

FORMES DE SÉLÉNIUM URINAIRE CHEZ LE MOUTON

M. HIDIROGLOU ⁽¹⁾ et I. HOFFMAN ⁽²⁾
avec la collaboration technique de R. J. WESTERBY

*Agriculture Canada,
(Animal Research Institute),
Institut de Recherches zootechniques,
Ottawa*

RÉSUMÉ

Le but de ce travail a été de connaître les teneurs ainsi que les formes de sélénium urinaire du mouton à qui l'on a administré cet oligoélément sous différentes formes. Pour chaque forme de sélénium administré, que ce soit, sélénate, sélénite ou sélénométhionine, on s'est servi de deux moutons. La séparation de deux formes de sélénium a été effectuée au moyen d'une colonne à résine anionique, par chromatographie bidimensionnelle sur papier, ou par électrophorèse. Il en ressort que le sélénium, administré sous quelque forme que ce soit, est éliminé rapidement par la voie urinaire, surtout sous forme organique.

INTRODUCTION

Dans une étude antérieure (HIDIROGLOU et coll., 1968) nous avons trouvé qu'une partie du sélénium administré au mouton est éliminée par voie urinaire. BYARD (1969) a rapporté que le triméthyle de sélénium était la forme sous laquelle se présentait la majeure partie du sélénium trouvé dans l'urine des petits animaux de laboratoire auxquels on avait administré du sélénite du sodium. PALMER et coll. (1970) ont retrouvé 25 p. 100 du sélénium urinaire du rat traité à une forme organique de sélénium sous la forme de triméthyle de sélénium et 18 p. 100 sous la forme d'un métabolite non identifié. Le travail rapporté ci-après est une tentative d'isoler les différentes formes de sélénium excrétées dans l'urine du mouton, en employant une nouvelle méthode de chromatographie sur colonne ou encore en se servant de chromatographie sur couches minces et électrophorèse à haut voltage.

(1) Contribution n° 560. Institut de Recherches zootechniques. Ottawa.

(2) Adresse présente : Conseil national de Recherches (Canada).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Animaux

On s'est servi de 6 moutons de race croisée *Leicester* × *Shropshire* nourris avec un foin contenant 0,03 p.p.m. de sélénium. Ces animaux ont été placés en cages à métabolisme huit jours avant le début de l'expérience. Tout le matériel, cages, mangeoires, lieux de collection d'urine, etc., était en matériel plastique. Pendant les 5 jours précédant l'administration du sélénium, des prélèvements d'urine ont été effectués chaque matin. Par la suite, après l'administration de sélénium sous forme de sélénite de sodium, de sélénate de sodium ou encore de sélénométhionine, la collection d'urine a continué quotidiennement pendant 120 heures. Pour chaque forme de sélénium, 2 moutons de poids égal (35-40 kg environ) ont été traités avec 10 mg de sélénium, l'un par voie orale, l'autre par voie intramusculaire. Des échantillons pondérés quotidiens ont été réalisés à partir des excréments journalières totales (après homogénéisation), et seulement des urines fraîches ont été utilisées pour la chromatographie sur colonne. En plus, deux moutons de 25 kg, nourris également avec un foin carencé en sélénium, ont reçu par voie intraveineuse 500 μ Ci de ^{75}Se -sélénométhionine.

Chromatographie sur couche mince. Électrophorèse en haut voltage.

L'urine des moutons traités à la ^{75}Se -sélénométhionine, 24 heures après son administration, a été premièrement déminéralisée sur Amberlite IR-120 H^+ puis chromatographiés, soit sur plaque en silice G (AMBERT et coll., 1966), ou sur papier Whatman N° 1, en bidimensionnelle d'après la technique de PALMER et coll. (1969) ou encore par électrophorèse en haut voltage, selon REY (1962). On a utilisé par la suite l'autoradiographie en vue d'identifier les taches radioactives.

Technique de Séparation des différentes formes de sélénium. Chromatographie sur colonne.

Pour la colonne, on a utilisé une burette de 25 ml en pyrex : un tampon de laine de verre a été mis au bas de la colonne que l'on a rempli de résine anionique sous forme de chlorure (Biorad). La résine fut lavée plusieurs fois à l'eau bidistillée jusqu'à obtention d'un liquide parfaitement clair, rincée 3 fois avec 25 ml d'acide sulfurique 0,1N, et relavée 3 fois avec 25 ml d'eau bidistillée. Pour la régénération de la colonne, on a utilisé de l'acide chlorhydrique 0,1N suivi par un dernier lavage avec 3×25 ml d'eau bidistillée.

Mode opératoire

1. Centrifuger 20 ml d'urine pendant 10 mn à $600 \times g$.
2. Prélever le surnageant et le transvaser dans la colonne à chromatographie (CC).
3. Laver les parois intérieures des tubes à centrifugation avec de légères rincées d'eau et transvaser dans la CC. Durant cette opération, éviter de mettre en suspension le sédiment d'urine (*résidu*).
4. Rincer la CC 3 fois avec 24 ml d'eau bidistillée. Collecter les éluats de la colonne dans un matras Kjeldahl. Ceci représente la *fraction organique*.
5. Laver le contenu de la CC avec 100 ml de SO_4H_2 0,1N et collecter les éluats dans une fiole volumétrique. Le contenu de cette dernière représente le *sélénium total inorganique*.
- 5 a. Prendre 50 ml des éluats acides et les transvaser dans un flacon à micro-Kjeldahl en vue de la minéralisation acide (nitrique, perchlorique et sulfurique) selon la méthode de HOFFMAN et coll. (1968). Ceci représente la moitié du sélénium *inorganique total*, lequel a été déterminé selon HOFFMAN et coll. (1968).
- 5 b. Transvaser dans un flacon Erlenmayer le reste des éluats. Mettre 3 billes de verre, 5 ml d'eau, 5 ml d'acide sulfurique, puis suivre les étapes de la méthode fluorimétrique de détermination du sélénium (HOFFMAN et coll. 1968) et ceci à partir du point où il est question d'ajouter de l'EDTA, de l'hydroxyde d'ammoniaque et de la solution de DAN, laquelle forme un complexe, spécialement avec le sélénite. Il en résulte donc que le sélénium déterminé au paragraphe 5 b sans minéralisation acide au préalable représente le sélénium IV (*Sélénite*).
6. Le sélénium VI (sélénate) a été calculé de la façon suivante : $2x$ la quantité de sélénium déterminé dans l'étape 5 a, -- $2x$ la quantité de sélénite déterminé dans l'étape 5 b.

On s'est servi des étalons internes radioactifs (sélénate, sélénite, sélénométhionine) au cours des étapes précitées. Les quantités récupérées de ces étalons étaient de l'ordre de 95 p. 100 en moyenne.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

A l'exception de quelques cas, la fluctuation journalière du sélénium urinaire et ses quantités excrétées furent faibles chez les moutons avant l'administration du sélénium. Cette excrétion de sélénium si basse est probablement le reflet d'une répercussion directe du régime carencé en cet élément (tabl. I, 2, 3). L'excrétion urinaire de sélénium était beaucoup plus rapide après administration intramusculaire qu'orale. Lors de l'administration des 3 formes de sélénium par voie intramusculaire, on a remarqué que dans le cas du sélérate ou du sélénite, la moitié du sélénium était excrétée par voie urinaire au bout d'une semaine, tandis que dans le cas de la sélénométhionine, l'excrétion en atteignait le quart seulement. Il se peut d'ailleurs que l'excrétion de cet acide aminé sélénié soit plus lente que les formes de sélénium inorganique, comme ceci d'ailleurs a été suggéré par JACOBSSON et LINDBERG (1968), pour le Mouton, et par THOMSON et STEWART (1973), pour le Rat.

TABLEAU I

Formes de sélénium (nanogrammes/20 ml d'urine) urinaire excrétées après l'administration d'une seule dose de 10 mg de sélénite de sodium (IV) par voie orale (O) ou intramusculaire (IM)

	Jours	Se ng/20 ml urine				Excrétion urinaire du Se (µg)	
		Se IV	Se VI	Se organique	Se résidu	par jour	en cinq jours
Mouton 1 avant administration	5	37	—	122	126	12	69
	4	41	—	443	182	16	
	3	28	—	545	202	16	
	2	21	—	619	105	13	
	1	17	14	719	139	12	
Mouton 1 après administration IM de Se IV (10 mg)	1	80	1 136	102 000	3 950	2 305	4 454
	2	76	690	64 000	1 950	1 030	
	3	44	296	22 600	2 700	705	
	4	43	176	8 700	2 760	240	
	5	82	48	4 400	730	174	
Mouton 2 avant administration	5	0	4	64	2	3	40
	4	0	16	10	4	2	
	3	24	—	180	10	7	
	2	24	—	396	11	12	
	1	36	—	436	125	16	
Mouton 2 après administration orale de Se IV (10 mg)	1	684	—	6 400	287	236	1 432
	2	55	244	6 500	619	645	
	3	28	128	2 240	441	356	
	4	46	444	2 160	262	128	
	5	64	39	550	490	67	

1 µg = 1 000 ng.

Après le traitement des moutons au sélénium (tabl. 1, 2, 3), les quantités excrétées de cet élément par voie urinaire se rapprochent sensiblement des résultats obtenus chez l'homme, où l'excrétion était de 6,5 à 15 mg de Se/24 h, ceci naturellement de façon comparative par rapport au poids des sujets.

Lors de l'administration de sélénite ou de sélénate, le sélénium a été davantage excrété au bout d'une semaine dans le cas d'administration IM qu'orale.

Il va de soi que ces observations sont rapportées à titre indicatif, vu le petit nombre d'animaux utilisés. En étudiant les tableaux (1, 2 et 3) on constate que la majorité du sélénium excrété avant l'administration de sélénium sous quelque forme que ce soit, est excrété sous forme organique. Une autre partie appréciable se trouve dans le « résidu », forme de sélénium encore non identifié, puis dans le sélénite. Quant au sélénium rapporté comme « sélénate », il existe en quantité infime.

TABLEAU 2

Formes de sélénium (nanogrammes/20 ml d'urine) urinaire excrétées après l'administration d'une seule dose de 10 mg de sélénate de sodium (VI) par voie orale (O) ou intramusculaire (IM)

	Jours	Se ng/20 ml urine				Excrétion urinaire du Se (μ g)	
		Se IV	Se VI	Se organique	Se résidu	par jour	en cinq jours
Mouton 3 avant administration	5	50	—	131	83	25	88
	4	18	—	216	75	18	
	3	24	16	458	153	15	
	2	48	—	231	92	19	
	1	24	7	622	284	11	
Mouton 3 après administration IM de 10 mg Se VI	1	124	1 016	33 300	725	2 887	5 785
	2	42	580	31 500	580	1 690	
	3	82	218	11 400	740	351	
	4	100	64	8 150	535	692	
	5	130	—	1 840	275	165	
Mouton 4 avant administration	5	16	—	172	6	8	71
	4	3	16	375	8	13	
	3	11	60	178	22	13	
	2	23	6	98	10	21	
	1	29	—	131	14	16	
Mouton 4 après administration orale de 10 mg Se VI	1	230	260	18 000	690	1 216	2 937
	2	43	331	14 500	1 000	873	
	3	104	94	6 400	540	574	
	4	21	391	2 080	338	187	
	5	48	20	690	356	87	

Après déminéralisation de l'urine du mouton ayant reçu de la ^{75}Se -sélénométhionine, sa chromatographie sur couche mince ou électrophorèse à haut voltage suivie d'une autoradiographie de 3 semaines nous ont permis d'isoler une seule tache

radioactive. Son activité atteignait approximativement 35 p. 100 de l'activité originale urinaire échantillonnée.

Il y a lieu de mentionner aussi que la chromatographie bidimensionnelle effectuée d'après la technique de PALMER et coll. (1969), où l'on s'est servi de deux systèmes de solvants dans un ordre donné, puis inversé, à confirmé également la présence d'une seule tache radioactive. Cette dernière présentait les mêmes caractères chromatographiques que celles du métabolite organique sélénié UI (le chlorure de triméthyle sélénum), mentionné par PALMER et Coll. (1969).

TABLEAU 3

Formes de sélénium (nanogrammes/20 ml d'urine) urinaire excrétées après l'administration d'une seule dose de 10 mg de sélénométhionine (Se-Me) par voie orale (O) ou intramusculaire (IM)

	Jours	Se ng/20 ml urine				Excrétion urinaire du Se (μ g)	
		Se IV	Se VI	Se organique	Se résidu	par jour	en cinq jours
Mouton 5 avant administration	5	20	—	204	98	18	72
	4	16	—	319	79	17	
	3	45	—	312	122	15	
	2	38	—	403	72	12	
	1	8	18	416	—	10	
Mouton 5 après administration IM de 10 mg Se-Me	1	—	476	23 000	1 050	1 391	2 731
	2	90	222	11 500	680	726	
	3	96	70	4 500	370	264	
	4	82	70	3 150	700	201	
	5	96	—	2 370	500	149	
Mouton 6 avant administration	5	4	8	190	14	6	45
	4	4	16	350	10	13	
	3	5	11	396	16	9	
	2	12	4	110	24	4	
	1	10	3	509	13	13	
Mouton 6 après administration orale de 10 mg de Se-Me	1	17	681	37 000	1 400	1 051	2 544
	2	63	401	23 500	600	749	
	3	40	248	12 000	550	379	
	4	10	526	4 500	450	209	
	5	34	94	3 130	412	156	

CONCLUSION

Il est évident que le sélénium, indépendamment de la forme sous laquelle il a été administré, est excrété rapidement par la voie urinaire surtout sous sa forme organique. Bien entendu, il serait intéressant de compléter ce travail par une étude similaire sur l'excrétion du sélénium fécal chez le Mouton.

Reçu pour publication en mars 1975.

SUMMARY

FORMS OF URINARY SELENIUM IN SHEEP

The purpose of the present study was to determine the amount and kinds of selenium excretory products in the urine of sheep after administration of this trace element in different forms. Two sheep were allocated to each treatment comprising the administration of one of the following forms of selenium : selenate, selenite and selenomethionine. Two selenium excretory products were separated by means of anion-exchange resins, two-dimensional paper chromatography or by electrophoresis. Results show that selenium, and especially the organic fraction, is rapidly excreted in the urine whatever the form administered.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AMBERT J.-P., PÉCHERY C., CHARPENTIER C., HARTMANN L., 1966. I. Dosage et différenciation des acides aminés urinaire chez le sujet normal. *Ann. Biochim. Clin.*, **24**, 17-40.
- BYARD L. J., 1969. Trimethyl selenide. A urinary metabolite of selenite. *Arch. Biochem. Biophys.*, **130**, 556-560.
- HIDIROGLOU M., JENKINS K. J., CARSON R. B., MCKAY R. R., 1968. Some aspects of selenium metabolism in normal and dystrophic sheep. *Can. J. Animal Sci.*, **48**, 335-346.
- HOFFMAN I., WESTERBY R., HIDIROGLOU M., 1968. Precise fluorometric microdetermination in agricultural materials. *J. A. O. A. C.*, **5**, 1039-1042.
- JACOBSSON S. O., LINDBERG P., 1968. The influence of a flushing dose of selenium on the excretion of selenium in sheep. *Acta Vet. Scand.*, **9**, 199-207.
- PALMER I. S., FISCHER D. D., HALVERSON A. W., OLSON O. E., 1969. Identification of a major selenium excretory product in rat urine. *Biochim. Biophys. Acta.*, **177**, 336-342.
- PALMER I. S., GUNSALUS R. P., HALVERSON A. W., OLSON O. E., 1970. Trimethylselenonium ion as a general excretory product from selenium metabolism in the rat. *Biochim. Biophys. Acta.*, **208**, 260-266.
- REY J., MAYER M. A., DEVSSON A., FRÉZAI J., LAMY M., 1962. Séparation bi-dimensionnelle des acides aminés par électrophorèse en haut voltage et chromatographie sur papier. *Rev. Franç. Études Clin. et Biol.*, **7**, 877-882.
- THOMSON D. C., 1972. Urinary excretion of selenium in some New Zealand women. *Proc. University Otago. Med. School.*, **50**, 31-33.
- THOMSON C. D., STEWART R. D., 1973. Metabolic studies of ⁷⁵Se-selenomethionine and ⁷⁵Se-selenite in the rat. *Br. J. Nutr.*, **30**, 139-147.