

## Disponibilité du fer dans la spiruline enrichie en fer par un modèle de digestion in vitro/culture cellulaire Co2

Grégoire Puyfoulhoux, † Jean-Max Rouanet,\* † Pierre Besanc, on,† Bruno Baroux, ‡  
Jean-Claude Baccou, § et Bertrand Caporiccio †

Unité Nutrition et Unité de Physiologie et Technologie Végétales, Laboratoire Génie Biologique et Sciences des Aliments, Université Montpellier II, Montpellier, France, et Aquamer S.A., BP 118, 34140 Mèze, France, BP 118, 34140 Mèze, France

La carence en fer, l'un des problèmes nutritionnels les plus importants au monde, peut être causée non seulement par des aliments déficients en fer, mais aussi par une mauvaise disponibilité du fer alimentaire. L'enrichissement en fer des aliments, combiné à du fer hautement disponible provenant de compléments, pourrait réduire efficacement cette carence. L'objectif de cette étude était d'examiner la disponibilité du fer dans la spiruline enrichie en fer. Nous avons utilisé un système de digestion in vitro/sur culture cellulaire Caco-2 pour mesurer la disponibilité du fer dans la spiruline et avons fait une comparaison avec celle de la viande de bœuf, de la levure, de la farine de blé et du sulfate de fer plus acide ascorbique comme référence. La disponibilité du fer a été évaluée par la formation de ferritine dans les cellules Caco-2 exposées à des produits de digestion contenant la même quantité de fer. Nos résultats démontrent une formation de ferritine 27 % plus élevée dans les produits de digestion de bœuf et de spiruline par rapport aux produits de digestion de levure et de farine de blé. Lorsque la disponibilité du fer a été exprimée par microgramme de fer utilisé dans chaque produit de digestion, une augmentation de 6,5 fois est apparue en utilisant le produit de digestion de spiruline par rapport à la viande. Compte tenu de la haute disponibilité en fer de la spiruline observée, nous concluons que la spiruline pourrait représenter une source adéquate de fer.

**Mots clés :** disponibilité du fer ; spiruline ; digestion in vitro ; cellules Caco-2 ; ferritine

### INTRODUCTION

L'anémie ferriprive est un problème grave et répandu dans le monde entier (1, 2) et touche environ 20 % de la population mondiale, bien que l'alimentation quotidienne moyenne contienne beaucoup plus de fer que la quantité nécessaire à des fins métaboliques. Ce problème est attribué à la faible disponibilité du fer alimentaire (3), car de nombreux aliments qui sont potentiellement de bonnes sources de fer sont limités par la biodisponibilité du fer (4). Il est donc important d'évaluer avec précision la disponibilité du fer dans l'alimentation. Cela est devenu plus évident à mesure que les progrès rapides de la technologie alimentaire et de transformation continuaient à fournir un nombre croissant de nouveaux produits alimentaires.

Ce travail avait pour but de mesurer la biodisponibilité du fer provenant de la spiruline enrichie en fer. La cyanobactérie *Spirulina platensis*

(algue bleue-verte) est commercialement disponible pour la consommation humaine. La spiruline représente l'une des sources de protéines d'origine végétale les plus riches (60-70 %) et constitue une bonne source de vitamines et de minéraux (5). Ces microalgues sont aujourd'hui utilisées comme source de nourriture saine pour l'homme (6). La simplicité des techniques de culture et la bonne qualité de leurs protéines, ainsi que l'absence de tout effet secondaire toxique (7,8), favorisent leur production à grande échelle. De plus, la capacité à contrôler la composition chimique de l'algue en variant les conditions de culture fait de la spiruline le végétal le plus facilement supplémentable en Fer par culture en milieu aquatique. La disponibilité en fer de l'algue a été comparée à celle du sulfate de fer, de la levure, de la farine de blé et du bœuf.

Le système de lignées cellulaires de l'épithélium intestinal humain (Caco-2) (9-11) est une technique très prometteuse pour déterminer la disponibilité du fer. Ces cellules se différencient spontanément après avoir atteint la confluence, formant une bordure en brosse bien définie sur la surface apicale et des jonctions cellulaires serrées (12,13). Elles ont récemment été appliquées avec succès à l'étude de la disponibilité du fer dans un travail pionnier de Glahn et al. (14,15) et aussi de Garcia et al. (16) ; en outre, elles représentent une méthode alternative qui réduit ou peut remplacer l'utilisation d'animaux de laboratoire (17).

\* Auteur à qui la correspondance doit être adressée : Dr Jean-Max ROUANET, Unité Nutrition, Laboratoire Génie Biologique et Sciences des Aliments, CC 023, Université Montpellier II, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cédex 05, France. Téléphone : (33) 04 67 14 35 21. Fax : (33) 04 67 63 36 49. Courriel : rouanet@arpb.univ-montp2.fr.

† Unité Nutrition, Université Montpellier II.

‡ Aquamer S.A.

§ Unité de Physiologie et Technologie Végétales, Université Montpellier II.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

**Enrichissement de la spiruline en fer.** L'étape d'enrichissement de l'algue a été réalisée chez Aquamer S.A. (Mèze, France). Des algues (*Spirulina platensis*) ont été cultivées dans un photobioréacteur de 130 L sous éclairage continu sur le milieu de Zarrouk à 22 °C et pH 10,5 en présence de FeCl<sub>3</sub>. Ce milieu contenait 16,8 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,5 g/L NaNO<sub>3</sub>, 1,0 g/L K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,0 g/L NaCl, 0,2 g/L MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0,04 g/L CaCl<sub>2</sub>, 0,01 g/L FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0,08 g/L EDTA, 2,86 10<sup>-3</sup> g/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1,81 10<sup>-3</sup> g/L MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O, 0,22 10<sup>-3</sup> g/L ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 7,9 10<sup>-5</sup> g/L CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O, 1,5 10<sup>-5</sup> g/L MoO<sub>3</sub> et 2,1 10<sup>-5</sup> g/L Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> et recevait une légère aération (30 l/min) et un ajout de 0,03 % de CO<sub>2</sub>. À la fin de la culture, la biomasse a été récupérée et filtrée à travers une membrane de 20 µm, puis lavée soigneusement avec de l'eau distillée, congelée et lyophilisée.

**Culture cellulaire.** Des cellules Caco-2 provenant de carcinomes colorectaux humains ont été obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) au passage 22 et utilisées dans des expériences au passage 45. Les cellules Caco-2 ont été cultivées à 37 °C dans une atmosphère contenant 5 % de CO<sub>2</sub>-95 % d'air à humidité constante et dans le milieu Dulbecco (DMEM) Eagle modifié supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur, 1 % d'acides aminés non essentiels et 4 mM de L-glutamine. Le milieu était changé tous les deux jours. Les cellules ont été régulièrement étalées dans des flacons de culture tissulaire (75cm<sup>2</sup>), et lorsque les cellules étaient confluentes à 80 - 90 %, elles étaient récoltées par traitement avec une solution contenant 0,25% de trypsine et 1 mM d'EDTA, lavées soigneusement, et remises en suspension dans un milieu de culture supplémenté.

Pour les expériences de transport, les cellules Caco-2 ont étéensemencées à un niveau de 5 x 10<sup>7</sup> cellules/cm<sup>2</sup> dans des plaques à six puits (Corning Costar Science Products, Brumath, France). Les cellules ont été utilisées dans les expériences d'absorption du fer à 28 jours après l'ensemencement.

**La digestion in vitro** a été strictement réalisée selon la procédure de Glahn et al. (15). En bref, de la pepsine porcine (800 - 2500 unités/mg de protéine), de la pancréatine (activité, spécification 4xUSP) et de l'extrait de bile (conjugués de glycine et taurine par des sels hyo désoxycholiques et autres sels biliaires) ont été achetés à Sigma (Saint Quentin Fallavier, France) et préparés par un traitement au Chelex-100 (Bio-Rad S.A, Ivry sur Seine, France) afin d'éliminer le Fer et une grande partie du Zn des préparations enzymatiques, comme vivement recommandé par Glahn et al. (15). Les digestions peptiques et intestinales ont été effectuées sur un agitateur à plateforme basculante (Rotomix, Bioblock, Illkirch, France) dans un incubateur à 37 °C avec une atmosphère à 5 % CO<sub>2</sub>-95 % air maintenue à une humidité constante. La digestion a été effectuée dans la chambre supérieure d'un système à deux chambres dans des plaques à six puits, la monocouche cellulaire étant cultivée sur la surface inférieure de la chambre inférieure, comme décrit par Glahn et al. (15). La chambre supérieure a été formée en adaptant le fond sur un anneau d'insert Transwell de taille appropriée avec une membrane de dialyse irradiée d'un poids moléculaire de 15 000 (Spectra/Por 2.1, Spectrum Laboratories Inc., Los Angeles, CA). La membrane de dialyse était maintenue en place par un anneau de téflon stérilisé. Après avoir fixé la membrane de dialyse à l'anneau d'insert, l'ensemble de l'unité a été maintenu dans de l'eau stérile jusqu'à utilisation. Pour lancer la digestion peptique, le pH de chaque échantillon a été ajusté à 2,0 avec 5,0 mol/L de HCl. L'échantillon a été transféré dans un tube de culture à bouchon à vis de 50 ml, 0,5 ml de la solution de pepsine a été ajouté par 10 ml d'échantillon, et le tube a été bouché, placé horizontalement et incubé dans l'agitateur basculant pendant 60 minutes.

Pour l'étape de digestion intestinale, le pH du produit de digestion a été porté à 6,0 par l'ajout goutte à goutte de 1 mol/L de NaHCO<sub>3</sub>. Ensuite, 2,5 ml de mélange d'extrait de pancréatine-bile ont été ajoutés par 10 ml d'échantillon original, le pH a été ajusté à 7,0 avec du NaOH, et le volume a été porté à 15 ml avec 120 mmol/L de

NaCl et 5 mmol/L de KCl.

**Conception expérimentale.** Juste avant l'étape de la digestion intestinale, le milieu de culture a été retiré de chaque puits, et la monocouche cellulaire a été lavée deux fois avec le milieu de croissance minimum essentiel (MEM, Gibco) ne contenant pas de fer, ajouté à 37 °C et pH 7,0. Ce milieu a été supplémenté avec 10 mmol/L de PIPES (pipérazine-*N*, *N*)-bis-[2-acide éthanesulfonique]), une solution antibiotique-antimicotique à 1 %, de l'hydrocortisone (4 mg/L), de l'insuline (5 mg/L), du sélénium sous forme de sélénite de sodium (5 µg/L), de la tri-iodothyronine (34 µg/L) et un facteur de croissance épidermique (20 µg/L). Tous les composants du milieu de culture étaient issus de Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). Pendant l'expérience, les cellules ont été recouvertes de 1,0 ml de MEM. Un anneau insert stérilisé, muni d'une membrane de dialyse, a ensuite été inséré dans le puits, formant ainsi le système à deux chambres. Ensuite, une aliquote représentative de 1,5 ml du produit de digestion intestinal a été soigneusement versée dans la chambre supérieure, la plaque a été recouverte et l'échantillon a été incubé sur l'agitateur basculant pendant 120 min.

À la fin de la digestion intestinale, l'anneau insert et le produit de digestion ont été retirés. La solution dans la chambre inférieure a été laissée sur la monocouche cellulaire, et un ml supplémentaire de MEM a été ajouté à chaque puits. La plaque à six puits a ensuite été renvoyée dans l'incubateur pour une période de 22 heures au terme de laquelle les cellules ont été récoltées pour analyse.

**Récolte de cellules.** Les cellules ont été récoltées comme décrit par Glahn et al. (15), et le fer lié à la surface des cellules et non absorbé par les cellules a été retiré en pipettant 2 ml d'une solution contenant 140 mmol/L de NaCl, 5 mmol/L de KCl et 10 mmol/L de PIPES, à pH 7,0, avec un supplément de 5 mmol/L d'hydrosulfite de sodium et 1 mmol/L d'acide bathophénanthroline di-sulfonique (BPDS) sur la monocouche cellulaire pendant 10 min (18). Après avoir été lavée avec la solution ci-dessus sans hydro-sulfite et BPDS, la monocouche a été lavée avec 2 ml d'eau déionisée. Ensuite, les plaques ont été soniquées pendant 15 min à 4 °C, et les cellules ont été raclées, récoltées dans 2 ml d'eau pour chaque puits, et stockées à -80 °C.

**Procédure expérimentale et échantillonnage des aliments.** Dans nos expériences, nous avons comparé des échantillons de sulfate de fer (FeSO<sub>4</sub> 4, 7H<sub>2</sub>O), les deux avec (Fe - AA) et sans (Fe) acide ascorbique (Sigma Chemical, Saint Quentin Fallavier, France) de levure, de farine de blé et de viande de bœuf avec de la spiruline enrichie en fer. La levure (Selegerm, Cereal, Annonay, France) et la farine de blé ont été achetées sur un marché local, et la spiruline enrichie en fer a été préparée par Aquamer S.A. (Mèze, France) ; elles contenaient 9,3 µg, 20,1 µg et 7,0 mg de Fe/g d'échantillon. La viande de bœuf fraîche a été achetée dans un supermarché local, et toute la graisse visible et le tissu conjonctif ont été enlevés ; elle a été finement hachée et lyophilisée et il a été constaté qu'elle contenait 111,3 µg de Fe/g d'échantillon. Les produits de digestion des échantillons ci-dessus contenaient 10 µg de Fer de chaque échantillon.

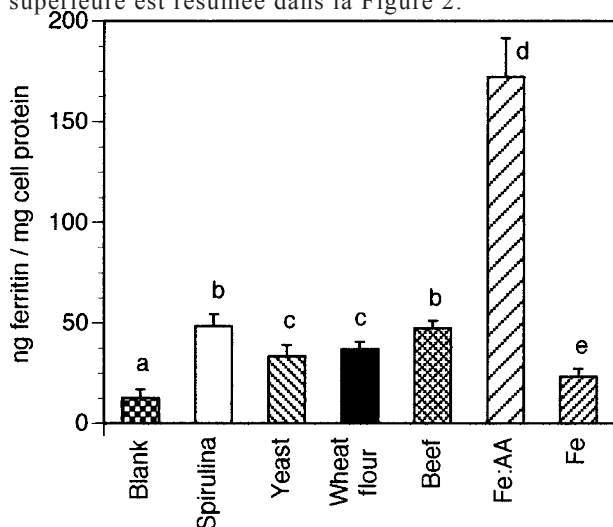
**Analyses biochimiques.** La protéine cellulaire Caco-2 a été mesurée par un test commercial de protéine (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) selon la méthode de Smith et al. (19) et en utilisant la sérum-albumine bovine comme référence. Les analyses de la teneur en fer des solutions et des échantillons alimentaires ont été effectuées par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) à l'aide d'un spectromètre Varian Vista (Varian, Les Ulis, France). La teneur en ferritine des cellules Caco-2 a été mesurée à l'aide d'un kit en phase solide de dosage immunoradiométrique à deux sites (Ferritin-CT, CIS bio international, Gif-Sur-Yvette, France) sur des échantillons de 25 µl de cellules soniquées récoltées dans 2 ml d'eau.

**Analyse statistique.** Pour chaque échantillon d'aliment testé, trois plaques de six puits ont été utilisées, et cette expérience a été répétée trois fois. La moyenne des données de chaque échantillon d'aliment a été calculée (n=54), et cette valeur moyenne a été le point de donnée utilisé dans l'analyse

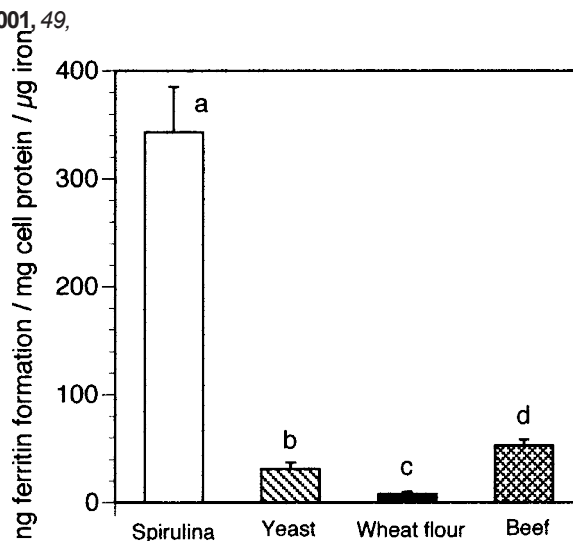
statistique. Les données sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM ; elles ont été analysées par une analyse de la variance à un facteur (ANOVA) avec la méthode de Fisher de la différence la moins significative (LSD) pour comparer les groupes en utilisant Stat View 4.5 (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA). Un niveau de signification de  $p < 0,05$  a été adopté pour toutes les comparaisons.

## RÉSULTATS

Dans nos expériences, des échantillons d'aliment ont été préparés afin de fournir 10  $\mu$ g de Fe dans chaque produit de digestion ; ainsi, 0,014 g de spiruline, 0,107 g de levure, 0,497 g de farine de blé et 0,090 g de bœuf ont été utilisés dans chaque produit de digestion. De plus, un système de digestion à blanc contenant uniquement de la pepsine, de la pancréatine et de l'extrait de bile sans ajout de Fer ou d'aliments a été utilisé. En outre, un produit de digestion contenant du sulfate de fer plus 1 mmol/L d'acide ascorbique (Fe - AA) a été utilisé comme référence ; un autre produit de digestion du sulfate de fer seul (désigné par Fe) a été introduit dans l'expérience. La quantité de fer mesurée dans 1,5 ml de chaque produit de digestion placé dans la chambre supérieure correspondait à la teneur en fer attendue des produits de digestion (seulement 1  $\mu$ g de fer a été chargé dans la chambre supérieure de chaque puits de culture) ; aucune différence significative n'est apparue entre les produits de digestion. Les taux de ferritine cellulaire mesurés 24 heures après le début de la digestion intestinale sont résumés dans la Figure 1. La ferritine était 7,5 fois plus élevée pour le sulfate de fer en présence d'acide ascorbique que pour le sulfate de fer seul. La spiruline enrichie en fer et les produits de digestion de bœuf ont conduit à des niveaux identiques de formation de ferritine qui étaient significativement plus élevés (environ 27 %) que ceux présentés par la levure et la farine de blé. La formation de ferritine exprimée par microgramme de fer chargé dans chaque chambre supérieure est résumée dans la Figure 2.



**Figure 1.** Formation de ferritine dans les cellules Caco-2 24 h après le début de la digestion in vitro. Les valeurs sont des moyennes (SEM ( $n$ ) 54). Les barres portant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes ( $p < 0,05$ ).



**Figure 2.** Formation de ferritine dans les cellules Caco-2 24 h après le début de la digestion in vitro et exprimée par microgramme de fer chargé dans chaque chambre supérieure. Les valeurs sont des moyennes (SEM ( $n$ ) 54). Les barres portant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes ( $p < 0,05$ ).

Le produit de digestion de spiruline a montré une augmentation spectaculaire de la ferritine formée par rapport aux autres produits de digestion et, en particulier, a montré un taux de ferritine 6,5 fois supérieure à celle du produit de digestion de bœuf.

## DISCUSSION

La disponibilité du fer peut être définie comme la quantité de fer ingéré qui pénètre dans l'organisme au-delà de la cellule intestinale. Le fer qui pénètre dans la cellule intestinale et y reste, étant excrété pendant le processus de desquamation cellulaire, n'est pas disponible. Le fer absorbé peut entrer dans les réserves de fer entérocytaire et peut être mobilisé pour satisfaire les besoins de l'organisme : c'est le fer biodisponible. Bien qu'il n'existe pas de définition clairement acceptée de la biodisponibilité, il existe un consensus général sur le fait qu'il s'agit de la proportion d'un nutriment donné que l'organisme utilise réellement (4).

Selon Crosby (20), la synthèse par la muqueuse de la ferritine est normale dans les états de complétion en fer ; ainsi, le fer entrant par le lumen est piégé dans la ferritine de muqueuse. Cette hypothèse a conduit à un mécanisme possible par lequel le contenu en ferritine de la cellule pourrait être conditionné par la quantité de fer dans l'environnement de la cellule. Néanmoins, la ferritine est une protéine de stockage nécessaire pour prévenir les dommages et constituer des réserves de fer. On peut donc penser que la ferritine de muqueuse est étroitement liée au statut et à l'absorption du fer (21-23).

Des études sur les cellules Caco-2 ont fait état d'une corrélation directe entre la formation de ferritine dans ces cellules et le niveau de la teneur en fer du milieu de culture (9,24) ; dans notre étude, les conditions de culture de départ ont été choisies de manière à obtenir un statut en fer cellulaire faible. Pour éliminer toute contamination du fer par le système expérimental, le milieu de culture essentiel minimum (MEM) a été choisi sans ajout de fer dans sa composition. Une

analyse du fer du MEM a révélé 5,4 µg de Fe/L, ce qui a été jugé suffisamment exempt de fer et un niveau de fer acceptable pour ce système (15). De la même manière, les solutions de pepsine et de pancréatine-bile contenant du fer ont été traitées sur la résine Chelex-100 pour éliminer le fer, et cette étape expérimentale nous a permis d'éliminer respectivement 94 et 50 % du fer, ce qui a conduit à une concentration moyenne de fer de 63 µg de Fe/L. L'élimination du zinc de la pepsine et du mélange pancréatine-bile était de 97 et 68 %, respectivement. C'est un point important, car la méthode utilisée est très sensible et une contamination minimale du fer doit être maintenue dans ce système pour que les différences de biodisponibilité du fer dans les aliments puissent être détectées.

Sinon, le zinc pourrait interférer avec l'absorption du fer (25). D'autre part, Halloran et al. (26) ont rapporté que l'élimination du fer des milieux de culture tissulaire s'accompagne d'un arrêt immédiat de la croissance et de la prolifération des cellules.

Parmi les facteurs alimentaires, l'acide ascorbique est l'un des facteurs les plus clairement documentés pour améliorer l'absorption et la biodisponibilité du fer non-hémérique (27,28). Ici, nous avons utilisé le sulfate de fer plus l'acide ascorbique (Fe-AA) comme référence pour la disponibilité du fer. En comparaison avec le sulfate de fer seul dans le produit de digestion (Fe), l'effet positif spectaculaire de l'acide ascorbique sur la disponibilité du fer, mesurée par la formation de ferritine, a été clairement montré dans la Figure 1. Dans cette étude, on s'attendait à ce que la disponibilité du fer soit plus élevée dans le produit de digestion de bœuf par rapport à celle de la levure, de la farine de blé ou de la spiruline. Cependant, la formation de ferritine à partir de la spiruline enrichie en fer dans les cellules Caco-2 n'était pas significativement différente de celle présentée par le produit de digestion de viande (Figure 1). Une énorme absorption de fer non-hémérique est apparue lorsque la formation de ferritine a été exprimée par microgramme de fer provenant des aliments soumis à une digestion in vitro (Figure 2), ce qui souligne les différences significatives d'efficacité entre les quatre sources de fer. Il est rare de trouver du fer d'origine végétale aussi disponible. Pourtant, Johnson et Shubert (29) ont rapporté que les rats nourris à la spiruline absorbaient le fer de façon supérieure ou égale à celui des rats nourris en fer par un supplément de sulfate ferreux. En outre, il a été démontré que la spiruline est plus efficace que la caséine et le gluten de blé pour améliorer le statut en fer des rats pendant la gestation et l'allaitement (30). Il semble donc que la spiruline contienne une forme de fer hautement disponible ; c'est l'un des aliments les plus riches en fer, fournissant 1,5 g de Fe/kg.

Il a été rapporté que le fer contenu dans la spiruline est plus de deux fois plus absorbable que la forme de fer présente dans les légumes et la plupart des viandes et qu'il est 60 % mieux absorbé que d'autres suppléments en fer tels que le sulfate de fer. Les algues concentrent les minéraux et les oligo-éléments des milieux aquatiques, et certains auteurs ont signalé

qu'elles se présentent sous une forme organique (31). Dans la spiruline, la phycocyanine est un pigment qui représente environ 25 % de la protéine cellulaire et ressemble aux pigments biliaires. On soupçonne le fer de s'infiltrer dans la structure porphyrique d'une telle protéine. De plus, comme les protéines de la spiruline sont très digestes et possèdent une valeur biologique élevée (32), cela pourrait représenter une explication de la grande disponibilité du fer de cette microalgue. Une autre hypothèse serait que le fer est associé à la surface des protéines par des liaisons ioniques ; ce pool de fer pourrait être facilement libéré, notamment par digestion peptique. Ainsi, deux pools de fer pourraient coexister dans la spiruline enrichie, l'un contenant du fer ressemblant au fer hémérique et l'autre comprenant du fer non-hémérique qui peut être rapidement libéré. Des études de fractionnement de la spiruline sont en cours pour vérifier cette hypothèse.

Pour conclure, nous avons démontré que l'enrichissement en fer de la spiruline représente un processus permettant d'obtenir une source concentrée de fer disponible (7,0 g de Fe/kg). La carence en fer et l'anémie ferriprive sont encore relativement fréquentes chez les tout-petits, les adolescentes et les femmes en âge de procréer (33). De nombreuses autres catégories de personnes devraient se préoccuper du fer : les athlètes dont le régime alimentaire doit comporter suffisamment de fer (34), les donneurs de sang qui doivent remplacer leurs globules rouges, les personnes qui suivent des régimes pour contrôler leur poids, les végétariens et les habitants des pays en développement. L'absorption de capsules de spiruline riches en fer pourrait constituer un autre moyen de supplémentation en fer, outre l'ajout d'hémoglobine bovine aux aliments (35) et de lactoferrine bovine aux préparations pour nourrissons (36).

#### REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier le Dr Raymond P. Glahn (U.S. Plant, Soil and Nutrition Lab, USDA/ARS, Cornell University, Ithaca, NY) et le Dr André Wagner (Centre Hospitalier Universitaire, Montpellier) pour leur aide fructueuse. Nous remercions l'Agence Nationale de Valorisation de la Recherche (ANVAR) pour le soutien financier d'une partie de cette recherche.

#### LITTÉRATURE CITÉE

- (1) Scrimshaw, N. S. Iron deficiency. *Sci. Am.* **1991**, *265*, 46-52.
- (2) Yip, R. Iron deficiency: contemporary scientific issues and international programmatic approaches. *J. Nutr.* **1994**, *124*, 1479S-1490S.
- (3) Bothwell, T. H.; Baynes, R. D.; MacFarlane, B. J.; MacPhail, A. P. Nutritional iron requirements and food iron absorption. *J. Intern. Med.* **1989**, *226*, 357-365.
- (4) Benito, P.; Miller, D. Iron absorption and bioavailability: an updated review. *Nutr. Res.* **1998**, *18*, 581-603.
- (5) Dillon, J. C.; Phuc, A. P.; Dubacq, J. P. Nutritional value of the alga spirulina. *World Rev. Nutr. Diet.* **1995**, *77*, 32-46.
- (6) Kay, R. A. Microalgae as food and supplement. *Clin. Rev. Food Sci. Nutr.* **1991**, *30*, 555-573.
- (7) Yoshino, Y.; Hirai, Y.; Takahashi, H.; Yamamoto, N.; Yamazaki, N. The chronic intoxication test on Spirulina



- product fed to Wistar-strain rats. *Jpn. J. Nutr.* **1980**, *38*, 221–225.
- (8) Chamarro, G.; Herrera, G.; Salazar, M.; Salazar, S.; Ulloa, V. Subchronic toxicity study in rats fed Spirulina. *J. Pharm. Belg.* **1988**, *43*, 29–36.
- (9) Alvarez-Hernandez, X.; Nichols, G. M.; Glass, J. Caco-2 cell line: a system for studying intestinal iron transport across epithelial cell monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1070*, 205–208.
- (10) Halleux, C.; Schneider, Y.-J. Iron absorption by Caco-2 cells cultivated in serum-free medium as an in vitro model of the human intestinal epithelial barrier. *J. Cell Physiol.* **1994**, *158*, 17–28.
- (11) Fairweather-Tait, S. J. Trace element bioavailability. In *Role of Trace for Health Promotion and Disease Prevention*; Sandstrom, B., Walter, P., Eds.; Bibliotheca Nutritio et Dieta; S. Karger AG: Basel, Switzerland, 1998, Vol. 54, pp 29–39.
- (12) Pinto, M.; Robin-Leon, S.; Appay, M.; Keding, M.; Triadou, N.; Dussaulx, E.; Lacroix, B.; Simon-Assan, P.; Haffen, K.; Fogh, J.; Zweibaum, A. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell.* **1983**, *47*, 323–330.
- (13) Hidalgo, I. J.; Raub, T. J.; Borchardt, R. T. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* **1985**, *96*, 736–749.
- (14) Glahn, R. P.; Wien, E.; Van Campen, D. R.; Miller, D. D. Caco-2 cell iron uptake from meat and casein digests parallels in vivo studies: use of a novel in vitro method for rapid estimation of iron bioavailability. *J. Nutr.* **1996**, *126*, 332–339.
- (15) Glahn, R. P.; Lee, O. A.; Yeung, A.; Goldman, M. I.; Miller, D. D. Caco-2 cell ferritin formation predicts nonradiolabeled food iron availability in an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *J. Nutr.* **1998**, *128*, 1555–1561.
- (16) Garcia, M. N.; Flowers, C.; Cook, J. D. The Caco-2 cell culture system can be used as a model to study food iron availability. *J. Nutr.* **1996**, *126*, 251–258.
- (17) Balls, M.; Fentem, J. H. The validation and acceptance of alternatives to animal testing. *Toxicol. in Vitro* **1999**, *13*, 837–846.
- (18) Glahn, R. P.; Gangloff, M. B.; Van Campen, D. R.; Miller, D. D.; Wien, E. M.; Norvell, W. A. Bathophenanthroline disulfonic acid and sodium dithionite effectively remove surface-bound iron from Caco-2 cells monolayer. *J. Nutr.* **1995**, *125*, 1833–1840.
- (19) Smith, S. K.; Krohn, R. I.; Mallia, A. K.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. K. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76–85.
- (20) Crosby, W. H. The control of iron balance by the intestinal mucosa. *Blood* **1963**, *22*, 441–449.
- (21) Savin, M. A.; Cook, J. D. Iron transport by isolated rat intestinal mucosal cells. *Gastroenterology* **1978**, *75*, 688–694.
- (22) Conrad, M. E.; Parmley, R. T.; Osterloh, K. Small intestinal regulation of iron absorption in the rat. *J. Lab. Clin. Med.* **1987**, *110*, 418–426.
- (23) Whittaker, P.; Skikne, B. S.; Covell, A. M.; Flowers, C.; Cooke, A.; Lynch, S. R.; Cook, J. D. Duodenal iron proteins in idiopathic hemochromatosis. *J. Clin. Invest.* **1989**, *83*, 261–267.
- (24) Gangloff, M. B.; Lai, C.; Van Campen, D. R.; Miller, D. D.; Norvell, W. A.; Glahn, R. P. Ferrous iron uptake but not transfer is down-regulated in Caco-2 cells grown in high iron serum-free medium. *J. Nutr.* **1996**, *126*, 3118–3127.
- (25) Wien, E. M.; Glahn, R. P.; Van Campen, D. R. Ferrous iron uptake by rat duodenal brush border membrane vesicles: effect of dietary iron level and competing minerals (Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>). *J. Nutr.* **1994**, *5*, 571–577.
- (26) Halloran, B.; Brown, R.; Xu, F. S.; Conrad, M.; Umbreit, J.; Moore, E. Alternative pathway transport of iron in transferrin free media. *Blood* **1997**, *90*, 9a.
- (27) Gillooly, J. D.; Torrance, J. D.; Bothwell, T. H.; MacPhail, A. P.; Derman, D.; Mills, W.; Mayet, F. The relative effect of ascorbic acid on iron absorption from soy-based and milk-based infant formulae. *Am. J. Clin. Nutr.* **1984**, *40*, 522–527.
- (28) Hallberg, L.; Brune, M.; Rossander, L. Effect of ascorbic acid on iron absorption from different types of meals. Studies with ascorbate rich foods and synthetic ascorbic acid given in different amounts with different meals. *Hum. Nutr. Appl. Nutr.* **1986**, *40A*, 97–113.
- (29) Johnson, P.; Shubert, E. Availability of iron to rats from spirulina, a blue-green algae. *Nutr. Res.* **1986**, *6*, 85–94.
- (30) Kapoor, R.; Mehta, U. Supplementary effect of spirulina on hematological status of rats during pregnancy and lactation. *Plant Foods Hum. Nutr.* **1998**, *52*, 315–324.
- (31) Bougle, D.; Boudey, M.; Arhan, P.; Bureau, F.; Neuville, D.; Drosowsky. In vivo study of the absorption of seaweed minerals by perfused rat intestine. *Phytother. Res.* **1996**, *10*, 325–326.
- (32) Richmond, A. Spirulina. In *Micro-Algal Biotechnology*; Borowitzka, M. A., Borowitzka, L. J., Eds.; Cambridge University Press: Sydney, Australia, 1989; pp 85–121.
- (33) Looker, A. C.; Dallman, P. R.; Carroll, M. D.; Gunter, E. W.; Johnson, C. L. Prevalence of iron deficiency in the United States. *JAMA* **1997**, *277*, 973–976.
- (34) Nielsen, P.; Nachtigall, D. Iron supplementation in athletes. Current recommendations. *Sports Med.* **1998**, *26*, 207–216.
- (35) Walter, T.; Hertrampf, E.; Pizarro, F.; Olivares, M.; Llugano, S.; Letelier, A.; Vega, V.; Stekel, A. Effect of bovine-hemoglobin fortified cookies on iron status of schoolchildren: a nationwide program in Chile. *Am. J. Clin. Nutr.* **1993**, *57*, 190–194.
- (36) Chierici, R.; Sawartzki, G.; Tamisari, L.; Volpato, S.; Vigi, V. Supplementation on an adapted formula with bovine lactoferrin. 2. Effect on serum iron, ferritin and zinc levels. *Acta Paediatr.* **1992**, *81*, 475–479.

Reçu pour examen le 27 septembre 2000. Manuscrit révisé reçu le 2 janvier 2001. Accepté le 2 janvier 2001.

JF001193C

