

UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDALLAH
FACULTE DES SCIENCES DHAR MEHRAZ FES

THESE

Présentée par

Meryem IBNLKHAYAT IDRISSI

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT NATIONAL ES-SCIENCES

UFR : Physiologie - Pharmacologie

Discipline : Biologie

Spécialité : Physiologie Animale

**ETUDE EXPERIMENTALE DES EFFETS DE L'ALUMINIUM
CHEZ LE RAT ET LA SOURIS**

INVESTIGATION CLINIQUE CHEZ LES HEMODIALYSES

Soutenu le : 21 Décembre 2002

Président :

Mr. Le Professeur **M. HILALI**

Faculté des Sciences D. M. Fès.

Membres du Jury :

Mme Le Professeur **B. LYOUSSI**

- Rapporteur -

Faculté des Sciences D. M. Fès.

Mr. Le Professeur **P. ZATTA**

- Rapporteur -

Président du C.N.R. Unité Métalloprotéines. Padova, Italie.

Mr. Le Professeur **M. NAJIMI**

- Rapporteur -

Faculté des Sciences et Techniques Beni Mellal.

Mme. Le Professeur **R. SOULEIMANI BENCHEIKH** - Examineur -

Chef de Service du Centre de Pharmacovigilance. Rabat.

Mr. Le Professeur **M. LACHKAR**

- Examineur -

Faculté des Sciences D. M. Fès.

DEDICACE

A Mon Père

Tes sacrifices et tes Prières m'ont permis de vivre ce jour. Rien ne saurait exprimer la fierté, la reconnaissance et l'Amour que je te porte. Que Dieu le Tout Puissant te procure, santé et longue Vie.

A Ma Mère

Avec tout mon amour pour ton soutien et tes encouragements. J'espère rester à la hauteur de tes espoirs. Ta bonté n'a d'égal que ta sagesse. Que Dieu te protège et t'accorde santé et longue Vie.

A Mes Frères et Sœurs

Vous êtes toujours là pour moi. Avec toute mon affection.

A Ma Belle Sœur Siham

Merci de ton aide précieuse. Avec toute mon affection.

A Mes Beaux Frères

Avec toute ma reconnaissance pour votre soutien moral et vos encouragements.

A Ma Nièce Zineb

Avec tout l'amour que je te porte.

A Mes Neveux et Nièces

Avec toute mon affection.

A Tonton Saïd

En témoignage de mon affection pour ton soutien.

REMERCIEMENTS

Monsieur Le Professeur M.HILALI

Nous avons eu le privilège de votre enseignement précieux. Vos conseils, votre compétence, votre rigueur scientifique et vos qualités humaines nous ont beaucoup aidé. Vous nous faites l'honneur de présider cette Thèse, nous vous en sommes reconnaissant. Veuillez trouver ici le témoignage de notre profond respect, notre sincère gratitude et l'expression de nos respectueuses considérations.

Professeur B. LYOUSSI

Votre enthousiasme communicatif, votre gentillesse et votre disponibilité sont des qualités qui nous ont aidé à réaliser ce travail. Nous sommes heureux de vous avoir parmi nos juges et vous prions de croire en notre profonde gratitude et notre grande estime.

Professeur P. ZATTA

Nous avons réalisé une grande partie de ce travail dans votre laboratoire où vous nous avez accueilli avec bienveillance. Votre patience, la clarté de vos avis et votre disponibilité à notre égard malgré vos multiples responsabilités ont contribué à la réalisation de ce travail. Vous avez accepté d'être de nos juges, nous vous prions de croire en notre gratitude et notre reconnaissance.

Professeur M. NAJIMI

Vous avez accepté d'être de nos juges, nous vous en remercions. Veuillez trouver ici l'expression de nos sincères remerciements.

Professeur M. LACHKAR

Nous vous remercions de l'intérêt que vous apportez à ce travail en acceptant de le juger. Nous vous en sommes très reconnaissant.

Professeur R.SOULEIMANI BENCHEIKH

Vous avez accepté d'être de nos juges, nous vous en remercions. Veuillez trouver ici l'expression de nos sincères remerciements.

Général-Médecin A. SALHI

Nous tenons à vous remercier pour votre aide appréciable dans la réalisation d'une partie de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de notre haute considération et de notre profond respect.

Colonel-Médecin S. BENOMAR

Chef du Service d'Anatomo-Pathologie de l'Hôpital Militaire. Rabat.

Nos sincères remerciements pour votre contribution à la réalisation d'une partie de ce travail. Nous vous prions de croire en notre sincère gratitude.

ASSESSORATO ALLA SANITA', Regione DEL VENETO, ITALIA

Ministre Régional de la Santé. Région de Venise.

Soyez persuadé Monsieur Le Ministre de notre profonde reconnaissance pour l'aide précieuse que vous nous avez apportée. Sans votre soutien financier, ce travail n'aurait pas abouti. Veuillez trouver ici l'expression de nos sincères remerciements.

Mr. A. SALHI

Tu es toujours là quand j'ai besoin de toi. Ton amitié m'est des plus précieuses. Merci pour tes encouragements et tes prières.

Docteur P. ZAMBENEDETTI

Biologiste Responsable du Laboratoire d'Anatomo-Pathologie de l'Hôpital de Dolo. Italie.

Ton amitié, ton aide et ta disponibilité ont facilité mon travail et permis mon intégration au sein de ton laboratoire. Accepte mes sincères remerciements et mon amitié la plus dévouée.

Docteur V. DINOTO

Je vous remercie de la confiance que vous m'avez témoignée au cours de mon séjour dans votre laboratoire. Soyez persuadé de ma profonde reconnaissance.

Docteur R. GIORDANO

Médecin Responsable du Service d'Anatomo-Pathologie de l'Hôpital de Dolo. Italie.

Votre cordialité, votre sympathie et votre gentillesse ont facilité mon travail dans votre laboratoire. Soyez sûr de ma profonde gratitude.

CNR-Center on Metalloproteins, Department of Biology, University of Padova

A tous les membres j'adresse un grand merci pour leur gentillesse et leur aide. L'ambiance qui régnait dans le CNR était pour moi un facteur qui a facilité mon intégration et a créé d'excellentes conditions de travail.

D. CERVELLIN

Technicien du Laboratoire de Biochimie au C. N. R. Unité Metalloprotéines, Padova. Italie.

Ta sympathie, ta disponibilité et ta gentillesse ont fait que tu étais toujours là quand j'avais besoin de toi. Ton aide m'était des plus précieuses. Sois sûr de ma profonde amitié.

M. VITADELLO et S. LAVINA

Merci pour votre aide, votre gentillesse et votre serviabilité.

Docteur S. BOUHBOUH

En témoignage de mon amitié pour ton aide précieuse.

Docteur F. ARJATI

Laboratoire d'analyses médicales, Sefrou.

Je vous prie de croire en mes remerciements les plus sincères pour votre aide.

Aux membres de l'Unité de Physiologie Animale

Vos encouragements et votre sympathie m'ont été précieux.

Au Personnel du Service d'Anatomo-Pathologie de l'Hôpital Militaire de Rabat

Merci pour votre disponibilité et votre contribution à la réalisation d'une partie de mon travail.

Aux membres de l'Unité de Biologie Animale

Un grand merci pour votre gentillesse et vos encouragements.

Aux Médecins responsables du Centre d'Hémodialyse de l'Hôpital Ghassani

Vous m'avez accueilli avec bienveillance dans votre centre, vos conseils m'ont été précieux. Veuillez trouver ici le témoignage de ma gratitude.

Aux Patients du centre d'Hémodialyse de l'Hôpital Ghassani

Merci pour votre collaboration qui a permis la réalisation d'une partie de ce travail.

Au Personnel du Centre d'Hémodialyse de l'Hôpital Ghassani

Mes chaleureux remerciements pour votre aide précieuse.

A M. Aabour

Ta bonté n'a d'égal que ta loyauté. Merci pour ton soutien permanent.

RESUME

Autrefois, l'aluminium était considéré comme parfaitement anodin et personne n'avait songé à étudier ses modalités de pénétration au sein de l'organisme ainsi que son comportement au sein des organes.

Aujourd'hui, la toxicité de l'aluminium est bien établie chez l'animal de laboratoire ainsi que chez les patients atteints d'insuffisance rénale, et un lien épidémiologique a effectivement été démontré entre exposition à l'aluminium et maladies neurodégénératives.

Le but de cette étude est l'exploration du taux plasmatique de l'aluminium dans le cas de l'insuffisance rénale chronique et de témoins, l'évaluation de l'effet du métal chez l'animal ainsi que son implication dans l'activité de certaines enzymes.

Chez les hémodialysés, l'aluminémie extrêmement élevée aussi bien avant qu'après dialyse, est due au fait que le traitement de l'eau pour dialyse n'était pas adéquat, vu que l'osmoseur inverse ne fonctionnait pas au moment et plusieurs mois avant que les prélèvements ne soient effectués. Environ la moitié des patients présentent des niveaux d'aluminium plus élevés après la dialyse, ce qui est probablement dû à l'ultrafiltration qui concentre les protéines plasmatiques. Les témoins également montrent une aluminémie très importante en raison de l'eau de boisson et des habitudes alimentaires.

Concernant la spéciation de l'aluminium après administration orale chronique et perfusion intraveineuse, il s'est avéré que le dépôt au niveau des organes cibles dépend des espèces chimiques utilisées et de la voie d'administration..

L'effet de l'action synergique de l'aluminium et du fer dans l'augmentation de la production des radicaux libres exprimée en concentration de MDA ne laisse pas de doute sur la toxicité potentielle de l'aluminium.

L'implication de l'aluminium dans l'activité de certaines enzymes met en évidence l'effet activateur du métal sur l'activité de l'AChE et le puissant effet inhibiteur sur l'activité de la DBH.

Au niveau histologique, les concentrations utilisées n'étaient pas suffisamment élevées pour provoquer des dommages tissulaires.

Mots clés : Aluminium, dialyse, spéciation, rat, AChE, MDA, activité, radicaux libres, DBH, souris.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
I - L'ALUMINIUM DANS L'ENVIRONNEMENT.....	1
II – L'ALUMINIUM ET LE SYNDROME UREMIQUE.....	3
III- L'ALUMINIUM ET LES MALADIES NEURODEGENERATIVES.....	8
IV - PROPRIETES CHIMIQUES ET SPECIATION DE L'ALUMINIUM.....	11
V - PRODUCTION DE RADICAUX LIBRES EN PRESENCE D'ALUMINIUM.....	14
VI - LA DOPAMINE - β - HYDROXYLASE.....	16
VII - L'ACETYLCHOLINESTERASE ET L'ALUMINIUM.....	17
BUT DU TRAVAIL	19
MATERIEL ET METHODES	20
I-PRESENTATION DES SUJETS EN HEMODIALYSE.....	20
II-PREPARATION DES ECHANTILLONS SANGUINS HUMAINS POUR DOSAGE A L'ICP.....	21
II-1- Prélèvements sanguins de sujets en hémodialyse.....	21
II-2- Prélèvements sanguins de sujets témoins.....	21
II-3- Centrifugation et stockage des échantillons.....	21
III - MODES DE TRAITEMENT DES ANIMAUX ET PREPARATION DES SOLUTIONS.....	21
III-1- Généralités	21
III-2- Préparation des différentes solutions d'aluminium et leurs ligands.....	22
III-2-1- Les réactifs utilisés.....	22
III-2-2- Préparation et modes d'administration des solutions.....	22
III-2-2-1- Le gavage.....	22
III-2-2-2-La perfusion.....	23
* Chirurgie.....	23
* Protocole expérimental.....	24
IV- DISSECTION ET PRELEVEMENT DES FRAGMENTS D'ORGANES.....	25
IV-1- Gavage.....	25
IV-2- Perfusion.....	26

IV-3- Stockage des tissus	26
V- PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR ANALYSES CHIMIQUES	
A L'ICP.....	26
V-1- Généralités sur le micro-ondes.....	26
V-2- Minéralisation.....	27
V-2-1- Plasma humains	27
V-2-2- Les fragments des tissus de rats.....	28
VI- DOSAGES DE L'ALUMINIUM PAR ICP	30
VI-1- Généralités sur l'ICP.....	30
VI-2- Introduction de l'échantillon.....	32
VI-3- Dosage des échantillons à l'ICP.....	33
VI-3-1- Calibration de l'appareil.....	33
VI-3-2- Dosage des échantillons.....	33
VII- HISTOLOGIE.....	34
VIII - EVALUATION DE LA PRODUCTION DE LA MALONDIALDEHYDE (MDA) : ANALYSES DES RADICAUX LIBRES DANS LES MEMBRANES BIOLOGIQUES.....	34
VIII-1- Préparation de l'homogénat de cerveau de souris.....	34
VIII-2- Détermination de la concentration en protéines selon la méthode de Lowry : Test du Biuret.....	35
VIII-3- Extraction des lipides du cerveau de souris.....	36
VIII - 4 - Préparation des liposomes de phospholipides purs.....	36
VIII-5- Mesure de la peroxydation lipidique.....	36
IX-EVALUATION DE L'ACTIVITE DE L'ACETYLCHOLINESTERASE (AChE).....	38
IX-1- Traitement des animaux.....	38
IX-2- Préparation d'homogénats de cerveau de souris.....	38
IX-3- Mesure de l'activité de l'AChE.....	38
X-EVALUATION DE L'ACTIVITE DE LA DOPAMINE- β -HYDROXYLASE	40
X-1- Détermination de l'activité de la Dopamine- β -Hydroxylase (DBH).....	40
X-2- Préparation de la solution d'aluminium.....	42
RESULTATS ET DISCUSSION.....	43
PARTIE I : DETERMINATION DE L'ALUMINIUM DANS LE PLASMA DES SUJETS UREMIQUES.....	43
I-1- Résultats.....	43
I-2-Discussion	45

PARTIE II : EVALUATION DE LA DISTRIBUTION DE L'ALUMINIUM CHEZ LES RATS TRAITES PAR DIFFERENTES ESPECES D'ALUMINIUM PAR GAVAGE ET PERFUSION.....	52
II-1- Résultats.....	52
II-1-1- Gavage.....	52
II-1-2-Perfusion intraveineuse.....	58
II-1-2-1-Distribution de l'aluminium dans les différents tissus.....	58
II-1-2-2-Evolution du débit urinaire.....	63
II-2- Discussion sur le gavage.....	64
II-3-Discussion sur la perfusion.....	68
PARTIE III : EVALUATION DE LA CONCENTRATION DE MDA CHEZ LES SOURIS TRAITES PAR L'ALUMINIUM : EFFET SYNERGIQUE DU FER ET DE L'ALUMINIUM SUR LA PRODUCTION DES RADICAUX LIBRES	71
III-1-Résultats	71
III-1-1-Les liposomes de phospholipides purs.....	71
III-1-2-Homogénat de cerveau de souris.....	73
III-2-Discussion.....	74
PARTIE IV : EFFET DE L'ALUMINIUM SUR L'ACTIVITE DE L' AChE.....	77
IV - 1- Résultats.....	77
IV-1-1- Expériences <i>in vivo</i>	77
IV-1-2- Expériences <i>in vitro</i>	81
IV-2- Discussion.....	85
PARTIE V : EFFET DE L'ALUMINIUM SUR L'ACTIVITE DE LA DBH.....	88
V-1- Résultats.....	88
V-2- Discussion.....	90
PARTIE VI : HISTOLOGIE.....	92
CONCLUSION GENERALE.....	93
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	95

INTRODUCTION GENERALE

I - L'ALUMINIUM DANS L'ENVIRONNEMENT

Constituant 8% de la croûte terrestre, l'aluminium est enfermé dans les minéraux, ce qui masque son statut de métal le plus abondant : c'est le troisième élément qui abonde après l'oxygène et le silicium. Il se trouve uniquement sous forme combinée comme oxyde dans la bauxite et aluminosilicates complexes comme les micas et les feldspaths. En contraste avec son abondance dans la croûte terrestre, sa concentration dans l'océan est au dessous de 1µg Aluminium par litre ; ce faible taux pourrait être dû à l'accumulation de l'aluminium et de la silice par les Diatomés [Hydes, 1977 et Stoffyn, 1979].

Dans les eaux de surface ou les eaux de source, et avant tout traitement de ces eaux, l'aluminium est présent sous forme de micropoussières d'argiles insolubles en suspension. Dans certaines régions, l'importance de ces particules donne à l'eau une certaine turbidité rendant son aspect peu agréable à la consommation. La clarification de ces eaux, obtenue par adjonction de sels d'aluminium solubles tel l'alun, lui donne un aspect plus acceptable. Connues et utilisées depuis la plus haute Antiquité, 3000 ans avant Jésus- Christ, en Chine, en Haute Egypte et en Grèce, les propriétés clarifiantes de l'alun d'aluminium sont toujours très largement utilisées actuellement par les services des eaux de la plupart des pays. En contrepartie, cette eau devenue limpide contient alors de l'aluminium soluble.

La plupart des eaux naturelles contiennent des quantités insignifiantes d'aluminium à l'exception de certaines régions volcaniques et de certaines sources. Tout Al^{3+} libéré se dépose généralement dans le sédiment sous forme d'hydroxyde. Avec l'arrivée des pluies acides, les ions métalliques comme l'aluminium, le mercure et le plomb s'échappent du minéral et apparaissent dans les eaux douces. La

concentration en Al^{3+} augmente rapidement dans les eaux claires des lacs à $pH < 6$ où des quantités micromolaires peuvent se rencontrer [Jorgensen & al., 1984] ; ce qui cause plus de dégâts chez les poissons qu'une augmentation de l'acidité, car ils ne tolèrent que des niveaux de l'ordre du nanomole d' Al^{3+} .

Dans les lacs acides ayant une teneur élevée d'aluminium, il a été démontré que ce dernier exerce une toxicité sur les poissons en interférant avec la fonction des branchies dans le transport de l'eau et de l'oxygène [Driscoll & al., 1980]. Il a été suggéré également que de fortes concentrations d'aluminium dans l'eau sont toxiques pour les oiseaux, causent des défauts dans la formation du squelette et altèrent la reproduction de certains oiseaux marins [Nyholm, 1981].

Les plantes comme le thé, qui accumulent $Al(III)$ même en sols acides où la solubilité des composés d'aluminium est nettement augmentée, le détoxifient en le stockant sous une forme chélatée dans les vacuoles des cellules des vieilles feuilles, séparé des parties métaboliquement actives de la plante.

Certaines plantes préviennent la toxicité de l'aluminium par la formation de mucilage par les racines qui chélate l'aluminium prévenant son absorption par les racines [Horst, & al., 1982]. Chez les plantes, la toxicité de l'aluminium apparaît agir au niveau de la croissance et son accumulation est fonction de l'acidité du sol qui influence sa biodisponibilité. Dans les plants de thé, il a été trouvé 3% d' $Al(III)$ dans les vieilles feuilles et seulement 0.01% dans les jeunes, donc une différence de 300 fois [Matsumoto & al., 1976].

Une infusion typique de thé contient environ 50 fois plus d' $Al(III)$ qu'une infusion de café. L'addition de lait au thé pourrait immobiliser $Al(III)$ en phosphate insoluble, tandis que l'addition de citron va fortement complexer $Al(III)$ en un dangereux complexe citraté [Martin, 1986].

La tétanie de l'herbe est une affection spasmodique aigue des muscles des ruminants (généralement les femelles stressées par la lactation) qui broûtent dans les pâturages luxuriants d'un printemps précoce. Il en résulte une mort convulsive à

moins qu'elle ne soit traitée. Ceci s'accompagne d'un faible taux de magnésium dans l'herbe qui pousse et aussi dans le sérum, mais cette déficience ne suffit pas pour produire cette condition. En 1971, il a été suggéré que cette tétanie pouvait être due à un niveau élevé d'Al(III) et à un faible niveau de magnésium dans l'herbe de fourrages; une cure d'engrais phosphatés avec un supplément de magnésium a été recommandée [Dennis, 1971].

L'aluminium est également présent dans l'air sous forme d'aluminosilicates associés à de la poussière ; ceci est dû à l'altération des roches d'aluminosilicates. Les concentrations ont été estimées à 50-500 ng/m³ dans les zones rurales et à 100-5000 ng/m³ dans les environnements urbains.

De l'aluminium est libéré dans l'environnement tant à la faveur de processus naturels que d'activités humaines. Il est présent sous une forme très concentrée dans les poussières que produisent les exploitations minières et agricoles ainsi que dans les particules produites par la combustion du charbon. Les silicates d'aluminium (argiles), qui sont les constituants majeurs des sols, contribuent pour une large part à la teneur des poussières en silicates. L'apport d'aluminium à l'environnement trouve beaucoup plus son origine dans les processus naturels que dans l'activité humaine.

L'alimentation industrielle par le biais de ses additifs (colorants, anti-coagulants, raffermissants ou encore levants) rend l'aluminium omniprésent à des doses supra-physiologiques dans la plupart des aliments et augmente ainsi le taux d'aluminium dans le sang de façon spectaculaire. Il existe une contamination des aliments par contact, c'est à dire que l'aluminium peut également s'introduire dans la nourriture à partir des casseroles, des ustensiles de cuisine et des emballages .

II – L'ALUMINIUM ET LE SYNDROME UREMIQUE

Grâce à l'efficacité des barrières cutanée, respiratoire et gastro-intestinale, la rétention de l'aluminium par le corps humain est minimale. Néanmoins, l'absorption respiratoire et gastro-intestinale de petites mais potentiellement

dangereuses quantités d'aluminium peut se produire en présence de charges excessives (Figure 1).

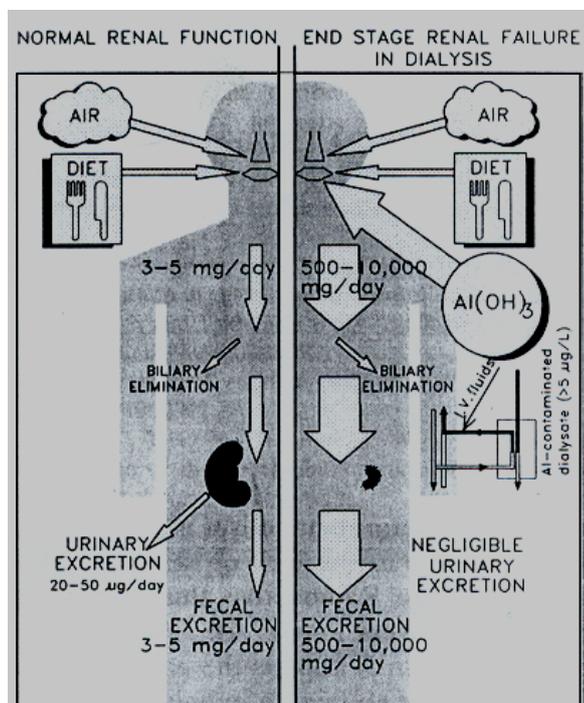


Figure 1. Métabolisme de l'aluminium en présence d'une fonction rénale normale (gauche) et d'une insuffisance rénale au stade ultime (droite).

Une barrière gastro-intestinale efficace pourvoit le principal mécanisme protecteur contre une accumulation d'aluminium. Jusqu'à présent, on croyait qu'aucune trace d'aluminium n'était absorbée à partir de l'appareil digestif et que l'administration orale de produits pharmaceutiques contenant des quantités massives d'aluminium était inoffensive. Cependant, plusieurs études ont démontré qu'une petite mais non négligeable fraction d'hydroxyde d'aluminium prise oralement était absorbée [Gorsky & al., 1979 ; Greger & al., 1983]. Cette fraction devient importante si la quantité totale d'aluminium prise oralement est grande, si la fraction absorbée est augmentée et/ou si l'excrétion de l'aluminium est diminuée.

La quantité totale d'hydroxyde d'aluminium administré oralement peut être grande (au dessus de 10 g /jour) chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique sévère (dialysés ou non dialysés), qui souvent prennent de l'hydroxyde d'aluminium comme ligand des phosphates en vue de réduire les taux de phosphates plasmatiques.

Les facteurs qui modulent l'absorption intestinale d'aluminium n'ont pas été complètement tracés. Puisque le pH joue un rôle central dans la solubilité des composés contenant l'aluminium, il est probable que l'absorption se produit dans le milieu acide de l'estomac ou dans le duodénum proximal.

Il a été suggéré que l'hormone parathyroïdienne (PTH) stimule l'absorption d'aluminium à partir du tractus gastro-intestinal. Cependant, il n'est pas clair dans des études réalisées sur les rats si c'est l'augmentation de l'absorption gastro-intestinale ou la diminution de l'excrétion rénale qui était responsable de l'augmentation de la rétention de l'aluminium au niveau des organes cibles. En effet, une stimulation de l'absorption de l'aluminium par la PTH est improbable, puisqu'il a été trouvé que la parathyroïdectomie n'avait aucun effet sur l'absorption gastro-intestinale aussi bien chez les animaux urémiques que les témoins [Alfrey, 1985].

Il a été montré que la vitamine D accroît l'absorption de plusieurs éléments dont le calcium, le plomb, le magnésium, le zinc, le strontium, le béryllium, le baryum, le cadmium, le césium et le cobalt. Cependant, il n'est pas certain qu'elle augmente l'absorption de l'aluminium [Alfrey, 1986]. En fait, les effets du calcitriol (1,25-dihydroxyvitamine D) dépendent de la dose, des niveaux de calcium et de PTH et du mode d'administration de l'aluminium.

Le type de composé d'aluminium peut aussi influencer l'absorption. Par exemple, une prise orale d'aluminium phosphate n'entraîne pas la même augmentation d'aluminium urinaire qu'une dose comparable d'hydroxyde ou de carbonate d'aluminium.

Il a été établi que, quand l'aluminium et le citrate sont combinés, le citrate accroît considérablement l'absorption gastro-intestinale de l'aluminium [Partridge & al., 1989 ; Yokel, 1994]. Une étude des constantes de stabilité peut expliquer l'influence stimulatrice du citrate. De pH 2 à 5, le complexe neutre aluminium citrate, qui est soluble, représente une importante fraction mole par dessus une large gamme de concentrations totales de citrate dans le sang. Ainsi, dans un environnement acide, la solubilisation du citrate peut entraver la précipitation de l'aluminium en hydroxyde ou phosphate et peut être responsable de l'augmentation de l'absorption de l'aluminium.

Des études réalisées sur les rats ont montré que le citrate de sodium ainsi que le citrate de calcium pouvaient accroître cent fois l'absorption gastro-intestinale d'aluminium. Chez les sujets urémiques, il a été observé un risque d'encéphalopathie induit par l'aluminium quand l'hydroxyde d'aluminium est administré en association avec du citrate de sodium [Bakir & al., 1986] ou du citrate de calcium [Flendrig & al., 1976]. En fait, plusieurs patients urémiques non dialysés montrant une encéphalopathie provoquée par l'aluminium avaient reçus de l'aluminium oral en association avec des composés citratés [Bakir & al., 1986]. Par conséquent, l'administration de citrate aux patients ayant une fonction rénale déficiente devrait être abandonnée.

L'aluminium contaminant le dialysat [Flendrig & al., 1976] et les solutions pour la dialyse péritonéale, l'hémofiltration ou l'administration intraveineuse [D'Haese, 1988], circonviert les barrières naturelles et peut présenter un danger encore plus grand que celui causé par les prises orales d'aluminium. L'aluminium étant fortement fixé aux protéines plasmatiques [Cochran & al., 1985], peut être transféré du dialysat contaminé ou des solutions d'hémofiltration au plasma contre un gradient de concentration.

Chez les sujets ne présentant pas une exposition excessive à l'aluminium et ayant une fonction rénale normale, la charge totale du corps en aluminium a été estimée aux environs de 30 mg [Alfrey, 1980a ; D'Haese, 1988].

Chez ces sujets, les taux les plus élevés d'aluminium sont trouvés dans les poumons (5-35 μg /g de tissu frais), suivi par les os (1-12 μg /g) et les muscles squelettiques (1-4 μg /g). Le taux d'aluminium sanguin est inférieur à 2 μg /l. Par conséquent, les muscles et les os comptent 40% et les poumons 12% de l'aluminium total du corps [D'Haese, 1988].

Chez les patients en dialyse chronique une distribution différente d'aluminium est observée (Figure 2).

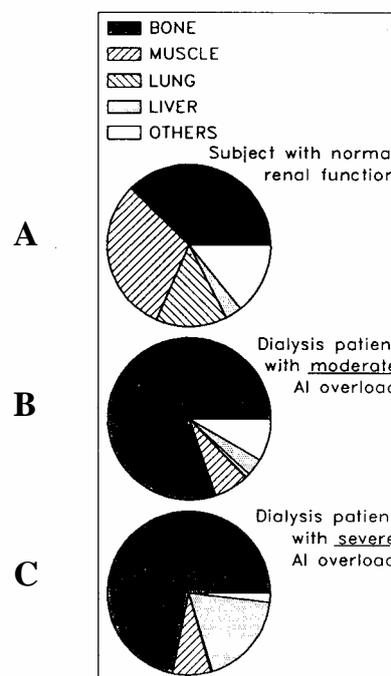


Figure 2. Distribution de l'aluminium dans le corps humain de :

A. personne à fonction rénale normale

B. patient dialysé avec surcharge modérée d'aluminium

C. patient dialysé avec surcharge sévère d'aluminium.

(Bone \wedge Os ; Lung \wedge Poumon ; Liver \wedge Foie ; Others \wedge Autres)

Bien que les taux d'aluminium du cerveau et des muscles augmentent avec l'augmentation de la durée de la dialyse [Alfrey & al., 1976], les os dépassent largement les muscles squelettiques en tant qu'organe de stockage chez les patients en stade final d'insuffisance rénale lesquels présentent un taux d'aluminium hépatique prépondérant sur celui des poumons. Il a été suggéré que la séquestration de l'aluminium dans les os protège le cerveau de sa toxicité [Alfrey & al., 1980b].

L'augmentation des taux d'aluminium chez les employés des industries de fabrication ou de transformation d'aluminium est due à l'inhalation des poussières contenant l'aluminium. Il a été établi que, en insuffisance rénale, l'aluminium pris oralement ainsi que celui entrant par voie sanguine peut s'accumuler dans le squelette causant des maladies des os induites par l'aluminium ou dans le cerveau aboutissant à la démence des dialysés.

Les reins paraissent être la voie majeure d'excrétion de l'aluminium. En absence de charges excessives, les reins paraissent être capables d'éliminer tout l'aluminium absorbé. Des études utilisant des techniques fiables de mesures d'aluminium, ont montré des taux d'excrétion urinaire de l'ordre de 15-55 μg /jour [Gorsky & al., 1979 et Greger & al., 1983]. Cependant, la clairance urinaire de l'aluminium est seulement d'environ 5% du taux de la filtration urinaire [Alfrey, 1986]. Par conséquent, une accumulation d'aluminium peut se produire chez les sujets ayant une fonction rénale normale recevant des charges excessives d'aluminium par voie orale ou intraveineuse. Les patients ayant une fonction rénale déficiente, en présence de charges excessives d'aluminium, sont incapables d'éliminer tout l'aluminium absorbé.

III- L'ALUMINIUM ET LES MALADIES NEURODEGENERATIVES

Alors que l'aluminium est l'un des éléments les plus abondants de la croûte terrestre et qu'il est distribué de manière ubiquitaire dans notre environnement, il n'intervient dans aucune fonction biologique, biochimique ou métabolique connue. Pendant longtemps l'aluminium était considéré comme anodin pour l'Homme

[Sorenson & al., 1974]. Or, il y a quelques années, il a été démontré que l'aluminium désorganisait une large variété de processus neurologiques [Ganrot, 1986] et qu'il représentait un danger potentiel pour le système nerveux [Crapper-McLachlan & al., 1980 ; Feldman, 1982].

Aujourd'hui, l'aluminium est connu pour être un puissant neurotoxique aussi bien chez les animaux d'expérience que dans les affections humaines [Crapper-McLachlan & al., 1980 ; Wills & al., 1983 ; Boegman & al., 1984 ; Ghetti & al., 1985 ; Birchall & al., 1988 ; Lipman & al., 1988 et Flaten & al., 1996].

Il y a plus d'un siècle, Siem et Dolken ont effectué les premières études montrant la neurotoxicité de l'aluminium chez les animaux d'expérience [Alfrey 1993].

Il a été rapporté qu'une inoculation intracérébrale d'aluminium phosphate chez les lapins avait pour résultat une dégénérescence neurofibrillaire de « ressemblance frappante » [Klatzo & al., 1965 ; Terry & al., 1965], avec les enchevêtrements neurofibrillaires de la maladie d'Alzheimer (MA), ouvrant de cette façon le débat contentieux de l'implication de l'aluminium dans cette maladie. En 1973, fût publié le premier rapport concernant des concentrations élevées d'aluminium dans les cerveaux de patients atteints de la MA. D'autres travaux ont mis l'accent sur l'implication de l'aluminium dans l'étiologie de la MA [Martyn, & al., 1989 ; Graves & al., 1990 ; Neri, 1991 et Forbes & al., 1995a].

La présence d'enchevêtrements neurofibrillaires, de plaques séniles dans le cerveau ainsi que des dépôts de plaques amyloïdes autour des vaisseaux sanguins cérébraux sont caractéristiques des personnes atteintes de la MA [Crapper McLachlan & al., 1991]. On signale un grand nombre d'enchevêtrements neurofibrillaires dans les régions du cerveau qui présentent des niveaux élevés d'aluminium. On a montré que l'aluminium coexistait avec le silicium sous forme d'aluminosilicates dans le noyau amyloïde des plaques séniles et dans les enchevêtrements neurofibrillaires du

cerveau de personnes atteintes de la MA [Crapper McLachlan & al., 1991]. La présence d'aluminium dans les noyaux des plaques a conduit à la théorie que l'aluminium pourrait être impliqué dans le déclenchement d'événements menant à la formation de plaques et que le complexe d'aluminosilicate fournirait un point d'appui pour la précipitation de protéines observée dans les plaques [Edwardson & al., 1986].

Peu de temps après l'introduction de la dialyse en tant que thérapie de routine chez les insuffisants rénaux chroniques, Alfrey et ses collaborateurs furent les premiers à découvrir que l'aluminium était la source de l'encéphalopathie des dialysés [Alfrey & al., 1972 ; Alfrey & al., 1976] et peut être la première maladie iatrogénique reconnue dans la population des dialysés [Alfrey, 1993]. Ce syndrome lié à l'aluminium comprend des symptômes chroniques dont des troubles de la parole, des anomalies neuropsychiatriques et une myoclonie multi-focale [Dewberry & al., 1980]. Des symptômes plus subtils comprennent des perturbations de la tétrahydrobioptérine et des anomalies dans un certain nombre de fonctions psychomotrices (mémoire de reconnaissance spatio-visuelle), tous se produisent à des niveaux d'aluminium sérique relativement élevés ($59\mu\text{g/L}$) et en l'absence de démence chronique [Altmann & al., 1989]. On a montré que les personnes atteintes d'une démence dialysaire présentaient des niveaux d'aluminium sérique très élevés ainsi que des concentrations accrues dans de nombreux tissus, dont le cortex cérébral [Alfrey & al., 1976 ; Alfrey & al., 1980b].

La toxicité de l'aluminium est aussi associée au développement des affections de l'os comprenant les fractures, l'ostéopénie et l'ostéomalacie [Klein & al., 1982 ; Ott & al., 1983 ; Banks & al., 1989 et Koo & al., 1992]. Chez les patients ayant une insuffisance rénale chronique et sous dialyse à long terme, il est établi que l'aluminium est l'agent responsable de l'ostéodystrophie [Wills & al., 1983].

Il a été suggéré que l'aluminium est impliqué dans l'étiologie de deux maladies neurodégénératives sévères : la sclérose amyotrophique latérale (SLA) [Perl & al., 1982 ; Silveis & al., 1989] et la maladie de Parkinson (MP) [Perl & al., 1982]. La

SLA et la MP, que l'on observe avec une très grande fréquence chez les populations de Chamorros de Guam, sont toutes les deux caractérisées par la perte de la fonction motoneurone et par la présence d'enchevêtrements neurofibrillaires dans le cerveau [Garruto & al., 1990]. Le sol et l'eau potable de Guam sont très pauvres en calcium et en magnésium, mais très riches en aluminium, en fer et en silicium [Gajdusek & al., 1982]. Après autopsie, on a signalé un dépôt intraneuronal de calcium et d'aluminium dans le cerveau de personnes atteintes de la SLA [Perl & al., 1982]. Garruto et Yase (1986) ont avancé que des déficiences nutritionnelles chroniques en calcium et en magnésium pourraient entraîner une augmentation de l'absorption d'aluminium (et d'autres métaux), causant ainsi un dépôt d'aluminium dans les neurones. Ces dépôts pourraient interférer avec la structure des neurones et pourraient entraîner à long terme des enchevêtrements neurofibrillaires [Garruto, 1989].

IV - PROPRIETES CHIMIQUES ET SPECIATION DE L'ALUMINIUM

L'aluminium appartient au groupe IIIb de la classification périodique. Il possède trois électrons sur sa couche périphérique ; leur perte donne naissance au cation Al^{3+} . Le degré d'oxydation (+III) est le seul que possède l'aluminium en solution.

Les autres éléments métalliques du groupe de l'aluminium sont le Gallium (Ga), l'Indium (In) et le Thallium (Tl) qui manifestent le même degré d'oxydation. La petite dimension de leurs ions, leur charge élevée, les valeurs importantes des trois premiers potentiels d'ionisation font penser qu'ils sont nettement covalents. En effet de nombreux composés simples comme AlCl_3 , GaCl_3 sont covalents à l'état anhydre. Cependant, en solution, l'hydratation dégage une importante quantité d'énergie qui compense la valeur élevée des potentiels d'ionisation.

Al^{3+} est un petit ion : le rayon ionique effectif de Al^{3+} pour une coordination 6 est seulement $0,54\text{\AA}$. En guise de comparaison, $\text{Ga}^{3+} \wedge 0,62$; $\text{Fe}^{3+} \wedge 0,65$; $\text{Mg}^{2+} \wedge 0,72$; $\text{Zn}^{2+} \wedge 0,74$; $\text{Fe}^{2+} \wedge 0,78$ et $\text{Ca}^{2+} \wedge 1,00\text{\AA}$ [Martin, 1986]

En se basant sur le rayon, Al^{3+} a presque la même dimension que Fe^{3+} et Mg^{2+} et, c'est à ces deux ions qu'on compare Al^{3+} . Ca^{2+} est plus volumineux, et dans sa coordination préférée 8, montre un rayon de 1.12 \AA , présentant un volume 9 fois celui de Al^{3+} . Dans le cristal mixte $\text{Ca}_3 \text{Al}_2 (\text{OH})_{12}$, chaque Al^{3+} hexacoordiné est entouré par 6 ions hydroxyde et chaque Ca^{2+} cubique par 8 ions hydroxyde. Chaque métal adopte donc son propre numéro de coordination favori.

Les distances Al – O sont de $1,92 \text{ \AA}$ et la moyenne des distances Ca – O est de $2,50 \text{ \AA}$ [Weiss & al., 1964]. La différence de $0,58 \text{ \AA}$ concorde exactement avec la différence des rayons ioniques cités plus haut entre une coordination 6 pour Al^{3+} et une coordination 8 pour Ca^{2+} . Ainsi, les sites de Al^{3+} et Ca^{2+} sont distincts.

Pour ces raisons, il est improbable que Al^{3+} se lie fortement aux sites de Ca^{2+} de la calmoduline [Martin, 1986 ; Martin, 1988], qui est une enzyme calcium-dépendante, isolée à l'origine à partir du tissu cérébral et qui joue un rôle cardinal dans la régulation d'une large variété de réponses cellulaires. Mais, certains chercheurs ont trouvé que Al^{3+} s'y liait faiblement [You & al., 1991 ; Richardt & al., 1985].

A cause de son petit rayon ionique ($0,54 \text{ \AA}$) et son potentiel d'oxydation élevé ($+ 1,706 \text{ V}$), l'aluminium attire fortement les anions. Par conséquent, l'aluminium est capable de former des sels relativement stables qui ne s'ionisent pas facilement.

La nature chimique de l'aluminium dans l'eau est essentiellement la chimie de $\text{Al}(\text{OH})_3$ qui a un caractère amphotère, a tendance à former des ions complexes et à se polymériser. Ainsi, la forme et la concentration de l'aluminium dans l'eau dépend du pH et de la nature des substances accompagnantes. La solubilité de l'aluminium est faible à pH compris entre 6,5 – 7,5. Il se produit des augmentations substantielles de la solubilité quand le pH augmente ou diminue [Gacek & al., 1979 ; D'Haese, 1988].

Dans les systèmes biologiques, Al^{3+} serait plus compétitif avec Mg^{2+} qu'avec Ca^{2+} [Martin, 1988 ; Macdonald & al., 1988]. Aussi bien en minéralogie qu'en biologie des rayons ioniques comparables l'emportent fréquemment sur la charge. Quand la concentration en Mg^{2+} est faible, Al^{3+} s'accumule davantage dans le système nerveux central [Mitani, 1992]. Al^{3+} et Mg^{2+} préfèrent les ligands donneurs d'oxygène, spécialement les groupes phosphates [Martin, 1990]. Al^{3+} est 10^7 fois plus efficace que Mg^{2+} pour provoquer la polymérisation des tubulines en microtubules [Macdonald & al., 1987]. Partout où il y a un processus impliquant Mg^{2+} , il y a une opportunité d'interférence d' Al^{3+} .

Les sites auxquels se lie Al^{3+} sont les atomes d'oxygène, surtout s'ils sont chargés négativement. Les carboxylates, les hydroxy déprotonés (comme dans la serine et la thréonine) et les groupes phosphates sont les liens les plus forts de Al^{3+} .

Malgré les informations abondantes concernant l'interaction entre l'aluminium et les systèmes biologiques, les bases moléculaires de la toxicité de l'aluminium restent plutôt méconnues. La raison dérive du fait que, dans la grande majorité des protocoles expérimentaux aussi bien *in vivo* que *in vitro*, l'aluminium est administré ou sous des conditions de pH mal déterminées ou comme un mélange mal défini de diverses espèces chimiques qui rendent difficile une interprétation correcte des données toxicologiques [Zatta & al., 1991]. Le terme « spéciation du métal » est très connu parmi les chimistes mais il est encore incompris ou inconnu parmi les biologistes.

Dans les solutions aqueuses, la solubilité de l'aluminium est fortement dépendante du pH. Sous des conditions acides ou alcalines ou en présence de ligands appropriés, des espèces solubles sont formées ; mais dans la zone des valeurs du pH physiologique (entre 6 et 8) Al(III) est généralement insoluble. A faibles valeurs de pH ($\text{pH} < 5$), les principales espèces sont $\text{Al}[(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$. Cependant, comme le pH augmente, Al(OH)^{2+} et Al(OH)^+_2 se forment progressivement et à pH neutre

$\text{Al}(\text{OH})_3$ qui est amorphe, précipite ; à pH basique ce précipité se dissout pour former $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ [Meiri & al., 1993].

En l'absence d'un agent de coordination, la chimie aqueuse de l'aluminium est plutôt simple. A pH physiologique les espèces métalliques présentes en solution sont $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ qui sont solubles et potentiellement toxiques et $\text{Al}(\text{OH})_3$ très insolubles [Martin, 1991].

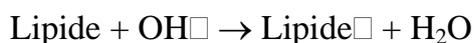
V - PRODUCTION DE RADICAUX LIBRES EN PRESENCE D'ALUMINIUM

Les données provenant de différents laboratoires [Deleers & al., 1986 ; Xie & al., 1996 ; Zhang & al., 1996 et Verstraeten & al., 1997] montrent une action de l'aluminium favorisant la " désorganisation" de la membrane plasmique à cause de sa liaison aux groupes phosphates des phospholipides. Il s'ensuit ainsi la création de discontinuités dans la superficie externe de la membrane favorisant ainsi le passage de certaines espèces chimiques. Parmi ces dernières les ions Fe^{2+} qui peuvent produire la peroxydation des lipides par la formation de radicaux libres [Pryor,1973]. Globalement le processus peut être ainsi résumé :

1 - Au moyen de la réaction de Fenton et celle de Haber-Weiss se produisent des espèces radicalaires $\text{OH}\cdot$ extrêmement réactives :

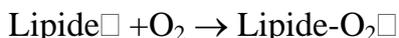


2 - Les radicaux $\text{OH}\cdot$ ont un $t_{1/2}$ de 10^{-9} s et réagissent avec toutes les espèces biologiques qu'ils rencontrent. Ils attaquent les acides gras des membranes et leurs arrachent un atome d'hydrogène :

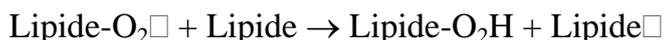


3 - Si le lipide est un acide gras insaturé (le lipide préféré de l'oxydation est celui de grande longueur), il tendra à se stabiliser en produisant un diène conjugué.

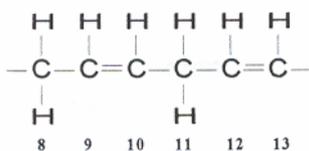
4 - Le diène conjugué réagit rapidement avec O₂ pour donner un radical lipoperoxydé.



5 - Les radicaux peroxydés réagissent à leur tour avec d'autres lipides formant un hydroperoxy-lipide (et ainsi se poursuit la réaction...).



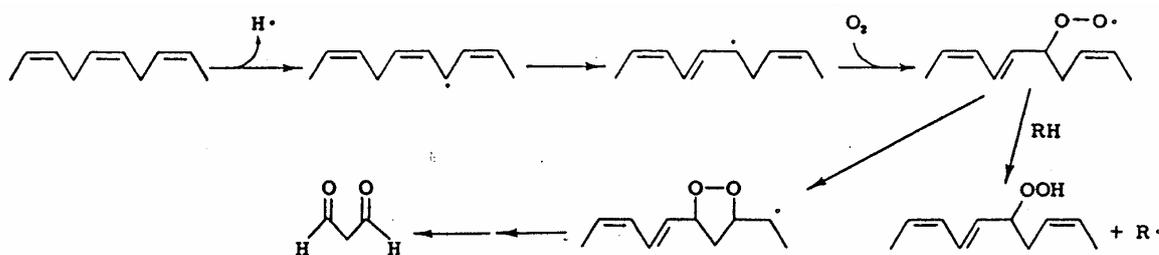
La double liaison des acides gras insaturés est particulièrement sensible à la peroxydation.



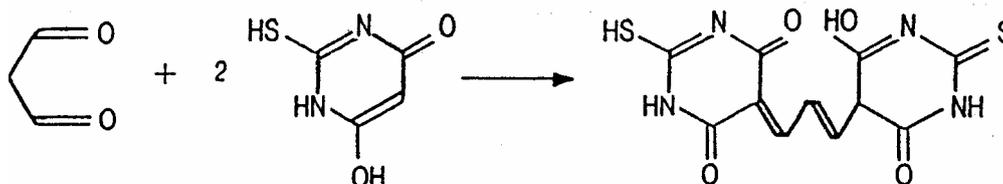
La liaison des hydrogènes (dits \square alléliques \square) aux carbones 8 et 11 (dits \square méthyléniques \square) est plus faible que celle des autres hydrogènes et seront les plus prêts à subir une scission en présence des radicaux OH \square .

On peut mesurer le degré de peroxydation des lipides en utilisant le test de l'acide 2-thiobarbiturique (4,6-dihydroxy 2-thiopyrimidine) :

a - D'un endoperoxy-lipide se forme la malondialdéhyde (en réalité un précurseur de celle-ci) qui peut être quantifiée par voie spectrophotométrique , avec divers autres produits tels que les alcools, les cétones, les aldéhydes et les éthers.



Après réchauffement du mélange à 89-100° pendant une durée suffisante (30 mn) en solution acide se forme la malondialdéhyde qui réagit ainsi :



Le produit de cette réaction présente une absorbance maximale à 532 nm qui est due à la production de malondialdéhyde (coefficient d'extinction molaire $1,56 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

VI - LA DOPAMINE - β - HYDROXYLASE ET L'ALUMINIUM

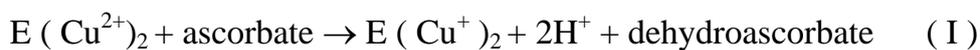
La dopamine- β -hydroxylase (DBH) ou dopamine mono-oxygénase est un tétramère cuivrique composé de 4 sous unités de 88 KD chacune [Okuno & al., 1984]. Elle possède deux sites actifs contenant chacun deux atomes de cuivre à l'état oxydé Cu^{2+} [Scott & al., 1988] dont le changement de valence joue un rôle essentiel dans l'activité de l'enzyme [Klinman & al., 1984]. C'est une glycoprotéine de poids moléculaire 290.000 Da, contenant 4% de carbohydrates (glucose, fucose, mannose, galactose, acide scialique, glucosamine) [Wallace & al., 1973].

La DBH possède une fonction oxydase mixte qui utilise l'oxygène moléculaire pour former un groupe hydroxyl qui se lie au carbone β sur le côté de la chaîne de la dopamine dont il résulte la formation de la noradrénaline [Craine & al., 1973].

L'acide ascorbique agit en tant qu'agent réducteur et donneur d'électrons et il est essentiel dans l'activation de la réaction d'hydroxylation de la dopamine.



L'ascorbate réduit le Cu^{2+} de l'enzyme en Cu^+ le transformant en dehydroascorbate (I) ; l'enzyme réduite se lie à une molécule d'oxygène (II) et enfin le substrat (RH) devient hydroxylé avec formation d'une molécule d'eau et rétablissement de l'enzyme à l'état oxydé (III).



La réaction exige des concentrations équimolaires de dopamine, oxygène et acide ascorbique. Sa vitesse est nettement augmentée en présence d'autres cofacteurs comme le fumarate qui favorise un changement allostérique conformationnel donnant un isoforme d'une activité catalytique très élevée ; la catalase protège l'enzyme de l'inactivation due à la peroxydation de l'hydrogène produit par auto-oxydation de la dopamine et de l'acide ascorbique.

Plusieurs composés peuvent inhiber *in vivo* l'activité de cette enzyme, en particulier les agents chélateurs de cuivre comme l'EDTA et la 8-OH-quinoline [Duch & al., 1968]. La DBH est contenue dans des vésicules où s'accumulent les catécholamines avec la plupart des enzymes attachées à la membrane interne des vésicules.

La concentration plasmatique de la DBH est prédéterminée génétiquement et est constante et spécifique à chaque individu. Les fluctuations de la concentration de la DBH semblent être en relation avec des conditions pathologiques telles que la maladie de Parkinson, le syndrome de Lesch-Nihon et la dystonie tortionnelle [Markianos & al., 1981].

VII - L'ACETYLCHOLINESTERASE ET L'ALUMINIUM

Les cholinestérases appartiennent à une famille de protéines largement distribuées à travers le corps aussi bien dans le tissu nerveux que non nerveux. Elles sont classées principalement selon la spécificité de leur substrat : Acétylcholinestérase (AChE) (EC 3.1.1.7) et pseudocholinestérases (EC 3.1.1.8) [Massoulié & al., 1993].

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative qui se manifeste par la présence dans le cerveau de plaques séniles et d'enchevêtrements neurofibrillaires. Les plaques séniles sont constituées principalement d'une accumulation excessive de fibrilles d'amyloïde- β (β A4) en plus d'autres protéines dont l'AChE. Il a été démontré que l'AChE accélère l'agrégation du β A4 avec formation de fibrilles d'amyloïde, et récemment il a été montré que l'agrégation de l'AChE- β A4₍₁₋₄₀₎ était plus toxique que l'AChE- β A4₍₁₋₄₂₎ et que cet effet toxique dépend de la quantité d'AChE liée au complexe d'amyloïde [Munoz & al., 1999].

L'aluminium a été reconnu comme étant un agent neurotoxique il y a plus d'un siècle. Il est considéré de manière controversée comme étant un facteur à risques potentiels dans la maladie d'Alzheimer [Frataglioni, 1998] et est connu d'avoir un sérieux effet négatif sur la capacité d'apprentissage [Bilkei-Gorzo, 1993]. L'aluminium a été démontré comme étant capable non seulement de traverser [Peng & al., 1992] mais aussi d'augmenter la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique [Banks & al., 1985 ; Favarato & al., 1992]. Les effets de l'aluminium sur le système nerveux central ont été largement étudiés ; il est capable d'exercer un effet nuisible sur l'activité de la choline acétyltransferase et l'AChE, enzymes impliquées dans le métabolisme de l'acétylcholine. Par exemple, la présence de l'aluminium provoque une diminution du nombre de récepteurs muscariniques de l'acétylcholine, surtout dans l'hippocampe [Julka & al., 1995].

Plusieurs travaux ont étudié les effets de l'aluminium sur l'activité de l'AChE aussi bien *in vivo* que *in vitro*. Les résultats de ces études semblent être plutôt contradictoires ; pendant que certains auteurs ont décrit une diminution de l'activité de l'AChE en présence d'aluminium [Gulya & al., 1990 ; Zaman & al., 1993 et Julka & al., 1995], d'autres décrivent une forte activation [Singer & al., 1990 ; Peng & al., 1992 ; Bilkei-Gorzo, 1993 et Zatta & al., 1994]. Comme discuté en détail ailleurs [Harris & al., 1996], les raisons de ces désaccords doivent être considérées en rapport avec les propriétés des composés utilisés (la spéciation du métal) et avec les protocoles expérimentaux qui sont divers et mal déterminés.

BUT DU TRAVAIL

L'aluminium abonde dans les sols. C'est donc un élément auquel nous sommes tous exposés même si sa très faible biodisponibilité en limite à priori les effets dans les conditions normales. Bien que sa neurotoxicité soit connue depuis plus d'un siècle, ce n'est que relativement récemment que l'aluminium a été caractérisé comme le facteur étiologique de plusieurs pathologies apparues au cours de la dialyse rénale (encéphalopathie, ostéomalacie, anémie), avec pour conséquence la suggestion d'un rôle possible pour l'aluminium dans la genèse de la maladie d'Alzheimer.

Le but de ce travail est, dans un premier temps, de mesurer pour la première fois les niveaux d'aluminium de sujets en insuffisance rénale chronique hémodialysés d'un centre d'hémodialyse d'un hôpital publique (Fès). Ainsi, des prélèvements ont été effectués aussi bien avant qu'après dialyse. Par ailleurs, d'autres prélèvements ont été réalisés sur des volontaires pour servir de témoins.

Dans un second temps, administrer plusieurs espèces d'aluminium ainsi que leurs ligands à des rats soit par gavage soit par perfusion, afin d'évaluer la distribution du métal dans les différents organes en vue d'étudier sa spéciation dans l'induction d'effets biologiques.

Le but est également d'étudier l'effet synergique du fer et de l'aluminium dans le phénomène de la peroxydation lipidique ainsi que les interactions entre l'aluminium et l'activité de certaines enzymes.

MATERIEL ET METHODES

I-PRESENTATION DES SUJETS EN HEMODIALYSE

On a étudié 37 patients (24 hommes et 13 femmes) hémodialysés chroniques. Leur âge est compris entre 17 et 85 ans. Après les prélèvements sanguins, parmi les 24 hommes, 11 sont décédés et 2 autres ont quitté la ville. Concernant les femmes, 4 sont décédées, une a quitté la ville et une autre le pays.

Les données concernant les 19 patients restants sont résumées dans le tableau I ci-dessous :

Tableau I : Présentation des sujets hémodialysés.

N°	Sexe	Age (années)	Etiologie de l'insuffisance rénale chronique(IRC)	Début en hémodialyse	Nombre de séances par semaine
1	M	66	Stade terminal de IRC	Janvier 1998	2 fois 4 heures
2	M	47	Rein multikistique	Septembre 1996	3 fois 4 heures
3	M	68	Stade terminal de IRC	Octobre 1996	3 fois 4 heures
4	M	68	Glomérulopathie extra-membraneuse	Avril 1995	3 fois 4 heures
5	M	62	Néphrite interstitielle chronique	Avril 1994	3 fois 4 heures
6	M	60	Néphropathie diabétique	Juillet 1998	3 fois 4 heures
7	M	34	Indéterminée	Décembre 1997	2 fois 4 heures
8	M	39	Indéterminée	Février 1994	2 fois 4 heures
9	M	38	Néphropathie diabétique	Janvier 1997	2 fois 4 heures
10	M	27	Glomérulopathie extra_membraneuse	Janvier 1997	2 fois 4 heures
11	M	39	Pyélonéphrite chronique	Novembre 1997	2 fois 4 heures
12	M	25	Néphrite interstitielle chronique	Février 1997	2 fois 4 heures
13	F	20	Glomérulo-néphrite aigue maligne	Novembre 1997	2 fois 4 heures
14	F	61	Indéterminée	Février 1998	2 fois 4 heures
15	F	56	Indéterminée	Août 1996	2 fois 4 heures
16	F	43	Indéterminée	Mars 1997	3 fois 4 heures
17	F	30	Indéterminée	Mars 1996	2 fois 4 heures
18	F	53	Indéterminée	Avril 1995	2 fois 4 heures
19	F	29	Lupus	Décembre 1996	2 fois 4 heures

II-PREPARATION DES ECHANTILLONS SANGUINS HUMAINS POUR DOSAGE EN SPECTROSCOPIE DE MASSE COUPLEE DE PLASMA INDUCTIF (ICP)

II-1- Prélèvements sanguins de sujets en hémodialyse

Des prélèvements de sang ont été effectués sur les sujets avant et après dialyse. Ceux-ci ont été réalisés avec des seringues Becton-Dickinson dont les aiguilles sont en acier inoxydable. Aucune trace d'aluminium n'a été libérée des seringues et des aiguilles après traitement avec une solution d'acide nitrique à 5%. Un volume de 5ml de sang est prélevé avant et après dialyse et transvasé dans des tubes héparinés en polypropylène préalablement lavés avec de l'acide nitrique (Nitric Acid 65% Suprapur, Merck) et rincés plusieurs fois avec de l'eau bidistillée pour éviter toute contamination du sang par les tubes.

II-2- Prélèvements sanguins de sujets témoins

Un prélèvement sanguin de 5 ml a été effectué sur 15 sujets volontaires, c'est à dire dont la fonction rénale est normale, pour servir de témoin.

Les prélèvements ont été réalisés avec le même type de seringues et transférés dans des tubes similaires à ceux utilisés pour les sujets en hémodialyse.

II-3- Centrifugation et stockage des échantillons

Juste après que le sang soit recueilli, les échantillons sont centrifugés à raison de 4000 tours par minute pendant 5 minutes. Le plasma est transvasé dans des tubes propres qui sont ensuite placés au congélateur jusqu'au moment des dosages.

III - MODES DE TRAITEMENT DES ANIMAUX ET PREPARATION DES SOLUTIONS

III – 1 - Généralités

Des rats mâles Wistar de poids corporel compris entre 200 et 300 grammes ont été sélectionnés en vue d'être traités par différentes solutions d'aluminium et leurs ligands.

L'élevage des rats a été effectué dans l'animalerie de la Faculté des Sciences Dhar-Mehraz de Fès, dans une chambre thermostatée à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ et soumis à une photopériode de 12L/12D. Ils sont nourris avec un régime standard nécessaire à leur constitution et développement (orge et cicalim). Les rats disposent de nourriture et d'eau de boisson *ad libitum*.

III-2-Préparation des différentes solutions d'aluminium et leurs ligands

III-2-1- Les réactifs utilisés

Quatre sortes de complexes d'aluminium sont utilisés :

* Aluminium-acétylacétonate (acac=2,4-pentanedionate ; acétylacétonate)

[Al(acac)₃], de Jensen Chimica, Belgique.

* Lactate d'Aluminium [Al(lac)₃], de Strem Chemicals, USA

* Chlorure d'Aluminium [AlCl₃], de Sigma Allemagne.

* Citrate d'Aluminium [Alcit₂], préparé par le Professeur A.Salifoglou, Département de Chimie, Université de Crète Heraclin, Grèce.

Les quatre types de ligands correspondant aux complexes cités ci-dessus sont :

* Acétylacétone (2,4-Pentanedione) [Hacac], de Sigma.

* Lactate de Sodium [Nalac], de Prolab.

* Chlorure de Sodium [NaCl], de Prolab.

* Citrate de Sodium [Nacit], de J.T. Baker, Holland.

III-2-2- Préparation et modes d'administration des solutions

III-2-2-1- Le gavage

30 mg de chaque complexe d'aluminium et son ligand sont mis dans un volume de 250 ml d'eau bidistillée.

Pour [Hacac], 15µl de la solution sont placés dans 100ml d'eau bidistillée.

Les rats ont été groupés en huit lots de cinq rats chacun et placés dans des cages séparées. Ceux-ci ont été pesés avant le début du traitement.

A chaque rat on administre 1ml de solution par 100g de poids corporel.

La solution est renouvelée deux fois par semaine durant toute la période du traitement.

Le gavage réalisé par une sonde en acier inoxydable, était quotidien et avait lieu à la même heure pendant deux mois.

III-2-2-2-La perfusion

*** Chirurgie**

Avant toute intervention chirurgicale, les rats sont soumis à une anesthésie générale par une injection intra-péritonéale d'inactine (10 mg /100g P.C ; Inactin, Byk-Gulden, Constante, RFA), puis sont placés sur une table chauffante à thermostat afin de maintenir constante leur température corporelle, c'est à dire aux environs de 37°C.

La première étape chirurgicale est réalisée au niveau du cou où on pratique une incision médiane transversale de la peau sur 2 cm environ en vue de réaliser une trachéotomie dans le but d'éviter l'asphyxie de l'animal et d'aspirer les sécrétions bronchiques. Pour ce faire, les muscles sterno-hyoïdiens sont écartés afin de dégager la trachée et d'y insérer un cathéter PE 240 (Intra-medic, Clay –adams) taillé en biseau. Un autre cathéter PE 50 rempli de sérum physiologique (NaCl à 0,9%) est introduit dans la veine jugulaire pour la perfusion de toutes les solutions à tester.

La seconde étape consiste en une chirurgie abdominale et permet la cathérisation de la vessie à l'aide d'un cathéter PE 50 à travers lequel et dans des tubes Eppendorf prépesés, les échantillons urinaires sont recueillis..

*** Protocole expérimental**

Le protocole expérimental adopté est schématisé dans la figure 3 dont la phase expérimentale teste l'effet de l'accumulation de l'aluminium dans les différents organes.

La manipulation débute par la perfusion à l'aide d'une pompe (B.Braun Melsungen AG) d'une solution physiologique de NaCl à 0.9 % avec un débit constant de 50 μ l / min / 100g P.C.

La préparation des différentes solutions expérimentales à perfuser se fait dans une solution tampon Tris :

12,5 g de Tris (Tris [hydroxymethyl] amino methane) Sigma 7-9® de Sigma Italie, sont dilués dans un litre d'eau bidistillée. La solution basique au départ (pH \approx 11), a son pH qui est ramené à 7,4 avec du HCl.

50 μ M de chaque complexe et ligand sont dilués dans 250 ml de tampon Tris au moment de la perfusion. Concernant Hacac, 15 μ l de la solution sont mélangés à 250 ml de tampon Tris.

La perfusion des solutions expérimentales est assurée avec la même pompe et avec le même débit que précédemment.

Les échantillons urinaires sont récupérés durant toute l'expérience par périodes de 20 minutes dans des tubes Eppendorf prépesés pour déterminer l'évolution du débit urinaire en fonction du temps. En général, l'expérience comprend 13 périodes de clairance de 20 minutes chacune :

- 3 périodes d'équilibration
- 4 périodes témoins
- 6 périodes expérimentales.

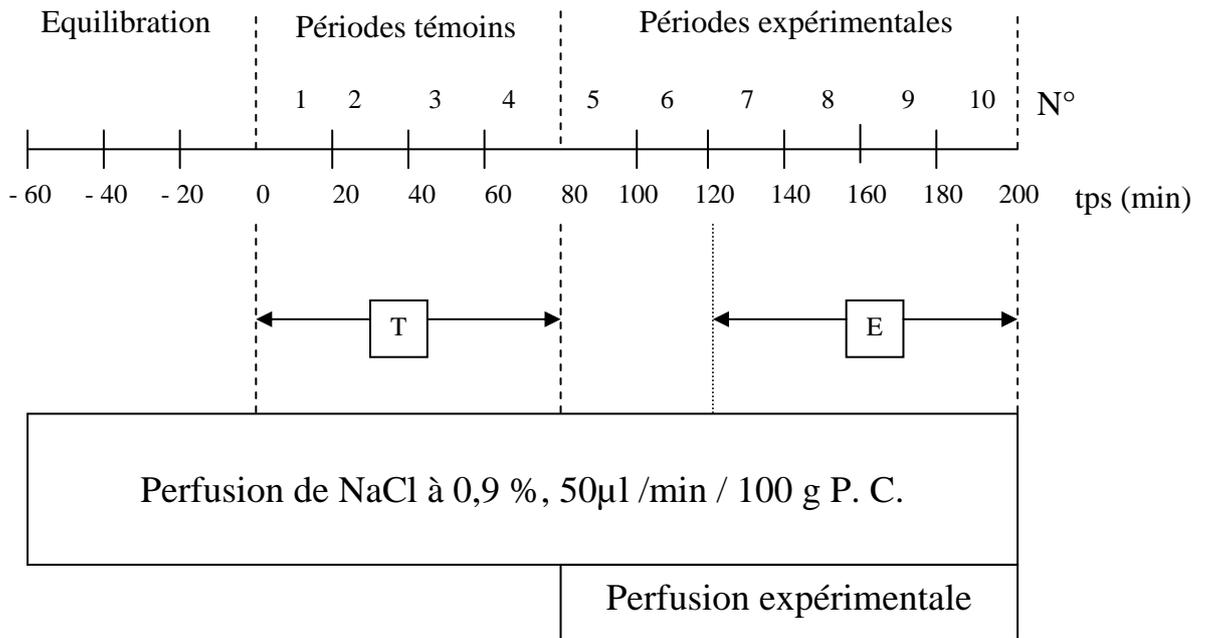


Figure 3 : Protocole expérimental.

T = Moyenne du débit urinaire des 4 périodes témoins

E = Moyenne du débit urinaire des 4 dernières périodes expérimentales.

IV-DISSECTION ET PRELEVEMENT DES FRAGMENTS D'ORGANES

Pour les deux types de traitement (gavage et perfusion), les organes à prélever sont : le cerveau, le cœur, le rein, le foie, le pancréas, la rate, l'intestin, le muscle et l'os (le tibia).

Les fragments prélevés sont de deux sortes :

- Ceux en vue d'analyses chimiques par spectroscopie de masse couplée de plasma inductif (ICP).
- D'autres pour les coupes histologiques.

IV-1- Gavage

A la fin des deux mois de traitement, les rats sont décapités et des morceaux d'organes cités auparavant sont prélevés.

Les échantillons destinés au dosage à l'ICP sont pesés (moins d'un mg), alors que pour l'histologie les fragments sont relativement importants.

IV-2- Perfusion

A la fin de chaque séance de perfusion, les rats sont décapités et les mêmes organes que pour le gavage sont prélevés.

Dans les deux cas (gavage et perfusion), les instruments de dissection sont lavés avec de l'acide nitrique 5% et rincés plusieurs fois avec de l'eau bidistillée pour éviter toute contamination des tissus par le matériel.

IV-3- Stockage des tissus

Les fragments d'organes sont placés dans des tubes en polypropylène préalablement lavés avec de l'acide nitrique 5% et rincés avec de l'eau bidistillée.

Pour les dosages à l'ICP, les tissus sont mis dans des tubes à sec.

Pour les coupes histologiques, les fragments baignent dans une solution de formaline à 10% et un tampon phosphate salin (10 μ M, pH 7,4).

V - PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR ANALYSES

CHIMIQUES A L'ICP

V – 1 - Généralités sur le micro-ondes

La minéralisation des tissus nécessite l'utilisation d'un micro-ondes.

L'appareil utilisé est le " Microwave Sample" Preparation System, Model MDS-2100 de CEM Corporation. USA.

Cet appareil est conçu pour la digestion, la dissolution et l'hydrolyse d'une large gamme de matériaux.

Le but principal de cet appareil est la préparation rapide d'échantillons pour analyses par absorption atomique, ICP, émission spectroscopique et chromatographie à phase liquide ou gazeuse.

L'appareil utilise l'énergie des micro-ondes pour chauffer les échantillons.

Des composés comme l'eau ou autre liquide polaire absorbent rapidement cette énergie.

Un échantillon placé à l'intérieur d'un récipient transparent spécial micro-ondes qui trempe dans un liquide polaire ou une solution ionique(généralement un acide) est sujet à un rapide réchauffement et pression élevée qui permettent la digestion de l'échantillon en un temps très court car la transparence du récipient permet l'absorption d'une quantité maximale d'énergie.

Les récipients sont placés sur un support qui durant l'opération, effectue une rotation de 360° puis une autre en sens inverse pour éviter que les tubules de pression ou que les sondes de température ne s'enchevêtrent et causent des dégâts.

Les récipients et leurs accessoires sont en Teflon PFR® et en Ultem® polyetherimide.

La température maximale atteinte au cours d'une opération est de 150°C alors que la pression maximale de l'appareil est de 200 PSIG (13,8 Bar).

Le pourcentage d'énergie, la pression et le temps de digestion sont variables selon le matériel à minéraliser.

V-2- Minéralisation

V-2-1- Plasmas humains

Dans chaque récipient on introduit 1 ml de plasma auquel on ajoute 2 ml d'acide nitrique (Merck, Allemagne).

L'appareil est calibré selon le matériel à minéraliser.

Le pourcentage d'énergie, la pression et le temps nécessaires à la minéralisation complète sont résumés dans le tableau II ci-dessous :

Tableau II : Paramètres nécessaires pour la minéralisation du plasma.

Etapes	1	2	3	4	5
% d'énergie	60	60	60	60	60
Pression	10	20	40	85	140
Temps (1) (min)	15 :00				
Temps (2) (min)	5 :00				

Temps (1) : temps nécessaire pour la minéralisation.

Temps (2) : à la fin de chaque période du Temps (1) une période de 5 mn est ajoutée pour activer la minéralisation.

A la fin de la cinquième période, l'appareil s'arrête et la minéralisation est achevée.

A leur sortie du micro-ondes, les récipients refroidissent soit à température ambiante soit qu'ils sont immédiatement trempés dans de la glace avant d'être ouverts. Ensuite, leurs contenus sont transvasés dans des fioles de 25 ml. Les récipients sont rincés à l'eau bidistillée et le volume des fioles est complété à 25 ml.

Le liquide obtenu est limpide et incolore. Les solutions sont ensuite mises dans des tubes en polypropylène, lavés avec de l'acide nitrique 5% et rincés avec de l'eau bidistillée, jusqu'au moment des dosages.

V-2-2- Les fragments des tissus de rats

Concernant le cerveau, le cœur, le foie, le rein, la rate, le muscle, l'intestin et le pancréas le protocole est le même.

On transvase les tissus dans les récipients à micro-ondes. Avec de l'eau bidistillée, on rince les tubes qui contenaient les fragments et on rajoute cette eau aux récipients. Dans chacun d'eux on met 2 ml d'acide nitrique. On vérifie que le

niveau des solutions est le même dans tous les récipients, sinon on complète avec de l'eau bidistillée. On ferme et on place dans le micro-ondes.

Le pourcentage d'énergie, la pression et le temps nécessaires à la minéralisation complète des différents tissus sont résumés dans le tableau III ci-dessous :

Tableau III : Paramètres nécessaires pour la minéralisation des différents tissus.

Etapes	1	2	3
% d'énergie	50	50	50
Pression	50	100	150
Temps (1) (min)	10 :00	10 :00	10 :00
Temps (2) (min)	5 :00	5 :00	5 :00

Temps (1) : temps nécessaire pour la minéralisation

Temps (2) : à la fin de chaque période de Temps (1) une période de 5mn est ajoutée pour activer la minéralisation.

Concernant les os, à cause de la présence de la matière inorganique, 3 ml d'acide nitrique sont ajoutés. Par conséquent, le pourcentage d'énergie et le temps de digestion sont plus importants comme indiqué dans le tableau IV ci-dessous:

Tableau IV : Paramètres nécessaires pour la minéralisation de l'os.

Etapes	1	2	3
% d'énergie	55	55	55
Pression	50	100	150
Temps (1) (min)	15 :00	20 :00	20 :00
Temps (2) (min)	8 :00	10 :00	10 :00

Temps (1) : temps nécessaire pour la minéralisation.

Temps (2) : à la fin de chaque période de Temps (1) une période de 8 mn puis de 10 mn est ajoutée pour activer la minéralisation.

A l'arrêt de l'appareil la digestion est terminée et on procède de la même manière que pour le plasma.

VI- DOSAGES DE L'ALUMINIUM PAR ICP

VI-1- Généralités sur l'ICP

Le principal élément de l'appareil consiste en un tube de quartz de 15 à 30 mm connecté à un générateur de haute fréquence.

Le générateur opère à des fréquences de l'ordre de 4 à 50 MHz (27 MHz est la fréquence usuelle).

Un gaz inerte, l'Argon, coule dans le tube. Ce flux de gaz agit comme un gaz support pour le plasma et comme agent de refroidissement (isolant thermique) pour le tube en quartz.

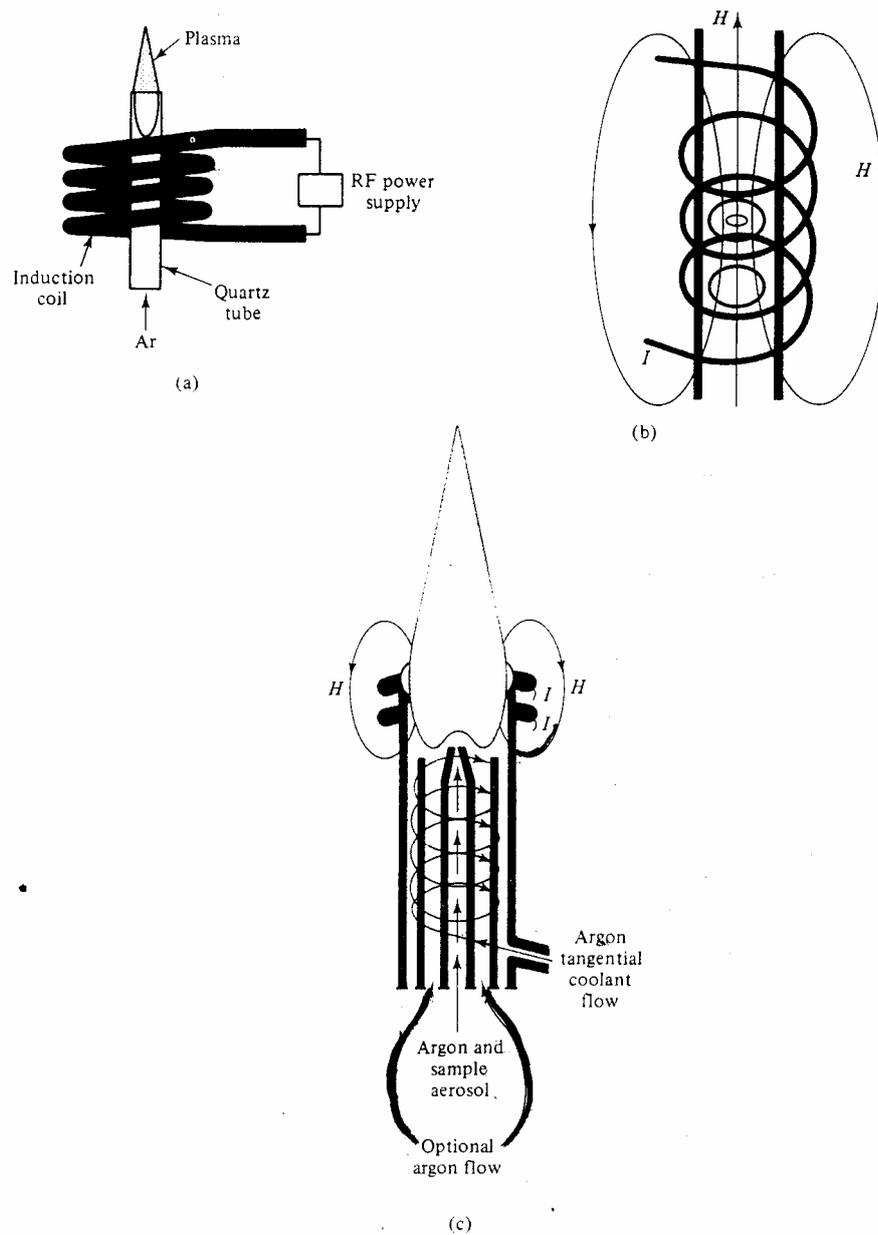


Figure 4. Fonctionnement d'un ICP :

- a- Bobine d'induction entourant un tube en quartz à travers lequel coule l'Argon
- b- Champs magnétiques (H) et courants (I) à l'intérieur du tube de quartz
- c- Configuration complète d'une torche à ICP.

Pour former le plasma, une étincelle provenant d'une bobine Tesla est utilisée pour produire des électrons et des ions dans la région de la bobine d'induction. Une fois

l'Argon arrive, le plasma se forme spontanément si le flux à l'intérieur du tube est convenable. A l'intérieur du tube en quartz naissent des courants à haute fréquence et des champs magnétiques (Figure 4-b).

Le courant induit, composé d'ions et d'électrons circulant dans une trajectoire fermée, chauffe le gaz support atteignant une température de l'ordre de 9 000 à 10 000 K et soutient l'ionisation nécessaire pour la réalisation d'un plasma stable.

Deux flux différents d'Argon sont utilisés : un flux à vitesse relativement faible, environ 1 L / mn, utilisé pour transporter l'échantillon au plasma et un autre de vitesse plus élevée 10 L / mn est introduit tangentiellement. Ce dernier sert d'isolant thermique pour le plasma et prévient un réchauffement excessif. (Figure 4-c)

L'ICP est connecté à un ordinateur où s'affichent courbes et valeurs.

VI-2- Introduction de l'échantillon

A hautes fréquences (≈ 27 MHz), le plasma est sous forme d'un anneau et permet une meilleure volatilisation et excitation de l'échantillon. C'est pourquoi le moyen le plus largement utilisé pour l'introduction de l'échantillon est l'introduction directe de l'aérosol à partir d'un nébuliseur à ultrasons qui convertit l'échantillon en un fin spray (Figure 5).

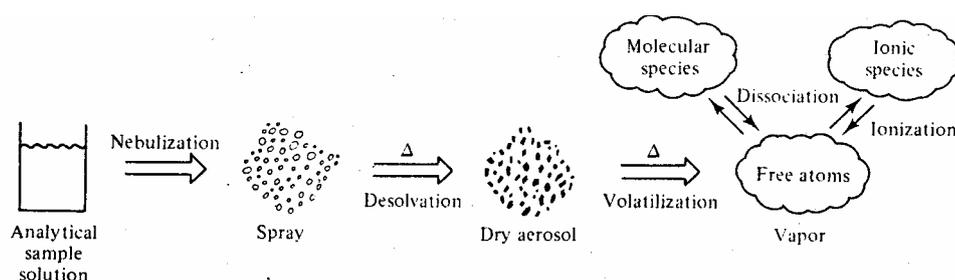


Figure 5. Processus conduisant à la vapeur atomique après introduction continue d'un échantillon dans un atomiseur continu.

Le nébuliseur utilisé est en plastique où un jet comprimé de gaz (Argon) aspire et nébulise la solution.

VI-3- Dosages des échantillons à l'ICP

VI-3-1- Calibration de l'appareil

L'ICP utilisé est un Spectroflame Modula, Sequential and Simultaneous Spectrometer de Spectro Analytical, Kleve, Germany.

Avant tout dosage, l'appareil doit être calibré. Pour cela on utilise :

- une solution d'acide nitrique 5%.
- une solution standard d'aluminium fortement concentrée (1000 ppm).

A partir de cette dernière solution on prélève 1ml et on complète à 1 litre avec de l'acide nitrique 5% pour avoir une solution mère à 1000 ppb.

Ensuite on procède à des dilutions pour avoir des solutions standard à 10 ppb, 50 ppb, 100 ppb, 160 ppb et 200 ppb.

On commence par doser le blanc composé d'une solution d'acide nitrique 5%, puis les différentes solutions standard. Chaque essai est répété trois fois.

L'ordinateur mémorise l'intensité des radiations pour chaque solution standard et on obtient une courbe d'étalonnage de l'intensité des radiations en fonction de la concentration d'aluminium dans la solution.

VI-3-2- Dosages des échantillons

Dans le tube contenant l'échantillon, on introduit le nébuliseur qui aspire la solution. Celle-ci remonte le tube en quartz et arrive au plasma où les atomes d'aluminium sont excités et donnent des ions Al^{3+} qui émettent des radiations. La densité des radiations est proportionnelle à la concentration d'aluminium dans la solution.

Chaque dosage est répété trois fois. Une valeur moyenne des trois essais est fournie par l'ordinateur.

VII - HISTOLOGIE

Les tissus, prélevés à la fin du gavage et des perfusions, sont plongés dans une solution de formaline à 10%. Ensuite, ils sont placés dans des bio-cassettes avec le côté à sectionner vers le bas.

Ces dernières sont placées d'abord dans de l'eau pour éliminer la formaline contenue dans les tissus puis dans des bains d'alcool de degrés croissants pour la déshydratation. Après l'alcool, on les trempe dans des bains de xylène qui est un agent miscible avec la paraffine. Ces étapes sont réalisées par l'intermédiaire d'une machine : Enclosed Tissue Processor-Shandon (USA)

A la fin de la dernière étape, de la paraffine est coulée dans les bio-cassettes qui sont ensuite posées sur une surface froide pour se solidifier.

Les coupes histologiques sont réalisées à l'aide d'un microtome. Les blocs sont taillés de manière à avoir des séries de sections de l'ordre de 3 à 4 µm d'épaisseur qui sont plongées dans un bain d'eau tiède (~23°) et récupérées sur des lames.

Pour éliminer toute trace de paraffine les lames sont placées dans des bains de xylène puis d'eau avant d'être plongées dans une solution d'hématoxiline.

Ces dernières étapes sont réalisées par une machine : « SAKURA Automatic Stainer » Model DRS-60 de Sakura Finetechnical. Co., LTD.

A la fin de la coloration, l'assemblage des lames et lamelles est effectué.

VIII - EVALUATION DE LA PRODUCTION DE LA MALONDIALDEHYDE (MDA) : ANALYSES DES RADICAUX LIBRES DANS LES MEMBRANES BIOLOGIQUES

VIII-1- Préparation de l'homogénat de cerveau de souris

Une souris a été sacrifiée et l'encéphale a été extrait. Ce dernier a été divisé en deux hémisphères : un a été homogénéisé dans un homogénéisateur en verre refroidit

dans de la glace en présence d'un volume de TBS et de sucrose égal à 4 fois son poids et l'autre a été utilisé pour l'extraction des lipides par la méthode de Folch. L'homogénat a été réparti dans des tubes Eppendorf et conservé au congélateur à -20°C .

VIII-2- Détermination de la concentration en protéines selon la méthode de Lowry : Test du Biuret

Avant de procéder à toute mesure, il est impératif de connaître la concentration en protéines de l'homogénat. Celle-ci est déterminée selon la méthode de Lowry par le test du Biuret.

Pour préparer le réactif du Biuret on prend :

- 0,75 g de sulfate de cuivre (Sigma, Milan, Italie)
- 3 g de tartrate de sodium et potassium (Sigma, Milan, Italie)
- 150 ml de NaOH à 10 % (Sigma, Milan, Italie)
- 250 ml d'eau milliQ.

On prépare également une solution d'acide Desoxycholique (Sigma, Milan, Italie) à 1 % (DOC 1%).

Dans un tube on met :

- 1500 μl du réactif du Biuret
- 500 μl de DOC 1 %
- 1000 μl d'eau milliQ.

Ce qui constitue le blanc avec lequel on ajuste le zéro du spectrophotomètre. Pour l'échantillon à doser on ajoute 20 μl d'homogénat pur à la solution précédente. La solution est ensuite portée à ébullition dans un bain-marie pendant 1 minute puis refroidie dans de la glace et l'absorbance est lue à 540 nm. La concentration en protéines a été établie en utilisant une courbe de calibration obtenue avec une solution connue d'albumine de sérum de bovin.

VIII-3- Extraction des lipides du cerveau de souris

Le cerveau de souris a été utilisé pour l'extraction des lipides réalisée selon la méthode de Folch [Folch et al., 1957].

Le cerveau a été pesé et homogénéisé avec un mélange de 2 volumes de chloroforme et un de méthanol. A un poids déterminé de cerveau sont ajoutés 20 volumes du mélange chloroforme-méthanol (v/v, 2 :1); la phase organique a été isolée et centrifugée pendant 15 minutes jusqu'à obtention d'une solution limpide. Pour éliminer toute trace de turbidité, le résidu a été filtré puis séché. Il a été ensuite pesé et mis dans 5 ml de tampon Tris-HCl 10 mM à pH 7,4. La concentration finale des lipides est de 6,6 mg / ml. Enfin, les lipides sont soumis à des ultrasons pour la préparation des liposomes.

VIII - 4 - Préparation des liposomes de phospholipides purs

10 mg de L- α - Lécithine (Oeufs, Sigma) sont dissous dans 0,33 ml de chloroforme. Le solvant a été évaporé dans un courant d'azote et le résidu est mis dans 3,3 ml de tampon Tris-HCl 10 mM à pH 7,4. La concentration finale est de 0,1 mg / ml de phospholipides. La suspension lipidique a été soumise à des ultrasons pour la formation des liposomes, jusqu'à obtention d'une dispersion transparente.

VIII-5- Mesure de la peroxydation lipidique

La mesure de la peroxydation lipidique des membranes a été effectuée aussi bien sur l'homogénat de cerveau de souris que sur les liposomes de l'extrait de Folch et des phospholipides purs.

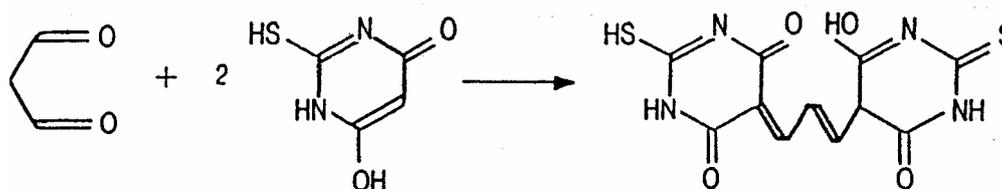
Dans ce but, on a utilisé le test de l'acide tiobarbiturique (TBA) suivant la procédure reportée par Ohyashiki et al (1993).

Les échantillons ont été incubés avec du FeSO₄ 0,1 mM dans du tampon Tris-HCl à pH 7,4 pendant 30 minutes, dans un bain thermostaté à 37°C, en présence et en absence de AlCl₃ (0,01-0,1 mM)

Au mélange réactionnel (1 ml), on a ajouté 1 ml d'acide trichloroacétique 10% et 1 ml d'acide tiobarbiturique 0,67% dissout dans de l'acide acétique glacial à 50%, et on l'a incubé pendant 30 minutes dans un bain sec à 90°C. Après incubation, les échantillons ont été refroidis dans de la glace et on a déterminé successivement l'absorbance à 532 nm. Pour les échantillons d'homogénat de cerveau de souris, après refroidissement, ceux-ci ont été centrifugés à 5000 tours par minute pendant 5 minutes et la lecture de l'absorbance a concerné le surnageant.

Le test de l'acide tiobarbiturique est l'une des méthodes les plus communes pour la détermination de l'oxydation des lipides ; elle est sensible et simple à exécuter [Asakava & Matsushita, 1979]. Le test permet de déterminer le degré de peroxydation lipidique par mesure spectrophotométrique de la malondialdéhyde (MDA), un des produits de dégradation des endoperoxydes cycliques générés pendant l'oxydation des lipides (voir introduction).

La MDA produite vient relever la réaction avec l'acide tiobarbiturique avec lequel elle forme un chromophore qui absorbe à 532 nm. La réaction est formée d'une molécule de MDA et deux d'acide tiobarbiturique.



Formation du complexe MDA-TBA

La lecture de l'absorbance à 532 nm est convertie en concentration de MDA produite pendant la réaction par l'application de la loi de Lambert-Beer :

$$A = \varepsilon l c$$

Où le coefficient d'extinction molaire du chromophore est $\varepsilon = 156.000 \text{ L mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

IX - EVALUATION DE L'ACTIVITE DE L'ACETYL - CHOLINESTERASE (AChE)

IX-1- Traitement des animaux

Des lots de 10 souris CD (Morini, Bologne, Italie) ont été traités par voie orale, pendant trois mois, avec une solution aqueuse de chlorure d'aluminium $AlCl_3$ et de lactate d'aluminium $Al(lac)_3$ (Sigma, Milan, Italie) à raison de 10 mg / animal / jour.

IX-2- Préparation d'homogénats de cerveau de souris

A la fin de la durée du traitement, tous les animaux ont été décapités.

Les cerveaux ont été immédiatement retirés, pesés et placés dans une solution contenant du saccharose à 250 mM et du tampon Tris-HCl à 100 mM, à pH 7,5 dans un bain de glace.

Les cerveaux sont ensuite homogénéisés dans un homogénéisateur en verre plongé dans de la glace, dans la même solution de saccharose-Tris-HCl, en utilisant 4 volumes de cette dernière par rapport au poids du cerveau.

L'homogénat est ensuite réparti dans plusieurs tubes Eppendorf et placés à $-80\text{ }^{\circ}C$ jusqu'à utilisation.

La tacrine (THA) (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine) provient de chez Aldrich (Milan, Italie) alors que la desferroxamine est fournie par Novartis Farma (Origgio-VA, Italie).

IX-3- Mesure de l'activité de l'AChE

Avant de procéder à toute mesure de l'activité de l'AChE, il est impératif de connaître la concentration en protéines de l'homogénat. Celle-ci est déterminée selon la méthode de Lowry par le test du Biuret décrite précédemment. Pour les échantillons à doser on ajoute 20 μl d'homogénat pur à la solution précédente. La solution est ensuite portée à ébullition dans un bain-marie pendant 1 minute puis

refroidie dans de la glace et l'absorbance est lue à 540 nm. L'essai est répété 3 fois et la valeur moyenne est retenue.

Après on procède à la mesure de l'activité de l'AChE (EC 3.1.1.7) déterminée selon la méthode décrite par Ellman [Ellman et al, 1961].

L'activité enzymatique est évaluée en mesurant la couleur jaune produite par la thiocholine après réaction avec les ions de l'acide Dithio-bis-nitrobenzoïque (DTNB).

Les réactifs utilisés sont :

- le tampon Tris- HCl 100 mM, à pH 7,4
- le DTNB (Sigma, Milan, Italie) à 0,01M : 3,6 mg sont dissous dans 10 ml de tampon
- l'iodure d'acétylthiocholine (Sigma, Milan, Italie) à 0,075 M : 0,0542 g sont dissous dans 25 ml d'eau milliQ.

Concernant les dosages, le protocole utilisé est le suivant : dans une cuvette on introduit 1000 µl de tampon, 100 µl de DTNB et 25 µl d'iodure d'acétylthiocholine. Ce qui constitue le blanc avec lequel on ajuste le zéro. Pour les échantillons à doser on ajoute 10 µl de l'homogénat dilué trois fois et on procède à la lecture de l'absorbance à 412 nm. Chaque essai est répété 3 fois et la moyenne des 3 valeurs est retenue.

Les mesures sont réalisées à 37°C grâce à un spectrophotomètre Perkin-Elmer Lamda 5 UV / VIS à double rayon et équipé d'un bain thermostaté Haake GH (Mirano, Venise, Italie).

L'augmentation progressive de l'absorbance est enregistrée pendant 5 minutes. L'activité enzymatique exprimée en (**moles x L⁻¹ x min⁻¹ x mg prot⁻¹**) est calculée selon la formule :

$$\text{Activité} = (\Delta A_{412} / \text{min}) / 13600 \times F \times C_0$$

où 13600 correspond au coefficient d'extinction molaire, F le facteur de dilution de l'homogénat et C_0 sa concentration initiale.

Les valeurs du K_m sont déterminées par analyse du graphique de Lineweaver-Burk [Dixon, 1953 ; Kontro et al., 1981] et l'analyse de la régression linéaire a été réalisée selon le programme informatique (Stat WorksTM).

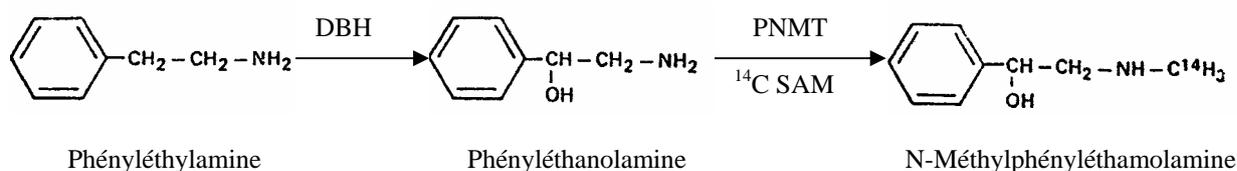
En ce qui concerne les expériences réalisées *in vitro*, l'aluminium a été introduit directement dans l'essai et l'activité enzymatique de l'AChE a été déterminée comme cité plus haut.

Dans toutes les expériences, les valeurs présentent un coefficient de corrélation de 0,99.

X-EVALUATION DE L'ACTIVITE DE LA DOPAMINE- β -HYDROXYLASE

X-1- Détermination de l'activité de la Dopamine- β -Hydroxylase (DBH)

L'activité de la DBH (E.C.1.14.17.1) a été déterminée sur l'enzyme purifiée ayant une concentration protéique de 5,5 mg /ml, et une activité de 3,2 U /mg de protéines (Sigma, Milan, Italie). La pureté de la DBH a été mesurée selon la méthode de Ljones et al [Ljones et al.,1976] et son activité a été déterminée suivant la méthode radio-chimique rapportée par Molinoff et al [Molinoff et al., 1971]. Cette méthode utilise la phényléthylamine (Sigma) comme substrat pour la DBH et l'enzyme phényléthanolamine-N-méthyltransférase [PNMT] (30 U/mg de protéine, Sigma) transfère le résidu méthylique du donneur, S-adénylméthionine[¹⁴C] (59 mCi/mmol, NEM, Italie), au groupe amino-terminal du produit de la réaction catalysée par la DBH. La réaction est résumée comme suit :



Le produit réactif résultant de la réaction a été déterminé par l'intermédiaire d'un scintillateur Packard Tricarb 1500.

Pour cet essai les réactifs utilisés sont les suivants :

- 25 μ l d'acide ascorbique 0,048 M à pH 6
- 25 μ l de fumarate de sodium 0,5 M à pH 6
- 20 μ l de pargyline 0,006 M
- 10 μ l de phényléthylamine 0,03M
- 1500 unités de catalase dans 10 μ l de tampon Tris 0,005 M à pH 7,4
- 10 μ l de tampon Tris 1 M à pH 6
- 10 μ l de CuSO_4 310 μ M
- 193 μ l de tampon Tris 5 mM à pH 7,4

Au mélange réactionnel de volume final égal à 303 μ l, on a ajouté 7 μ l de DBH diluée à 1 volume pour 5 volumes de Tris 0,5 mM à pH 7,4 ; le mélange a été ensuite incubé pendant 20 minutes à 37°C après on a ajouté successivement 87 μ l de Tris 1 mM à pH 8,6, 10 μ l de PNMT (5 mg / ml dans Tris 1mM à pH 7,4) et 3 μ l de S-adénosylméthionine-¹⁴C. Après 30 minutes d'incubation à 37°C la réaction est arrêtée par addition de tampon borate à pH 10 et le produit de la réaction a été extrait avec 6 ml de toluène contenant 3% d'alcool isoamyle. Après centrifugation à basse vitesse, 4 ml de la phase organique ont été transférés dans une fiole appropriée contenant 10 ml de liquide de scintillation et la radioactivité est mesurée par un compteur de scintillation (Packard Tricarb 1500). L'activité de la DBH est

exprimée en concentration de phényléthanolamine produite par milligramme de protéines par minute de réaction.

X-2- Préparation de la solution d'aluminium

Une solution mère de $\text{Al}(\text{lact})_3$ 10 mM a été préparée dans du TBS (solution de NaCl 0,9 % dans du tampon Tris pH 7,4) 0,1 M pH 7,4. Le pH de la solution a été porté à 7,4. Il s'ensuivit une centrifugation pendant 15 minutes à 3000 tours par minute pour séparer l'hydroxyde d'aluminium formé. Après avoir effectué un nouveau contrôle de pH, la solution a été filtrée sur papier puis ultrafiltrée avec un filtre de porosité 0,2 μm [Zatta et al., 1995].

Dans l'essai l'enzyme est prise à concentrations croissantes (0-0,04 mg /ml de protéines) et le substrat est constant ceci en présence et en absence de $\text{Al}(\text{lact})_3$ 100 μM .

RESULTATS ET DISCUSSION

PARTIE I

DETERMINATION DE L'ALUMINIUM DANS LE PLASMA DES SUJETS UREMIQUES

I-1- Résultats

Après les dosages d'aluminium effectués à l'ICP, les valeurs individuelles obtenues selon les patients dialysés sont représentées dans le tableau V ci-dessous :

Tableau V : Aluminémie chez les patients en hémodialyse.

Patient N°	Aluminémie avant dialyse (μ g/L)	Aluminémie après dialyse (μ g/L)
1	235	172
2	239	268
3	193	153
4	235	163
5	189	195
6	428	333
7	131	403
8	275	163
9	494	215
10	230	223
11	506	222
12	255	288
13	174	523
14	153	194
15	208	268
16	151	193
17	151	197
18	171	133
19	293	241

Les valeurs obtenues à l'ICP sont en ppb. Pour convertir en µg/ml on applique la formule suivante :

$$[Al]_{\text{échantillon}} (\mu\text{g/ml}) = [Al]_{\text{ICP}} (\text{ppb}) \times 25 / \text{Poids}_{\text{échantillon}} (\text{g ou ml}) \times 1000$$

Concernant les sujets témoins, les taux d'aluminium trouvés après dosage à l'ICP figurent dans le tableau VI ci-dessous :

Tableau VI : Aluminémie chez les sujets témoins.

Témoins	Aluminémie (µg/L)
T ₁	184
T ₂	173
T ₃	190
T ₄	138
T ₅	235
T ₆	190
T ₇	165
T ₈	188
T ₉	188
T ₁₀	242
T ₁₁	396
T ₁₂	316
T ₁₃	175
T ₁₄	232
T ₁₅	212

D'après le tableau V, on constate que les 19 patients présentent des niveaux d'aluminium très élevés aussi bien avant dialyse qu'après dialyse. Neuf d'entre eux

présentent des taux plus élevés après dialyse qu'avant dialyse dont 2 montrant des niveaux extrêmement importants.

Concernant les sujets témoins, on remarque que les niveaux d'aluminium sont également très élevés.

I-2-Discussion

Durant les deux dernières décennies, en association avec le début de la thérapie de la dialyse chronique et la prolongation de l'état urémique, la toxicité de l'aluminium a représenté une cause majeure de mortalité chez les patients urémiques. Le patient urémique a été trouvé être à haut risque des charges d'aluminium et toxicité à partir de diverses sources d'exposition parentérale, de l'accroissement de l'absorption gastro-intestinale et d'une capacité compromise à éliminer tout aluminium administré à cause d'un affaiblissement rénal.

Chez les sujets normaux le tractus gastro-intestinal est une barrière relativement imperméable à l'aluminium avec un faible taux d'absorption pour cet ion métallique. L'aluminium absorbé à partir du tractus gastro-intestinal est normalement excrété par les reins. En présence d'une fonction rénale faible l'aluminium est retenu et accumulé dans les tissus.

Le but de ce travail est de déterminer, pour la première fois, les quantités d'aluminium contenues dans le plasma de sujets insuffisants rénaux chroniques et sous hémodialyse d'un hôpital régional public.

Quelques mois avant que les prélèvements soient effectués, l'osmoseur inverse était tombé en panne et par conséquent l'eau de dialyse n'était pas convenablement traitée. Au moment où les prélèvements ont été réalisés, l'osmoseur défectueux n'était toujours pas réparé.

D'après les résultats, on remarque que les niveaux d'aluminium sont extrêmement élevés aussi bien avant dialyse (minimum :131 µg/L ; maximum :506 µg/L) qu'après dialyse (minimum :133 µg/L ; maximum :523 µg/L).

Les sujets témoins présentent également des niveaux très élevés avec un minimum de 138 µg/L et un maximum de 396 µg/L, valeurs qui se situent dans l'intervalle des niveaux d'aluminium des hémodialysés.

L'aluminémie normale chez les patients en hémodialyse est . 40 µg/L. Or, les taux d'aluminium trouvés aussi bien chez les hémodialysés que chez les témoins sont extrêmement élevés. Or, tout niveau d'aluminium ☹ 60µg/litre devrait être considéré comme signe d'une surcharge aluminique.

Concernant les sujets témoins, on peut dire que ces niveaux sont surtout dus à l'eau de boisson qui n'est autre que l'eau potable et à l'alimentation, car la plupart des aliments contiennent naturellement de l'aluminium en raison de son abondance dans la nature. Certains aliments ont de hautes teneurs en aluminium, par exemple le thé et certaines herbes et épices.

L'adulte moyen absorbe probablement chaque jour entre 9 et 14 milligrammes d'aluminium par diverses voies d'exposition, mais surtout 90 % par la nourriture, en particulier par les aliments traités avec des additifs contenant de l'aluminium, par exemple dans le fromage industriel, les produits en poudre sèche et les biscuits, les aliments cuits dans des ustensiles en aluminium et les aliments présentés dans des emballages d'aluminium.

La composition des aliments consommés avec de l'eau potable contenant de l'aluminium a un effet important sur l'absorption de l'aluminium. Chez des rats ayant reçu de l'aluminium dans l'eau avec du jus de citron, du jus d'orange, du café ou du vin, l'absorption de l'aluminium augmentait respectivement de 1 800 p. cent, de 1 700 p. cent, de 250 p. cent et de 188 p. cent [Walton & al., 1994 et Walton & al., 1995]. Dans le cas du jus de citron et du jus d'orange, cet effet était en grande partie dû à la formation de citrate d'aluminium non ionisé, qui devrait traverser facilement la barrière gastro-intestinale [Slanina & al., 1986]. En fait, l'acide citrique peut constituer le facteur le plus important pour la détermination de l'absorption de l'aluminium. Il est ressorti de plusieurs études que la présence de citrate dans les aliments ou dans les boissons augmente de manière significative

l'absorption de l'aluminium à partir des sources alimentaires [Fulton & Jeffery, 1990 ; Greger & Powers, 1992 et Nolan & al., 1994].

Le thé constitue une source majeure d'aluminium alimentaire car le théier est l'une des rares plantes qui accumulent de grandes quantités d'aluminium, qui peut être libéré des feuilles. Les concentrations d'aluminium dans le thé infusé se situent en général dans une gamme de 2 à 8 mg/litre. Bien que les concentrations d'aluminium dans le thé soient de 10 à 100 fois supérieures aux concentrations retrouvées dans l'eau potable [Forster & al., 1995], l'aluminium dans le thé se présente presque exclusivement (91-100 %) sous forme de complexes organiques très stables et à haut poids moléculaire qui ne sont pas facilement absorbés. Mais, l'absorption de l'aluminium chez les grands consommateurs de thé, particulièrement ceux avec une absorption accrue, peut ne pas être insignifiante en raison de la teneur relativement élevée du thé en aluminium [Butterworth & al., 1992 et Drewitt & al., 1993].

La consommation d'eau potable est également une des causes des niveaux élevés d'aluminium dans le plasma des témoins. La région de Fès est une zone volcanique et les eaux de ce genre de région sont très riches en aluminium. Comme le pH de l'eau peut varier d'une région à une autre, les teneurs naturelles d'aluminium sont parfois plus élevées. La teneur en aluminium des eaux de distribution publique dépend des origines de l'eau brute et des conditions du traitement. L'eau potable est une eau traitée avec de l'alun (sulfate d'aluminium) qui est considéré comme le plus efficace des coagulants. Par suite du traitement à l'alun, les niveaux d'aluminium dans l'eau traitée sont souvent plus élevés que dans l'eau brute [Driscoll & Letterman, 1988]. Actuellement, il existe une directive de l'Organisation Mondiale de la Santé selon laquelle le taux d'aluminium maximal admissible dans l'eau potable est de 0,2 mg d'aluminium par litre en raison de l'importance de ce seuil pour les traiteurs d'eau utilisant les sels d'aluminium comme coagulants.

Un examen critique de la littérature scientifique semble indiquer que certaines maladies accroissent l'absorption de l'aluminium par voie gastro-intestinale. Par exemple, on a noté certains indices d'une absorption d'aluminium plus facile chez

les personnes souffrant d'insuffisance rénale chronique ou d'urémie que chez les individus normaux [Wills & Savory, 1989 et Lindberg & al., 1993].

Les patients ayant une insuffisance rénale chronique et nécessitant un traitement par hémodialyse risquent de développer une toxicité à l'aluminium.

Les sujets ayant une fonction rénale déficiente sont connus pour avoir une capacité réduite à excréter l'excès d'aluminium [Maharaj & al., 1987].

Selon plusieurs études réalisées chez les patients en hémodialyse, la source principale d'aluminium est l'eau utilisée pour préparer les solutions d'hémodialyse par dilution des concentrés [Alfrey, 1986 ; Taylor & Walker, 1992 ; Alfrey, 1993 ; Blanusa & al., 1997 et Mazzaferro & al., 1997].

Avec un liquide de dialyse contenant moins de 0,4 $\mu\text{mol/litre}$ (= 10 $\mu\text{g/L}$) et un plasma de moins de 1 $\mu\text{mol/litre}$, le transfert de l'aluminium au patient serait minimal. Cependant, si le contenu en aluminium dans le liquide de dialyse est au dessus de 0,4 $\mu\text{mol/litre}$, il y a un transfert continu à travers la membrane de dialyse vers le patient. Ce transfert n'est presque pas entravé au cours de chaque séance de dialyse car l'aluminium qui a traversé la membrane est rapidement et spécifiquement lié à une protéine plasmatique, la transferrine, qui facilite davantage la diffusion vers l'intérieur. Par conséquent, le patient accumule à chaque séance de dialyse une charge d'aluminium qui est l'équivalent d'une charge de trois fois par semaine de dialyse. Le résultat est que la transferrine plasmatique est de plus en plus saturée en aluminium ; l'aluminium plasmatique total augmente et là apparaît être un transfert progressif et concomitant de la transferrine dans les tissus.

Le liquide de dialyse est traité afin d'éliminer ou au moins de réduire au minimum la teneur en aluminium. Selon la Résolution C184 du 23 Juillet 1986 de la Communauté Européenne pour la protection du patient traité par dialyse contre l'aluminium, la concentration en aluminium du liquide de dialyse doit être inférieure à 10 $\mu\text{g/litre}$ [Taylor & Walker, 1992].

L'osmose inverse réduit fortement la teneur en aluminium et en plusieurs autres substances de l'eau du robinet qui sert à la préparation du liquide de dialyse.

Or, dans cette étude, l'osmoseur inverse ne fonctionnait pas plusieurs mois avant que les prélèvements soient effectués. Par conséquent, l'eau qui servait à préparer le liquide de dialyse n'était pas correctement traitée. Ceci pourrait être une des causes qui font que les niveaux du métal soient extrêmement élevés dans le plasma des patients. En effet, en 1986, Alfrey a montré que les patients dialysés dont la solution de dialyse ne contenait pas d'aluminium avaient des niveaux d'aluminium plasmatique inférieurs à 100 µg/litre ; cependant, les patients qui subissent une dialyse dont le liquide est contaminé par l'aluminium auraient des niveaux de 200 à 300 µg/litre.

Un autre aspect reconnu de la toxicité de l'aluminium est l'anémie qui est probablement due à l'inhibition de la synthèse de l'hémoglobine dans la moelle osseuse. Cette anémie, morphologiquement hypochromique et microcytique, pourrait être l'unique signe évident de la lente accumulation ou l'intoxication prolongée de l'aluminium [Stewart, 1989].

Sur les 19 patients hémodialysés, 11 d'entre eux présentent une anémie. Or, la toxicité à l'aluminium est associée à l'anémie chez les patients ayant une insuffisance rénale chronique. Dans une étude, Cannata et al (1991) ont évalué les conséquences hématologiques d'une surcharge en aluminium. Ils ont également étudié *in vivo* si une surcharge d'aluminium peut moduler l'absorption gastro-intestinale du fer et *in vitro* si la présence de l'aluminium peut influencer la prise du fer par les cellules. Cette étude a démontré que l'aluminium interfère avec l'absorption et le transfert du fer, et suggère que ces mécanismes peuvent être responsables du maintien et même de l'augmentation de l'anémie observée dans le cas d'une surcharge en aluminium. Une autre étude réalisée également par Cannata et al (1991) a montré qu'une diminution en fer augmente nettement l'absorption et la prise de l'aluminium par les cellules et suggère que les individus susceptibles, tels que les insuffisants rénaux, courent un grand risque s'ils sont déficients en fer.

Un autre facteur pouvant être en rapport avec les taux élevés d'aluminium est le tampon utilisé dans le bain de dialyse et qui correspond à l'acétate de sodium. Ce dernier est utilisé comme tampon standard pour des raisons de facilité de préparation et de stérilisation des concentrés ; l'acétate est rapidement transformé en bicarbonate par le foie du patient. Selon la Résolution C184 pour la protection du patient traité par dialyse contre l'aluminium, la concentration de ce dernier dans le tampon doit être $\leq 10 \mu\text{g/litre}$ [Taylor & Walker, 1992].

Par la suite, la Consensus Conference tenue à Paris le 27 Juin 1992 et le Guide de la Société Italienne de Néphrologie ont modifié les proportions établies par la Résolution C184, recommandant des niveaux bien inférieurs pour les solutions de dialyse ($\leq 5 \mu\text{g/litre}$) et le sérum ($\leq 30 \mu\text{g/litre}$).

Au cours de ces dernières années, il a été démontré que le citrate (connu comme étant un chélateur de l'aluminium) pris oralement ainsi que d'autres constituants alimentaires tels que les acides ascorbique, gluconique, malique et lactique augmentent l'absorption gastro-intestinale de l'aluminium [Froment & al., 1989 ; Partridge & al., 1989 ; Walker & al., 1990 ; Lindberg & al., 1993 et Domingo & al., 1994].

Ces facteurs organiques semblent être d'une grande importance car ils sont disponibles dans l'alimentation en concentrations relativement importantes. Aussi, puisque ces acides sont considérés comme inoffensifs, ils sont largement utilisés comme additifs alimentaires.

Il est donc clair que les patients urémiques devraient éviter l'ingestion simultanée d'aliments contenant d'importantes quantités d'acides citrique, ascorbique et lactique et des composés contenant de l'aluminium [Domingo & al., 1994].

En conclusion, concernant les sujets hémodialysés dont les niveaux d'aluminium sont plus élevés après dialyse qu'avant dialyse, on peut suggérer que c'est peut-être dû à l'ultrafiltration qui concentre les protéines plasmatiques. Ces fluctuations

pourraient dissimuler une entrée et un transfert d'aluminium entre les dépôts tissulaires et le liquide de dialyse.

PARTIE II

EVALUATION DE LA DISTRIBUTION DE L'ALUMINIUM CHEZ LES RATS TRAITES PAR DIFFERENTES ESPECES D'ALUMINIUM PAR GAVAGE ET PERFUSION

II-1- Résultats

II-1-1- Gavage

Chez les animaux traités par gavage nous observons que :

- la spéciation du métal est un facteur important concernant les différentes accumulations dans chaque organe.
- En plus de la spéciation du métal, nous avons une spéciation d'organes car nous pouvons voir clairement que l'accumulation du métal est différente d'un organe à un autre (Tableau VII).

Nous observons particulièrement que le métal est accumulé à fortes concentrations dans les os (Fig . 6). Cette observation est cohérente avec la chimie de l'aluminium car les os sont constitués de phosphate de calcium et les phosphates sont les ligands préférés de l'aluminium. La majorité du métal accumulé dans les os est sous forme de $\text{Al}(\text{acac})_3$ et AlCl_3 .

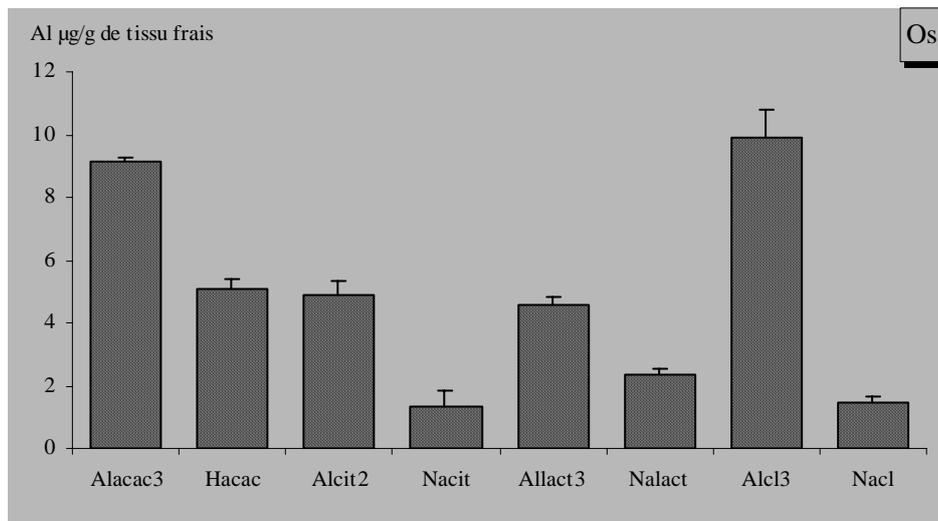


Figure 6 :Concentrations en aluminium ($\mu\text{g/g}$ de tissu frais) dans l'os.

Dans le muscle (Fig. 7) et le cœur (Fig. 8), le métal le plus effectif est $\text{Al}(\text{cit})_2$. Cependant, la quantité d'aluminium accumulée dans ces deux organes est d'environ 50% par rapport à la quantité maximale accumulée dans les os.

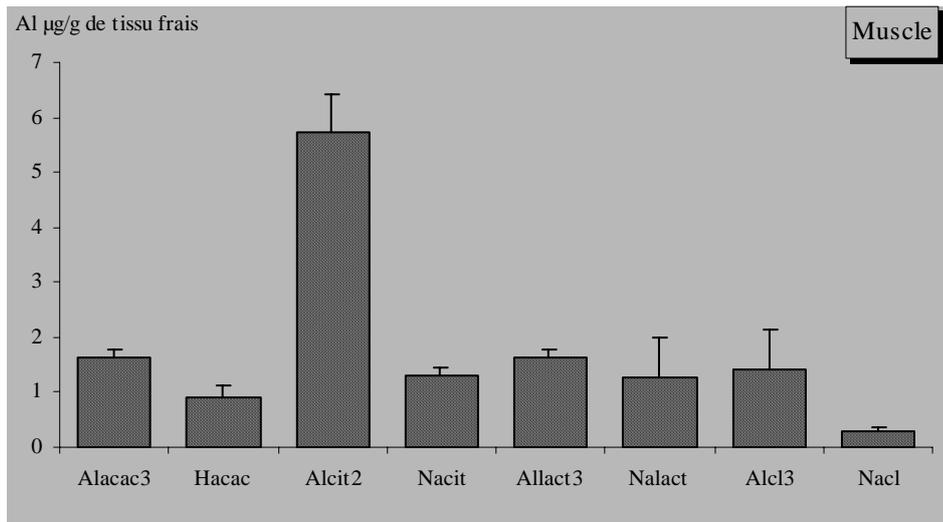


Figure 7 : Concentrations en aluminium (µg/g de tissu frais) dans le muscle.

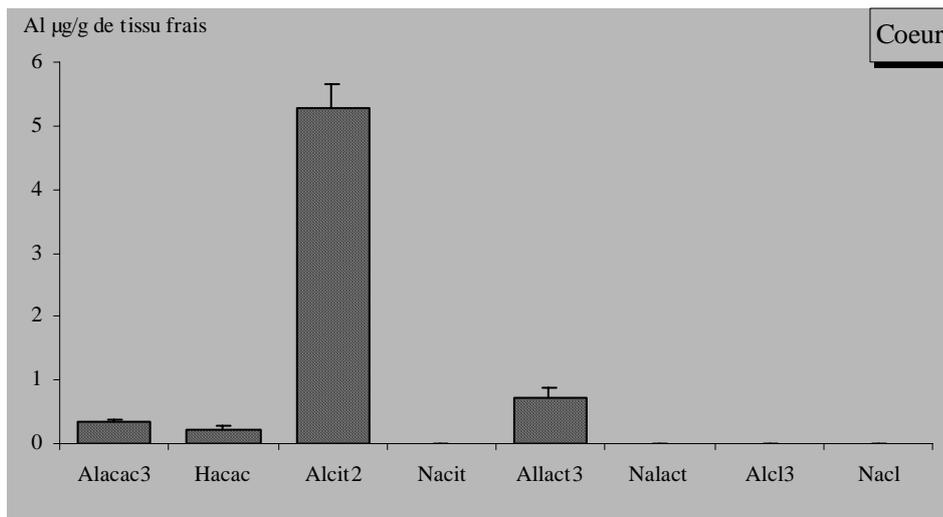


Figure 8 : Concentrations en aluminium (µg/g de tissu frais) dans le cœur.

Dans le foie (Fig. 9), les deux espèces chimiques qui favorisent l'accumulation de l'aluminium sont $\text{Al}(\text{lact})_3$ et $\text{Al}(\text{cit})_2$ et la quantité maximale du métal accumulée dans le foie est d'environ le tiers de celle trouvée dans les os.

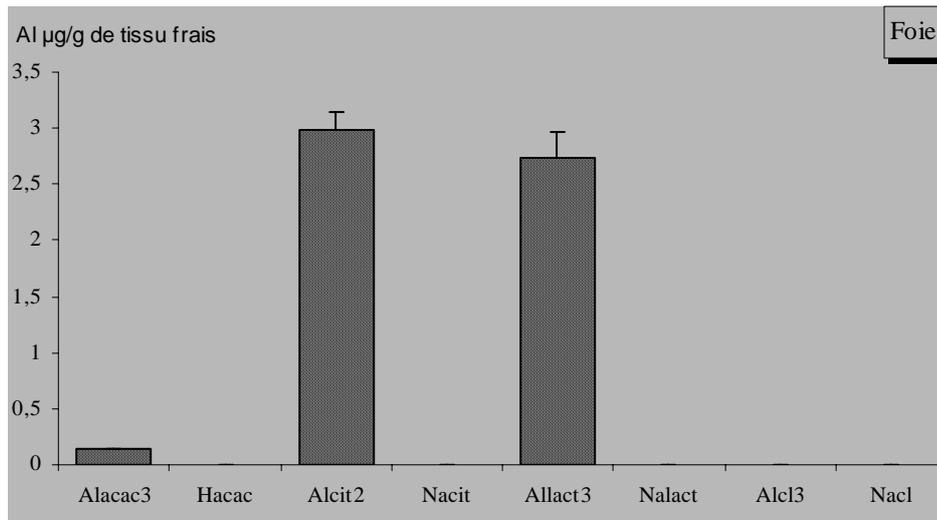


Figure 9 : Concentrations en aluminium (µg/g de tissu frais) dans le foie.

Dans le pancréas (Fig. 10), apparemment toutes les espèces métalliques s'accumulent presque au même taux.

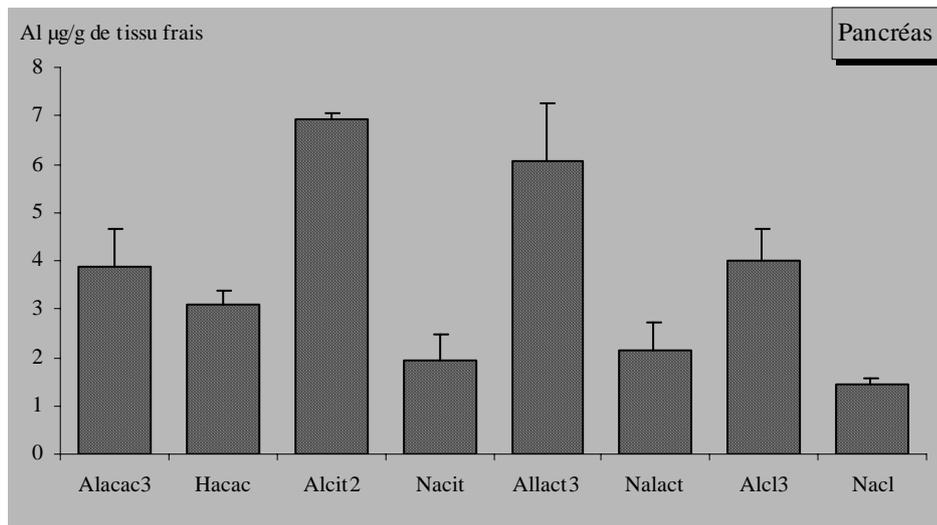


Figure 10 : Concentrations en aluminium (µg/g de tissu frais) dans le pancréas.

Au niveau de l'intestin (Fig. 11), on observe que l'espèce chimique qui permet l'accumulation de l'aluminium est $Al(cit)_2$ dont la quantité maximale accumulée est d'environ la moitié de celle observée dans les os.

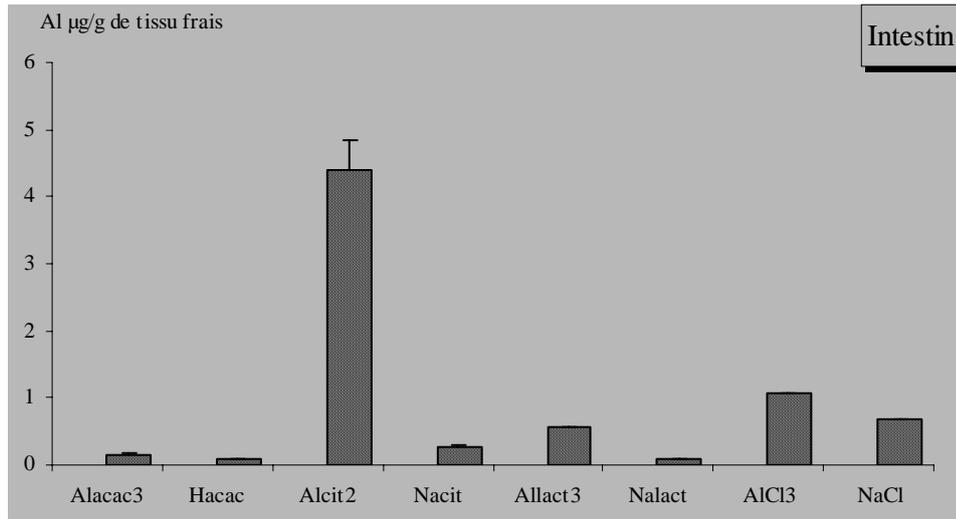


Figure 11 : Concentrations en aluminium (µg/g de tissu frais) dans l'intestin.

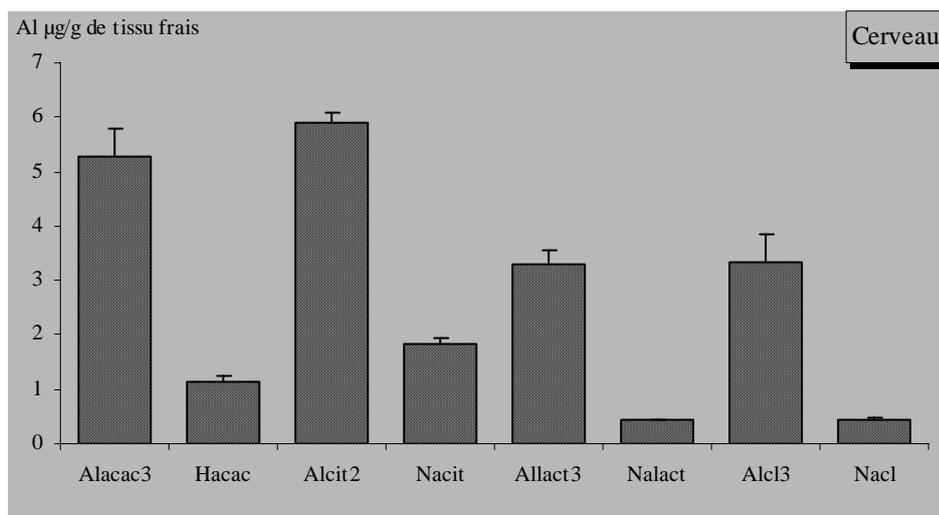


Figure 12 : Concentrations en aluminium (µg/g de tissu frais) dans le cerveau.

Dans le cerveau (Fig. 12) nous distinguons la différence dans l'accumulation des complexes d'aluminium et leurs ligands. La raison est probablement due au fait que, la barrière hémato-encéphalique étant riche en récepteurs de transferrine, ces derniers favorisent la translocation de l'aluminium en utilisant les récepteurs de la transferrine.

Concernant le rein et la rate aucune accumulation des différentes espèces chimiques d'aluminium et ligands n'a été observée.

II-1-2-Perfusion intraveineuse

II-1-2-1-Distribution de l'aluminium dans les différents tissus

L'accumulation de l'aluminium par perfusion est faible par rapport à celle du gavage car la durée du traitement est de quelques heures alors que celle du gavage était de deux mois.

Même dans le cas de la perfusion, aucune accumulation d'aluminium n'a été observée dans le rein et la rate (Tableau VIII).

AlCl₃ paraît être l'espèce la plus effective au niveau de tous les tissus (figures. 13, 14, 15, 16, 17, 18 et 19) et ceci est justifié par le fait que, parmi toutes les espèces utilisées, AlCl₃ est l'espèce hydrolytiquement la moins stable.

En effet, AlCl₃ plus qu'aucune autre espèce utilisée, une fois dans le sang, Al³⁺ est immédiatement libéré et se lie à la transferrine qui transporte le métal dans tous les organes.

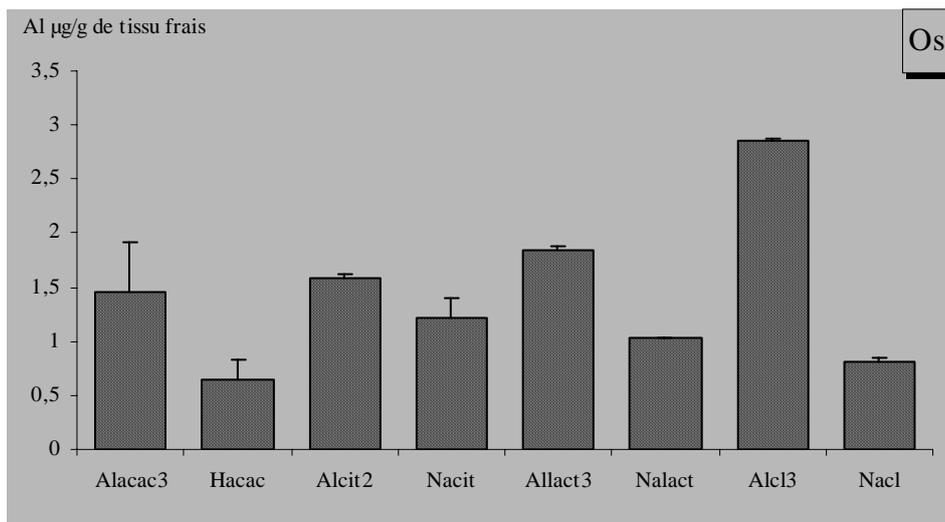


Figure 13 : Concentrations en aluminium (µg/g de tissu frais) dans l'os.

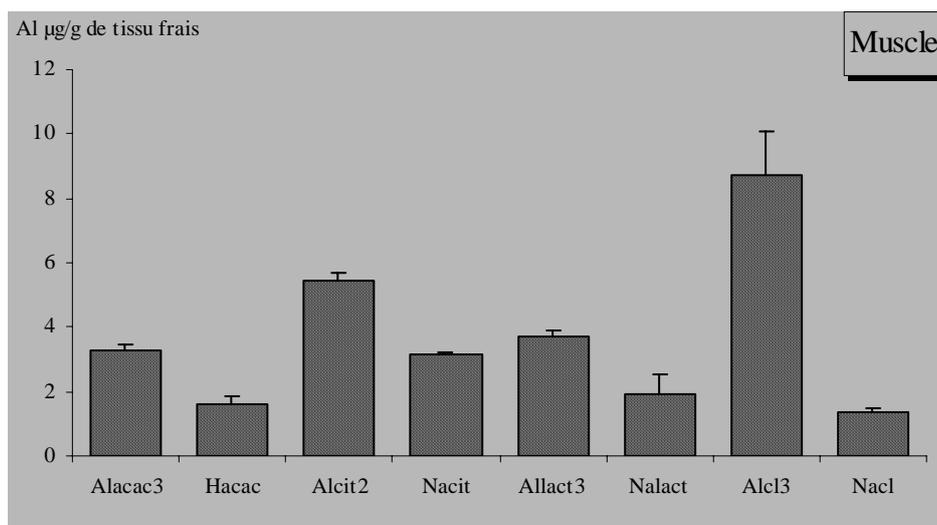


Figure 14 : Concentrations en aluminium (µg/g de tissu frais) dans le muscle.

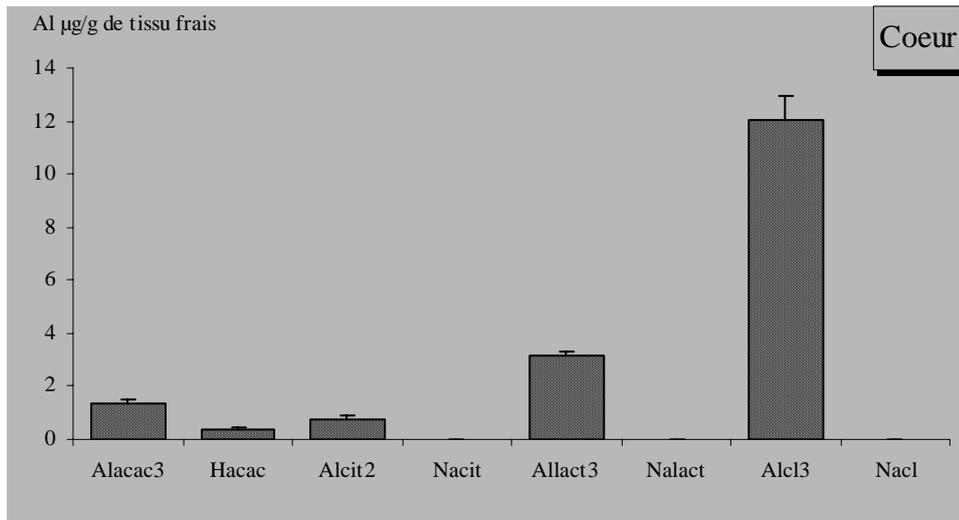


Figure 15 : Concentrations en aluminium ($\mu\text{g/g}$ de tissu frais) dans le cœur.

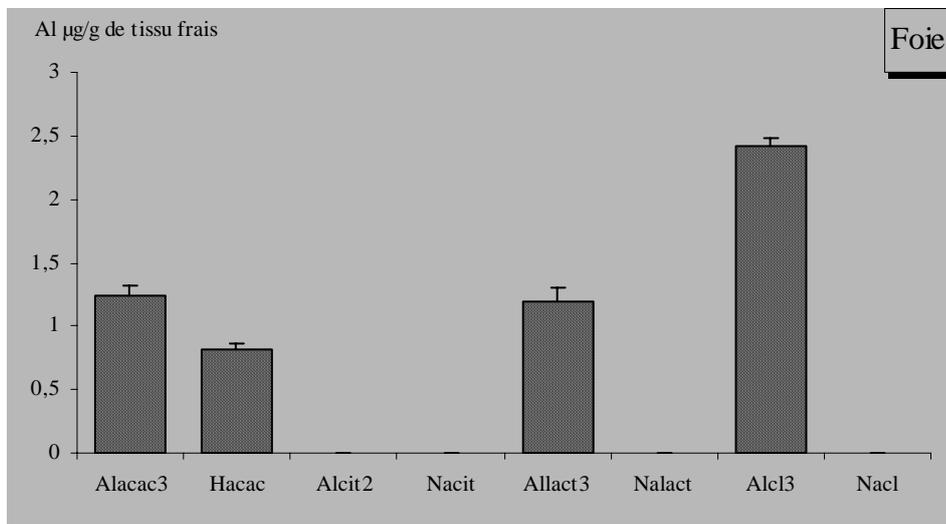


Figure 16 : Concentrations en aluminium ($\mu\text{g/g}$ de tissu frais) dans le foie.

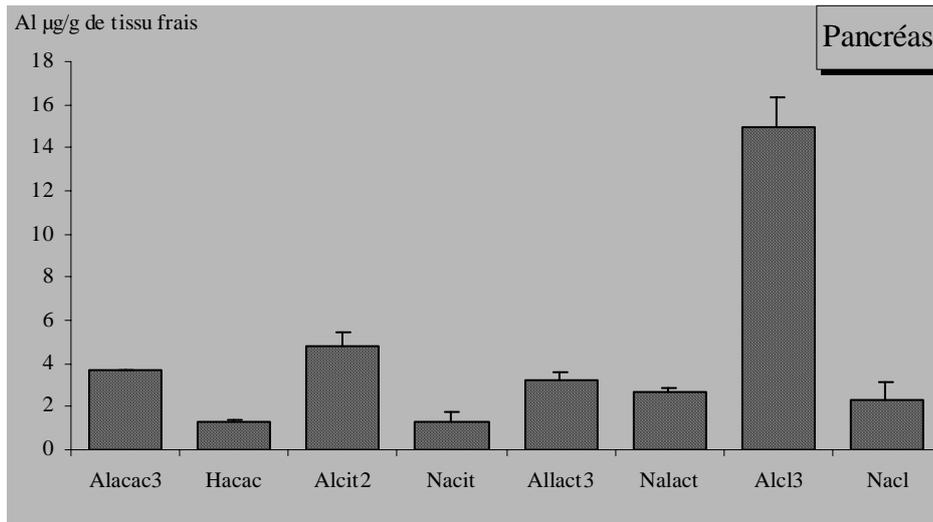


Figure 17 : Concentrations en aluminium ($\mu\text{g/g}$ de tissu frais) dans le pancréas.

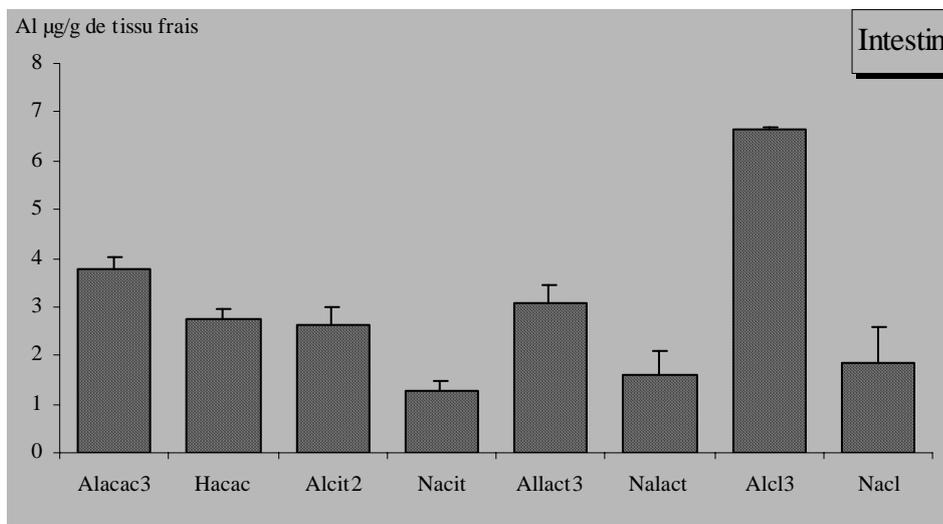


Figure 18 : Concentrations en aluminium ($\mu\text{g/g}$ de tissu frais) dans l'intestin.

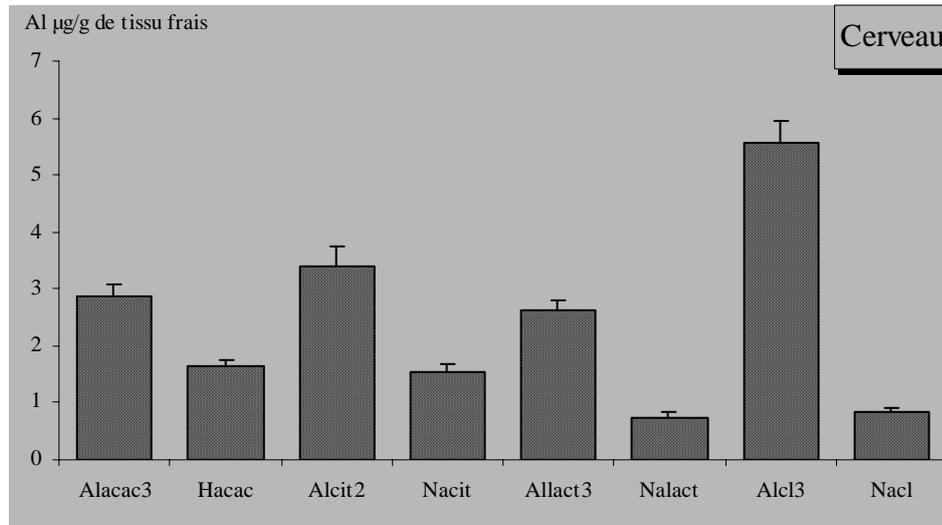


Figure 19 : Concentrations en aluminium (µg/g de tissu frais) dans le cerveau.

Même avec la perfusion nous pouvons voir que la spéciation est importante concernant la distribution du métal dans les différents organes.

En général, la distribution du métal est presque la même que pour le gavage avec cependant deux différences :

- la durée de la perfusion est courte par rapport à celle du gavage
- $AlCl_3$ est plus effectif quand il est introduit directement dans la circulation sanguine.

II-1-2-2-Evolution du débit urinaire

Les valeurs de la moyenne du débit urinaire des 4 périodes témoins et des 4 périodes expérimentales sont représentées dans le tableau IX ci-dessous :

Tableau IX : Valeurs de la moyenne du débit urinaire des 4 périodes témoins et des 4 périodes expérimentales.

	Moyenne du débit urinaire des 4 périodes témoins ($\mu\text{l}/\text{mn}$)	Moyenne du débit urinaire des 4 périodes expérimentales ($\mu\text{l}/\text{mn}$)
$\text{Al}(\text{acac})_3$	$30,66 \pm 0,18$	$144,39 \pm 0,13$
Hacac	$62,13 \pm 0,14$	$140,27 \pm 0,24$
AlCl_3	$23,77 \pm 0,15$	$101,42 \pm 0,05$
NaCl	$55,59 \pm 0,33$	$186,39 \pm 0,22$
$\text{Al}(\text{lact})_3$	$22,24 \pm 0,20$	$143,87 \pm 0,19$
Nalact	$65,55 \pm 0,21$	$125,09 \pm 0,06$
$\text{Al}(\text{cit})_2$	$15,09 \pm 0,12$	$117,34 \pm 0,20$
Nacit	$12,85 \pm 0,26$	$112,85 \pm 0,04$

On remarque d'après le tableau IX que les valeurs du débit urinaire sont relativement faibles pendant les 4 phases témoins (perfusion de NaCl 0,9%) et qu'elles sont beaucoup plus importantes après la perfusion des différents complexes d'aluminium et leurs ligands.

Donc la perfusion de ces derniers a un effet important sur le débit urinaire.

II-2- Discussion sur le gavage

Le degré d'absorption de l'aluminium chez les animaux dépend d'un certain nombre de paramètres, qui comprennent le pH, la spéciation de l'aluminium et des facteurs alimentaires [Partridge & al., 1989]. La quantité d'aluminium absorbée est plus grande à un pH faible qu'à un pH neutre ou élevé [Rodger & al., 1991].

L'absorption de l'aluminium ne semble pas se produire dans l'estomac [Froment & al., 1989] où la plus grande partie de l'aluminium est convertie en une espèce monomérique soluble à un pH faible. Cependant, dans l'intestin, à un pH presque neutre, la plus grande partie de l'aluminium prend une forme insoluble et n'est pas disponible pour être absorbée. La petite portion qui reste disponible pour le transport est la fraction qui a été complexée avec les molécules organiques dans l'estomac, ce qui lui permet de rester soluble au pH plus élevé de l'intestin grêle [Reiber & al., 1995].

L'aluminium qui est solubilisé et dissocié dans les conditions acides de l'estomac va normalement reprecipiter en hydroxyde ou hydroxyphosphates en atteignant l'intestin [Powell & Thompson, 1993]. Cependant, plusieurs acides alimentaires, spécialement le citrate, augmentent l'absorption de l'aluminium à partir du tractus gastro-intestinal [Yokel, 1994] formant vraisemblablement des complexes assez forts pouvant solubiliser des quantités importantes d'aluminium [Molitoris & al., 1989].

Testolin et al (1996) montrèrent que les acides organiques alimentaires possédaient la capacité d'augmenter l'absorption de l'aluminium ainsi que son accumulation dans les tissus.

L'absorption de l'aluminium à travers l'intestin de rat a été étudiée de manière intensive. Il a été montré que le métal était absorbé par diffusion passive [Adler & Berlyne, 1985] ainsi que par transport actif énergie-dépendant [Adler & Berlyne, 1985 ; Cochran & al., 1990].

Whitehead et al (1997) montrèrent que malgré une hydroxypolymérisation de l'aluminium au pH intestinal, l'intestin grêle et le colon, mais non l'estomac, absorbent l'aluminium de manière passive et paracellulaire.

Dans notre expérience, on remarque que l'espèce accumulée par excellence dans tous les tissus sauf l'os correspond à $\text{Al}(\text{cit})_2$. Froment et al (1989) ont suggéré qu'après administration de $\text{Al}(\text{cit})_2$ l'absorption de l'aluminium se produit dans

l'intestin proximal par voie paracellulaire par suite de l'ouverture des jonctions cellulaires.

Pour approfondir l'étude sur l'hypothèse stipulant que le citrate augmente l'absorption de l'aluminium par ouverture des ∇ tight junctions ∇ , Froment et al (1989) effectuèrent des études (Ussing chamber studies) pour déterminer l'effet du citrate d'aluminium, le chlorure d'aluminium et le lactate d'aluminium sur les résistances transmurales des segments proximal et jejunal. Le citrate de sodium et l'EDTA ont été utilisés comme témoins étant donné qu'ils sont connus d'ouvrir les ∇ tight junctions ∇ et de réduire les résistances électriques transmurales des segments proximal et jejunal. Le citrate d'aluminium, mais pas le chlorure ni le lactate d'aluminium, a entraîné une diminution prolongée de la résistance transmurale [Froment & al., 1989] compatible avec l'ouverture des ∇ tight junctions ∇ .

Puisque le citrate est censé ouvrir les ∇ tight junctions ∇ en chélatant le calcium, il était donc nécessaire de déterminer la capacité du citrate contenu dans le citrate d'aluminium à chélater le calcium. Pour cette raison et pour déterminer aussi la capacité des anions du chlorure d'aluminium et du lactate d'aluminium à chélater le calcium, une électrode sélective d'ions calcium a été utilisée. Alors que l'aluminium citrate a eu pour résultat une rapide et presque complète ($99,7 \pm 0,1\%$) chélation de calcium, ni le chlorure ni le lactate d'aluminium n'a donné de résultat significatif [Froment & al., 1989]. Ces données fournissent l'évidence que le citrate accroît l'absorption gastro-intestinale proximale d'aluminium en augmentant sa solubilité et en chélatant le calcium qui rompt les ∇ tight junctions ∇ et permet l'augmentation nette du flux paracellulaire d'aluminium.

Il a été montré que, chez des rats exposés de manière chronique à du $\text{Al}(\text{cit})_2$ et indépendamment de leur fonction rénale intacte, l'aluminium s'accumulait dans différents tissus [Garbossa & al., 1998].

Dans le pancréas et le cerveau on observe une accumulation de toutes les espèces métalliques avec prédominance de $\text{Al}(\text{cit})_2$. Ces deux organes sont probablement

sensibles à toutes les formes chimiques étudiées du métal. Rahnema et Jennings (1999) ont montré que l'ingestion de $\text{Al}(\text{cit})_2$ augmente la concentration de l'aluminium dans le cerveau. En plus, il a été suggéré que la forme chimique de l'aluminium influence fortement sa biodisponibilité [Ogasawara & al., 2002]. La distribution de l'aluminium dans le cerveau a été largement étudiée [Santos & al., 1987 ; Fosmire & al., 1993 ; Van Ginkel & al., 1993 et Sahin & al., 1994]. Le passage de l'aluminium dans le cerveau apparaît être génétiquement dépendant [Fosmire & al., 1993].

Il a été observé par Julka et al (1996) qu'après une exposition aigue et subaiguë à l'aluminium, celui-ci s'accumulait dans toutes les régions du cerveau avec un maximum au niveau de l'hippocampe et qu'il se répartissait de manière variable dans presque tous les tissus du corps. Une étude similaire réalisée sur les souris [Yang & al., 1998] a montré également qu'au niveau du cerveau la majorité du métal s'accumulait dans l'hippocampe.

La barrière hémato-encéphalique étant riche en récepteurs de transferrine permet le passage du métal sous toutes ces formes dans le cerveau étant donné qu'il est considéré comme un organe cible de l'aluminium.

Concernant l'os où la quantité maximale d'aluminium a été observée, il a été montré que celui-ci accumulait l'aluminium avidement. En effet, comme le cerveau, l'os est considéré comme un organe cible du métal car de part sa composition, les phosphates constituent les ligands préférés de l'aluminium.

En ce qui concerne l'administration des différents ligands, on remarque que l'accumulation du métal est faible et provient certainement de la nourriture et de l'eau de boisson. On remarque que le cœur et le foie ne présentaient pas d'accumulation d'aluminium après administration de Nacit, Nalact et NaCl. Comme ces deux organes sont très vascularisés, il est probable que le métal libéré de ces tissus, passe dans le plasma et est capté par d'autres tissus.

Le rein et la rate ne montrent aucune trace du métal. Pour le rein, il est possible que tout le métal soit éliminé avec les urines car les quantités administrées ne sont pas très élevées, alors que pour la rate, comme c'est un organe qui est également très vascularisé, l'aluminium a dû être repris par d'autres organes en passant par le sang.

II-3-Discussion sur la perfusion

L'aluminium n'a pas de fonction physiologique connue et n'est pas considéré comme un composé diététique essentiel. Aujourd'hui, il est connu comme étant un élément pouvant produire des effets adverses sur les systèmes biologiques.

La majorité des études réalisées sur la toxicité de l'aluminium n'a pas prêté suffisamment attention à la spéciation du métal. Il y a une grande différence dans la capacité des différents ligands à solubiliser et à transporter l'ion Al^{3+} aux sites cibles critiques, où une réaction d'échange de ligand se produit pour transférer Al^{3+} aux groupes fonctionnels des molécules cibles. Dans ce sens, certains complexes d'aluminium sont plus toxiques que d'autres [Harris & al., 1996].

Comme discuté par Martin [Martin, 1986], l'aluminium, à cause de sa constante de formation élevée avec la transferrine, le citrate, le phosphate et les hydroxydes, ne peut exister dans le plasma sous une forme libre. Les constantes de formation de l'aluminium avec la transferrine et le citrate sont plus grandes qu'avec les hydroxydes. Ainsi, dans le plasma, l'aluminium existerait essentiellement associé à la transferrine et secondairement au citrate [Alfrey, 1991].

L'accumulation de l'aluminium dans les tissus est attribuée principalement à la liaison du métal à la transferrine et à sa distribution par la suite dans les tissus qui sont riches en récepteurs de transferrine [Edwardson & al., 1991]. L'aluminium se lie à au moins un des deux sites du fer de la transferrine sérique [Trapp, 1983].

Quand l'aluminium est administré aux rats par voie intraveineuse, la spéciation de l'aluminium a un effet majeur sur son excrétion rénale. L'aluminium administré

sous forme de citrate est excrété de manière plus importante que celui administré sous forme de chlorure ou de sulfate [Lote & al., 1995 et Spencer & al., 1995].

En effet, dans notre expérience, $AlCl_3$ est l'espèce accumulée dans tous les tissus avec le niveau le plus élevé dans le pancréas. Le niveau le plus faible se trouvant dans le foie, ce qui est probablement dû à une excrétion biliaire. En effet, il a été suggéré que l'aluminium absorbé, acheminé au foie par la circulation portale, était rapidement éliminé dans la bile [Jessica & al., 1996].

Sutherland et Greger (1998) ont suggéré que le foie était capable de sécréter dans la bile de petites quantités d'aluminium alimentaire absorbé mais que les reins restent les organes excréteurs principaux pour l'aluminium quand la capacité sécrétrice du foie est dépassée.

Dans notre étude, on a constaté que le rein et la rate ne présentaient aucune trace du métal, alors que d'autres travaux ont montré que l'aluminium s'accumulait de manière importante dans le rein [Wills & al.,1993 ;Sahin & al., 1994 ; Walker & al., 1994; Spencer & al., 1995 et Zafar & al.,1997] ainsi que dans la rate [Domingo & al., 1991 ; Julka & al., 1996 et Zafar & al., 1997].

Cette absence du métal dans le rein est probablement due au fait que l'aluminium est éliminé de manière importante dans les urines car comme il est indiqué dans le tableau IX le débit urinaire augmente de manière très significative au cours des quatre périodes expérimentales.

Des études réalisées sur la liaison entre les protéines et l'aluminium confirment la suggestion que l'élimination rénale de l'aluminium est dépendante du degré d'aluminium lié. Il est proposé qu'à faible charge d'aluminium dans le plasma, les reins possèdent la faculté de l'éliminer de manière efficace [Hohr & al., 1989].

Dans les tissus de rats auxquels on a administré différents ligands d'aluminium on observe une accumulation du métal, sauf au niveau du cœur et du foie où aucune trace d'aluminium n'est décelée après administration de Nacit, Nalact et NaCl.

Cette accumulation du métal dans les tissus provient probablement de la nourriture et de l'eau de boisson que consommaient les animaux avant l'expérience.

II-4-Conclusion

La distribution de l'aluminium dans les tissus, aussi bien pour le gavage que pour la perfusion, dépend des espèces chimiques utilisées et de la voie d'administration.

On peut donc dire que l'administration orale comme voie d'exposition à l'aluminium peut résulter en des accumulations divergentes du métal dans les tissus dont la concentration dépend de la forme chimique.

Quand l'aluminium est administré par voie intraveineuse, et bien que la durée soit relativement courte, les quantités d'aluminium accumulées dans les différents organes sont plus élevées que quand le métal a été administré oralement.

PARTIE III

EVALUATION DE LA CONCENTRATION DE LA MALONDIALDEHYDE (MDA) CHEZ LES SOURIS TRAITEES PAR L'ALUMINIUM : EFFET SYNERGIQUE DU FER ET DE L'ALUMINIUM SUR LA PRODUCTION DES RADICAUX LIBRES

III-1-Résultats

III-1-1-Les liposomes de phospholipides purs

La mesure de la production des radicaux libres dans les systèmes biologiques a été obtenue par le test de l'acide tiobarbiturique qui évalue la formation de MDA produite durant les processus oxydatifs.

Le premier modèle adopté est celui des liposomes de L- α -lecithine. La figure 20 montre qu'en présence de Fe^{2+} , la production de MDA est proportionnelle à la quantité de liposomes présents dans l'essai. Comme on peut le noter dans la figure 21, l'ion métallique agit comme un catalyseur indispensable à la formation de MDA. La concentration de MDA augmente avec l'augmentation de la concentration de Fe^{2+} jusqu'à la valeur de 0,08 mM de $FeSO_4$, valeur au delà de laquelle on n'observe aucune augmentation. En absence de Fe^{2+} , les niveaux d'aluminium sont en effet négligeables et dus essentiellement à la présence de traces du métal contaminant les réactifs.

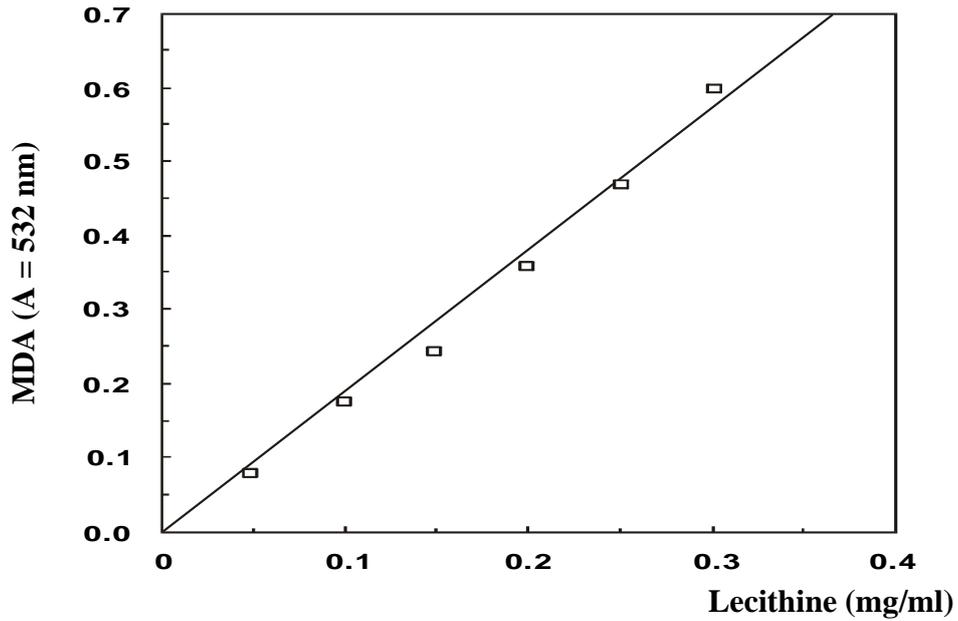


Figure 20 : Mesure de la concentration de la MDA des liposomes de L- α -lecithine en fonction de la concentration en phospholipides.

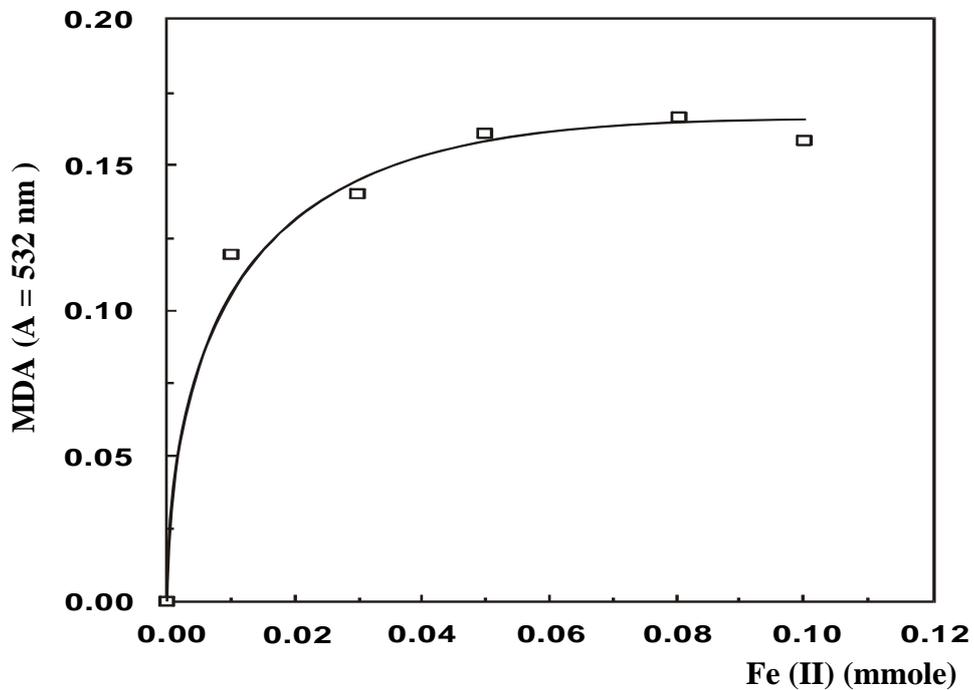


Figure 21 : Mesure de la concentration de la MDA des liposomes de L- α -lecithine en fonction de la concentration en fer.

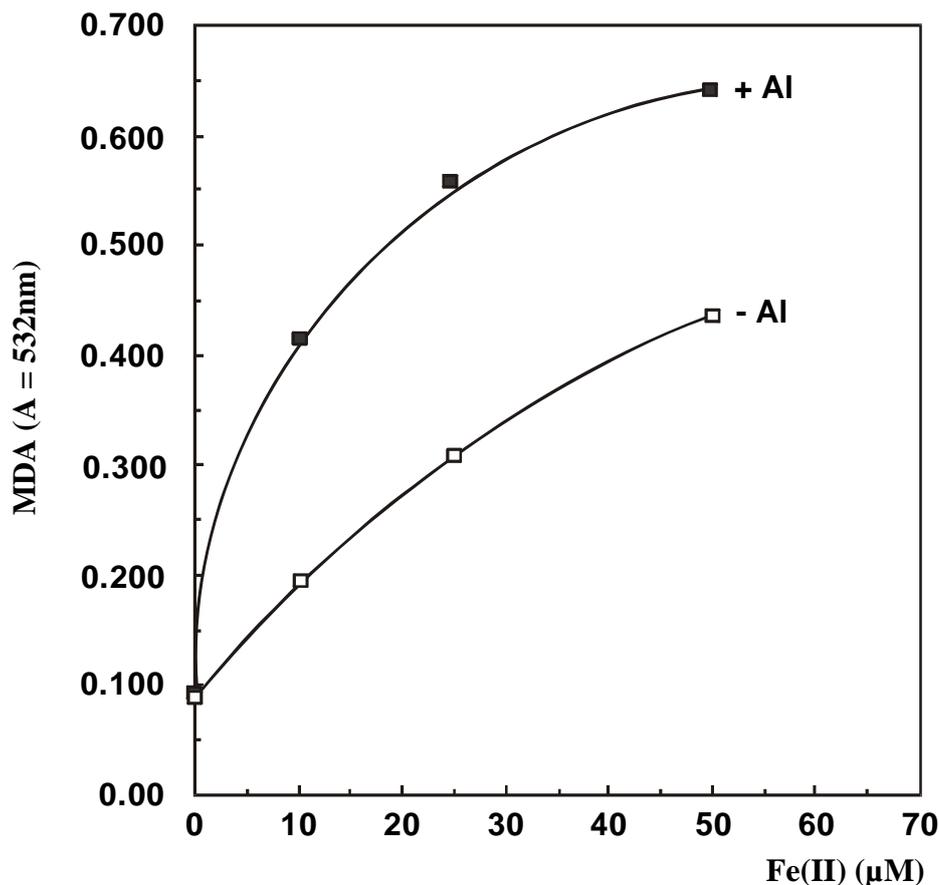


Figure 22 : Mesure de la concentration de la MDA des liposomes de L- α -lecithine en fonction de la concentration en fer en présence et en absence d'Aluminium.

La figure 22 montre que la présence de Al^{3+} augmente considérablement la production de MDA.

III-1-2-Homogénat de cerveau de souris

L'homogénat de cerveau de souris a également servi de modèle dans la détermination de la peroxydation lipidique de la part des ions Fe^{2+} et Al^{3+} .

La figure 23 montre que Al^{3+} contribue de manière importante dans la formation des radicaux libres.

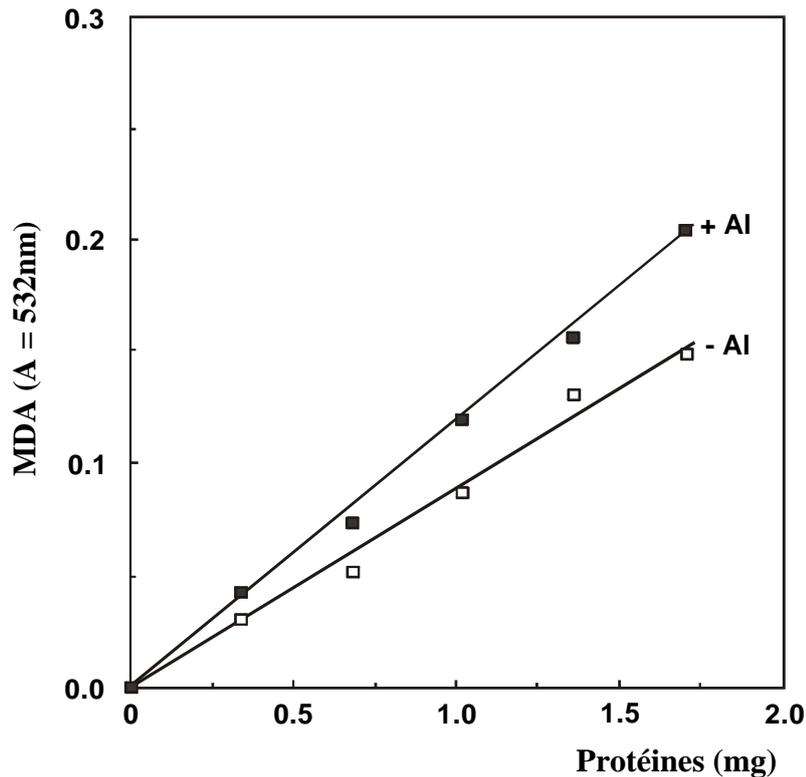


Figure 23 : Mesure de la concentration de MDA en fonction de concentrations croissantes de protéines d'homogénat de cerveau de souris en présence et en absence d'Aluminium.

III-2-Discussion

Plusieurs études ont montré que l'aluminium accroît la peroxydation lipidique du cerveau qui est une forme de dommage oxydatif. L'exposition alimentaire à l'aluminium augmente le taux de peroxydation lipidique du cerveau des poussins, des souris et des rats [Ohtawa & al., 1983 ; Fraga & al., 1990 et Chainy & al., 1993].

Oteiza et al (1993) ont démontré que Al(III) possède à la fois une activité pro et anti-oxydante à travers les membranes cellulaires dépendante de la concentration en fer. Il a été suggéré que le mécanisme de l'action pro-oxydante de l'aluminium à travers son interaction à l'intérieur des membranes, produit des changements

subtils dans le réarrangement des lipides qui peuvent augmenter la disponibilité des acides gras à l'attaque des radicaux libres ou faciliter la propagation de la peroxydation lipidique.

Cette propriété est de grande importance car l'aluminium, comme les autres ions métalliques, s'accumule dans l'encéphale au fil des années au cours desquels on enregistre dans le cerveau des altérations distinctes que ce soit dans les phénomènes oxydatifs qu'inflammatoires. Quelques fois, ces facteurs peuvent représenter le facteur déchaînant, sinon l'élément aggravant certaines conditions neuropathologiques. Ces dernières années on a prêté plus d'attention à l'hypothèse etiopathogénétique liée à la production des radicaux libres en rapport avec les maladies telle que la maladie de Parkinson.

Toda et al (1998) ont démontré sur l'homogénat de cerveau de souris que l'aluminium accélère la peroxydation lipidique induite par le fer. Les modifications protéiques oxydatives causées par les ions ferreux et/ou d'aluminium sont augmentées à concentrations élevées et supprimées à faibles concentrations d'ions aluminium. Cette dernière observation suggère un rôle biologique possible de l'aluminium comme anti-oxydant. Ils ont également démontré que l'interaction entre Al(III) et Fe(II) peut faciliter les dommages oxydatifs des lipides et des protéines dans le cerveau, conduisant ainsi aux enchevêtrements neurofibrillaires typiques de MA [Toda & al ; 1998].

Les radicaux libres sont impliqués dans la MA. La probabilité de cette implication est soutenue par le fait que les neurones sont extrêmement sensibles à l'attaque des radicaux libres destructeurs [Christen, 2000].

Les expériences réalisées dans ce travail ont permis de mettre en évidence quelques effets produits par l'aluminium sur les membranes soit comme facteur direct du déséquilibre soit comme facteur indirect dans la production de radicaux libres.

En effet, les expériences sur les liposomes montrent qu'à l'augmentation de la concentration d'aluminium correspond une augmentation de la production de MDA

utilisée comme mesure de la peroxydation lipidique. Toutefois, l'aluminium à lui seul n'est pas capable de peroxyder les lipides ; il a seulement un effet indirect à travers la désorganisation de la double couche lipidique qui permet une agressivité majeure des éléments de transition comme le fer.

Il a été trouvé que les ions Al^{3+} ne pouvaient pas eux mêmes stimuler la peroxydation lipidique à cause de leur nombre d'oxydation (III) qui est fixe ; donc il ne peut participer dans les réactions d'oxydo-réduction et conduire à la formation de radicaux. Les sels d'aluminium ne stimulent pas la peroxydation des phospholipides des liposomes, mais accélèrent fortement la peroxydation induite par les sels de fer [Gutteridge & al., 1985].

Les données expérimentales démontrent que non seulement le fer est un catalyseur des processus oxydatifs mais aussi que l'aluminium pourrait avoir une importante action synergique dans la stimulation de la production des radicaux libres, agissant comme déstabilisateur des membranes biologiques.

En outre, il a été observé aussi bien dans les modèles qui utilisent les liposomes préparés à partir des phospholipides purs que ceux de l'homogénat de cerveau de souris, que la présence concomitante de l'aluminium et du fer dans les modèles adoptés révèle une importante augmentation de la production de radicaux libres exprimée en concentration de MDA. L'effet de l'aluminium associé au fer ne laisse pas de doute sur la toxicité potentielle de cet élément comme cofacteur dans la production des radicaux libres.

PARTIE IV

EFFET DE L'ALUMINIUM SUR L'ACTIVITE DE L'ACHÉ

IV- 1- Résultats

IV-1-1- Expériences *in vivo*

Notre étude montre que Al(III) est un puissant activateur de l'AChE. La figure 24 montre l'activité de l'AChE dans les homogénats de cerveaux de souris en fonction de la concentration en protéines.

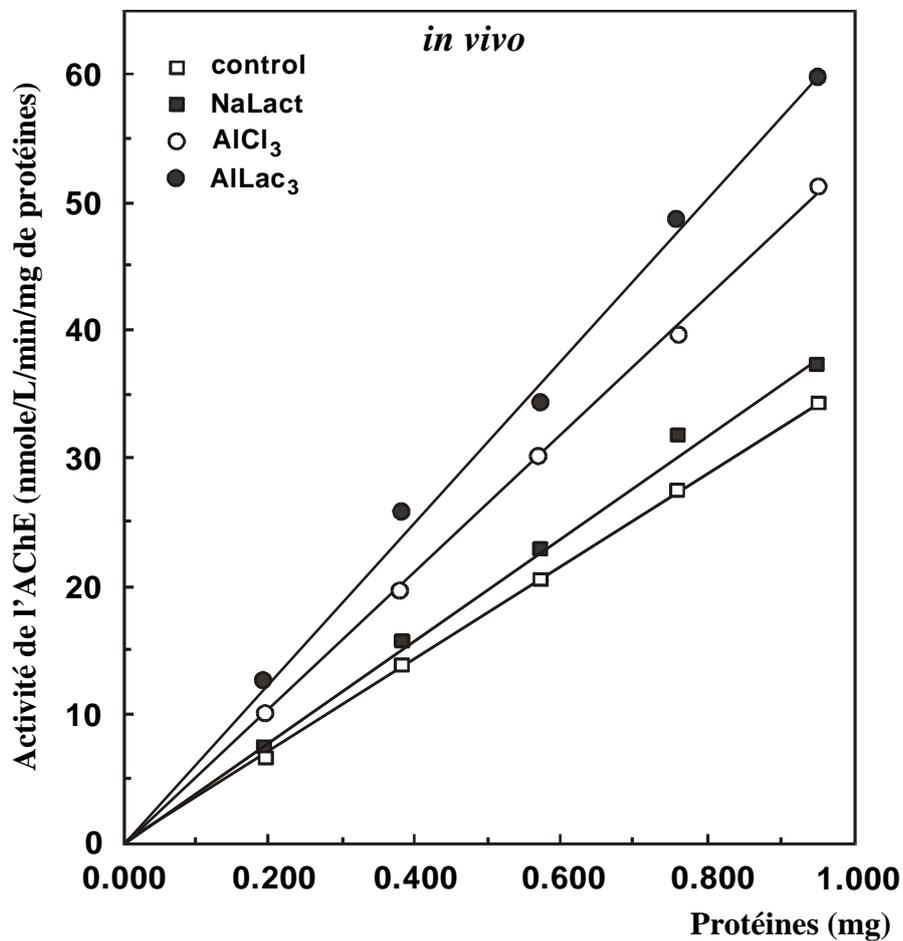


Figure 24 : Analyse de l'activité de l'AChE dans les homogénats de cerveaux de souris traitées avec du AlCl₃ et du Al(lact)₃ et de souris témoins en fonction de la concentration en protéines.

Une augmentation de l'activité de l'AChE a été trouvée dans les homogénats de cerveaux préparés à partir d'animaux traités par voie orale par AlCl_3 ou $\text{Al}(\text{lact})_3$, pendant trois mois.

$\text{Al}(\text{lact})_3$ a apparemment un effet stimulateur plus important que AlCl_3 . L'effet activateur de $\text{Al}(\text{III})$ sur l' AChE était aussi dépendant du temps comme indiqué sur la figure 25 qui montre l'activité de l'AChE dans les homogénats de cerveaux préparés après un et trois mois de traitement.

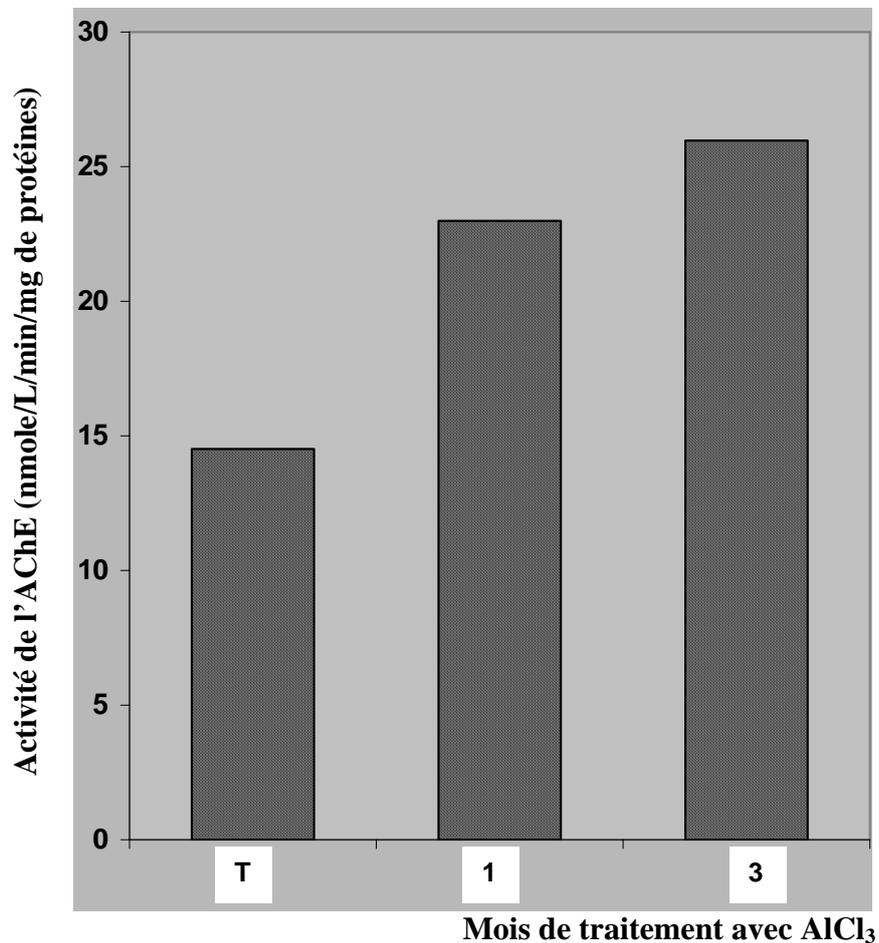


Figure 25 : Activité de l'AChE dans les homogénats de cerveaux de souris après traitement oral d'un mois et trois mois avec du AlCl_3 et de souris témoins (T).

La figure 26 montre le graphique de Lineweaver-Burk obtenu à partir d'analyses de l'AChE dans les homogénats de cerveaux de souris après trois mois de traitement *in vivo* avec du AlCl_3 et $\text{Al}(\text{lact})_3$. Le traitement avec le métal produit une variation appréciable du K_m de $2,5\mu\text{mol} / \text{L}$ chez les témoins à $1,16\mu\text{mol} / \text{L}$ et $1,0\mu\text{mol} / \text{L}$ après traitement respectivement avec AlCl_3 et $\text{Al}(\text{lact})_3$. La V_{max} est de $5,8\mu\text{mol} / \text{min}$ aussi bien chez les témoins qu'après traitement avec AlCl_3 et $\text{Al}(\text{lact})_3$.

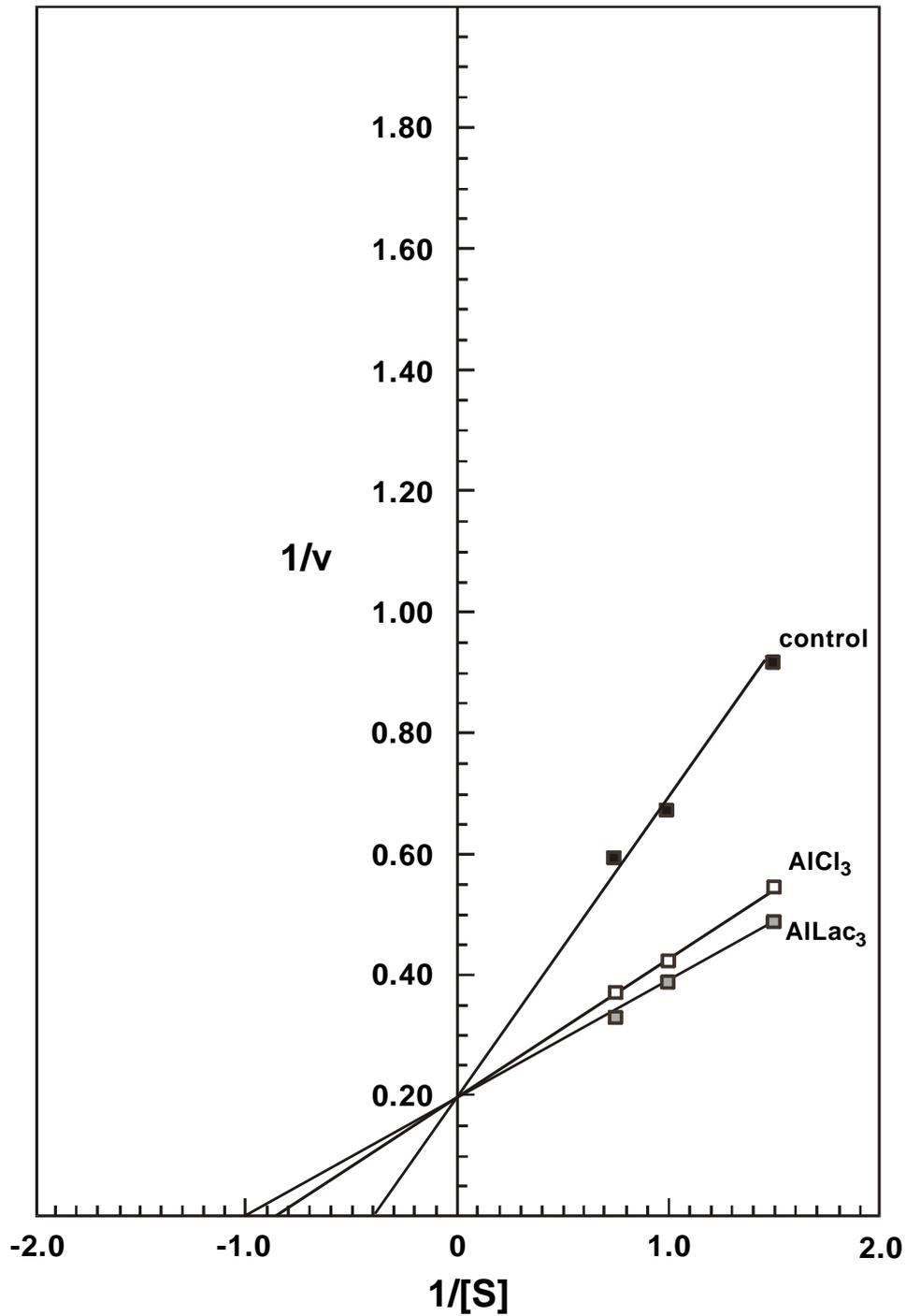


Figure 26 : Courbe de Lineweaver-Burk de l'AChE d'homogénats de cerveaux de souris après trois mois de traitement oral avec AlCl₃ et Al(lact)₃.

Témoins : Km = 2,5 µmole

Vmax = 5,8 µmole/min

AlCl₃ : Km = 1,16 µmole

Vmax = 5,8 µmole/min

Al(lact)₃ : Km = 1,0 µmole

Vmax = 5,8 µmole/min

IV-1-2- Expériences *in vitro*

Sur la figure 27, Al(III) montre un effet activateur sur l'AChE également dans les essais *in vitro*. Cette figure montre l'effet activateur de Al(III) qui est fonction de la concentration des ions du métal et démontre que l'effet de la spéciation du métal était plus évident quand le traitement a été appliqué *in vitro* sur les homogénats de cerveaux. Ce qui est intéressant, c'est que les espèces les plus hydrolysables montrent l'effet activateur le plus bas. Les deux courbes atteignent un plateau à la concentration d'Al(III) la plus élevée utilisée dans les essais.

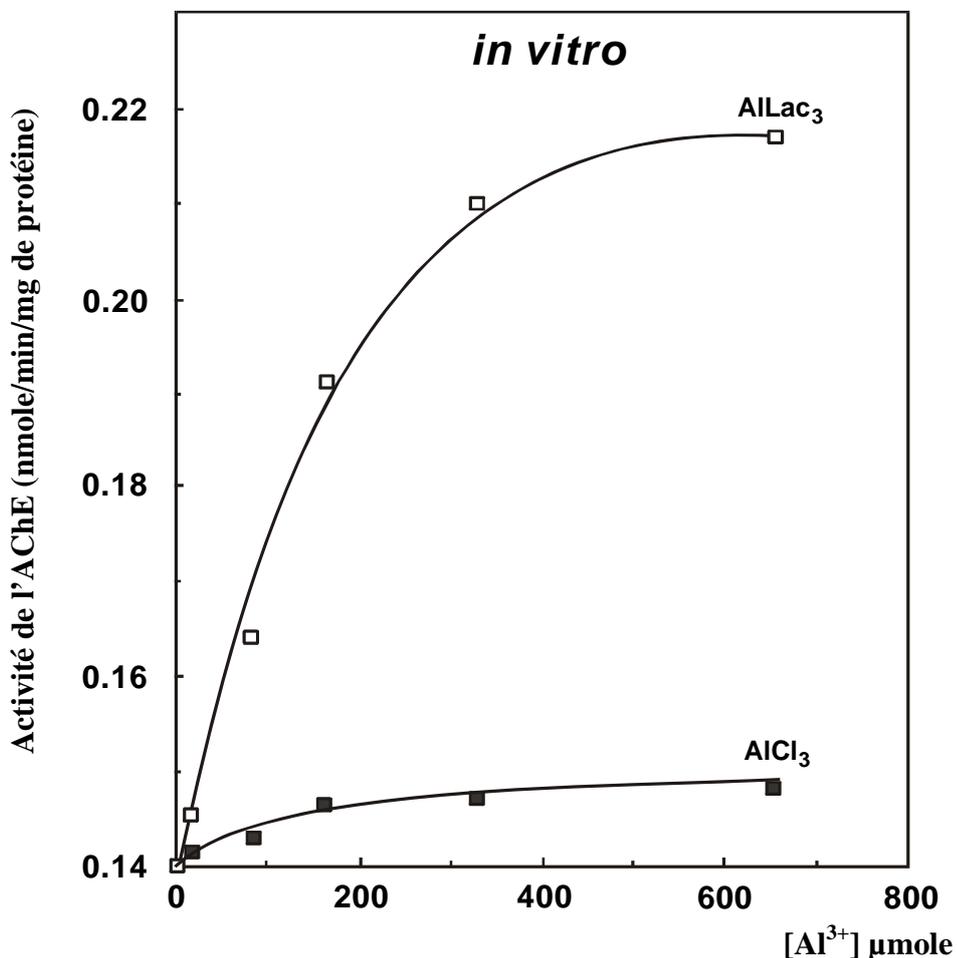


Figure 27 : Evaluation de l'activité de l'AChE dans les homogénats de cerveaux de souris après traitement *in vitro* en fonction de la concentration d'aluminium (AlCl₃ et Al(lact)₃).

Ces résultats sont en accord avec des études ultérieures [Singer & al., 1990 et Zatta & al., 1994] et suggèrent que la capacité de Al(III) de moduler l'activité de AChE est fortement dépendante non seulement de la concentration des ions métalliques mais aussi des espèces chimiques présentes [Zatta & al., 1994].

La figure 28 représente le graphique de Lineweaver-Burk de l'AChE mesurée par incubation d'homogénats de cerveaux de souris en présence et en absence d'Al(lact)₃ et AlCl₃.

Conformément aux résultats de *in vivo* décrits ci-dessus, le traitement par le métal *in vitro* produit une variation appréciable du Km de 2,5 μmol / L chez les témoins à 0,61 μmol/ L et 0,46 μmol/ L après traitement respectivement par AlCl₃ et Al(lact)₃ ; la valeur de Vmax 5,8 μmol / min n'a pas été affectée par le traitement avec l'un ou l'autre des composés d'aluminium. Aussi, dans ce cas, l'effet activateur était plus prononcé avec Al(lact)₃. La comparaison des graphiques de Lineweaver-Burk montre que, tandis que les cinétiques *in vitro* suivent l'équation typique d'un inhibiteur mixte, *in vivo* l'équation est caractéristique d'une inhibition compétitive.

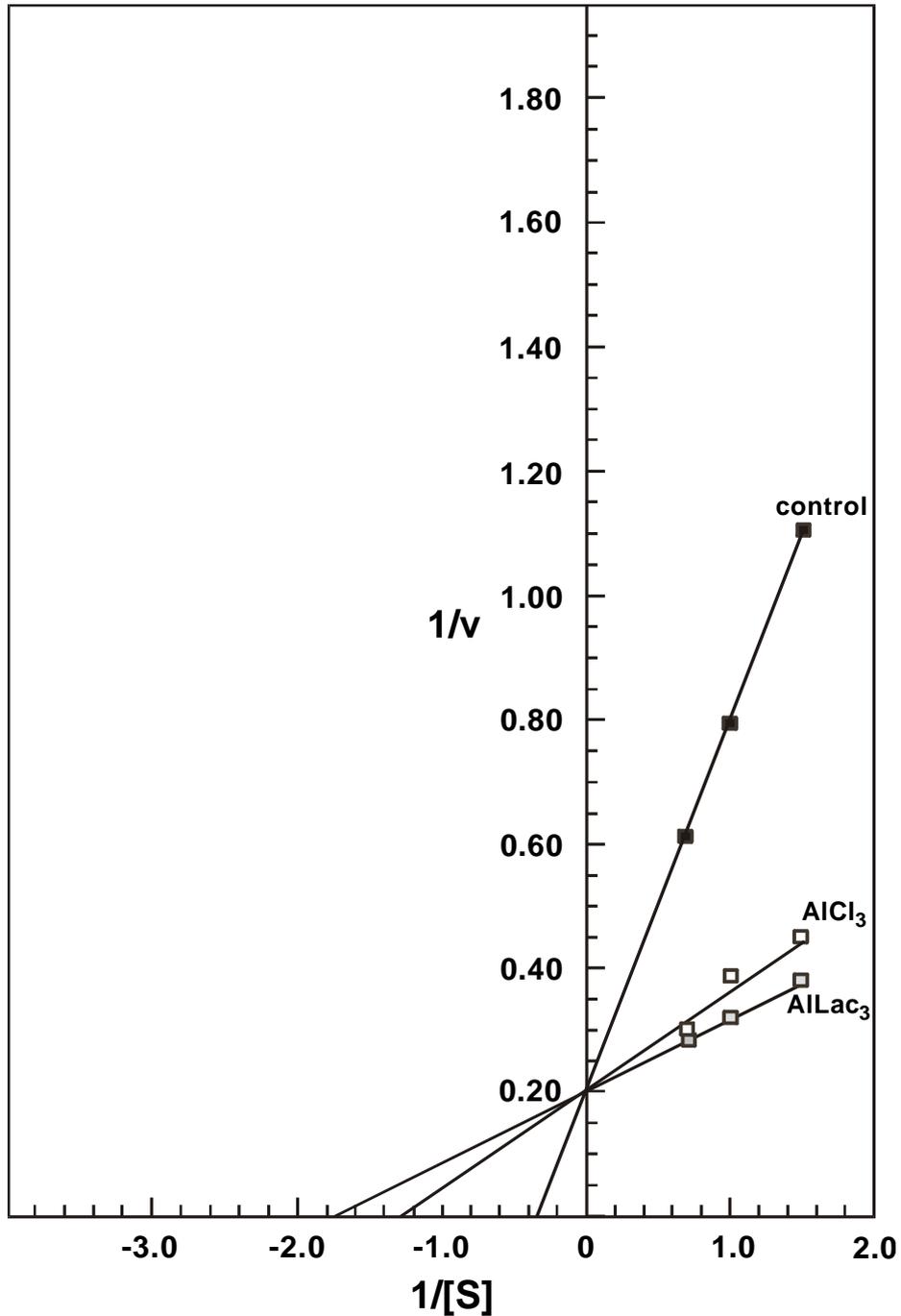


Figure 28 : Courbe de Lineweaver-Burk de l'activité de l'AChE dans les homogénats de cerveaux de souris incubés *in vitro* en présence et en absence d'AlCl₃ et d'Al(lact)₃.

Témoins : Km = 2,5 µmole

Vmax = 5,8 µmole/min

AlCl₃ : Km = 0,61 µmole

Vmax = 5,8 µmole/min

Al(lact)₃ : Km = 0,46 µmole

Vmax = 5,8 µmole/min

La Tacrine est connue comme étant un puissant inhibiteur de l'AChE. Aussi nous avons comparé en réalisant des expériences *in vivo* et *in vitro*, les effets de la tacrine et d'Al(III) sur l'activité de l'AChE. La figure 29 montre que la tacrine exerce un puissant effet inhibiteur aussi bien *in vivo* que *in vitro* et abolit complètement l'effet activateur de Al(III). Au contraire, la Desferroxamine (DFO), connue étant un agent chélateur de Me^{3+} , n'a pu réduire l'effet activateur produit par l'ion métallique.

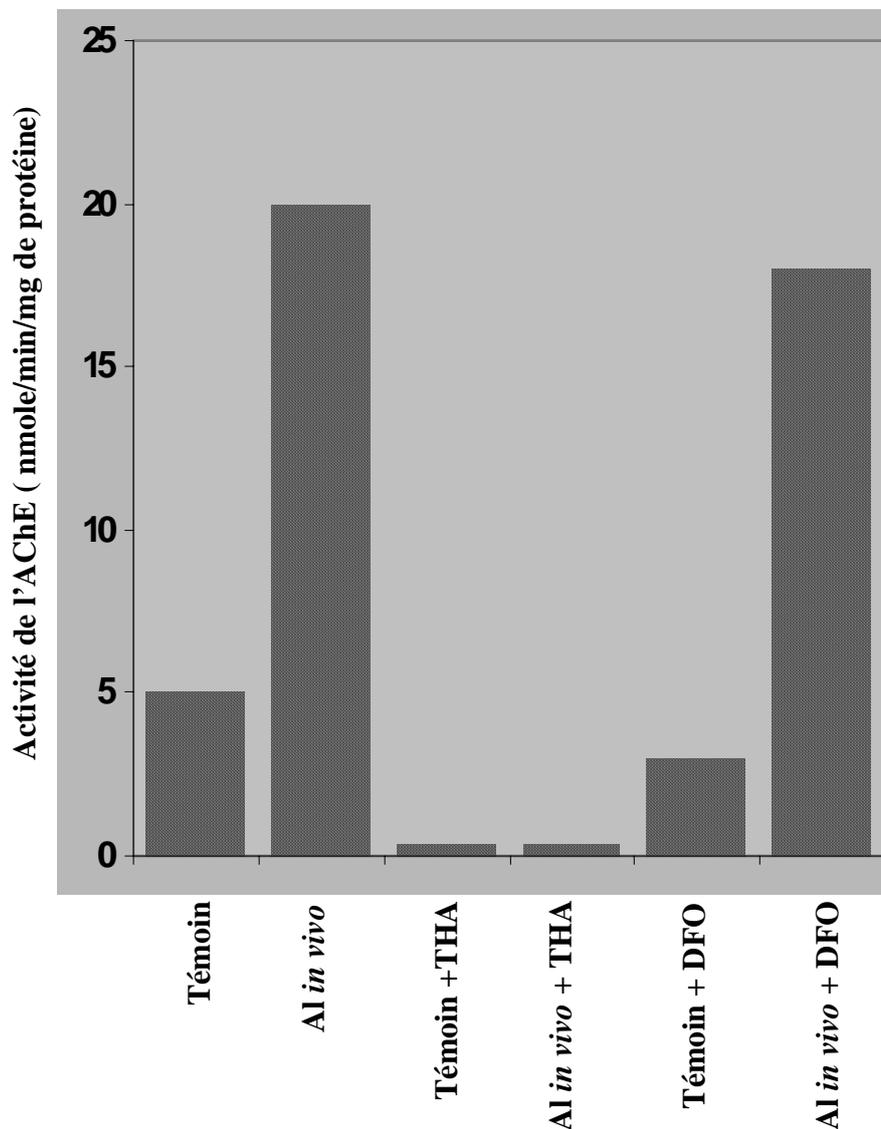


Figure 29 :Effets de la Tacrine (THA) (1 μ M), Al(lact)₃ et DFO (1mM) sur l'activité de l'AChE par rapport aux témoins.

Al *in vivo* : animaux traités par voie orale pendant trois mois avec Al(lact)₃.

IV-2- Discussion

Les effets neurotoxiques de Al(III) ont été étudiés au niveau de divers modèles biologiques. En particulier, l'effet de l'ion métallique sur l'activité de l'AChE, a été étudié aussi bien *in vivo* que *in vitro*. Cependant, les résultats sont controversés, comme l'activation observée par certains auteurs [Perry & al., 1978 ; Peng & al., 1992 ; Bilkei, 1993 et Zatta & al., 1993] ne coïncide pas avec l'inhibition reportée par d'autres [Gulya & al., 1990 et Julka & al., 1995].

Ces résultats contradictoires reflètent très probablement l'utilisation dans les essais de protocoles analytiques et des espèces métalliques mal définis.

Cette étude montre que l'activation de l'AChE est plus importante *in vivo* que *in vitro*. De plus, les essais *in vitro* révèlent que AlCl₃ et Al(lact)₃, qui représentent deux espèces chimiques différentes d'aluminium avec des caractéristiques chimiques et des constantes de stabilité différentes, donnent des résultats différents qualitativement et quantitativement.

Cette différence d'activité indique que la spéciation de Al(III) pourrait jouer un rôle pertinent dans la production d'effets toxicologiques et fournit une idée de la complexité d'établir *in vivo* l'interaction de l'aluminium avec de potentielles molécules cibles.

La littérature scientifique relate de nombreux exemples d'effets biologiques produits par Al(III). Par exemple, les études réalisées sur le singe révèlent des effets sur la physiologie du cerveau après exposition chronique à l'aluminium comprenant la modification de la composition des lipides et de l'activité de diverses enzymes associées à la membrane ; l'aluminium provoque une diminution significative de la concentration des lipides totaux, glycolipides et phospholipides du cerveau du primate [Sarin & al., 1997]. De plus le cholestérol et le rapport cholestérol / phospholipides ont nettement augmentés ce qui témoigne d'une perte importante de l'intégrité de la membrane et par conséquent un effet significatif de l'aluminium sur

l'activité et la fonction de nombreuses enzymes associées à la membrane dont l'AChE [Sarin & al., 1997].

Dans la maladie d'Alzheimer (MA), la dégénérescence et la perte des neurones cholinergiques du *nucleus basalis* de Meynert ont été documentées dans de nombreuses études. La corrélation entre l'activité anormale de la cholinestérase et MA apparaît être propre à cette maladie, car une telle anomalie n'a pas été observée dans d'autres neuropathologies telles que la démence multi-infarctuelle, la schizophrénie ou la dépression [Atack & al., 1983]. Dans MA, l'expression de l'AChE est substantiellement altérée et son activité est basse dans la majorité des régions du cerveau. Cependant, l'activité de l'AChE est augmentée à l'intérieur et autour des plaques d'amyloïde [Sberna & al., 1998]. En outre, le rapport possible entre la perte des neurones cholinergiques et la formation des plaques séniles associées à MA semble indiquer que les changements dans l'innervation corticale, qui provient des neurones du *nucleus basalis* de Meynert, sont des caractéristiques importantes dans la formation des plaques séniles [Arendt & al., 1984].

L'association entre la production élevée d'AChE et la formation de plaques d'amyloïde observées dans un cerveau humain en dégénérescence, avec des déficiences cognitives progressives, a été appuyée par des observations faites sur des modèles d'animaux AChE transgéniques [Grisaru & al., 1999]. Il a été démontré que l'AChE stimule l'agrégation de $\beta A4_{(1-40)}$ dans les fibrilles d'amyloïde. Les complexes stables d'AChE- $\beta A4_{(1-40)}$ ont été découverts comme étant plus toxiques que ceux qui ne contiennent pas d'enzyme [Munoz & al., 1999].

Par ailleurs, dans MA, l'association putative entre l'accumulation de l'AChE dans les plaques d'amyloïde et le développement des déficits cognitifs a inspiré plusieurs études sur l'utilité possible des inhibiteurs de l'AChE dans le traitement pharmacologique pour augmenter les fonctions cholinergiques, lesquels pourtant ont donné des résultats modestes.

La tacrine, un inhibiteur très connu de l'AChE paraît améliorer la fonction cognitive ; cependant ses effets adverses pourraient limiter son usage pratique. Ainsi, ce produit paraît être le meilleur ; aussi il est efficace pour une courte période et seulement au début de la manifestation de la pathologie. La tacrine inhibe l'activité de l'AChE même quand l'enzyme a été activée par Al(III).

Inversement, DFO est totalement inefficace sur l'activité de l'AChE, très probablement parce que cette molécule chélatrice de Me^{3+} est incapable d'atteindre les sites actifs ou même le site périphérique de l'AChE où probablement Al^{3+} pourrait être attaché [Zatta & al., 1993].

La majeure activité de l'AChE du corps n'est pas associée aux neurones cholinergiques ou leurs terminaisons. Ceci suggère que l'AChE pourrait hydrolyser d'autres substrats en plus de l'acétylcholine [Small, 1990], et rend l'activation de l'AChE par Al(III) encore plus applicable d'un point de vue pathologique. En effet, l'AChE a été observée possédant une activité protéasique et partage les séquences homologues d'acides-amino en trypsine-endopeptidases et serine carboxypeptidase.

En conclusion, l'effet stimulateur de l'aluminium sur l'activité de l'AChE, le pouvoir de l'ion métallique à agréger l'amyloïde, l'activité protéolytique putative de l'AChE contre la protéine précurseur de l'amyloïde et sa capacité d'accélérer le rassemblement de $\beta A4$ dans les fibrilles de MA, tout ceci pourrait donner lieu à un complexe synergique d'événements aggravant l'évolution de cette pathologie.

PARTIE V

EFFET DE L'ALUMINIUM SUR L'ACTIVITE DE LA DBH

V-1- Résultats

L'étude des paramètres cinétiques de la DBH, en présence et en absence d'aluminium, ont démontré que cet ion métallique a un puissant effet inhibiteur sur l'activité de cette enzyme.

La figure 30 montre le taux de la réaction enzymatique comme une fonction de la concentration en protéines, en présence et en absence d'aluminium. La vitesse de la réaction, exprimée en pmol/min de méthylphényléthylamine produite soit en présence soit en absence d'aluminium, a été nettement réduite en présence de l'ion métallique.

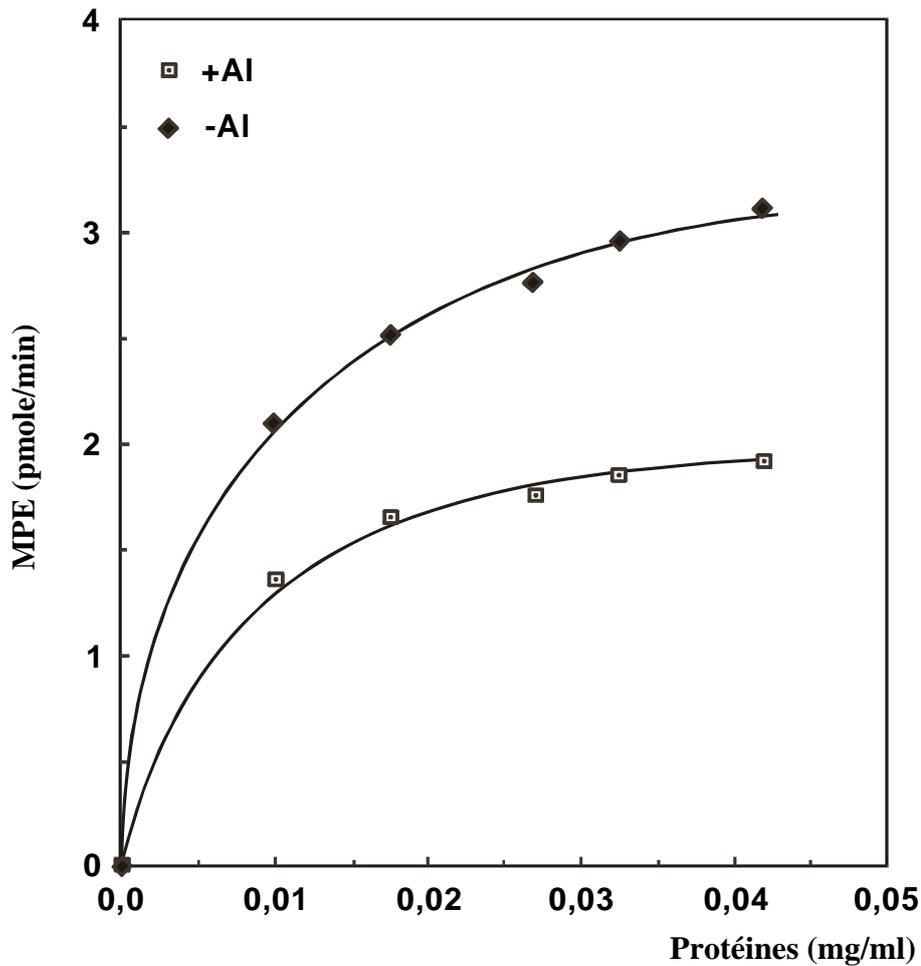


Figure 30 : Vitesse de la réaction de la DBH en fonction de la quantité d'enzyme en présence et en absence d'Al(lact)₃.

Le diagramme de Lineweaver-Burk illustré en figure 31, montre les caractéristiques de cet effet inhibiteur. En absence d'aluminium, les valeurs du K_m et du V_{max} sont respectivement de 2,56 mM et 4,12 pmol/min. En présence d'aluminium, le K_m atteint une valeur de 3,85 mM, alors que celle de la V_{max} décroît jusqu'à 2,86 pmol/min. L'inhibition de l'aluminium était de type mixte, où apparemment les complexes enzyme et enzyme-substrat ont été affectés par l'ion métallique.

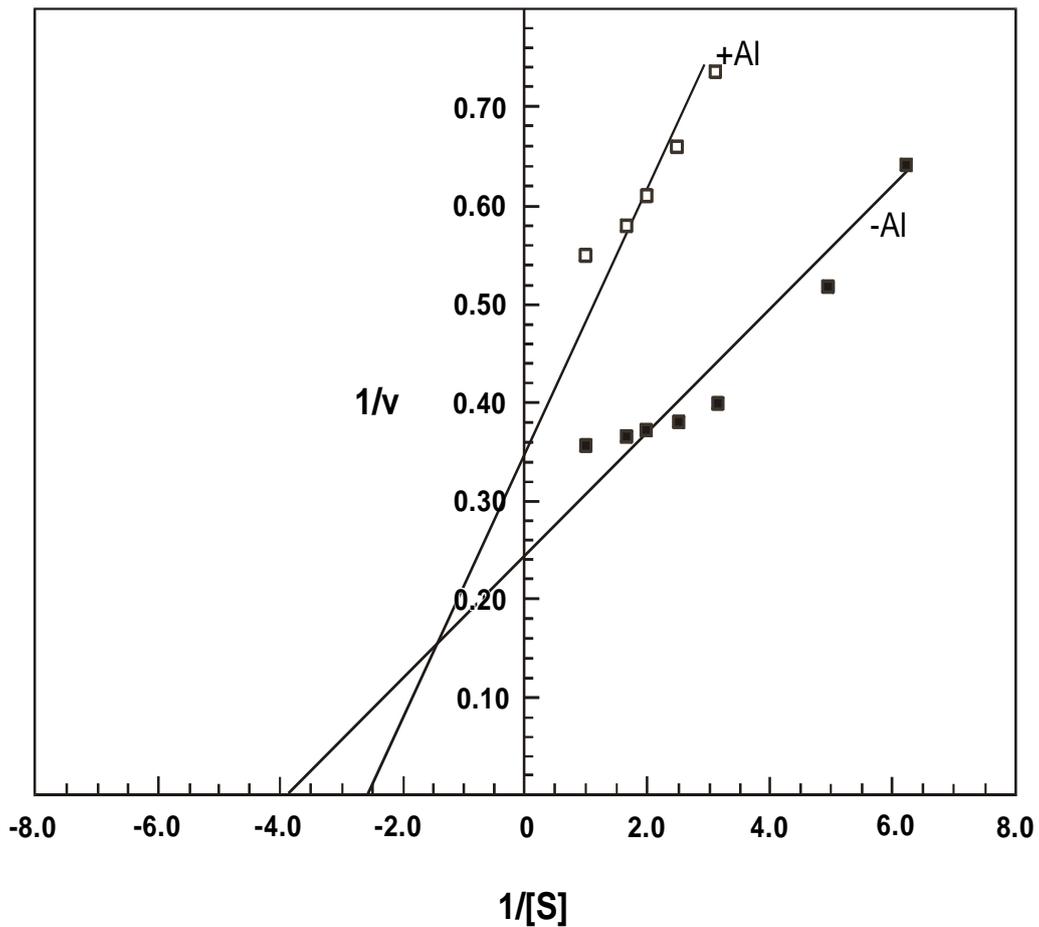


Figure 31 : Courbe de Lineweaver-Burk de la DBH calculée à partir de différentes concentrations de substrat (Phenyléthylamine) en présence et en absence d'Al(lact)₃.

-Al : Km = 2,56 mM

Vmax = 4,12 pmole/min

+Al : Km = 3,85 mM

Vmax = 2,86 pmole/min

V-2- Discussion

Il est établi aujourd'hui que l'aluminium est toxique et qu'il est impliqué comme facteur étiologique dans de nombreuses manifestations neuropathologiques. Cependant, les mécanismes moléculaires qui sont à l'origine de la toxicité de ce métal sont encore très peu compris. Il a été observé que l'aluminium s'accumulait dans certaines maladies neurodégénératives telles que la sclérose amyotrophique

latérale, la démence de Guam [Perl & al., 1982 et Garruto & al., 1984], la maladie de Parkinson [Yasui & al., 1992], la maladie d'Alzheimer [Crapper & al., 1976], la démence des dialysés [Alfrey, 1976] et autres.

La DBH qui catalyse la conversion de la dopamine en noradrénaline, est contenue dans des granules de sécrétion qui emmagasinent les catécholamines. L'activité et la concentration de cette enzyme sont déterminées génétiquement ; l'activité enzymatique de la DBH augmente progressivement de la troisième à la huitième décennie de la vie, puis subit une baisse prononcée à partir de la neuvième décade [Miyata & al., 1984] ; un déclin de la DBH a été également observé chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer [Nakamura & al., 1984].

Dans la maladie de Parkinson, le changement neurochimique le plus remarquable est la déficience de la dopamine nigrostriatale. Ceci peut être en rapport avec les changements de la concentration en Fe^{3+} qui est deux fois plus élevée dans la substance noire (*pars compacta*) que chez les témoins, tel qu'il a été démontré par microanalyses à énergie-dispersive et rayons X. Une telle augmentation en Fe^{3+} pourrait conduire à la production de radicaux libres destructeurs.

Par ailleurs, il a été montré que l'activité de la DBH, qui est un marqueur de l'activité noradrénergique centrale, était approximativement de 41% plus faible dans les échantillons de liquide cérébro-spinal de patients atteints de la maladie de Parkinson par rapport aux témoins [Hurst & al., 1985]. Il a été observé que, chez les malades parkinsoniens, l'accumulation d'aluminium atteint les niveaux les plus élevés dans la substance noire, le *caudate nucleus* et le *globus pallidus*, ainsi que des concentrations significatives dans la matière grise et les ganglions basales [Jellinger & al., 1992]. Il a été montré que, dans la dégénérescence du système nerveux central et la maladie de Parkinson, les concentrations élevées d'aluminium sont souvent associées à de faibles niveaux de magnésium ; ce qui suggère que l'aluminium pourrait représenter un cofacteur qui a un rapport avec l'etiopathogénèse de cette maladie [Yasui & al., 1992].

L'hypomagnésie est commune parmi les personnes assez âgées et pourrait être un sérieux élément aggravant pour les sujets affectés par une accumulation anormale d'ions métalliques. Des résultats ont été rapportés concernant le cerveau de sujets atteints de la démence des dialysés, dans lequel la concentration d'aluminium est de 250 μM par rapport à la concentration normale d'environ 16 μM [Alfrey, 1978 et Alfrey, 1980]. Ainsi, le niveau élevé d'aluminium dans différentes régions malades ou non fonctionnelles du cerveau ainsi que son puissant effet inhibiteur sur l'activité de la DBH et autres enzymes clés, suggèrent que cet ion métallique pourrait avoir un rôle pertinent dans diverses manifestations neurodégénératives.

PARTIE VI

HISTOLOGIE

Après observation au microscope photonique des lames des différents tissus, il s'est avéré qu'aucun d'eux ne présentait de dommages. Ceci peut-être expliqué par le fait que, les concentrations des différents complexes et ligands d'aluminium utilisées, bien qu'elles aient provoquées une accumulation au sein des tissus, n'étaient pas suffisamment élevées pour causer des dégâts.

Ceci pourrait démontrer que Al(III) à très faibles concentrations est capable de produire des effets à l'échelle moléculaire.

CONCLUSION GENERALE

Le but de la présente recherche était d'évaluer et de comparer les niveaux d'aluminium dans le sang de sujets sains et d'autres hémodialysés et d'étudier à travers l'utilisation de modèles biologiques la spéciation de ce métal et aussi son implication dans la production des radicaux libres et dans l'activité de certaines enzymes.

La première partie consistait en la détermination des niveaux d'aluminium dans le sang de sujets en hémodialyse aussi bien avant qu'après dialyse et leur comparaison avec ceux de sujets témoins.

Concernant les sujets hémodialysés, neuf d'entre eux (correspondant environ à la moitié) montrent des niveaux d'aluminium plus élevés après dialyse qu'avant dialyse. On peut donc suggérer que ceci est peut-être dû à l'ultrafiltration qui concentre les protéines plasmatiques. Ces fluctuations pourraient dissimuler une entrée et un transfert d'aluminium entre les dépôts tissulaires et le liquide de dialyse.

La deuxième étape concernait des rats traités par différentes espèces d'aluminium et leurs ligands aussi bien par gavage que par perfusion. Ces deux voies ont montré que la distribution de l'aluminium dans les tissus dépend des espèces chimiques utilisées et de la voie d'administration.

On peut donc dire que l'administration orale comme voie d'exposition à l'aluminium peut résulter en des accumulations divergentes du métal dans les tissus dont la concentration dépend de la forme chimique.

Alors que, quand l'aluminium est administré par voie intraveineuse, et bien que la durée soit relativement courte par rapport au gavage, les quantités d'aluminium

accumulées dans les différents organes sont plus élevées que quand le métal a été administré oralement.

La troisième phase correspondant à la présence concomitante de l'aluminium et du fer dans les modèles adoptés révèle une augmentation importante de la production de radicaux libres exprimée en concentration de MDA. Donc, l'effet de l'aluminium associé au fer ne laisse pas de doute sur la toxicité potentielle de cet élément comme cofacteur dans la production des radicaux libres.

La dernière partie portant sur l'implication de l'aluminium sur l'activité de certaines enzymes a révélé l'effet stimulateur de l'aluminium sur l'activité de l'AChE, ainsi qu'un puissant effet inhibiteur sur l'activité de la DBH. Ceci suggère que cet ion métallique pourrait avoir un rôle pertinent dans diverses manifestations neurodégénératives.

PERSPECTIVES

- Chez les dialysés, il serait souhaitable de réaliser des biopsies osseuses et des dosages de parathormone en vue de connaître les niveaux d'aluminium.
- Il serait utile de choisir une large gamme de concentrations, dans le but de connaître celle à partir de laquelle commence les lésions tissulaires.
- Il est essentiel d'effectuer des contrôles des niveaux d'aluminium plasmatique et urinaire, dans le but d'évaluer leurs taux circulant et éliminé.

Liste des abréviations fréquemment citées

ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
DBH	Dopamine- β -hydroxylase
DFO	Desferroxamine
EDTA	Acide éthylène-diamine tétra-acétique
HCl	Acide chloridrique
ICP	Spectroscopie de masse couplée de plasma inductif
IRC	Insuffisance Rénale chronique
MA	Maladie d'Alzheimer
MDA	Malondialdéhyde
MP	Maladie de Parkinson
MPE	Méthylphényléthanolamine
PNMT	Phényl-éthanolamine-N-méthyltransférase
PTH	Hormone Parathyroïde
SLA	Sclérose amyotrophique latérale
TBA test	Test de l'acide tiobarbiturique
TBS	Solution de NaCl 0,9% dans du tampon Tris à pH 7,4
THA	Tacrine

Liste des figures

N° de figure	Titre	N° de page
1	Métabolisme de l'aluminium en présence d'une fonction rénale normale (gauche) et d'une insuffisance rénale au stade ultime (droite).	4
2	Distribution de l'aluminium dans le corps humain de : A. personne à fonction rénale normale. B. patient dialysé avec surcharge modérée d'aluminium. C. patient dialysé avec surcharge sévère d'aluminium.	7
3	Protocole expérimental.	25
4	Fonctionnement d'un ICP.	31
5	Processus conduisant à la vapeur atomique après introduction continue d'un échantillon dans un atomiseur continu.	32
6	Concentrations en aluminium ($\mu\text{g/g}$ de tissu frais) dans l'os (gavage).	54
7	Concentrations en aluminium ($\mu\text{g/g}$ de tissu frais) dans le muscle (gavage).	55
8	Concentrations en aluminium ($\mu\text{g/g}$ de tissu frais) dans le cœur (gavage).	55
9	Concentrations en aluminium ($\mu\text{g/g}$ de tissu frais) dans le foie (gavage).	56
10	Concentrations en aluminium ($\mu\text{g/g}$ de tissu frais) dans le pancréas (gavage).	56
11	Concentrations en aluminium ($\mu\text{g/g}$ de tissu frais) dans l'intestin (gavage).	57
12	Concentrations en aluminium ($\mu\text{g/g}$ de tissu frais) dans le cerveau (gavage).	57
13	Concentrations en aluminium ($\mu\text{g/g}$ de tissu frais) dans l'os (perfusion).	60
14	Concentrations en aluminium ($\mu\text{g/g}$ de tissu frais) dans le muscle (perfusion).	60
15	Concentrations en aluminium ($\mu\text{g/g}$ de tissu frais) dans le cœur (perfusion).	61
16	Concentrations en aluminium ($\mu\text{g/g}$ de tissu frais) dans le foie (perfusion).	61
17	Concentrations en aluminium ($\mu\text{g/g}$ de tissu frais) dans le pancréas (perfusion).	62
18	Concentrations en aluminium ($\mu\text{g/g}$ de tissu frais) dans l'intestin (perfusion).	62
19	Concentrations en aluminium ($\mu\text{g/g}$ de tissu frais) dans le cerveau (perfusion).	63

Liste des figures (suite)

N° de figure	Titre	N° de page
20	Mesure de la concentration de la MDA des liposomes de α - lecitine en fonction de la concentration en phospholipides.	72
21	Mesure de la concentration de la MDA des liposomes de α - lecitine en fonction de la concentration en fer.	72
22	Mesure de la concentration de la MDA des liposomes de α - lecitine en fonction de la concentration en fer en présence et en absence d'Aluminium.	73
23	Mesure de la concentration de MDA en fonction de concentrations croissantes de protéines d'homogénat de cerveau de souris en présence et en absence d'Aluminium.	74
24	Analyse de l'activité de l'AChE dans les homogénats de cerveaux de souris traitées avec du $AlCl_3$ et du $Allact_3$ et de souris témoins en fonction de la concentration en protéines.	77
25	Activité de l'AChE dans les homogénats de cerveaux de souris après traitement oral d'un mois et trois mois avec du $AlCl_3$ et de souris témoins (T).	78
26	Courbe de Lineweaver-Burk de l'AChE d'homogénats de cerveaux de souris après trois mois de traitement oral avec $AlCl_3$ et $Allact_3$.	80
27	Evaluation de l'activité de l'AChE dans les homogénats de cerveaux de souris après traitement <i>in vitro</i> en fonction de la concentration d'aluminium ($AlCl_3$ et $Allact_3$).	81
28	Courbe de Lineweaver-Burk de l'activité de l'AChE dans les homogénats de cerveaux de souris incubés <i>in vitro</i> en présence et en absence d' $AlCl_3$ et d' $Allact_3$.	83
29	Effets de la Tacrine (THA) ($1\mu M$), $Allact_3$ et DFO ($1mM$) sur l'activité de l'AChE par rapport aux témoins.	84
30	Vitesse de la réaction de la DBH en fonction de la quantité d'enzyme en présence et en absence d' $Allact_3$.	89
31	Courbe de Lineweaver-Burk de la DBH calculée à partir de différentes concentrations de substrat (Phényléthylamine) en présence et en absence d' $Allact_3$.	90

Liste des tableaux

N° du Tableau	Titre	N° de page
I	Présentation des sujets hémodialysés.	20
II	Paramètres nécessaires pour la minéralisation du plasma.	28
III	Paramètres nécessaires pour la minéralisation des différents tissus.	29
IV	Paramètres nécessaires pour la minéralisation de l'os.	30
V	Aluminémie chez les patients en hémodialyse.	43
VI	Aluminémie chez les sujets témoins.	44
VII	Quantités d'aluminium en $\mu\text{g/g}$ de tissu frais contenues dans les différents tissus prélevés à la fin du gavage.	53
VIII	Quantités d'aluminium en $\mu\text{g/g}$ de tissu frais contenues dans les différents tissus prélevés à la fin de la perfusion.	59
IX	Valeurs de la moyenne du débit urinaire des 4 périodes témoins et des 4 périodes expérimentales.	64

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adler, A.J. and Berlyne, G.M., Duodenal aluminium absorption in the rat : Effect of vitamin D, *Am. J. Physiol.*, 249 : G209-G213 (1985).

Alfrey, A.C., Aluminium metabolism in uremia, in : *Aluminum Neurotoxicity* (Liss,L., Ed) Pathotox Publ., Park Forest South, IL, USA, pp. : 43-45 (1980).

Alfrey, A.C., Aluminium metabolism in uremia, *Neurotoxicology*, 1 : 43 (1980a).

Alfrey, A.C., Dialysis encephalopathy syndrome, *Ann. Rev. Med.*, 29 : 93-98 (1978).

Alfrey, A.C., The case against aluminum affecting parathyroid function, *Am. J. Kidney. Dis*, 6 : 309 (1985).

Alfrey, A.C., Aluminum metabolism. *Kidney. International*, Vol. 29, Suppl. 18, pp. S-8-S : 11 (1986).

Alfrey, A.C., Aluminum toxicity in patients with chronic renal failure, *Ther. Drug. Monit.*, 15(6) : 593-7 (1993).

Alfrey, A.C. Aluminum Intoxication Recognition and Treatment. In : *Aluminum in Chemistry, Biology and Medicine. A series of Advances. Vol 1.* Edited by Nicolini, M., Zatta, P.F. and Corain, B., New York / Raven Press, 80-81 (1991).

Alfrey, A.C., Hegg, A. and Craswell, P., Metabolism and toxicity of aluminum in renal failure, *Am. J. Clin. Nutr.*, 33 : 1509 (1980b).

Alfrey, A.C., LeGendre, G.R. and Kaehny, W.D., The dialysis encephalopathy Syndrome. Possible aluminum intoxication. *N. Engl. J. Med.*, 294 : 184-188 (1976).

Alfrey, A.C., Mishell, J.M., Burks, J., Contiguglia, S.R., Rudolph, H., Lewin, E. and Holmes, J.H., Syndrome of dispraxia and multifocal seizures associated with chronic hemodialysis, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs.*, 18 : 257-261 (1972).

Altmann, P., Hamon, C., Blair, J., Dhanesha, U., Cunningham, J. and Marsh, F., Disturbance of cerebral function by aluminium in haemodialysis patients without overt aluminium toxicity, *Lancet*, ii : 7-12 (1989).

Anderson, K.J., Nordgaard, D.O., Julshamn, K. and Schjoensby, H., Increased serum aluminum in patients with jaundice, *N. Engl. J. Med.*, 30s : 728 (1979).

Arendt, T., Bigl, V., Tennstedt, A. and Arendt, A., Correlation between cortical plaque count and neuronal loss in the nucleus basalis in Alzheimer's disease, *Neurosc. Lett.*, 48 : 81-85 (1984).

Atack, J.R., Perry, E.K., Bonham, J.R., Perry, R.H., Tomlinson, B.E., Blessed, G. and Fairbairn, A., Molecular forms of acetylcholinesterase in senile dementia of Alzheimer type : selective loss of intermediate (10S) form, *Neurosc. Lett.*, 40 : 199-204 (1983).

Bakir, A.S., Hryhorczuk, D.O., Berman, E. and Dunea, J., Acute fatal hyperaluminemic encephalopathy in undialyzed and recently dialyzed uremic patients, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs.*, 32 : 171 (1986).

Banks, W.A. and Kastin, A.J., The aluminum-induced increase in the blood-brain barrier permeability to delta-sleep-inducing peptide occurring through the brain and is independent of phosphorus and acetylcholinesterase levels, *Psychopharmacol.*, 86 : 84-89 (1985).

Banks, W.A. and Kastin, A.J., Aluminum-induced neurotoxicity : Alterations in membrane function at the blood-brain barrier, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 13 : 47-53 (1989).

Bilkei-Gorzo, A., Neurotoxic effect of enteral aluminum, *Food and Chem. Toxicol.*, 31 : 357-361 (1993).

Birchall, J.D. and Chappell, J.S., Aluminum chemical physiology and Alzheimer's disease, *Lancet.*, ii : 1008-1010 (1988).

Blanusa, M., Prester, L., Crnogorac, M., Puretic, Z., Bubic-Filipi, L. and Dadic, Z., Aluminium in water for preparation of dialysate and in serum of dialysed patients, *Arh. Hig. Rada . Toksikol.*, 48(2) : 197-204 (1997).

Boegman, R.J. and Bates, L.A., Neurotoxicity of aluminum, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 62 : 1010-1014 (1984).

Butterworth, K.R., Drewitt, P.N., Springall, C.D. and Moorhouse, S.R., Bioavailability of aluminium, *Lancet.*, 339 : 1489 (1992).

Cannata, J.B., Fernandez-Soto, I., Fernandez-Menendez, M.J., Fernandez-Martin, J.L., McGregor, S.J., Brock, J.H. and Halls, D., Role of iron metabolism in absorption and cellular uptake of aluminum, *Kidney. Int.*, 39(4) : 799-803 (1991).

Cannata, J.B, Gomez Aonso, C., Fernandez Menendez, M.J., Fernandez Soto, I., McGregor, S., Menendez-Fraga, P. and Brock, J.H., Iron uptake in aluminium overload : in vivo and in vitro studies, *Nephrol. Dial. Transplant.*, 6(9) : 637-42 (1991).

Christen, Y., Oxidative stress and Alzheimer disease (1), *Am. J. Clin. Nutr.*, 71 : 621S-9S (2000).

Cochran, M., Goddard, G. and Ludwigson, N., Aluminium absorption by rat duodenum : further evidence of energy-dependent uptake, *Toxicol. Lett.* 51 : 287-294 (1990).

Craine, J.E., Daniels, G. and Kaufman, S., Dopamine beta hydroxylase. The subunit structure and anion activation of the bovine adrenal enzyme, *J. Biol. Chem.*, 248 : 7838-7844 (1973).

Crapper, D.R., Krishnan, S.S. and Quittkat, S., Aluminum, neurofibrillary degeneration and Alzheimer's disease, *Brain*, 99 : 67-80 (1976).

Crapper-McLachlan, D.R. and DeBoni, U., Aluminum in human brain disease-an over view, *Neuro. Toxicology.*, 1 : 3-16 (1980).

CrapperMcLachlan, D.R., Kruck,T.P.,Lukiw, W.J. and Krishnan, S.S., Would decreased aluminum ingestion reduce the incidence of Alzheimer's disease ?, *Can. Med. Assoc. J.*, 145 : 793-804 (1991).

Cochran, M., Patterson, D., Neoh, S., Stevens, B. and Mazzachi, R., Binding of Al by protein in plasma of patients on maintenance hemodialysis, *Clin. Chem.*,31 : 1314 (1985).

Chainy, G.B.N., Sahoo, A. and Swain, C., Effect of aluminum on lipid peroxidation of cerebral hemisphere of chick, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 50 : 85-91 (1993).

Deelers, M., Servais, J.P. and Wulfert, E., Neurotoxic cations induce membrane rigidification and membrane fusion at micromolar concentrations, *Bioch. Bioph. Acta.*, 855 : 271-276 (1986).

Dennis, E.J., *Fert Solutions* 15 : 44-54 (1971). In. *Aluminum in chemistry, biology and medicine. A Series of Advances* vol. 1. eds. M. Nicolini, P.F. Zatta and B. Corain. pp. 3-20 New York : Raven Press (1991).

Dewberry, F.L., McKinney, T.D. and Stone, W.J., The dialysis dementia Syndrome : report of fourteen cases and review of the literature, *Am. Soc. Artif. Intern. Organs.*, 3 : 102-108 (1980).

D'Haese, P.C., Aluminum accumulation in patients with chronic renal failure. Monitoring, diagnosis and therapy. Ph D-thesis, University of Antwerp/Amsterdam, (1988).

Dixon, M., The determination of enzyme inhibitor constants, *Biochem. J.*, 129 : 197-202 (1953).

Domingo, J.L., Gomez, M., Llobet, J.M., Del Castillo, D. and Corbella, J., Influence of Citric, Ascorbic and Lactic Acids on the Gastrointestinal Absorption of Aluminum in Uremic Rats, *Nephron.*, 66 : 108-109 (1994).

Domingo, J.L., Gomez, M, Llobet, J.M. and Corbella, J., Influence of some dietary constituents on aluminum absorption and retention in rats, *Kidney.Int.*, 39(4) : 598-601 (1991).

Drewitt, P.N., Butterworth, K.R., Springall, C.D. and Moorhouse, S.R., Plasma levels of aluminium after tea ingestion in healthy volunteers, *Food. Chem. Toxicol.*, 31(1) : 19-23 (1993).

Driscoll, C.T., Bazker, J.P., Bisogni, J.J. and Schofield,C.L., Effect of aluminium on fish in dilute acidified waters, *Nature.*, 17 : 627 (1980).

Driscoll, C.T. and Letterman, R.D., Chemistry and fate of Al(III) in treated drinking water, *J. Environ. Eng.*, 114(1) : 21-37 (1988).

Duch, D., Viveros, O.H. and Kirshner, N., Endogenous inhibitor(s) in adrenal medulla of dopamine- β -hydroxylase, *Biochem . Pharmacol.*, 17 : 155-264 (1968).

Edwardson, J.A., Klinowski, J., Oakley, A., Perry, R. and Candy, J., Aluminosilicates and the ageing brain : implications for pathogenesis of Alzheimer's Disease, Ciba Found. Symp., 121 : 160-179 (1986).

Edwardson, J., Ferrier, I., McArthur, F., McKeith, I.G., McLaughlin, I., Morris, C.M., Mountford, S.A., Oakley, A.E., Taylor, G.A., Ward, M.K. and Candy, J.M., Alzheimer's disease and the aluminium hypothesis. In : Aluminum in chemistry, biology and medicine. A Series of Advances. vol 1. eds Nicolini, M., Zatta, P.F. and Corain, B, New York : Raven Press, 85-96 (1991).

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. and Featherstone, R.M., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, Biochem. Pharmacol., 7 : 88-95 (1961).

Favarato, M., Zatta, P., Perazzolo, M., Fontana, L. and Nicolini, M., Aluminum(III) influences the permeability of the blood-brain barrier to ¹⁴C-sucrose in rats, Brain Res., 569 : 330-335 (1992).

Feldman, R.G., Central and peripheral nervous system effects of metals : a survey, Acta Neurol. Scand.[Suppl. 92]., 66 : 143-166 (1982).

Flaten, T.P., Alfrey, A.C., Birchall, J.D., Savory, J. and Yokel, R.A., Status and future concerns of clinical and environmental aluminum toxicology, J ; Toxicol. Environ. Health., 48 : 527-541 (1996).

Flendrig, JA., Kruis, H. and Das, H.A., Aluminium and dialysis dementia, Lancet. i : 1235 (1976).

Forbes, W.F., Gentleman, J.F. and Maxwell, C.J., Concerning the role of aluminum in causing dementia, Exp. Gerontology., 30 : 23-32 (1995a).

Forster, D.P., Newens, A.J., Kay, D.W.K. and Edwardson, J.A., Risk factors in clinically diagnosed presenile dementia of the Alzheimer type : a case-control study in northern England, *J. Epidemiol. Commun. Health.*, 49 : 253-258 (1995).

Fosmire, G.J., Focht, S.J. and McClearn, G.E., Genetic influences on tissue deposition of aluminum in mice, *Biol. Trace. Elem. Res.*37 : 115-121 (1993).

Fraga, C.G., Oteiza, P.I., Golub, M.S. and Gershwin, M.E., Effects of aluminum on brain lipid peroxidation, *Toxicol. Lett.*, 51 : 213-219 (1990).

Frataglioni, L., In : Wimo, A., Jonsson, B., Karlsson, K. and Winblad, B.,eds, Health Economics of Dementia, *Epidemiology. J. Wiley and Sons, New York*, pp.3-31 (1998).

Froment, D.P., Molitoris, B.A., Buddington, B., Miler, N. and Alfrey, A.C., Site and mechanism of enhanced gastrointestinal absorption of aluminum by citrate, *Kidney. Int.*, 36(6) : 978-984 (1989).

Fulton, B. and Jeffery, E.H, Absorption and retention of aluminum from drinking water.1. Effect of citric and ascorbic acids on aluminum tissue levels in rabbits, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 14 : 788-796 (1990).

Gacek, E.M., Babb, A.L., Uvelli, D.A., Fry, D.L. and Scribner, B.H., Dialysis dementia : the role of dialysate pH in altering the dialyzability of aluminum, *Trans.Am. Soc. Artif. Intern. Organs.*, 25 : 409 (1979).

Gajdusek, D.C. and Salazar, A., Amyotrophic lateral sclerosis and Parkinsonian syndromes in high incidence among the Auya and Jakai people of West New Guinea., *Neurology.*, 32 : 107-126 (1982).

Ganrot, P.O., Metabolism and possible health effects of aluminum, *Environ. Health. Perspect.*, 65 : 363-441 (1986).

Garbossa, G., Galvez, G., Perez, G., Stripeikis, J., Tudino, M. and Nesse, A., Oral aluminum administration to rats with normal renal function. 2. Body distribution, HUMAN-AND-EXPERIMENTAL-TOXICOLOGY., 17(6) : 318-322 (1998).

Garruto, R.M., Cellular and molecular mechanisms of neuronal degeneration : amyotrophic lateral sclerosis, parkinsonism-dementia, and Alzheimer disease, Am. J. Hum. Biol., 1 : 529-543 (1989).

Garruto, R.M., Fakatsu, R., Yanagihara, R., Gajdusek, D.C., Hook, G. and Fiori, C.E., Imaging of calcium and aluminum in neurofibrillary tangle-bearing neurons in parkinsonism- dementia of Guam, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 : 1875-1879 (1984).

Garruto, R.M., Yanagihara, R. and Gajdusek, D.C., Models of environmentally induced neurological disease : epidemiology and etiology of amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia in the Western Pacific, Environ. Geochem. Health., 12 : 137-151 (1990).

Garruto, R.M. and Yase, Y., Neurodegenerative disorders of the Western Pacific : the search for mechanisms of pathogenesis, Trends Neurosci., 9 : 368-374 (1986).

Ghetti, B., Musicco, M., Norton, J. and Bugiani, O., Nerve cell loss in the progressive encephalopathy induced by aluminum powder. A morphologic and semi quantitative study of the Purkinje cells, Neuropathol. Appl. Neurobiol., 11 : 31-53 (1985).

Gorsky, J.E., Dietz, A.A., Spencer, H. and Osis, D., Metabolic balance of aluminum studied in six men, Clin. Chem., 25 : 1739 (1979).

Graves, A.M., White, E., Koepsel, T.D., Reifler, B.V., VanBelle, G. and Larson, E.B., The association between aluminum-containing products and Alzheimer's disease, J. Clin. Epidemiol., 43 : 35-44 (1990).

Greger, J.L. and Baier, M.J., Excretion and retention of low or moderate levels of aluminium by human subjects, *Fd. Chem. Toxicol.*, 21 : 473 (1983).

Greger, J.L. and Powers, C.F., Assessment of exposure to parenteral and oral aluminum with and without citrate using a desferrioxamine test in rats, *Toxicology*, 76 : 119-132 (1992).

Grisaru, D., Sternfeld, M., Eldor, A., Glick, D. and Soreq, H., Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology, *Eur. J. Biochem.*, 264 : 672-686 (1999).

Gulya, K., Rakonczay, Z. and Kasa, P., Cholinotoxic effects of aluminum in rat brain, *J. Neurochem.*, 54 : 1020-1026 (1990).

Gutteridge, J.M.C., Quinlan, G.J., Clark, I. and Halliwell, B., Aluminium salts accelerate peroxidation of membrane lipids stimulated by iron salts, *Biochimica et Biophysica Acta.*, 835 : 441-447 (1985).

Harrington, C.R., Wischik, C.M., McArthur, F.K., Taylor, G.A., Edwardson, J.A. and Candy, J.M., Alzheimer's-disease-like changes in tau protein processing : Association with aluminum accumulation in brain of renal dialysis patients, *Lancet*, 343 : 993 (1994).

Harris, W., Berthon, G., Day, J.P., Exley, C., Flaten, T.P., Forbes, W.F., Kiss, T., Orvig, C. and Zatta, P., Speciation of aluminum in biological systems, *J. Toxicol. Environm. Health*, 48 : 543-568 (1996).

Hohr, D., Abel, J. and Wilhelm, M., Renal clearance of aluminium : studies in the isolated perfused rat kidney, *Toxicol.Lett.*, 45(2-3) : 165-74 (1989).

Horst, W.J., Wagner, A. and Marchner, H., Mucilage protects root meristems from aluminum injury, *Z ; Pflanzenphysiol.*, 105 : 435 (1982).

Hurst, J.H., Lewitt, P.A., Burns, R.S. and Foster, N.L., CSF dopamine beta hydroxylase activity in Parkinson's disease, *Neurology.*, 35 : 565-568 (1992).

Hydes, D., *Nature*, 268 :136 (1977). In. Aluminum in chemistry, biology and medicine. A Series of Advances vol. 1. eds. M. Nicolini , P.F. Zatta and B. Corain. pp. 3-20 New York : Raven Press (1991).

Jellinger, K., Kienzl, E., Rumpelmaier, G., Riederer, P., Stachelberger, H., Ben-Shakar, D. and Youdim, M.B.H., Iron-melanin complex in substantia nigra of parkinsonian brains : an x-ray microanalysis, *J. Neurochem.*, 59 : 1168-1171 (1992).

Jorgenson, S.E. and Jensen, A., *Metal Ions Biol Syst*, 18 : 61 (1984). In. Aluminum in chemistry, biology and medicine. A Series of Advances vol. 1.eds. M. Nicolini, P.F. Zatta and B. Corain. pp. 3-20 New York : Raven Press (1991).

Julka, D., Sandhir, R. and Gill, K.D., Altered cholinergic metabolism in rat CNS following exposure : implications on learning performance, *J. Neurochem.*, 65 : 2157-2164 (1995).

Julka, D., Vasishta, R.K. et Gill, K.D., Distribution of aluminum in different brain regions and body organs of rat, *Biol. Trace Elem. Res.*, 52(2) : 181-92 (1996).

Klatzo, I., Wisniewski, H. and Stretcher, E., Experimental production of neurofibrillary degeneration .1. Light microscopic observations, *J. Neuropathol.*, 24 : 187 (1965).

Klein, G.L., Alfrey, A.C. and Miller, N.L., Aluminum loading during total parenteral nutrition, *Am. J. Clin. Nutr.*, 14 : 1425-1429 (1982).

Klinman, J.P., Krueger, M., Brenner, M. and Edmondson, D.E., Evidence for two copper atoms/subunit in dopamine beta monooxygenase catalysis, *J. Biol. Chem.*, 259 : 3399-3402 (1984).

Koch, K.R., Pougnet, M.A.B., DeViliers, S. and Monteagudo, F., Increased urinary excretion of aluminium after drinking tea, *Nature (Londres)*, 333 : 122 (1988).

Kontro, P. and Oja, S.S., Enzyme kinetics, in *Methods in Neurobiology*, (Lauher, R., ed), Plenum Press, New York, pp. 265-337 (1981).

Koo, W.K., Krug, S.K. and Succop, P., Sequential serum Al and urine aluminum. Creatinine ratio and tissue Al loading in infants with fractures, *Pediatrics.*, 89 : 877-881 (1992).

Lindberg, J.S., Copley, J.B., Koenig, K.G. and Cushner, H.M., Effect of citrate on serum aluminum concentrations in hemodialysis patients : a prospective study, *South. Med. J.*, 86 : 1385-1388 (1993).

Lipman, J.J., Colowick, S.P. and Lawrence, P.L., Aluminum induced encephalopathy in the rats, *Life Sci.*, 42 : 402-413 (1988).

Lote, C.J., Willmott, K., Wood, J.A., Thewles, A. and Freeman, M., Renal excretion of aluminium in the rat : effet of citrate infusion, *Hum. Exp. Toxicol.*, 14 : 945-8 (1995).

Macdonald, T.L., Humphreys, W.G. and Martin, R.B., Promotion of tubulin assembly by aluminum ion in vitro, *Science.*, 236 :183 (1987).

Macdonald, T.L. and Martin, R.B., Aluminium ion in biological systems, *Trends. Biochem. Sci.*, 13 : 15 (1988).

Maharaj, D., Fell, G., Boyce, B., Ng, J., Smith, G., Boulton-Jones, J., Cumming, R. and Davidson, J., Aluminium bone disease in patients receiving plasma exchange with contaminated albumin, *Br. Med. J.*, 295: 693-6 (1987).

Markianoss, M., Hadjikonstantinou, M. and Sfagos, C., Normal plasma dopamine beta hydroxylase in non-treated and treated Parkinson patients, *Acta Neurol. Scand.*,63 : 267- 272 (1981).

Martin, R.B., The chemistry of aluminum as related to biology and medicine, *Clin. Chem*, 32 : 1797-1806 (1986).

Martin, R.B., Bioinorganic chemistry of aluminum. In *Metal ions in biological systems*, eds. H. Sigel and A. Sigel, vol.24, pp.1-57. New York : Marcel Dekker (1988).

Martin, R.B., Aluminosilicates stabilities under blood plasma conditions, *Polyhedron.*, 9 :193-197 (1990).

Martin, R.B., Aluminum in biological systems. In *Aluminum in chemistry, biology and medicine*, eds. M. Nicolini, P.F. Zatta and B. Corain,pp.3-20. New York : Raven Press (1991).

Martyn, C.N., Osmond, C., Edwardson, J.A., Barker, D.J.P., Harris, E.C. and Lacey, R.F., Geographical relation between Alzheimer's disease and aluminum in drinking water, *Lancet*, i, 59-62 (1989).

Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E. and Vallette, F.M., Molecular and cellular biology of cholinesterases, *Prog. Neurobiol.*, 41 : 31-91 (1993).

Matsumoto, J., Hirasawa, E., Morimura, S. and Takahashi, E., Localization of aluminum in tea leaves, *Plant Cell Physiol.*, 17 : 627 (1976).

Mazzaferro, S., Perruzza, I., Costantini, S., Pasquali, M., Onorato, L., Sardella, D., Giordano, R., Ciaralli, L., Ballanti, P., Bonucci, E., Cinotti, G.A. and Coen, G., Relative roles of intestinal absorption and dialysis-fluid-related exposure in the accumulation of aluminium in haemodialysis patients, *Nephrol. Dial. Transplant.*, 12(12) : 2679-2682 (1997).

Meiri, H., Banin, E., Roll, M. and Rousseau, A., Toxic effects of aluminium on nerve cells and synaptic transmission, *Prog. Neurobiol.*, 40 :89-121 (1993).

Mitani, K., Relationship between neurological diseases due to aluminium load, specially amyotrophic lateral sclerosis, and magnesium status, *Magnesium Res.*, 5 : 203-13 (1992).

Miyata, S. Nagata, H., Yamao, S., Nakamura, S. and Kameyama, M., Dopamine beta hydroxylase activities in serum and cerebrospinal fluid of aged and demented patients, *J. Neurol. Sci.*,63 : 403-409 (1984).

Molinoff, P.B., Weinshilbom, R. and Axelrod, J., A sensitive enzymatic assay for dopamine β hydroxylase, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 178 : 424-431 (1971).

Molitoris, B.A., Froment, D.H., Mackenzie, T.A., Huffer, W.H. and Alfrey, A.C., Citrate : A major factor in the toxicity of orally administered aluminum compounds, *Kidney Int.*, 36 : 949-953 (1989).

Munoz, F.J. and Inestrosa, N.C., Neurotoxicity of acetylcholinesterase amyloid beta-peptide aggregates is dependent on the type of Abeta peptide and the AChE concentration present in the complex, *FEBS Lett.*, 450 : 205-209 (1999).

Nakamura, S., Koshimura, K., Kato, T., Yamao, S., Iijima, S., Nagata, H., Myata, S., Fujiyoshi, K., Okamoto, K. and Suga, H., Neurotransmitters in dementia, *Clin. Ther.*, 7 : 18-34 (1984).

Neri, L.C. and Hewitt, D., Aluminum, Alzheimer's disease and drinking water, *Lancet*, 338-390 (1991).

Nolan, C.R., DeGoes, J.J and Alfrey, A.C., Aluminum and lead absorption from dietary sources in women ingesting calcium citrate, *South. Med. J.*, 87(9) : 894-898 (1994).

Nyholm, N.E.I., Evidence of involvement of aluminum in causation of defective formation of eggshells and of impaired breeding in wild passerine birds, *Environmental Research.*, 26 : 363 (1981).

Ogasawara, Y., Sakamoto, T., Ishii, K., Takahashi, H. and Tanabe, S., Effects of the administration routes and chemical forms of aluminum on aluminum accumulation in rat brain, *Biol. Trace. Elem. Res.*, 86(3) : 269-78 (2002).

Okuno, S. and Fujisawa, H., Purification and characterization of rat dopamine beta Monooxygenase and monoclonal antibodies to the enzyme, *Biochim. Biophys. Acta* 799 : 260-269 (1984).

Ohtawa, M., Seko, M. and Takayama, F., Effect of aluminum ingestion on lipid peroxidation in rats, *Chem. Pharm. Bull.*, 31 : 1415-1418 (1983).

Oteiza, P.I., Fraga, C.G. and Keen, C.L., Aluminum has both oxidant and antioxidant effects in mice, *Arch. Biochem. Biophys.*, 300 : 517-521(1993).

Ott, S.M., Maloney, N.A. and Klein, G.L., Aluminum is associated with low bone formation in patients on chronic parenteral nutrition, *Ann. Inter. Med.*, 98 : 910-914 (1983).

Partridge, N.A., Regnier, F.E., White, J.L. and Hem, S.L., Influence of dietary constituents on intestinal absorption of aluminum, *Kidney Int.*, 35 : 1413-1417 (1989).

Peng, J.H., Xu, Z.C., Parker, J.C., Friedlander, E.R., Tang, J.P. and Melethil, S., Aluminum-induced acute cholinergic neurotoxicity in rat, *Mol. Chem. Neuropathol.*, 17 : 79-89 (1992).

Perl, D.P., Gadjusek, D.C., Garruto, R.M., Yanagihara, R.T. and Gibbs, C.J., Intraneuronal aluminum accumulation in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson-dementia of Guam, *Science.*, 217 :1053-1055 (1982).

Perry, E.K., Perry, R.H., Blessed, G. and Tomlinson, B.E., Changes in brain cholinesterase in senile dementia of Alzheimer type, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 4 : 273-277 (1978).

Posner, A.S., Blumenthal, N.C. and Boskey, A.L., Model of aluminum induced osteomalacia : inhibition of apatite formation and growth, *Kidney Int.*, 29 (Suppl.18) : S17-S19 (1986).

Powell, J.J., and Thompson, R.P.H., The chemistry of aluminium in the gastrointestinal lumen and its uptake and absorption, *Proc. Nutr. Soc.*, 52 : 241-253 (1993).

Pryor, W.A., Free radical reactions and their importance in biochemical systems, *Fed. Proc.*, 32 : 1862-1869 (1973).

Rahnema, S. et Jennings, F., Accumulation and depletion of aluminum from various tissues of rats following aluminum citrate ingestion, *OHIO-JOURNAL-OF-SCIENCE.*, 99(5) : 98-101 (1999).

Reiber, S., Kukull, W. and Standish-Lee, P., Drinking water aluminum and bioavailability, *J. Am. Water Works Assoc.*, 88 : 86-100 (1995).

Richardt, G., Federolf, G. and Habermann, E., The interaction of aluminum and other metal ions with calcium-calmodulin-dependent phosphodiesterase, *Arch. Toxicol.*, 57 : 257-9 (1985).

Rodger, R.S.C., Muralikrishna, G.S., Halls, D.J., Henderson, J.B., Forrest, J.A., Macdougall, A.I. and Fell, G.S., Ranitidine suppresses aluminum absorption in man, *Clin.Sci.*, 80 : 505-508 (1991).

Sahin, G., Varol, I. and Temizer, A., Determination of aluminum levels in the kidney, liver and brain of mice treated with aluminum hydroxide, *Biol. Trace. Elem. Res.*, 41 : 129-135 (1994).

Santos, F., Chan, J. C.M., Yang, M.S., Savory, J. and Wills, M.R., Aluminum deposition in the central nervous system, preferential accumulation in the hippocampus in weanling rats, *Med. Biol.*, 65 : 53-55 (1987).

Sarin, S., Gupta, V. and Gill, K.D., Alterations in lipid composition and neuronal injury in primates following chronic aluminum exposure, *Biol. Trace. Elem. Res.*, 59 : 133-143 (1997).

Sberna, G., Saez-Valer, J., Czech, C., Beyreuther, K., Masters, C.M., McLean, C.A. and Smal, D.H., Acetylcholinesterase is increased in the brain of transgenic mice expressing the C-terminal fragment (CT 100) of the beta-amyloid protein precursor of Alzheimer's disease, *J. Neurochem.*, 71 : 723-731 (1998).

Scott, R.A., Sullivan, R.J., DeWolf, W.E.Jr, Dolle, R.E. and Kruse, L.I., The copper sites of dopamine beta-hydroxylase : an X-ray absorption spectroscopic study, *Biochemistry.*, 27(15) : 5411-5417 (1988).

Sillevis, P.A.E. and DeJong, D.M., Animal models of amyotrophic lateral sclerosis and the spinal muscular atrophies, *J. Neurol. Sci.*, 91 : 231-258 (1989).

Singer, H.S., Searles, C.D., Hahn, I.H., Mrch, J.L. and Troncoso, J.C., Effect of aluminum on markers for synaptic neurotransmission, cyclic AMP, and neurofiaments in a neuroblastoma x glioma hybridoma (NG108-15), *Brain Res.*, 528 : 73-79 (1990).

Slanina, P., Frech, W., Ekström, L.G., Lööf, L., Slorach, S. and Cedergren, A., Dietary citric acid enhances absorption of aluminum in antacids, *Clin. Chem.*, 32(3) : 539-541 (1986).

Small, D.H., Non-cholinergic action of acetylcholinesterase : proteases regulating cell growth and development ?, *TIBS*, 15 : 213-216 (1990).

Sorenson, J.R.J., Campbell, I.R., Tepper, L.B. and Ligg, R.D., Aluminum in the environment and human health, *Environ. Health Perspect.*, 8 : 3-95 (1974).

Spencer, A.J., Wood, J.A., Saunders, H.C., Freeman, M.S. and Lote, C.J., Aluminium deposition in liver and kidney following intravenous administration of aluminium chloride or citrate in conscious rats, *Hum. Exp. Toxicol.*,14(10) : 787-94, (1995).

Stewart, W.K., Aluminium toxicity in individuals with chronic renal disease. In : Massey, R.C., Taylor, D., eds. *Aluminium in food and the environment*. Cambridge, UK, The Royal Soc. Chem., 6-19 (1989).

Stoffyn, M., *Science*. 203 : 651(1979). In. *Aluminum in chemistry, biology and medicine*. A Series of Advances vol. 1. eds. M, Nicolini, P.F. Zatta and B. Corain. pp 3-20 New York : Raven Press (1991)..

Sutherland, J.E. and Greger, J.L., Effect of the size of an oral dose of aluminium on the relative importance of biliary v. urinary aluminium excretion in conscious rats, *Food. Chem. Toxicol.*, 36(6): 505-12 (1998).

Taylor, A. and Walker, A.W., Measurement of aluminium in clinical samples, *Ann. Clin. Biochem.*, 29 : 377-389 (1992).

Terry, R.D. and Pena, C., Experimental production of neurofibrillary degeneration. 2. Electron microscopy, phosphatase histochemistry and electron probe analysis, *J. Neuropathol.*, 24 : 200 (1965).

Testolin, G., Erba, D., Ciappellano, S. and Bermano, G., Influence of organic acids on aluminium absorption and storage in rat tissues, *Food. Addit. Contam.*, 13(1) : 21-7 (1996).

Toda, S. and Yase, Y., Effect of aluminum on iron-induced lipid peroxidation and protein oxidative modification of mouse brain homogenate., *Biol.Trace. Elem. Res.*, 61(2) : 207-17(1998).

Trapp, G.A., Plasma aluminum is bound to transferrin., *Life Sci.*, 33 : 311-316 (1983).

Van Ginkel, M.F., Van der Voet, G.B., D'Haese, P.C., DeBroe, M.E. and DeWolff, F.A., Effect of citric acid and maltol on the accumulation of aluminum in rat brain and bone, *J. Lab.Clin. Med.*, 121 : 453-460 (1993).

Verstraeten, S.V., Nogueira, L.V., Schreier, S. and Oteiza, P.I., Effect of trivalent metal ions on phase separation and membrane lipid packing role in lipid peroxidation, *Arch. Biochem. Biophys.*, 338 : 121-127 (1997).

Walker, J.A., Sherman, R.A. and Cody, R.P., The effect of oral bases on enteral aluminum absorption, *Arch. Intern. Med.*, 38 : 937-941 (1990).

Walker, V.R., Sutton, R.A., Meirav, O., Sossi, V., Johnson, R., Klein, J., Fink, D. and Middleton, R., Tissue disposition of ²⁶aluminum in rats measured by accelerator mass spectrometry, *Clin.Invest.Med.*, 17(5) : 420-5 (1994).

Wallace, E., Krantz, M.J. and Lovenberg, W., Dopamine-b-hydroxylase : a tetrameric glycoprotein, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 70 : 2253-2255 (1973).

Walton, J., Hams, G. and Wilcox, D., Bioavailability of aluminium from drinking water : co-exposure with foods and beverages, Research Report 83, Urban Water Research Association of Australia, Melbourne (1994).

Walton, J., Tuniz, C., Fink, D., Jakobsen, G. and Wilcox, D., Uptake of trace amounts of aluminum into the brain from drinking water, *Neuro. Toxicology.*, 16(1) : 187-190 (1995).

Weiss, R. and Grandjean, D. and Pavin, J.L., Structure de l'aluminate tricalcique hydraté, 3CaO. Al₂O₃. H₂O. *Acta Cryst.*17 : 1329 (1964). In. Aluminium toxicity in infants' health and disease.eds. P.F. Zatta and A.C. Alfrey. pp. 3-13 World Scientific (1997).

Whitehead, M.W., Farrar, G., Christie, G.L., Blair, J.A., Thompson, R.P. and Powel, J.J., Mechanisms of aluminum absorption in rats, *Am. J. Clin. Nutr.*, 65(5) : 1446-52 (1997).

Wills, M.R., Hewitt, C.D., Sturgill, B.C., Savory, J. and Herman, M.M., Longterm oral or intravenous aluminum administration in rabbits, I Renal and hepatic changes, *Ann.Cin. Lab. Sci.*,23 : 1-16 (1993).

Wills, M.R. and Savory, J., Aluminum poisoning, dialysis encephalopathy, osteomalacia and anemia, *Lancet.*, 2 : 29-34 (1983).

Wills, M.R. and Savory, J., Aluminum and chronic renal failure : sources, absorption, transport, and toxicity, *Crit. Rev. Clin. Sci.*, 27 : 59-107 (1989).

Xie, C.X. and Yokel, R.A., Aluminum facilation of iron-mediated lipid peroxidation is dependent on substrate, pH and aluminum and iron concentrations, *Arch. Biochem. Biophys.*, 327 : 222-226 (1996).

Yang, M.S., Wong, H.F. and Yung, K.L., Determination of endogenous trace metal contents in various mouse brain regions after prolonged oral administration of aluminum choride, *Journal of Toxicology and Environmental Health., Part A*, 55 : 445-453 (1998).

Yasui, M., Kihira, T. and Ota, K., Calcium, magnesium and aluminum concentration in Parkinson's disease, *Neurotoxicol.*, 13 : 593-600 (1992).

Yokel, R.A., Aluminum chelation : chemistry, clinical and experimental studies and the search for alternatives to desferrioxamine, *J.Toxocol. Environ. Health.*, 41 : 131-74 (1994).

You, G. and Nelson, D.J., Al³⁺ versus Ca²⁺ ion binding to methionine and tyrosine Spin-labeled bovine brain calmodulin, *J. Inorg. Biochem*, 41 : 283-91 (1991).

Zafar, T.A., Weaver, C.M., Martin, B.R., Flarend, R. and Elmore, D., Aluminum (Al-26) metabolism in rats, PROCEEDINGS-OF-THE SOCIETY-FOR-EXPERIMENTAL-BIOLOGY-AND- MEDICINE., 216(1) : 81-85 (1997).

Zaman, K., Zaman, W. and Siddique, H., Hematological and enzymatic results of aluminum intoxication in rats, Comp. Biochem. Physiol. C, 105 : 73-76 (1993).

Zatta, P.F., Nyame, K., Comier, M.J., Mattox, S.A., Prieto, P.A., Smith, D.F. and Cummings, R.D., A solid-phase assay for beta-1,4 galactosyltransferase activity in human serum using recombinant aequorin, Anal. Biochem., 194(1) : 185-91 (1991).

Zatta, P., Favarato, M. and Bordin, C., The inhibition of trypsin and a-chymotrypsin proteolytic activity by Al(III), Arch. Biochem. Biophys., 303 : 407-411 (1993).

Zatta, P., Zambenedetti, P., Bruna, V. and Filippi, B., Activation of acetylcholinesterase by aluminium(III) : the relevance of the metal species, NeuroReport., 5 : 1777-1780 (1994).

Zatta, P., Zambenedetti, P., Pizziuti, A. and Perazzolo, M., Different effects of aluminum upon carbonic anhydrases and Na⁺/K⁺ ATPase activities in rat, Neurosc. Lett., 197 : 65-68 (1995).

Zhang, G., Slaski, J.J., Archambault, D.J. and Taylor, G.J., Aluminum-induced alterations in lipid composition of microsomal membranes from an aluminum-resistant and on aluminum-sensitive cultivar of Triticum aestivum, Phis. Plant. 96 : 683-691 (1996).