient au cours de l'étude selon la quantité de solvant organique introduite (MeOH) et la matrice de l'échantillon.

Tableau 15: Paramètres de l'ICPMS pour l'analyse du sélénium

Nébuliseur	Concentrique (Meinhard)	
Chambre de nébulisation	Scott, refroidie à 2°C	
	% MeOH < 5%	5% < MeOH < 50%
Cônes	Ni	Pt
Diamètre de la torche (Quartz)	2.5mm	1.5mm
Puissance du plasma	1500kW	1600kW
Débit du gaz plasmagène (Ar)	15 L.min ⁻¹	15 L.min ⁻¹
Débit du gaz auxiliaire (Ar)	0,9 L.min ⁻¹	0,9 L.min ⁻¹
Débit du gaz de nébulisation (Ar)	1,1 L.min ⁻¹	0,8 L.min ⁻¹
Débit du gaz optionnel (O ₂)	-	5% relatif au gaz de nébulisation
Isotopes suivis	⁷⁷ Se, ⁸² Se (matrice H ₂ O, 10 mM HFBA, phase mobile)	
	⁷⁷ Se, ⁷⁸ Se (matrice urine)	
Points/seconde	0,4 ms/pt	
Cellule de collision/réaction (analyse échantillons réels)		
Nature du multipôle	Octopôle	
Débit gaz réactif (H ₂)	3 mL.min ⁻¹	

La cellule de collision / réaction permet le suivi des isotopes les plus abondants du sélénium (⁷⁸Se et ⁸⁰Se), fortement perturbés par les interférences Ar-Ar (cf. I.B. §3.1.). Pour une sensibilité optimale, particulièrement utile pour l'analyse d'échantillons d'urine, où la teneur en sélénium est très faible, la cellule est pressurisée avec H₂. Cependant, la présence du brome dans l'échantillon et d'hydrogène comme gaz réactionnel, entraîne la formation d'autres interférences (⁷⁹Br¹H et ⁸¹Br¹H) pouvant perturber la mesure des isotopes ⁸⁰Se et ⁸²Se (cf. I.B. §3.1.). La mesure des m/z 80 et 82 demanderait alors l'utilisation d'équations de corrections [265]. Pendant l'étape des optimisations chromatographiques, les concentrations utilisées (≥ 0.5 µg(Se).L⁻¹/ espèce) sont détectables à l'aide des isotopes ⁷⁷Se et ⁸²Se du sélénium, sans utiliser la cellule de collision.

1.4. Choix des colonnes chromatographiques

De par la grande variété des composés étudiés (acides aminés, sucres, composés inorganiques...) et leur forme (cationique, neutre, zwitterionique ou anionique), l'utilisation d'un seul mécanisme chromatographique pour la rétention et la séparation de tous les étalons est quasiment impossible (cf. I.B. §2.3.). De plus, dans le cas d'un détecteur élémentaire, l'identification des composés étant basée sur le temps de rétention des solutés, il peut subvenir des phénomènes de coélution lors de l'analyse d'un échantillon contenant des espèces inconnues. Il est donc nécessaire, pour une vérification des résultats, de faire appel au minimum à deux mécanismes de séparation. Les propriétés des colonnes chromatographiques utilisées au cours de cette étude sont détaillées Tableau 16.

Tableau 16: Caractéristiques des colonnes HPLC

Nom de la colonne	Atlantis dC18 (Waters)	Hypercarb (Thermo Electron)	PRP-X200 (Hamilton)
Type d'interactions	hydrophobes	hydrophobes + électroniques	cationiques
Dimensions de la colonne	4.6 x 150 mm	4.6x 100 mm	4.1 x 250 mm
Diamètre des particules	5 µm	5 µm	10µm
Diamètre des pores	100 Å	250 Å	100 Å
Pourcentage de porosité	68%	75%	n.d.*
Surface spécifique	334 m ² /g	120 m ² /g	n.d.*
Type de support	Silice greffée en C18	Carbone graphite poreux	Polystyrène- divinylbenzène / sulfonates
Pourcentage de carbone	12.29%	100%	n.d.*
Domaine de température	20-45°C	20-200°C	5-60° C
Pression maximale	400 bars	450 bars	350 bars
Domaine de pH	2-7	0-14	1-13

*n.d. : données non fournies

La phase stationnaire de la colonne Atlantis dC18 est caractéristique d'une séparation en phase inverse. Compte tenu de la diversité des composés sélénisés présents dans l'urine, l'étude bibliographique (cf. I.B. §2.3.) a révélé que la phase stationnaire de cette colonne, permettant à la fois la rétention des composés polaires et apolaires, est particulièrement adaptée à l'analyse de spéciation du sélénium dans l'urine.

La phase stationnaire de la colonne Thermo Hypercarb est composée de carbone graphitique poreux (PGC). Ses propriétés, décrites précédemment (cf. I.B. §2.3.), font intervenir des interactions hydrophobes ainsi que des interactions électroniques entre un analyte polaire et sa surface polarisable. Les particularités de sa surface (planéité, homogénéité) lui confèrent également une aptitude à séparer les isomères géométriques.

La présence de TMSe^+ dans l'urine est sujette à grand nombre de controverses et doit donc être vérifiée (cf I.B. §1.1.). Pour la rétention spécifique de ce cation, le mécanisme le mieux adapté est l'échange de cations. La colonne, Hamilton PRP-X200, s'est avéré performante pour l'analyse de ce composé dans l'urine humaine [174, 187]. Au cours de notre étude cette colonne sera donc utilisée pour l'analyse du TMSe^+ en partant des conditions déjà prédéfinies par Kuehnelt *et al.* [174].

1.5 Performances analytiques

Les performances analytiques sont évaluées par le calcul des limites de détection (LD), de la répétabilité (RSD) et de la linéarité pour chacune des espèces étudiées selon la méthode de séparation choisie.

➤ Limites de détection

Les limites de détection sont calculées selon les recommandations de l'IUPAC [167] à l'aide du coefficient de Student défini en fonction du nombre de points appartenant à la droite d'étalonnage et du coefficient de corrélation de la droite. Elles sont évaluées pour un signal mesuré en hauteur.

$$LD = \frac{\text{coeff. student} \times \sigma \times \sqrt{\left(\frac{1}{n} + \frac{1}{n_y}\right)}}{a_o} \quad (\text{Eq. 1})$$

Avec: σ : écart type des blancs ;

a_o : pente de la droite d'étalonnage ;

n : nombre de blancs ;

n_y : nombre de réplicats pour une mesure.

Pour 10 échantillons de blancs ($n=10$), des analyses faites en triplicat et un intervalle de confiance de 95%, le calcul des limites de détection se simplifie :

$$LD = 3 \times \frac{\sigma}{a_o} \quad (\text{Eq. 2})$$

➤ Limites de quantification

De la même façon, les limites de quantification se calculent selon la formule :

$$LQ = 10 \times \frac{\sigma}{a_o} \quad (\text{Eq.3})$$

➤ Répétabilité

La répétabilité (RSD) est calculée à partir de 5 injections d'un échantillon contenant la plus faible concentration détectable, selon la formule :

$$RSD(\%) = \left(\frac{\sigma_{\text{aires}}}{\text{aire}_{\text{moyenne}}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

Elle est évaluée par la mesure de l'aire car c'est ce paramètre qui est utilisé par la suite, pour la quantification des composés.

1.6. Evaluation de la qualité de la séparation

Pour l'évaluation de la qualité de la séparation, différentes grandeurs caractéristiques ont été utilisées [243].

➤ Le facteur de rétention k' :

Il correspond au rapport entre la masse de composé dans la phase mobile et la masse de composé dans la phase stationnaire. Il rend compte de la "capacité" de la colonne à retenir un composé. A partir de l'étude d'un chromatogramme on définit :

$$k' = \frac{(t_R - t_m)}{t_m} \quad (\text{Eq. 5})$$

avec t_R : temps de rétention d'un composé (= temps entre l'injection et la détection) ;

t_m : temps mort (= temps entre l'injection et la détection d'un composé non retenu).

Plus k' est grand, plus la rétention du composé est importante.

➤ Résolution

Le calcul du facteur de résolution entre deux composés A et B permet de renseigner sur la qualité de la séparation en caractérisant l'aptitude du système chromatographique à séparer 2 composés d'un mélange. Ce facteur se calcule à partir des temps de rétention et des largeurs des pics à la base selon l'équation :

$$R_{SAB} = 2 \times \frac{(t_R(B) - t_R(A))}{(\omega(B) + \omega(A))} \quad (\text{Eq. 6})$$

avec $t_R(A)$ et $t_R(B)$: temps des rétention des composés A et B en min ;
 $\omega(A)$ et $\omega(B)$: largeur à la base des pics A et B en min.

Pour $R_S \geq 1.5$: très bonne séparation des composés, analyse quantitative ;

$1.5 > R_S \geq 0.7$: séparation considérée comme acceptable, analyse qualitative (Pour $R_S=1$, le recouvrement des pics est de 2%) ;

$R_S < 0.7$: les composés ne sont pas séparés.

➤ Efficacité

Elle se traduit par la "finesse des pics" obtenue pour les composés. Plus le pic est fin, plus la colonne est efficace. Elle est exprimée en nombre de plateaux théoriques N :

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{\omega} \right)^2 \quad (\text{Eq. 7})$$

avec t_R : temps de rétention en min ;

ω : largeur du pic à la base en min.

Plus le pic est fin, plus N est grand et donc plus la colonne est efficace.

2. OPTIMISATION DES CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES

En vue d'une application pour des analyses de routine, une méthode de séparation rapide et simple d'utilisation est recherchée. Dans ce but, le mode de séparation envisagé est le mode isocratique à température ambiante.

Remarque : L'étalon SeGlu a été synthétisé après l'optimisation des conditions chromatographiques. L'influence des paramètres chromatographiques n'a donc pu être testée pour ce composé. Il apparaît cependant dans le bilan des méthodes séparatives.

2.1. Propriétés acido-basiques de certains composés

Certains composés tels que les acides aminés, SeIV et SeVI ont des propriétés acido-basiques (pKa). Ils ont donc un état de charge variable en fonction du pH du milieu dans lequel ils se trouvent. Cela va conditionner les mécanismes d'interactions de ces espèces avec la phase mobile et la phase stationnaire. Afin d'expliquer leur rétention sur les différentes colonnes, nous

nous sommes donc intéressés à leur charge apparente (CA) calculée à partir des pKa des espèces selon la formule :

$$CA = \frac{\sum_i (z_i \times \text{concentration de l'ion de charge } z_i)}{\text{concentration totale du composé}} \quad (\text{Eq.6})$$

avec z = charge ionique d'une espèce.

Il nous est alors possible d'établir l'évolution de la charge apparente de SeMet, SeCyst, SeIV et SeVI en fonction du pH de la phase mobile (Figure 22).

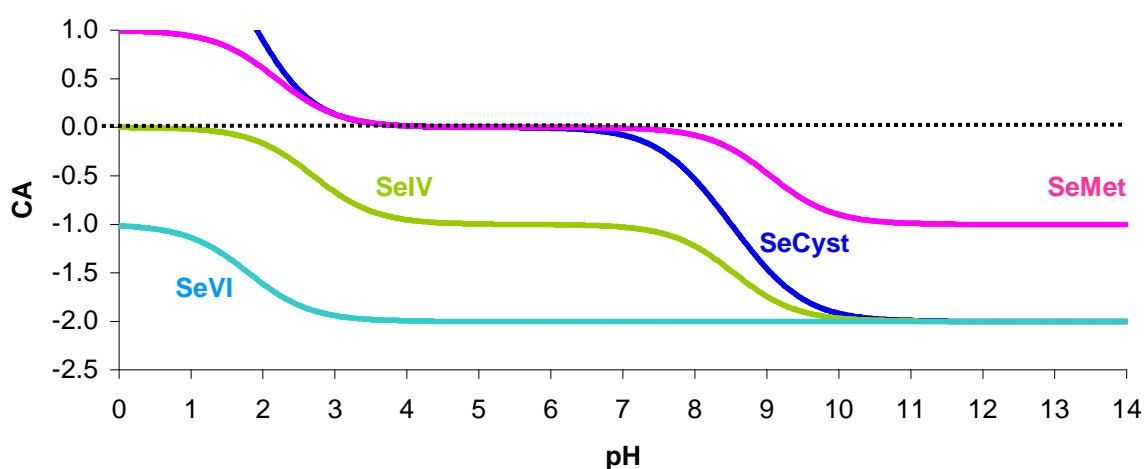


Figure 22: Charge apparente de SeMet, SeCyst, SeIV, SeVI en fonction du pH

SeVI a une première acidité très forte ($pK_{a1} < 0$) et se présente donc sous forme anionique quel que soit le pH. SeIV possède une charge apparente négative pour $pH > 2$. Les espèces inorganiques ne possèdent pas de groupement hydrophobe. Quel que soit le pH, elles ne seront pas retenues en mode phase inverse. Par contre elles pourront être retenues dans le cas d'interactions électroniques avec la phase stationnaire PGC, SeVI plus fortement que SeIV.

Les acides aminés ont un caractère cationique pour $pH < 2.5$; un caractère anionique pour $pH > 8.2$ et un caractère zwitterionique entre les deux. Ainsi, dans le cas où la rétention de ces deux espèces est majoritairement gouvernée par les interactions hydrophobes avec la phase stationnaire, comme c'est le cas sur une colonne en phase inverse, l'idéal serait de se placer à un pH de telle sorte que les acides aminés soient présents sous forme globalement neutre c'est-à-dire entre pH 3 et 7.

Le cation $TMSe^+$ possède une charge apparente égale à 1 dans toute la gamme de pH. $TMSe^+$ sera retenu sans aucune difficulté sur une phase stationnaire échangeuse de cations. En

possédant un petit groupement hydrophobe, il sera plus retenu sur phase inverse que les espèces inorganiques. Cependant, afin d'améliorer sa rétention l'ajout d'un agent de paire d'ion anionique est envisageable.

2.2. Choix de la phase mobile

Tel que décrit précédemment, une variation de pH peut modifier la charge et donc la rétention des composés. Afin d'obtenir des résultats reproductibles, le pH de la phase mobile est contrôlé en utilisant une solution tampon. En vue d'une analyse par spectrométrie de masse moléculaire de fractions collectées en sortie de la colonne, il est également important que la solution tampon soit volatilisable. Les tampons volatilisables les plus couramment utilisés pour une séparation en mode phase inverse sont :

- $\text{HCOOH}/\text{HCOO}^-$ $\text{pK}_a = 3.8$
- $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ $\text{pK}_a = 4.8$

L'acide formique sera utilisé pour la séparation sur phase inverse. L'acide formique et l'acide acétique seront testés pour la séparation sur PGC.

En chromatographie de phase inverse, la rétention augmente avec l'hydrophobie du composé. Les composés ionisables sont donc plus retenus sous leur forme neutre que sous leur forme ionique. L'ionisation étant un phénomène dépendant du pH, il est important de tester l'influence de ce facteur sur la rétention des espèces. Pour ce faire, en partant d'une valeur optimale c'est-à-dire pH 3 pour l'acide formique, le pH de la phase mobile en mode phase inverse C18 sera modifié, selon la gamme autorisée par la colonne, soit de 2.5 à 6.5, par pas de 1 (Tableau 16).

En mode phase inverse, la concentration de la solution tampon ne devrait pas affecter la rétention des analytes [243]. Cependant, la colonne utilisée possède également des propriétés hydrophiles. Dans le cas où des interactions d'échange d'ion sont présentes, la concentration du tampon pourrait faire varier la rétention des analytes. La concentration totale d'acide formique sera donc modifiée par pas de 30 mM, de 20 à 146 mM.

Un des modificateurs organiques le plus souvent utilisé en mode phase inverse est le méthanol. L'addition d'un pourcentage de 3% de MeOH à la phase mobile permet d'améliorer considérablement l'intensité des composés sélénisés [263] (cf. I.B. §3.1.). En mode isocratique, le pourcentage de MeOH est donc fixé à 3%. Le MeOH étant plus apolaire que l'eau, une augmentation de sa concentration entrainerait une élution plus rapide des composés.

Afin de retenir le cation TMSe^+ en mode phase inverse, un agent de paire d'ion anionique, l'acide heptafluorobutyrique (HFBA) sera ajouté à la phase mobile pour une concentration variant de 1 à 5 mM par pas de 1 mM. La phase PGC étant suffisamment stable à pH acide, l'ajout de HFBA à l'échantillon sera également testé dans la gamme allant de 0 à 100 mM.

2.3. Séparation des étalons sur C18

a) Optimisation de la séparation

Dans un premier temps, la phase mobile utilisée par Kuehnelt *et al.* [160], *i.e.* 20 mM de formiate d'ammonium, 3% de méthanol et pH 3 ajusté par ajout d'acide formique, a été testée. Ces conditions d'analyse n'ont pas permis d'obtenir une bonne séparation de SeVI , SeIV , SeCyst , MeSeOOH , TMSe^+ et MeSeCyst , ces 6 composés éluant en début de chromatogramme (Figure 23).

Il est particulièrement important de retenir et de séparer TMSe^+ des autres espèces car la présence de ce composé dans l'urine est à confirmer (cf. I.B. §1.1.). Dans ce but, certains paramètres de la phase mobile comme indiqué précédemment, ont été modifiés.

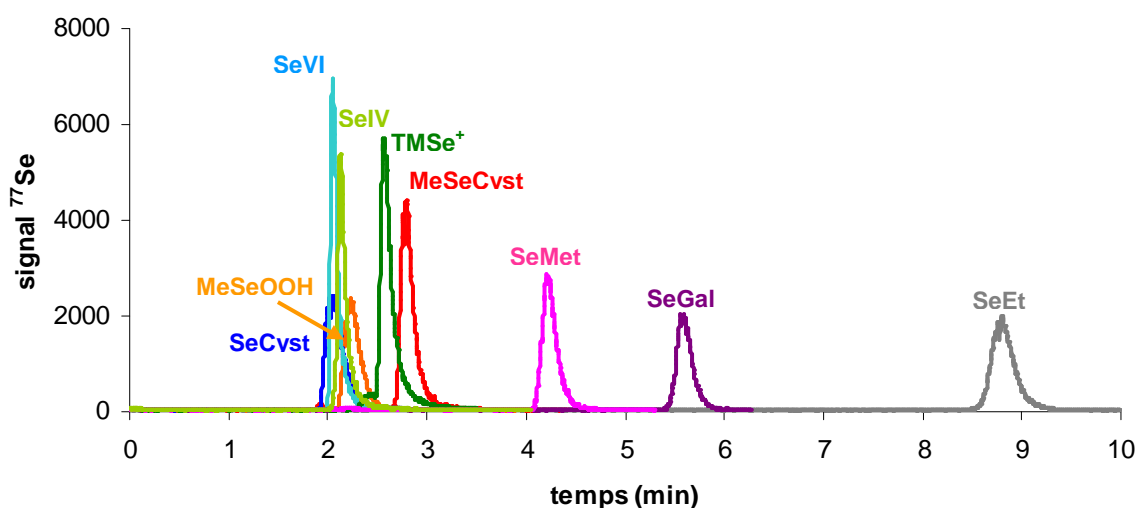


Figure 23: Chromatogramme d'un mélange d'étalons à $10 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ par espèce dans H_2O (colonne C18 ; phase mobile : 20 mM HCOONH_4 + 3% MeOH + HCOOH ($\text{pH} = 3$) soit $[\text{HCOOH}]_{\text{tot}} = 146\text{mM}$)

1°) Influence de la concentration en acide formique à pH constant

Le premier paramètre étudié est la force éluante de la phase mobile par modification de la concentration totale en acide formique. La concentration totale en acide formique a été testée dans la gamme de 20 mM à 146 mM, cette dernière étant la concentration précédemment utilisée. Le pouvoir éluant est diminué afin de mieux retenir les composés non séparés en début de chromatogramme. Le pH est fixé à 3 par ajout d'ammoniaque à la phase mobile.

Aucune variation importante du temps de rétention des composés (< 11%) n'a été observée. Pour la suite de l'étude, une concentration totale en acide formique de 146 mM est conservée.

2°) Influence du pH à concentration totale en acide formique constante

Pour une concentration totale en acide formique constante ($[\text{HCOOH}]_{\text{tot}} = 146 \text{ mM}$), l'influence du pH sur la qualité de séparation des espèces a été étudiée. Le pH est ajusté avec de l'ammoniaque par pas de 1, entre 2.5 et 6.5 (gamme autorisée pour la colonne, Tableau 16). L'évolution de la rétention des composés selon le pH est présentée Figure 24.

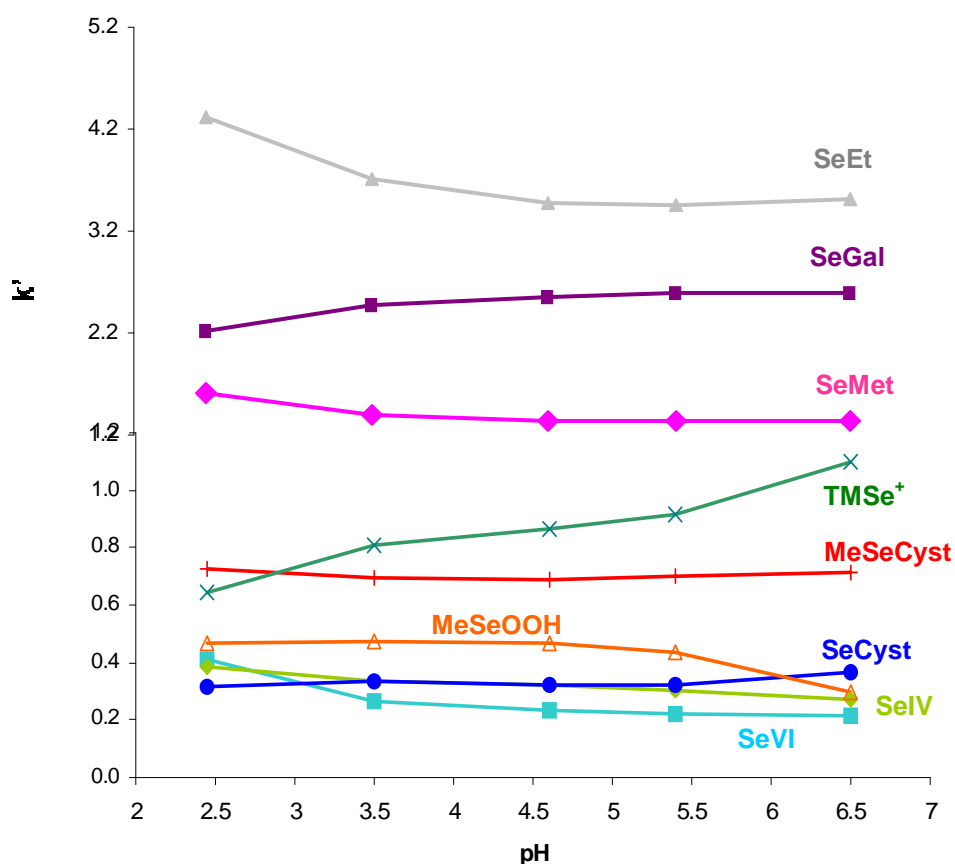


Figure 24: Evolution de la rétention de composés sélénés en fonction du pH de la phase mobile (colonne C18)

Quel que soit le pH, les espèces inorganiques SeIV et SeVI ne sont pas retenues.

La rétention du sélénosucré, SeGal, ne varie pas de manière significative dans la gamme de pH étudiée. Bien que possédant des groupements hydroxyles et donc des propriétés acido-basiques, la rétention de ce composé semble être principalement gouvernée par l'hydrophobicité de son cycle et son encombrement stérique dans cette gamme de pH.

Aucune modification importante des temps de rétention n'a également été observée pour SeMet et SeCyst, l'état de charge de ces espèces variant très peu dans le domaine de pH étudié (cf. Figure 22). La modification du pH n'a pas, non plus, d'influence sur la rétention de MeSeCyst et MeSeOOH.

La rétention de SeEt diminue fortement entre pH 2.5 et pH 3.5 et se stabilise entre pH 3.5 et pH 6.5. Il se pourrait que le pKa de cette espèce soit situé entre ces deux valeurs de pH ce qui expliquerait que la variation de l'état de charge provoque une diminution de la rétention.

A l'inverse, la rétention de TMSe^+ augmente lorsque le pH augmente. Cette augmentation est vraisemblablement due à la formation de paire d'ions avec les ions formiate, la concentration en ions formiate augmentant avec le pH.

L'influence d'un agent de paire d'ions permettant une rétention plus importante du TMSe^+ , *i.e.* de nature plus hydrophobe, est donc testée. Le pH est fixé à 3 afin de conserver une capacité tampon optimale.

3°) Influence de l'ajout d'un agent de paire d'ion anionique à la phase mobile

L'ajout d'un agent de paire d'ions anionique, l'acide heptafluorobutyrique (HFBA), à la phase mobile, est envisagé. Il est choisi d'après les résultats déjà obtenus par Gammelgaard *et al.* [188] pour la séparation de TMSe^+ , MeSeCyst, MeSeMet et SeMet sur une phase stationnaire en C8. Au cours de notre étude, HFBA est utilisé à une concentration allant de 0 à 5 mM par pas de 1 mM. Expérimentalement, il apparaît que HFBA, du fait de la longueur de sa chaîne carbonée, a tendance à rester fixé sur la phase stationnaire rendant ainsi les résultats non reproductibles. Afin ne pas surcharger la colonne en HFBA, dans nos conditions d'élution (3% MeOH), la concentration maximale en HFBA testée est donc deux fois moins importante que celle utilisée par Gammelgaard *et al.* [188]. En partant de 20 mM de formiate d'ammonium, le pH est ajusté à 3 avec l'acide formique ce qui correspond à une variation de 70 mM à 146 mM de la concentration totale en acide formique selon la concentration en HFBA utilisée. Dans cette gamme, l'influence de la concentration totale en acide formique, étudiée précédemment (cf. II.A. §2.3.), sur les temps de rétention des étalons est négligeable (variation relative des temps de rétention < 9% entre 70 et 146 mM).

L'évolution de la rétention des étalons en fonction de la quantité de HFBA ajoutée à la phase mobile est représentée sur la Figure 25.

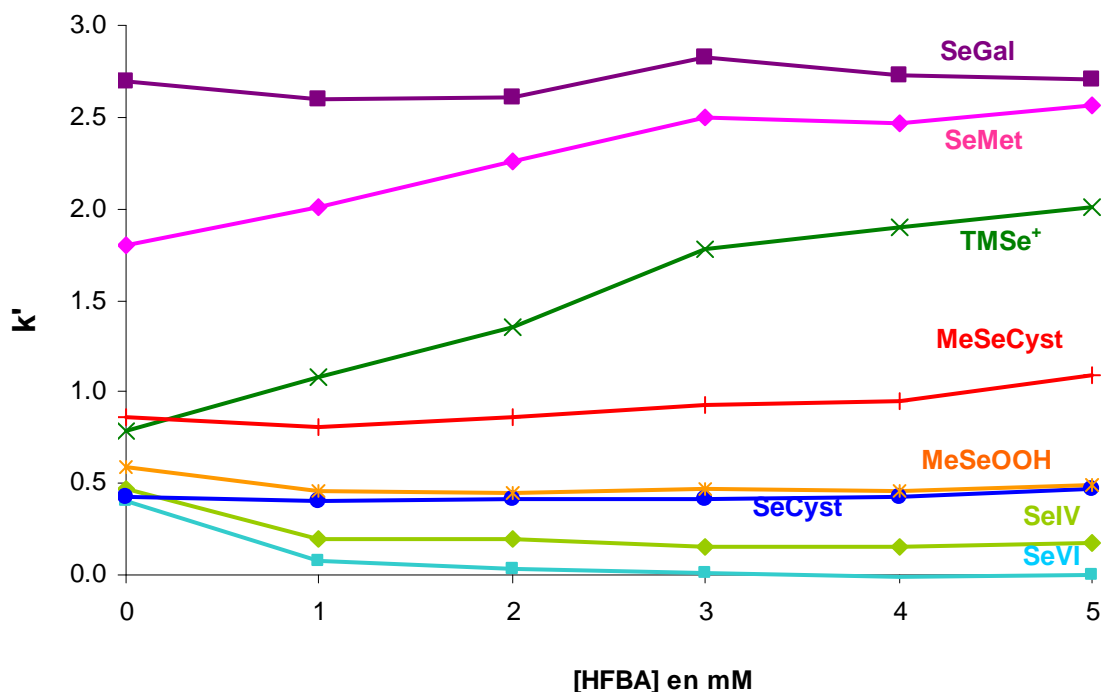


Figure 25: Evolution de la rétention des étalons sélénés en fonction de la concentration en acide heptafluorobutyrique (HFBA) (colonne C18)

La rétention de SeCyst et MeSeCyst n'est pas modifiée de manière significative dans la gamme de concentrations en HFBA testée.

Comme observé précédemment lors de l'augmentation de la concentration en ions formiate, l'augmentation de la concentration en HFBA entraîne une légère diminution de la rétention des espèces inorganiques et de MeSeOOH.

A l'inverse, la rétention de SeEt ($k' = 9.6$ avec 5 mM HFBA, résultats non présentés), de SeMet, ainsi que du cation TMSe^+ , augmente lorsque la concentration en HFBA augmente. A partir de 1 mM HFBA, TMSe^+ est séparé des autres composés éluant en début de chromatogramme ($R_s \geq 1.1$).

La rétention de SeGal n'est pas modifiée par l'ajout de HFBA à l'échantillon. Cependant, la résolution entre ce composé et SeMet diminue lorsque la concentration en HFBA augmente. Elle devient inférieure à 1.5 lorsque la concentration en HFBA atteint 2 mM. Pour une concentration en HFBA de 1mM la séparation des deux composés est très satisfaisante ($R_s = 1.9$).

En comparaison avec les conditions initiales (cf. Figure 23), l'ajout de HFBA 1 mM à la phase mobile, permet, pour une même durée d'analyse, inférieure à 10 min, de séparer 5 composés (tracés en noir, Figure 26) dont TMSe^+ et SeGal.

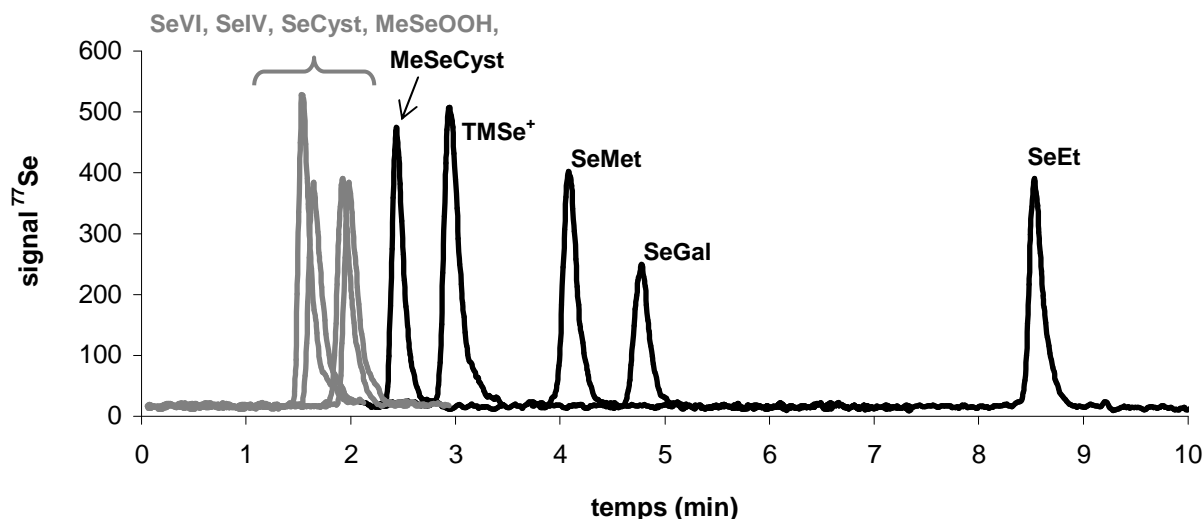


Figure 26: Chromatogramme d'un mélange des étalons à $0.5 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ dans H_2O (colonne C18 ; phase mobile : $20 \text{ mM HCOONH}_4 + 1 \text{ mM HFBA} + 3\% \text{ MeOH} + \text{HCOOH}$ ($\text{pH}=3$))

Les conditions expérimentales optimisées pour la séparation sur phase inverse sont ensuite mises en œuvre pour l'analyse d'échantillons naturels afin d'évaluer les effets de matrice.

b) Etude des effets de matrice

L'urine est une matrice contenant des teneurs élevées en sels et composés organiques qui peuvent fortement perturber la séparation des analytes. Afin de vérifier la robustesse des conditions précédemment optimisées, les étalons sélénisés sont ajoutés à l'urine diluée 10 fois dans la phase mobile (Figure 27).

Remarque : SeEt ne fait pas partie de l'étude car c'est un composé synthétique éthyli. Il a donc peu de chance d'être présent dans des échantillons naturels et en particulier dans l'urine [162].

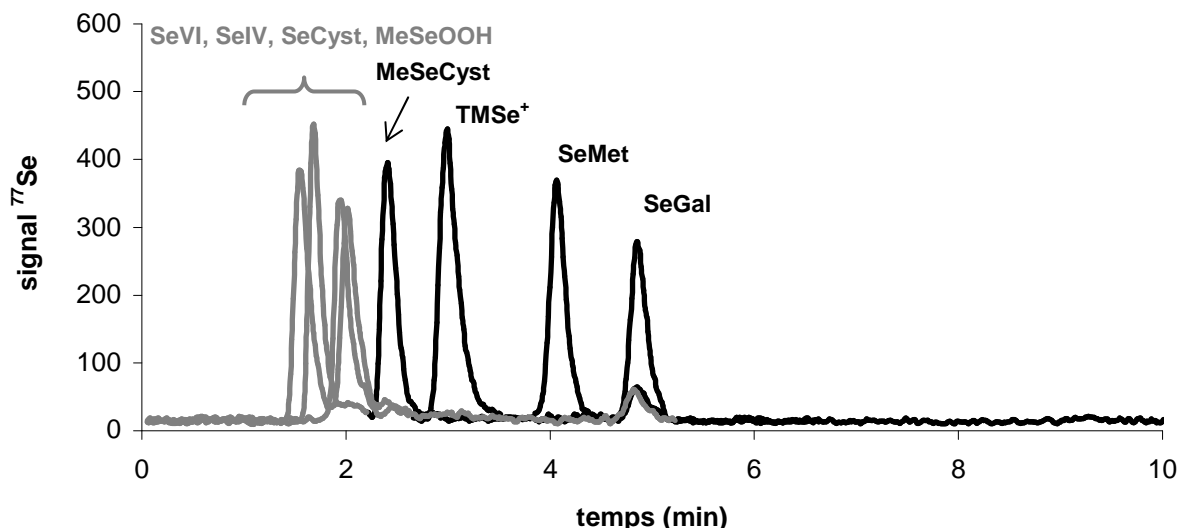


Figure 27: Chromatogrammes d'un mélange des étalons à $0.5 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ dans urine diluée (1 : 9) dans phase mobile (colonne C18 ; phase mobile : $20 \text{ mM COOHNH}_4 + 3\% \text{ MeOH} + \text{HCOOH} (\text{pH}=3) + 1 \text{ mM HFBA}$)

Les variations relatives du temps de rétention n'excèdent pas 3% pour l'ensemble des composés. Un élargissement des pics est observé. La résolution diminue alors légèrement dans la matrice urine. Cependant elle reste suffisante pour l'analyse quantitative de MeSeCyst, TMSe^+ , SeMet et SeGal dans l'urine. SeGlu, non disponible lors de cette optimisation, est élué dans ces conditions à un temps de 7.2 min et est parfaitement résolu des autres composés dans les conditions optimisées.

2.4. Séparation des étalons sur PGC

a) Optimisation de la séparation

La phase stationnaire de carbone graphitique poreux (PGC) met en jeu deux types d'interactions (cf. I.B. §2.3.):

- interactions hydrophobes
- interactions électroniques

Ainsi, avec une phase mobile composée à 100% d'eau, les composés inorganiques SeIV et SeVI sont totalement retenus de la même façon que sur une phase stationnaire échangeuse d'anions [247]. Pour permettre leur élution, un anion compétiteur doit être ajouté à la phase mobile. Dans la majorité des cas, ce sont les acides formique ou acétique qui sont employés à cet

effet [289, 290]. Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à l'acide acétique dont nous avons fait varier la concentration totale dans une gamme allant de 20 à 100 mM. Cependant, les résultats obtenus n'ont pas été concluants. En effet, sa force éluante est apparue insuffisante pour l'éluion de SeVI très fortement retenu ($t_R > 50$ min). De plus, dans ces conditions, l'éluion de TMSe^+ a eu lieu dans le volume mort. L'ajout de HFBA à la phase mobile (0 – 5 mM) pour augmenter la rétention de TMSe^+ a également été testé, sans succès.

Nous nous sommes donc intéressés à l'utilisation de l'acide formique, plus polaire que l'acide acétique (pK_a inférieur et hydrophobicité plus faible). La force éluante de l'acide formique envers les anions est donc plus importante que celle de l'acide acétique tandis qu'elle est moins importante envers les composés apolaires [247]. Possédant un pourcentage de carbone plus faible que l'acide acétique, il pourra également être utilisé à des concentrations plus importantes dans le cas du couplage avec l'ICPMS.

Comme point de départ, les conditions de Dauthieu *et al.* [252] utilisées pour la séparation de SeIV, SeVI, SeMet, SeCyst et SeEt ont été testées. Le chromatogramme des composés étudiés est représenté Figure 28.

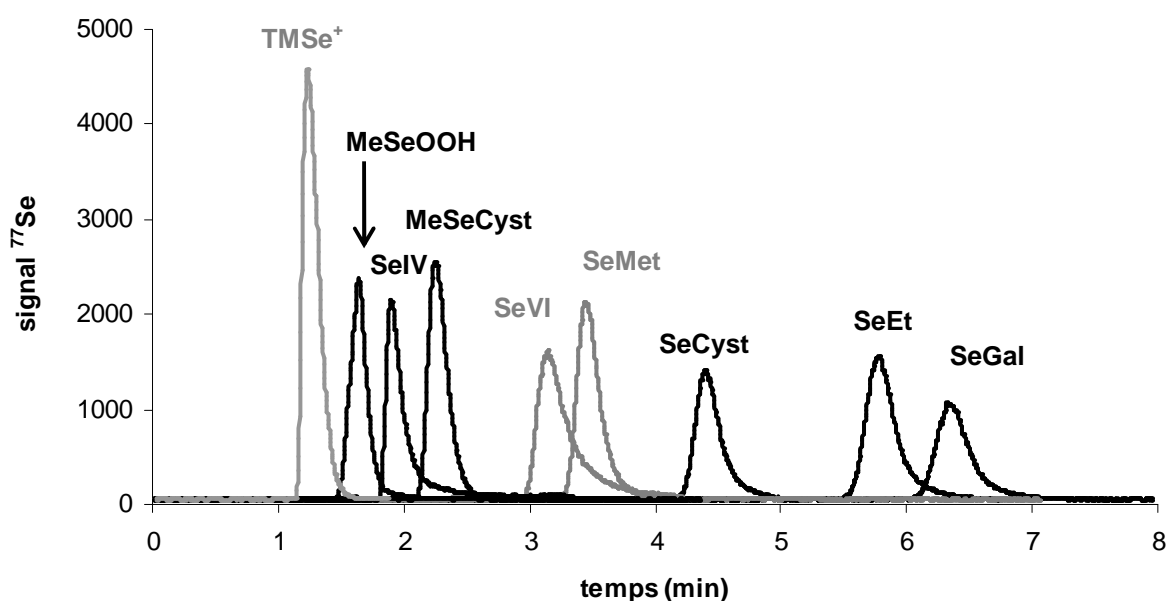


Figure 28: Chromatogramme des étalons ($10 \mu\text{g}(\text{Se})/\text{L}$ par espèce) dans H_2O (colonne PGC ; phase mobile: 240 mM HCOOH + 1% MeOH + NH_3 ($\text{pH}=2.3$))

Ces conditions chromatographiques permettent la séparation d'un grand nombre des étalons, mis à part TMSe^+ non retenu, dans un temps d'analyse inférieur à 8 min. L'ajout d'un agent de paire d'ion, HFBA, à l'échantillon afin d'améliorer l'efficacité de la colonne et la résolution entre SeVI et SeMet ($R_s = 0.17$) est envisagé.

b) Ajout d'un agent de paire d'ions à l'échantillon

La possibilité de préconcentration sur la colonne PGC a déjà été étudiée [252, 289]. Cette préconcentration est rendue possible par l'utilisation d'un milieu d'injection qui permet une forte rétention des analytes en tête de colonne. Au cours de leurs travaux, Dauthieu *et al.* [252] ont montré que l'ajout d'un acide carboxylique, HFBA 10 mM, comme agent de paire d'ions à l'échantillon permettait d'améliorer l'allure des pics de SeMet, SeCyst et SeEt évaluée grâce à l'augmentation, d'un facteur 15 ; 4 et 9 respectivement, du nombre de plateaux théoriques lors de l'injection de volumes supérieurs à 200 µL.

Dans notre étude, différentes concentrations en HFBA ajoutées à l'échantillon avant injection, allant de 0 à 100 mM, ont ainsi été testées. L'ajout de HFBA se traduit par une diminution du temps de rétention des espèces inorganiques du fait de son pouvoir éluant et, par une augmentation du temps de rétention des acides aminés du fait de son rôle d'agent de paire d'ions. Cependant, à partir d'une concentration égale à 20 mM, nous observons un élargissement du pic de TMSe^+ (jusqu'au dédoublement à partir des concentrations supérieures à 30 mM HFBA) ainsi qu'une mauvaise séparation de TMSe^+ , MeSeOOH et SeIV . Le meilleur compromis entre une bonne séparation des composés et l'allure des pics chromatographiques est obtenu pour une concentration en HFBA introduite dans l'échantillon égale à 10 mM. Le Tableau 17 présente une comparaison des paramètres de la séparation suite à l'injection sans ou avec 10 mM HFBA.

Tableau 17 : Amélioration de la qualité de la séparation par ajout de HFBA 10 mM à l'échantillon

Injection dans eau milli-Q					Injection dans 10mM d'HFBA				
espèces	t_R (en min)	ω (en s)	N	R_s	espèces	t_R (en min)	ω (en s)	N	R_s
TMSe^+	1.22	19	248	1.16	TMSe^+	1.22	25	139	0,89
MeSeOOH	1.64	25	245	0.55	MeSeOOH	1.62	29	179	0,66
SeIV	1.89	32	207	0.70	SeIV	1.89	20	497	1,29
MeSeCyst	2.24	29	353	1.40	MeSeCyst	2.38	25	509	1,32
SeVI	3.21	54	203	0.17	SeVI	3.06	37	404	0,99
SeMet	3.35	37	463	1.56	SeMet	3.59	28	970	1,93
SeCyst	4.40	44	579	1.71	SeCyst	4.59	34	1027	2,27
SeEt	5.74	50	771	0.62	SeEt	5.98	39	1358	0,51
SeGal	6.32	63	584		SeGal	6.32	41	1354	

L'ajout de HFBA 10 mM au milieu d'injection améliore la séparation de SeVI/SeMet ($R_s=0.99$) et SeIV/MeSeCyst ($R_s=1.29$) (Figure 29). Nous observons également une amélioration de l'allure des pics chromatographiques des acides aminés, de SeGal, et des espèces inorganiques, l'efficacité de la colonne étant multipliée par 2. La résolution entre SeEt et SeGal diminue mais ceci est sans conséquence pour l'analyse d'échantillons d'urine dans lesquels seule la présence de SeGal est attendue [162].

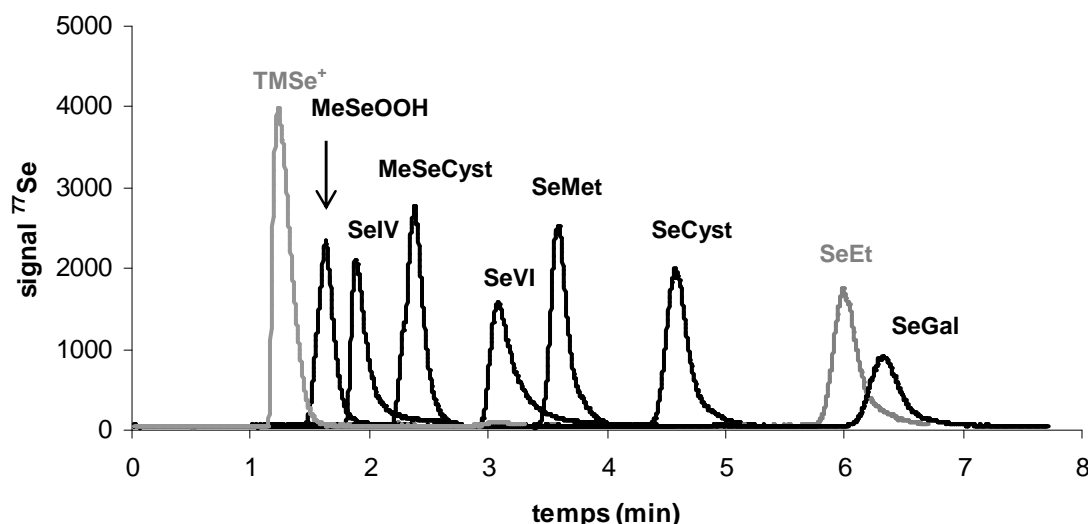


Figure 29: Chromatogramme des étalons ($10 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ par espèce) dans HFBA 10mM (colonne PGC ; phase mobile : 240 mM HCOOH + 1% MeOH + NH_3 (pH=2.3))

c) Etude des effets de matrice

Afin d'étudier les effets due à la matrice urine, les étalons sont ajoutés dans l'urine diluée 10 fois dans le milieu défini précédemment pour l'optimisation de la séparation des étalons, *i.e.* 10 mM HFBA (Figure 30). Aucune variation significative des temps de rétention des étalons n'est observée en présence d'urine (< 2%). De la même manière que sur la phase stationnaire C18, nous remarquons un élargissement des pics (diminution d'environ 20% du nombre de plateaux théoriques). Cependant, la séparation des composés n'est pas perturbée.

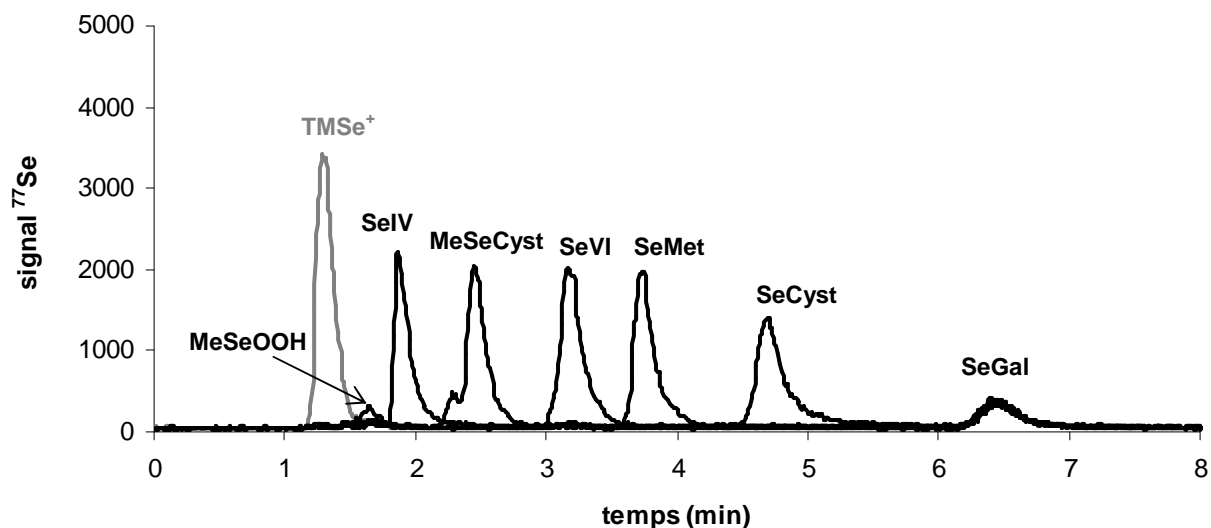


Figure 30: Chromatogramme des étalons ($10 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ par espèce) dans urine diluée (1 : 9) dans HFBA 10 mM
 (colonne PGC ; phase mobile : 240 mM HCOOH + 1% MeOH + NH₃ (pH=2.3))
Remarque : SeGal n'est pas ajouté à l'échantillon, il est initialement présent dans l'urine.

En ce qui concerne MeSeOOH, une forte diminution de son signal d'environ 85% est observée en présence de la matrice urine. Afin d'étudier l'effet de la matrice urine sur ce composé, différents facteurs et milieux de dilution ont été comparés.

1°) Influence de l'urine sur le signal de MeSeOOH

Le signal obtenu pour une concentration de $2 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ du composé est comparé dans les matrices eau milli-Q et urine diluée 10 ou 20 fois dans l'eau milli-Q. La Figure 31 présente les chromatogrammes obtenus dans ces différentes conditions d'injection.

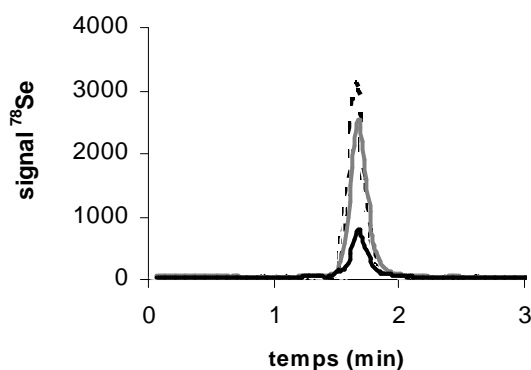


Figure 31: Chromatogramme de MeSeOOH à $2 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ dans urine diluée (1 : 9) dans H₂O (trait plein noir) ; dans urine diluée (1 : 19) dans H₂O (trait gris) ; dans H₂O (trait discontinu noir)

En comparaison avec le signal obtenu dans l'eau milli-Q, l'aire de MeSeOOH diminue de 11 à 77% dans l'urine diluée 20 à 10 fois. L'effet de la matrice urine sur le signal de ce composé est donc significatif.

2°) Influence du milieu de dilution de l'urine sur le signal de MeSeOOH

Afin d'améliorer l'allure des pics et ainsi minimiser l'influence de la matrice différents milieux de dilution de l'urine ont été testés. Le signal de MeSeOOH à $2 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ est comparé dans l'urine diluée 10 fois dans HFBA 10mM, eau milli-Q et phase mobile, Figure 32.

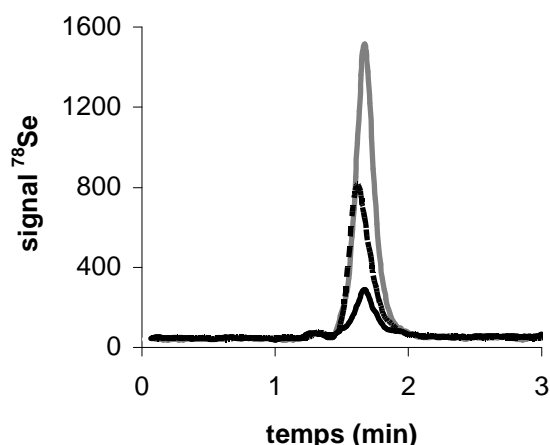


Figure 32: Chromatogramme de MeSeOOH à $2 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ dans urine diluée (1 : 9) dans H_2O (trait gris) ; dans phase mobile (trait noir en pointillé) ; dans HFBA 10 mM (trait plein noir)

Dans le cas où l'urine est diluée dans 10 mM HFBA on observe une perte de 83% du signal de MeSeOOH par rapport au signal du composé dans l'urine diluée dans l'eau. La diminution du signal est moins importante lorsque l'urine est diluée dans la phase mobile (43%). Cette diminution est donc non seulement liée à la matrice urine mais également à son milieu de dilution.

Une dilution de l'urine dans 10 mM HFBA ne permettra donc pas l'analyse de MeSeOOH. Cependant, la seule étude ayant détecté MeSeOOH dans l'urine (rats supplémentés) a conclu que ce composé était présent comme produit de dégradation de SeGlu et ne devait donc pas être considéré comme un métabolite sélénié naturel [201]. L'effet de matrice observé dans nos conditions analytiques est donc sans conséquence pour la suite de l'étude.

Les conditions retenues en diluant l'échantillon dans 10 mM HFBA, permettent donc la séparation de 6 composés (dont SeGlu non présenté lors de cette optimisation, qui élue à $t_R = 9.2$ min).

2.5. Séparation sur colonne échangeuse de cations

Ce dernier mode chromatographique, l'échange de cations, est utilisé afin de vérifier la présence et la quantification de TMSe^+ dans l'urine, pour l'instant uniquement quantifiable sur la colonne C18. Sur la base des conditions utilisées par Kuehnelt *et al.* [174] pour l'analyse des trois sélénosucres et TMSe^+ dans l'urine humaine, la séparation obtenue pour TMSe^+ est présentée Figure 33.

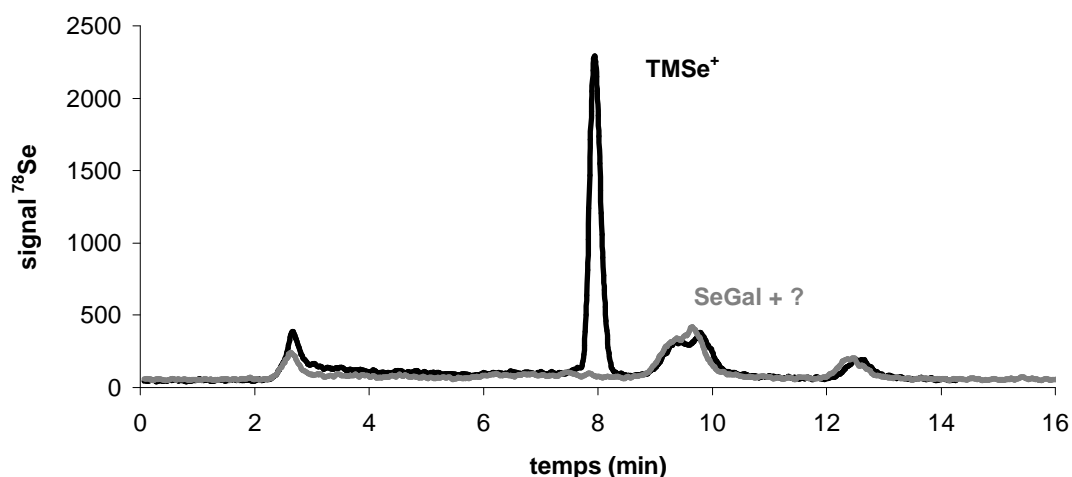


Figure 33 : Chromatogramme de l'étalon TMSe^+ à $1 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ dans urine diluée (1 : 9) dans phase mobile (colonne échangeuse de cations ; phase mobile : 10mM pyridine + HCOOH (pH=5))
Remarque : SeGal n'est pas ajouté à l'échantillon, il est initialement présent dans l'urine.

TMSe^+ et SeGal ont des temps de rétention proches. Une légère variation du pH pourrait entraîner leur coélution. Afin d'améliorer leur séparation, la diminution du pH à 4 a été testée. TMSe^+ est sous forme cationique sur toute la gamme de pH. Une diminution du pH engendre une augmentation de la concentration en protons et donc du pouvoir éluant de la phase mobile envers les cations. TMSe^+ devrait donc être moins retenu à pH 4 qu'à pH 5. Ne connaissant pas le pKa du sélénosucré SeGal , aucune prévision de son comportement n'est possible. Le chromatogramme obtenu est présenté Figure 34.

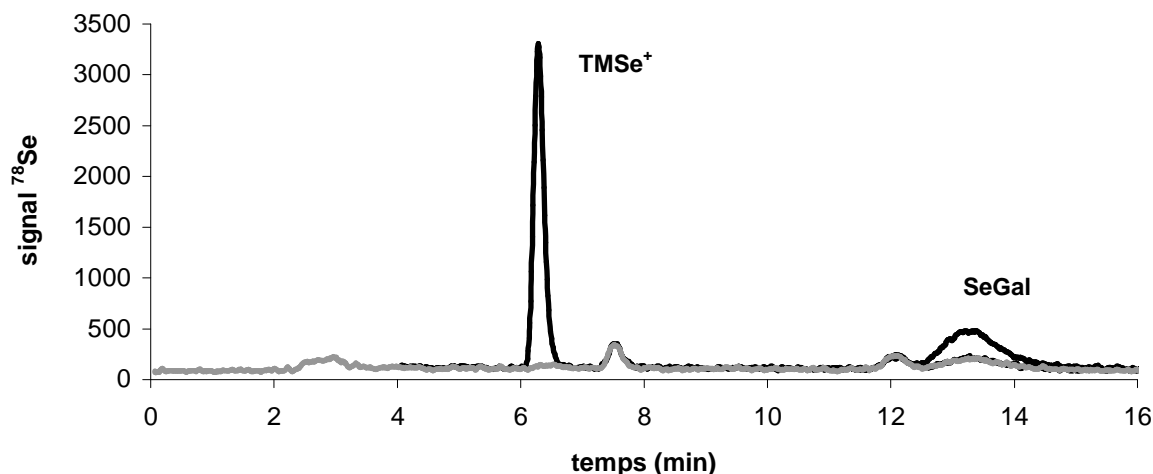


Figure 34: Chromatogramme d'un mélange des étalons $TMSe^+$ et $SeGal$ à $1\mu g(Se).L^{-1}$ dans urine diluée (1 : 9) dans phase mobile (colonne échangeuse de cations ; phase mobile : 10 mM pyridine + $HCOOH$ (pH=4))

Comme attendu, le temps de rétention de $TMSe^+$ diminue lorsque le pH diminue, améliorant la séparation entre $SeGal$ et $TMSe^+$ ($R_s= 1.7$ à pH 5 et $R_s= 4.8$ à pH 4). L'abaissement du pH permet également la mise en évidence d'un nouveau composé au temps de 7.5 min qui semblait coéluer avec $SeGal$ à pH 5. L'efficacité de la colonne envers $TMSe^+$ est très bonne ($H = 1.15 \times 10^4$ m). Ce mode de séparation n'est pas adapté pour l'analyse de $SeGal$ (pic élargi) mais cela n'est pas l'objectif de cette séparation. Deux composés qui éluent à 7.5 et 12.1 min ont été détectés. Ils ne correspondent à aucun des étalons disponibles au laboratoire.

2.6. Gradient d'éluion

Pour s'assurer qu'aucun composé sélénié contenu dans l'échantillon ne reste retenu sur les phases stationnaires hydrophobes C18 et PGC, le caractère apolaire de la phase mobile, c'est-à-dire son pouvoir éluant, est augmenté. Pour cela, le pourcentage de modificateur organique, en l'occurrence MeOH, est augmenté.

1°) Colonne C18

Le gradient en MeOH comprend un palier à 40% de MeOH pendant 10 min, la concentration en MeOH commençant à augmenter après l'éluion de l'étalon $SeGlu$ ($t_R= 6.1$ min) c'est-à-dire à partir de 9 min. Un temps d'équilibrage de 20 min est nécessaire pour assurer la répétabilité des analyses (Figure 35).

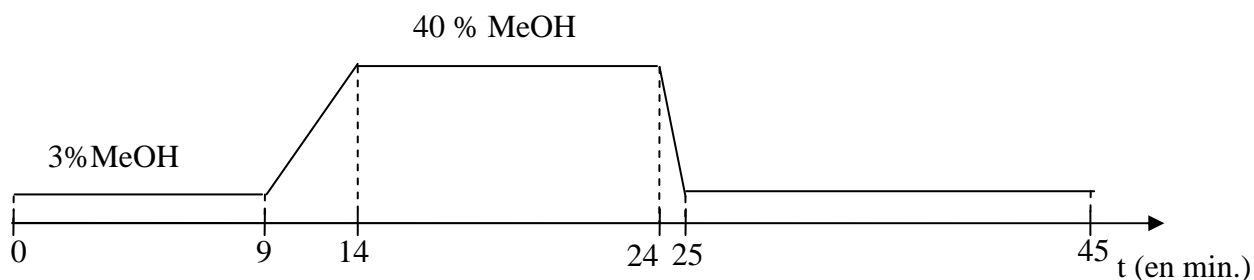


Figure 35: Gradient en MeOH, colonne C18

Le chromatogramme d'un échantillon d'urine obtenu en mode gradient d'élution est comparé à celui du même échantillon analysé en mode isocratique pendant 90 min, Figure 36.

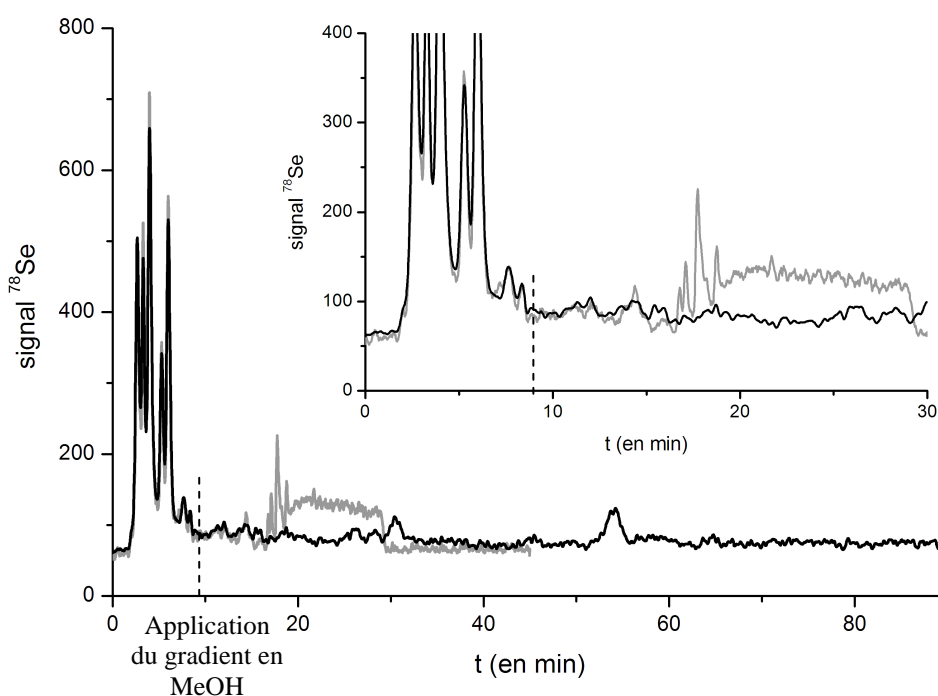


Figure 36: Chromatogrammes d'un échantillon d'urine diluée (1 : 9) dans phase mobile obtenus en mode isocratique (trait noir) et en mode gradient (trait gris) (colonne C18)

En mode isocratique, on observe la présence de deux pics chromatographiques mal définis, qui éluent à des temps de rétention d'environ 30 min et 53 min. L'application d'un gradient en MeOH permet une élution plus rapide de ces composés et évite ainsi leur détection lors de l'injection suivante. Afin de tenter d'identifier ces composés, les étalons sélénisés volatils DMSe et DMDS₂Se ont été ajoutés à l'urine puis injectés en mode isocratique et gradient. Dans les deux cas, les temps de rétention de ces formes méthylées restent inchangés. Le gradient n'a aucun effet sur l'élution de ces composés. DMDS₂Se est élué au bout de 93 min, tandis que DMSe, moins hydrophobe que DMDS₂Se, élué à environ 18 min. Nous pouvons donc conclure que les

composés observés précédemment à 30 et 53 min en mode isocratique ne correspondent pas aux formes volatiles sélénées DMSe et DMDSe.

2*) Colonne PGC

Comme décrit précédemment sur la colonne C18, l'influence d'un gradient en MeOH a également été étudiée sur la colonne PGC. Il commence tout de suite après l'élution du dernier étalon, SeGlu ($t_R = 9.2$ min), soit 10 min après l'injection. La phase stationnaire PGC étant plus apolaire que celle de la colonne C18, le palier à 40% de MeOH est plus long de 5 min afin de s'assurer que tous les composés soient élués (Figure 37).

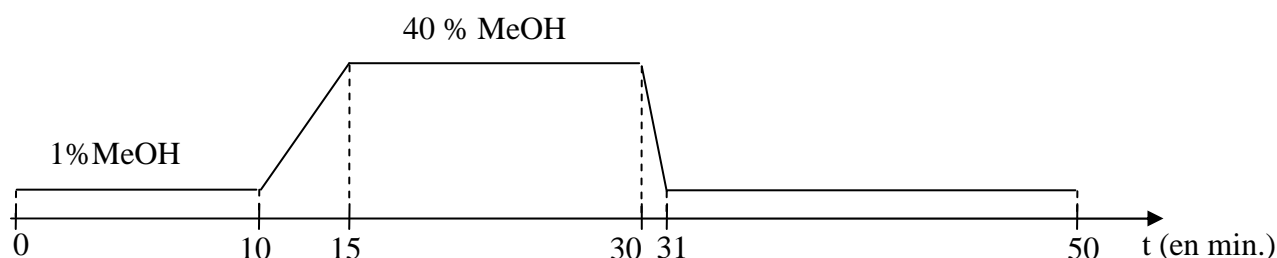


Figure 37: Gradient en MeOH, colonne PGC

La comparaison des chromatogrammes obtenus pour un échantillon d'urine en modes gradient et isocratique est représentée Figure 38.

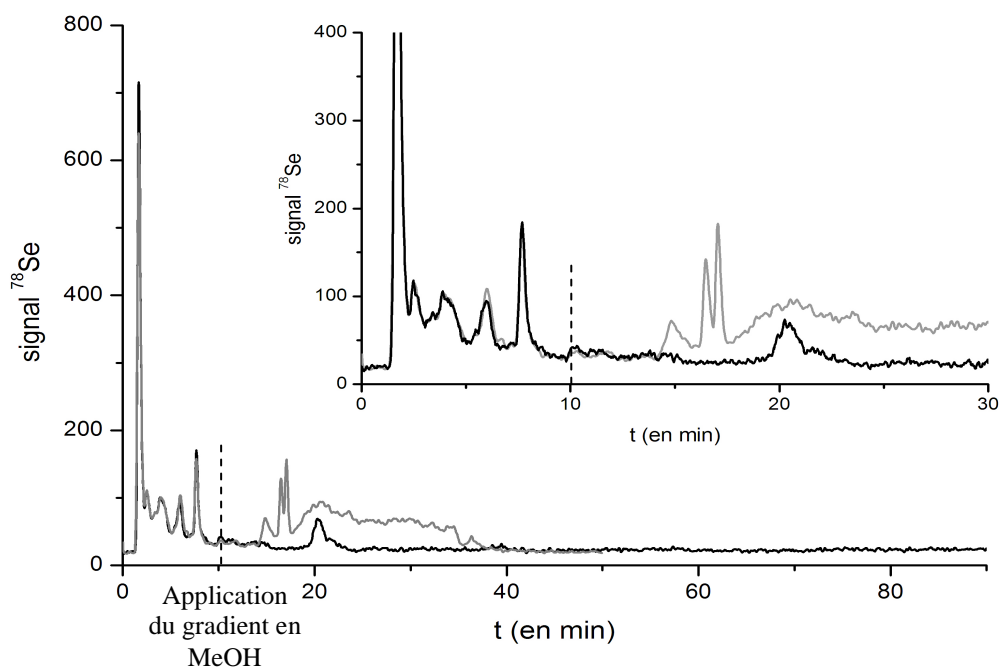


Figure 38: Chromatogrammes d'un échantillon d'urine diluée (1 : 9) dans HFBA 10 mM obtenus en mode isocratique (trait noir) et en mode gradient (trait gris) (colonne PGC)

Trois composés aux temps de rétention compris entre 15 et 20 min sont détectés en mode gradient tandis qu'un seul composé au temps de rétention 20.5 min est détecté en mode isocratique. La mise en application du gradient en MeOH permet donc la mise en évidence de 2 nouveaux composés. Afin de savoir si les nouveaux composés détectés correspondent aux espèces sélénées volatiles DMSe et DMDS_e, les étalons ont été ajoutés à l'urine en mode isocratique et gradient.

De la même manière que sur la colonne C18, le gradient en MeOH, n'a aucun effet sur l'élution des composés sélénés volatils DMSe et DMDS_e qui éluent respectivement à 4.2 min et 22 min. Nous pouvons donc en déduire qu'aucun des composés détectés pour un temps d'analyse supérieur à 15 min en mode isocratique et gradient, ne correspondent aux formes sélénées volatiles DMSe et DMDS_e.

2.7. Bilan sur les conditions chromatographiques d'analyse de l'urine diluée

Les trois modes de séparation chromatographiques optimisés (phase inverse, PGC, échange de cations) sont rappelés dans le Tableau 18.

Tableau 18: Récapitulatif des conditions chromatographiques et des espèces séparées pour l'analyse d'un échantillon d'urine

Colonne	Phase mobile	Milieu de dilution de l'urine	Espèces séparées	t _R (min)	Rs
Phase inverse C18 (Atlantis dC18, Waters)	A : 20 mM COOHNH ₄ + 3% MeOH + HCOOH (pH=3) + 1 mM HFBA B : 20 mM COOHNH ₄ + 40% MeOH + HCOOH (pH=3) + 1 mM HFBA débit 1 mL.min ⁻¹ , Vinj=100 µL <u>Gradient:</u> 0-9 min : 100% A 9-14 min: 100% A → 100% B 14-24 min: 100% B 24-25 min: 100% B → 100% A 25-40 min: 100% A	(1 : 9) dans phase mobile	MeSeCyst	2.4	1.0
			TMSe ⁺	3.0	
			SeMet	3.8	
			SeGal	4.8	
			SeGlu	7.2	
			DMSe	17.2	
			(DMDSe)	(93.0)	
PGC (Hypercarb, Thermo)	A : 240 mM HCOOH + 1% MeOH + NH ₃ (pH=2.3) B: 240 mM HCOOH + 40% MeOH + NH ₃ (pH=2.3) débit 1 mL.min ⁻¹ , Vinj=100 µL <u>Gradient:</u> 0-10 min: 100% A 10-15 min: 100% A → 100% B 15-30 min: 100% B 30-31 min: 100% B → 100% A 31-50 min: 100% A	(1 : 9) dans 10mM HFBA	SeIV	1.8	1.1
			MeSeCyst	2.4	
			SeVI	3.1	
			SeMet	3.7	
			SeCyst	4.7	
			SeGal	6.5	
			SeGlu	9.2	
			DMDSe	22	
Echange de cation (PRP-X200, Hamilton)	10 mM pyridine, pH ajusté à 4 avec HCOOH débit 1 mL.min ⁻¹ , Vinj=100 µL <u>Isocratique</u>	(1 : 9) dans phase mobile	TMSe ⁺	6.3	

En moins de 10 min d'analyse, cinq à sept étalons sont séparés respectivement sur les colonnes C18 (MeSeCyst, TMS⁺, SeMet, SeGal, SeGlu) et PGC (SeIV, MeSeCyst, SeVI, SeMet, SeCyst, SeGal, SeGlu). Un temps d'analyse supérieur peut également conduire à l'analyse des formes sélénées volatiles dont DMSe sur la colonne C18 et DMDS_e sur la colonne PGC.

La quantification de SeGal et SeGlu dans l'urine est donc rendue possible sur les phases en C18 et PGC, celle de TMS⁺ peut être obtenue en phase inverse C18 et échange de cations. Ces chromatographies complémentaires seront utilisées afin de s'assurer des résultats obtenus et de mettre en évidence d'éventuelles co-élutions conduisant à des résultats erronés.

L'utilisation du gradient en MeOH pour la séparation sur les phases de caractère hydrophobe permet une élution plus rapide de deux composés inconnus sur la colonne C18 et la mise en évidence de trois composés sur la colonne PGC, dont deux particulièrement intenses. Deux composés inconnus ont également été détectés sur la colonne échangeuse de cations.

Une représentation schématique de la durée d'analyse et des espèces analysables par chaque mode chromatographique est donnée Figure 39.

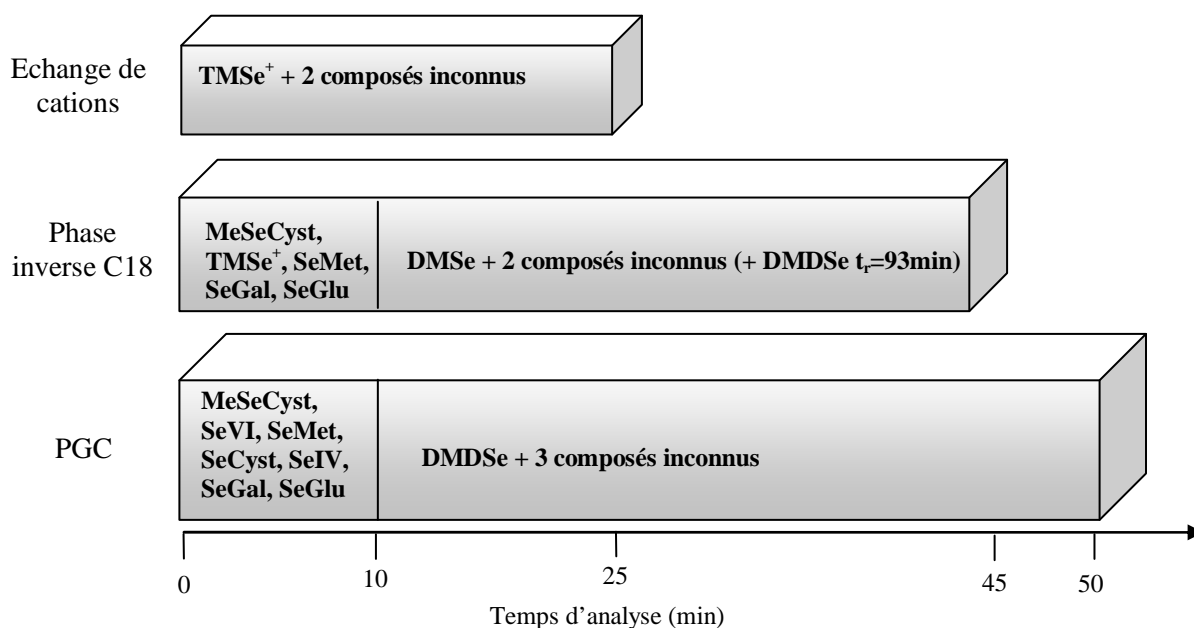


Figure 39: Durée d'analyse et espèces analysées en fonction du mode chromatographique utilisé

2.8. Performance analytiques

Les performances analytiques du couplage HPLC-ICPMS ont été évaluées en fonction de l'isotope ^{78}Se dans la matrice étudiée, *i.e.* urine diluée 10 fois dans la phase mobile (colonne C18 ; échangeuse de cations) ou dans 10 mM HFBA (colonne PGC). Le calcul des limites de détection, de quantification ainsi que de la répétabilité est fait selon les équations énoncées précédemment (Eq.2, Eq.3 et Eq.4 respectivement, cf. II.A. §1.5.). Les analyses ont été réalisées à des jours différents et donc avec des échantillons d'urine différents pour chacune des colonnes.

Les limites de détection et de quantification sont indiquées pour un volume d'injection de 100 μL et ramenées à l'urine en tenant compte du facteur dix de dilution (LD_{urine} et LQ_{urine}). Les courbes d'étalonnage sont tracées pour une gamme de concentrations allant de 20 à 1500 $\text{ng}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$

1*) Colonne C18

Les performances analytiques de la colonne C18 sont rassemblées dans le Tableau 19. La répétabilité (RSD) est calculée à partir de 5 injections d'un échantillon d'urine diluée 10 fois dans la phase mobile et contenant 50 $\text{ng}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ par espèce.

Tableau 19: Performances analytiques, colonne C18

Espèces	LD_{urine} $\text{pg}(\text{Se})$	LD_{urine} $\text{ng}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$	LQ_{urine} $\text{ng}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$	RSD	R^2
TMSe^+	2.1	21	71	5%	0.9967
MeSeCyst	2.1	21	71	1%	0.9998
SeMet	2.4	24	79	4%	0.9994
SeGal	3.8	38	126	3%	0.9998
SeGlu	2.6	26	85	5%	0.9992

Les limites de détection absolues, obtenues pour tous les étalons dans l'urine sont d'environ 2 $\text{pg}(\text{Se})$. La valeur la plus élevée est celle de SeGal qui est de 3.8 $\text{pg}(\text{Se})$. Elle est nettement inférieure à celle reportée par l'équipe de Kuehnelt [160] qui est d'environ 10 $\text{pg}(\text{Se})$ pour les trois sélénosucres. Ces auteurs utilisent un volume d'injection de 20 μl et l'urine est injectée sans dilution, après filtration à 0.22 μm . De plus, la phase mobile utilisée ne contient pas de HFBA. A cause d'une plus importante quantité de matrice injectée (deux fois supérieure à la nôtre), la ligne de base de leur chromatogramme est environ cinq fois plus élevée que celle que

nous obtenons. De plus, l'ajout de HFBA à la phase mobile permet une meilleure définition du pic de SeGal ($\omega(\text{SeGal})$ sans HFBA = 44 sec et $\omega(\text{SeGal})$ avec 1 mM HFBA = 28 sec).

Les courbes d'étalonnage sont linéaires dans la gamme de concentration étudiée. La méthode de séparation mise au point est donc applicable pour une large gamme de concentration allant des LQ trouvées pour les différents étalons, jusqu'à $1.5 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ dans l'urine diluée (soit $15\mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ dans l'urine). Le métabolite sélénié majoritaire SeGal, étant présent dans l'urine à des concentrations généralement inférieures à $8 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$, la gamme de linéarité choisie apparaît donc bien adaptée à l'analyse des métabolites séléniés dans l'urine [202]. La mesure des aires des pics chromatographiques s'avère être répétable, avec une variation de 1 à 6% sur les cinq chromatogrammes consécutifs.

2*) Colonne PGC

Les résultats des performances analytiques obtenues avec la colonne PGC sont reportés dans le Tableau 20. La répétabilité a été déterminée à partir de 5 mesures consécutives de l'aire des pics de SeIV, SeVI, MeSeCyst, SeMet, SeGal et SeGlu à une concentration de $50 \text{ ng}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ dans l'urine diluée 10 fois dans HFBA 10 mM. SeCyst ayant une limite de quantification plus haute que les autres étalons (soit $89 \text{ ng}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$), il est ajouté à une concentration de $100 \text{ ng}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ à l'échantillon.

Tableau 20 : Performances analytiques, colonne PGC

Espèces	LD _{urine} pg(Se)	LD _{urine} ng(Se).L ⁻¹	LQ _{urine} ng(Se).L ⁻¹	RSD	R ²
SeIV	6.5	65	216	6%	0.9997
MeSeCyst	6.7	67	223	6%	0.9995
SeVI	6.4	64	214	5%	1.0000
SeMet	6.8	68	228	6%	0.9996
SeCyst	28	267	890	22%	0.9979
SeGal	20	204	680	5%	0.9996
SeGlu	18	182	608	2%	0.9979

Les courbes d'étalonnage sont linéaires dans le domaine de concentration étudié. Les limites de détection calculées sont supérieures à celles trouvées par Dauthieu *et al.* [252] pour l'analyse des étalons SeIV, SeVI, SeMet et SeCyst dans l'eau milli-Q (LD d'environ $3 \text{ pg}(\text{Se})$). Ces valeurs sont toutefois peu comparables étant donné les différentes conditions analytiques de détermination (matrice, volume d'injection...). La mesure de l'aire des composés s'avère être répétable, avec une variation allant de 3 à 6%.

3°) Colonne échangeuse de cations

Ce mécanisme de séparation est particulièrement adapté à l'analyse du cation TMSe^+ . En comparaison avec les colonnes C18 et PGC, cette colonne n'est pas utilisable pour l'analyse des autres composés. Les limites de détection et la répétabilité du signal de TMSe^+ calculée pour une concentration de $50 \text{ ng}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$, sont présentées Tableau 21.

Tableau 21: Performances analytiques, colonne échangeuse de cations

Espèces	LD_{urine} pg(Se)	LD_{urine} ng(Se).L⁻¹	LQ_{urine} ng(Se).L⁻¹	RSD	R²
TMSe^+	8.1	81	272	1%	0.9996

Le signal est linéaire dans le domaine de concentration étudié. La limite de détection du TMSe^+ est plus élevée que sur la colonne C18. Cependant la répétabilité est meilleure (1%) ce qui permettra une analyse quantitative précise de ce composé. Ce mode de séparation est donc parfaitement adapté pour la quantification du TMSe^+ dans l'urine.

3. APPLICATION A DES ECHANTILLONS D'URINE

3.1. Analyse du sélénium total

Pour l'analyse du sélénium total présent dans l'urine, les échantillons, filtrés et dilués, sont acidifiés avec 2% HNO₃. Les résultats de Se total sont exprimés en concentration de l'élément et la limite de détection dans l'eau, évaluée en fonction de l'isotope ⁷⁸Se, est d'environ 13 ng(Se).L⁻¹.

Au cours d'un stage réalisé au laboratoire (résultats non publiés), l'influence de l'étape de minéralisation, permettant de détruire la matrice et donc d'éliminer de possibles interférences, a été étudiée pour la détermination du sélénium total dans l'urine. Trois protocoles de préparation d'échantillon ont été testés en triplicats sur un même échantillon d'urine. Deux consistent en une minéralisation à températures différentes (120°C et 200°C) avec HNO₃ comme réactif, le troisième consiste en un simple ajout de HNO₃ 2% à l'échantillon, sans étape de minéralisation. Les résultats montrent que les concentrations totales en sélénium mesurées dans les trois cas ne sont pas significativement différentes. Il apparaît donc que l'étape de minéralisation n'est pas nécessaire pour l'analyse du sélénium total dans les échantillons d'urine.

Toutefois, une étude récente a montré la présence de composés séléniés volatils (DMSe et DMDS_e) dans un échantillon d'urine humaine certifié, reconstitué, NIES CRM 18, susceptibles de perturber la mesure du sélénium total. En effet, les auteurs ont constaté que la réponse de DMSe et DMDS_e était 58 fois supérieure à celle du sélénite du fait de la volatilité de ces espèces, améliorant leur transport jusqu'au plasma [180]. La réponse des différents étalons disponibles en milieu 2% HNO₃ a donc été vérifiée. Les pentes des droites d'étalonnage correspondantes (gamme 100 à 2000 ng(Se).L⁻¹) sont rassemblées dans le Tableau 22.

Tableau 22: Pentes des droites d'étalonnage individuelles des composés séléniés

	Pente (hauteur/ ng(Se).L ⁻¹)	R ²		Pente (hauteur/ ng(Se).L ⁻¹)	R ²
TMSe ⁺	1.12±0.04	0.9993	SeMet	1.12±0.04	0.9993
SeIV	1.13±0.02	0.9997	MeSeCyst	1.18±0.05	0.9998
SeVI	1.23±0.02	0.9996	DMSe	0.95±0.07	0.9935
SeCyst	1.07±0.02	1.0000	DMDS _e	1.43±0.06	0.9955

Dans nos conditions d'analyse, les pentes de réponse des composés dissous et de DMSe ne sont pas significativement différentes. A l'inverse, la réponse de DMDS₂Se est légèrement supérieure (d'environ 20%) à celle des autres étalons sélénisés. Toutefois, sachant que la teneur en composés volatils sélénisés dans les échantillons d'urine normale est de l'ordre du ng(Se).L⁻¹, la différence de réponse du DMDS₂Se ne devrait pas affecter de manière significative la détermination de la teneur totale en sélénium qui est au minimum de l'ordre de la vingtaine de µg(Se).L⁻¹ [165]. L'ajout de HNO₃ 2% à l'échantillon permet donc une analyse fiable et représentative de la teneur totale en Se de l'urine.

3.2. Analyse de spéciation

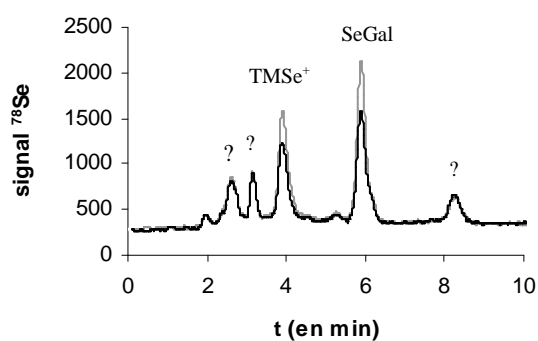
Les différents modes de séparation développés ont été appliqués pour l'analyse de spéciation de Se dans différents échantillons d'urine.

a) Analyse qualitative

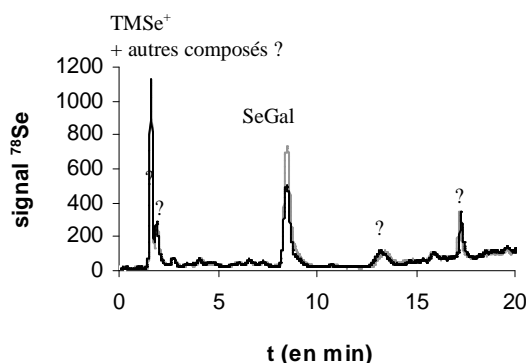
Un exemple des chromatogrammes obtenus pour un échantillon d'urine, avec les trois mécanismes de séparation développés est présenté Figure 40. Cet échantillon est représentatif des autres échantillons analysés.

Seuls SeGal et TMS₂Se⁺ ont pu être identifiés, SeGlu n'a pas été détecté. A l'heure actuelle, seule sa présence à l'état de trace dans l'urine de personnes supplémentées avec SeIV ou SeMet (1 mg(Se)), ou après ingestion de levure sélénisée (200 µg(Se)) a été confirmée [160, 174, 179].

a) colonne C18



b) colonne PGC



c) colonne échangeuse de cations

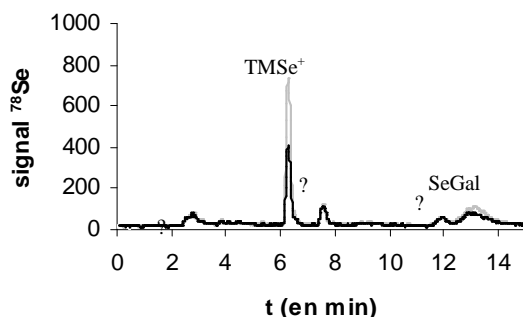


Figure 40 : Chromatogrammes d'un échantillon d'urine sans (trait noir) et avec (trait gris) ajout d'un mélange de TMSe^+ et SeGal a) colonne C18 ; b) colonne PGC ; c) colonne échangeuse de cations

Les temps de rétention des composés détectés sur les chromatogrammes des différentes urines analysées sur les trois colonnes sont rassemblés dans le Tableau 23 . La présence de certains étant aléatoire, seuls sont considérés les composés dont la présence est générale (indiqués en gras dans le Tableau 23). Sur la colonne C18, en plus de SeGal et TMSe^+ , deux composés ne correspondant à aucun de nos étalons, peuvent être détectés aux temps de rétention de 2.6 et 3.2 min. Le composé inconnu qui élué à environ 3.2 min coélué avec l'étalon MeSeCyst sur la colonne C18 mais n'est pas détecté au temps de rétention correspondant sur la colonne PGC. Selon Kuehnelt *et al.* [160], il pourrait correspondre au sélénosucré 3 dont l'étalon n'est pas disponible au laboratoire. Les espèces éluées à des temps de rétention inférieurs à 3 min correspondent aux formes inorganiques, SeCyst, MeSeOOH et éventuellement d'autres espèces inconnues qui ne sont pas bien retenues sur la phase stationnaire.

Tableau 23: Récapitulatif des temps de rétention des pics chromatographiques détectés dans différents échantillons urine dilués dix fois

Colonne C18	Colonne PGC	Colonne échangeuse de cations
$t_R = 2.6 \text{ min}$	$t_R = 1.6 \text{ min}$	$t_R = 6.2 \text{ min: TMSe}^+$
$t_R = 3.2 \text{ min: sélénosucré 3?}$	$t_R = 6 \text{ min}$	$t_R = 7.5 \text{ min : sélénosucré 3 ?}$
$t_R = 3.9 \text{ min : TMSe}^+$	$t_R = 8.3 \text{ min : SeGal}$	$t_R = 11.8 \text{ min}$
$t_R = 5.5 \text{ min}$	$t_R = 13.7 \text{ min}$	$t_R = 12.9 \text{ min: SeGal}$
$t_R = 5.9 \text{ min : SeGal}$	$t_R = 16.5 \text{ min}$	
$t_R = 8.3 \text{ min}$	$t_R = 17.3 \text{ min}$	
$t_R = 18 \text{ min}$		

Remarque : les pics détectés dans tous les échantillons d'urine sont indiqués en gras, la présence des autres est aléatoire

Sur les chromatogrammes des différentes urines analysées sur la colonne PGC, en plus de SeGal, deux autres composés inconnus ont été détectés. Le premier est mal séparé du pic chromatographique correspondant au volume mort de la colonne. Afin d'évaluer la nature du composé, une concentration croissante en HFBA est appliquée à l'échantillon (Figure 41). Elle se traduit par un déplacement du pic chromatographique vers des temps de rétention plus élevés sans diminution de son intensité.

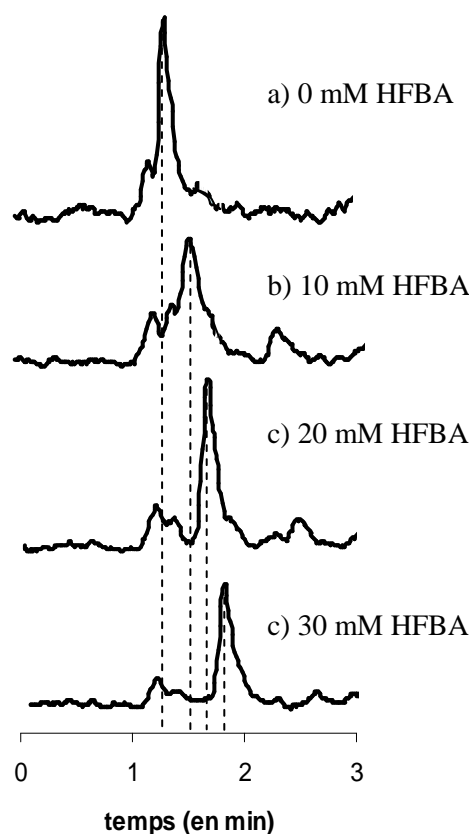


Figure 41: Chromatogrammes d'un échantillon d'urine dilué (1 : 9) dans a) H₂O ; b) 10 mM HFBA ; 20 mM HFBA ; c) 30 mM HFBA (colonne PGC)

L'influence de HFBA sur le comportement de ce composé traduit une possible formation de paire d'ions avec HFBA et permet d'éliminer l'hypothèse d'un composé anionique. Ce composé pourrait correspondre au TMS⁺. En effet, TMS⁺ est susceptible de former des paires d'ions avec HFBA et élué également proche du volume mort de la colonne. Afin de savoir si le composé détecté correspond au TMS⁺, un ajout de l'étalon est réalisé dans l'urine diluée dix fois dans 20 mM HFBA (Figure 42).

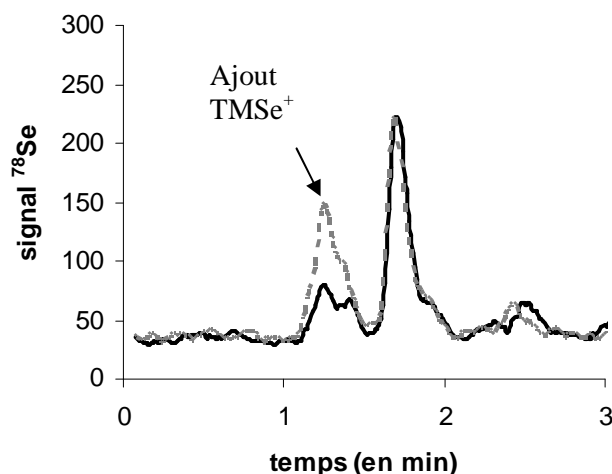


Figure 42: Chromatogramme d'un ajout de TMSe^+ ($1 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$) (trait pointillés gris) dans urine diluée (1 : 9) dans 20mM HFBA (trait noir) (colonne PGC)

L'étalon TMSe^+ ne coélué pas avec ce composé. Ce pic correspond donc à un composé inconnu.

Le deuxième composé inconnu détecté montre une rétention plus importante que les étalons non volatils et inférieure à celle de DMDSe .

Sur les chromatogrammes des échantillons d'urine analysés sur la colonne échangeuse de cations, deux composés inconnus sont détectés. Le composé qui élue juste après TMSe^+ à environ 7.5 min semble correspondre au sélénosucré 3 [153]. L'abaissement du pH au cours de l'étape d'optimisation de la phase mobile, n'a pas eu d'influence sur la rétention du deuxième composé inconnu qui élue à 11.8 min. Il est donc peu probable que ce soit un composé cationique.

b) Analyse quantitative

Un résumé des résultats des quantifications réalisées dans les différents échantillons est donné Tableau 24. La concentration totale de Se a été déterminée par ICPMS comme décrit précédemment (cf II.A. §1.3.).

Tableau 24: Concentrations en TMSe^+ , SeGal et sélénium total (en $\mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$) dans différents échantillons d'urine

échantillons	[Se] _{tot}	TMSe ⁺	SeGal	
		C18	C18	PGC
A	n.q.* ¹	n.q.* ¹	n.q.* ¹	2.5 ± 0.1
B	n.q.* ¹	n.q.* ¹	n.q.* ¹	0.70 ± 0.02
C	n.q.* ¹	< 0.02 (LD)	0.98±0.02	0.85±0.01
D	n.q.* ¹	0.35±0.02	6.6±0.1	4.9±0.1
E	25±1	0.21±0.02	5.9±0.9	4.5±0.3
F	38±1	n.q.* ¹	n.q.* ¹	4.9±0.2
G	48±1	n.q.* ¹	n.q.* ¹	5.2±0.2
H	32±1	n.q.* ¹	n.q.* ¹	3.4±0.1
I* ²	36±1	2.57±0.02	5.78±0.03	4.42±0.04

*¹ n.q. : pas quantifié.

*² : L'échantillon I a également été analysé sur la colonne échangeuse de cations. Les valeurs quantifiées sont : 2.29±0.07 $\mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ pour TMSe^+ et 4.5±0.2 $\mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ pour SeGal.

Pour tous les échantillons, la teneur en SeGal déterminée sur la colonne PGC est inférieure de 10 à 25% à celle déterminée sur la colonne C18. L'hypothèse pouvant expliquer cela est une coélution de SeGal avec un autre composé sur la colonne C18. Les résultats de la quantification de SeGal obtenus avec la colonne échangeuse de cations, dans l'échantillon I, semblent conforter cette hypothèse. Bien que ce mécanisme ne soit pas approprié à la quantification de ce composé (pic étalé, écart type important sur la mesure), la teneur en SeGal déterminée sur cette colonne est en accord avec celle déterminée sur la colonne PGC. La colonne PGC est donc bien adaptée pour l'analyse de SeGal dans l'urine, contrairement à la colonne C18 pour laquelle l'hypothèse d'une coélution d'un composé inconnu avec SeGal semble confirmée.

En ce qui concerne TMSe^+ , dans l'échantillon I, l'écart entre la teneur déterminée sur la colonne C18 et celle déterminée sur la colonne échangeuse de cations n'est pas significatif (10%). Les deux méthodes séparatives sont donc bien adaptées à l'analyse de TMSe^+ dans l'urine.

SeGal est présent dans tous les échantillons d'urine à une teneur comprise entre 0.70 et 5.2 $\mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$. La concentration en SeGal dans l'échantillon est toujours supérieure à celle de TMSe^+ (< 0.02 - 2.57 $\mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$). Sur les chromatogrammes des urines, l'intensité du pic de SeGal est toujours supérieure à celle des autres composés. Conformément aux travaux déjà publiés [177], quel que soit le mode de séparation utilisé, SeGal est le composé sélénié majoritaire présent dans l'urine humaine.

SeGal et TMSe^+ ne représentent au maximum que 23% de la teneur totale en sélénium. Les 77% restant se répartissent entre les pics non identifiés et les composés non détectés (<LD ou non élués). Les composés inconnus détectés ne semblent représenter qu'un faible pourcentage du sélénium total. De nombreux composés ne sont pas détectés. Afin d'améliorer la sensibilité de notre méthode, un protocole permettant de purifier l'échantillon pour minimiser la dilution de la matrice et ainsi augmenter la concentration des espèces a été développé. Il fait l'objet de la partie suivante.

II.B. EXTRACTION SUR PHASE SOLIDE COMME TECHNIQUE DE PREPARATION D'ECHANTILLON POUR L'ANALYSE DE SPECIATION DU SELENIUM DANS L'URINE

L'étude bibliographique (cf. I.B. §2.2.) a permis de dresser l'inventaire de toutes les techniques déjà testées pour la purification et/ou la préconcentration des espèces sélénées dans l'urine. Ceci nous a permis de définir l'extraction sur phase solide (SPE) comme technique de prétraitement d'échantillon, la SPE étant certainement la plus simple d'utilisation et la moins agressive. Certains auteurs ont montré que la SPE permet soit la préconcentration de SeGal dans l'urine et l'élimination de 50% des sels avant analyse par HPLC-ICP/MS [177, 188]; soit l'élimination d'une partie de la matrice organique [198]. Il est donc envisageable non seulement de purifier l'échantillon mais également de préconcentrer les analytes, ces techniques s'avérant particulièrement intéressantes en vue d'une analyse par spectrométrie de masse moléculaire qui requiert une pureté maximale de l'échantillon, et dont la sensibilité, généralement deux fois plus faible que celle de l'ICPMS pour les composés organiques du sélénium [257], est une limitation pour l'analyse de métabolites faiblement concentrés.

Le travail soumis pour publication au journal *Analytical Chimica Acta* "Solid phase extraction for selenium species determination in normal human urine", décrit l'optimisation de deux protocoles d'extraction sur phase solide pour la purification de l'échantillon et/ou la préconcentration des analytes. Les protocoles de SPE sont suivis d'une analyse par couplage HPLC-ICPMS utilisant les modes chromatographiques précédemment développés (cf. Partie II.A.) afin de confirmer l'identité des espèces détectées. Ce type de traitement pouvant causer perte et/ou dégradation des analytes, la justesse et la robustesse des protocoles optimisés ont été vérifiées par l'étude de la stabilité des étalons TMSe^+ , SeGal, SeGlu et le calcul de leur rendement après traitement. Les prétraitements résultent en une augmentation globale de la sensibilité de la méthode analytique d'environ un facteur quatre, calculé sur la base de la teneur totale en sélénium, tout en éliminant une partie de la matière organique. Le protocole SPE, optimisé sur une phase stationnaire en copolymère (N-vinylpyrrolidone/divinylbenzène) permet essentiellement d'éliminer une partie de la matrice. Les rendements obtenus pour TMSe^+ et les sélénosucres (SeGal et SeGlu) sont respectivement de $103 \pm 4\%$ et $89 \pm 2\%$.

Le second protocole, basé sur la rétention des analytes sur une phase stationnaire en C18, et leur élution dans un volume réduit, permet d'obtenir des rendements de $72 \pm 5\%$ pour TMSe^+ et de $26 \pm 2\%$ pour les sélénosucres. Les limites de détection pour TMSe^+ , SeGal et SeGlu sont

ainsi abaissées respectivement à 2 ; 9 et 6 ng(Se).L⁻¹ (contre 21 ; 38 et 26 ng(Se).L⁻¹ en analyse directe HPLC(C18)-ICPMS). Le second protocole SPE est particulièrement utile pour la quantification du TMS⁺ avec une amélioration de la sensibilité de la méthode d'un facteur proche de dix.

L'application de la méthode à différents échantillons montre que l'amélioration de la sensibilité permet une quantification plus aisée du métabolite sélénié majeur, SeGal, et de TMS⁺ dont la présence dans l'urine de personnes non supplémentées est confirmée. En parallèle, de nouveaux composés inconnus, c'est-à-dire ne correspondant à aucun des étalons séléniés disponibles, sont détectés.

Solid phase extraction for selenium species determination in normal human urine

Marlène Klein, Maïté Bueno and Florence Pannier

Laboratoire de Chimie Analytique Bio Inorganique et Environnement, IPREM, Université de Pau et des Pays de l'Adour, UMR CNRS 5254, Hélioparc, Avenue du Président Angot, 64000 Pau.

Abstract

This paper describes the use of solid phase extraction for selenium species preconcentration and matrix cleaning for urine samples. SPE treated urine samples can be analysed by HPLC-ICPMS without any further dilution. Three complementary chromatographic modes were used to confirm the identity and quantification of Se species detected in urine samples. Developed procedures which accuracy has been checked by recovery tests, led to an average Se sensitivity improvement factor about four. Such improved sensitivity allowed the increase of Se-containing peaks intensity and the emergence of unknown selenium compounds.

Keywords:

Selenium metabolites, urine analysis, matrix cleaning, preconcentration, SPE, HPLC, ICPMS

1. Introduction

Selenium is an essential trace element which plays an important role in anti oxidative processes in the human body and has additional health benefits effects like cancer [1, 2] and SIDA [3, 4] protective. However this element can also produce toxic effects at relatively modest intake. Its dual role as toxicant and essential trace element leads to important research interest in various fields such as human nutrition and toxicology. The metabolism of selenium in human body is still not fully elucidated. As urine is the major excretory route for selenium (50-70% of ingested Se [5]), the determination of Se speciation in this matrix should indicate relevant biomarker(s) for element dietary assessment. Investigations on selenium metabolites in urine could also provide valuable information to elucidate possible metabolic pathways. A review article by Francesconi and Pannier [6] critically detailed all Se-species detected and identified in urine.

The model of Se metabolism proposed by Ganther in 1986 [7] suggested urinary excretion of Se as trimethylselenonium ion (TMSe^+). This model, however, was primarily based on experiments with rats after diet supplementation with large doses of selenium. After the introduction of hyphenated techniques with element selective detection, liquid chromatography (HPLC) coupled with inductively mass spectrometry (ICPMS) being the most commonly used, several authors reported the presence of TMSe^+ in few samples only [8] and a marked individual variability of its concentration level has also been observed [9]. Clear indication of the presence of selenomethionine (SeMet) after supplementation with SeMet [10, 11] and, selenite (SeIV) at low concentrations in some samples of basal human urine [12], has also been given. Application of HPLC-mass spectrometry has evidenced that the major selenium metabolite in rat urine, is the selenosugar methyl 2-acetamido-2-deoxy-1-seleno- β -D-galactopyranoside (SeGal) [13]. Further studies showed that SeGal is also the dominant species in human urine and that two others

selenosugars were present as minor urine metabolites [13-15]. Nevertheless, several other Se species which can be observed in urine remain unknown and need further investigation.

The determination of selenium speciation in urine remains an analytical challenge for three main reasons: the low level of total selenium in basal human urine (generally 10-80 $\mu\text{g}(\text{Se})\cdot\text{L}^{-1}$ [5]), the complexity of the urinary matrix and the lack of commercially available certified selenium standards. The use of analytical techniques providing structural information such as HPLC-mass spectrometry in combination with sensitive HPLC-ICPMS is thus essential. A tenfold sample dilution is usually performed to reduce the complexity of the matrix prior to injection into HPLC-ICP/MS. However, because of the low level of selenium in urine samples, such dilution can hamper the detection of some species which are below the detection limits of analytical method. To overcome such an important dilution factor, several sample pretreatment procedures have been tested such as crown ether extraction to remove potassium and sodium followed by solid phase extraction [16, 17] or incubation with urease followed by evaporation and extraction with cold methanol for de-salting and de-proteinization [18-20]. Such aggressive cleaning procedures have been shown to generate some disadvantages such as the oxidation of selenosugars [15, 21] or the loss of inorganic selenium species [17]. These results indicate that urine pre-treatment should be as simple as possible to maintain original Se speciation. Moreover, the major selenium metabolite (SeGal) has been showed to decompose within 24 h storage at ambient temperature [10]. It appears thus mandatory for identification studies that the analytical procedure be fast enough to preserve the original selenium compounds. Solid phase extraction (SPE) has been proposed as an alternative sample preparation for matrix elimination and/or species preconcentration in human urine (Table 1). Camara and coworkers [22, 23] used C18 sorbent to remove a part of the organic urine matrix prior to analysis by HPLC-ICPMS. A recovery of about 100% was obtained for TMSe^+ , selenocystine (SeCys), SeMet, selenoethionine

(SeEt), selenite (SeIV), selenate (SeVI) and 2 unknown compounds (one of them being presumably SeGal).

Other procedures focused on Se species retention and their elution in a minimal volume. Gammelgaard et al. [24] obtained the retention of SeGal with the use of a copolymer material. Their procedure allowed the elimination of part of the organic matrix and the decrease of salt content of the sample. Complementary preconcentration steps by freeze drying and preparative chromatographies allowed them to identify SeGal in basal human urine. In this study, a recovery of about 30% was obtained for total Se. Unfortunately species selective recoveries were not evaluated. Another work by Wrobel et al. [25] demonstrated that C18 sorbent modified with hexanesulfonic acid before sample filtration was able to retain cationic Se species. After treatment of spiked urine, the added species, *i.e.* SeMet, methylselenomethionine, TMSe^+ , SeEt and adenosylselenomethionine, were detected in eluate fraction but corresponding recoveries were not calculated.

The work presented in this paper focuses on the optimisation of urine sample pretreatment by SPE allowing matrix cleaning and/or selenium species preconcentration. Different sorbents were compared and operating conditions were further optimised. HPLC-ICP/MS analysis of treated samples was performed using three complementary chromatographic separations to overcome possible species coelution and to obtain reliable species quantification. The stability of Se species during developed SPE procedure was verified with available standards and the method was finally applied to urine samples obtained from non Se-supplemented subjects.

2. Experimental

2.1 Chemicals and reagents

Ultrapure water was obtained from Milli-Q system (Millipore Co., Bedford, MA, USA). Trimethylselenonium (TMSe^+) and methyl 2-acetamido-2-deoxy-1-seleno- β -D-glucopyranoside (SeGlu) were synthesized in our laboratory according to published protocols [25, 26]. Methyl 2-acetamido-2-deoxy-1-seleno- β -D-galactopyranoside (SeGal) was kindly provided by Dr. Yasumitsu Ogra (Showa Pharmaceutical University, Japan). Stock standard solutions of $1000 \text{ mg (Se).L}^{-1}$ were prepared in water and stored in the dark at 4°C . Working standard solutions were prepared daily by diluting the respective stock solutions in ultrapure water.

All reagents were of analytical grade and purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), if not specified. Formic acid, heptafluorobutyric acid (HFBA), ammonium formate, methanol and ammonia (both from J.T.Baker, Deventer, The Netherlands) were used for mobile phases preparation and/or solid phase extraction procedure. Nitric acid (Ultrex, J.T. Baker, Deventer, The Netherlands) was used for samples acidification before total Se measurement.

A synthetic urine containing $134 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ Na}^+$, $67 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ K}^+$, $2.6 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$, $3.2 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$, $19.8 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ H}_2\text{PO}_4^-$, $122 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ Cl}^-$, 310 mmol.L^{-1} urea and 9.8 mmol.L^{-1} creatinine was prepared according to [27].

2.2. ICP/MS apparatus and HPLC conditions

The HPLC system consisted of Agilent 1100 series HPLC pump, equipped with an autosampler and variable volume sample loop. Injection volume was fixed at $100 \mu\text{L}$.

Three chromatographic separations were employed. Ion pairing chromatography was performed on Atlantis C18 column ($150 \times 4.6\text{mm}$, $5\mu\text{m}$, Waters, Milford, MA, USA) and a mobile phase composed of 20 mM ammonium formate, 1mM heptafluorobutyric acid (HFBA), 3% methanol,

at pH 3.0 adjusted with formic acid. Porous graphitic carbon stationary phase (Hypercarb, Thermo Scientific, 100 x 4.6mm, 5 μ m) was used with mobile phase composed of 240 mM formic acid, 1% methanol, at pH 2.3, adjusted with ammonia. Cationic exchange chromatography (Hamilton PRP-X200, 4.1 x 250 mm, 10 μ m) was used as third separation to specifically confirm TMS⁺ quantification. A solution of 10 mM pyridine at pH 4.0 (adjusted with formic acid) was used as mobile phase. Mobile phase flow rate for all separation conditions was 1mL.min⁻¹ and a methanol gradient running up to 40%MeOH was used with hydrophobic stationary phases as detailed in Table 2.

The interface between the chromatograph and the ICP/MS was simply made with a poly-ether-ether-ketone (PEEK) tube. The ICPMS instrument used was the 7500cs from Agilent Technologies (Tokyo, Japan), equipped with an octopole collision/reaction cell. H₂ of 99.995% purity (Linde, St Priest, France) was used as the cell gas in the octopole cell (3 mL.min⁻¹). Sample introduction system is constituted of a concentric nebulizer (Meinhard Associates, California, USA) and a Scott double spray chamber cooled to 2°C. The detection of selenium containing peaks was realized by monitoring ⁷⁷Se, ⁷⁸Se isotopes. Other parameters settings are summarized Table 2.

2.3. Urine samples

Urine samples were collected from non-supplemented volunteers in polytetrafluoroethylene (PTFE) bottles. They were immediately filtered through a 0.45 μ m filter (Whatman, Dassel, Germany) after collection. Extraction procedure was performed within the day of collection. Total selenium in urine was determined by standard additions after a ten-fold sample dilution and acidification with 2% HNO₃. Total Se content of urine samples, between 16 and 60 μ g(Se).L⁻¹, was within the typical range for non supplemented European people [28].

2.4. Solid phase extraction (SPE)

The following SPE sorbents were compared: Sep Pack C18 (Waters) and Hyper Sep C18 (Thermo, Bellefonte, USA), both hydrophobic sorbents and, Oasis HLB (Waters, Milford, MA, USA), a macroporous copolymer with hydrophilic (N-vinylpyrrolidone polymer) and lipophilic (divinylbenzene polymer) properties. Copolymer sorbent provides a reversed phase capability (relative retention capacity 3 times higher than C18) and hydrophilic properties for enhanced retention of polar compounds [29]. All cartridges contained 500 mg of sorbent. Three different procedures, which conditions are summarized in Table 3, were applied to compare efficiencies of the three sorbents. The first one involves urine dilution in milli-Q water, the second one in ammonium formate (used as mobile phase for C18 separation) and the third one in heptafluorobutyric acid, an ion pairing agent. Flow rate was 1 mL.min⁻¹ for all extraction steps, controlled by a 12 port vacuum manifold (Interchim, Montluçon, France).

3. Results and discussion

3.1 SPE sorbent and procedure selection

A preliminary study was performed to select appropriate SPE conditions. The same urine sample was filtered through the three sorbents following the three different procedures, as detailed in the experimental part. A washing step between sample loading and elution was not included in the procedures as it resulted in substantial loss of selenium metabolites.

Effluents were collected during loading (filtrates, F) and elution (eluates, E) steps. Total selenium concentrations were measured in filtrates and eluates. Corresponding total Se recoveries are presented in Table 4.

The results of these experiments indicate that from the point of view of Se retention, the two C18 sorbents behave similarly, i.e. up to 56% Se retention for procedure 3 conditions, and are therefore suitable for selenium preconcentration. Nevertheless, as selenium recovered in

HyperSep eluate was slightly superior to the one obtained with SepPak, the HyperSep C18 sorbent was then selected for further optimisation of Se preconcentration procedure. On the opposite, the copolymer sorbent appeared to be suitable for matrix cleaning as the amount of Se retained was low, i.e. close to 25% for procedure 1 conditions.

In order to optimise experimental procedures conditions for selected sorbents, total Se breakthrough during loading and elution steps was investigated. Effluents (filtrates and eluates) were sampled in 1mL fractions, and total selenium concentrations were measured in these fractions (Figure 1).

The results of Se recovery in collected 1 ml filtrates during urine sample loading on copolymer sorbent showed a plateau after filtration of 4 ml volume of sample (Figure 1a). From 5 to 10 mL of filtered urine, a Se recovery of $88 \pm 6\%$ was obtained. HPLC-ICPMS analyses of collected fractions showed the presence of the same Se containing compounds in all fractions of the filtrate, peaks intensities being lower in fractions from 1 to 4 mL. Therefore, the conditions of SPE procedure with copolymer sorbent were modified, filtrate being collected from 5 to 10 mL of filtered sample.

The elution profile of Se from C18 sorbent (HyperSep) in 1 mL fractions of eluate, i.e. 25% MeOH in milliQ water (Figure 1b) indicate that the amount of total Se eluted in the first three mL reaches 81% of retained selenium. HPLC-ICPMS analyses of collected fractions of the eluate evidenced the presence of the same Se containing compounds in all collected fractions. As no different Se species were detected in 4 to 6 mL eluates, the conditions of Se elution from C18 sorbent were modified to minimize eluate volume which was therefore reduced to 3 mL.

Elution with higher methanol concentration was examined in order to improve Se recovery. Elution with 50% MeOH did not increase significantly Se recovery and resulted in very coloured effluents. HPLC-ICPMS analyses of collected eluates showed the presence of the same Se containing compounds in eluates composed of 25%MeOH or 50% MeOH. However as

chromatographic resolution was lowered by 50% MeOH medium, elution with 25% MeOH was finally retained. A previous study dedicated to SPE of SeGal also showed that SeGal recovery was not affected by the methanol content of eluent in the range 25% to 100% [24].

Optimized SPE conditions for Se preconcentration and urine matrix cleaning are summarized Table 5.

3.3. Recovery and stability of Se species during SPE treatments

To evaluate the stability and recovery of Se species during optimised SPE treatments, synthetic and natural urine individually spiked with TMSe^+ , SeGal or SeGlu at $10 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ were treated following the two optimised SPE procedures. Blanks, *i.e* unspiked, synthetic and natural urines were also treated. Se species concentrations were measured for copolymer filtrates and C18 eluates by HPLC-ICPMS coupling using two to three chromatographic separations as detailed in Experimental part. Total Se was also measured in filtrates and eluates. Comparison of determined total Se and species concentrations would indicate species degradation during treatment.

On copolymer cartridge, TMSe^+ recoveries calculated from either total Se measurement or species selective quantification after chromatography were very close, *i.e* $103 \pm 4\%$, indicating that TMSe^+ was not degraded during treatment of both natural and synthetic urines (see Table 6). Selenosugars degradation was observed during treatment of spiked synthetic urine, while a recovery of $89 \pm 2\%$ was obtained after treatment of spiked natural urine. This result was quite surprising as natural urine is a more complex matrix than synthetic urine, but it seems indicative of selenosugar species stabilization in natural urine. Synthetic urine matrix may thus not be suitable to predict SeGal and SeGlu behaviours in natural urine during solid phase extraction.

On C18 cartridge, recoveries were always lower than 100% as Se retention and Se elution were not complete (cf Table 3). In natural urine, Se retention varied from $26 \pm 2\%$ for selenosugars to

$72 \pm 5\%$ for TMSe^+ species. In synthetic urine, retention was slightly higher, with $42 \pm 3\%$ and $100 \pm 1\%$ respective retentions of selenosugars and TMSe^+ species. Retention appears thus to be incomplete and, matrix and species dependant. It has to be noted that the optimal conditions retained for C18 were based on the use of HFBA during sample loading, this reagent being effective to form ion pair with TMSe^+ . The retention of this compound is therefore increased compared to the one of selenosugars. Concerning the elution step, similar recoveries were obtained for all species. The amount of eluted Se was superior for treated natural urine ($90 \pm 3\%$) than for synthetic urine ($73 \pm 9\%$). Elution appears also matrix dependant but not species dependant. As recoveries calculated from total Se measurements were the same as the ones obtained from species concentration determination, it can be concluded that no degradation occurred during the preconcentration of studied species on C18 sorbent.

3.2. Performance of the optimized protocols

Repeatability of optimized SPE procedures was evaluated by triplicate treatments of same urine sample. Relative standard deviations obtained from total selenium determinations in filtrates and eluates, were lower than 3% for both SPE procedures. HPLC-ICPMS analyses of filtrates and eluates showed superimposable chromatograms of triplicate treated sample, confirming SPE procedures repeatability.

Reproducibility was investigated by treating five different urine samples of total Se content in the range $28\text{-}56 \mu\text{g}(\text{Se})\cdot\text{L}^{-1}$. Relative standard deviation obtained for total Se recoveries on copolymer sorbent was 8% whereas it was 16% on C18.

The average sensitivity improvement of optimized SPE methods was evaluated for the same urine samples by calculating the ratio of total Se concentration in filtrate (copolymer sorbent) or eluate (C18 sorbent) to total Se concentration in tenfold diluted urine. A mean

sensitivity improvement of 4.1 ± 0.3 was obtained for copolymer treatment, and of 4.7 ± 0.7 for C18 treatment.

Species specific sensitivity improvements were also calculated for TMSe^+ , SeGal and SeGlu as the ratio of species concentration in copolymer filtrate or C18 eluate and species concentration in ten fold diluted urine. Results and ensuing HPLC-ICPMS detection limits are summarized in Table 7. Compared to untreated sample, a significant improvement of species detection limits was obtained for treated sample, by respective factors 11 and 4 for TMSe^+ and selenosugars with C18 sorbent and, around 5 for all species with copolymer sorbent. C18 SPE treatment appears thus particularly useful for TMSe^+ determination in urine.

3.4. Application to different urine samples

Developed SPE procedures were applied to different urine samples. Species specific recoveries (Table 6) were applied to calculate species concentration in urine samples. Samples named A and B were obtained from a 25 years old woman, while samples C to E were obtained from a 26 years old man. Examples chromatograms of untreated and treated (filtrate and eluate) urine sample are presented Figure 2. The sensitivity improvement achieved by SPE treatments allowed an increase of Se-containing compounds peaks intensity and, the emergence of uncharacterized Se containing compounds whose retention times do not match any available standards. The identification of these unknown compounds is currently in progress, and one of them has been already identified as methylselenoneine by molecular mass spectrometry after further purification and preconcentration steps [30].

TMSe^+ was quantified with C18 reversed phase and cation exchange chromatographic separations while SeGal was first quantified with C18 and PGC based chromatographic separations. We observed that the results of SeGal quantification obtained with C18 separation were always superior to the ones obtained with PGC chromatography (10 to 30%). This

difference could indicate a co-elution of SeGal and other(s) compound(s) with C18 reversed phase separation. As a matter of fact, the newly identified Se compound, methylselenoneine, showed the same retention time than SeGal with C18 separation while it was well separated from other Se species with PGC chromatography [30]. SeGal quantification results, presented in Table 8, were thus based on PGC chromatography. As no urine reference material certified for selenium species is available, we compared for sample C the quantification results of TMSe^+ and SeGal obtained in untreated urine (after dilution 1: 9 in ultra pure water) and SPE treated urines. Species concentrations measured in untreated ($[\text{TMSe}^+] = 2.29 \pm 0.07 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$; $[\text{SeGal}] = 4.42 \pm 0.08 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$) and SPE treated sample (Table 8) do not differ significantly indicating reliability of SPE procedures. The minor metabolite SeGlu was not detected in analysed urine samples ($< 6 \text{ ng}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$). Concentrations of SeGal measured in samples are in agreement with those reported in the literature for normal urine samples, in the range 1 to $8 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ [15], with the exception of sample A for which SeGal concentration was slightly superior. TMSe^+ was quantified in all studied samples, with concentrations between 0.30 and $4.8 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ (equivalent to 1-8% of total Se content) confirming the presence of TMSe^+ in urines of subjects exposed to non toxic Se levels. Samples C to E showed superior values than those previously published in normal urines ($< 0.005(\text{LD}) - 0.37 \mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$) [9].

3.4. Conclusions

The SPE procedures developed lead to the elimination of part of urine matrix and/or species preconcentration resulting in a mean analytical sensitivity improvement of about 4 without any degradation for TMSe^+ , SeGal and SeGlu species. This sensitivity improvement involves the emergence of unknown selenium compounds and the increase of Se-containing peaks intensity

leading to easier quantification of SeGal and TMSe^+ present in normal urine samples compared to conventional HPLC-ICPMS after tenfold urine dilution. It is also interesting to note that our analytical approach combining the use of three different chromatographic separations demonstrated its usefulness evidencing that commonly used C18 chromatography, does not allow to distinguish SeGal, the major selenium metabolite, from the newly identified metabolite Se-methylselenoneine, leading to over-value SeGal concentrations in urine samples.

Acknowledgment

Authors thank Jean-Marc Sotiropoulos (Equipe Chimie Physique, IPREM, UPPA/CNRS UMR 5254, Pau, France) for his help in chemical synthesis.

References

- [1] H.J. Thompson, *J. Agric. Food Chem.*, 32 (1984) 422.
- [2] P.C. Raich, J. Lü, H.J. Thompson, G.F. Combs, *Cancer Invest.*, 19 (2001) 540.
- [3] M.C. Delmas-Beauvieux, E. Peuchant, A. Couchouren, J. Constans, C. Sergeant, M. Simonoff, J.L. Pellegrin, B. Leng, C. Conri, M. Clerc, *Am. J. Clin. Nutr.*, 64 (1996) 101.
- [4] M.K. Baum, G. Shor-Posner, S. Lai, G. Zhang, H. Lai, M.A. Fletcher, H. Sberlich, J.B. Page, *J. of Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 15 (1997) 370.
- [5] E. Dumont, F. Vanhaecke, R. Cornelis, *Anal. Bioanal. Chem.*, 385 (2006) 1304.
- [6] K.A. Francesconi, F. Pannier, *Clin. Chem.*, 50 (2004) 2240.
- [7] H.E. Ganther, *Int. J. Toxicol.*, 5 (1986) 1.
- [8] B. Gammelgaard, K.D. Jessen, F.H. Kristensen, O. Jons, *Anal. Chim. Acta*, 404 (2000) 47.
- [9] D. Kuehnelt, D. Juresa, N. Kienzl, K. Francesconi, *Anal. Bioanal. Chem.*, 386 (2006) 2207.
- [10] B. Gammelgaard, L. Bendahl, U. Sidenius, O. Jøns, *J. Anal. At. Spectrom.*, 17 (2002) 570.
- [11] T.H. Cao, R.A. Cooney, M.M. Woznichak, S.W. May, R.F. Browner, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 2898.
- [12] B. Gammelgaard, O. Jons, *J. Anal. At. Spectrom.*, 15 (2000) 945.
- [13] B. Gammelgaard, L. Bendahl, *J. Anal. At. Spectrom.*, 19 (2004) 135.
- [14] L. Bendahl, B. Gammelgaard, *J. Anal. At. Spectrom.*, 19 (2004) 950.
- [15] B. Gammelgaard, L. Bendahl, N.W. Jacobsen, S. Sturup, *J. Anal. At. Spectrom.*, 20 (2005) 889.
- [16] B. Gammelgaard, O. Jøns, L. Bendahl, *J. Anal. At. Spectrom.*, 16 (2001) 339.

- [17] V. Díaz Huerta, J. Szpunar, R. Lobinski, M. L. Fernández Sánchez, A. Sanz-Medel, J. Anal. At. Spectrom., 18 (2003) 1471.
- [18] Y. Kobayashi, Y. Ogra, K. Ishiwata, H. Takayama, N. Aimi, K.T. Suzuki, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99 (2002) 15932.
- [19] Y. Ogra, K. Ishiwata, H. Takayama, N. Aimi, K.T. Suzuki, J. Chromatogr. B, 767 (2002) 301.
- [20] E. Dumont, Y. Ogra, K.T. Suzuki, F. Vanhaecke, R. Cornelis, Anal. Chim. Acta, 555 (2006) 25.
- [21] Y. Ogra, T. Hatano, M. Ohmichi, K.T. Suzuki, J. Anal. At. Spectrom., 18 (2003) 1252.
- [22] M.M. Gomez, T. Gasparic, M.A. Palacios, C. Camara, Anal. Chim. Acta, 374 (1998) 241.
- [23] M.A. Quijano, A.M. Gutierrez, M.C. Perez-Conde, C. Camara, Talanta, 50 (1999) 165.
- [24] B. Gammelgaard, K.G. Madsen, J. Bjerrum, L. Bendahl, O. Jøns, J. Olsen, U. Sidenius, J. Anal. At. Spectrom., 18 (2003) 65.
- [25] K. Wrobel, K. Wrobel, S.S. Kannamkumarath, J.A. Caruso, Anal. Bioanal. Chem., 377 (2003) 670.
- [26] P. Traar, F. Belaj, K.A. Francesconi, Austr. J. Chem., 57 (2004) 1051.
- [27] B. Gammelgaard, O. Jøns, J. Anal. At. Spectrom., 14 (1999) 867.
- [28] M. Sanz Alaejos, C. Diaz Romero, Clin. Chem., 39 (1993) 2040.
- [29] Waters, Chromatography columns and supplies catalog 2008-2009.
- [30] M. Klein, L. Ouerdane, M. Bueno, F. Pannier, Metallomics, 3 (2011) 513.

Table captions

Table 1: Solid phase extraction procedures for selenium species determination in human urine

Table 2: HPLC and ICPMS operating conditions

Table 3: Conditions of SPE procedures tested

Table 4: Total Se recoveries in SPE filtrates and eluates

Table 5: Operating conditions of optimized SPE protocols

Table 6: Recoveries of Se species during SPE treatments calculated from Se total and species quantification

Table 7: SPE sensitivity improvements and ensuing detection limit ($\text{ng}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$)

Table 8: SeGal and TMSe^+ quantification in urine samples by SPE-HPLC-ICPMS
(in $\mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$)

Figure captions

Figure 1: Total Se breakthrough during SPE treatments: (a) Se recoveries in filtrate fractions during SPE sample loading step (copolymer sorbent) and (b) Se concentrations in eluate fractions during SPE elution step (C18 sorbent)

Figure 2: Example HPLC (C18)-ICPMS chromatograms of untreated and treated urine sample: (a) copolymer SPE filtrate (grey line) compared to urine (diluted 1:9 in water) (black line) ; (b) C18 SPE eluate (grey line) compared to urine diluted 10 fold in 25%MeOH (black line).

Table 1: Solid phase extraction procedures for selenium species determination in human urine

Nature of SPE sorbent	SPE procedure	Se species retention	Comments	Recovery	Speciation analysis	Ref
C18 (RP) (Bond Elut C18, 500mg)	Conditioning: 3 mL MeOH, then 3 mL HFBA 20mM Sample loading: 3 mL urine (0.45 μ m filtration) diluted (1:1) with HFBA (pH 2) Washing: 0.2 mL HFBA 20mM Elution: 3 ml MeOH	SeGal	Elimination of part of salt content; Preconcentration factor 10	95% for SeMet	HPLC(IP)-ICP-MS	[10]
C18 (RP) (Sep pak VAC C18, 500mg)	Conditioning: 6 mL MeOH, then 3 mL H ₂ O Sample loading: not detailed	no	Elimination of organic matrix; Important matrix effect is still observed	100% (TMSe ⁺ , SeCys, SeMet, SeEt, SeIV, SeVI)	HPLC(AE)-MO-HG-AAS FI-MO-HG-AAS	[22]
C18 (RP) (Bond Elut C ₁₈)	Conditioning: 5 mL MeOH, then 5 mL H ₂ O Sample loading : 4 mL Washing: 4.5 mmol.dm ⁻³ phosphate buffer (pH=6.0)	no	Elimination of organic matrix;	100% (TMSe ⁺ , SeCys, SeMet, SeEt, SeIV, SeVI)	HPLC(AE)-ICP-MS	[23]
N-vinylpyrrolidone divinylbenzène polymer (Oasis HLB, Waters, 500mg)	Conditioning: 3 mL MeOH, then 3 mL HCOONH ₄ 10mM Sample loading: 10mL urine (0.45 μ m filtration) diluted (1:1) with HCOONH ₄ 10 mM (pH=7) Elution: 6 ml MeOH 25%	SeGal	Elimination of part of organic matrix; Elimination of 50% [K ⁺] and [Na ⁺]	30% for total Se content	HPLC(RP)-ICP-MS SEC-ICPMS APCI-MS ESI/MS	[24]
C18 modified with hexanesulfonic acid (C18, Waters)	Conditioning: 10 mL hexanesulfonic acid 1%, then 5 mL H ₂ O Sample loading: 10 mL urine acidified (pH 2) with perchloric acid 0.4 M Elution: 3 ml MeOH 50%, then 3 mL MeOH 90%	cationic species	Elimination of chloride interferences; Preconcentration factor 20	not given	HPLC(IP) -ICP-MS	[25]

Table 2: HPLC and ICPMS operating conditions for selenium determination

Chromatographic conditions	
Columns and mobile phases	<p><i>Reversed phase (RP) chromatography:</i> Atlantis C18 (150 x 4.6mm, 5μm) A: 20mM HCOONH₄ + 1mM HFBA + 3%MeOH + HCOOH (pH=3) B: 20mM HCOONH₄ + 1mM HFBA + 40%MeOH + HCOOH (pH=3) Gradient: 0-9min: 100% A 9-14: 100% A \rightarrow 100% B 14-24min: 100% B 24-25min: 100% B \rightarrow 100% A 25-45min: 100% A</p> <p><i>Porous graphitic carbon (PGC) chromatography:</i> Hypercarb (100 x 4.6mm, 5μm) A: 240mM HCOOH + 1%MeOH + NH₃ (pH=2.3) B: 240mM HCOOH + 40%MeOH + NH₃ (pH=2.3) Gradient: 0-10min: 100% A 10-15: 100% A \rightarrow 100% B 15-30min: 100% B 30-31min: 100% B \rightarrow 100% A 31-50min: 100% A</p> <p><i>Cation exchange (CEX) chromatography::</i> PRPX-200 (250 x 4.1mm) Isocratic: 10mM pyridine + HCOOH (pH=4)</p>
Column temperature	Ambient
Sample volume	100 μ L
Flow rate	1mL.min ⁻¹
ICP-MS	
Sampling and skimmer cones	Platinum
Forward power	1500 W
Sampling depth	8mm
Plasma gas flow rate (Ar)	15L.min ⁻¹
Auxiliary gas flow rate (Ar)	0.9 L.min ⁻¹
Carrier gas flow rate (Ar)	0.9 L.min ⁻¹
Optional gas flow rate (O ₂)	5% (relative to carrier gas)
QP Bias	-16.5 V
Octopole Bias	-18 V
Collision gas flow rate	3 mL.min ⁻¹
Isotopes monitored	77, 78*
Dwell time	10ms/pt (total Se); 40 ms/pt (speciation)

*As no interference were observed between m/z 77, 78, results are reported only for m/z 78

Table 3: Conditions of SPE procedures tested

Steps	1. Conditioning	2. Loading	3. Eluting
Procedure 1	1°) MeOH 2°) H ₂ O	Urine/H ₂ O (1 :1 v/v)	MeOH/H ₂ O (1 :3 v/v)
Procedure 2	1°) MeOH 2°) HCOONH ₄ 10 mM (pH=7)	Urine/HCOONH ₄ 20 mM (1 :1 v/v)	
Procedure 3	1°) MeOH 2°) HFBA 20 mM (pH=1,8)	Urine/HFBA 50 mM (1 :1 v/v)	
Volume (mL)	3 + 3	10	6
Fractionation		10x1mL : filtrates	6x1 mL : eluates
Flow (mL.min⁻¹)	1		

Table 4: Total Se recoveries in filtrates and eluates

	Oasis HLB	Sep Pak C18	HyperSep C18
Filtrates, V=10mL			
Procedure 1	74 ± 2%	65 ± 2%	54 ± 2%
Procedure 2	71 ± 2%	56 ± 2%	51 ± 2%
Procedure 3	53 ± 2%	44 ± 2%	44 ± 2%
Eluates, V=6mL			
Procedure 1	12 ± 1%	16 ± 1%	24 ± 1%
Procedure 2	12 ± 1%	15 ± 1%	23 ± 1%
Procedure 3	18 ± 1%	20 ± 1%	25 ± 1%

Table 5: Optimized SPE protocols

Sorbent	Copolymer N-vinylpyrrolidone/divinylbenzene	C18
Commercial name	Oasis HLB (Waters)	HyperSep C18 (Thermo)
Conditioning	3 ml MeOH 3 ml H ₂ O	3 ml MeOH 3 ml HFBA 20mM
Sample loading	10 ml urine (1:1) in water	10 ml urine (1:1) in HFBA 25mM
Elution	None	3 ml MeOH/H ₂ O (1:3)
Effluent collected	Filtrate: 5 - 10 mL of loaded sample	Eluate

Table 6: Recoveries of Se species during SPE treatments calculated from Se total and species quantification

	Synthetic urine		Natural urine	
	HPLC	Total	HPLC	Total
Copolymer recovery				
[Se in filtrate] / [Se in urine during filtration]				
TMSe ⁺	103 ± 6 %	99 ± 5 %	107 ± 8 %	-
SeGal	10 ± 1 %	47 ± 4 %	88 ± 4 %	87 ± 5 %
SeGlu	7 ± 1 %	47 ± 2 %	92 ± 2%	89 ± 5 %
C18 recoveries				
m _{Se} retained / m _{Se} filtered				
TMSe ⁺	99 ± 2 %	100 ± 3 %	68 ± 1 %	75 ± 4 %
SeGal	38 ± 5 %	45 ± 4 %	26 ± 3 %	25 ± 4 %
SeGlu	41 ± 3 %	44 ± 2 %	25 ± 4 %	29 ± 8 %
m _{Se} eluted / m _{Se} retained				
TMSe ⁺	67 ± 1 %	64 ± 1 %	91 ± 2%	92 ± 4 %
SeGal	88 ± 5 %	76 ± 7 %	92 ± 3 %	85 ± 8 %
SeGlu	75 ± 4 %	69 ± 3 %	91 ± 5 %	89 ± 7 %
m _{Se} eluted / m _{Se} filtered				
TMSe ⁺	66 ± 2 %	64 ± 3 %	62 ± 2 %	69 ± 4 %
SeGal	33 ± 5 %	34 ± 7 %	24 ± 3 %	21 ± 4 %
SeGlu	31 ± 4 %	30 ± 3 %	23 ± 4 %	26 ± 8 %

Table 7: SPE sensitivity improvements and ensuing detection limit (ng(Se).L⁻¹)

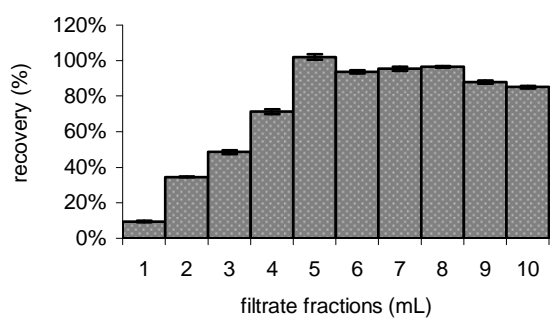
	Sensitivity improvement	LD (reversed phase) (ng(Se).L ⁻¹)	LD (PGC) (ng(Se).L ⁻¹)	LD (cation exchange) (ng(Se).L ⁻¹)
Without sample pretreatment				
TMSe ⁺	-	21	-	81
SeGal	-	38	204	-
SeGlu	-	26	182	-
Copolymer SPE				
TMSe ⁺	4.9 ± 0.2	4	-	17
SeGal	4.4 ± 0.2	9	46	-
SeGlu	4.5 ± 0.4	6	41	-
C18 SPE				
TMSe ⁺	11.2 ± 0.8	2	-	7
SeGal	4.1 ± 0.1	9	50	-
SeGlu	4.2 ± 0.2	6	43	-

Table 8: SeGal and TMSe⁺ quantification in urine samples by SPE-HPLC-ICPMS(in µg(Se).L⁻¹)

Samples	A	B	C	D	E
[SeGal] in urine	14.5 ± 0.5	8.6 ± 0.5	4.4 ± 0.2	5.5 ± 0.2	2.5 ± 0.1
[SeGal]/[Se] _{tot} (%)	38 ± 1 %	54 ± 3 %	12.5 ± 0.4 %	12.6 ± 0.5 %	4.2 ± 0.2 %
[TMSe ⁺] in urine	0.30 ± 0.03	0.68 ± 0.04	2.3 ± 0.1	2.3 ± 0.1	4.7 ± 0.3
[TMSe ⁺]/[Se] _{tot} (%)	0.9 ± 0.1 %	4.2 ± 0.3 %	6.5 ± 0.4 %	5.2 ± 0.3 %	8.0 ± 0.5 %

Figure 1: Total Se breakthrough during SPE treatments: (a) Se recoveries in filtrate fractions during SPE sample loading step (copolymer sorbent) and (b) Se concentrations in eluate fractions during SPE elution step (C18 sorbent)

(a)



(b)

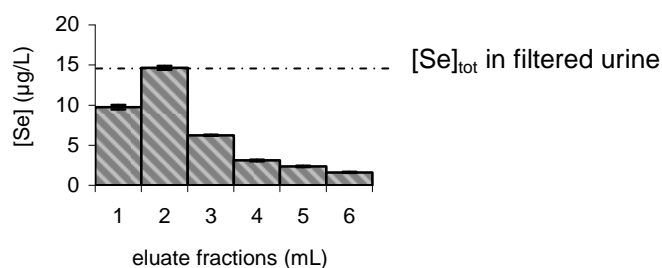
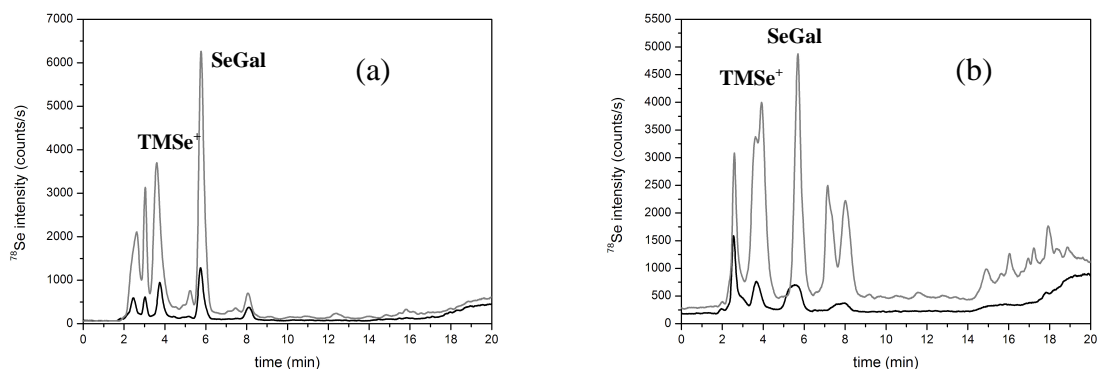


Figure 2: Example HPLC (C18)-ICPMS chromatograms of untreated and treated urine sample: (a) copolymer SPE filtrate (grey line) compared to urine (diluted 1:9 in water) (black line) ; (b) C18 SPE eluate (grey line) compared to urine diluted 10 fold in 25%MeOH (black line).



II.C. IDENTIFICATION D'UN NOUVEAU METABOLITE SELENIE DANS L'URINE ET LE SANG HUMAINS

Les travaux précédents ont montré l'intérêt de l'utilisation d'un protocole de préparation d'échantillon pour l'amélioration de la sensibilité analytique. Cette augmentation a ainsi permis la détection de nouvelles espèces sélénées. Dans cette partie de la thèse, l'objectif est d'aboutir à l'identification des composés inconnus mis en évidence après traitement de l'échantillon.

Les composés sont d'autant plus facilement détectables par spectrométrie de masse moléculaire que l'échantillon est correctement purifié et que la concentration des analytes est suffisante. Après une première étape de préconcentration des analytes, et de purification de la matrice par SPE, une étape supplémentaire de préconcentration par lyophilisation suivie d'une première analyse par HPLC-ICPMS avec le mécanisme de séparation sur phase inverse précédemment optimisé (cf. II.A.) a été utilisé pour la collecte de fractions contenant les composés d'intérêt. Suite à l'analyse en sélénium total des fractions, deux fractions ont été sélectionnées. Ces fractions n'étant pas suffisamment purifiées et concentrées pour permettre une analyse directe en spectrométrie de masse structurale, une seconde étape de préconcentration par lyophilisation suivie d'une analyse par HPLC-ICPMS ont été réalisées. Pour cela, un second mécanisme de séparation basé sur les interactions hydrophiles (HILIC), récemment développé au laboratoire [291], a été utilisé. Il présente l'avantage de retenir les composés polaires et d'utiliser une phase mobile compatible avec la spectrométrie de masse structurale. Le couplage de la chromatographie HILIC à l'ICPMS, a permis de séparer deux composés présents dans une fraction. L'application du même mécanisme de séparation à la spectrométrie de masse structurale (ESI-LTQ Orbitrap MS) a ensuite conduit, connaissant les temps de rétention des composés, à obtenir la structure des espèces précédemment détectées. L'identification d'un nouveau métabolite sélénié, Se-méthylsélénonéine, a ainsi été obtenue. Cette démarche a également permis l'identification du sélénosucre SeGal dans l'urine de personnes non supplémentées avec, pour la première fois, une masse exacte pour les ions précurseurs et les ions fragments.

Afin d'éliminer l'hypothèse d'un artefact causé par la préparation de l'échantillon, la connaissance du spectre de masse de la Se-méthylsélénonéine a ensuite permis de rechercher ce composé directement, *i.e.* sans étape de préconcentration, dans l'urine de sujets non supplémentés. Le couplage HPLC-ESIMS³ en mode haute résolution (résolution 30 000 à m/z 400) avec une large fenêtre de sélection des ions précurseurs, a permis de détecter la masse

spécifique des isotopes du sélénium et de conserver le profil isotopique du sélénium dans les ions fragments produits en mode MSⁿ.

Cette méthode a été étendue au suivi direct des deux formes séléniées et de leurs analogues soufrés dans l'urine et le sang humains. La sélénonéine et son analogue soufré, l'ergothionéine, ayant tendance à s'oxyder, une étape de dérivation des groupements thiols et séléniols avec l'iodoacétamide a été mise œuvre. La technique développée a ainsi permis d'observer les quatre formes dans des proportions différentes dans le sang et l'urine.

Pour la forme soufrée, le rapport entre forme méthylée et non méthylée est de 1 pour 5 dans le sang et de 5 pour 1 dans l'urine, pouvant indiquer une excrétion préférentielle des formes méthylées dans l'urine. En ce qui concerne l'analogue sélénié, seule la forme méthylée a été détectée dans l'urine, tandis que les deux formes, sont présentes dans le sang avec un rapport de 1 pour 3. L'analogue sélénié semble donc être plus facilement méthylé.

Ces travaux ont conduit à la rédaction d'un article "*Identification in human urine and blood of a novel selenium metabolite, Se-methylselenoneine, a potential biomarker of metabolism in mammals of the naturally occurring selenoneine, by HPLC coupled to electrospray hybrid linear ion trap-orbital ion trap MS*" paru dans le journal Metallomics.

Cite this: *Metallomics*, 2011, **3**, 513–520

www.rsc.org/metallomics

PAPER

Identification in human urine and blood of a novel selenium metabolite, Se-methylselenoneine, a potential biomarker of metabolism in mammals of the naturally occurring selenoneine, by HPLC coupled to electrospray hybrid linear ion trap-orbital ion trap MS

Marlène Klein, Laurent Ouerdane, Maïté Bueno and Florence Pannier*

Received 14th October 2010, Accepted 20th January 2011

DOI: 10.1039/c0mt00060d

Speciation analysis of selenium in human urine allowed for the first time the identification of a novel selenium metabolite, Se-methylselenoneine. Despite a concentration at low ppb level, its characterization was achieved after sample purification by solid phase extraction (SPE) followed by the parallel coupling of the bidimensional RP/HILIC chromatography with ICP-MS and ESI-LTQ Orbitrap MS detection. To confirm its biological significance with regards to selenoneine, the recently discovered analog of ergothioneine, and to discard the possibility of sample preparation artifacts, a new method was developed to monitor its actual presence, as well as the occurrence of its sulfur and/or non-methylated analogs, in non-preconcentrated urine and blood samples of non-supplemented humans. It consisted in a HILIC ESI-MS³ method in high resolution mode (resolution 30 000 at m/z 400) with large isolation width windows for precursor ions. These two particular settings allowed respectively to keep observing the specific mass defect of selenium- and sulfur-containing molecules and to maintain the characteristic selenium pattern in product ions created through MS^{*n*} fragmentations. As a result, all four metabolites were detected in blood and three of them in urine. Moreover, different ratios “methylated/non-methylated” were observed between urine and blood samples, which seemed to indicate their active metabolism. The analytical tool developed here will be of a great importance to further study the occurrence and the potential metabolic role in mammalian organelles, cells and fluids of these very particular and promising redox metabolites.

Introduction

Selenium is an essential trace element for which the margin between safe and toxic levels is narrow. Selenium is incorporated in antioxidant selenoenzymes such as glutathione peroxidase or thioredoxin reductase. Selenium also plays a role in reducing toxic effects of heavy metals such as arsenic and mercury.^{1–4} The anticarcinogenic effects of Se have also been an increasing subject of research these last years.^{5–7} As the bioavailability, toxicity and chemopreventive effects of Se are species-dependant, the study of selenium metabolism in human has therefore attracted considerable interest. After absorption by the body, selenium is mainly excreted through urine and the study of the metabolites present in this matrix has provided valuable information to elucidate possible metabolic pathways.^{9,10}

Regarding selenium speciation in urine, many studies have been published and various selenocompounds were claimed to

be present in urine. A review by Francesconi and Pannier¹¹ critically detailed all Se-species detected and identified in it.

In 2002, Suzuki and co-workers identified the major selenium species in rat urine as a novel sugar derivative, namely methyl 2-acetamido-2-deoxy-1-seleno- β -D-galactopyranoside.⁸ Further studies showed that this selenosugar is also the dominant species in human urine and allow to identify related compounds (2 others selenosugars) as minor urine metabolites.^{9,12–14} Other selenium species considered to be present in urine are TMS⁺, selenomethionine (SeMet) after supplementation with SeMet.^{15,16} Nevertheless, a lot of Se compounds present in urine still remain unknown. It is worth noticing that the majority of the studies are conducted in samples from rats receiving high doses of different Se species or human subject with elevated Se intake through supplementation.

In a normal subject, *i.e.* a non supplemented subject, mean urinary selenium concentrations usually vary between 20 and 60 $\mu\text{g Se L}^{-1}$. These low levels, combined with the complexity of the urine matrix, hampered the detection of some species which are below the detection limits of the analytical method.

Laboratoire de Chimie Analytique Bio Inorganique et Environnement, IPREM, Université de Pau et des Pays de l'Adour | CNRS UMR 5254, Hélioparc, Avenue du Pr. Angot, 64000 Pau, France.
E-mail: florence.pannier@univ-pau.fr

Highly sensitive analytical methods are required to achieve speciation of selenium at trace levels in such a complex matrix. Among these techniques, the coupling of high performance liquid chromatography (HPLC) with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) is widely applied.¹⁷ From a chromatographic point of view, the high salt content of the sample can drastically affect the resolution between species of interest. A tenfold sample dilution is usually performed to reduce the complexity of matrix prior to injection into HPLC ICP-MS, but it is then necessary to achieve good sensibility of the analytical method as Se level is also drastically reduced. Pretreatment of the sample can also be carried out. The use of liquid-liquid extraction with crown ether^{18,19} or incubation with urease followed by cold methanol precipitation^{8,20,21} have been reported for de-salting and deproteinization of the sample. However the application of these aggressive protocols may lead to the oxidation of selenosugars²² or the loss of inorganic selenium species.¹⁹ The use of solid phase extraction has also been reported by some authors. The protocols can be applied to clean the sample by removing a part of organic matrix urine^{23,24} and/or to preconcentrate the Se species by retaining them on selected sorbents before further elution.^{14,25} This protocol allowed Gammelgaard and co-workers to identify SeGal in basal human urine. Additional steps of preconcentration by freeze-drying^{9,12,19} or evaporation^{9,14,15,25} may also be implemented.

Besides the problems encountered with low selenium level and matrix complexity, the process of selenium species identification is also hampered by the lack of readily available authentic standards. During the last decades the use of molecular spectrometry has become more popular and, from this perspective, electrospray ionization is an effective "soft" ionization approach which has been widely used provided that the sample is perfectly purified as high salt content suppresses analyte ionization and reduces the already low signal intensity even further.

It is now well admitted that without mass spectral structure confirmation, only partial identification of the compounds present in biological samples can be accomplished and it is essential to obtain positive identification of the organic part of the molecule to unequivocally confirm the structure of a given selenium-containing metabolite.

The purpose of this work was to identify a new selenium metabolite detected in urine after an alternative sample preparation based on solid phase extraction (SPE). The protocol has been optimized to allow sample purification and/or species preconcentration (M. Klein *et al.*, unpublished work).²⁶ After preparation, urine samples can be analyzed without any further dilution by HPLC ICP-MS. Two complementary chromatographic modes, reversed phase and hydrophilic interaction chromatography (HILIC), were used to purify compounds of interest and to detect selenium containing peaks before structural identification by electrospray hybrid linear ion trap/Orbitrap MS. Later on, a method was also set to monitor the occurrence of identified species, *i.e.*, selenized and/or methylated analogs of ergothioneine, in raw urine and blood samples and the metabolic potential role of these naturally occurring molecules is discussed.

Experimental

Reagents

Ultra pure water was obtained from Milli-Q system (Millipore Co., Bedford, MA, USA). All reagents were of analytical grade and were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), if not specified. Formic acid, ammonium formate, methanol (J. T. Baker, Deventer, The Netherlands) and acetonitrile were used for mobile phase preparation. The pH of mobile phases was adjusted by drop wise addition of formic acid solution. Dithiothreitol, iodoacetamide, Tris and HCl were used for the sample derivatization procedure.

SeGalNAc (methyl 2-acetamido-2-deoxy-1-seleno- β -D-galactopyranoside) was kindly provided by Dr Yasumitsu Ogra (Showa Pharmaceutical University, Japan). Following the procedure employed by Traar *et al.*,²⁷ SeGluNAc (methyl 2-acetamido-2-deoxy-1-seleno- β -D-glucopyranoside) was synthesized in our institute. Stock standard solutions of 1000 mg Se L⁻¹ were prepared in water and stored in the dark at 4 °C. Working standard solutions were prepared daily by diluting the respective stock solutions in ultrapure water.

Sample preparation and Se total content determination

Urine samples were first collected from a non-supplemented male volunteer in polytetrafluoroethylene (PTFE) bottle. Samples were immediately filtered through a 0.45 μ m filter (Whatman, Dassel, Germany) after collection. The extraction procedure was performed within the day of collection on an Oasis HLB cartridge (6 mL/500 mg) from Waters (Milford, MA, USA). During loading and elution the flow rate was 1 mL min⁻¹, controlled by a 12-port vacuum manifold (Interchim, Montluçon, France). Whole blood samples were collected from a non-supplemented male volunteer in heparinized tubes and then kept in the freezer at -20 °C. Before being prepared for analysis, they were submitted to a quick freeze/thaw cycle to provoke cell lysis that permitted analysis of metabolites in the whole blood fraction. Urine samples of three other individuals were later analyzed to confirm the presence of the newly discovered compounds.

Derivatized urine and derivatized blood samples were prepared by incubating 300 μ l of sample with 10 μ l of a dithiothreitol (DTT) solution (0.45 M in 50 mM Tris-HCl at pH 7.5) and 27.5 μ l of an iodoacetamide (IAM) solution (0.5 M in 50 mM Tris-HCl at pH 7.5) for 55 min. Then, remaining IAM was destroyed by the addition of 55 μ l of the DTT solution with an incubation time of 30 min. Derivatization is made prior to further sample treatment to ensure that thiol- or selenol-containing compounds are no longer bound to high molecular weight structures, like proteins.

Only untreated urine samples were later purified by SPE following the protocol describe below. Once species of interest were identified, all fresh urine and unfrozen blood samples (derivatized or not) were analyzed directly by HILIC MS coupling. Prior to their injection on HILIC column, these samples were diluted 3 times with acetonitrile and centrifuged (at 10 000g). The obtained supernatants were then filtered with a 10 kDa cut-off filter tube centrifuged at 5000g. By this protocol, proteins, cell debris and most of salts were removed

from sample to allow direct analysis by HPLC. 3 μL of this preparation were immediately injected on a HILIC column for ESI-MS experiments. For HILIC ICP-MS analysis, centrifuged samples were pre-concentrated 10 times prior to injection by evaporation under nitrogen flow.

Total selenium in urine was determined by standard additions after a tenfold sample dilution and acidification with 2% HNO_3 (Ultrex, J.T. Baker). The total selenium contents were within the typical range of concentration for non-supplemented European population.²⁸

Material and methods

The HPLC system consisted of an Agilent 1100 series HPLC pump (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipped with an autosampler and a variable volume sample loop. Injection volume was fixed at 100 μL .

For conventional HPLC ICP-MS analyses, reversed phase chromatography was performed on Atlantis dC18 column (150×4.6 mm, 5 μm , Waters, Milford, MA, USA) with a guard column and a mobile phase of 20 mM ammonium formate containing 3% methanol at pH 3.0 adjusted with formic acid. The mobile phase flow rate was 1 mL min^{-1} and a methanol gradient program was applied: 0–9 min 3% MeOH, 9–14 min up to 40% MeOH, 14–24 min 40% MeOH, 24–25 min down to 3% MeOH, 25–45 min 3% MeOH.

For the narrow bore chromatographic separation coupled either to ICP-MS or to ESI-MS, an HILIC column TSK gel amide 80 column (250×1 mm, 5 μm , Tosoh Biosciences, Stuttgart, Germany) was used. Gradient elution ($50 \mu\text{L min}^{-1}$) was carried out using eluent A: acetonitrile and eluent B: 10 mM ammonium formate (pH 5). The gradient program was: 0–5 min 10% B, 5–20 min up to 50% B, 20–25 min 50% B, 25–27 min up to 65% B, 27–30 min 65% B, 30–35 min down to 10% B, 35–40 min 10% B. Samples were redissolved or diluted with acetonitrile and water to obtain a ratio water:acetonitrile (1:2). 3 μL were injected on the HILIC column each time.

The chromatographic system was coupled directly from the column to the nebulizer of ICP-MS. The ICP-MS instrument used was the 7500cs from Agilent Technologies (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), equipped with an octopole collision/reaction cell. H_2 of 99.995% purity (Linde, St Priest, France) was used as the cell gas in the octopole cell (3 mL min^{-1}). For conventional HPLC, the sample introduction system is constituted of a concentric nebulizer (Meinhard Associates, California, USA) and a Scott double spray chamber cooled to 2 $^\circ\text{C}$. The UV and conductivity monitoring after sample preparation was performed with the same reversed phase column installed on an AKTA purifier system (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK). For HILIC ICP-MS, the interface was an Isomist interface (Glass Expansion, Melbourne, Vic, Australia) consisting of a 20 mL model Cinnabar spray chamber cooled at 2 $^\circ\text{C}$ and fitted with a $50 \mu\text{L min}^{-1}$ Micromist nebulizer. For both chromatographic couplings, the detection of selenium containing peaks was realized by monitoring ^{77}Se , ^{78}Se and ^{80}Se isotopes with ICP-MS.

The HILIC column was also connected to an electrospray hybrid linear ion trap-orbital ion trap mass analyzer

(Thermo H-ESI II LTQ Orbitrap Velos, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) used in either full-scan mode or in product ion (MS^n) mode. The ion source was operated in the positive ion mode at 3.5 kV and heated at 80 $^\circ\text{C}$. The capillary temperature was set to 280 $^\circ\text{C}$.

For the HILIC ESI-MS experiments, the resolving power of the Orbitrap (full width half-height, FWHM) was set to 100 000 (at $m/z = 400$) in full scan mode and 30 000 in MS^n mode. Selenocompounds were searched in full scan mass spectra at retention times determined during HPLC ICP-MS coupling and the presence of Se in the compound is confirmed by checking the interisotopic mass difference that are particular for Se (*e.g.*, a mass difference of 1.9992 amu between ^{80}Se and ^{78}Se isotopes, an error of ± 0.0007 amu being acceptable). For the MS^3 experiments, the precursor ions were collected with isolation widths of 15 amu for selenocompounds and 2 amu for thio compounds. Then, the product ions were generated first in the LTQ trap at a collision energy setting of 35% for MS^2 and later by HCD at 55% energy (unless specified otherwise) for MS^3 . Depending of screened ions (full scan $\text{MS} + \text{MS}^3$ of 1 to 4 precursor ions), cycle times were of 4 to 5 s maximum, which was compatible with chromatographic time scales. The identities of the neutral losses observed during fragmentation of the ions of interest were each time confirmed by exact mass matching with the closest theoretical mass values of hypothetical formulas by checking all possible combinations with elements commonly found in biological matrices (C, H, N, O, P, S, Se, Na and K) using Xcalibur 2.1 software (Thermo Fisher Scientific).

Results and discussion

SPE purification and reversed phase chromatography methods for the pre-concentration of selenium species present in urine

In order to overcome the classical tenfold dilution, we choose to apply a solid phase extraction procedure. After previous optimization (M. Klein *et al.*, unpublished work),²⁶ SPE was performed on the Oasis HLB cartridge previously conditioned with 3 mL of methanol, followed by 3 mL of ultra pure water. 10 mL of urine diluted (1:1) in ultra pure water was injected through the cartridge (pH 5.3). As repeatability of SPE purification had already been verified, this treatment was repeated on 4 cartridges to increase treated sample volume. The effluent was collected during sample loading between the fifth and the tenth mL. This filtrated sample will be further designed as sample F. After loading, the selenium retained on the sorbent was eluted with 25% methanol. The first 3 mL of eluted sample (sample E) were then collected.

Samples F and E were first analyzed by conventional HPLC ICP-MS (Fig. 1). The same species could be observed for these two samples because of the relative hydrophilicity of the searched compounds, which prevents good separation between salts and selenocompounds. Apolar compounds (eluting after 10 min in HPLC) are also present in fraction F because of saturation of cartridge that allow a part of each compound to elute without being retained. However, from the UV and conductivity measurement (data not shown), it was decided to only focus the analysis on sample E in order to limit the

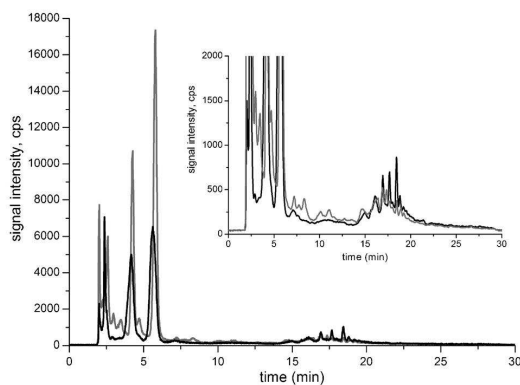


Fig. 1 Chromatograms of sample F (gray trace) and E (black trace) obtained by reversed phase HPLC ICP-MS (^{78}Se) coupling. The inset represents a zoom on the weakly intense chromatographic peaks.

salts and other concentrated polar compounds content in the sample for ESI-MS analysis.

To further preconcentrate the sample before chromatography, the sample E was freeze-dried and reconstituted in 100 μL of ultrapure water. All this concentrated sample was then injected into the C18 column and 1 mL fractions were collected from 2 min to 23 min. Total selenium was measured in each collected fraction to draw the Se profile and select fractions of interest as shown in Fig. 2.

A particular interest was given to the fractions 4 and 5, the most concentrated fractions that are not corresponding to compounds eluting in the void (fraction 1) or numerous well retained compounds (fractions 11 to 20), possibly proteolytic selenopeptides, selenoproteins being the main pool of selenium in human. Fractions 3 and 6 were observed by HILIC ICP-MS (data not shown) to contain similar selenospecies compared to fractions 4 and 5 and so were not further purified. For further analysis, they were freeze dried and redissolved in 50 μL of water : acetonitrile mixture (1 : 2).

Identification of selenocompounds present in urine by coupling in parallel HILIC chromatography to ICP-MS and high resolution ESI-MS instruments

Taking into account the low concentrations of the selenium species in urine, even after the first step of preconcentration, it was found necessary to employ a second chromatographic dimension to achieve identification of potentially unknown species. The strategy developed here implies the parallel use of ICP-MS and high resolution ESI-MS, both specific and

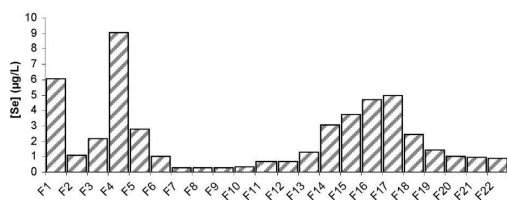


Fig. 2 Total Se concentration of fractions (1 mL) collected after RP chromatography of preconcentrated sample E.

sensitive instrumentations, to greatly improve the discovery rate of new selenium species. Indeed, the HPLC ICP-MS coupling allows to detect the Se containing peaks on the basis of Se isotopes monitoring and the coupling of the same chromatographic settings (leading to matching retention times) to molecular mass spectrometry instrument provides structural information on the compounds previously detected. This was done, first, in the full scan spectra on the basis of the characteristic selenium isotopic pattern and, later, by further multistage fragmentations of the compounds. Being an orthogonal technique compared to reversed phase for compounds separation, the hydrophilic interaction liquid chromatography allows the separation of polar compounds and this chromatographic mode has the interesting advantage of being performed with mobile phases which are compatible with electrospray ionization. A parallel coupling of HILIC chromatography with either elemental mass spectrometry or molecular mass spectrometry has already been developed in our laboratory for the identification of unknown metals²⁹ or metalloids³⁰ containing species in various samples. It was similarly applied here to characterize the selenocompounds present in urine. Even if the 2D RP/HILIC ESI-high resolution MS coupling is found here to be slightly superior in term of chromatographic resolution and reproducibility, bidimensional chromatography associating size exclusion and cation exchange separation could have been also an interesting alternative strategy if the matrix would have been more concentrated in low molecular weight metabolites, as it was demonstrated recently for the identification and screening of 27 different selenocompounds in yeast extracts.³¹

For fraction 4, a major peak (at 10.5 min) and a minor one (at 21 min) could be observed on HILIC ICP-MS chromatogram, as shown in Fig. 3A. Electrospray MS at the retention time of first peak revealed one ion with the isotopic pattern of selenium at m/z 300.034 (m/z corresponding to the most abundant mass of the isotopic distribution). The corresponding chromatograms, the characteristic pattern of Se as well as the MS^3 fragment ions of this species are presented in Fig. 3B–D. This compound is identified as methyl 2-acetamido-2-deoxy-1-seleno- β -D-galactopyranoside (SeGalNAc), as the two diastereoisomers (SeGalNAc and SeGluNAc) were differentiated by their retention time on HPLC ICP-MS chromatogram.

SeGalNAc has already been observed in several studies. Nevertheless the authors want to emphasize that this compound is for the first time observed with an exact mass matching for precursor and product ions in non-supplemented volunteers, whereas, usually, chromatographic ICP-MS signal matching with standard retention time¹³ or MRM (or MS^n) signals with low resolution quadrupole MS^{14,32} are used. The presence of SeGalNAc could therefore be definitively confirmed as one of the main selenocompounds in urine of non supplemented subjects.

For the fraction 5, results are presented in Fig. 4A–D and only the second peak eluting at 21 min could be observed by HILIC ICP-MS. The MS chromatogram revealed for this retention time only one compound at m/z 292.056 with the characteristic isotopic distribution of Se-containing molecules. This mass to charge ratio did not correspond to any selenium compound already identified. Although this compound had

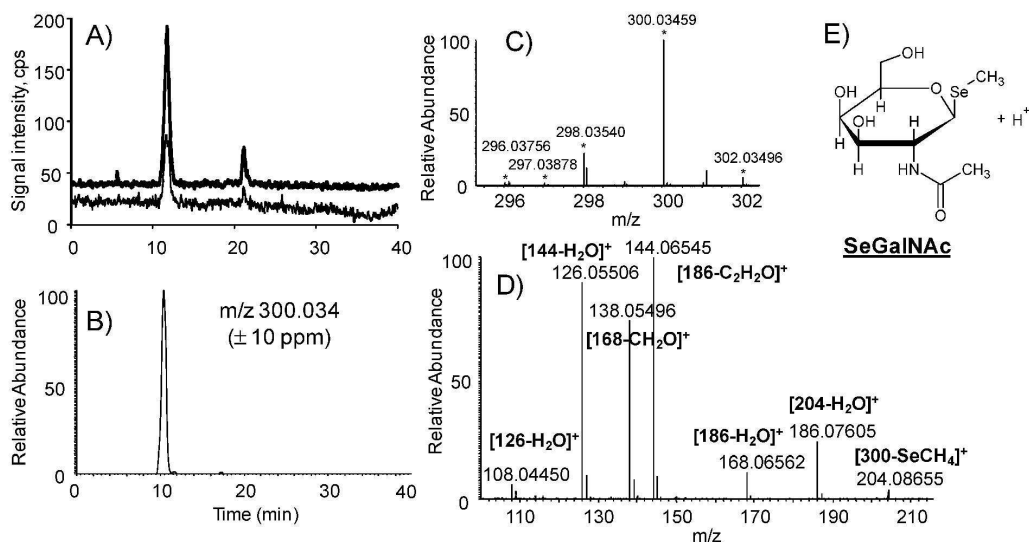


Fig. 3 HILIC chromatograms of fraction 4 obtained by (A) ICP-MS detection of ^{80}Se (bold line, offset) and ^{78}Se (thin line) and (B) ESI-LTQ Orbitrap MS detection (trace of m/z 300.034). (C) A zoom of the mass spectra obtained at 10.5 min demonstrate the presence of a selenocompound with its specific isotopic pattern (each of the five main Se isotopes are marked with an asterisk and their m/z are given). (D) MS^3 spectra of m/z 300.034. In this particular case, MS^3 spectra were obtained at 35% energy in HCD mode. (E) Structural identification of the major selenocompound present in fraction 4.

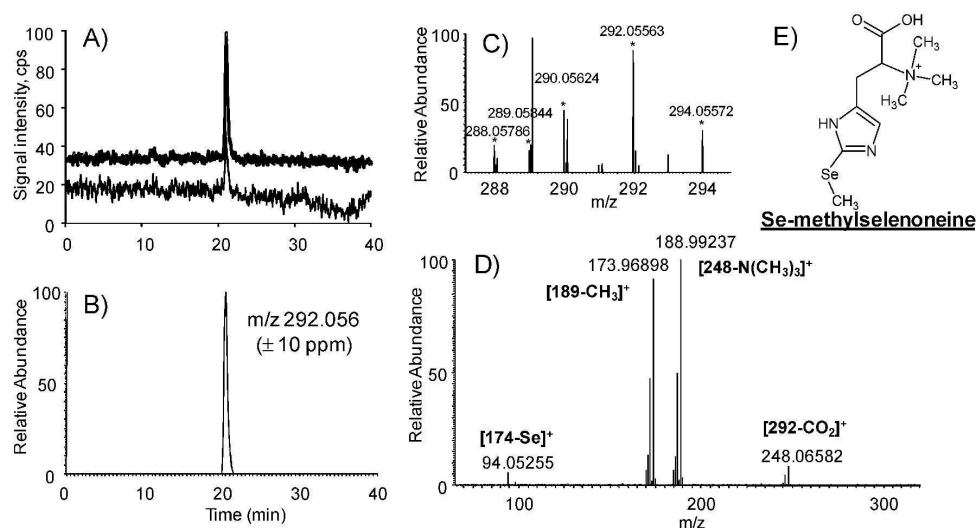


Fig. 4 HILIC chromatograms of fraction 5 (*idem* as Fig. 3 but with m/z 292.056, a retention time of 21 min and MS^3 obtained 55% energy in HCD mode).

not been identified before, the MS/MS showed some fragments which correspond to the loss of characteristic and known residues previously observed in other molecules, such as the quaternary amine function ($\text{C}_3\text{H}_9\text{N}$, with a neutral mass loss of 59.073 amu during fragmentation). The detected and identified fragments ions are presented in Fig. 4D. Based on this fragmentation, it was therefore possible to assign a structure to the compound and to identify it as the Se-methylated form of

selenoneine ($\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2\text{Se}$ in its globally neutral zwitterionic form). The non methylated form of this compound, namely selenoneine, has just been recently reported in fish blood and tissues by Yamashita and Yamashita³³ and more recently in sea turtles by Anan *et al.*³⁴ The MS/MS spectra of its moneric form³⁴ was consistent to the fragment ions observed for the methylated form discovered in this work. It consists in the loss of the carboxylic acid group followed by the loss of the quaternary

amine group and finally the fragmentation of the bounds surrounding the atom of selenium, leaving untouched the histidnyl group as well as the ethyl part attached to it that is remaining after betaine fragmentation. Finally, the methylation of selenoneine observed in our compound is clearly occurring on selenol group as the loss of Se could only occur after the loss of the methyl group.

Development of HILIC ESI-MS³ method for the monitoring of Se-methylselenoneine and three of its analogs in non-preconcentrated urine and blood samples of non-supplemented individuals

In order to confirm that this new selenium compound is originally present in human body fluids of non supplemented volunteers and that it is not an artifact due to sample preparation, urine and blood samples were analyzed without preconcentration step. A second set of samples were also prepared by derivatizing all thiol and selenol groups with iodoacetamide (see protocol above) before addition of acetonitrile,

centrifugation and filtration, which made possible the screening of the total content of ergothioneine as well as its selenized and/or methylated analogs in a single chromatographic run. Derivatized selenoneine, Se-methylselenoneine and their sulfur analogs were all identified in derivatized blood according to their predicted precursor masses and product ions as shown in Fig. 5A. To demonstrate the specificity (*i.e.*, the absence of background noise) of the MS³ screening in high resolution mode of ergothioneine analogs, the chromatographic traces obtained after the analysis of derivatized blood are presented, as an illustration, in Fig. 5B. Similar specific traces were obtained for the three other types of samples (data not shown). In all samples (urine and blood, derivatized or not), Se-methylselenoneine and its sulfur analog were observed. In derivatized samples, carboxamidomethylated selenoneine and its sulfur analog were present in blood but only the sulfur-containing compound was detected in urine.

Selenoneine is the selenium analog of ergothioneine, first identified in rye ergot by Tanret in 1909.³⁵ Regarded as a betaine, ergothioneine is an unusual amino acid recognized as

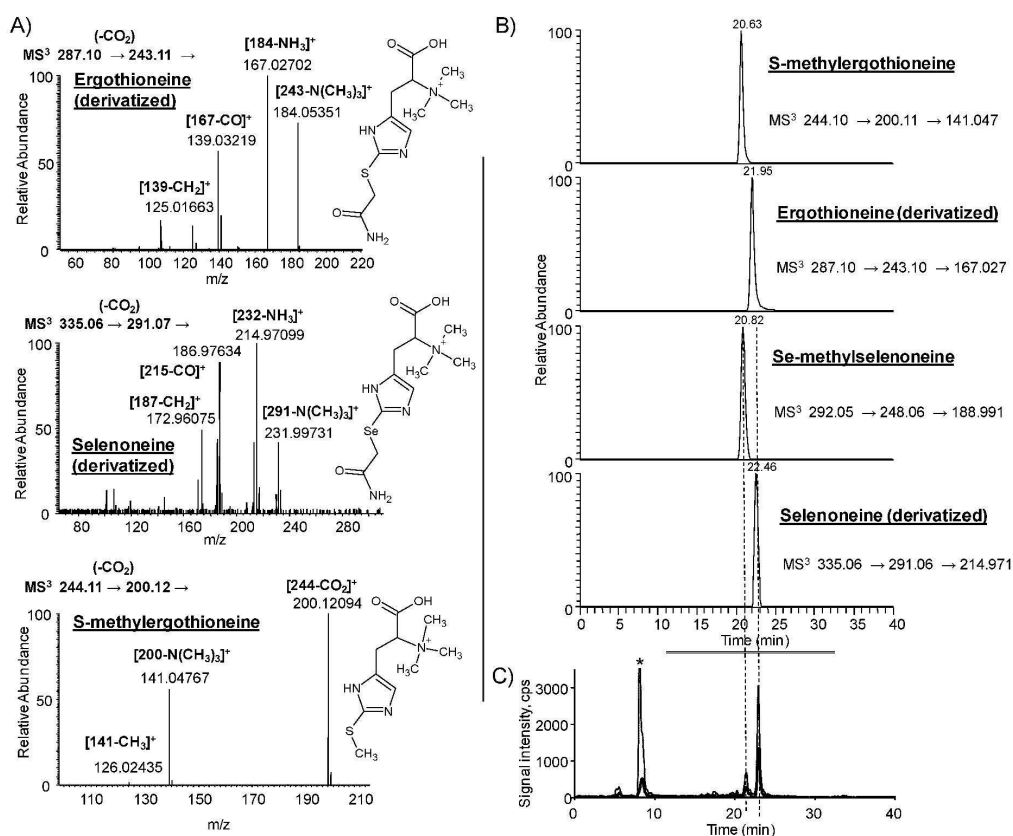


Fig. 5 Screening in derivatized blood of ergothioneine and its analogs. (A) Their MS³ spectra as well as (B) their specific chromatographic traces (expected *m/z* values \pm 5 ppm) and retention times are monitored for each of the four compounds analyzed by HILIC ESI-MS coupling. (C) By HILIC ICP-MS coupling, ⁸⁰Se (dotted line) and ⁷⁸Se (solid line) chromatograms of derivatized blood preconcentrated 10 times are also obtained, which gives quantitative information on the relative concentration of selenoneine and Se-methylselenoneine in blood (a peak due to interference on ⁸⁰Se trace cause by bromine (⁷⁹BrH⁺) at 9 min is marked with an asterisk).

the only naturally occurring thio-imidazole amino acid. It was demonstrated to play an important biological role as an antioxidant.^{36–38} Since then, ergothioneine has received research and commercial interest as a strong antioxidant with therapeutic value. Although it has never been evidenced in urine, Melville *et al.*³⁹ could evidence that the liver and kidney had the highest concentrations of ergothioneine among other organs. The selenium analog of ergothioneine found in marine organisms seems also to exhibit antioxidant effects and studies are on-going in this field.⁴⁰

In the urine sample, the Se-methylated form of selenoneine was present as well as its sulfur analog. To our knowledge the S-methylated form of ergothioneine was known only as a synthetic compound and not a natural product until it has once been reported in deepwater sponge extract in 2004.⁴¹ For these authors as the ergothioneine can be only biosynthesized in some fungi and mycobacteria, it was probably assimilated by the sponge through dietary intake or it is present in the microbial symbionts of the sponge. As regards with the presence of the Se-methylselenoneine in the urine sample, no explanation about its origin can be given yet but as selenoneine appears to be a major selenium compound in tissues of some fishes, it can be postulated that its origin is probably from the diet of the volunteers and that it was later on partially methylated, most likely by methyltransferase enzymes present in liver or kidney.^{10,42} The absolute ion intensities of the selenium compounds in HILIC ICP-MS presented in Fig. 5C seem to indicate that the proportions between the methylated and non-methylated forms are around 1-to-4 in blood whereas non-methylated form is not present in urine, which could indicate that methylated forms are excreted preferentially in urine. Close to the one obtained with ICP-MS, a 1-to-3 ratio between the MS³ main product ions intensities of the two selenium species is observed with Orbitrap instrument indicating that data obtained with this molecular instrument can allow to achieve an approximate comparison for the concentration of these two forms. Very interestingly, according to HPLC ICP MS chromatogram of derivatized blood presented in Fig. 5C, it seems that selenoneine and its methylated form constitute the main pool of non-proteic selenium in human blood. The absolute ion intensities of the sulfur compounds in full scan mode seem to indicate that in urine, the proportion of the methylated form compared to the non-methylated one would be more important than in blood. However, as no ICP-MS data (intensity below detection limit for sulfur) is available to support this information about sulfur species, this result has to be considered with care. Nonetheless, this result for sulfur species would be consistent with what is observed for selenium species, that is to say that methylated forms are the main forms in urine and that the non-methylated forms are the main one in blood. According to ICP-MS signals, concentrations of selenoneine and Se-methylselenoneine should be in the range of sub-ppb to low ppb levels but a higher concentration was observed in blood than in urine. In parallel the application of this HILIC ESI-MS³ method could help elucidating the huge accumulation of selenoneine in the blood samples of some fishes that are more concentrated by at least 4 orders of magnitude compared to human blood,⁴³ whereas, very

interestingly, ergothioneine, its sulfur analog, has never been observed in tuna.³³

Very recently, ergothioneine was demonstrated to be an important physiological cytoprotectant, especially to protect mitochondria from oxidative damage,⁴⁴ and therefore it was proposed as a new vitamin by the authors of this study. Ergothioneine and its S-methylated form show similar redox properties⁴⁵ and seleno analogs of sulfur-containing redox compounds are usually observed to have an increased capacity to prevent oxidative damage. Moreover, it was recently demonstrated that selenoneine has a much higher radical scavenging activity than ergothioneine.³³ Also, like selenoneine, Se-methylselenoneine could be a very valuable compound to evaluate for Se supplementation as it is not prone to provoke S-adenosyl methionine (SAM) degradation through S-methyltransferase activity, contrary to selenoneine. Therefore, it would be of a huge interest in the future to determine the role and the cytoprotectant abilities of ergothioneine selenized analogs (methylated and non-methylated) in animals and humans.

Conclusion

The analytical method presented here for the screening of four compounds of the ergothioneine family will be of a great help to quantify and to further study the potential role of these species in mammalian cells and fluids. Up to now, the supplementation with Se-analogs of ergothioneine has never been tested voluntarily with synthesized standards or involuntarily through supplementation with Se-enriched yeast as the organism used for this purpose, *Saccharomyces cerevisiae*, is unable to synthesize ergothioneine. To better understand the potential role of these metabolites, toxicological studies should be performed, which implies also that their quantification would be necessary. After preparation of standards, it could be easily and quickly performed by MRM analysis using the metabolite specific fragment ions (as they are now identified) or by ICP-MS measurement.

Acknowledgements

The contribution of the Region of Aquitaine and the FEDER funds via CPER A2E (31486/08011464) project is acknowledged. The authors thank Jean-Marc Sotiropoulos (Equipe Chimie Physique, IPREM, UPPA/CNRS UMR 5254, Pau, France) for his help in chemical synthesis and Sandra Gil Casal for her help in sample preparation.

References

- 1 E. Johansson, *J. Trace. Elem. Electrolytes Health Dis.*, 1991, **5**, 273–274.
- 2 S. Biswas, G. Talukder and A. Sharma, *Mutat. Res.*, 1999, **441**, 155–160.
- 3 J. Gailer, *Appl. Organometal. Chem.*, 2002, **16**, 701–707.
- 4 A. L. Choi, E. Budtz-Jørgensen, P. J. Jørgensen, U. Steuerwald, F. Debes, P. Weihe and P. Grandjean, *Environ. Res.*, 2008, **107**, 45–52.
- 5 H. J. Thompson, *J. Agric. Food Chem.*, 1984, **32**, 422–425.
- 6 L. C. Clark, G. F. Jr Combs, B. W. Turnbull, E. H. Slate, D. K. Chalker, D. Albanes, P. R. Taylor and C. Coltman, *J. Am. Med. Assoc.*, 1996, **276**, 1957–1963.

- 7 M. P. Rayman, *Proc. Nutr. Soc.*, 2005, **64**, 527–542.
- 8 Y. Kobayashi, Y. Ogra, K. Ishiwata, H. Takayama, N. Aimi and K. T. Suzuki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, **99**, 15932–15936.
- 9 B. Gammelgaard and L. Bendahl, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 135–142.
- 10 Y. Ohta and K. T. Suzuki, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2008, **226**, 169–177.
- 11 K. A. Francesconi and F. Pannier, *Clin. Chem.*, 2004, **50**, 2240–2253.
- 12 L. Bendahl and B. Gammelgaard, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 950–957.
- 13 B. Gammelgaard, L. Bendahl, N. Wessel Jacobsen and S. Sturup, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2005, **20**, 889–893.
- 14 B. Gammelgaard, K. Grimstrup Madsen, J. Bjerrum, L. Bendahl, O. Jøns, J. Olsen and U. Sidenius, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2003, **18**, 65–70.
- 15 B. Gammelgaard, L. Bendahl, U. Sidenius and O. Jøns, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2002, **17**, 570–575.
- 16 T. H. Cao, R. A. Cooney, M. M. Woznichak, S. W. May and R. F. Browner, *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 2898–2902.
- 17 B'Hymer and J. A. Caruso, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1114**, 1–20.
- 18 B. Gammelgaard, O. Jøns and L. Bendahl, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2001, **16**, 339–344.
- 19 V. Díaz Huerta, J. S. R. Lobinski, M. L. Fernández Sánchez and A. Sanz-Medel, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2003, **18**, 1471–1476.
- 20 Y. Ogra, K. Ishiwata, H. Takayama, N. Aimi and K. T. Suzuki, *J. Chromatogr. B*, 2002, **767**, 301–312.
- 21 E. Dumont, Y. Ogra, K. T. Suzuki, F. Vanhaecke and R. Cornelis, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **555**, 25–33.
- 22 Y. Ogra, T. Hatano, M. Ohmichi and K. T. Suzuki, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2003, **18**, 1252–1255.
- 23 M. M. Gomez, T. Gasparic, M. A. Palacios and C. Camara, *Anal. Chim. Acta*, 1998, **374**, 241–251.
- 24 M. A. Quijano, A. M. Gutierrez, M. C. Perez-Conde and C. Camara, *Talanta*, 1999, **50**, 165–173.
- 25 Wrobel ABC, 2003K. Wrobel, K. Wrobel, S. S. Kannamkumarath and J. Caruso, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, **377**, 670–674.
- 26 M. Klein, L. Ouerdane, M. Bueno and F. Pannier, unpublished work.
- 27 P. Traar, F. Belaj and K. A. Francesconi, *Austr. J. Chem.*, 2004, **57**, 1051–1053.
- 28 M. S. Alaejos and C. D. Romero, *Clin. Chem.*, 1993, **39**, 2040–2052.
- 29 L. Ouerdane, S. Mari, P. Czernic, M. Lebrun and R. Lobinski, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, **7**, 676–683.
- 30 M. Dernovics and R. Lobinski, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 3975–3984.
- 31 S. Gil Casal, J. Far, K. Bierla, L. Ouerdane and J. Szpunar, *Metallomics*, 2010, **2**, 535–548.
- 32 S. Letsiou, V. Nischwitz, P. Traar, K. A. Francesconi and S. A. Pergantis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2007, **21**, 343–351.
- 33 Y. Yamashita and M. Yamashita, *J. Biol. Chem.*, 2010, **285**, 18134–18138.
- 34 Y. Anan, K. Ishiwata, N. Suzuki, S. Tanabe and Y. Ogra, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2011, **26**, 80–85.
- 35 C. Tanret, *C. R. Acad. Sci.*, 1909, **149**, 222–224.
- 36 D. Akanmu, R. Cecchini, O. I. Aruoma and B. Halliwell, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1991, **288**, 10–16.
- 37 O. I. Aruoma, M. Whiteman, T. G. England and B. Halliwell, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, **231**, 389–391.
- 38 O. I. Aruoma, J. P. E. Spencer and N. Mahmood, *Food Chem. Toxicol.*, 1999, **37**, 1043–1053.
- 39 D. B. Melville, W. H. Horner and R. Lubschez, *J. Biol. Chem.*, 1954, **206**, 221–228.
- 40 Y. Yamashita, T. Yabu and M. Yamashita, *World J. Biol. Chem.*, 2010, **1**, 144–150.
- 41 H. Gross, J. Reitner and G. M. König, *Naturwissenschaften*, 2004, **91**, 441–446.
- 42 N. M. Mozier, K. P. McConnell and J. L. Hoffman, *J. Biol. Chem.*, 1988, **263**, 4527–4531.
- 43 J. Ey, E. Schömig and D. Taubert, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**, 6466–6474.
- 44 B. D. Paul and S. H. Snyder, *Cell Death Differentiation*, 2010, **17**, 1134–1140.
- 45 K. D. Asmus, R. V. Benasson, J. L. Bernier, R. Houssin and E. J. Land, *Biochem. J.*, 1996, **315**, 625–629.

II.D. BILAN SUR L'ANALYSE DE FORMES SELENEES DISSOUTES DANS L'URINE DE SUJETS NON SUPPLEMENTES

Dans ce chapitre, les développements analytiques pour l'étude des formes sélénées dissoutes dans l'urine de personnes non supplémentées, ont été présentés. L'objectif de cette thèse étant l'analyse de spéciation, la séparation chromatographique des étalons sélénés disponibles au laboratoire a été la première étape de nos travaux. Trois modes de séparation ont été optimisés pour confirmer l'identité et la quantification des espèces. Ainsi SeGal et TMSe^+ ont pu être quantifiés. Les résultats de la quantification de SeGal sur la colonne C18, supérieurs à ceux obtenus sur la colonne PGC, ont laissé supposer une coélution de SeGal avec un composé inconnu.

Cependant, en analyse directe par HPLC-ICPMS les seuils de détection sont encore trop élevés pour détecter toutes les formes sélénées présentes dans les échantillons d'urine, particulièrement peu concentrés après la dilution par dix habituellement réalisée pour diminuer les effets de matrice (LD entre 21 et 38 $\mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ sur phase inverse C18). Afin de minimiser cette dilution, deux méthodes de purification et/ou de préconcentration d'échantillon ont été optimisées.

Le développement de ces deux protocoles de préparation d'échantillon basés sur l'extraction sur phase solide a finalement permis l'abaissement global des limites de détection d'un facteur quatre. L'amélioration de la sensibilité s'est ainsi traduite par une quantification plus aisée du métabolite séléné majeur SeGal, et de TMSe^+ , tous les deux présents dans les échantillons d'urine analysés avec des concentrations variant de 2.5 à 14.5 $\mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ (soit 4.2 à 54% $[\text{Se}]_{\text{tot}}$) et, 0.30 à 4.8 $\mu\text{g}(\text{Se}).\text{L}^{-1}$ (soit 0.9 à 8.0% $[\text{Se}]_{\text{tot}}$) respectivement. Les raisons de la variabilité des concentrations mesurées pour ces composés dans l'urine ne sont toujours pas élucidées. L'abaissement des limites de détection a également conduit à la mise en évidence de composés sélénés inconnus.

Après purification de l'échantillon par SPE, suivie d'une chromatographie bidimensionnelle phase inverse / interactions hydrophiles couplée à l'ICPMS pour la détection des espèces sélénées et à l'ESI- LTQ Orbitrap MS pour l'identification structurale de ces espèces, la présence de SeGal a été confirmée pour la première fois avec une masse exacte des ions précurseurs et des ions fragments. Un nouveau composé, la Se-méthylsélénonéine, a également été identifié. Ce composé est élué dans la même fraction que SeGal par séparation en phase inverse C18. L'hypothèse de la coélution de SeGal avec un autre composé sur la colonne

C18 est ainsi confirmée et explique les différences obtenues lors de la quantification de SeGal sur cette colonne par rapport aux autres mécanismes utilisés. Ce résultat traduit clairement la nécessité de disposer de différents mécanismes de séparation pour mettre en évidence les phénomènes de coélution. A l'inverse, la Se-méthylsélénonéine est correctement séparée des autres composés sélénés sur la colonne PGC. Dans les conditions d'analyse précédemment optimisées (cf. II.A), son temps de rétention est de 17 min. La Se-méthylsélénonéine correspond donc à l'un des composés inconnus initialement détectés lors de l'analyse directe des échantillons d'urine.

La sélénonéine, analogue de l'ergothionéine, a récemment été identifiée dans le sang du thon rouge [74]. La présence de la forme méthylée est probablement due à la méthylation, par les enzymes méthyltransférase dans le foie et les reins, de la sélénonéine provenant de l'alimentation. Afin d'éliminer l'hypothèse d'un artefact causée par la préparation de l'échantillon, la connaissance du spectre de masse de la Se-méthylsélénonéine a ensuite permis de rechercher ce composé directement, *i.e.* sans étape de préconcentration, dans l'urine de sujets non supplémentés. Cette méthode a été étendue au suivi direct des deux formes sélénées et de leurs analogues soufrés dans l'urine et le sang humains. Les quatre formes ont été détectées dans le sang tandis que seulement trois ont été détectées dans l'urine. Le rapport des formes soufrées et sélénées méthylées/non méthylées dans le sang et dans l'urine semble indiquer que les formes méthylées sont préférentiellement excrétées dans l'urine et que la sélénonéine semble être plus facilement méthylée que son analogue soufré, l'ergothionéine.

Des travaux récents ont montré que l'ergothionéine peut jouer un rôle important en tant que cytoprotecteur, particulièrement pour les dommages oxydatifs causés aux mitochondries [292]. Le protocole analytique utilisé au cours de cette étude devrait donc être d'un grand intérêt pour l'étude du rôle de toutes ces espèces dans le métabolisme humain et animal, et pour d'éventuelles recherches en tant que complément alimentaire. Après synthèse de l'étalon correspondant, il sera alors possible de quantifier directement ce métabolite dans l'urine.

En plus des formes dissoutes nous avons pu voir que certains auteurs ont également mis en évidence la présence de formes volatiles du sélénium dans les échantillons d'urine. Le chapitre III présente donc les recherches réalisées dans le cadre de cette thèse concernant les formes sélénées volatiles.

Chapitre III

**ANALYSE DES FORMES SELENIIEES VOLATILES DANS
L'URINE DE SUJETS NON SUPPLEMENTES**

Des travaux récents ont montré la présence de formes sélénées volatiles dans des échantillons d'urine dopés avec SeGal et conservés sur une longue période [191]. Les mêmes auteurs ont également mis en évidence la présence de ces composés sur un échantillon d'urine humaine certifiée et reconstituée [180].

Une étude précédente réalisée au laboratoire, a abouti à la détection de DMSe en tant que métabolite sélénié mineur et supposé l'existence de DMSeS (identification basée sur l'estimation de son point d'ébullition selon son temps de rétention). Ces travaux ont utilisé comme technique d'analyse la micro-extraction sur phase solide en mode « espace de tête » (HS SPME) en amont d'une séparation par chromatographie en phase gazeuse couplée à l'ICPMS (GC-ICPMS). La technique d'extraction retenue possède l'avantage de pouvoir s'affranchir d'une partie des interférents de la matrice, de préconcentrer les analytes ([DMSe] dans l'urine = 4-10 ng(Se).L⁻¹), tout en étant suffisamment rapide et simple d'utilisation. Dans cette étude, un problème de quantification de DMSe est apparu, les ajouts étant détectés uniquement dans les échantillons ne contenant pas de composés soufrés volatils. Il a donc été supposé que le DMSe ajouté réagissait avec les composés volatils soufrés présents (suivi de m/z 34) pour former DMSeS. Au cours de cette thèse, l'objectif était donc de mieux comprendre le comportement de DMSe dans l'urine afin de pouvoir statuer sur sa présence en tant que métabolite. A cette fin, l'analyse simultanée des formes volatiles sélénées et soufrées par HS SPME-GC-ICPMS a été mise en œuvre. Les étalons disponibles au laboratoire incluent DMSe, DMSe, diméthylsulfure (DMS) et diméthyltrisulfure (DMTS). Il est cependant à noter que pour l'analyse du soufre par ICPMS, la mesure de l'isotope majeur ³²S (95,02%) est perturbée par les interférences O¹⁶/O¹⁶ et celle de l'isotope ³⁴S (4,21%), peu abondant, par les interférences O¹⁸/O¹⁶. L'introduction de xénon dans la cellule permet le suivi de l'isotope ³²S avec des limites de détection de l'ordre de 4 µg(S).L⁻¹ en analyse élémentaire [293]. Cependant l'utilisation de xénon diminue fortement la sensibilité de l'appareil envers le sélénium dont la limite de détection en analyse élémentaire est augmentée à 3.3 µg(Se).L⁻¹ (⁸⁰Se) avec un débit de xénon de 130-160 µL.min⁻¹ (LD à 0.4 µg(Se).L⁻¹ avec un débit de 2 mL.min⁻¹ d'hydrogène [294]). L'utilisation de xénon s'avère donc inappropriée à la détection de Se à l'état d'ultra-traces, simultanément à S. L'introduction de l'hydrogène seul dans la cellule de collision/réaction n'a pas permis de diminuer suffisamment les interférences aux m/z 32 et 34 pour lesquelles le bruit de fond apparaît toujours trop élevé pour la détection des composés soufrés. Une alternative pour le suivi de S a consisté à mesurer m/z 48 (³²S¹⁶O) sans pressurisation de la cellule de collision. Certains auteurs ont ainsi obtenu des limites de détection (LD = 0.2 µg(S).L⁻¹) vingt fois inférieures à celles obtenues avec utilisation du xénon [295]. Le suivi des rapports m/z 48 et 77, a ainsi été mis en œuvre pour la détection simultanée

du soufre et du sélénium en GC-ICPMS sans pressurisation de la cellule de collision/réaction. L'utilisation de la SPME combinée avec l'analyse en GC-ICPMS dans nos conditions analytiques, nous permet donc d'obtenir des limites de détection proches de 30 ng(Se).L^{-1} pour DMDS et DMTS ; et entre 30 et 60 pg(Se).L^{-1} respectivement pour DMDS_{Se} et DMS_{Se}.

Les premiers essais sur les échantillons d'urine ont laissé supposer une évolution rapide des formes volatiles (séléniées, soufrées et mixtes Se/S) dans l'échantillon. Avant de continuer les recherches d'identification et de quantification des métabolites séléniés volatils détectés dans l'urine, nous avons choisi dans un premier temps de définir un protocole de stockage et d'analyse des échantillons permettant le maintien de la spéciation originelle.

L'article "*Study of volatile selenium metabolites stability in normal urine: effects of sample handling and storage conditions*" paru dans le Journal of Analytical Atomic Spectrometry présente les résultats obtenus selon différentes conditions de stockage et de manipulation de l'échantillon. Les conditions de stockage permettant de garantir la stabilité des espèces séléniées volatiles dans l'urine de sujets non supplémentés ont ainsi pu être définies.

Deux types d'études ont été réalisés. La première étude concerne une période de conservation relativement courte, *i.e.* jusqu'à 35 heures de conservation après le prélèvement. Au cours de cette période, l'influence de la température de conservation (température ambiante, 4°C), de la lumière, et de l'ajout d'un agent bactéricide (NaN_3) a été évaluée. Dans le cas où l'analyse peut être réalisée le jour même de la collecte, ce qui est préférable, il apparaît nécessaire de conserver les échantillons à l'obscurité immédiatement après leur collecte. Si l'analyse ne peut être réalisée le jour même du prélèvement, la conservation à 4°C après ajout de NaN_3 est préconisée. Les espèces séléniées, soufrées et mixtes Se/S sont ainsi stabilisées pour une durée de 35 heures.

La seconde partie de cet article présente l'étude de stabilité réalisée pour une plus longue période de conservation de l'échantillon, soit quatre semaines aux températures de - 20°C et - 80°C. Il apparaît que l'échantillon peut être conservé jusqu'à deux semaines à - 20°C et jusqu'à quatre semaines à - 80°C.

La présence de deux composés séléniés ne correspondant à aucun des étalons disponibles a été mise en évidence dans l'urine fraîchement collectée. Le premier composé a pu être identifié par chromatographie en phase gazeuse à source à pression atmosphérique en phase gazeuse couplée à un triple quadrupôle (GC-APGC-QQQ) comme étant DMS_{Se}S. L'identité de ce composé avait déjà été supposée sur la base de sa température d'ébullition. Sa présence est donc pour la première fois confirmée dans l'urine normale par une technique d'identification structurale. En ce qui concerne le second composé, la linéarisation de son temps de rétention

selon son point d'ébullition pourrait indiquer qu'il s'agit de DMSeDS. Cependant, sa concentration est très faible dans l'échantillon et sa structure n'a de ce fait pas pu être confirmée par GC-APGC-QQQ.

Au cours de ces travaux, nous nous sommes également intéressés aux effets de la matrice urine sur le DMDS_e. La comparaison des droites d'étalonnage HS-SPME-GC-ICPMS de DMDS_e réalisées dans l'eau milli-Q, l'urine synthétique et l'urine humaine a permis d'observer une diminution du signal de DMDS_e en présence de sels (urine synthétique) et une disparition totale de son signal dans l'urine naturelle. Afin de tenter d'élucider les causes de la disparition du signal de DMDS_e dans l'urine, des expériences complémentaires ont été menées en comparant l'évolution des espèces dans l'échantillon d'urine dopé (100 ng(Se).L⁻¹) ou non en DMDS_e. Différentes conditions de stockage ont été comparées quotidiennement pendant quatre jours :

- température ambiante (21 ± 2°C), lumière
- température ambiante (21 ± 2°C), lumière et NaN₃ 0.05%
- température réfrigérée (5 ± 1°C), obscurité et NaN₃ 0.05%

La concentration d'ajout de DMDS_e a pu être mesurée immédiatement après dopage mais disparaît dans les premières 24h quel que soient les conditions de stockage. Aucune augmentation du signal des autres espèces n'est observée en parallèle. A la fin de ces essais, soit au bout de quatre jours, les chromatogrammes des échantillons dopés ou non en DMDS_e sont entièrement superposables pour chacune des conditions de stockage. La démarche expérimentale suivie mettant en œuvre l'analyse des formes volatiles apparaît donc mal adaptée à l'étude du comportement de DMDS_e dans l'urine. Afin de vérifier l'hypothèse d'une possible dégradation de DMDS_e en un composé non volatil, le suivi des formes dissoutes a donc été mis en œuvre en complément, ce qui a nécessité l'utilisation de concentrations de dopage plus élevées.

L'échantillon a finalement été dopé à différentes concentrations de DMDS_e (0 ; 1 ; 10 ; 100 µg(Se).L⁻¹) puis analysé le lendemain par HPLC(PGC)-ICPMS après filtration à 0.45 µm et dilution d'un facteur dix de l'échantillon. L'échantillon a été stocké au cours de la nuit dans les mêmes conditions que celles définies auparavant pour son étude de comportement. Un nouveau composé a été détecté dans tous les échantillons dopés avec DMDS_e, quelle que soit la condition de stockage. Son signal augmente en accord avec la concentration de dopage de DMDS_e. Il émerge à un temps de rétention qui ne correspond à aucun étalon. Cependant, l'analyse par spectrométrie de masse structurale (Orbitrap LTQ-MS) de la fraction contenant l'analyte n'a pas fourni de résultats concluants. Des recherches futures sur l'identification de ce composé sont nécessaires.

Cite this: *J. Anal. At. Spectrom.*, 2011, **26**, 602

www.rsc.org/jaas

TECHNICAL NOTE

Study of volatile selenium metabolites stability in normal urine: effects of sample handling and storage conditions†‡

Marlène Klein, Hugues Preud'homme, Maïté Bueno* and Florence Pannier

Received 17th August 2010, Accepted 17th December 2010

DOI: 10.1039/c0ja00117a

The aim of this study was to define suitable conditions for sample handling and storage of urine samples in order to ensure reliable analysis of selenium-containing volatile metabolites. Short-term stability testing (from sample collection to 30–35 hours) included: temperature (room, *i.e.* 22 ± 2 °C, refrigerator (4 °C)), the presence and absence of light, and addition of a bactericide (0.05% NaN_3). The long-term stability study evaluated urine storage at -20 and -80 °C over a period of 4 weeks. This work was conducted with normal urine samples, *i.e.* from non-supplemented human volunteers, in order to profile baseline metabolites and corresponding concentration levels. The results indicate that urine samples should be maintained in the dark immediately after collection and preferably analyzed within the day of collection. If temporary storage cannot be avoided, it should be at 4 °C after addition of NaN_3 . For longer period, urine samples can be stored at -20 or -80 °C without measurable changes respectively for 2 to 4 weeks.

Introduction

Selenium is an essential trace element at recommended levels of intake, *i.e.* 55 μg per day for male and female adults.¹ However when ingested at higher levels, it can produce toxic effects. This dual role has motivated the study of selenium metabolism which is generally based on the determination of dissolved selenium species in urine, as ingested Se is mostly excreted in urine. Selenosugars have been identified as major soluble Se metabolites (selenosugar 1), and minor metabolites could be identified such as trimethylselenonium (TMSe^+), selenite ($\text{Se}(\text{IV})$) and selenomethionine (Se-Met) for Se-Met supplemented subjects.² Recent studies also evidenced the presence of volatile selenium species in urine, either due to some degradation in selenosugar 1 spiked samples stored for a long time,³ or in reconstituted urine certified reference material (NIES CRM 18).⁴ In a previous work, we reported optimization of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) in conjunction with gas chromatography (GC)-ICPMS for volatile selenium species determination in normal urine samples, *i.e.* from unsupplemented human volunteers.⁵ Dimethylselenide (DMSe) was quantified at its natural occurrence level, *i.e.* in the range 4–10 $\text{ng}(\text{Se}) \text{L}^{-1}$. Two unknown

selenium-containing compounds were detected, one of which was supposed to be dimethyl selenenyl sulfide (DMSeS) based on boiling temperature estimation from the GC retention time. While DMSe was quantified with similar standard addition response slopes for all studied samples, dimethyldiselenide (DMDS) standard additions response was only obtained in urine sample with no significant volatile sulfur content (sulfur content estimation based on m/z 34 monitoring). Before carrying on further work on volatile selenium urinary metabolites, it appeared thus necessary to perform simultaneous monitoring of Se and S volatile species in order to examine their possible reactivity in urine matrix as previously observed in methanolic standard solutions.⁶ Moreover to ensure reliable analysis of selenium-containing volatile metabolites, the influence of different conditions of sample handling and storage was examined. Studied storage conditions include: temperature (room, *i.e.* 22 ± 2 °C, refrigerator (4 °C), and freezer (-20 and -80 °C)), the presence and absence of light, and addition of a bactericide (0.05% NaN_3). As volatile species concentrations in urine are in the $\text{ng}(\text{Se}) \text{L}^{-1}$ range, that is to say 10^3 less than total selenium and dissolved metabolite concentrations, the stability studies focused only on volatile species determination.

Experimental

Reagents and chemicals

Dimethylselenide (DMSe) (>99%, Strem), dimethyldiselenide (DMDS) (98%, Aldrich), dimethyl disulfide (DMS) (99%, Aldrich) and dimethyl trisulfide (DMTS) (98%, Aldrich) were used without further purification. Individual stock standard

Université de Pau et des Pays de l'Adour, Laboratoire de Chimie Analytique Bio Inorganique et Environnement (LCABIE), IPREM, UMR CNRS 5254, Hélio parc, Avenue du Président Angot, 64000 Pau, France. E-mail: maite.bueno@univ-pau.fr

† This article is a part of a collection of papers highlighting outstanding and emerging work in the area of speciation.

‡ Electronic supplementary information (ESI) available: Urine matrix effect on HS SPME calibration slopes, and monitored parents and daughter ions in MRM analysis mode. See DOI: 10.1039/c0ja00117a

solutions containing $\sim 5000 \mu\text{g}$ (Se or S) g^{-1} in methanol (Normapur, >99%, Prolabo) were stored in the dark at -4°C . Working standard solutions were prepared by successive dilutions in Milli-Q water (18.2 M Ω cm, Millipore) for SPME sampling. All standard solutions were prepared in 10 mL headspace vials sealed with polytetrafluoroethylene (PTFE)-coated silicone rubber septa (20 mm diameter) (Supelco). Sodium azide (NaN_3 , BioXtra, $\geq 99.5\%$) was provided by Sigma Aldrich.

Urine sample collection and storage conditions

After collection, the morning urine samples of several volunteers were pooled and immediately transferred to 38 mL headspace vials sealed with PTFE-silicone rubber septa. Samples were allowed to cool at room temperature before being stored under the different tested conditions. For the short period storage study, samples were maintained at room temperature in the light, at room temperature in the dark, at 4°C in the dark, and after addition of NaN_3 (final concentration 0.5 g L^{-1}) at room temperature in the light and at 4°C in the dark. Determination of selenium species was made at the beginning of the experiment, *i.e.* just after sample cooling ($t = 0$), and after 8 and 30 hours. For the long period storage study, sub-aliquoted samples were placed at -20 and -80°C . Samples were analyzed on the day of collection and after 1, 2, 3 and 4 weeks storage.

Instrumental

GC-ICPMS. The ICPMS instrument was the 7500cs from Agilent technologies (Tokyo, Japan) used with no gas in the collision-reaction cell. Sampler and skimmer cones were made of platinum. Operating conditions were optimised daily using 50 ppm Xe in Ar, with typical settings being: plasma power 1050 W, plasma gas flow 15 L min^{-1} , auxiliary gas 0.9 L min^{-1} , carrier gas 0.5 L min^{-1} , optional gas (O_2) flow 9% relative to carrier gas. In these conditions sulfur determination was based on m/z 48 ($^{32}\text{S}^{16}\text{O}$) monitoring. Integration times of monitored isotopes were 10 ms at m/z 48 and 124 (Xe), and 80 ms at m/z 76–79, 81 and 82.

An Agilent 6890 gas chromatograph equipped with a split/splitless injection port and a narrow bore injection liner (0.75 mm id) was used. Separation was obtained with SPB1-sulfur column (30 m, 0.32 mm id, 4 μm film thickness) (Supelco) as previously described.⁵ Briefly, the inlet temperature was 270°C and the flow rate of He carrier gas (99.995% purity, Linde) was 2 mL min^{-1} . The oven temperature program was: 40°C isothermal for 3 min; $30^\circ\text{C min}^{-1}$ to 220°C ; then 2 min isothermal. Coupling of GC with ICPMS was accomplished through the use of Agilent GC-ICPMS interface (transfer line temperature 250°C).

GC-APGC-QQQ. Gas chromatography with mass spectrometric analysis was accomplished by coupling an Agilent 7890A gas chromatograph to a Waters Xevo TQ mass spectrometer. The carrier gas was ultra-high purity helium (99.99990% purity, Linde). Chromatographic conditions including column and temperature program were identical to those described above. Coupling of GC with QQQ was accomplished through the use of Agilent GC-QQQ interface (transfer line temperature 250°C) with a make up gas of 400 L h^{-1} .

The QQQ instrument was used with Ar (0.15 mL min^{-1}) as gas in the collision cell (T-wave). The ionization source is working in positive mode, at atmospheric pressure, heated to 120°C , with the help of a corona discharge $1 \mu\text{A}$ for ionization in the nitrogen flow. Operating conditions were optimized and set to 25 V for cone voltage, 0 L h^{-1} for auxiliary gas, 9 eV as collision energy for the daughter scan and the MRM mode. The scan speed in the daughter scan was set to 1000 amu s^{-1} , the data were obtained in profile mode (*i.e.* 16 pts amu^{-1}).

SPME procedure

SPME was carried out manually with the appropriate SPME holder and a 75 μm carboxen-polydimethylsiloxane (CAR-PDMS) fiber (Supelco) pre-conditioned by inserting it into the GC injector according to the manufacturer's instructions, *i.e.* 2 h at 300°C .

Solid-phase microextraction was performed in the headspace mode, in 38 mL headspace vials with 20 mL sample volume at ambient temperature, *i.e.* $22 \pm 2^\circ\text{C}$. HS-SPME of volatile selenium and sulfur species was carried out under mechanical agitation (350 rev min^{-1}) for 10 min. Once sampling completed, the analytes were desorbed in the GC injection port and the fibre was held in the inlet liner for the entire chromatographic run (including first three minutes in splitless mode) to assure complete analyte desorption and avoid any memory effects. Analyte quantification was obtained by standard additions method.⁵

Matrix effects

To examine the effect of urine salt content on HS-SPME response of the analytes, synthetic urine containing $134 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Na}^+$, $67 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}^+$, $2.6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$, $3.2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$, $19.8 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{PO}_4^-$, $122 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Cl}^-$, 310 mmol L^{-1} urea and 9.8 mmol L^{-1} creatinine was prepared as described by Gammelgaard and Jøns.⁷ The resulting pH was 5.6 ± 0.1 . Repeatability was evaluated by repeating consecutively five HS-SPME-GC-ICPMS measurements of solutions spiked with 10 ng(Se) L^{-1} of DMSe and DMDS, and 250 ng(S) L^{-1} of DMDS and DMTS.

Results and discussion

Matrix effects

The influence of urine matrix on the HS-SPME sensitivity of the four available volatile analytes was studied in the conditions of simultaneous analytes sampling, with the exception of DMDS sampling in human urine. Standard calibrations were performed in the concentration ranges of $10\text{--}80 \text{ ng(Se) L}^{-1}$ for DMSe and DMDS, and $250\text{--}1000 \text{ ng(S) L}^{-1}$ for DMDS and DMTS. The matrix influence was estimated by the comparison of standard calibration slopes obtained in urine matrices with the ones obtained in Milli-Q water. Repeatability of measurements was in the range 8–12%. Results (detailed in ESI†) indicate that urine matrices initiate salting-out effect for DMDS and DMTS improving their extraction, but it reduces those of DMSe and DMDS. Salting-out effect is due to a decrease of the solubility of nonpolar gaseous analyte in an aqueous salt matrix compared

to pure water. The DMSe solubility in water is about tenfold higher than that of DMDS ($S_{\text{DMSe},25^\circ\text{C}} = 0.218 \text{ mol L}^{-1}$ (ref. 8), $S_{\text{DMDS},20^\circ\text{C}} = 0.0228 \text{ mol L}^{-1}$ (ref. 9)), which can account for the observed different effects of salted matrices. The DMSe response was strongly affected by the synthetic urine matrix and also by the human urine but to a lesser extent. The reason for such a behavior is not clear, the human urine is a much more complex matrix than the synthetic one but indicates that the synthetic urine may not be well adapted to mimic the natural urine. The DMDS response was almost totally suppressed in human urine. Such response suppression has been also observed in blood plasma matrix and was attributed to DMDS reaction with plasma constituents resulting in the formation of non-volatile Se species.¹⁰ In the same study,¹⁰ the authors also observed that headspace sensitivity of DMSe was not affected by the human urine matrix and that DMDS determination was submitted to a large imprecision between replicates. Direct comparison with our observations is made difficult as (i) concentration levels used in the work of Gabel-Jensen *et al.*¹⁰ are 10^5 times superior to the ones used here and (ii) the direct headspace sampling was performed instead of SPME sampling.

Short period stability study

Observed unstable extraction yields of volatile species let us suspect that an evolution of sample volatile composition was occurring when urine samples were left at room temperature even for short periods, *i.e.* during the day of analysis. For example (Fig. 1, m/z 77), GC-ICPMS chromatogram obtained with freshly collected sample shows two significant selenium-containing peaks, corresponding to DMSe and DMSeS species, and two small unknown Se-containing peaks (Uk1, $t_R = 7.89 \text{ min}$, and Uk2, $t_R = 8.35 \text{ min}$). For the same sample left at room temperature in the light during 8 hours, GC-ICPMS chromatogram showed an increase of initially detected peak intensities and appearance of a DMDS peak corresponding peak. Profiles obtained monitoring m/z 48 indicated a similar evolution of the sample for volatile sulfur species. Comparison of m/z 48 and m/z 77 profiles also indicated that none of the selenium-containing peaks

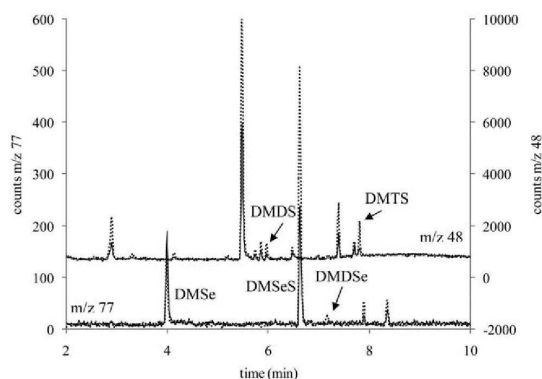


Fig. 1 Example of GC-ICPMS chromatograms obtained from 10 minutes HS-SPME of freshly collected sample (continuous line) and after 8 h storage at ambient temperature in the light (dotted line).

corresponds to detected sulfur containing peaks. In fact, detection limits of the entire method (evaluated in Milli-Q water and according to IUPAC specifications¹¹) are between 30–60 pg(Se) L^{-1} and 20–30 ng(S) L^{-1} respectively for m/z 77 and 48 monitoring. As simultaneous detection of mixed Se/S volatile species was not possible due to too low levels to detect, *i.e.* a few ng L^{-1} , the following discussion is focused on m/z 77 monitoring.

In order to check if such chromatogram evolution was mainly due to the progress of analyte partition to the headspace phase at ambient temperature, the urine sample was left at room temperature in the dark and analyzed just after collection, and after 8 and 30 hours. DMSe quantification was performed by standard additions. As same DMSe concentrations were determined at all sampling times, evolution of unknown species concentration was estimated by the ratio of DMSe peak height to that of the unknown species. We observed no measurable sample changes for 8 hours storage. However after 30 hours storage, GC-ICPMS chromatogram showed increased intensities of initially detected peaks, *i.e.* DMSeS, Uk1 and Uk2, and emergence of the DMDS corresponding peak. The data obtained when urine sample was stored at 4 °C in the dark, *i.e.* fridge conditions, were similar. These first experiments suggest that unstable extraction yields were not due to the progress of analyte distribution between aqueous and headspace phases but rather to some sample reactivity which kinetic was faster under light exposure. The effect of NaN_3 addition was compared between urine samples stored at room temperature in the light, or at 4 °C in the dark. Treatment with NaN_3 reduced the reactivity for urine samples stored at ambient temperature in the light as increased intensities of DMSeS and Uk2 corresponding peaks were only detectable after 30 hours storage (Fig. 2). Storage at 4 °C in the dark with sodium azide prevented sample evolution as measured peak height ratios of DMSe to DMSeS were not significantly different for the freshly collected and 30 hours stored sample, *i.e.* 2.87 and 2.80 respectively. Microorganisms can be present in urine samples due to natural flora of the urine excretory duct, urinary tract infection or use of unsterilized material for sample collection.^{12–14} Sodium azide has been used in concentrations ranging from 1 to 10 g L^{-1} in doping control laboratories for analyte preservation due to its bactericidal

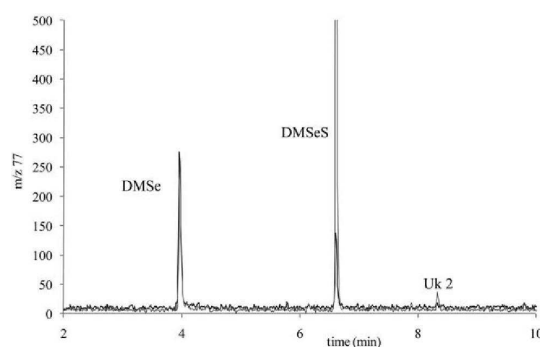


Fig. 2 GC-ICPMS chromatograms obtained from urine containing NaN_3 for freshly collected sample (continuous dark line) and after 30 hours storage at room temperature in the light (continuous grey line).

Table 1 Stability of volatile selenium species in urine samples stored at -20 and -80 °C. Values represent the mean \pm SD of four replicate samples in ng(Se) L $^{-1}$. DMSeS concentrations were estimated from DMSe standard additions slope

		Initial	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4
-20 °C	DMSe	3.4 ± 0.3	3.0 ± 0.3	3.3 ± 0.3	3.3 ± 0.3	3.4 ± 0.3
	DMSeS	0.60 ± 0.15	0.80 ± 0.17	1.46 ± 0.15	1.28 ± 0.15	1.32 ± 0.25
-80 °C	DMSe	3.4 ± 0.3	3.2 ± 0.3	3.3 ± 0.3	3.4 ± 0.3	3.2 ± 0.3
	DMSeS	0.60 ± 0.15	0.67 ± 0.15	0.90 ± 0.15	0.75 ± 0.15	0.75 ± 0.11

properties.¹⁴ The range of NaN₃ concentrations between 0.5 and 1 g L $^{-1}$ has also been known to inhibit microbial degradation of urine samples.¹⁵ In this study, the concentration of NaN₃ (0.5 g L $^{-1}$) was chosen according to Juresa *et al.*'s³ study on selenosugar stability in human urine. The level of sodium azide addition as well as target microorganisms do not seem to be very well defined as indicated by contradictory published results. For example, Saudan *et al.*¹⁶ have reported that sodium azide (10 g L $^{-1}$) inhibited *Enterococcus faecalis* growth in urine sample up to 7 days storage in the temperature range 4–37 °C. On the other hand, Tsiyou *et al.*¹⁴ indicated that NaN₃ was not suitable for the inhibition of fecal streptococci such as *E. faecalis*. Growth of microorganisms showing urease-positive activity induces alkalization of urine pH.¹² Urine samples containing NaN₃ and stored at room temperature in the light, or at 4 °C in the dark were found to have a constant pH of 5.6 ± 0.1 after 30 hours storage. If changes of species concentrations in urine sample resulted from a microbial activity, it would thus be due to urease-negative microorganisms (for example *Escherichia coli* and *E. faecalis*,¹² which are part of normal fecal flora¹⁴).

Regarding NaN₃ solubility in water (436 g L $^{-1}$ at 25 °C¹⁷) and its acid–base characteristics (K_a (HN₃/N₃ $^{-}$) = 1.2×10^{-5} (ref. 18)), we calculated that a concentration of hydrazoic acid around 1.6 mmol L $^{-1}$ was formed in urine samples (pH = 5.6 ± 0.1) from added NaN₃. As HN₃ is highly volatile (boiling temperature = 35.7 °C¹⁸), addition of NaN₃ may also result in increased head-space competitions for analyte sorption onto the CAR/PDMS fiber. Actually, in the case of samples containing NaN₃, we observed that volatile sulfur response was strongly decreased, which could indicate some affinity of HN₃ for the fiber coating.

Long period stability study

The long-term study evaluated urine storage at -20 and -80 °C without preservative addition¹⁹ over a period of 4 weeks. Sub-aliquoted urine samples were frozen immediately after collection to minimize freeze–thaw cycles. Samples were allowed to thaw at ambient temperature in the dark before analysis. For each temperature storage, at least four HS-SPME samplings of urine samples were performed on the day of analysis, *i.e.* within a maximum length of storage time at an ambient temperature of ten hours. DMSe quantification was obtained by standard additions. As no DMSeS commercial standard is available, corresponding concentrations were estimated from the slope of the DMSe standard addition curve. The variation in the concentrations of the detected selenium species is reported in Table 1. No measurable losses of DMSe were observed at both temperatures of storage. DMSeS was also stable in urine stored

at -80 °C while storage at -20 °C led to an increase of its concentration (\sim twofold) after 2 weeks. The unknown Se-containing peaks and DMSe were not detected over the 4 weeks storage.

Unknown Se-containing compounds

Unknown Se-containing peaks with late elution times, *i.e.* Uk1 with $t_R = 7.89$ min and Uk2 with $t_R = 8.35$ min, were detected in GC-ICPMS chromatograms either for freshly collected urine sample analysis or, some hours after sample collection depending on storage conditions. Boiling points, $T_{b.p.}$, of these unknown compounds were estimated from their retention times using the linear correlation between t_R and $T_{b.p.}$ obtained under our GC temperature program as previously described.^{20–22} Estimated Uk1 and Uk2 boiling points were thus 178 ± 4 and 193 ± 5 °C respectively. Swearingen *et al.*²¹ reported that the boiling point of dimethyl selenodisulfide, CH₃SeSSCH₃ (DMSeDS), was 192 °C. We thus postulated that Uk2 was DMSeDS. GC-APGC-QQQ was tentatively used to confirm the identity of these selenium-containing compounds including dimethyl selenenyl sulfide. Since ICPMS responses of Uk1 and Uk2 for freshly collected urine sample were close to instrument's detection limits, sub-aliquoted urine samples were left at room temperature in the light during four weeks to increase their concentrations. Higher levels of unknown compounds were indeed detected and signals could be simultaneously monitored on m/z 77 and 48 consolidating our assumption of mixed Se/S compounds (Fig. 3). Elemental ratios, S : Se, in eluted species were calculated from DMSeS and Uk2 chromatographic peak areas and the Uk2 (DMSeDS supposed) elemental ratio was found to be twofold that of DMSeS. In order

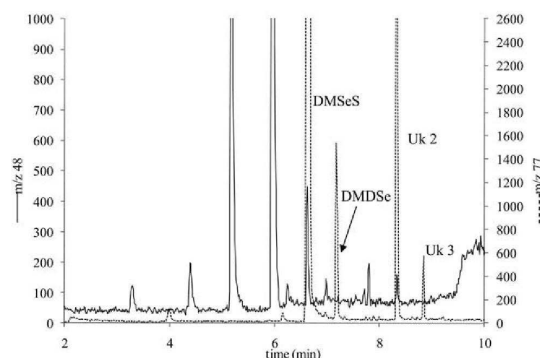


Fig. 3 Example GC-ICPMS chromatogram obtained from urine sample stored at ambient temperature in the light during four weeks.

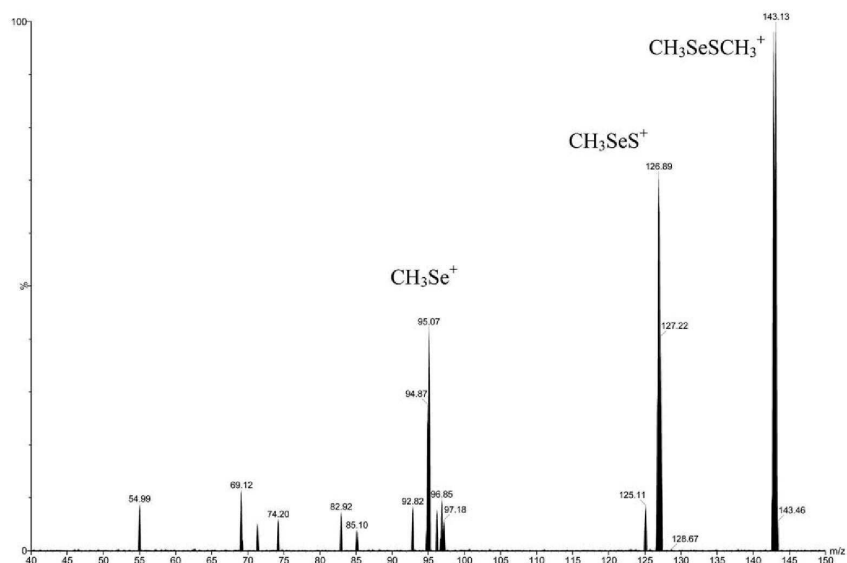


Fig. 4 Daughter scan on ion parent of dimethyl selenenyl sulfide (DMSes) from HS-SPME sampling of urine sample stored at ambient temperature in the light during four weeks.

to obtain greater sensitivity and optimize ionization conditions, GC-APGC-QQQ was first used in Multiple Reaction Monitoring (MRM) analysis mode. The list of monitored parents and daughter ions is available in the ESI†. We selected if possible the two most intense transitions for $[M]^+$ (^{80}Se -containing) for structural confirmation and with at least one $[M - 2]^+$ (^{78}Se -containing) for the selenium presence confirmation. DMSesDS corresponding transitions were not detected, the structure of Uk2 could thus not be confirmed. Further optimization is necessary to obtain the corresponding molecular ion with sufficient intensity and then reach the MSMS structural confirmation of this compound. The retention times obtained by GC-APGC-QQQ in MRM mode for DMSes, DMSes and DMSesS were similar to those obtained by GC-ICPMS. To achieve their structural elucidations, we performed a daughter scan experiment on the following parent ions at m/z 109.96 (DMSes); 141.94 (DMSesS); 189.88 (DMSesDS) only in the expected retention time window. The identity of DMSesS (Fig. 4), DMSes and DMSesDS was thus confirmed in the unspiked urine sample.

Conclusion

The results of this study emphasize the importance of careful collection, handling and storage of urine samples for volatile selenium speciation analysis. To protect the sample fidelity, the following recommendations arise from results obtained in this study: (1) no preservative is necessary if samples are stored at/or below $-20\text{ }^\circ\text{C}$ (over 2 weeks at $-20\text{ }^\circ\text{C}$, 4 weeks at $-80\text{ }^\circ\text{C}$); (2) addition of preservative (NaN_3 0.5 g L^{-1}) is necessary if analysis cannot be performed on the day of collection and temporary storage (~ 30 to 35 hours) at $4\text{ }^\circ\text{C}$ is necessary and (3) immediately after collection, urine sample should be maintained sheltered from light. Furthermore, this study has revealed the

presence of two mixed Se/S volatile compounds. The first one, detected in all freshly collected samples, was identified by mass spectrometry as DMSes. The second one is probably DMSesDS, based on literature and first experimental data, but its structure could not be confirmed by mass spectrometry due to its too low concentration level. Both compounds' concentrations rapidly increase (a few hours after sample collection) when the urine sample was maintained in the light. The formation mechanism of these species in collected urine was not investigated; however, a well known precursor of these species is DMSes whose detection in urine samples occurred only some hours (depending on storage conditions) after collection. Our future work will thus investigate interactions between volatile selenium and sulfur species in urine matrix.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Waters Company and Jean-Marc Joumier for the loan of APGC source and the Agilent Company and Jean-Paul Chauve for the loan of 7890A GC.

References

- 1 Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) *Toxicological Profile for Selenium*, ATSDR Atlanta, Georgia, 2003.
- 2 K. A. Francesconi and F. Pannier, *Clin. Chem.*, 2004, **50**, 2240–2253.
- 3 D. Juresa, J. Darrouzès, N. Kienzl, M. Bueno, F. Pannier, M. Potin-Gautier, K. A. Francesconi and D. Kuehnelt, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, **21**, 684–690.
- 4 D. Juresa, D. Kuehnelt and K. A. Francesconi, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 8569–8574.
- 5 M. Bueno and F. Pannier, *Talanta*, 2009, **78**, 759–763.
- 6 J. Meija and J. A. Caruso, *Inorg. Chem.*, 2004, **43**, 7486–7492.
- 7 B. Gammelgaard and O. Jøns, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1999, **14**, 867–874.

-
- 8 U. Karlson, W. T. Frankenberger Jr and W. F. Spencer, *J. Chem. Eng. Data*, 1994, **39**, 608–610.
- 9 Diméthylsulfure, *Guide d'intervention chimique*, Centre de Documentation, de Recherche et d'Expérimentations sur les Pollutions Accidentelles des Eaux (Cedre), 2007.
- 10 C. Gabel-Jensen, K. Lunøe and B. Gammelgaard, *Metallomics*, 2010, **2**, 167–173.
- 11 G. L. Long and J. D. Winefordner, *Anal. Chem.*, 1983, **55**, 712A–724A.
- 12 R. de la Torre, X. de la Torre, C. Alía, J. Segura, T. Baró and J. M. Torres-Rodríguez, *Anal. Biochem.*, 2001, **289**, 116–123.
- 13 M. Tsivou, D. Livadara, D. G. Georgakopoulos, M. A. Koupparis, J. Atta-Politou and C. G. Georgakopoulos, *Anal. Biochem.*, 2009, **388**, 146–154.
- 14 M. Tsivou, D. Livadara, D. G. Georgakopoulos, M. A. Koupparis, J. Atta-Politou and C. G. Georgakopoulos, *Anal. Biochem.*, 2009, **388**, 179–191.
- 15 E. J. Want, I. D. Wilson, H. Gika, G. Theodoridis, R. S. Plumb, J. Shockcor, E. Holmes and J. K. Nicholson, *Nat. Protocols*, 2010, **5**, 1005–1018.
- 16 C. Saudan, J. M. Entenza, N. Baume, P. Mangin and M. Saugy, *J. Chromatogr., B: Biomed. Appl.*, 2006, **844**, 168–174.
- 17 E. Lieber, C. N. R. Rao, H. E. Dingle and J. Tectsov, *J. Chem. Eng. Data*, 1966, **11**, 105.
- 18 N. Wiberg, A. F. Holleman, E. Wiberg, *Inorganic Chemistry*, Academic Press Inc, San Diego, 2001.
- 19 M. Lauridsen, S. H. Hansen, J. W. Jaroszewski and C. Cornett, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 1181–1186.
- 20 J. Meija, Interpretation of mass spectra for elemental speciation studies, PhD thesis, University of Cincinnati, 2005.
- 21 J. W. Swearingen Jr, D. P. Frankel, D. E. Fuentes, C. P. Saavedra, C. C. Vásquez and T. G. Chasteen, *Anal. Biochem.*, 2006, **348**, 115.
- 22 R. Burra, G. A. Pradenas, R. A. Montes, C. C. Vásquez and T. G. Chasteen, *Anal. Biochem.*, 2010, **396**, 217.

**SYNTHESE GENERALE
ET
PERSPECTIVES**

Au cours de ce travail de thèse, des techniques analytiques permettant l'identification et la quantification de métabolites sélénisés dans l'urine humaine de sujets non supplémentés ont été développées, afin de pouvoir identifier des biomarqueurs d'exposition potentiels et améliorer les connaissances sur le métabolisme du sélénium. Nous avons choisi de nous intéresser aux formes dissoutes de Se mais également aux formes volatiles, beaucoup moins étudiées.

D'après l'étude bibliographique, le détecteur ICPMS apparaît particulièrement adapté pour l'analyse élémentaire et de spéciation du sélénium à l'état de traces dans les matrices complexes, telles que l'urine ($[Se]_{tot} = 20 - 60 \mu\text{g.L}^{-1}$). Pour l'analyse des formes dissoutes, la chromatographie liquide a été retenue comme technique de séparation en raison des nombreux mécanismes de rétention qui permettent d'adapter la sélectivité en fonction des composés présents. L'urine contient de nombreuses formes inconnues qui peuvent par phénomène de coélution, fausser l'exactitude de l'identification et de la quantification des formes sélénisées. Afin de confirmer les résultats, trois modes chromatographiques (phase inverse sur C18, carbone graphitique poreux, échange de cations) ont été optimisés pour la séparation des formes dissoutes connues, c'est-à-dire dont les étalons étaient disponibles au laboratoire. L'encombrement stérique des sélénosucres SeGal et SeGlu permet, quelles que soient les conditions et le mode chromatographique, une rétention satisfaisante de ces deux formes. Certains composés chargés tels que TMSe^+ ont également pu être retenus par utilisation d'une chromatographie alternative, la chromatographie de paire d'ions ou d'une chromatographie spécifique, la chromatographie d'échange de cations. Les différents modes chromatographiques optimisés ont ensuite été appliqués à l'analyse d'échantillons d'urine. Ainsi au moins deux composés inconnus ont été mis en évidence, et SeGal et TMSe^+ ont pu être quantifiés dans des échantillons d'urine normale. La présence de SeGal en tant que métabolite sélénisé majoritaire dans les échantillons d'urine de sujets non supplémentés a été confirmée. Cependant, une matrice chargée telle que l'urine, ne peut pas être analysée directement et implique une dilution des échantillons, généralement d'un facteur dix, pour ne pas perturber le système d'analyse. Dans ces conditions, de nombreux composés, présents à l'état d'ultra traces dans l'échantillon, peuvent ne pas être détectés. En effet, les résultats de la quantification de SeGal et TMSe^+ dans les échantillons d'urine ont montré qu'environ 77% du sélénium total ne sont pas identifiés et quantifiés en analyse de spéciation. Afin de minimiser le facteur de dilution et ainsi améliorer les performances analytiques, deux méthodes de purification et/ou de préconcentration d'échantillon ont été optimisées. Ces techniques basées sur l'extraction sur phase solide (SPE) ont permis d'obtenir une amélioration globale de la sensibilité d'un facteur quatre. La quantification de TMSe^+ et SeGal est ainsi rendue plus aisée, et la présence de TMSe^+ dans l'urine de personnes non

supplémentées a pu être confirmée. Cette amélioration de la sensibilité a également permis de mettre en évidence plusieurs composés inconnus parmi lesquels la Se-méthylsélénonéine a pu être identifiée par spectrométrie de masse moléculaire. Ce protocole analytique a également permis de confirmer la présence de SeGal avec, pour la première fois, une masse exacte des ions précurseurs et des ions fragments. Afin de s'assurer que la Se-méthylsélénonéine n'était pas un produit de dégradation d'autres composés, lié à l'étape de traitement de l'échantillon, une méthode d'analyse directe a été développée. Cette méthode a permis le suivi en parallèle des formes méthylée et non méthylée et de leurs analogues soufrés dans l'urine et le sang humains. Le rapport entre formes méthylées et non méthylées a permis de conclure à une excrétion préférentielle des formes méthylées par voie urinaire.

Les formes volatiles sélénées ont été analysées par micro-extraction sur phase solide en mode «espace de tête» (HS SPME) combinée à la chromatographie gaz couplée à l'ICPMS (GC-ICPMS). Une évolution du signal des espèces ayant été observée au cours de la journée d'analyse, une étude de stabilité selon différentes conditions de stockage a été réalisée. Les résultats ont permis de souligner l'importance du maniement et du stockage de l'échantillon pour l'analyse des formes volatiles. Afin de conserver la spéciation originelle et assurer la répétabilité des mesures, l'addition d'un bactéricide (NaN_3 0.5 g.L^{-1}) est apparue nécessaire si l'analyse ne peut se faire le jour de la collecte de l'échantillon. Pour une conservation temporaire d'environ 30-35 heures, le stockage à 4°C à l'abri de la lumière est nécessaire. Un stockage à -20°C ou à -80°C permet de conserver l'intégrité des espèces pendant deux ou quatre semaines respectivement. Ces travaux ont permis de confirmer la présence de DMSe dans les urines normales et de mettre en évidence la présence de deux composés mixtes Se/S. Le premier a pu être identifié par GC-APGC-QQQ comme étant le DMSeS. Il s'agit de la première identification structurale de ce composé dans des urines normales. Le second composé pourrait correspondre à DMSeDS, mais sa structure n'a pu être confirmée du fait de son trop faible niveau de concentration.

Du point de vue des perspectives, l'étude des métabolites urinaires volatils du sélénium reste à compléter. Les résultats préliminaires concernant la stabilité des espèces sélénées et sélénées/soufrées montrent tout l'intérêt de disposer d'une méthode analytique suffisamment sensible pour évaluer les biotransformations se produisant dans ce milieu biologique. La réactivité observée dans ce milieu, se traduisant par une agmentation des teneurs en composés mixtes sélénés/soufrés, nécessite d'être mieux comprise à l'aide d'investigations supplémentaires. En particulier, les effets de la matrice urine sur le comportement de DMSe,

précurseur possible de ces composés, restent incompris. La disparition du signal de DMDS_{Se} dans la matrice urine pourrait indiquer sa transformation, totale ou partielle, en une espèce non volatile.

En ce qui concerne les formes dissoutes du sélénium dans l'urine humaine normale, l'analyse d'échantillons provenant de plusieurs sujets a mis en relief d'importantes variations des teneurs en SeGal et TMSe⁺ dans l'urine. Des travaux complémentaires restent donc nécessaires pour comprendre les raisons de ces variations. L'application des protocoles d'extraction sur phase solide a permis la détection de plusieurs composés contenant Se dont les structures restent à identifier. La combinaison des protocoles développés associant SPE et chromatographie bidimensionnelle couplée en parallèle aux détecteurs élémentaire et moléculaire, pourra être appliquée pour l'identification de ces composés. La Se-méthylsélénonéine a été identifiée et détectée dans tous les échantillons analysés, son niveau de concentration reste maintenant à déterminer. Cette étape est subordonnée à l'obtention d'un étalon de pureté contrôlée.

D'après les études menées sur l'ergothionéine et sa forme méthylée nous pouvons supposer que les analogues séléniés de ces composés possèdent de nombreuses propriétés antioxydantes. A l'heure actuelle, la supplémentation sous forme de composés séléniés analogues à l'ergothionéine n'a jamais été testée. L'étude du rôle potentiel de la sélénonéine dans l'alimentation apparaît alors d'un grand intérêt et nécessite également des études en toxicologie. La méthode directe d'analyse présentée dans ce mémoire servirait alors de base pour les futures analyses de quantification de ces formes.

Par ailleurs, l'influence des conditions de prélèvement de l'échantillon, recueilli de manière naturelle dans ce travail, sera également à vérifier. Ainsi, les méthodes analytiques développées ici permettront de comparer la spéciation du sélénium, sous ses formes dissoutes et volatiles, dans l'urine suite à un prélèvement par sonde urinaire, ou naturel. D'autre part, ces outils pourront également être étendus à l'analyse d'échantillons provenant de sujets supplémentés afin de mettre en évidence des biomarqueurs d'exposition potentiels. Ils pourraient également être appliqués à l'analyse de spéciation de Se à l'état de traces dans d'autres échantillons, biologiques ou environnementaux.

BIBLIOGRAPHIE

1. World Health Organization (W.H.O.) and Food Agriculture Organisation, Trace elements in human nutrition and health. 1996: Geneva.
2. Rayman M.P., The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up? *British Journal of Nutrition*, 2004. **92**(4): p. 557-573.
3. Johansson L., Gafvelin G., and Arnér Elias S.J., Selenocysteine in proteins--properties and biotechnological use. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2005. **1726**(1): p. 1-13.
4. Wrobel K., Wrobel K., and Caruso J.A., Pretreatment procedures for characterization of arsenic and selenium species in complex samples utilizing coupled techniques with mass spectrometric detection. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2005. **381**(2): p. 317-331.
5. Trelase S.F., *Bad Earth. Science Monthly*, 1942. **54**: p. 12-28.
6. Schwarz K. and Foltz C. M., Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *Journal of the American Chemical Society*, 1957. **79**(12): p. 3292-3293.
7. Levander O.A., Selenium. Trace elements in human and animal nutrition, ed. e. Mertz W. 1986, Orlando: Academic Press, Inc. p. 209-279
8. Chen X., Yang G., Chen J., Chen X., Wen Z., and Ge K., Studies on the relations of selenium and Keshan disease. *Biological Trace Element Research*, 1980. **2**(2): p. 91-107.
9. Yang G.Q., Chen J.S., Wen Z.M., Ge K.Y., Zhu L.Z., Chen X.C., and Chen X.S., The role of selenium in Keshan disease. *Advances in nutritional research*, 1984. **6**: p. 203-231.
10. Cheng Y.Y. and Qian P.C., The effect of selenium-fortified table salt in the prevention of Keshan disease on a population of 1.05 million. *Biomedical and environmental sciences* 1990. **3**(4): p. 422-428.
11. Yamamuro T., Kashin-Beck disease: a historical overview. *International Orthopaedics*, 2001. **25**(3): p. 134-137.
12. Moreno-Reyes R., Suetens C., Mathieu F., Begaux F., Zhu D., Rivera M. T., Boelaert M., Neve J., Perlmutter N., and Vanderpas J., Kashin-Beck osteoarthropathy in rural Tibet in relation to selenium and iodine status. *The New England journal of medicine*, 1998. **339**(16): p. 1112-1120.
13. Peng A., Yang C., Rui H., and Li H., Study on the pathogenic factors of Kashin-Beck disease. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 1992. **35**(2): p. 79-90.
14. IRSN, I.d.R.e.d.S.N., Sélénium 79 et environnement. Fiche radionucléide 2005.
15. Lide D.R., *Handbook of chemistry and physics*. 2003: CRC Pr I Llc.
16. De Laeter J.R., Böhlke J.K., De Bièvre P., Hidaka H., Peiser H.S., Rosman K.J.R., and Taylor P.D.P., Atomic weights of the elements: Review 2000. *Pure and Applied Chemistry*, 2003. **75**(6): p. 683-800.
17. Anderson J.W., Selenium interactions in sulfur metabolism. *Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants—Regulatory, Agricultural and Environmental Aspects*, 1993: p. 49–60.
18. United States Department of Health and human services, Toxicological profile of selenium. 2003.
19. Levander O.A., Metabolic interrelationships between arsenic and selenium. *Environmental Health Perspectives*, 1977. **19**: p. 159-164.
20. Fishbein L., Environmental selenium and its significance. *Fundamental and applied toxicology*, 1983. **3**: p. 411-419.

21. Cummins L.M. and Kimura E.T., Safety evaluation of selenium sulfide antidandruff shampoos. *Toxicology and applied pharmacology*, 1971. **20**: p. 89-96.
22. George M.W., *Minerals Yearbook 2004: Selenium and Tellurium*. U.S. Geological Survey, 2004.
23. Lemly A.D., Aquatic selenium pollution is a global environmental safety issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2004. **59**(1): p. 44-56.
24. Lee Robert E. and Vandiver Duffield F., Sources of Environmentally Important Metals in the Atmosphere, in *Ultratrace Metal Analysis in Biological Sciences and Environment*. 1979, American Chemical Society: Washington, D. C. p. 146-171.
25. Bisson M., Gay G., Guillard D., Ghillebaert F., and Tack K., Sélénium et ses composés. I N E R I S - Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, 2009.
26. Nriagu J.O., Occurrence and Distribution of Selenium, ed. E. M. Inhat. 1989, Boca Raton: CRC Press. 327-340.
27. Martens D.A. and Suarez D.L., Selenium speciation of marine shales, alluvial soils, and evaporation basin soils of California. *Journal of Environmental Quality*, 1997. **26**(2): p. 424-432.
28. Dumont E., Vanhaecke F., and Cornelis R., Selenium speciation from food source to metabolites: A critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006. **385**(7): p. 1304-1323.
29. Frankenberger W.T. and Engberg R.A., *Environmental chemistry of selenium*. 1998: CRC.
30. Frankenberger Jr W.T. and Benson S., *Selenium in the Environment*. Ed Marcel Dekker, 1994: p. 23.
31. Simonoff M. and Simonoff G., *Le sélénium et la vie*, ed. Masson. 1991.
32. Bujdoš M., Muová A., Kubova J., and Medve J., Selenium fractionation and speciation in rocks, soils, waters and plants in polluted surface mine environment. *Environmental Geology*, 2005. **47**(3): p. 353-360.
33. Tan J., Zhu W., Wang W., Li R., Hou S., Wang D., and Yang L., Selenium in soil and endemic diseases in China. *The Science of the Total Environment*, 2002. **284**(1-3): p. 227-235.
34. Shamberger R.J., Selenium in the environment *1. *The Science of The Total Environment*, 1981. **17**(1): p. 59-74.
35. Oldefield J.E., *Selenium world atlas (Updated Edition)*. Selenium-Tellurium Development Association (STDA), 2002.
36. Gupta U.C. and Gupta S.C., Selenium in soils and crops, its deficiencies in livestock and humans: Implications for management. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 2000. **31**(11): p. 1791-1807.
37. Simonoff M., Selenium: essentialness, content in food, supplementation, deficiency. *Journal de Pharmacie de Belgique*, 1990. **45**(2): p. 141-150.
38. Robberecht H. and Van Grieken R., Selenium in environmental waters: Determination, speciation and concentration levels. *Talanta*, 1982. **29**(10): p. 823-844.
39. Conde J.E. and Alaejos M.S., Selenium concentrations in natural and environmental waters. *Chemical Reviews*, 1997. **97**: p. 1979-2003.
40. World Health Organization WHO. Health criteria and other supporting information. in *Guidelines for drinking-water quality*. 1996. Geneva.
41. Tanzer D. and Heumann K.G., Determination of dissolved selenium species in environmental water samples using isotope dilution mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 1991. **63**(18): p. 1984-1989.

42. Vinceti M., Cann C.I., Calzolari E., Vivoli R., Garavelli L., and Bergomi M., Reproductive outcomes in a population exposed long-term to inorganic selenium via drinking water. *The Science of the Total Environment*, 2000. **250**(1-3): p. 1-7.
43. Vinceti M., Nacci G., Rocchi E., Cassinadri T., Vivoli R., Marchesi C., and Bergomi M., Mortality in a population with long-term exposure to inorganic selenium via drinking water. *Journal of clinical epidemiology*, 2000. **53**(10): p. 1062-1068.
44. Haygarth P.M., Jones K.C., and Harrison A.F., Selenium cycling through agricultural grasslands in the UK: budgeting the role of the atmosphere. *The Science of The Total Environment*, 1991. **103**(1): p. 89-111.
45. Calabrese E.J., Canada A.T., and Sacco C., Trace elements and public health. *Annual review of public health*, 1985. **6**(1): p. 131-146.
46. Cohen E., Kourtchatova G., and Ivanov G., Rapid flameless Atomic-absorption methods for determination of nanogram levels of mercury, beryllium, arsenic and selenium in air. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 2001. **2**(1): p. 49-60.
47. Barceloux D.G., Selenium. *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology*, 1999. **37**(2): p. 145-172.
48. Germ M., Stibilj V., and Kreft I., Metabolic Importance of Selenium for Plants. *European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 2007. **1**(1): p. 91-97.
49. Fox P.M., LeDuc D.L., Hussein H., Lin Z., and Terry N., Selenium speciation in soils and plants. *Biogeochemistry of Environmentally Important Trace Elements*, ed. e. Y. Cai and O. Braids. Vol. 835. 2002: ACS Symp. Ser. p. 339-354.
50. Zayed A., Lytle C.M., and Terry N., Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Planta*, 1998. **206**(2): p. 284-292.
51. Hamilton S.J., Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. *Science of the Total Environment*, 2004. **326**(1-3): p. 1-31.
52. Aro A., Alfthan G., and V. P., Effects of supplementation of fertilizers on human selenium status in Finland. *Analyst*, 1995. **120**: p. 841-843.
53. Barclay M.N.I., MacPherson A., and Dixon J., Selenium content of a range of UK foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 1995. **8**(4): p. 307-318.
54. Terry N., Zayed A.M., De Souza M.P., and Tarun A.S., Selenium in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, 2000. **51**(1): p. 401-432.
55. Combs G.F., Selenium in global food systems. *British Journal of Nutrition*, 2001. **85**(05): p. 517-547.
56. Brown T. and Shrift A., Exclusion of selenium from proteins of selenium- tolerant *Astragalus* species. *Plant Physiology*, 1981. **67**: p. 1051-1061
57. Montes-Bayón M., Molet M.J.D., González E.B., and Sanz-Medel A., Evaluation of different sample extraction strategies for selenium determination in selenium-enriched plants (*Allium sativum* and *Brassica juncea*) and Se speciation by HPLC-ICP-MS. *Talanta*, 2006. **68**(4): p. 1287-1293.
58. De Souza M.P., Pilon-Smits E.A.H., Mel Lytle C.M., Hwang S., Tai J., Honma T.S.U., Yeh L., and Terry N., Rate-limiting steps in selenium assimilation and volatilisation by Indian Mustard. *Plant Physiology*, 1998. **117**: p. 1487-1494.
59. Hartikainen H., Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2005. **18**(4): p. 309-318.
60. Whanger P.D., Metabolic pathways of selenium in plants and animals and their nutritional significance. *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries*, ed. J.K. Lyons TP. 2003. 51-58.
61. Chasteen T.G. and Bentley R., Biomethylation of selenium and tellurium: microorganisms and plants. *Chemical Reviews*, 2003. **103**(1): p. 1-26.

62. Wilber C.G., Toxicology of selenium: a review. *Clinical toxicology*, 1980. **17**(2): p. 171-230.
63. Meija J., Montes-Bayon M., Le Duc D.L., Terry N., and Caruso J.A., Simultaneous Monitoring of Volatile Selenium and Sulfur Species from Se Accumulating Plants (Wild Type and Genetically Modified) by GC/MS and GC/ICPMS Using Solid-Phase Microextraction for Sample Introduction. *Analytical Chemistry*, 2002. **74**(22): p. 5837-5844.
64. Lewis B.G., Johnson C.M., and Broyer T.C., Volatile selenium in higher plants the production of dimethyl selenide in cabbage leaves by enzymatic cleavage of Se-methyl selenomethionine selenonium salt. *Plant and Soil*, 1974. **40**(1): p. 107-118.
65. Whanger P.D., Selenocompounds in plants and animals and their biological significance. *Journal of the American College of Nutrition*, 2002. **21**(3): p. 223-232.
66. Oldfield J.E., Selenium (Se) World Atlas, ed. S.-T.D. Association. 1999, Grimbergen, Belgium.
67. Kroes R., Müller D., Lambe J., Löwik M.R.H., Van Klaveren J., Kleiner J., Massey R., Mayer S., Urieta I., and Verger P., Assessment of intake from the diet. *Food and Chemical Toxicology*, 2002. **40**(2-3): p. 327-385.
68. Lamand M., Tressol J.C., and V. S., Évaluation des pertes minérales à la cuisson dans quelques aliments. *Cahier de nutrition et diététique*, 1997. **32**(1): p. 28-30.
69. Sager M., Selenium in agriculture, food, and nutrition. *Pure and Applied Chemistry*, 2006. **78**(1): p. 111-134.
70. Patrick L., Selenium biochemistry and cancer: a review of the literature. *Alternative Medicine Review*, 2004. **9**(3): p. 239-258.
71. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), Etude de l'alimentation totale française : Mycotoxines, minéraux et éléments traces (Rapport EAT1) <http://www.afssa.fr/Documents/RapportEAT1.pdf> 2006.
72. Rayman M.P., Selenium in cancer prevention: A review of the evidence and mechanism of action. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2005. **64**(4): p. 527-542.
73. Edmonds J.S. and Morita M., The identification of selenium species in biological samples. *Applied organometallic chemistry*, 2000. **14**(3): p. 133-145.
74. Yamashita Y. and Yamashita M., Identification of a Novel Selenium-containing Compound, Selenoneine, as the Predominant Chemical Form of Organic Selenium in the Blood of Bluefin Tuna. *Journal of Biological Chemistry*, 2010. **285**(24): p. 18134-18138.
75. Simonoff M., Hamon C., Moretto P., Llabador Y., and Simonoff G., Selenium in foods in France. *Journal of Food Composition and Analysis*, 1988. **1**(4): p. 295-302.
76. Secor C.L. and Lisk D.J., Variation in the selenium content of individual Brazil nuts. *Journal of Food Safety*, 2007. **9**(4): p. 279-281.
77. Oster O. and Prellwitz W., The daily dietary selenium intake of West German adults. *Biological Trace Element Research*, 1989. **20**: p. 1-7.
78. Fairweather-Tait S., Bioavailability of trace elements. *Food Chemistry*, 1992. **43**: p. 213-217.
79. Cabañero A., Carvalho C., Madrid Y., Batoreu C., and Cámara C., Quantification and speciation of mercury and selenium in fish samples of high consumption in Spain and Portugal. *Biological Trace Element Research*, 2005. **103**(1): p. 17-35.
80. Levander O.A., The scientific rationale for the 1989 Recommended Dietary Allowance for selenium. *Journal of the American Dietetic Association*, 1991. **91**: p. 1572-1576.
81. Cesarini J.P., Le sélénium: actualités. Ed. John Libbey Eurotext, 2004.
82. Daniels L.A., Selenium metabolism and bioavailability. *Biological Trace Element Research*, 1996. **54**(3): p. 185-199.

83. Van Dael P., Lewis J., and Barclay D., Stable isotope-enriched selenite and selenate tracers for human metabolic studies: a fast and accurate method for their preparation from elemental selenium and their identification and quantification using hydride generation atomic absorption spectrometry. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2004. **18**(1): p. 75-80.
84. Levander O.A., Considerations in the design of selenium bioavailability studies. *Federation proceedings*, 1983. **42** ((6)): p. 1721-1725.
85. Xia Y., Hill K.E., Byrne D.W., Xu J., and Burk R.F., Effectiveness of selenium supplements in a low-selenium area of China. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2005. **81**(4): p. 829-834.
86. Calvo A., Xiao N., Kang J., Best C.J.M., Leiva I., Emmert-Buck M.R., Jorcyk C., and Green J.E., Alterations in gene expression profiles during prostate cancer progression: functional correlations to tumorigenicity and down-regulation of selenoprotein-P in mouse and human tumors. *Cancer Research*, 2002. **62**(18): p. 5325-5335.
87. Clark L.C., Combs Jr G.F., Turnbull B.W., Slate E.H., Chalker D.K., Chow J., Davis L.S., Glover R.A., Graham G. F., Gross E.G., Krongrad A., Leshner Jr J.L., Park H.K., Sanders Jr B.B., Smith C.L., and Taylor J.R., Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin: A randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association*, 1996. **276**(24): p. 1957-1963.
88. Thompson H.J., Selenium as an anticarcinogen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1984. **32**(3): p. 422-425.
89. Raich P.C., Lü J., Thompson H.J., and Combs G.F., Selenium in cancer prevention: clinical issues and implications. *Cancer investigation*, 2001. **19**(5): p. 540-553.
90. Delmas-Beauvieux M.C., Peuchant E., Couchouron A., Constans J., Sergeant C., Simonoff M., Pellegrin J. L., Leng B., Conri C., and Clerc M., The enzymatic antioxidant system in blood and glutathione status in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients: Effects of supplementation with selenium or β -carotene. *American Journal of Clinical Nutrition* 1996. **64**(1): p. 101-107.
91. Baum M.K., Shor-Posner G., Lai S., Zhang G., Lai H., Fletcher M.A., Sberlich H., and Page J. B., High risk of HIV-related mortality is associated with selenium deficiency. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 1997. **15**: p. 370-374.
92. Friis H., Kæstel P., Iversen A.N.K., Bügel S., and Friis H., Selenium and HIV infection. *Micronutrients & HIV infection*. 2001. 183.
93. Schrauzer G.N., Selenium yeast: Composition, quality, analysis, and safety. *Pure and Applied Chemistry*, 2006. **78**(1): p. 105-110.
94. Clausen J. and Nielsen S.A., Comparison of whole blood selenium values and erythrocytes of glutathione peroxidase activities of normal individuals on supplementation with selenate, selenite, L-selenomethionine and high selenium yeast. *Biological Trace Element Research* 1988. **15**: p. 125-138.
95. Chappuis P., *Les oligoéléments en médecine et biologie*. Ed. Médicales Internationales, 1991.
96. Mertz W., The essential trace elements. *Science*, 1981. **213**(4514): p. 1332-1338.
97. Théron P., Malvy D., and Favier A., Toxicité du sélénium à doses pharmacologiques par voie orale. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 1997. **11**(2): p. 91-101.
98. Wada O., Kurihara N., and Yamazaki N., Essentiality and toxicity of trace elements. *Journal of Nutritional Assessment* 2003. **10**: p. 199-210.
99. Oldfield J.E., The two faces of selenium. *Journal of Nutrition*, 1987. **117**(12): p. 2002-2008.
100. Sunde R.A., Molecular biology of selenoproteins. *Annual review of nutrition*, 1990. **10**(1): p. 451-474.

101. Papp L.V., Lu J., Holmgren A., and Khanna K.K., From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxidants & redox signaling*, 2007. **9**(7): p. 775-806.
102. Rayman M.P., The importance of selenium to human health. *The Lancet*, 2000. **356**(9225): p. 233-241.
103. Allan C.B., Lacourciere G.M., and Stadtman T.C., Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium. *Annual review of nutrition*, 1999. **19**: p. 1-16.
104. Diplock A.T., Antioxidants and disease prevention. *Molecular Aspects of Medicine*, 1994. **15**: p. 293-376.
105. Spallholz J.E., Boylan L.M., and Larsen H.S., Advances in understanding selenium's role in the immune system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1990. **587**: p. 123-139.
106. Arthur J.R. and Beckett G.J., Newer aspects of micronutrients in risk groups: new metabolic roles for selenium. *Proceedings of the Nutrition Society* 1994. **53**: p. 615-624.
107. Holben D.H. and Smith A.M., The Diverse Role of Selenium within Selenoproteins: A Review. *Journal of the American Dietetic Association*, 1999. **99**(7): p. 836-843.
108. Ursini F., Heim S., Kiess M., Maiorino M., Roveri A., Wissing J., and Flohé L., Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science*, 1999. **285**(5432): p. 1393-1396.
109. Arthur J.R., Nicol F., and Beckett G.J., The role of selenium in thyroid hormone metabolism and effects of selenium deficiency on thyroid hormone and iodine metabolism. *Biological trace element research*, 1992. **34**(3): p. 321-325.
110. Beckett G.J., Mac Dougall D.A., Nicol F., and Arthur R., Inhibition of type I and type II iodothyronine deiodinase activity in rat liver, kidney and brain produced by selenium deficiency. *Biochemical Journal*, 1989. **259**(3): p. 887-892.
111. Burk R.F. and Hill K.E., Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Annual review of nutrition*, 2005. **25**: p. 215-235.
112. Burk R.F., Hill K.E., and Motley A.K., Selenoprotein metabolism and function: evidence for more than one function for selenoprotein P. *Journal of Nutrition*, 2003. **133**(5): p. 1517S-1520S.
113. Arteel G.E., Briviba K., and Sies H., Protection against peroxynitrite. *Federation of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology letters*, 1999. **445**(2-3): p. 226-230.
114. Behne D., Kyriakopoulos A., Kalcklösch M., Weiss-Nowak C., Pfeifer H., Gessner H., and Hammel C., Two new selenoproteins found in the prostatic glandular epithelium and the spermatid nuclei. *Biomedical and Environmental Sciences* 1997. **10**: p. 340-345.
115. Behne D., Pfeifer H., Rothlein D., and Kyriakopoulos A., Cellular and subcellular distribution of selenium and selenoproteins. *Trace elements in man and animals 10: proceedings of the tenth international symposium on trace elements in man and animals*, ed. F.A. Roussel AM, Anderson RA, eds. 2000, New York: Plenum Press. p. 29-33.
116. Boles J.O., Cisneros R.J., Weir M.S., Odom J.D., Villafranca J.E., and Dunlap R.B., Purification and characterization of selenomethionyl thymidylate synthase from *Escherichia coli*: comparison with the wild-type enzyme. *Biochemistry*, 1991. **30**(46): p. 11073-11080.
117. Huber R.E. and Criddle R.S., The isolation and properties of [beta]-galactosidase from *Escherichia coli* grown on sodium selenate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1967. **141**(3): p. 587-599.
118. Galan P., Preziosi P., Monget A.L., Richard M.J., Arnaud J., Lesourd B., Girodon F., Munoz Alferez M.J., Bourgeois C., Keller H., Favier A., and Hercberg S., Effects of trace element and/or vitamin supplementation on vitamin and mineral status, free radical

- metabolism and immunological markers in elderly long term-hospitalized subjects. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 1997. **67**(6): p. 450-460.
119. Dubois F. and Belleville F., Selenium: Physiology and human medical implications. *Sélénium: rôle physiologique et intérêt en pathologie humaine Transactions of the Zoological Society of London*, 1988. **36**(8): p. 1017-1025.
 120. Sappey C., Legrand-Poels S., Best-Belpomme M., Favier A., Rentier B., and Piette J., Stimulation of glutathione peroxidase activity decreases HIV type 1 activation after oxidative stress. *AIDS research and human retroviruses*, 1994. **10**(11): p. 1451-1461.
 121. Taylor E.W., Nadimpalli R.G., and Ramanathan C.S., Genomic structures of viral agents in relation to the biosynthesis of selenoproteins. *Biological trace element research*, 1997. **56**(1): p. 63-91.
 122. Martin A., *Apports nutritionnels conseillés pour la population française* Tec & Doc, ed. France: CNERNA-CNRS, Afssa, 2001.
 123. Neve J., Physiological and nutritional importance of selenium. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1991. **47**(2): p. 187-193.
 124. Neve J., Vertongen F., and Molle L., Selenium deficiency. *Clinics in endocrinology and metabolism*, 1985. **14**(3): p. 629-656.
 125. Navarro-Alarcón M. and López-Martínez M.C., Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. *The Science of The Total Environment*, 2000. **249**(1-3): p. 347-371.
 126. Van Rij A.M., Mc Kenzie J.M., Robinson M.F., and Thomson C.D., Selenium and total parenteral nutrition. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 1979. **3**(4): p. 235-239
 127. Van Rij A.M., McKenzie J.M., Thomson C.D., and Robinson M.F., Selenium supplementation in total parenteral nutrition. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 1981. **5**(2): p. 120-124.
 128. Baruthio F., *Toxicologie des éléments trace essentiels. Les oligo-éléments en Médecine et Biologie.*, ed. C.P. ed. 1991, Paris: Lavoisier Tec &Doc. p. 213-310.
 129. Ruta D.A. and Haider S., Attempted murder by selenium poisoning. *British Medical Journal*, 1989. **299**(6694): p. 316.
 130. Tinggi U., Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. *Toxicology letters*, 2003. **137**(1-2): p. 103-110.
 131. Cases N., See K.A., Lavercombe P.S., Dillon J., and Ginsberg R., Accidental death from acute selenium poisoning. *The Medical Journal of Australia*, 2006. **185**(7): p. 388-389.
 132. Helzlsouer K., Jacobs R., and Morris S., Acute selenium intoxication in the United States. *Federation Proceedings/Mercury*, 1985. **44**: p. 1670-1678.
 133. Kunli L., Lirong X., Jian'an T., Douhu W., and Lianhua X., Selenium source in the selenosis area of the Daba region, South Qinling Mountain, China. *Environmental Geology*, 2004. **45**(3): p. 426-432.
 134. Raisbeck M.F., Selenosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2000. **16**(3): p. 465-480.
 135. Olson O.E., Selenium Toxicity in Animals with Emphasis on Man. *International Journal of Toxicology*, 1986. **5**(1): p. 45 - 70.
 136. Kremer D., Ilgen G., and Feldmann J., GC-ICP-MS determination of dimethylselenide in human breath after ingestion of ⁷⁷Se-enriched selenite: monitoring of in-vivo methylation of selenium. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2005. **383**(3): p. 509-515.
 137. Lobinski R., Edmonds J.S., Suzuki K.T., and Uden P.C., Species-selective determination of selenium compounds in biological materials. *Pure and Applied Chemistry*, 2000. **72**(3): p. 447-462.

138. Ogra Y. and Anan Y., Selenometabolomics: Identification of selenometabolites and specification of their biological significance by complementary use of elemental and molecular mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2009. **24**(11): p. 1477-1488.
139. Thomas D. and Surdin-Kerjan Y., Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997. **61**(4): p. 503-532.
140. Xu X.M., Carlson B.A., Irons R., Mix H., Zhong N., Gladyshev V.N., and Hatfield D.L., Selenophosphate synthetase 2 is essential for selenoprotein biosynthesis. *Biochemical Journal*, 2007. **404**(1): p. 115-120.
141. Xu X.M., Carlson B.A., Mix H., Zhang Y., Saira K., Glass R.S., Berry M.J., Gladyshev V.N., and Hatfield D.L., Biosynthesis of selenocysteine on its tRNA in eukaryotes. *Public Library of Science Biology*, 2007. **5**(1): p. e4.
142. Yuan J., Palioura S., Salazar J.C., Su D., O'Donoghue P., Hohn M. J., Cardoso A.M., Whitman W.B., and Söll D., RNA-dependent conversion of phosphoserine forms selenocysteine in eukaryotes and archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006. **103**(50): p. 18923-18927.
143. Allmang C. and Krol A., Selenoprotein synthesis: UGA does not end the story. *Biochimie*, 2006. **88**(11): p. 1561-1571.
144. Böck A., Forchhammer K., Heider J., Leinfelder W., Sawers G., Veprek B., and Zinoni F., Selenocysteine: the 21st amino acid. *Molecular Microbiology*, 1991. **5**(3): p. 515-520.
145. Itoh M. and Suzuki K.T., Effects of dose on the methylation of selenium to monomethylselenol and trimethylselenonium ion in rats. *Archives of toxicology*, 1997. **71**(7): p. 461-466.
146. Slotnick M.J. and Nriagu J.O., Validity of human nails as a biomarker of arsenic and selenium exposure: a review. *Environmental research*, 2006. **102**(1): p. 125-139.
147. Francesconi K.A., Tanggaard R., M. C.J., and G. W., Arsenic metabolites in human urine after ingestion of an arsenosugar *Clinical Chemistry*, 2002. **48**: p. 92-101.
148. Achari R., Mayersohn M., and Conrad K.A., HPLC analysis of creatinine in human plasma and urine *Journal of Chromatographic Science*, 1983. **21**: p. 278-281.
149. Franson J.C., Hoffman D.J., Wells-Berlin A., Perry M.C., Shearn-Bochsler V., Finley D.L., Flint P.L., and Hollmen T., Effects of dietary selenium on tissue concentrations, pathology, oxidative stress, and immune function in common eiders (*Somateria mollissima*). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 2007. **70**(10): p. 861-874.
150. Oster O., Schmiedel G., and Prellwitz W., The organ distribution of selenium in German adults. *Biological Trace element Research*, 1988. **15**(1): p. 23-45.
151. Levander O.A., A global view of human selenium nutrition. *Annual review of nutrition*, 1987. **7**(1): p. 227-250.
152. McConnell K.P. and Roth D.M., Respiratory Excretion of Selenium. *Experimental Biology and Medicine*, 1966. **123**(3): p. 919.
153. Kuehnelt D., Juresa D., Kienzl N., and Francesconi K.A., Marked individual variability in the levels of trimethylselenonium ion in human urine determined by HPLC/ICPMS and HPLC/vapor generation/ICPMS. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2006. **386**(7): p. 2207-2212.
154. Sanz Alaejos M. and Diaz Romero C., Urinary selenium concentrations. *Clinical Chemistry*, 1993. **39**(10): p. 2040-2052.
155. Robberecht H.J. and Deelstra H.A., Selenium in human urine: concentration levels and medical implications. *Clinica Chimica Acta*, 1984. **136**(2-3): p. 107-120.

156. Moser-Veillon P.B., Mangels A.R., Patterson K.Y., and Veillon C., Utilization of two different chemical forms of selenium during lactation using stable isotope tracers: an example of speciation in nutrition. *The Analyst*, 1992. **117**(3): p. 559-562.
157. Oster O. and Prellwitz W., The renal excretion of selenium. *Biological Trace Element Research*, 1990. **24**(2): p. 119-146.
158. Thomson C.D. and Stewart R.D.H., The metabolism of [⁷⁵Se] selenite in young women. *British Journal of Nutrition*, 1978. **32**(1): p. 47-57.
159. Robinson J.R., Robinson M.F., Levander O.A., and Thomson C.D., Urinary excretion of selenium by New Zealand and North American human subjects on differing intakes. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1985. **41**(5): p. 1023-1031.
160. Kuehnelt D., Kienzl N., Traar P., Le N.H., Francesconi K.A., and Ochi T., Selenium metabolites in human urine after ingestion of selenite, L-selenomethionine, or DL-selenomethionine: a quantitative case study by HPLC/ICPMS. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2005. **383**(2): p. 235-246.
161. Dumont E., Ogra Y., Suzuki K.T., Vanhaecke F., and Cornelis R., Liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry for on-line characterization, monitoring and isotopic profiling of the main selenium-metabolite in human urine after consumption of Se-rich and Se-enriched food. *Analytica Chimica Acta*, 2006. **555**(1): p. 25-33.
162. Francesconi K.A. and Pannier F., Selenium metabolites in urine: A critical overview of past work and current status. *Clinical Chemistry*, 2004. **50**(12): p. 2240-2253.
163. Ogra Y., Ishiwata K., Takayama H., Aimi N., and Suzuki K. T., Identification of a novel selenium metabolite, Se-methyl-N-acetylselenohexosamine, in rat urine by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry and-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2002. **767**(2): p. 301-312.
164. Zeisel S.H., Ellis A.L., Sun X.F., Pomfret E.A., Ting B.T.G., and Janghorbani M., Dose-response relations in urinary excretion of trimethylselenonium in the rat. *Journal of Nutrition*, 1987. **117**(9): p. 1609-1614.
165. Bueno M. and Pannier F., Quantitative analysis of volatile selenium metabolites in normal urine by headspace solid phase microextraction gas chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*, 2009. **78**(3): p. 759-763.
166. Byard J.L., Trimethyl selenide. A urinary metabolite of selenite. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1969. **130**: p. 556-560.
167. Gammelgaard B., Jessen K.D., Kristensen F.H., and Jons O., Determination of trimethylselenonium ion in urine by ion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta*, 2000. **404**(1): p. 47-54.
168. Gammelgaard B., Jøns O., and Bendahl L., Selenium speciation in pretreated human urine by ion-exchange chromatography and ICP-MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2001. **16**(4): p. 339-344.
169. Wrobel K., Wrobel K., Kannamkumarath S.S., and Caruso J.A., Identification of selenium species in urine by ion-pairing HPLC-ICP-MS using laboratory-synthesized standards. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2003. **377**(4): p. 670-674.
170. Zheng J., Shibata Y., and Tanaka A., Study of the stability of selenium compounds in human urine and determination by mixed ion-pair reversed-phase chromatography with ICP-MS detection. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2002. **374**(2): p. 348-353.
171. Yang K.L. and Jiang S.J., Determination of selenium compounds in urine samples by liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry with an ultrasonic nebulizer. *Analytica Chimica Acta*, 1995. **307**(1): p. 109-115.

172. Quijano M., Gutiérrez A.M., Pérez-Conde M.C., and Cámara C., Determination of selenium species in human urine by high performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*, 1999. **50**(1): p. 165-173.
173. Suzuki K.T., Kurasaki K., Okazaki N., and Ogra Y., Selenosugar and trimethylselenonium among urinary Se metabolites: dose-and age-related changes. *Toxicology and applied pharmacology*, 2005. **206**(1): p. 1-8.
174. Kuehnelt D., Juresa D., Francesconi K.A., Fakih M., and Reid M.E., Selenium metabolites in urine of cancer patients receiving l-selenomethionine at high doses. *Toxicology and applied pharmacology*, 2007. **220**(2): p. 211-215.
175. Kobayashi Y., Ogra Y., Ishiwata K., Takayama H., Aimi N., and Suzuki K.T., Selenosugars are key and urinary metabolites for selenium excretion within the required to low-toxic range. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002. **99**(25): p. 15932-15936.
176. Suzuki K.T., *Metabolomics of selenium: Se metabolites based on speciation studies*. *Journal of Health Science*, 2005. **51**(2): p. 107-114.
177. Gammelgaard B., Madsen K.G., Bjerrum J., Bendahl L., Jøns O., Olsen J., and Sidenius U., Separation, purification and identification of the major selenium metabolite from human urine by multi-dimensional HPLC-ICP-MS and APCI-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2003. **18**(1): p. 65-70.
178. Bendahl L. and Gammelgaard B., Separation and identification of Se-methylselenogalactosamine - A new metabolite in basal human urine - By HPLC-ICP-MS and CE-nano-ESI-(MS) 2. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2004. **19**(8): p. 950-957.
179. Gammelgaard B. and Bendahl L., Selenium speciation in human urine samples by LC- and CE-ICP-MS - Separation and identification of selenosugars. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2004. **19**(1): p. 135-142.
180. Juresa D., Kuehnelt D., and Francesconi K.A., Consequences of vapor enhancement on selenium speciation analysis by HPLC/ICPMS. *Analytical Chemistry*, 2006. **78**(24): p. 8569-8574.
181. Gammelgaard B. and Jøns O., Determination of selenite and selenate in human urine by ion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2000. **15**(8): p. 945-949.
182. Ochsenkühn-Petropoulou M.T. and Tsopelas F.N., Separation of organoselenium compounds and their electrochemical detection. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2004. **379**(5): p. 770-776.
183. Yu H., Chen C., Gao Y., Li B., and Chai Z., Selenium speciation in biological samples using a hyphenated technique of high-performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2006. **34**(6): p. 749-753.
184. Wang R.Y., Hsu Y.L., Chang L.F., and Jiang S.J., Speciation analysis of arsenic and selenium compounds in environmental and biological samples by ion chromatography-inductively coupled plasma dynamic reaction cell mass spectrometer. *Analytica chimica acta*, 2007. **590**(2): p. 239-244.
185. Kuo C.Y. and Jiang S.J., Determination of selenium and tellurium compounds in biological samples by ion chromatography dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2008. **1181**(1-2): p. 60-66.
186. Chatterjee A., Shibata Y., Tao H., Tanaka A., and Morita M., High-performance liquid chromatography-ultrasonic nebulizer high-power nitrogen microwave-induced plasma mass spectrometry, real-time on-line coupling for selenium speciation analysis. *Journal of Chromatography A*, 2004. **1042**(1-2): p. 99-106.

187. Chatterjee A., Tao H., Shibata Y., and Morita M., Determination of selenium compounds in urine by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2003. **997**(1-2): p. 249-257.
188. Gammelgaard B., Bendahl L., Sidenius U., and Jøns O., Selenium speciation in urine by ion-pairing chromatography with perfluorinated carboxylic acids and ICP-MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2002. **17**(6): p. 570-575.
189. Zheng J., Ohata M., and Furuta N., Reversed-phase liquid chromatography with mixed ion-pair reagents coupled with ICP-MS for the direct speciation analysis of selenium compounds in human urine. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2002. **17**(7): p. 730-735.
190. Pan F., Tyson J.F., and Uden P.C., Simultaneous speciation of arsenic and selenium in human urine by high-performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2007. **22**(8): p. 931-937.
191. Juresa D., Darrouzès J., Kienzl N., Bueno M., Pannier F., Potin-Gautier M., Francesconi K.A., and Kuehnelt D., An HPLC/ICPMS study of the stability of selenosugars in human urine: Implications for quantification, sample handling, and storage. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2006. **21**(7): p. 684-690.
192. Kresimon J., Grüter U., and Hirner A., HG/LT-GC/ICP-MS coupling for identification of metal (loid) species in human urine after fish consumption. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 2001. **371**(5): p. 586-590.
193. Díaz Huerta V., Szpunar J., Lobinski R., Sanchez M.L.F., and Sanz-Medel A., Sample preparation for identification of selenocompounds in urine by electrospray-MS/MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2003. **18**(12): p. 1471-1476.
194. Gammelgaard B. and Jøns O., Determination of selenium in urine by inductively coupled plasma mass spectrometry: interferences and optimisation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1999. **14**: p. 867-874.
195. Juresa D., Blanusa M., Francesconi K.A., Kienzl N., and Kuehnelt D., Biological availability of selenosugars in rats. *Chemico-biological interactions*, 2007. **168**(3): p. 203-210.
196. Poole C.F., New trends in solid-phase extraction. *Trends in Analytical Chemistry*, 2003. **22**(6): p. 362-373.
197. Huck C.W. and Bonn G.K., Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 2000. **885**(1-2): p. 51-72.
198. Gomez M.M., Gasparic T., Palacios M.A., and Camara C., Determination of five selenium compounds in urine by liquid chromatography with focused microwave assisted digestion and hydride generation-atomic absorption spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta*, 1998. **374**(2-3): p. 241-251.
199. Fontanals N., Marcé R.M., and Borrull F., New hydrophilic materials for solid-phase extraction. *Trends in Analytical Chemistry*, 2005. **24**(5): p. 394-406.
200. Interchim, *Extraction sur phase solide*. 2010.
201. Ogra Y., Hatano T., Ohmichi M., and Suzuki K.T., Oxidative production of monomethylated selenium from the major urinary selenometabolite, selenosugar. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2003. **18**(10): p. 1252-1255.
202. Gammelgaard B., Bendahl L., Jacobsen N.W., and Stürup S., Quantitative determination of selenium metabolites in human urine by LC-DRC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2005. **20**(9): p. 889-893.
203. Wahl H.G., Hoffmann A., Luft D., and Liebich H.M., Analysis of volatile organic compounds in human urine by headspace gas chromatography-mass spectrometry with a multipurpose sampler. *Journal of Chromatography A*, 1999. **847**(1-2): p. 117-125.

204. Michael L.C., Erickson M.D., Parks S.P., and Pellizzari E.D., Volatile environmental pollutants in biological matrixes with a headspace purge technique. *Analytical Chemistry*, 1980. **52**(12): p. 1836-1841.
205. Polkowska Z., Kozłowska K., Mazerska Z., Gorecki T., and Namiesnik J., Volatile organohalogen compounds in human urine: The effect of environmental exposure. *Chemosphere*, 2006. **62**(4): p. 626-640.
206. Flórez Menéndez J.C., Fernández Sánchez M.L., Sánchez Uría J.E., Fernández Martínez E., and Sanz-Medel A., Static headspace, solid-phase microextraction and headspace solid-phase microextraction for BTEX determination in aqueous samples by gas chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 2000. **415**(1-2): p. 9-20.
207. Zlatkis A. and Liebich H.M., Profile of volatile metabolites in human urine. *Clinical Chemistry*, 1971. **17**(7): p. 592-594.
208. Zlatkis A., Bertsch W., Lichtenstein H.A., Tishbee A., Shunbo F., Liebich H.M., Coscia A.M., and Fleischer N., Profile of volatile metabolites in urine by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 1973. **45**(4): p. 763-767.
209. Brown S.D., Rhodes D.J., and Pritchard B.J., A validated SPME-GC-MS method for simultaneous quantification of club drugs in human urine. *Forensic science international*, 2007. **171**(2-3): p. 142-150.
210. Kuriki A., Kumazawa T., Lee X.P., Hasegawa C., Kawamura M., Suzuki O., and Sato K., Simultaneous determination of selegiline and desmethylselegiline in human body fluids by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2006. **844**(2): p. 283-291.
211. Mills G.A. and Walker V., Headspace solid-phase microextraction profiling of volatile compounds in urine: application to metabolic investigations. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2001. **753**(2): p. 259-268.
212. de la Calle Guntiñas M.B., Ceulemans M., Witte C., Lobinski R., and Adams F.C., Evaluation of a purge-and-trap injection system for capillary gas chromatography-microwave induced plasma-atomic emission spectrometry for the determination of volatile selenium compounds in water. *Microchimica Acta*, 1995. **120**(1): p. 73-82.
213. Campillo N., Aguinaga N., Vinas P., López-García I., and Hernández-Córdoba M., Gas chromatography with atomic emission detection for dimethylselenide and dimethyldiselenide determination in waters and plant materials using a purge-and-trap preconcentration system. *Journal of Chromatography A*, 2005. **1095**(1-2): p. 138-144.
214. Landaluze J.S., Dietz C., Madrid Y., and Camara C., Volatile organoselenium monitoring in production and gastric digestion processes of selenized yeast by solid-phase microextraction-multicapillary gas chromatography coupled microwave-induced plasma atomic emission spectrometry. *Applied Organometallic Chemistry*, 2004. **18**(12): p. 606-613.
215. Dietz C., Sanz Landaluze J., Ximenez-Embun P., Madrid-Albarran Y., and Camara C., Volatile organo-selenium speciation in biological matter by solid phase microextraction-moderate temperature multicapillary gas chromatography with microwave induced plasma atomic emission spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta*, 2004. **501**(2): p. 157-167.
216. Dietz C., Pérez-Corona T., Madrid-Albarrán Y., and Cámara C., SPME for on-line volatile organo-selenium speciation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2003. **18**(5): p. 467-473.
217. Burra R., Pradenas G.A., Montes R.A., Vásquez C.C., and Chasteen T.G., Production of dimethyl triselenide and dimethyl diselenenyl sulfide in the headspace of metalloid-resistant *Bacillus* species grown in the presence of selenium oxyanions. *Analytical biochemistry*. **396**(2): p. 217-222.

218. Swearingen Jr J.W., Frankel D.P., Fuentes D.E., Saavedra C.P., Vasquez C.C., and Chasteen T.G., Identification of biogenic dimethyl selenodisulfide in the headspace gases above genetically modified *Escherichia coli*. *Analytical biochemistry*, 2006. **348**(1): p. 115-122.
219. Meija J., Bryson J.M., Vonderheide A.P., Montes-Bayon M., and Caruso J.A., Studies of selenium-containing volatiles in roasted coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003. **51**(17): p. 5116-5122.
220. Belardi R.P. and Pawliszyn J.B., The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns. *Water Quality Research Journal of Canada*, 1989. **24**(1): p. 179-191.
221. Mester Z., Sturgeon R., and Pawliszyn J., Solid phase microextraction as a tool for trace element speciation. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2001. **56**(3): p. 233-260.
222. Haberhauer-Troyer C., Crnoja M., Rosenberg E., and Grasserbauer M., Surface characterization of commercial fibers for solid-phase microextraction and related problems in their application. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 2000. **366**(4): p. 329-331.
223. Mills G.A. and Walker V., Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials. *Journal of Chromatography A*, 2000. **902**(1): p. 267-287.
224. Poli D., Manini P., Andreoli R., Franchini I., and Mutti A., Determination of dichloromethane, trichloroethylene and perchloroethylene in urine samples by headspace solid phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2005. **820**(1): p. 95-102.
225. Supelco (Sigma Aldrich), Solid Phase Microextraction Theory and Basics of a modern Sample Preparation Technique. 2010.
226. Morales R., López-Sánchez J.F., and Rubio R., Selenium speciation by capillary electrophoresis. *Trends in Analytical Chemistry*, 2008. **27**(2): p. 183-189.
227. Mounicou S., McSheehy S., Szpunar J., Potin-Gautier M., and Lobinski R., Analysis of selenized yeast for selenium speciation by size-exclusion chromatography and capillary zone electrophoresis with inductively coupled plasma mass spectrometric detection (SEC-CZE-ICP-MS). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2002. **17**(1): p. 15-20.
228. Casiot C., Donard O.F.X., and Potin-Gautier M., Optimization of the hyphenation between capillary zone electrophoresis and inductively coupled plasma mass spectrometry for the measurement of As-, Sb-, Se- and Te-species, applicable to soil extracts. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2002. **57**(1): p. 173-187.
229. Uden P., Modern trends in the speciation of selenium by hyphenated techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2002. **373**(6): p. 422-431.
230. Suzuki K.T., Itoh M., and Ohmichi M., Selenium distribution and metabolic profile in relation to nutritional selenium status in rats. *Toxicology*, 1995. **103**(3): p. 157-165.
231. Ogra Y. and Suzuki K.T., Speciation of selenocompounds by capillary HPLC coupled with ICP-MS using multi-mode gel filtration columns. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2005. **20**(1): p. 35-39.
232. Ohta Y., Kobayashi Y., Konishi S., and Hirano S., Speciation analysis of selenium metabolites in urine and breath by HPLC- and GC-inductively coupled plasma-MS after administration of selenomethionine and methylselenocysteine to rats. *Chemical Research in Toxicology*, 2009. **22**(11): p. 1795-1801.
233. Suzuki K.T., Doi C., and Suzuki N., Metabolism of ⁷⁶Se-methylselenocysteine compared with that of ⁷⁷Se-selenomethionine and ⁸²Se-selenite. *Toxicology and applied pharmacology*, 2006. **217**(2): p. 185-195.

234. Suzuki K.T., Kurasaki K., Ogawa S., and Suzuki N., Metabolic transformation of methylseleninic acid through key selenium intermediate selenide. *Toxicology and applied pharmacology*, 2006. **215**(2): p. 189-197.
235. Suzuki K.T., Somekawa L., and Suzuki N., Distribution and reuse of ⁷⁶Se-selenosugar in selenium-deficient rats. *Toxicology and applied pharmacology*, 2006. **216**(2): p. 303-308.
236. Suzuki K.T., Ohta Y., and Suzuki N., Availability and metabolism of ⁷⁷Se-methylseleninic acid compared simultaneously with those of three related seleno compounds. *Toxicology and applied pharmacology*, 2006. **217**(1): p. 51-62.
237. Suzuki K.T., Somekawa L., Kurasaki K., and Suzuki N., Simultaneous tracing of ⁷⁶Se-selenite and ⁷⁷Se-selenomethionine by absolute labeling and speciation. *Toxicology and applied pharmacology*, 2006. **217**(1): p. 43-50.
238. Letsiou S., Nischwitz V., Traar P., Francesconi K.A., and Pergantis S.A., Determination of selenosugars in crude human urine using high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007. **21**(3): p. 343-351.
239. Kuehnelt D., Kienzl N., Juresa D., and Francesconi K.A., HPLC/vapor generation/ICPMS of selenium metabolites relevant to human urine—selective determination of trimethylselenonium ion. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2006. **21**: p. 1264 - 1270.
240. Marchante-Gayón J.M., Feldmann I., Thomas C., and Jakubowski N., Speciation of selenium in human urine by HPLC-ICP-MS with a collision and reaction cell. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2001. **16**(5): p. 457-463.
241. Cao T.H., Cooney R.A., Woznichak M.M., May S.W., and Browner R.F., Speciation and identification of organoselenium metabolites in human urine using inductively coupled plasma mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2001. **73**(13): p. 2898-2902.
242. LaFuente J.M.G., Dlaska M., Sánchez M.L.F., and Sanz-Medel A., Organic and inorganic selenium speciation in urine by on-line vesicle mediated high-performance liquid chromatography–focused microwave digestion–hydride generation–inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1998. **13**(5): p. 423-429.
243. Lindsay S. and Barnes J., *High performance liquid chromatography*. 1992: Wiley.
244. Waters, *Atlantis column. Application netbook*, 2004.
245. Michel M. and Buszewski B., Porous graphitic carbon sorbents in biomedical and environmental applications. *Adsorption*, 2009. **15**(2): p. 193-202.
246. Hennion M.C., Coquart V., Guenu S., and Sella C., Retention behaviour of polar compounds using porous graphitic carbon with water-rich mobile phases. *Journal of Chromatography A*, 1995. **712**(2): p. 287-301.
247. Elfakir C., Chaimbault P., and Dreux M., Determination of inorganic anions on porous graphitic carbon using evaporative light scattering detection:: Use of carboxylic acids as electronic competitors. *Journal of Chromatography A*, 1998. **829**(1-2): p. 193-199.
248. Chaimbault P., Petritis K., Elfakir C., and Dreux M., Ion-pair chromatography on a porous graphitic carbon stationary phase for the analysis of twenty underivatized protein amino acids. *Journal of Chromatography A*, 2000. **870**(1-2): p. 245-254.
249. Elfakir C. and Lafosse M., Porous graphitized carbon and octadecyl-silica columns in the separation of some alkylglycoside detergents. *Journal of Chromatography A*, 1997. **782**(2): p. 191-198.
250. Fish B.J., Use of a porous graphitic carbon column to separate cis and trans isomers in a novel anti-asthma compound. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 1993. **11**(6): p. 517-521.

251. Lindemann T. and Hintelmann H., Selenium speciation by HPLC with tandem mass spectrometric detection. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 2002. **372**(3): p. 486-490.
252. Dauthieu M., Bueno M., Darrouzes J., Gilon N., and Potin-Gautier M., Evaluation of porous graphitic carbon stationary phase for simultaneous preconcentration and separation of organic and inorganic selenium species in "clean" water systems. *Journal of Chromatography A*, 2006. **1114**(1): p. 34-39.
253. Lindemann T. and Hintelmann H., Identification of selenium-containing glutathione S-conjugates in a yeast extract by two-dimensional liquid chromatography with inductively coupled plasma MS and nanoelectrospray MS/MS detection. *Analytical Chemistry*, 2002. **74**(18): p. 4602-4610.
254. Meija J. and Caruso J.A., Selenium and sulfur trichalcogenides from the chalcogenide exchange reaction. *Inorganic Chemistry*, 2004. **43**(23): p. 7486-7492.
255. Wuilloud J.C.A., Wuilloud R.G., Vonderheide A.P., and Caruso J.A., Gas chromatography/plasma spectrometry--an important analytical tool for elemental speciation studies. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2004. **59**(6): p. 755-792.
256. Darrouzes J., Amelioration des etapes analytiques pour la speciation du selenium au niveau ultratrace - Apport d'un spectrometre de masse à couplage inductif équipé d'une cellule de collision/réaction (ICP-CC/R-MS). Thèse Environnement et Matériaux, 2005.
257. Szpunar J., Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques. *The Analyst*, 2000. **125**(5): p. 963-988.
258. Gammelgaard B., Gabel-Jensen C., Stürup S., and Hansen H. R., Complementary use of molecular and element-specific mass spectrometry for identification of selenium compounds related to human selenium metabolism. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008. **390**(7): p. 1691-1706.
259. Ogra Y., Integrated strategies for identification of selenometabolites in animal and plant samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008. **390**(7): p. 1685-1689.
260. Nelms S., *Inductively coupled plasma mass spectrometry handbook*. 2005: Blackwell Pub.
261. Bendahl L., Gammelgaard B., Jøns O., Farver O., and Hansen S. H., Interfacing capillary electrophoresis with inductively coupled plasma mass spectrometry by direct injection nebulization for selenium speciation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2001. **16**(1): p. 38-42.
262. Darrouzès J., Bueno M., Simon S., Pannier F., and Potin-Gautier M., Advantages of hydride generation interface for selenium speciation in waters by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry coupling. *Talanta*, 2008. **75**(2): p. 362-368.
263. Larsen E.H. and Stürup S., Carbon-enhanced inductively coupled plasma mass spectrometric detection of arsenic and selenium and its application to arsenic speciation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1994. **9**(10): p. 1099-1105.
264. May T.W. and Wiedmeyer R.H., A table of polyatomic interferences in ICP-MS. *Atomic Spectroscopy*, 1998. **19**(5): p. 150-155.
265. Darrouzès J., Bueno M., Lespès G., and Potin-Gautier M., Operational optimisation of ICP - Octopole collision/reaction cell - MS for applications to ultratrace selenium total and speciation determination. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2005. **20**(2): p. 88-94.
266. Cole R.B., *Electrospray ionization Mass spectrometry. Fundamentals instrumentation & applications*. (ed). John Wiley: New York, 1997.

267. Dole M., Mack L.L., Hines R.L., Mobley R.C., Ferguson L.D., and Alice M.B., Molecular beams of macroions. *The Journal of Chemical Physics*, 1968. **49**: p. 2240-2249.
268. Iribarne J.V. and Thomson B.A., On the evaporation of small ions from charged droplets. *The Journal of Chemical Physics*, 1976. **64**: p. 2287-2294.
269. Fenn J.B., Mann M., C.K. Meng, Wong S.F., and Whitehouse C.M., Electrospray ionization-principles and practice. *Mass Spectrometry Reviews*, 1990. **9**(1): p. 37-70.
270. Monegier B., Électrospray = Electrospray. *Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation*, 1997. **5**(3350): p. 1-7.
271. Ikonomou M.G., Blades A.T., and Kebarle P., Investigations of the electrospray interface for liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 1990. **62**(9): p. 957-967.
272. Katta V., Chowdhury S.K., and Chait B.T., Electrospray ionization: a new tool for the analysis of ionic transition-metal complexes. *Journal of the American Chemical Society*, 1990. **112**(13): p. 5348-5349.
273. Sablier M. and Bouchoux G., Spectrométrie de masse: Principe et appareillage. *Techniques de l'ingénieur*, 2005. **2645**: p. 1-31.
274. Gates P., Mass spectrometry ressource. The University of Bristol, School of Chemistry, 2004
275. Arpino P., Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse. III. *Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation*, 2009. **2**(1492): p. 1-29.
276. De Hoffmann E. and Stroobant V., Mass spectrometry: principles and applications. 2007: Wiley-Interscience.
277. Gross M.L. and Caprioli R.M., Mass analysis and associated instrumentation. *The Encyclopedia of Mass Spectrometry*. Elsevier Science, Oxford, 2004.
278. Griffiths W.J., Jonsson A.P., Liu S., Rai D.K., and Wang Y., Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. *Biochemical Journal*, 2001. **355**(3): p. 545-561.
279. Hu Q., Noll R.J., Li H., Makarov A., Hardman M., and Cooks R.G., The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry*, 2005. **40**(4): p. 430-443.
280. Makarov A., Hardman M.E., Schwartz J.C., and Senko M.W., *Mass spectrometry method and apparatus*. 2007, Google Patents.
281. Riter L.S., Gooding K.M., Hodge B.D., and Julian Jr R.K., Comparison of the Paul ion trap to the linear ion trap for use in global proteomics. *Proteomics*, 2006. **6**(6): p. 1735-1740.
282. Makarov A., Denisov E., Kholomeev A., Balschun W., Lange O., Strupat K., and Horning S., Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Analytical Chemistry*, 2006. **78**(7): p. 2113-2120.
283. Scigelova M. and Makarov A., Orbitrap mass analyzer-overview and applications in proteomics. *Proteomics*, 2006. **6**(2): p. 16-21.
284. Olsen J.V., de Godoy L.M.F., Li G., Macek B., Mortensen P., Pesch R., Makarov A., Lange O., Horning S., and Mann M., Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2005. **4**(12): p. 2010.
285. Makarov A., Denisov E., Lange O., and Horning S., Dynamic range of mass accuracy in LTQ Orbitrap hybrid mass spectrometer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2006. **17**(7): p. 977-982.
286. Seby F., Potin-Gautier M., Giffaut E., Borge G., and Donard O. F. X., A critical review of thermodynamic data for selenium species at 25 C. *Chemical Geology*, 2001. **171**(3-4): p. 173-194.

287. Da Silva M.R., Olivas R.M., Donard O.F.X., and Lamotte M., Determination of the deprotonation constants of seleno-DL-cystine and seleno-DL-methionine and implication to their separation by HPLC. *Applied Organometallic Chemistry*, 1997. **11**(1): p. 21-30.
288. Traar P., Belaj F., and K.A. Francesconi, Synthesis of Methyl 2-Acetamido-2-deoxy-1-seleno- β -D-glucopyranoside and galactopyranoside: Selenium Metabolites in Human Urine. *Australian Journal of Chemistry*, 2004. **57**: p. 1051-1053.
289. Abbas-Ghaleb K., Gilon N., Crétier G., and Mermet J. M., Preconcentration of selenium compounds on a porous graphitic carbon column in view of HPLC-ICP-AES speciation analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003. **377**: p. 1026-1031.
290. Mazan S., Gilon N., Crétier G., Rocca J. L., and J. M. Mermet, Inorganic selenium speciation using HPLC-ICP-hexapole collision/reaction cell-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2002: p. 366 - 370.
291. Ouerdane L., Mari S., Czernic P., Lebrun M., and Lobinski R., Speciation of non-covalent nickel species in plant tissue extracts by electrospray Q-TOFMS/MS after their isolation by 2D size exclusion-hydrophilic interaction LC (SEC-HILIC) monitored by ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2006. **21**(7): p. 676-683.
292. Paul B.D. and Snyder S.H., The unusual amino acid L-ergothioneine is a physiologic cytoprotectant. *Cell Death & Differentiation*, 2010. **17**: p. 1134-1140.
293. Schaumlöffel D., Giusti P., Preud'Homme H., Szpunar J., and Lobinski R., Precolumn Isotope Dilution Analysis in nanoHPLC- ICPMS for Absolute Quantification of Sulfur-Containing Peptides. *Analytical Chemistry*, 2007. **79**(7): p. 2859-2868.
294. Schaumlöffel D., Bierla K., and Lobinski R., Accurate determination of selenium in blood serum by isotope dilution analysis using inductively coupled plasma collision cell mass spectrometry with xenon as collision gas. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2007. **22**(3): p. 318-321.
295. Bandura D.R., Baranov V.I., and Tanner S.D., Detection of ultratrace phosphorus and sulfur by quadrupole ICPMS with dynamic reaction cell. *Analytical Chemistry*, 2002. **74**(7): p. 1497-1502.

Identification et quantification de métabolites sélénés dans l'urine humaine

Résumé :

La barrière entre l'aspect bénéfique du sélénium (Se) et son aspect toxique est étroite. Afin de mieux contrôler les apports de cet élément dans l'alimentation, de nombreux travaux s'intéressent à la compréhension de son métabolisme.

Cette thèse présente le développement et l'optimisation de méthodes d'analyse des espèces sélénées dissoutes et volatiles présentes dans l'urine de sujets non supplémentés. Le couplage entre la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse atomique précédé d'un prétraitement de l'échantillon par extraction sur phase solide a permis non seulement de confirmer la présence de métabolites sélénés précédemment détectés dans l'urine de sujets supplémentés mais également, de mettre en évidence des composés inconnus. Un de ces composés a été identifié par spectrométrie de masse moléculaire. Les couplages entre la chromatographie gazeuse et les spectrométries de masse atomique et moléculaire, précédés d'une micro-extraction sur phase solide ont été utilisés pour l'analyse des formes volatiles de Se. Ces méthodes ont permis de confirmer la présence de composés sélénés et mixtes Se/S dans les urines de sujets non supplémentés et, de définir des conditions de stockage permettant de préserver la spéciation originelle dans l'échantillon.

Mots clés : sélénium, spéciation, urine, métabolites dissous, sélénonéine, métabolites volatils, préconcentration, GC-ICPMS, HPLC-ICPMS, spectrométrie de masse

Identification and quantification of selenium metabolites in human urine

Summary:

The concentration range between beneficial and toxic effects for selenium (Se) is very narrow. In order to monitor selenium intake and to improve knowledge of Se metabolism, studies on selenium species ingested and excreted are performed.

This report presents the development and the optimization of speciation analysis of dissolved and volatile Se species in urine of non supplemented subjects by coupling liquid chromatography or gas chromatography to inductively coupled plasma mass spectrometry. In the case of dissolved species, solid phase extraction of the sample as sample pretreatment allowed us to confirm the presence of known selenium compounds and to highlight unknown selenium species. One of these new species was further identified by molecular mass spectrometry.

The analysis of volatile selenium compounds was performed by gas chromatography coupled to ICP-MS after sample extraction by SPME. This method led to the identification of some selenium and mixed selenium/sulphur species in urine from non supplemented subjects and allowed us to define suitable storage conditions to maintain original speciation.

Keywords : selenium, speciation, urine, dissolved metabolites, selenoneine, volatile metabolites, preconcentration, GC-ICPMS, HPLC-ICPMS, mass spectrometry
