

## **Évaluation de la biodisponibilité du sélénium à partir de sous-fractions de spiruline à forte teneur en sélénium chez les rats déficients en sélénium**

JULIEN CASES,<sup>†</sup> IRENA AGNIESZKA WYSOCKA,<sup>‡</sup> BERTRAND CAPORICCIO,<sup>†</sup>  
 NICOLAS JOUY,<sup>§</sup> PIERRE BESANC, ON,<sup>†</sup> JOANNA SZPUNAR,<sup>‡</sup> ET  
 JEAN-MAX ROUANET<sup>\*,†</sup>

Unité Nutrition, Laboratoire Génie Biologique et Sciences des Aliments, Université Montpellier II,  
 Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier, France ; Groupe de chimie analytique bio-inorganique,  
 CNRS - UMR 5034, Hélioparc, 64053 Pau, France ; et Aquamer S.A., Mèze, France

Il a été précédemment constaté que la biodisponibilité du Se provenant de la spiruline riche en Se (SeSp) était inférieure à celle de la sélénite ou de la sélénoéthionine lorsqu'elle était administrée à des rats déficients en Se. La présente étude a examiné la biodisponibilité du Se provenant de sous-fractions de SeSp : un culot (P) issu de la centrifugation d'une suspension de SeSp brisée et un rétentat (R) résultant de l'ultrafiltration du surnageant à travers une membrane d'exclusion de 30 kDa. Les animaux ont été nourris avec un régime à base de levure torula sans Se (déficiences) ou supplémenté avec 75 µg de Se/kg de régime sous forme de sélénite de sodium (témoins) pendant 42 jours. Les rats déficients en sélénium ont ensuite été gavés pendant 56 jours de Se (75 µg/kg de régime) administré sous forme de sélénite de sodium, de SeSp, de P ou de R. Pendant cette période, les témoins ont continué de recevoir du sélénite de sodium. La spéciation du Se dans les sous-fractions a montré que la majorité était présente sous forme de composés à haut poids moléculaire ; la sélénoéthionine libre n'était qu'un constituant mineur. L'absorption brute de Se à partir de sélénite de sodium, de P et de R n'était pas différente et était plus élevée que celle à partir de la SeSp. Seul le rétentat a permis la reconstitution complète de la concentration de Se dans le foie et les reins (tout comme le sélénite de sodium) et l'activité de la glutathion peroxydase (GSHPx) dans le foie, les reins, le plasma et les érythrocytes. Les biodisponibilités du Se dans le rétentat, évaluées par l'analyse du rapport des pentes en utilisant le sélénite comme Se de référence, étaient de 89 et 112 % dans la teneur en Se des tissus et de 106–133 % dans les activités de la GSHPx. La SeSp et le P ont révélé une biodisponibilité brute de <100 %. Ces résultats indiquent que le Se dans le rétentat est hautement biodisponible et représente une source intéressante de Se pour la supplémentation alimentaire.

**MOTS CLÉS :** sélénium ; biodisponibilité ; glutathion peroxydase ; sous-fractions de spiruline à forte teneur en sélénium

### **INTRODUCTION**

Le sélénium est un oligo-élément essentiel pour les êtres humains et les animaux. Il fait partie intégrante de l'enzyme glutathion peroxydase (GSHPx) (1) et d'autres sélénoenzymes ou sélénoprotéines (2), qui interviennent dans l'élimination du peroxyde d'hydrogène et des peroxydes lipidiques produits au cours du processus d'oxydation dans les cellules. Cette fonction contribue à maintenir l'intégrité de la membrane (3) et la probabilité de propagation d'autres dommages oxydatifs aux lipides, aux lipoprotéines et à l'ADN, avec le risque accru associé de maladies telles que l'athérosclérose et le cancer (3). La carence en sélénium chez l'homme peut être liée à d'autres maladies telles que les cardiopathies ischémiques (4), la maladie de Keshan (5), la sclérose en plaques (6), la dystrophie musculaire (7),

<sup>49</sup> ; courriel rouanet@ arpb.univ-montp2.fr].

<sup>†</sup> Université Montpellier II.

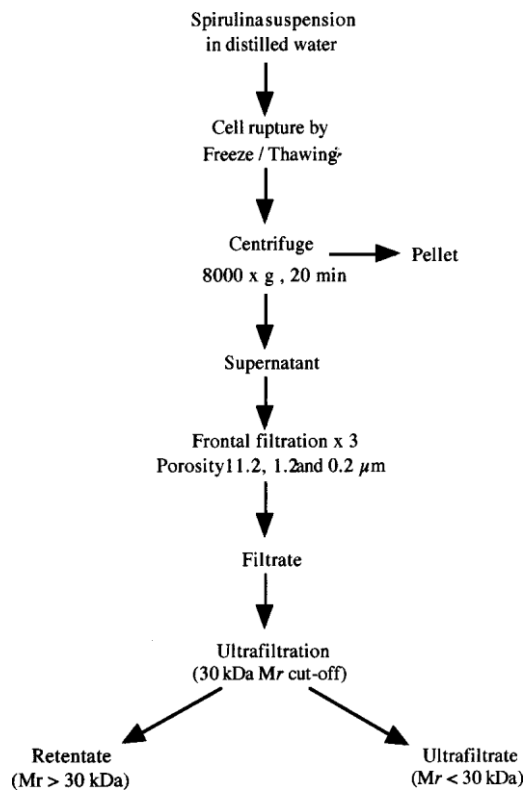
<sup>‡</sup> CNRS.

<sup>§</sup> Aquamer S.A.

\* Adressez votre correspondance à l'auteur à 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

la polyarthrite rhumatoïde (8) et la cataracte (9). Ainsi, les apports nutritionnels conseillés sont très importants et ont établi pour le Se une dose de 55  $\mu\text{g}/\text{jour}$  pour les femmes et les hommes (10). La quantité de sélénium dans l'alimentation et donc l'activité des sélénoprotéines dépendent dans une grande mesure de la concentration de sélénium dans le sol. En raison du climat et de la fertilisation artificielle excessive des sols, l'apport alimentaire en sélénium est généralement faible en Europe (11). De plus, le métabolisme du sélénium varie en fonction de la forme chimique du sélénium ingéré ; cela détermine sa biodisponibilité (12), c'est-à-dire l'absorption intestinale et la distribution et l'utilisation tissulaires qui en découlent. Les principales formes de

sélénium dans les denrées alimentaires sont la sélénométhionine (SeMet) et la sélénocystéine (SeCys). Les sels de sélénium inorganiques sont ajoutés aux aliments en tant que suppléments (13). En général, la biodisponibilité du sélénium dans la SeMet, la SeCys et la plupart des matières végétales semble être raisonnablement bonne, tandis que celle du Se dans de nombreux produits animaux semble être modérée et dans certains cas faible (14). Nous avons récemment signalé que le sélénium provenant de la spiruline riche en sélénium était moins efficace et moins biodisponible que le sélénium provenant du sélénite de sodium et de la SeMet pour la reconstitution de l'activité de la GSHPx et du sélénium tissulaire dans la plupart des organes et tissus de rats appauvris en Se



**Figure 1.** Procédure schématique pour le fractionnement de la spiruline.

(15). Finley (16) a signalé que la biodisponibilité peut être utilisée comme synonyme d'utilité biologique ; ainsi, en raison de ses effets non négligeables, la spiruline à forte teneur en sélénium possède une utilité biologique et constitue une source efficace de sélénium dont nous avons précédemment démontré les effets bénéfiques chez les rats nourris avec des régimes à haute teneur en cholestérol (17). La spiruline (*Spirulina platensis*) est une algue bleu-vert appartenant à la famille des cyanobactéries, disponible dans le commerce pour la consommation humaine et utilisée comme aliment fonctionnel pour l'homme (18). En milieu aquatique, la spiruline est un végétal qui peut facilement être supplémenté avec du sélénium. Étant donné que la capacité de biodisponibilité du sélénium varie en fonction de sa forme chimique, nous avons décidé dans cette étude de séparer différentes fractions de la spiruline riche en sélénium et d'examiner l'impact de ces fractions sur des rats déficients en sélénium.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

**Production de spiruline riche en sélénium.** L'étape d'enrichissement de l'algue a été réalisée chez Aquamer S.A. (Mèze, France). Des algues 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 dioxyde de sélénium (en préparation de brevet). Le milieu contenait 16,8 g/L de NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,5 g/L de NaNO<sub>3</sub>, 1,0 g/L de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,0 g/L de NaCl, 0,2 g/L de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,04 g/L de CaCl<sub>2</sub>, 0,01 g/L de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,08 g/L d'EDTA, 2,86 10<sup>-3</sup> g/L de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1,81 X 10<sup>-3</sup> g/L de MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0,22 X 10<sup>-3</sup> g/L de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 7,9 X 10<sup>-5</sup> g/L de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 1,5 X 10<sup>-5</sup> g/L de MoO<sub>3</sub>, et 2,1 X 10<sup>-5</sup> g/L de 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,

a été obtenu en faisant passer le filtrat, à 4 °C sous pression d'azote, à travers une cellule d'ultrafiltration sous agitation Amicon (Millipore S.A., Saint-Quentin-en-Yvelines, France) équipée d'une membrane d'exclusion 30000 Mr. L'UF et le rétentat (R) ont été congelés dans de l'azote liquide et lyophilisés ; l'UF n'a pas été testé pour la biodisponibilité du Se et n'a servi qu'à vérifier l'équilibre du Se après fractionnement.

**Caractérisation de la spéciation du sélénium dans la spiruline enrichie.** La spéciation du sélénium a été caractérisée par une extraction séquentielle avec des solutions réactives destinées à lixivier sélectivement différentes classes d'espèces de sélénium dans une phase aqueuse. Les extraits ont ensuite été caractérisés par HPLC d'exclusion stérique, échange d'anions et échange de cations avec détection spécifique du Se par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) (19). Un échantillon de 0,2 g a été prélevé pour analyse. Il a été extrait séquentiellement avec (a) 5 ml d'eau chaude (85–90 °C) par agitation pendant 1 h pour les espèces sélénosolubles dans l'eau, (b) 5 ml de Driselase à 4 % dans un tampon Tris-HCl 30 mM (pH 7,0) en présence de PMSF 1 mM par agitation pendant 1 h à 25 °C pour le sélénium associé à la paroi cellulaire, (c) 5 ml de tampon Tris-HCl 30 mM (pH 7,0) contenant du SDS à 4 % par agitation pendant 1 h à 25 °C pour les sélénoprotéines insolubles dans l'eau, et

(d) 5 ml de tampon de phosphate (pH 7,5) par incubation pendant 16 h à 37 °C avec un mélange contenant 10 mg de lipase et 20 mg de Pronase pour libérer et briser les sélénoprotéines résiduelles. Le sélénium a été déterminé (par ICP-MS) dans le surnageant restant après la centrifugation. Le résidu final a été dissous complètement dans 2 ml d'hydroxyde de tétraméthyl-ammonium (TMAH) à 25 % dans de l'eau pour déterminer le Se résiduel. Une aliquote de 100 µL d'extrait (10 fois dilué) a été injectée sur une colonne Superdex Peptide HR 10/30 (Pharmacia, Uppsala, Suède) et éluée à 0,75 ml min<sup>-1</sup> avec un tampon Tris-HCl 30 mM (pH 7,5).

La chromatographie par échange d'anions a été réalisée sur une colonne Hamilton PRPX-100 à un débit de 1 ml min<sup>-1</sup> ; les solvants utilisés pour

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.

**Fractionnement de la spiruline.** Les fractions ont été isolées comme le montre la Figure

1. De la spiruline riche en sélénium (SeSp) a été mise en suspension dans de l'eau distillée (50 g/L). Ensuite, la suspension a été soumise à deux cycles de congélation/décongélation pour induire la rupture des cellules et centrifugée pendant 20 min à 8 000 g ; le culot (P) a été récupéré, lavé deux fois à l'eau distillée, congelé dans de l'azote liquide et lyophilisé. Le surnageant a été soumis à trois filtrations frontales successives (porosités membranaires de 11,2, 1,2 et 0,2 µm, respectivement). Un ultrafiltrat (UF)

la séparation étaient les suivants : solvant A, 5 mmol/L d'acétate d'ammonium ajusté à pH 4,7 avec de l'acide acétique ; solvant B, 100 mmol/L d'acétate d'ammonium ajusté à pH 4,7 avec de l'acide acétique. Les conditions chromatographiques consistaient en 5 min à 100 % A, 35 min de 0 à 100 % B et 20 min à 100 % B. La chromatographie par échange de cations a utilisé une colonne Supelcosil SCX à un débit de  $1 \text{ ml min}^{-1}$  avec 2 mmol/L de phosphate à pH 6,0 (A) et 25 mM de phosphate à pH 6,0 (B) ; l'élution a été effectuée avec un gradient consistant en 10 min à 100 % A, 20 min de 0 à 100 % B, et 20 min à 100 % B.

$^{78}\text{Se}$ ,  $^{80}\text{Se}$  et  $^{82}\text{Se}$  ont été monitorés en ligne à l'aide d'un spectromètre Elan 6000 ICP MS (PE-SCIEX, Thornhill, ON, Canada). Le sélénium total a été déterminé par addition standard à deux niveaux correspondant à la teneur en sélénium de l'échantillon. La HPLC-ICP-MS pour l'analyse de spéciation du Se a été réalisée à l'aide d'une pompe HP1100 HPLC (Hewlett-Packard, Waldbronn, Allemagne) couplée à l'Elan 6000 (Perkin-Elmer SCIEX, ON, Canada) via une colonne à chambre de pulvérisation à double passage Scott ( $4,6 \times 250 \text{ mm} \times 10 \mu\text{m}$ ) Hamilton PRPX-100 (Supelco, St. Quentin Fallavier, France), une colonne ( $4,6 \times 250 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$ ) Supelcosil SCX (Supelco, St. Quentin Fallavier, France) et une colonne ( $10 \times 300 \text{ mm} \times 13 \mu\text{m}$ ) Superdex Peptide (Pharmacia) pour la chromatographie d'échange d'anions, d'échange de cations et d'exclusion stérique, respectivement.

**Animaux et régimes alimentaires.** Des rats mâles Sprague-Dawley (Iffa Credo, L'Arbresle, France) pesant env. 68 g ont été logés individuellement dans des cages métaboliques suspendues en acier inoxydable dans une pièce à température contrôlée (22–24 °C) avec un cycle lumière-obscurité de 12 h. Les animaux avaient libre accès à l'eau déionisée et étaient pesés chaque semaine. Ils ont reçu un régime alimentaire de base à base de levure torula (TY) déficiente en sélénium (**Tableau 1**) et ont été maintenus par l'alimentation par paire avec l'apport alimentaire du groupe ayant l'apport le plus faible au cours des périodes expérimentales. À l'arrivée et juste avant le début de la période expérimentale, 5 des 90 rats ont été sélectionnés au hasard et sacrifiés pour évaluer l'activité GSHPx des tissus et la concentration de Se afin d'établir la ligne de base. Au début de la période expérimentale, les 85 autres rats ont été répartis en deux groupes alimentaires en fonction de leur poids corporel moyen : le groupe témoin (groupe C ;  $n = 20$ ) a reçu le régime TY auquel ont été ajoutés  $75 \mu\text{g}$  de Se/kg sous forme de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ . L'ensemble de l'expérience a duré 98 jours avec deux périodes distinctes. Les périodes de déplétion en Se et de réplétion en Se ont duré respectivement 42 et 56 jours. Pendant les 42 premiers jours (période de déplétion en Se), les animaux restants ( $n = 65$ ) ont reçu le régime de base TY déficient en Se (groupe alimentaire déficient en Se ; groupe SD), qui contenait  $7 \mu\text{g}$  de Se/kg. À la fin de cette période, le foie, les reins et le sang ont été prélevés sur cinq animaux

**Tableau 1.** Composition des régimes alimentaires expérimentaux (grammes par kilogramme<sup>a</sup>)

composant du régime	régime témoin (groupe)	régime déficient en Se (groupe SD)
levure torula <sup>b</sup> (N × 6,25)	323	323
DL-méthionine	1	1
amidon de maïs	344	344
saccharose	172	172
cellulose	50	50
huile de maïs	50	50
mélange de minéraux <sup>c</sup>	40	40
mélange de minéraux <sup>d</sup>		40
mélange de vitamines <sup>e</sup>	20	20
sélénium total (µg/kg)	75,00	7,00

<sup>a</sup> Tous les régimes ont été formulés pour contenir 15 % de protéine. La levure torula contenait N à 7,42 % . <sup>c</sup> Le mélange de minéraux contenait (mg/kg de nourriture) les éléments suivants : CaHP<sub>4</sub>O, 17200 ; KCl, 4000 ; NaCl, 4000 ; MgO, 420 ; MgSO<sub>4</sub>, 2000 ; Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 120 ; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 200 ; oligo-éléments, 400 (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 0,165 ; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 98 ; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 20 ; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 80 ; CoSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,16 ; KI, 0,32 ; une quantité d'amidon suffisante pour porter à 40 g (par kg de régime). <sup>d</sup> Mélange de minéraux tel que décrit ci-dessus et exempt de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. <sup>e</sup> Mélange de vitamines contenant (mg/kg de régime) les éléments suivants : rétinol, 12 ; cholécalférol, 0,125 ; thiamine, 40 ; riboflavine, 30 ; acide pantothénique, 140 ; pyridoxine, 20 ; inositol, 300 ; cyanocobalamine, 0,1a ; l'rac-R-tocophérol, 340 ; ménadione, 80 ; acide nicotinique, 200 ; choline, 2720 ; acide folique, 10 ; acide aminobenzoïque, 100 ; biotine, 0,6 ; une quantité d'amidon suffisante pour porter à 20 g (par kg de régime).

de chaque groupe pour les bio-essais de Se et l'activité GSHPx afin de vérifier que le régime alimentaire déficient en Se avait induit un état de déplétion en Se. La période de réplétion en Se a duré du jour 43 au jour 98 : les animaux du groupe SD ont été répartis au hasard en quatre groupes alimentaires de 15 animaux, qui ont reçu un régime alimentaire contenant 75 µg de Se/kg sous forme de sélénite de sodium, de SeSp, de P ou de R. Cinq rats de chaque groupe ont été tués aux jours 7, 28 et 56 de la période de réplétion. Cinq animaux du groupe témoin ont également été tués aux mêmes périodes.

**Essai du sélénium dans les tissus animaux et les fractions de spiruline.** Les échantillons ont été convertis en cendres pendant la nuit avec de l'acide nitrique concentré dans des tubes à essai en borosilicate placés dans un bloc chaud (Bioblock Scientific, Illkirch, Paris, France) à 110 °C. La concentration de sélénium a été déterminée par ICP-MS à l'aide d'un spectromètre Varian Vista (Varian, Les Ulis, France). **Procédures analytiques.** Les animaux ont été traités conformément au *Guide pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire* (20). Ils ont été non nourris pendant la nuit et anesthésiés (pentobarbital 6 %, 60 mg/kg de poids corporel) avant que les tissus ne soient excisés. Les reins étaient excisés, lavés dans une solution saline glacée, épurés, pesés et stockés dans de l'azote liquide.

Le foie a été perfusé avec du KCl à 1,15 % pour éliminer le sang résiduel et traité de la même manière que les reins. Le foie et les reins ont été homogénéisés dans 5 vol. de tampon de phosphate de potassium 0,1 mol/L glacé (pH 7,4), et l'homogénat a été centrifugé à 13000g pendant 15 min à 4 °C. Le surnageant a ensuite été centrifugé à 105000g pendant 60 min à 4 °C et les cytosols ont été stockés à -80

°C pour l'essai ultérieur de l'activité de la GSHPx. L'activité de la glutathion peroxydase a été mesurée selon la méthode de Wendel (21) en utilisant 0,2 mmol/L de peroxyde d'hydrogène comme substrat et en incluant 1,0 mmol/L d'azote de sodium pour inhiber la catalase, si bien que seule l'activité de la GSHPx dépendant du Se a été mesurée. L'activité enzymatique est exprimée en micromoles de substrat hydrolysé par minute par milligramme de protéine (abrégié µU/mg de protéine). La concentration de protéine a été déterminée selon la méthode de Smith et al. (22) et avec de la sérum-albumine bovine comme norme. Le sang a été prélevé par ponction cardiaque à l'aide de seringues héparinées pour la détermination de l'activité de la GSHPx dans le plasma et les globules rouges (GR). Les GR obtenus ont été lavés avec une solution saline et éclatés dans 9 volumes de

Se algal a été estimée par une technique de rapport des pentes, qui compare la pente des tracés temps-réponse observés pour la SeSp, le culot et le rétentat

à la pente observée pour le sélénite de sodium (rats soumis à réplétion en Se).

**Mesures des spectres d'absorption.** Les mesures spectroscopiques ont été effectuées en enregistrant les spectres d'absorption de la phycocyanine rétentante et purifiée dans la région de 240-750 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Shimadzu UV-160 A.

**Analyses statistiques.** Les données sont présentées sous la forme de moyennes ± SEM de cinq mesures par groupe. L'analyse statistique des données a été effectuée à l'aide du logiciel Stat View IV (Abacus Concepts, Berkeley, CA) par ANOVA bidirectionnelle avec la source de Se (sélénite de sodium, spiruline, culot et rétentat) et le jour de la réplétion comme principaux effets, suivie d'une comparaison multiple Bonferroni/Dunn. Les différences ont été considérées comme

tampon hypotonique (5 mmol/L de tampon au phosphate de sodium, pH 7,0). Des fèces ont été prélevées sur chaque rat pendant les cinq derniers jours de la période de réplétion pour la mesure de l'absorption intestinale.

**Estimation de la biodisponibilité du Se.** La biodisponibilité du Se provenant de la SeSp, du culot et du rétentat a été évaluée en utilisant des rats réalimentés au sélénite de sodium comme Se de référence. Le dépôt de Se et l'augmentation de l'activité de la GSHPx dans différents tissus ont été utilisés comme réponse au temps de réplétion (T). Comme cette réponse R peut être décrite par l'équation  $R = mT + k$ , la biodisponibilité relative du Se provenant des trois sources de

significativement différentes à  $P < 0,05$ .

## RÉSULTATS

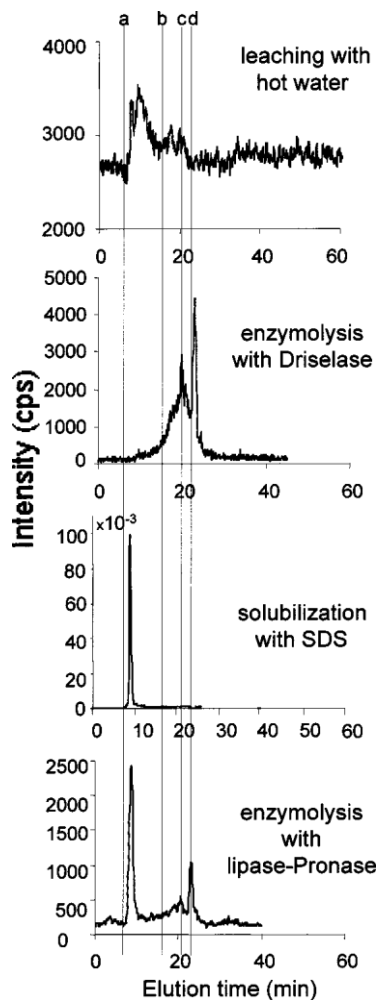
La concentration de sélénium dans les algues enrichies était de  $223 \pm 9 \mu\text{g/g}$ . La spéciation de ce sélénium a précédemment été rapportée (15). La teneur totale en Se dans les trois fractions (**Figure 1**) correspond aux 96,6 % de Se présents dans la matière de départ. La plus grande partie du sélénium (79 %) est présente sur le culot. Le Se restant est également réparti entre les fractions à haute (rétentat, 11,5 %) et faible (ultrafiltrat, 9,5 %) masse moléculaire (point de coupure à 30 kDa).

**Caractéristiques du culot (Figure 2).** L'extraction à l'eau chaude visait à récupérer les espèces de sélénium de faible masse moléculaire solubles dans l'eau. Les chromatogrammes d'échange d'anions et de cations (non illustrés) ont montré la présence d'au moins deux espèces, bien que le profil de chromatographie d'exclusion stérique suggère la présence d'un plus grand nombre de sélénocomposés. L'extraction enzymatique par Driselase a permis la libération d'espèces associées aux polysaccharides de la paroi cellulaire : une sélénoprotéine et de la sélénométhionine sont présentes. Les sélénoprotéines insolubles dans l'eau ont été récupérées par solubilisation par SDS. Le chromatogramme d'exclusion stérique montre la présence d'un signal très intense et net au niveau du volume d'exclusion de la colonne ( $M_r > 15$  kDa). Les chromatogrammes d'échange d'anions et de cations (non illustrés) avaient une très faible intensité, ce qui suggère que les composés de masse moléculaire élevée présents n'ont pas pu passer à travers les colonnes d'analyse ; cependant, un pic de faible intensité correspondant à la SeMet peut être observé. L'enzymolyse avec la lipase et la pronase visait à libérer et à digérer les sélénoprotéines résiduelles pour obtenir des composés de faible masse moléculaire. Le chromatogramme d'exclusion stérique de P consiste en un signal aigu s'éluant au volume d'exclusion de la colonne ( $M_r > 15$  kDa) suivi d'un groupe de deux pics mal résolus dans la région de faible masse moléculaire. Le chromatogramme d'échange d'anions suggère également la présence de SeMet, mais elle n'a pas été confirmée par la chromatographie d'échange de cations.

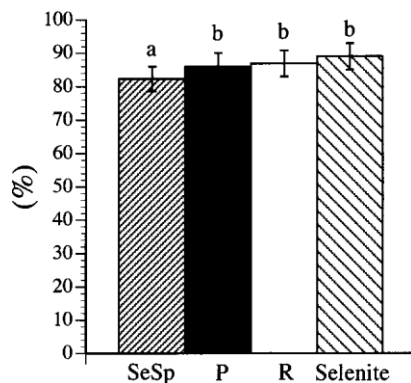
**Caractéristiques du rétentat.** La présence d'au moins une espèce à caractère hautement anionique a été détectée. La chromatographie d'échange d'anions et de cations (non illustrée) ne permet pas d'identifier positivement les espèces présentes.

**Absorption du Se de la spiruline et de ses sous-fractions.** En raison de la technique de l'alimentation par paire, les groupes alimentaires ont eu un apport alimentaire identique soit à 42 jours, soit à 7, 28 et 56 jours de réplétion en Se. Par conséquent, les apports en Se ont été en moyenne de  $1,40 \mu\text{g/jour}$  dans tous les groupes. L'absorption apparente de Se était significativement moindre pour la SeSp (82 %) que pour le culot (86 %), le rétentat (87 %) et le sélénite de sodium (89 %), qui ne différaient pas (**Figure 3**).

**Rétablissement du Se tissulaire et de l'activité de la GSHPx.** La déplétion en sélénium dans le foie et le rein est illustrée dans les parties A et B de la **Figure 4**, respectivement : dans ces organes, la restauration du Se était significativement plus élevée chez les rats nourris au rétentat (111 et 107 % des témoins, respectivement) ou au sélénite de sodium (109 et 101 % des témoins, respectivement) que chez les témoins après 56 jours. La SeSp



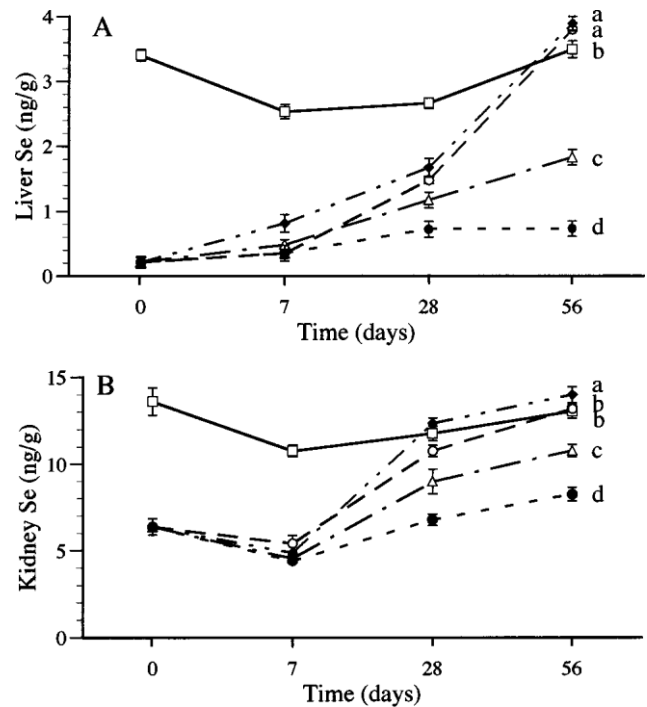
**Figure 2.** Spéciation du sélénium dans la fraction « culot » par HPLC-ICP-MS d'exclusion stérique après extraction séquentielle. Les extractions ont été effectuées avec de l'eau chaude, une solution de Driselase (mélange de laminarinase, xylanase et cellulase), une solution de SDS et une solution de lipase-pronase. Les lignes en pointillés marquent les volumes d'exclusion (a) et d'éluion des normes Se(VI) (b), Se(IV) (c) et sélénio-méthionine (d).



**Figure 3.** Pourcentage de sélénium alimentaire absorbé par les rats déficients en Se après 56 jours de réplétion en sélénite de sodium, spiruline riche en Se (SeSp), culot (P) ou rétentat (R). Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SEM,  $n = 5$ . Les barres avec différentes lettres d'index différent,  $P < 0,05$ .

ne peut pas normaliser le sélénium du foie (52 %) et des reins (82 %). Bien que le rétentat et la spiruline, dans une moindre mesure, aient continué à augmenter le Se dans les deux organes pendant toute la période de réplétion, le culot n'a pas pu atteindre une telle efficacité.

Les rats nourris pendant 42 jours avec le régime de base TY



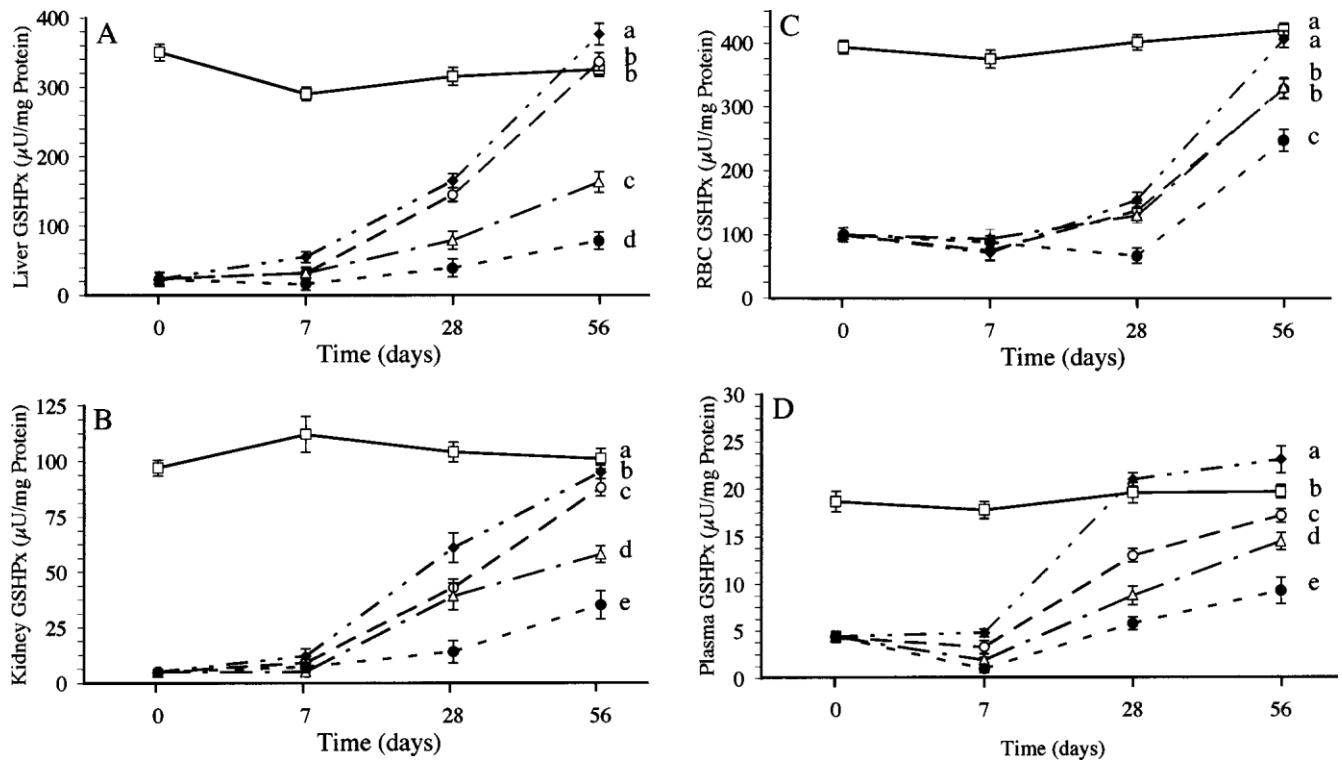
déficient en Se n'ont eu que 6,6 % de l'activité GSHPx du cytosol hépatique des animaux témoins

**Figure 4.** Effet de la source de Se sur le rétablissement de la concentration de Se dans les tissus de rats nourris avec un régime pauvre en Se pendant 6 semaines. Les rats nourris à la levure torula pendant 6 semaines ont reçu un nouveau régime contenant 0,075 mg de Se/kg avec du Se fourni sous forme de sélénite de sodium enrichi(O), de spiruline ( $\Delta$ ) ou de sous-fractions de spiruline [culot (●) et rétentat ( $\blacklozenge$ )]. Les animaux témoins (O) ont été nourris avec un régime contenant 0,075 mg de Se/kg (Se sous forme de sélénate) pendant toute l'expérience. Les valeurs sont la moyenne de cinq animaux  $\pm$  SEM. La réplétion de Se est montrée pour le foie (A) et le rein (B).

(**Figure 5A**). Au cours de la période de réplétion en Se, l'activité GSHPx du foie a rapidement repris dans les groupes d'animaux nourris au rétentat et au sélénite de sodium (115 et 103 % des témoins, respectivement). Les rats nourris à la spiruline présentaient une récupération finale de l'activité de la GSHPx 2,3 fois plus faible qu'avec le rétentat, et la récupération finale était de 50 % des témoins. Les animaux nourris au culot ont montré une activité significativement plus faible que les autres groupes pendant la période de réplétion (24 % des témoins). Ces niveaux de réplétion étaient étroitement liés à la réplétion de la concentration de Se dans ce tissu ( $r = 0,95, 1,14, 1,03$  et  $0,95$  pour SeSp, P, R et sélénite de sodium, respectivement). Les coefficients de corrélation étaient plus faibles dans le rein que dans le foie ( $r = 0,69, 0,55, 0,88$  et  $0,86$  pour SeSp, P, R et sélénite de sodium, respectivement); l'activité GSHPx du cytosol rénal n'était pas entièrement récupérée par une forme quelconque de Se (**Figure 5B**), et la réplétion allait de 35 % du témoin pour le culot à 87 % pour le sélénite de sodium et 95 % pour le rétentat. À la fin de la période de 56 jours, l'activité GSHPx des globules rouges (**Figure 5C**) n'a été rétablie dans aucun des groupes; le rétentat alimentaire a cependant permis d'atteindre le niveau de 96,5 % des témoins. En ce qui concerne le plasma (**Figure 5D**), seul le rétentat permettait une activité GSHPx entièrement reconstituée (117 % des témoins), alors que celle du groupe nourri au sélénite de sodium était de 84 % des témoins.

Les résultats des analyses de régression entre le temps de réplétion et la concentration de Se dans les tissus ou les activités GSHPx sont présentés dans le **Tableau 2**. La biodisponibilité relative du Se dans la SeSp, le culot et le rétentat est résumée dans le **Tableau 3**. Les données des **Figures 4** et **5** sont confirmées par celles du **Tableau 3**. Le rétentat a montré une très bonne biodisponibilité du Se (>100 %), sauf pour le Se du foie. En revanche, le Se était peu disponible dans la spiruline entière et le culot.





**Figure 5.** Effet de la source de Se sur la restauration de la glutathion peroxydase dans les tissus. Voir Figure 4 pour la description des méthodes expérimentales et la légende. La réplétion de l'activité GSHPx est montrée pour le cytosol du foie (A), le cytosol des reins (B), les globules rouges (C) et le plasma (D).

**Tableau 2.** Analyses de régression entre les activités du sélénium tissulaire ou des activités GSHPx et le temps chez les rats appauvris en Se avec le sélénite de sodium, la spiruline riche en Se (SeSp), le culot (P) ou le rétentat (R<sup>a</sup>)

variable dépendante	pente (m)				sélénite	constante (k)				coefficient de corrélation (R <sup>2</sup> )			
	sélénite	SeSp	P	R		sélénite	SeSp	P	R	sélénite	SeSp	P	R
Teneur en Se	0,071	0,027	0,007	0,063	0,28	0,33	0,37	0,99	0,98	0,99	0,83	0,98	
foie													
rein	0,146	0,123	0,070	0,164	5,47	4,35	4,14	4,35	0,96	0,95	0,97	0,98	
Activité GSHPx													
foie	6,237	2,700	1,270	6,600	-18,20	9,24	5,74	-4,51	0,99	0,99	0,99	0,99	
rein	1,612	1,059	0,580	1,612	-2,22	-1,85	1,04	-0,43	1,00	0,97	0,98	0,98	
érythrocytes	5,272	4,963	3,420	5,272	19,74	33,44	29,83	34,14	0,98	0,96	0,85	0,98	
plasma	0,263	0,271	0,166	0,263	2,96	0,44	0,30	0,44	0,94	0,99	0,98	0,97	

<sup>a</sup> La régression a été ajustée à l'équation  $R = mt + k$ , où R représente la teneur en Se des tissus ou l'activité de la GSHPx chez les rats soumis à une réplétion en Se avec du sélénite de sodium, de la spiruline riche en sélénium, le culot ou le rétentat. Les unités des variables dépendantes étaient les mêmes que celles des Figures 4 et 5.

**Tableau 3.** Biodisponibilité relative du sélénium contenu dans la spiruline riche en sélénium, le culot (P) et le rétentat (R<sup>a</sup>)

paramètre	spiruline	P	R
Teneur en Se			
foie	38	98	89
rein	84	48	112
Activité GSHPx			
foie	43	20	106
rein	66	36	103
érythrocytes	94	65	131
plasma	103	63	133

<sup>a</sup> La disponibilité biologique relative a été estimée en utilisant la pente de la ligne de régression décrite dans le Tableau 3 ; (pente de la SeSp ou du P ou du R)/(pente du sélénite de sodium)  $\times 100$ .

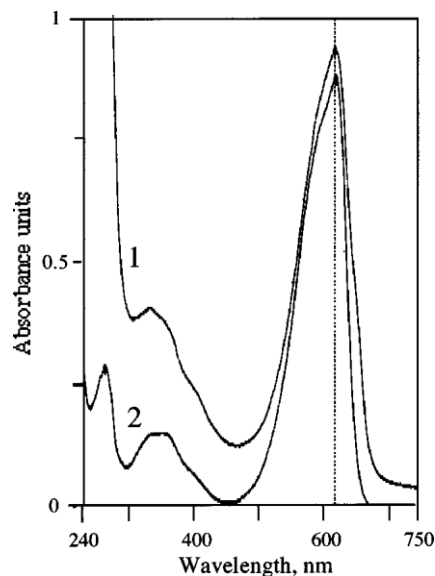
**DISCUSSION**

La concentration minimale de Se alimentaire qui répondra aux besoins des animaux se situerait dans la fourchette de 50-100 µg de Se/kg (23). Dans cette étude, nous avons utilisé 75 µg de Se/kg dans les régimes

témoin et de réplétion en Se. Ce niveau sous-optimal a été choisi pour générer des activités GSHPx sans plateau (23) parce que l'utilisation de 100 µg de Se/kg masquerait très probablement toute différence métabolique qui aurait pu être détectée avec un niveau inférieur à l'exigence de Se alimentaire.

Le remplacement des composés de Se inorganiques comme additifs alimentaires peut être effectué par la SeMet (25) ou par des sources nutritionnelles. Il a été rapporté que la levure cultivée dans les milieux enrichis en Se avait des effets bénéfiques (26). En réponse à la nécessité de Se soutenir la santé humaine, des aliments enrichis en sélénium ont été développés ces dernières années : choux de Bruxelles à haute teneur en Se (27), céleri à haute teneur en Se (28) et légumes Brassica à haute teneur en Se (29). L'ail à haute teneur en Se s'est révélé avoir un grand effet protecteur contre le cancer du sein (30) et le brocoli à haute teneur en Se contre le cancer du sein et du côlon (16, 31). Dans la recherche d'une source économique de formes nutritionnelles organiques de Se, nous avons tenté d'augmenter la teneur normalement faible en Se de

la spiruline en la cultivant dans un milieu enrichi en Se (15)  
: bien que le sélénium de la spiruline enrichie en Se soit biologiquement utile, sa biodisponibilité n'était pas supérieure à celle du sel de Se inorganique (sélénite de sodium) ou de la SeMet. Cela peut être



**Figure 6.** Spectres d'absorption du rétentat (1) et de la phycocyanine purifiée (2). Les mesures ont été effectuées dans la région de 240–750 nm. La ligne pointillée marque la longueur d'onde de 620 nm.

dû en partie à une dégradation de l'algue réduite dans le tube digestif et à différentes voies métaboliques utilisées par le Se des différentes formes utilisées dans cette étude. Nous avons donc préparé des sous-fractions de spiruline, et l'un des principaux objectifs de la présente étude était d'évaluer la biodisponibilité du Se dans chaque fraction. En général, l'absorption apparente des composés de Se organiques dans les aliments est considérée comme bonne (70–95 %) (32). Nos résultats sont conformes à ces valeurs.

La spiruline est une algue bleu-vert non ramifiée, hélicoïdale et filamenteuse ou cyanobactérie, qui est consommée depuis longtemps par l'homme. Outre les protéines, la biomasse de spiruline contient des lipides, des glucides et des pigments photosynthétiques (chlorophylle, caroténoïdes et phycocyanine). Cette dernière est responsable de la couleur bleu-vert caractéristique de la spiruline et ressemble aux pigments biliaires. Le procédé de fractionnement de la biomasse de spiruline visant à séparer les protéines hydrosolubles est bien connu (33) et a été utilisé dans cette étude avec une légère modification par l'ajout de l'étape d'ultrafiltration. La fraction hydrosoluble obtenue après l'élimination du culot est une fraction de couleur bleue intense car la phycocyanine en est le principal composant. Cela a été confirmé par le spectre ultraviolet-visible du rétentat en comparaison avec celui de la phycocyanine purifiée (**Figure 6**). Les phycocyanines sont des phycobiliprotéines trimériques (~110 kDa) qui peuvent se présenter sous forme de monomères à pH 6–8 et à faible force ionique. Les monomères eux-mêmes sont constitués de deux sous-unités (plage 17–18 kDa). Le procédé de fractionnement utilisé produit un culot riche en protéines et en lipides et un rétentat (principalement des phycocyanines). Ailleurs, la consommation de spiruline présente un avantage et un intérêt nutritionnel substantiels (18) sans rapport avec le sélénium ; la fraction appelée « rétentat » (c'est-à-dire la phycocyanine) exerce une action purificatrice contre les espèces réactives de l'oxygène telles que les radicaux  $\text{OH}^{\cdot}$  et  $\text{RO}^{\cdot}$  produit une diminution, en fonction de la concentration, de la peroxydation des lipides induite par l'acide ascorbique  $-\text{Fe}^{2+}$  dans les

distribué et métabolisé dans l'organisme ; c'était là un autre but de ce travail, par rapport à une forme de Se qui a été plus souvent étudiée, le sélénite de sodium.

Le sélénium du rétentat était supérieur à celui des autres fractions et de la SeSp pour restaurer l'activité GSHPx tissulaire et la concentration en Se. En fait, nous avons déjà signalé que la majorité du Se dans la spiruline était présente sous forme de sélénoprotéines (15). De plus, la phycocyanine représente 25 % de la protéine cellulaire, hautement digestible et de grande valeur biologique (36) : cela pourrait expliquer en partie pourquoi le Se du rétentat est si hautement disponible. Sa biodisponibilité relative, qui est de >100 % (sauf pour le foie), est simplement annulée en raison d'une erreur expérimentale. Cela signifie que le Se du rétentat était aussi efficace que la forme inorganique, le sélénite de sodium. Comme le rapporte Finley (37), un critère pour être bénéfique est que la forme du supplément de Se doit être relativement non toxique, ce qui signifie qu'elle ne doit pas s'accumuler excessivement dans l'organisme, mais lorsque le Se alimentaire est limitant, il doit également pouvoir reconstituer le pool de Se utilisé pour la synthèse des sélénoprotéines. Nos résultats ont montré que dans nos conditions expérimentales, le rétentat répond globalement au

microsomes du foie de rat (34). Il a également été rapporté que la phycocyanine est un protecteur antioxydant des érythrocytes humains contre la lyse par les radicaux peroxydes (35). La spiruline cultivée en présence de Se accumule des quantités substantielles de Se (17), et les fractions contiennent également du Se. Il est donc possible que les bienfaits de la spiruline pour la santé et plus particulièrement du rétentat soient améliorés par l'enrichissement en Se. Au début de cette étude, on ne savait rien sur la façon dont le Se de la spiruline et de ses sous-fractions est absorbé,

premier critère d'une bonne forme de supplément de Se, malgré une biodisponibilité légèrement > 100 % (Se rénal). Il répond sans réserve au deuxième critère.

La technique du rapport des pentes utilisée dans cette étude est une procédure raisonnable (ici, les coefficients de corrélation des régressions allaient de 0,83 à 0,99) pour l'évaluation de la biodisponibilité du Se provenant de différentes sources, comme le rapportent Yoshida et al. (38). Les auteurs ont mesuré la biodisponibilité du Se des levures sélénisées qui dépassait celle du sélénite, allant de 105 à 197 % selon les paramètres mesurés ; à titre de comparaison, le rétentat de Se présentait des valeurs allant de 83 à 130%. D'autres observations utilisant l'analyse du rapport des pentes ont indiqué que la biodisponibilité relative du Se provenant de la levure était >100 % (39) ; malgré cela, les levures sélénisées ont été signalées comme étant utiles comme source de Se pour améliorer le statut du Se humain. Ailleurs, dans notre étude, il y a une cohérence entre les concentrations de Se dans les tissus et les activités de la GSHPx ; en outre, nous avons montré que le Se du rétentat était au moins aussi efficace que celui du sélénite de sodium, bien qu'il n'ait pas la même forme chimique (principalement incorporé dans la phycocyanine du rétentat). En revanche, dans le culot, le Se se présente sous une forme en fait mal définie et peu efficace. Par conséquent, on peut conclure que le rétentat issu du fractionnement de la spiruline riche en Se peut être une source de Se précieuse et hautement disponible pour la supplémentation alimentaire dans la fourchette de l'apport quotidien recommandé en Se. Des recherches supplémentaires (i) pour identifier la forme de Se des espèces de masse moléculaire élevée pour lesquelles il n'existe pas de normes analytiques et (ii) pour évaluer les activités biologiques potentielles du rétentat doivent être menées avant de recommander cette fraction comme supplément en Se.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions le Dr Christian Aymard (CIRAD, Montpellier, France) pour ses critiques utiles en matière d'analyse statistique.

## LITTÉRATURE CITÉE

- (1) Rotruck, J.; Pope, A.; Ganther, A.; Swanson, A.; Hafemen, D.; Hoekstra, W. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* **1973**, *179*, 588–590.
- (2) Burk, R. F.; Hill, K. E. Regulation of Selenoproteins. In *Annual Review of Nutrition*, 13th ed.; Olson, R., Bier, D., McCormick, D., Eds.; Annual Reviews: Palo Alto, CA, 1993; pp 65–81.

- (3) Ne'Ve, J. Selenium as a risk factor for cardiovascular diseases. *J. CardioVasc. Risk* **1996**, *3*, 42–47.
- (4) Ellis, N.; Lloyd, B.; Clayton, B. E. Selenium and vitamin E in relation to risk factors for coronary heart disease. *J. Clin. Pathol.* **1984**, *37*, 200–206.
- (5) Keshan Disease Research Group of the Chinese Academy of Medical Science, Beijing. Epidemiologic studies on the etiologic relationship of selenium and Keshan disease. *Chin. Med. J.* **1979**, *92*, 477–482.
- (6) Jensen, G. E.; Clausen, J. Glutathione peroxidase and reductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and catalase activities in multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **1984**, *63*, 45–53.
- (7) Orndahl, G.; Sellde'n, U.; Hallin, S.; Wetterqvist, H.; Rindby, A.; Selin, E. Myotonic dystrophy treated with selenium and vitamin E. *Acta Med. Scand.* **1986**, *219*, 407–414.
- (8) Tarp, U.; Overvad, K.; Hansen, J. C.; Thorling, E. B. Low selenium level in severe rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* **1985**, *14*, 97–101.
- (9) Fecondo, J. V.; Augusteyn, R. C. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the human cataractous lens. *Exp. Eye Res.* **1983**, *36*, 15–23.
- (10) Panel on Dietary Antioxidant and Related Compounds. *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and  $\beta$ -Carotene and Other Carotenoids*; National Academy Press: Washington, DC, 2000.
- (11) Rayman, P. M. Dietary selenium: time to act. Low bioavailability in Britain and Europe could be contributing to cancers, cardiovascular disease, and subfertility. *Br. Med. J.* **1997**, *314*, 387–388.
- (12) Fairweather-Tait, S. J. Bioavailability of selenium. *Eur. J. Clin. Nutr.* **1997**, *51*, S20–S23.
- (13) Van Vleet, J. F. Current knowledge of selenium-vitamin E deficiency in domestic animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1980**, *176*, 321–325.
- (14) Combs, G. F., Jr. Selenium in global food and systems. *Br. J. Nutr.* **2001**, *85*, 517–547.
- (15) Cases, J.; Vacchina, V.; Napolitano, A.; Caporiccio, B.; Besanc, on, P.; Lobinski, R.; Rouanet, J. M. Selenium from selenium-rich spirulina is less bioavailable than selenium from sodium selenite and selenomethionine in selenium-deficient rats. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 2343–2350.
- (16) Finley, J. W.; Davis, C. D.; Feng, Y. Selenium from high selenium broccoli protects rats from colon cancer. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2384–2389.
- (17) Cases, J.; Puig, M.; Caporiccio, B.; Baroux, B.; Baccou, J. C.; Besanc, on, P.; Rouanet, J. M. Glutathione related enzymic activities in rats receiving high cholesterol or standard diets supplemented with two forms of selenium. *Food Chem.* **1999**, *65*, 207–211.
- (18) Kay, R. A. Microalgae as food and supplement. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1991**, *30*, 555–573.
- (19) Casiot, C.; Szpunar, J.; Lobinski, R.; Potin-Gautier, M. Sample preparation and HPLC separation approaches to speciation analysis of selenium in yeast by ICP MS. *J. Anal. At. Spectrom.* **1999**, *14*, 645–650.
- (20) National Research Council. *Guide for the Care and the Use of Laboratory Animals*; Publication 85-23 (rev.); National Institutes of Health: Bethesda, MD, 1985.
- (21) Wendel, A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **1981**, *77*, 325–333.
- (22) 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.
- (23) Gissel-Nielsen, G. Selenium intake by plants, animals and humans. In *Selenium in Medicine and Biology*; Ne'Ve, J., Favier, A., Eds; de Gruyter: Berlin, Germany, 1988; pp 1–10.
- (24) Weiss, S. L.; Evenson, J. K.; Thompson, K. M.; Sunde, R. A. Dietary selenium regulation of glutathione peroxidase mRNA and other selenium-dependent parameters in male rats. *J. Nutr. Biochem.* **1997**, *8*, 85–91.
- (25) Schrauzer, G. N. Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 1653–165.
- (26) Mahan, D. C. Selenium metabolism in animals: what role does selenium yeast have? In *Biotechnology of the Feed Industry*; Lyons, T. P., Jacques, K. A., Eds.; Nottingham University Press: Loughborough, U.K., 1994; pp 257–267.
- (27) Stoewsand, G. S.; Andrews, J. L.; Munson, L.; Lisk, D. J. Effect of dietary Brussels sprouts with increased selenium content on mammary carcinogenesis in the rat. *Cancer Lett.* **1989**, *45*, 43–48.
- (28) Lee, G. P.; Park, K. W. Quality improvement of 'Seoul' celery by selenium in the nutrient solution culture. *Acta Hort.* **1999**, *483*, 185–192.
- (29) Kospell, D. A.; Randall, W. M. Selenium accumulation in a rapid-cycling *Brassica oleracea* population responds to increasing sodium selenate concentrations. *J. Plant Nutr.* **1999**, *22*, 927–937.
- (30) Ip, C.; Lisk, D. J. Efficacy of cancer prevention by high-selenium garlic is primarily dependent on the action of selenium. *Carcinogenesis* **1995**, *16*, 2649–2652.
- (31) Finley, J. W.; Ip, C.; Lisk, D. J.; Davis, C. D.; Hintze, K. J.; Whanger, P. D. Cancer-protective properties of high-selenium broccoli. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *49*, 2679–2683.
- (32) Combs, G. F., Jr.; Combs, S. B. Selenium in foods and feeds. In *The Role of Selenium in Nutrition*; Combs, G. F., Jr., Combs, S. B., Eds.; Academic Press: New York, 1986; pp 41–126.
- (33) Vincenzini, M.; Bocci, F.; Materassi, R.; Florenzano, G. Decoloration and fractionation in spirulina biomass. In *Progress in Food Engineering: Solid Extraction and Purification*; Texturization European Symposium (LWT Edition 7); de Gruyter: Berlin, Germany, 1983; pp 563–565.
- (34) Romay, C.; Armesto, J.; Ramirez, D.; Gonzalez, R.; Ledon, N.; Garcia, I. Antioxidant and anti-inflammatory properties of c-phycocyanin from blue-green algae. *Inflam. Res.* **1998**, *47*, 36–41.
- (35) Romay, C.; Gonzalez, R. Phycocyanin is an antioxidant protector for human erythrocytes against lysis by peroxy radicals. *J. Pharm. Pharmacol.* **2000**, *52*, 367–368.
- (36) Puyfoulhoux, G.; Rouanet, J. M.; Besanc, on, P.; Baroux, P.; Baccou, J. C.; Caporiccio, B. Iron availability from iron-fortified spirulina by an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1625–1629.
- (37) Finley, J. W. The absorption and tissue distribution of selenium from high-selenium broccoli are different from selenium from sodium selenite, sodium selenate, and selenomethionine as determined in selenium-deficient rats. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3702–3707.
- (38) Yoshida, M.; Fukunaga, K.; Tsuchita, H.; Yasumato, K. An evaluation of the bioavailability of selenium in high-selenium yeast. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **1999**, *45*, 119–128.
- (39) Vinson, J. A.; Bose, P. Relative bioavailability of inorganic and natural selenium. In *Selenium in Biology and Medicine: Proceedings of the Third International Symposium on Selenium in Biology and Medicine*; Combs, J. F., Jr., Spallholz, J. E., Levander, O. A., Oldfield, J. E., Eds.; AVI: New York, 1987; Part A, pp 445–449.

Reçu pour examen le 11 décembre 2001. Manuscrit révisé reçu le 27 mars 2002. Accepté le 27 mars 2002.

JF011646T