HAL
open science

Immobilisation in vitro du plomb par l'apatite : Influence sur la biodisponibilité de ce métal chez le rat

Nathalie Arnich

To cite this version:

Nathalie Arnich. Immobilisation in vitro du plomb par l'apatite : Influence sur la biodisponibilité de ce métal chez le rat. Toxicologie. Université Paul Verlaine - Metz, 2002. Français. NNT : 2002METZ018S . tel-01749699

HAL Id: tel-01749699

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749699v1

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

74550640

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ
N° inv. 2002 0575
Cote S/Mz 02/18
Loc

UNIVERSITE DE METZ
UFR Sciences Fondamentales et Appliquées

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ

Spécialité : TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT

Présentée et soutenue publiquement par

Nathalie ARNICH

le mardi 12 novembre 2002

IMMOBILISATION *IN VITRO* DU PLOMB PAR L'APATITE. INFLUENCE SUR LA BIODISPONIBILITE DE CE METAL CHEZ LE RAT

JURY

Professeur J.-P. ANGER, Université de Rennes (rapporteur)
Professeur F. ARSAC, Université de Reims, (rapporteur)
Professeur P. VASSEUR, Université de Metz (présidente)
Professeur D. BURNEL, Université de Nancy (directeur de thèse)
Docteur M.-C. LANHERS, MCU, Université de Nancy
A. MONTIEL, Directeur de la Direction de la Qualité de l'Environnement (SAGEP)
Docteur R. PODOR, Ingénieu

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ
031 465978 5

UNIVERSITE DE METZ
UFR Sciences Fondamentales et Appliquées

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ

Spécialité : TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT

Présentée et soutenue publiquement par

Nathalie ARNICH

le mardi 12 novembre 2002

IMMOBILISATION *IN VITRO* DU PLOMB PAR L'APATITE. INFLUENCE SUR LA BIODISPONIBILITE DE CE METAL CHEZ LE RAT

JURY

Professeur J.-P. ANGER, Université de Rennes (rapporteur)
Professeur F. ARSAC, Université de Reims, (rapporteur)
Professeur P. VASSEUR, Université de Metz (présidente)
Professeur D. BURNEL, Université de Nancy (directeur de thèse)
Docteur M.-C. LANHERS, MCU, Université de Nancy
A. MONTIEL, Directeur de la Direction de la Qualité de l'Environnement (SAGEP)
Docteur R. PODOR, Ingénieur de Recherche CNRS, Université de Nancy

AVANT-PROPOS

Le présent travail a été proposé par Monsieur le Professeur Daniel BURNEL et a été effectué sous sa bienveillante direction, au Laboratoire de Chimie et Toxicologie de Métaux, Département Environnement et Santé Publique, Unité INSERM U420, de la Faculté de Médecine, de l'Université Henry Poincaré, Nancy I.

Il a fait l'objet d'une publication internationale :

ARNICH Nathalie, LANHERS Marie-Claire, LAURENSOT Franck, PODOR Renaud, MONTIEL Antoine and BURNEL Daniel, *In vitro, in situ* and *in vivo* studies of lead immobilization by synthetic hydroxyapatite, acceptée à *Environmental Pollution*

précédée d'une publication internationale, portant sur une technique expérimentale mise au point au cours de l'année de DEA et appliquée au plomb dans le cadre de ce présent travail :

ARNICH Nathalie, LANHERS Marie-Claire, CUNAT Lisiane, JOYEUX Michel and BURNEL Daniel, 2000, Nickel absorption and distribution from rat small intestine *in situ*, *Biological Trace Element Research* **74** : 141-151

REMERCIEMENTS

Avant de présenter ce travail de recherche, je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers Monsieur le Professeur Daniel BURNEL, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Son esprit scientifique, son soutien et sa confiance m'ont permis de réaliser cette thèse dans les meilleurs conditions possibles.

Je remercie sincèrement le Docteur Marie-Claire LANHERS, pour son engagement dans ce travail et pour m'avoir convaincue que l'esprit de discipline et la rigueur sont deux atouts dans la recherche expérimentale.

Je suis sensible à l'honneur que m'ont fait Mademoiselle le Professeur Paule VASSEUR, d'avoir accepté de présider ce jury et Messieurs les Professeurs Jean-Pierre ANGER et François ARSAC, d'avoir accepté d'être rapporteurs et de juger ce travail.

Que les Docteurs Renaud PODOR et Yves GRIGNON trouvent dans ces quelques mots l'expression de mon amitié et de ma reconnaissance pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail, pour l'aide technique qu'ils m'ont apportée et surtout pour leur disponibilité et leur gentillesse.

Enfin, j'ai une pensée particulière pour le Docteur Lisiane CUNAT, ce fut un plaisir de travailler en sa compagnie.

Merci à ma famille pour sa compréhension et son soutien.

SOMMAIRE

INTRODUCTION **8**
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE **9**
GENERALITES.....**10**
1) PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DU PLOMB 10
2) PRODUCTION ET UTILISATIONS DU PLOMB 10
3) PRINCIPALES SOURCES D'EXPOSITION AU PLOMB 12
3.1) Teneurs atmosphériques en plomb 12
3.2) Teneurs alimentaires en plomb 13
3.3) Teneurs hydriques en plomb 14
3.3.1) Origine du plomb dans l'eau 14
3.3.2) Réglementation 15
3.3.3) Evaluation de la teneur en plomb de l'eau de distribution 15
3.3.4) Paramètres influençant la corrosion des conduites en plomb 16
3.3.5) Traitements destinés à abaisser la teneur en plomb au robinet du consommateur 18
3.4) Contribution des trois principales sources d'exposition à l'apport global en plomb 20
METABOLISME DU PLOMB.....**22**
1) ABSORPTION DU PLOMB 22
1.1) Absorption intestinale 22
1.2) Absorption pulmonaire 26
1.3) Absorption cutanée 26
2) DISTRIBUTION DU PLOMB DANS L'ORGANISME 27
2.1) Distribution sanguine 27
2.1.1) Teneurs sanguines 27
2.1.2) Répartition du plomb entre le sang total et le plasma 28
2.2) Distribution du plomb dans les tissus 29
3) ELIMINATION DU PLOMB 31
4) MODELES BIOCINETIQUES 32
TOXICITE DU PLOMB.....**33**
1) TOXICITE AIGUE 33
2) TOXICITE CHRONIQUE 34
2.1) Système hématologique 34
2.2) Système nerveux 35
2.3) Système rénal 36
2.4) Système cardiovasculaire 36
2.5) Système reproducteur 37

3) TERATOGENICITE, CANCEROGENICITE 37
4) DEPISTAGE : INDICATEURS BIOLOGIQUES 38
4.1) Plombémie 38
4.2) Activité de l'acide delta-aminolévulinique déshydratase (ALAD) 39
4.3) Taux de protoporphyrine érythrocytaire 40
4.4) Plomburie provoquée 41
4.5) Teneur osseuse en plomb 41
5) TRAITEMENTS 41
FACTEURS SUSCEPTIBLES D'INFLUENCER LA TOXICITE DU PLOMB.....43
1) ELEMENTS ESSENTIELS 43
1.1) Calcium 43
1.2) Fer 44
1.3) Phosphore 45
1.4) Zinc 46
1.5) Cuivre 47
1.6) Magnésium 47
1.7) Sélénium 48
2) VITAMINES 48
2.1) Vitamine D 48
2.2) Vitamine C 49
2.3) Vitamine E 50
2.4) Vitamine B1 50
3) AUTRES FACTEURS NUTRITIONNELS 51
3.1) Acides aminés et protéines 51
3.2) Lipides 52
3.3) Lait 52
4) AGE 53
5) SEXE 54
6) FACTEURS GENETIQUES 54
7) FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX 55
8) AUTRES FACTEURS 56
8.1) Alcool 56
8.2) Tabac 57
8.3) Remèdes et maquillages traditionnels 57
8.4) Poteries artisanales "vernies au plomb" 57
IMMOBILISATION DU PLOMB PAR L'APATITE.....58
1) THEORIE DE LA DISSOLUTION/PRECIPITATION 59
2) THEORIE DE L'ECHANGE IONIQUE 60
OBJECTIFS.....62

CHAPITRE II : ETUDE EXPERIMENTALE 64
ETUDE *IN VITRO* DE L'IMMOBILISATION DU PLOMB PAR L'HYDROXYAPATITE 65
Etude physico-chimique 66
1) MATERIEL ET METHODE 66
1.1) Matériel 66
1.1.1) Equipement 66
1.1.2) Petit matériel 66
1.1.3) Réactifs 67
1.2) Méthode 67
2) RESULTATS 68
Etude cristallographique 69
1) MATERIEL ET METHODE 69
1.1) Matériel 69
1.2) Méthode 70
2) RESULTATS 70
Discussion générale 74
ETUDE *IN SITU* DE L'IMMOBILISATION DU PLOMB PAR L'HYDROXYAPATITE 78
1) MATERIEL ET METHODE 79
1.1) Matériel 79
1.1.1) Equipement 79
1.1.2) Petit matériel 80
1.1.3) Réactifs 80
1.2) Animaux 80
1.3) Méthode 81
1.3.1) Contrôles préliminaires 81
1.3.2) Caractéristique des solutions 81
1.3.3) Perfusion *in situ* de l'intestin grêle 82
1.3.4) Prélèvement du sang et des organes 83
1.3.5) Analyse de la teneur en plomb des échantillons 84
1.3.6) Analyse histologique 85
1.3.7) Analyse statistique 85
2) RESULTATS 85
2.1) Analyse histologique 85
2.2) Absorption et distribution du plomb seul 86
2.3) Absorption et distribution du plomb en présence d'hydroxyapatite synthétique dissoute 88
3) DISCUSSION 90
ETUDE *IN VIVO* DE L'IMMOBILISATION DU PLOMB PAR L'HYDROXYAPATITE 92

1) MATERIEL ET METHODE 93
1.1) Matériel 93
1.1.1) Equipement 93
1.1.2) Petit matériel 93
1.1.3) Réactifs 94
1.2) Animaux 94
1.3) Méthode 95
1.3.1) Contrôles préliminaires 95
1.3.2) Caractéristiques des solutions 95
1.3.3) Intubation gastrique des rats 96
1.3.4) Prélèvement du sang et des organes 96
1.3.5) Analyse de la teneur en plomb des échantillons 96
1.3.6) Analyse des teneurs tissulaires en métaux essentiels 97
1.3.7) Analyse histologique des reins 98
1.3.8) Analyse statistique 98
2) RESULTATS 99
2.1) Evolution du poids et de la consommation en croquettes des rats au cours du traitement 99
2.2) Absorption et distribution du plomb en présence d'hydroxyapatite synthétique solide 99
2.3) Teneurs tissulaires en métaux essentiels 101
2.4) Analyse histologique des reins 101
3) DISCUSSION 101
ETUDE *IN VITRO* DE L'IMMOBILISATION DU PLOMB PAR L'APATITE NATURELLE.....106
1) MATERIEL ET METHODE 107
2) RESULTATS 107
3) DISCUSSION 110
CONCLUSION GENERALE 112
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 115
ANNEXES 143

INTRODUCTION

Le plomb constitue un important problème de santé publique, à travers le monde. En effet, la production élevée et les nombreuses utilisations de ce métal ont contribué à son accumulation dans l'environnement. Ainsi, la présence de plomb dans l'essence a conduit à l'élévation des teneurs atmosphériques, principalement dans les grandes agglomérations, mais surtout à la diffusion planétaire de ce polluant.
Depuis l'introduction de l'essence sans plomb, la population générale reste principalement exposée à travers l'alimentation et l'eau de distribution. Concernant les enfants (groupe à risque), la source de contamination privilégiée provient de l'ingestion d'éclats de peintures à base de plomb (habitations antérieures à 1948).

L'intoxication au plomb est appelée saturnisme, mais l'absence de signes cliniques spécifiques rend son diagnostic difficile. En effet, le plomb exerce des effets toxiques aussi bien sur les systèmes digestif, rénal, cardiovasculaire, reproducteur, hématologique que sur le système nerveux, ce dernier étant le plus sensible, particulièrement chez les jeunes enfants.

La confirmation d'une imprégnation saturnine repose, actuellement, sur le dosage de plomb dans le sang (plombémie), même si cet indicateur ne représente pas exactement la charge corporelle en plomb, puisque l'essentiel du métal se trouve dans les différents tissus, dont 90 % dans les os. En effet, le plomb est un toxique cumulatif et le squelette peut représenter une source de contamination interne non négligeable, particulièrement lors d'un déséquilibre métabolique (carence en calcium, en fer, fracture osseuse, grossesse, ...).

Le traitement médical est basé sur l'utilisation de chélateurs, mais sa réussite dépend surtout de l'identification et de l'éviction de la source d'exposition au plomb.

CHAPITRE 1 :

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

GENERALITES

1) PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DU PLOMB

Le plomb (Pb) est un élément chimique métallique dense, de masse atomique 207,2 $g.mol^{-1}$ et de numéro atomique 82, le positionnant dans le groupe 14 (ou IVa) de la classification périodique des éléments de Mendeleïev. Son état d'oxydation le plus important correspond à la valence 2+.

Métal brillant se ternissant à l'air, mou, malléable et ductile, le plomb représente à l'état naturel approximativement 0,002 % de la croûte terrestre. Lorsqu'il est associé au zinc, il constitue son principal minerai appelé la galène (PbS). Il est également présent sous forme d'anglésite ($PbSO_4$), de cérusite ($PbCO_3$), de crocoïse ($PbCrO_4$), de pyromorphite ($Pb_5(PO_4)_3OH$) et de mimétite ($PbCl_{2,3}Pb_3(AsO_4)_2$).

De nombreuses formes isotopiques du plomb ont été mises en évidence, dont quatre sont stables : le plomb 204 (1,4 %), le plomb 206 (25,2 %), le plomb 207 (21,7 %) et le plomb 208 (51,7 %). Les trois dernières formes sont respectivement les derniers éléments de la chaîne radioactive de l'uranium, de l'actinium et du thorium ; le plomb 204 n'a pas de précurseur radioactif. Les isotopes radioactifs (195 à 203, 205, 209 à 214) ont des demi-vies très variées, s'étendant de quelques heures (3,3 h pour Pb^{209}) à plus de 10^7 années (Pb^{205}).

Le plomb est un métal lourd ubiquitaire. Il a été détecté dans tous les compartiments environnementaux (air, sol, eaux de surface et souterraines), ainsi que dans les organismes biologiques (Brodsky, 1978 ; Haguenoer & Furon, 1982 ; Cabridenc *et al.*, 1994, Royer-Morot, 1996 ; Juberg *et al.*, 1997 ; INSERM, 1999).

2) PRODUCTION ET UTILISATIONS DU PLOMB

Les plus importantes réserves de plomb sont situées en Australie, aux USA, en Russie, en Chine, au Canada, au Mexique et au Pérou (Quid, 2000).
En incluant la fraction recyclée, la quantité totale de plomb mise sur le marché au niveau mondial reste à peu prêt constante : elle a été évaluée à 5,5 millions de tonnes en 1984 et à 5,4 millions de tonnes en 1994 (Cabridenc *et al.*, 1994 ; Christensen & Kristiansen, 1994 ; Service canadien de la faune, 1999).

Les utilisations du plomb sont nombreuses et dépendent de la forme chimique considérée (cation libre ou complexé) (Haguenoer & Furon, 1982 ; Cabridenc *et al.*, 1994).

Tableau I : Principales utilisations mondiales du plomb.

UTILISATIONS	% DE LA PRODUCTION MONDIALE
Piles et accumulateurs	63,0
Pigments	12,8
Métal laminé (tubes et tuyaux)	7,7
Gainage de câbles électriques	4,5
Additifs de l'essence	2,2
Autres utilisations	9,9

Le plomb métallique est exploité depuis des millénaires, l'anecdote la plus célèbre étant les conduites d'eau en plomb sous l'Empire Romain. Les utilisations contemporaines du plomb sont encore nombreuses et variées. Les principales ont été recensées en 1999, par le Service canadien de la faune (1999) et sont présentées dans le tableau I. Essentiellement rencontré en métallurgie, le plomb est incorporé en grande quantité dans les batteries et les accumulateurs, ainsi que dans le gainage de câbles électriques. Du fait de sa densité élevée et de ses propriétés nucléaires, le plomb constitue une protection contre les radiations (tabliers, écrans, conteneurs). Les tuyaux en plomb ont longtemps servi à acheminer l'eau potable, majoritairement dans les réseaux privés. Comme utilisation plus récente, le plomb se retrouve dans les composants électroniques.
Mais cet élément est aussi présent dans nos loisirs avec les soldats de plomb, les plombs de chasse ou de pêche, ainsi que dans notre quotidien avec les capsules de surbouchage des bouteilles et les tubes souples pour le conditionnement des pommades.

En France, jusqu'en 1948, une quantité considérable de plomb a été utilisée sous forme de sels, d'oxydes ou d'hydroxydes, en particulier dans les peintures et les pigments, de couleurs très variées. Celles-ci vont du blanc avec l'hydroxycarbonate de plomb ($(PbCO_3)_2$, $Pb(OH)_2$) ou céruse, le chlorure de plomb ($PbCl_2$), au jaune avec l'antimoniate de plomb ($Pb_3(SbO_4)_2$), le chromate de plomb ($PbCrO_4$), le molybdate de plomb ($PbMoO_4$), le vanadate de plomb ($Pb(VO_3)_2$) et au rouge avec le minium (Pb_3O_4), utilisé pour protéger le fer de la corrosion.
Certains vernis peuvent contenir de l'oléate de plomb, du sulfate de plomb ($PbSO_4$), du monoxyde de plomb (PbO) ou litharge.
Si une telle utilisation par les professionnels est interdite depuis 1948, la réglementation n'a été étendue aux particuliers qu'à partir de 1990, avec l'obligation de mentionner sur l'étiquette la présence d'une concentration en plomb supérieure à 0,15 % (soit 1500 ppm) (INSERM, 1999).
Le plomb est également présent dans les allumettes, sous forme de nitrate de plomb ($Pb(NO_3)_2$), de thiocyanate de plomb ($Pb(SCN)_2$), ainsi que de dioxyde de plomb (PbO_2).
Enfin, il est utilisé comme stabilisant de matières plastiques, sous forme de phosphate de plomb ($Pb_3(PO_4)_2$).

D'autre part, le plomb possède une aptitude remarquable à se lier au carbone pour donner des dérivés organiques. Ainsi, dès 1920, le plomb tétraéthyle, $Pb(C_2H_5)_4$, et le plomb tétraméthyle, $Pb(CH_3)_4$, ont été utilisés comme additifs antidétonants dans l'essence (Haguenoer & Furon, 1982 ; Cabridenc *et al.*, 1994 ; INSERM, 1999).
Depuis 2000, 42 pays ont ou sont en train de supprimer l'essence plombée. Si une douzaine de pays ont prévu de le faire d'ici 2005, plus de 150 pays dans le monde n'ont toujours rien décidé (Gavaghan, 2002).
Concernant la France, la teneur en plomb dans le carburant n'a cessé de diminuer depuis 1981, pour atteindre la valeur limite de 0,15 $g.L^{-1}$ en 1991, année d'introduction de l'essence sans plomb (Cabridenc *et al.*, 1994). En outre, la vente de carburant plombé est arrêtée depuis le 1er janvier 2000. Aussi, compte tenu du parc automobile français comportant encore plus

Tableau II : Concentrations en plomb atmosphérique de quelques villes françaises ($ng.m^{-3}$).

VILLES	CONCENTRATIONS EN 1991	CONCENTRATIONS EN 1996
Amiens	210	180
Caen	120	70
Grenoble	700	280
Le Havre	160	70
Lille	120	-
Lyon	650	150
Marseille	200	210 (1995)
Montpellier	500	100
Nantes	320	140
Paris	410	180
Strasbourg	340	0
Toulouse	550	210

(Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement, 1997)

Tableau III : Concentrations en plomb atmosphérique de quelques pays ($ng.m^{-3}$).

PAYS	CONCENTRATIONS	REFERENCES
Finlande (Helsinki)	745 (1980)	Pönkä, 1998
	7 (1996)	
France (moyenne en ville)	200	INSERM, 1999
Chine	310	Zhang *et al.*, 1999b
Corée	220-1596	
Japon	36	
Malaisie	30-462	
Philippines	648	
Thaïlande	210-390	

d'un million de véhicules ne pouvant consommer d'essence sans plomb, un nouveau carburant ("super") a été progressivement mis en place, comprenant un additif de teneur en potassium comprise entre 8 et 20 $mg.kg^{-1}$ (Ministère de l'Economie, des Finances et de l'Industrie, 2002).

3) PRINCIPALES SOURCES D'EXPOSITION AU PLOMB

L'homme est exposé quotidiennement au plomb, de par sa présence dans l'air, les aliments et l'eau de distribution.

3.1) Teneurs atmosphériques en plomb

De manière générale, les teneurs considérées comme "normales", correspondant à des zones théoriquement non contaminées par des émissions anthropogéniques, fluctueraient entre 0,01 à 0,1 $\mu g.m^{-3}$. En milieu urbain, les teneurs observées s'étendraient de 0,5 à 1 $\mu g.m^{-3}$ (Cabridenc *et al.*, 1994 ; INSERM, 1999).

Les données présentées dans le tableau II (teneurs atmosphériques en plomb de quelques villes françaises en 1991 et 1996) montrent une décroissance des concentrations en plomb atmosphérique mesurées en France, entre 1991 et 1996. Cette diminution serait principalement due à l'introduction de l'essence sans plomb et à la diminution de la teneur en plomb de l'essence ordinaire (0,15 $g.L^{-1}$ depuis juillet 1991).

Concernant les données recueillies pour quelques autres pays (tableau III), la Finlande présente une réduction considérable de sa teneur atmosphérique en plomb, les pays asiatiques présenteraient encore des valeurs relativement élevées. Cette pollution (exceptée au Japon) s'expliquerait par l'utilisation encore d'actualité de l'essence plombée, parallèlement aux rejets des activités industrielles (Pönkä, 1998 ; Zhang *et al.*, 1999b).

Le plomb est également présent à l'intérieur des habitations, sous forme de poussières contaminantes, résultant à la fois d'apports externes (pollution atmosphérique, sols contaminés, ...) et d'apports internes liés à la dégradation de peintures au plomb (INSERM, 1999).

L'estimation de l'apport journalier en plomb par inhalation varie de 0,333 µg (Thomas *et al.*, 1999) à 6-9 µg (DGS, 1995).

Tableau IV : Concentrations en plomb dans les aliments (ppb) en France.

ALIMENTS	EXEMPLES	VALEURS LIMITES (Decloître, 1998)	BIEGO, 1999	DGS, 1995
ALIMENTS FRAIS				
Légumes		300		
	Carottes	500	36 (17-55)	Feuilles : 88,6 (10-1190)
	Choux	300	14	Racines : 41,5 (10-90)
	Endives		26	Autres : 108 (2-1870)
	Epinards		108 (94-122)	
	Haricots		18	
	Poireaux		29	
	Pommes de terre	300	19 (10-34)	46,7 (1-357)
	Salades		8,9 (4,2-14,0)	
	Tomates		4,4 (4,2-4,7)	
	Lentilles sèches		194 (192-197)	
Fruits		300		99,9 (24-469)
	Bananes		17 (13-21)	
	Oranges		13 (10-17)	
	Poires		13 (11-14)	
	Pommes		13 (12-15)	
	Abricots secs		87 (64-110)	
Produits de la mer				
	Poissons	500	13 (12-14)	77,8 (7-979)
	Chair de coques	1000	979 (912-1023)	
	Crustacés	2000	298 (228-368)	
	Huîtres/Moules			127 (53-195)/ 264 (79-592)
Viandes Oeufs		250		61,6 (6-689)
	Viande de bœuf		22 (18-32)	
	Viande de porc		26 (12-40)	
	Jambons		75 (52-84)	Charcuteries : 29,8 (9-175)
	Saucisses		63 (33-94)	
	Volailles		5,4 (<2,5-12,1)	
	Œufs	500	< 2,5	
	Abats	1000	154 (114-179)	Foies : 110,1 (10-310)
				Rognons : 506,7 (11-5500)
Produits laitiers		50		
	Laits		< 2,5	13,5 (2-84)
	Laits concentrés		17,5	
	Laits en poudre		< 2,5	
	Yaourt		< 2,5	} 28,6 (17-41)
	Fromage		85 (78-95)	
ALIMENTS DIVERS				
Produits céréaliers		500		
	Pains		15,9 (8,3-23,5)	31 (9-48)
	Pâtes/Riz		< 2,5	
Matières grasses				
	Huiles		5,3 (2,9-7,7)	
	Beurre	50	< 2,5	35 (10-90)
Sucreries				
	Sucre		< 2,5	
	Chocolat		73,6	
Boissons				
	Vins	250	52 (37-70)	69 (28-183)
	Bières	250	< 2,5	4,6 (1-10)
	Eaux de vie		9,6 (4,5-15)	
	Eaux minérales		< 2,5	
ALIMENTS EN CONSERVES				
Légumes			40 (4,5-108)	
Fruits			51 (18-118)	
Plats cuisinés			48 (15-73)	
Poissons		86 (31-136)		

3.2) Teneurs alimentaires en plomb

De manière générale, on retrouve du plomb dans tous les aliments, toutefois les teneurs sont très variables (Tableau IV).

En France, les aliments présentant les teneurs en plomb les plus élevées sont les abats (foie, rognons), les mollusques bivalves (coques, huîtres, moules), les crustacés (crevettes) et certains légumes tels que les lentilles sèches et les épinards. Toutefois, compte tenu des habitudes alimentaires françaises, les apports de plomb les plus importants proviendraient des légumes (pomme de terre), du pain et du vin (Direction Générale de la Santé, 1993, 1995 ; Decloître, 1998).
A signaler que la concentration en plomb du vin a régressé ces dernières années, grâce à une modification des méthodes de vinification et à l'abandon des capsules contenant du plomb (Direction Générale de la Santé, 1995 ; Decloître, 1998).

La présence du plomb dans les aliments pourrait résulter, en partie, d'une contamination au niveau de la production industrielle et par les contenants eux-mêmes (récipients en céramique, en émail, en cristal, en étain, soudures des boîtes de conserve, capsules des bouteilles de vin, ustensiles, ...) (Mahaffey, 1985 ; Philipp & Gerson, 1994 ; Juberg *et al.*, 1997 ; INSERM, 1999 ; Brown *et al.*, 2000 ; Rothenberg *et al.*, 2000). Ainsi, selon une étude mexicaine, réalisée sur des femmes, l'utilisation de céramiques vernies au plomb serait responsable d'un excès de plomb sanguin de 14 $\mu g.L^{-1}$ (Hernandez-Avila *et al.*, 1997).

Les contrôles concernant la présence du plomb dans les aliments se sont intensifiés. Par exemple, concernant la viande d'animaux de boucherie, leur nombre est passé de 600 en 1995, à 1000 en 1997 et à 3800 en 1998 (INSERM, 1999). Toutefois, certains aliments y échappent, notamment le gibier issu de la chasse personnelle (Santosa *et al.*, 2001).

Selon de récents travaux, l'estimation française de la dose journalière ingérée (DJI) de plomb varie de 43 à 52 µg, soit une dose hebdomadaire ingérée (DHI) de 301 à 364 µg (Biego, 1999 ; Leblanc *et al.*, 2000). Cette estimation reste inférieure à la dose hebdomadaire tolérée (DHT), établie à 25 $\mu g.kg^{-1}$ (soit 1500 µg pour un adulte de 60 kg), en 1993, par le comité joint d'experts FAO/OMS des additifs alimentaires (OMS, 1997). A noter que cette DJI avait précédemment été évaluée à 165 µg en 1978 et entre 73 et 123 µg en 1992 (Direction Générale de la Santé, 1995).

Une tendance similaire à la baisse a pu être constatée au Royaume-Uni et aux USA (Bolger *et al.*, 1996 ; Ysart *et al.*, 2000). Selon les auteurs, elle pourrait s'expliquer par la réduction des rejets, notamment atmosphériques (essence sans plomb), par la mise en œuvre de Bonnes Pratiques de Fabrication dans l'élaboration et le conditionnement des aliments en conserves et

Tableau V : Estimation de l'apport alimentaire journalier en plomb (années de l'étude, np : non précisée).

PAYS	APPORT JOURNALIER ESTIME (µg)	REFERENCES
Allemagne	19 (1995) sans eau	Seifert & Anke, 2000
Asie de l'Est et du Sud-Est	7-32 (1991-1997)	Ikeda *et al.*, 2000
Chine	25 (1993-1997)	Zhang *et al.*, 1999b
Corée	21 (np)	Zhang *et al.*, 1999b
Danemark	27 (1988-1992) 31-104 (np)	Decloître, 1998 Christensen & Kristiansen, 1994
Finlande	18 (1991) 10-40 (np)	Decloître, 1998 Pönkä, 1998
France	50 (1991) 73-123 (1992) 68 (1990-1993) 43 (np)	Hartemann, 1994 DGS, 1995 Decloître, 1998 Biego, 1999
Japon	15(np) 7,7 (1991-1997) 9 (1991-1997)	Zhang *et al.*, 1999b Ikeda *et al.*, 2000 Zhang *et al.*, 2000
Malaisie	10 (np)	Zhang *et al.*, 1999b
Pays Bas	32 (1989)	Decloître, 1998
Pays Basque espagnol	43 (1996)	Decloître, 1998
Philippines	11 (np)	Zhang *et al.*, 1999b
Royaume-Uni	26 (1997)	Ysart *et al.*, 2000
Suède	26 (1990)	Decloître, 1998
Thaïlande	15 (1998)	Zhang *et al.*, 1999a
USA	5-11 (1991) 1,82-4,17 (1991) 11 (1995) 3-4 (1996) 11 (1995)	Carrington & Bolger, 1992 Bolger *et al.*, 1996 Thomas *et al.*, 1999 Decloître, 1998 Thomas *et al.*, 1999

des vins, ainsi que par l'établissement d'une réglementation concernant notamment les contenants à usage alimentaire (céramiques, ...), l'emploi d'additifs, etc.
Les estimations de l'apport alimentaire en plomb différent selon les pays (tableau V), en raison de la variabilité des teneurs dans les différents aliments, ainsi que de la méthodologie utilisée (stratégie d'échantillonnage, technique de dosage, ...). Comparativement aux autres pays, l'apport alimentaire en plomb reste élevé en France (INSERM, 1999) ; en effet, il correspond au double, voire au triple, des pays asiatiques, au double des autres pays européens et représente 10 fois l'estimation américaine la plus récente.

A noter que l'EPA (US Environmental Protection Agency) a estimé que chaque µg de plomb ingéré (dans le cas d'une exposition alimentaire de faible niveau, inférieure à 30 $\mu g.j^{-1}$) conduisait à une élévation de la plombémie de 2 $\mu g.L^{-1}$ chez l'enfant, quatre fois moins chez l'adulte (Bolger *et al.*, 1996).

3.3) Teneurs hydriques en plomb

3.3.1) Origine du plomb dans l'eau

Le plomb est présent dans l'eau de boisson, à la robinetterie du consommateur. La contamination provient du contact de l'eau avec les matériaux de transport et non de la source, l'eau sortant des captages et des installations de traitement étant normalement toujours inférieure aux seuils de détection analytique (Baron & Leroy, 2001 ; Boireau *et al.*, 2001). Pour exemple, on peut citer les anciennes canalisations en plomb massif (toute nouvelle pose est interdite depuis l'arrêté 95-363 du 5 avril 1995), les soudures à l'étain-plomb, les brasures à base de plomb (interdites depuis l'arrêté du 10 juin 1996), les polymères contenant du stéarate de plomb, les robinets en laiton (Boireau, 1997 ; Godet & Leroy, 1999 ; INSERM, 1999 ; Boireau & Philippe, 2001).

En France, le plomb a été utilisé pour les réseaux privés de distribution d'eau jusqu'en 1948. Une enquête datant de 1995 a évalué qu'en moyenne 40 % des branchements (soit 4 millions) étaient en plomb, ce qui représenterait une longueur cumulée de 40000 km. Si cette proportion est plus faible (10 %) en zone rurale, elle dépasse fréquemment 50 % dans les grandes agglomérations, pour avoisiner 70 % en région parisienne (Boireau, 1997 ; INSERM, 1999 ; Boireau & Philippe, 2001).

Bien qu'elle soit rarement la cause unique d'intoxication saturnine, la présence de plomb dans l'eau de distribution peut significativement accroître l'exposition globale d'une personne, particulièrement des enfants. Par exemple, dans le département des Vosges (France) ou encore à Glasgow (Ecosse), ainsi que dans de nombreuses autres villes du Royaume-Uni, caractérisées par une eau agressive et la présence de canalisations en plomb, la plombémie des habitants est significativement corrélée à la teneur en plomb de l'eau livrée à la

consommation (Pocock *et al.*, 1983 ; Sherlock *et al.*, 1984 ; Bonnefoy *et al.*, 1985 ; Thiriat-Delon *et al.*, 1994 ; Watt *et al.*, 1996, 2000 ; Kuntz *et al.*, 1999).

3.3.2) Réglementation

Sur la base d'une dose journalière tolérable (DJT) estimée, en 1972, à 7 µg par kilo de poids corporel, la directive européenne 80/778/CEE fixait, en 1980, la concentration maximale admissible (CMA) du plomb dans l'eau à 50 $\mu g.L^{-1}$.

En 1993, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) proposait une valeur guide (VG) de 10 $\mu g.L^{-1}$, obtenue selon l'équation suivante, appliquée à la population à risque (les nourrissons) : **VG = DJT x poids corporel x p/c** où **p** est la proportion de la DJT attribuable à l'eau (50 % pour le nourrisson et l'enfant), **c** la consommation journalière d'eau de boisson (0,75 L pour le nourrisson), pour un poids de 5 kg et pour une **DJT** de 3,5 $\mu g.kg^{-1}$.
Suite à ces recommandations, la nouvelle directive européenne 98/83/CE du 3 novembre 1998, relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine, prévoit une diminution progressive de la CMA de 25 $\mu g.L^{-1}$ en 2003 à 10 $\mu g.L^{-1}$ en 2013 (INSERM, 1999 ; Baron & Leroy, 2001). A noter que cette directive déplace le prélèvement de l'échantillon du compteur d'eau au robinet du consommateur (Montiel *et al.*, 2001).
En comparaison, la norme américaine fixée par l'Environmental Protection Agency est de 15 $\mu g.L^{-1}$ (EPA, 1999).

3.3.3) Evaluation de la teneur en plomb de l'eau de distribution

La mesure de la teneur en plomb de l'eau de distribution au robinet du consommateur peut varier rapidement dans des proportions importantes, du fait des nombreux paramètres influençant la dissolution du plomb, suite à la corrosion des canalisations (paragraphe 3.3.4). Des valeurs de quelques centaines de microgrammes par litre ne sont pas rares et le milligramme par litre n'est pas impossible (INSERM, 1999). L'absence de protocole d'échantillonnage standard rend impossible la détermination fiable de la concentration en plomb et rend d'autant plus difficile l'application de la nouvelle directive européenne.

En effet, il existe cinq grands types de méthodes de prélèvements : le prélèvement aléatoire, le prélèvement après écoulement, le prélèvement au premier jet après une stagnation d'une nuit ou une stagnation contrôlée de 30 min (temps moyen de stagnation pour une famille de quatre personnes) et enfin, le prélèvement proportionnel. Réalisée à l'aide d'un robinet intégrateur, cette dernière technique permet de récupérer un volume proportionnel au volume de chaque soutirage et d'obtenir un échantillon représentatif de l'eau consommée ; toutefois, son usage est limité par son coût et la contrainte qu'elle engendre auprès de l'usager.

Selon une étude menée, en 1999, par l'AGHTM (Association Générale des Hygiénistes et Techniciens Municipaux), le prélèvement aléatoire présentait une reproductibilité insuffisante, mais il permettrait de réaliser un diagnostic dans une zone de distribution (unité géographique présentant des qualités d'eau identiques), à condition de réaliser un nombre de points suffisant (30 à 60), eux-mêmes sélectionnés de manière aléatoire. Au niveau individuel, le prélèvement après stagnation contrôlée de 30 min semble préférable (Baron, 1997, 2000 ; Boireau, 1997 ; Baron & Leroy, 2001 ; Montiel *et al.*, 2001).

Des travaux menés en milieu urbain par l'AGHTM, depuis 1993, montrent que les limites de 25 et 10 $\mu g.L^{-1}$ sont dépassées dans respectivement 29 et 65 % des cas, en présence de conduites en plomb. En absence de plomb massif dans le réseau, 20 % des cas ne respectent pas le seuil de 10 $\mu g.L^{-1}$ (Baron, 1997).
Des concentrations proches de 50 $\mu g.L^{-1}$ sont parfois relevées, même après écoulement, tandis que les relargages de plomb peuvent atteindre plusieurs centaines de microgrammes par litre, après stagnation (Cordonnier, 1997 ; Gulson *et al.*, 1997a). A noter que des teneurs de 1 à 2 $mg.L^{-1}$ au premier jet ont pu être observées dans certaines régions, notamment françaises et écossaises, en raison de leur caractéristiques géochimiques (Seux *et al.*, 1994 ; Galvin, 1996 ; INSERM 1999) ; une valeur anormalement élevée (5 $mg.L^{-1}$) a même pu être relevée dans le département des Vosges (Thiriat-Delon *et al.*, 1994).

3.3.4) Paramètres influençant la corrosion des conduites en plomb

La corrosion des canalisations en plomb correspond à l'oxydation de cet élément, selon la réaction $Pb + ½ O_2 + H_2O \rightarrow Pb^{2+} + 2 OH^-$ (Cordonnier, 1997).
Les ions Pb^{2+}, OH^- et éventuellement CO_3^{2-}, se retrouvent dans la couche limite, en contact avec la paroi en plomb, conduisant à la formation de carbonate de plomb ($PbCO_3$), d'hydroxycarbonate de plomb ($(PbCO_3)_2$, $Pb(OH)_2$ ou $Pb_3(CO_3)_2(OH)_2$) et d'hydroxyde de plomb ($Pb(OH)_2$). Ces composés présentant globalement une charge positive sont donc attirés par la paroi, chargée négativement. Il se forme alors un dépôt, si les concentrations en CO_3^{2-} et OH^- sont suffisantes.
Toutefois, du plomb particulaire peut parfois apparaître, suite à une perte d'adhérence des dépôts (vitesse de l'eau excessive, turbulences) ou à la présence d'une vanne en laiton (formation de couples galvaniques, les parois en laiton étant cathodiques et les parois en plomb anodiques).

Ce phénomène de corrosion des conduites en plomb ne compromet pas leur longévité, en raison de son caractère uniforme, de sa très faible vitesse et de l'épaisseur importante des parois (Legrand & Leroy, 1995 ; Boireau & Philippe, 2001). En revanche, il engendre l'élévation de la concentration en plomb mesurée au robinet du consommateur, suite à la dissolution de cet élément.

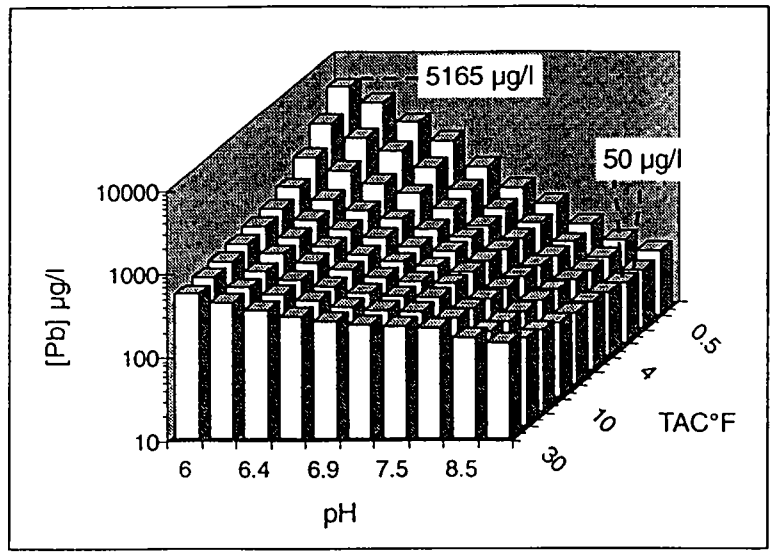


Figure 1 : Solubilité théorique du plomb à 25 °C en fonction du pH et du TAC de l'eau (Baron & Leroy, 2001).

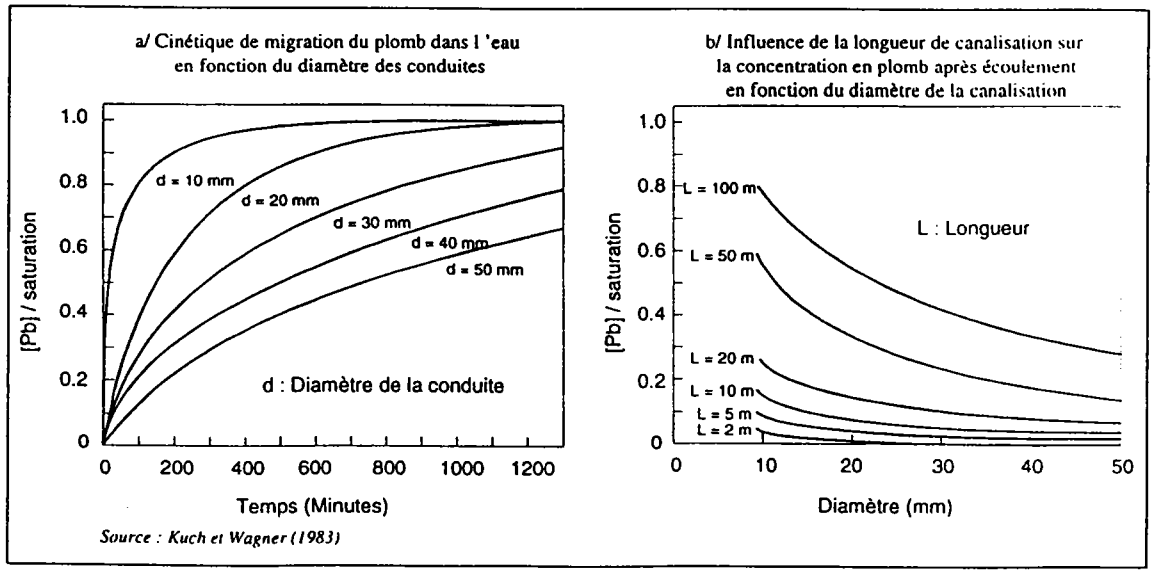


Figure 2 : Influence du diamètre et de la longueur des canalisations en plomb sur la migration du plomb dans l'eau (Baron & Leroy, 2001).

Les principaux paramètres influençant cette corrosion sont la présence de plomb dans le réseau, les caractéristiques de l'eau transportée et du réseau, ainsi que le temps de contact entre l'eau et le matériau.

- Présence de plomb dans le réseau

Les conduites d'eau potable en plomb sont présentes dans les réseaux intérieurs des immeubles et au niveau des branchements entre les réseaux public et privé. Le plomb n'a jamais été utilisé pour les canalisations publiques, en amont des branchements (Montiel *et al.*, 2001 ; Baron & Leroy, 2001).

Cet élément peut également être présent au niveau des anciennes soudures et brasures. Ainsi, les soudures dites à l'étain, présentes sur les conduites en cuivre, contiennent environ 60 % de plomb ; toutefois, l'utilisation de telles soudures est interdite depuis 1995.

Enfin, le plomb peut être un constituant d'autres matériaux employés essentiellement dans le réseau privé (Montiel *et al.*, 2001 ; Al-Malack, 2001 ; Baron & Leroy, 2001) :

- l'acier galvanisé dont le zinc peut contenir jusqu'à 1 % de plomb,
- le laiton et les alliages cuivreux que l'on retrouve dans les robinetteries et les vannes pouvant présenter 5 à 6 % de plomb,
- les PVC de fabrication étrangère pouvant intégrer des stabilisants à base de sels de plomb.

- Caractéristiques de l'eau transportée

Deux types d'eau sont considérés "à risques potentiels" :

- les eaux "douces" agressives et corrosives, à pH bas (< 6,5) et peu minéralisées (calcium), avec de faibles teneurs en hydrogénocarbonates, correspondant à un TAC bas (titre alcalimétrique complet),
- certaines eaux "dures", avec des teneurs en calcium et en hydrogénocarbonates élevées.

En effet, la solubilité du plomb est influencée par le pH et le TAC de l'eau ; plus ces deux paramètres sont bas, plus la concentration en plomb dans l'eau transportée est élevée (figure 1).

La température est également un paramètre à considérer ; effectivement, les conduites intérieures ont souvent une température supérieure (de plus de 10 °C) à celle des conduites enterrées, ce qui double la capacité de dissolution du plomb (Boireau *et al.*, 2001 ; Cordonnier & Boireau, 2001).

- Caractéristiques du réseau

Le contact entre l'eau et le métal dépend de la longueur des conduites et de leur diamètre (figure 2), sachant que plus ce dernier est petit, plus la concentration en plomb de l'eau augmente rapidement.

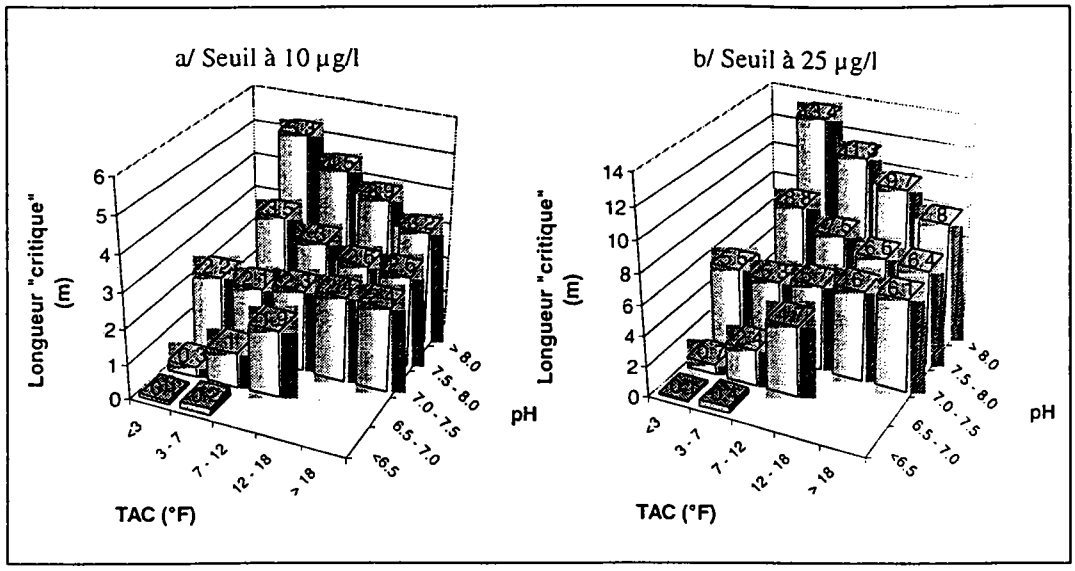


Figure 3 : Estimation des "longueurs critiques" de canalisations en plomb en fonction du pH et du TAC de l'eau (risque de dépassement du seuil inférieur à 5 % en deçà de la longueur critique) (Baron & Leroy, 2001).

Le tracé du réseau et son environnement jouent également un rôle sur la teneur en plomb de l'eau. Ainsi, le couplage avec d'autre matériaux métalliques, le passage dans des locaux surchauffés, les vibrations, le fait que le réseau soit utilisé comme prise de terre sont autant de circonstances qui peuvent favoriser la dissolution du plomb.
Le réseau peut être caractérisé par sa longueur critique (figure 3), c'est-à-dire la longueur des conduites au-delà de laquelle le risque de dépasser la concentration maximale admissible est inférieur à 5 %, compte tenu des conditions de pH et de TAC de l'eau transportée. Cette estimation montre que, pour un seuil de 10 $\mu g.L^{-1}$, la longueur critique est très faible, même pour des eaux très faiblement agressives (5 m pour un pH supérieur à 8).
(Cordonnier, 1997 ; Baron & Leroy, 2001 ; Montiel *et al.*, 2001)

- Temps de contact entre l'eau et le matériau

La teneur en plomb de l'eau transportée augmente avec le temps de contact, jusqu'à une valeur d'équilibre thermodynamique, variant de quelques heures, pour les conduites de faible diamètre (environ 10 h pour un diamètre de 10 mm), à plus d'une journée pour un diamètre plus élevé (au-delà de 24 h pour un diamètre de 30 mm).
Le temps de contact entre l'eau et le plomb dépend non seulement de la longueur du réseau intérieur, mais aussi du comportement de l'utilisateur (répartition des soutirages au cours de la journée, temps de stagnation, débit, pratique d'une purge avant la consommation de l'eau, ...) (Baron & Leroy, 2001).

3.3.5) Traitements destinés à abaisser la teneur en plomb au robinet du consommateur

Le respect à long terme de la valeur maximale admissible de 10 $\mu g.L^{-1}$ implique le remplacement systématique des conduites en plomb massif, voire de celles en matériaux connues pour relarguer du plomb (acier galvanisé, certains PVC, laiton, ...). Le coût de cette éradication est estimé entre 8,4 et 21,8 milliards d'euros, dont 80 % seraient à la charge des propriétaires de réseaux intérieurs. Toutefois, le bénéfice sanitaire annuel attendu, suite à la baisse de la plombémie des enfants de moins de 6 ans, serait comprise entre 27,5 millions et 1,3 milliards d'euros (INSERM, 1999 ; Mariet, 1999 ; Boireau & Philippe, 2001).

Compte tenu de ce coût, du temps nécessaire au remplacement des branchements et des conduites contenant du plomb sur l'ensemble du territoire et de l'hésitation quant au matériau de remplacement, il est indispensable de mettre en place des actions correctives (traitement centralisé de l'eau ; informations aux consommateurs, avec établissement d'un code de bonne pratique (annexe 1) (Leroy, 1993 ; Baron, 2000 ; Rapinat, 2001).

Ainsi, le traitement de l'eau a pour but de favoriser la formation d'une couche protectrice peu soluble à la surface de la conduite en plomb. Cette passivation peut être naturelle, par formation d'une couche carbonatée d'hydroxycarbonate de plomb, $Pb_3(CO_3)_2(OH)_2$, si les

conditions de pH et d'alcalinité sont adéquates ; elle peut être obtenue également par injection d'inhibiteurs de corrosion (Cordonnier, 1997). Toutefois, dans ce second cas, si la norme de 25 $\mu g.L^{-1}$ peut être généralement respectée, celle de 10 $\mu g.L^{-1}$ ne peut l'être qu'après écoulement (Boireau, 1997 ; Gaujous *et al.*, 2000 ; Cordonnier & Boireau, 2001).

- Choix du traitement

Le traitement à employer diffère selon la nature de l'eau transportée.

- Les eaux "douces"

Elles peuvent bénéficier d'une neutralisation, d'une reminéralisation ou d'un traitement filmogène.

La neutralisation et la reminéralisation ont pour but de relever le pH, le première par ajout de produits alcalins tels que la chaux ou la soude, la seconde par filtration sur matériaux calcaires ou par injection de gaz carbonique et de chaux.

Le traitement filmogène est un procédé à base de phosphates. Le produit le plus efficace est l'orthophosphate, conduisant à la formation d'orthophosphates de plomb tels que la pyromorphite $Pb_5(PO_4)_3OH$. L'apport simultané de zinc offre une action synergique sur la vitesse de corrosion et la rapidité de formation du film protecteur. La diminution moyenne des teneurs en plomb mesurées varie de 65 à 90 %. Les concentrations maximales admissibles en phosphates (exprimée en P_2O_5) et en zinc sont de 5 $mg.L^{-1}$, pour les eaux destinées à la consommation humaine. Au niveau des rejets, l'impact de l'utilisation des phosphates est relativement faible, en comparaison des autres apports de phosphore (environ 10 %). En revanche, concernant le zinc, l'incidence est non négligeable et peut compromettre la valorisation agricole des boues de station d'eaux résiduaires.

- Les eaux "dures"

Elles peuvent bénéficier d'une décarbonatation partielle pour abaisser le titre alcalimétrique ou d'un traitement filmogène.

La décarbonatation partielle peut se faire par ajout de chaux ou de soude, pour précipiter le carbonate de calcium, par échange ionique sur une résine carboxylique ou par passage sur une membrane de nanofiltration. Cette dernière technique permet une diminution de la teneur moyenne en plomb mesurée de 50 %.

Le traitement filmogène à base de phosphates peut employer de l'orthophosphate, un mélange d'ortho et de polyphosphates ou un mélange d'orthophosphate et de sels de zinc. Toutefois, ce traitement est limité aux eaux de dureté (concentrations en calcium et magnésium) inférieure à 30°F, limite au-delà de laquelle des précipités de phosphate de calcium peuvent se former (Cordonnier, 1997 ; Boireau *et al.*, 1997, 2001 ; Cordonnier & Boireau, 2001).

De nouveaux traitements, indépendants de la nature de l'eau, sont actuellement à l'étude. Il permettraient la réhabilitation des conduites en plomb des réseaux intérieurs, par l'application d'un film polymère sur la paroi interne. Toutefois, les polymères testés

présentent encore quelques défauts, notamment une perméabilité résiduelle au plomb et le relargage de composés indésirables (Boireau *et al.*, 2001).

Enfin, la dernière possibilité serait la mise en place d'un robinet "anti-plomb". Ce dispositif serait constitué d'une cartouche placée à la sortie du robinet, chez le consommateur. Le cahier des charges comprend différents critères :
- diminution de la teneur en plomb en dessous de 10 $\mu g.L^{-1}$
- efficacité du dispositif quelle que soit la qualité de l'eau
- faible encombrement
- débit de 2 $L.min^{-1}$
- durée de vie d'une cartouche : 6 mois, soit 1100 L (base de 6 L par jour)
- prix du litre d'eau délivrée 10 fois inférieur à celui d'une eau embouteillée
- "alimentarité" et non-dégradation de la qualité de l'eau (Boireau *et al.*, 2001).

Toutefois, ces filtres présentent l'inconvénient d'être une source potentielle de contamination microbiologique et leur efficacité sous-entend l'entière collaboration du consommateur qui devra pratiquer un changement régulier (Jackson, 1996 ; Hitchmough, 1997).
Une étude australienne portant sur des cartouches de la marque BRITA, composées d'une résine échangeuse d'ions et de charbon actif, a montré une large différence de capacité de rétention du plomb, selon les caractéristiques de l'eau. De plus, après un certain temps d'utilisation, la valeur de 10 $\mu g.L^{-1}$ était dépassée, dans les eaux au 1er jet (Gulson *et al.*, 1997b).

- <u>Coût du traitement</u>

Le coût de l'utilisation d'inhibiteurs de corrosion est de l'ordre de 0,0076 à 0,030 euros par m^3. La mise en place de stations de traitement (reminéralisation, décarbonatation, etc.) revient entre 0,076 et 0,305 euros par m^3 (Cordonnier & Leroy, 2001).

3.4) Contribution des trois principales sources d'exposition à l'apport global en plomb

La contribution des trois principales sources d'exposition (alimentation, air, eau) à l'apport global en plomb, varie en fonction du milieu géographique et du mode de vie des individus. Par exemple, l'estimation de la contribution hydrique serait de 28 % en France (Hartemann, 1994) et de 20 % aux USA (EPA, 1999).
De manière générale, l'Organisation Mondiale de la Santé a estimé la part moyenne des apports en plomb à 49 % par les boissons conditionnées, 35 % par les aliments solides et 16 % par l'eau de boisson (robinet) (Galal-Gorchev, 1993).

Selon une étude française de 1994 basée sur deux environnements, l'un qualifié de peu exposant et l'autre d'exposant au plomb (tableau VI), la principale source de plomb pour le

nourrisson proviendrait de l'eau (49-52 %) ; le jeune enfant et l'adulte seraient surtout exposés par la nourriture (respectivement 49-45 % et 66-57 %) (Hartemann, 1994).

Plus récemment, un groupe d'experts, réunis par l'INSERM pour évaluer l'incorporation quotidienne de plomb, a distingué cinq environnements : rural, rural exposé (eau agressive), urbain, urbain exposé (habitat dégradé) et industriel. Dans les trois premiers cas, la principale source d'exposition au plomb serait l'eau chez le nourrisson et l'alimentation chez l'enfant. En revanche, dans les deux derniers environnements, l'ingestion de poussières représenterait la majorité de l'apport en plomb. Concernant l'adulte, la contamination serait principalement alimentaire (INSERM, 1999).

Tableau VI : Contribution des différentes sources aux apports de plomb en France (Hartemann, 1994).

Environnement peu exposant

MILIEUX	TENEURS	NOURRISSON (3 mois, 5 kg)	ENFANT (2 ans, 13,6 kg)	ADULTE (70 kg)
AIR	0,1 $\mu g.m^{-3}$	1,6 %	1,8 %	2,6 %
EAU	10 $\mu g.L^{-1}$	49,0 %	22,4 %	26,4 %
ALIMENTS	Variables	37,9 %	48,8 %	66,1 %
POUSSIERES	180 $\mu g.g^{-1}$	11,8 %	26,9 %	4,8 %

Environnement exposant

MILIEUX	TENEURS	NOURRISSON (3 mois, 5 kg)	ENFANT (2 ans, 13,6 kg)	ADULTE (70 kg)
AIR	1,0 $\mu g.m^{-3}$	6,9 %	8,2 %	11,3 %
EAU	25 $\mu g.L^{-1}$	51,9 %	25,6 %	28,4 %
ALIMENTS	Variables	32,5 %	44,8 %	56,7 %
POUSSIERES	310 $\mu g.g^{-1}$	8,6 %	21,3 %	3,5 %

METABOLISME DU PLOMB

1) ABSORPTION DU PLOMB

Les voies d'entrée du plomb dans l'organisme sont diverses : orale, respiratoire et cutanée. Un nombre important d'études s'est intéressé à ces différentes voies, dans le but d'estimer le taux d'absorption de cet élément et d'identifier les mécanismes mis en jeu.

1.1) Absorption intestinale

Le taux d'absorption intestinale généralement reconnu chez l'homme adulte varie de 5 à 10 % de la dose de plomb ingérée. Deux protocoles expérimentaux ont permis d'aboutir à ces estimations :

- soit par un bilan alimentaire, c'est-à-dire en retranchant la teneur en plomb retrouvée dans les fèces à celle du duplicata des repas, enrichis ou non en isotope non radioactif du plomb (^{204}Pb) durant 1 à 124 jours (Rabinowitz *et al.*, 1974, 1975, 1976, 1980) voire des années (Kehoe, 1961)
- soit par l'utilisation d'un isotope radioactif du plomb (^{203}Pb) en comparant la radioactivité corporelle des sujets, 7 jours après l'ingestion du traceur, aux données obtenues par injection intraveineuse de ^{203}Pb (Watson *et al.*, 1986).

Selon Thompson (1971), la rétention du plomb dans l'organisme, qui correspond à l'apport alimentaire en cet élément retranché de la quantité de plomb excrété dans les fèces et les urines, serait moins importante que l'absorption intestinale, n'atteignant pas 4 % de la dose ingérée après 12 à 28 jours.

En revanche, chez le jeune enfant, les taux d'absorption intestinale et de rétention sont nettement plus élevés que chez l'adulte, atteignant respectivement 41 à 53 % et 18 à 32 % selon les études (Alexander *et al.*, 1972 ; Ziegler *et al.*, 1978).

Les résultats de différentes études expérimentales menées chez l'homme indiquent que l'absorption gastro-intestinale du plomb est augmentée lorsque celui-ci est ingéré en absence de nourriture. De manière générale, la fraction absorbée serait multipliée par un facteur 4 à 6 (Rabinowitz *et al.*, 1975, 1980 ; Blake, 1976 ; Flanagan *et al.*, 1982 ; Heard & Chamberlain, 1982 ; Blake *et al.*, 1983 ; James *et al.*, 1985).

Selon Morton et collaborateurs (1985), en présence d'aliments, la majorité du plomb serait sous forme insoluble dans l'intestin grêle (carbonates, oxydes et hydroxydes de plomb) et seulement 10 % du plomb seraient solubles (complexes inorganiques, plomb cationique (Pb^{2+}), complexes avec les sels biliaires et des acides aminés).

De nombreux travaux ont été menés chez l'animal, essentiellement chez les rongeurs (souris, rats), mais également chez le poulet (Mykkänen & Wasserman, 1981, 1982 ; Edelstein *et al.*, 1984) et le singe (O'Flaherty *et al.*, 1996).
Les estimations du taux d'absorption intestinale s'étendent de 1 à 82 %. Cette hétérogénéité résulte de l'influence de nombreux paramètres, tels que l'espèce animale, la dose de plomb, la forme chimique (acétate, chlorure, sulfate) et la technique utilisée (perfusion intestinale, intubation gastrique, intoxication orale par l'alimentation ou la boisson).

De surcroît, le type d'alimentation solide ou de boisson administrées aux animaux peut également avoir un effet sur l'absorption intestinale du plomb.
Ainsi, l'utilisation d'une alimentation dite purifiée ou semi-purifiée par certains auteurs est connue pour maximiser l'absorption du plomb, du fait de sa faible teneur en calcium et en fibres (Cerklewski & Forbes, 1976a, b, 1977 ; Mylroie *et al.*, 1978 ; Bushnell & DeLuca, 1983 ; Freeman *et al.*, 1992, 1996). De manière plus générale, les variations constatées au niveau de la composition des croquettes déshydratées pour animaux de laboratoire, selon les différents fournisseurs, pourraient largement influencer les résultats des études sur l'absorption intestinale du plomb (DeLuca *et al.*, 1982).
De même concernant la boisson, quelques auteurs utilisent l'eau du robinet (Barltrop & Meek, 1975 ; Bushnell & DeLuca, 1983 ; Palminger Hallén & Oskarsson, 1995), tandis que d'autres préfèrent l'eau déminéralisée voire distillée (Forbes & Reina, 1972 ; Cerklewski & Forbes, 1976, 1977 ; Barton *et al.*, 1978a, b ; Conrad & Barton, 1978 ; Barton *et al.*, 1980 ; Aungst *et al.*, 1981 ; Barton & Conrad, 1981 ; Yannaï & Sachs, 1993 ; Freeman *et al.*, 1996).
Parmi les différents facteurs pouvant modifier l'absorption intestinale du plomb chez l'animal, il faut également citer les sécrétions biliaires.
Effectivement, différentes études réalisées sur l'animal (perfusions intestinales avec ou sans ligature du canal cholédoque) ont pu mettre en évidence une élévation du taux d'absorption du plomb, en présence de bile ; les auteurs ont ainsi suggéré la formation de complexes de plomb avec certains composés biliaires, probablement des protéines (Cikrt & Tichy, 1975 ; Conrad & Barton, 1978).
Toutefois, dans la littérature, les protocoles expérimentaux ne sont pas toujours très détaillés à ce sujet, certains auteurs mentionnant la ligature du canal cholédoque (Barton *et al.*, 1978a,b ; Conrad & Barton, 1978 ; Barton *et al.*, 1980 ; Barton & Conrad, 1981), d'autres n'apportant aucune précision (Flanagan *et al.*, 1979, 1980 ; Mykkänen & Wasserman, 1981, 1982 ; Edelstein *et al.*, 1984).

Les diverses investigations expérimentales, menées afin d'identifier le ou les sites d'absorption et de transport du plomb dans l'intestin grêle, ont conclu à la prédominance du duodénum, quelle que soit l'espèce animale étudiée (rat, poulet), que les animaux soient matures ou non (Conrad & Barton, 1978 ; Barton *et al.*, 1980 ; Barton & Conrad, 1981 ; Mykkänen & Wasserman, 1982 ; Barton, 1984 ; Edelstein *et al.*, 1984 ; Henning & Leeper, 1984 ; Henning & Cooper, 1988).

Afin de comprendre les hypothèses émises quant aux mécanismes impliqués dans l'absorption digestive du plomb, il est nécessaire de rappeler quelques aspects morphologiques et physiologiques de l'intestin grêle.

Cet organe est dissocié en trois segments : le duodénum (segment de faible longueur, en position proximale, après le pylore), le jéjunum (représentant la majorité de l'intestin grêle) et l'iléon (segment de faible longueur, en position distale, avant le cæcum).

La paroi intestinale présente une couche continue de cellules (épithélium), nommées entérocytes (figure 4). Leur membrane apicale est organisée en une multitude d'évaginations en doigts de gants, appelées microvillosités, augmentant ainsi considérablement la surface de contact avec la lumière intestinale. Immédiatement en dessous de ces microvillosités, les membranes latérales de deux cellules adjacentes se rejoignent pour former une jonction serrée (ou étanche). Au-delà de ces jonctions serrées, les membranes se séparent pour délimiter un espace intercellulaire. Ces cellules épithéliales sont situées sur une membrane basale, proche du réseau de capillaire sanguin (Morton *et al.*, 1985 ; Darnell *et al.*, 1988).

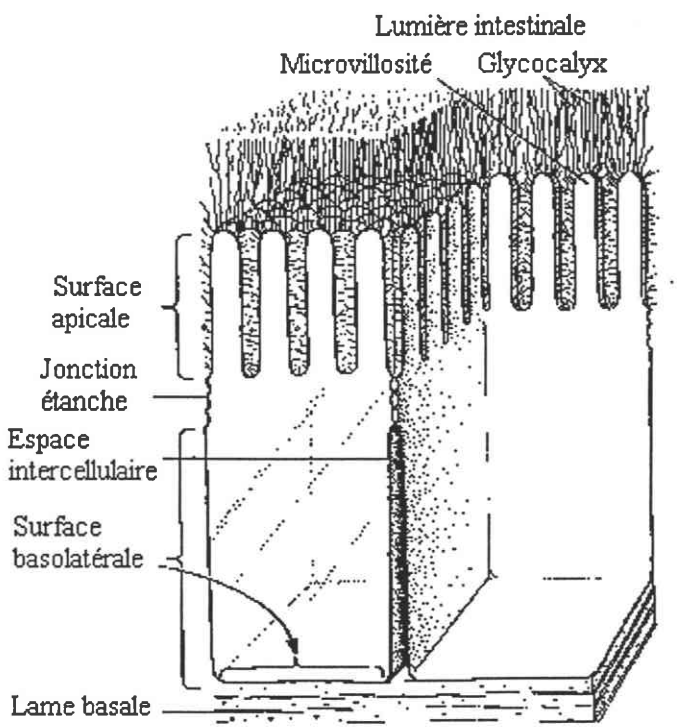


Figure 4 : Illustration schématique de cellules intestinales épithéliales, d'après Darnell *et al.*, 1988.

Le passage du plomb à travers la paroi intestinale semble comprendre à la fois un système de transport actif saturable, qui pourrait emprunter les voies d'absorption du calcium et du fer, et un mécanisme de diffusion passive, qui serait fonction de la concentration en plomb dans la lumière intestinale.

Selon certains auteurs, la diffusion passive serait le processus principal de l'absorption intestinale du plomb (Gruden & Stantic, 1975 ; Blair *et al.*, 1979 ; Flanagan *et al.*, 1979 ; Morton *et al.*, 1985 ; Karmakar & Jayaraman, 1988). Toutefois, le modèle cinétique de Aunst et Fung (1981) semble contredire ces données en considérant comme majeur le processus saturable (plus de 99 % du plomb absorbé par cette voie, pour de faibles concentrations en cet élément, et 80 % pour des concentrations plus élevées (10 $mg.L^{-1}$)).

L'hypothèse d'un transport actif repose sur les observations d'un besoin énergétique lors du passage du plomb à travers la paroi intestinale, l'identification de protéines transportant le plomb, ainsi que la saturabilité du passage, au-delà d'un certain seuil (Mykkänen & Wasserman, 1981 ; Barton, 1984 ; Henning & Leeper, 1988).
Le caractère saturable de l'absorption intestinale du plomb a été mis en évidence dans de nombreuses études et selon divers protocoles expérimentaux :
- *in vitro*, sur segments intestinaux de rat isolés (Aungst & Fung, 1981 ; Aungst *et al.*, 1981 ; Barton, 1984),
- *in situ*, par perfusion intestinale chez la souris (Flanagan *et al.*, 1979) et chez le poulet (Mykkänen & Wasserman, 1981),
- *in vivo*, soit par intubation gastrique de souriceaux (Palminger Hallen *et al.*, 1996a), de rats allaités (Henning & Cooper, 1988) ou de rats sevrés (Bushnell & DeLuca, 1983), soit par intoxication alimentaire de rats sevrés (Freeman *et al.*, 1992, 1994, 1996).

Chez l'homme, l'existence d'une relation non linéaire entre la concentration sanguine et l'apport en plomb serait un argument en faveur du caractère saturable de l'absorption intestinale de ce métal (Pocock, 1983 ; Zhang *et al.*,1999a).

Concernant la diffusion passive, les mécanismes ne sont pas encore bien définis. Selon des études *in vitro* menées sur des sacs intestinaux inversés de rats, la diffusion paracellulaire du plomb aurait lieu à travers les jonctions serrées. Ces jonctions épithéliales auraient un pore de 10-16 Å de diamètre, une densité de charge négative et une sélectivité élevée pour les cations (Morton *et al.*, 1985 ; Coogan,1982 cité par Mushak, 1991).
En outre, la diffusion à travers la membrane de cellules épithéliales pourrait se faire par formation de complexes de plomb liposolubles dans la lumière intestinale (Morton *et al.*, 1985).

Une autre hypothèse propose une absorption intestinale du plomb en deux étapes : dans un premier temps, le plomb se fixerait rapidement à la surface des cellules épithéliales (mécanisme passif), puis dans un second temps, il serait transporté plus lentement (mécanisme actif) à travers la membrane jusqu'au compartiment séreux (Blair *et al.*, 1979 ; Mykkänen & Wasserman, 1981 ; Barton, 1984 ; Dekaney *et al.*, 1997).
Certains auteurs suggèrent même la formation de vésicules membranaires lisses, dans le cytoplasme apical des cellules épithéliales (Hussein *et al.*, 1984) ; ce moyen de transport a également été avancé dans le cas de l'absorption du calcium chez le poulet (Takito *et al.*, 1990).

1.2) Absorption pulmonaire

Cette voie de contamination concerne essentiellement les personnes exposées en milieu professionnel. Elle correspond à l'inhalation de poussières contenant du plomb, passant la barrière alvéolaire par diffusion, pour atteindre la circulation sanguine.
Parmi les facteurs influençant l'absorption du plomb par voie pulmonaire, citons la dimension, la densité et la nature chimique des particules, les conditions respiratoires du sujet exposé, ainsi que la durée et l'intensité de l'exposition (Kehoe, 1961).

Concernant les particules inhalées, leur absorption pulmonaire serait liée à leur taille. Ainsi, dans le cas de poussières inférieures 1 µm, 64 % atteindraient les alvéoles pulmonaires, alors que ce pourcentage ne serait que de 45 % pour des poussières supérieures à 2 µm. Sur cette fraction retenue au niveau alvéolaire, seulement un tiers à la moitié passerait ensuite dans la circulation sanguine et serait donc effectivement absorbée. Quant à la fraction non retenue, elle se déposerait sur les couches de mucus et pourrait faire l'objet d'une absorption ultérieure par le tractus gastro-intestinal, après transport par le flux mucociliaire (Kehoe, 1961 ; Karhausen, 1972 ; Mahaffey, 1985 ; Seux & Dab, 1994 ; Morlot, 1996).
Contrairement à ce que l'on pourrait attendre, ce sont les grosses particules (1,6 µm de diamètre) et non les plus fines (0,8 µm de diamètre) qui entraîneraient les plombémies les plus élevées (Rendall *et al.*, 1975). En effet, l'absorption intestinale continue de grosses particules serait plus importante que l'absorption pulmonaire intermittente (inhalation) de fines particules.

1.3) Absorption cutanée

Bien que cette voie de pénétration concerne surtout les composés organiques du plomb (tétraéthyle, tétraméthyle), du fait de leur liposolubilité, elle pourrait toutefois se révéler importante pour des sujets manipulant des espèces inorganiques du plomb, dans le cadre de leur activité professionnelle (Florence *et al.*, 1988 ; Lilley *et al.*, 1988).

Le passage du plomb à travers l'épithélium se ferait par diffusion lente, excepté au niveau des glandes sudoripares et des follicules pileux, où la pénétration serait plus rapide et plus importante, surtout en cas de sudation (Lilley *et al.*, 1988 ; Stauber *et al.*, 1994).
Cette voie d'absorption a pu être mise en évidence sur l'animal (souris), le dépôt de plomb sur la peau ayant provoqué une élévation importante de la teneur en plomb dans différents organes, mais pas dans le sang (Florence *et al.*, 1998).
De même, chez l'homme, le plomb serait rapidement absorbé à travers la peau et serait détectable dans la sueur et dans la salive, 2 à 6 heures après l'application. L'utilisation d'un isotope stable (^{204}Pb) aurait permis de mettre en évidence, que si les teneurs sanguine et urinaire en plomb ne sont pas modifiées, la concentration du marqueur serait nettement plus élevée (Florence *et al.*, 1988 ; Lilley *et al.*, 1988 ; Stauber *et al.*, 1994).

Tableau VII : Plombémies moyennes de quelques pays ($\mu g.L^{-1}$) (année de prélèvements).

PAYS		PLOMBEMIES		REFERENCES
Allemagne	(enfants 5-14 ans)	33	(1992-1993)	Jacob *et al.*, 2000
Asie de l'Est et du Sud-Est	(femmes)	32-65	(1991-1997)	Ikeda *et al.*, 2000
Australie	(femmes)	30		Gulson *et al.*, 1998a
Chine	(femmes)	46	(1993-1997)	Zhang *et al.*, 1999b
Corée		53	(1999)	Todd *et al.*, 2001
Danemark		48,5		Kristiansen *et al.*, 1997
Espagne (Barcelone)		46		Solé *et al.*, 1998
Finlande	(enfants 1-8 ans)	46	(1983)	Pönka, 1998
France		26	(1996)	
	Paris	128	(1979-1982)	Huel, 1997
		63	(1991-1993)	Campagna *et al.*, 2000
		60	(1995)	Huel, 1997
	Lyon	129	(1979-1982)	Huel, 1997
		57	(1995)	Huel, 1997
	Marseille	124	(1979-1982)	Huel, 1997
		76	(1995)	Huel, 1997
	Mans (enfants 6 mois-6 ans)	37	(1995)	Flurin *et al.*, 1998
	(enfants 8-11 ans)	31-40	(1996-1997)	Leroyer *et al.*, 2000b
	Lorraine (enfants 4-6 ans)	32	(1996-1998)	Kuntz *et al.*, 1999
Japon		19	(1991-1993)	Ikeda *et al.*, 2000
	(femmes)	32	(1991-1997)	Zhang *et al.*, 1999b
	(femmes)	20		Zhang *et al.*, 2000
Malaisie	(femmes)	173	(1982)	Hisham *et al.*, 1998
		77	(1998)	
Maroc		87		Khassouani *et al.*, 1997
Mexique (Mexico)	(femmes)	112	(1991-1993)	Hernandez-Avila *et al.*, 1997
Norvège		12,4		Odland *et al.*, 1999
Royaume Uni		176	(1979)	Fell, 1984
		135	(1981)	
	(femmes)	39	(1995-1996)	White & Sabbioni, 1998
Russie	(femmes)	29		Odland *et al.*, 1999
Suède	(femmes 29 ans)	32	(1990-1992)	Palminger Hallen *et al.*, 1995
	(> 75 ans)	37	(1994-1996)	Nordberg *et al.*, 2000
Taiwan		82,8		Liou *et al.*, 1996
Thaïlande	(femmes)	32	(1998)	Zhang *et al.*, 1999a
Turquie (17 villes)		36	(1998)	Furman & Laleli, 1999
USA	(enfants 6-36 mois)	51	(1982-1997)	Lanphear *et al.*, 1998
	(NHANES III)	28	(1988-1991)	Brody *et al.*, 1994
	(adolescents/adultes)	25-35	(1988-1994)	Simons & Hudes, 1999
	(hommes 48-92 ans)	63	(1991-1994)	Hu *et al.*, 1996
	(49-93 ans)	62	(1991-1995)	Cheng *et al.*, 1998
	(femmes 58 ans)	31	(1993-1995)	Korrick *et al.*, 1999
	(femmes)	22-28	(1995-1998)	Rothenberg *et al.*, 2000

2) DISTRIBUTION DU PLOMB DANS L'ORGANISME

Après traversée de la barrière intestinale, pulmonaire ou cutanée, le plomb passe dans le sang pour être ensuite distribué aux tissus mous et aux tissus durs (os et dents).

L'estimation de la quantité de plomb contenue dans le corps d'un homme adulte non exposé varie selon les auteurs : 95,5 mg (Saltzman *et al.*, 1990), 124 mg (Fell, 1984) et 150 mg (Direction Générale de la Santé, 1995). Cette charge corporelle moyenne en plomb s'élèverait de 2,3 mg par an (Saltzman *et al.*, 1990).

2.1) Distribution sanguine

Le plomb sanguin représenterait 1 à 4 % de la charge corporelle globale en plomb (Fell, 1984 ; Gerson, 1990 ; DeVries *et al.*, 1998 ; Inserm, 1999).
L'estimation de la demi-vie sanguine du plomb varie de 15 à 30 jours (Rabinowtitz *et al.*, 1974, 1976 ; Wittmers *et al.*, 1988 ; DeVries *et al.*, 1998).

2.1.1) Teneurs sanguines

Dans le cadre d'une enquête de grande envergure sur la population générale américaine, intitulée The National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES), les prélèvements sanguins réalisés sur la période 1988-1991 ont montré une diminution de 78 % de la teneur moyenne en plomb par rapport à la période 1976-1980 (respectivement 28 et 128 $\mu g.L^{-1}$). Ce profil se retrouve dans tous les pays industrialisés (tableau VII) et serait corrélé à la diminution des teneurs en plomb dans les carburants (Brody *et al.*, 1994 ; Pirkle *et al.*, 1994 ; Thomas *et al.*, 1999), ainsi qu'à l'amélioration des techniques analytiques.

La plombémie moyenne française est élevée, comparée au reste du monde, notamment les pays industrialisés (Suède, Norvège, Finlande, USA, Japon, Royaume Uni, Australie). Toutefois, elle reste inférieure à celle de pays connus pour être pollués au plomb (Chine, Corée, Maroc, Mexique, Taiwan, Malaisie, Turquie).

Remarque : la plombémie peut être influencée par de nombreux facteurs, tels que l'âge, le sexe, la consommation d'alcool, de tabac, de remèdes traditionnels, etc. Tous ces paramètres seront étudiés plus en détail dans le chapitre "Facteurs influençant la toxicité du plomb".

2.1.2) Répartition du plomb entre le sang total et le plasma

Le plomb absorbé pénètre dans la circulation sanguine, où il y est essentiellement lié aux globules rouges ; une très faible fraction, variable selon la plombémie mais aussi selon les études, est retrouvée dans le plasma. Ainsi, chez les individus non exposés (adultes et enfants), la part de plomb sanguin présente dans le plasma varie de 0,2 à 0,37 % (Manton & Cook, 1984 ; Minoia *et al.*, 1990 ; Schütz *et al.*, 1996 ; Bergdahl *et al.*, 1999 ; Manton *et al.*, 2001 ; Smith *et al.*, 2002), alors que chez les sujets exposés professionnellement, elle s'étend de 0,43 à 3,3 % (Cavalleri *et al.*, 1978 ; DeSilva, 1981 ; Manton & Cook, 1984 ; Schütz *et al.*, 1996 ; Fleming *et al.*, 1998 ; Bergdahl *et al.*, 1998).

Le pool plasmatique est continuellement rechargé en métal, à partir du plomb relargué par les hématies (INSERM, 1999). Selon Manton et collaborateurs (2001), la relation entre le plomb plasmatique et le plomb érythrocytaire serait linéaire à partir de 60 $\mu g.L^{-1}$. D'autres auteurs la considère comme biphasique : linéaire en deçà d'une certaine plombémie, variant de 250 à 400 $\mu g.L^{-1}$ selon les auteurs, puis curvilinéaire au-delà (Manton & Cook, 1984 ; Leggett, 1993 ; Philip & Gerson, 1994). Enfin, d'autres études ont mis en évidence une relation purement curvilinéaire (Schütz *et al.*, 1996 ; Casteel *et al.*, 1997 ; Bergdahl *et al.*, 1998, 1999 ; Smith *et al.*, 2002). Cette curvilinéarité s'expliquerait par la saturation progressive des sites de liaison pour le plomb, au niveau des érythrocytes ; lors d'une plombémie plus élevée, une fraction plus importante de plomb serait alors présente dans le plasma (Leggett, 1993 ; Philip & Gerson, 1994 ; Mason, 2000).

Dans le plasma, le plomb serait principalement transporté par des protéines (près de 90 % par l'albumine, le reste par les globulines) et des lipides. Une petite fraction du plomb plasmatique est libre et diffusible (3 %). C'est à partir de ce dernier compartiment sanguin que le plomb est ensuite distribué aux divers tissus (Gerson, 1990 ; Leggett, 1993 ; Christiensen & Kristiansen, 1994 ; INSERM, 1999 ; Mason, 2000).

Dans les érythrocytes, la distribution du plomb est controversée :

- Pour certains auteurs, plus des deux tiers du plomb sanguin seraient associés à l'hémoglobine. Le reste serait localisé dans les membranes, plus particulièrement au niveau des protéines, la fixation se faisant essentiellement avec les groupements carboxyliques (Barton, 1989 ; Christiensen & Kristiansen, 1994 ; INSERM, 1999).
- En revanche, Church et collaborateurs (1993) ont proposé l'existence d'une protéine intra-érythrocytaire, nommée protéine M, présentant certaines caractéristiques d'une métallothionéine (faible poids moléculaire, faible absorption à 280 nm et composition à 33 % de cystéine).
- Enfin, Bergdahl et collaborateurs (1998) ne mentionnent pas la fixation de plomb à l'hémoglobine, mais suggèrent une répartition du plomb sanguin entre l'acide delta aminolévulinique déhydratase (ALAD) (35-81 %), une protéine de 45 kda (12-26 %) et une protéine de poids moléculaire inférieur à 10 kda (< 1 %).

2.2) Distribution du plomb dans les tissus

Le **squelette** représente le principal tissu de stockage du plomb, accumulant 80 à 95 % de la charge corporelle totale en cet élément (Haguenoer & Furon, 1982 ; Christensen & Kristiansen, 1994 ; INSERM, 1999) ; de plus, cette fraction augmenterait avec l'âge du sujet (Wittmers *et al.*, 1988 ; Saltzman *et al.*, 1990).

La répartition du plomb osseux serait inégale, selon le type d'os considéré :
- dans l'os spongieux, le turn-over du plomb serait rapide, avec une demi-vie biologique de 2,4 ans (Rabinowitz *et al.*, 1976). Le métal y serait fixé par des liaisons relativement labiles, le rendant mobilisable par administration d'EDTA calcique (Schütz *et al.*, 1987)
- dans l'os dense, le turn-over du plomb serait plus lent, avec une demi-vie biologique variable selon les os : 16 ans dans le calcanéum et 27 ans dans le tibia (Nilsson *et al.*, 1991). Contrairement au pool précédent, ce plomb qui représenterait les 3/4 de la charge osseuse totale, ne pourrait être mobilisé par l'EDTA (Schütz *et al.*, 1987). Le métal serait incorporé au réseau cristallin d'hydroxyapatite, sous forme de phosphate de plomb insoluble (Wittmers *et al.*, 1988 ; Philipp & Gerson, 1994 ; Royer-Morrot, 1996).

Il en résulte une distribution inégale du plomb, selon les divers os du squelette (tibia, crâne, côtes, vertèbres), mais qui respecterait une symétrie latérale (pas de différence entre deux os homologues de gauche et de droite d'un même individu) et verticale (homogénéité entre les différentes vertèbres d'un même individu) (Wittmers *et al.*, 1988).

La partie du plomb osseux mobilisable pourrait repasser dans le sang, contribuant à la charge sanguine à hauteur de 10 à 20 % (Rabinowitz *et al.*, 1976 ; Fell, 1984 ; Cake *et al.*, 1996 ; Gulson *et al.*, 1998b, 1999 ; O'Flaherty, 1998). En outre, une modification du métabolisme osseux suite à une fracture, un changement hormonal dû à la ménopause, une grossesse ou l'allaitement pourraient accroître le transfert osseux de plomb vers le pool sanguin. Par exemple, chez la femme enceinte, cette contribution pourrait s'élever à 30-50%, voire 80 % lors de l'allaitement ; cette élévation correspondrait à une mobilisation du plomb osseux résultant d'une demande physiologique en calcium plus importante, par le fœtus, ou par les mécanismes de la lactation (Gulson *et al.*, 1998a, b, 1999 ; Rothenberg *et* al, 2000 ; Markowitz & Shen, 2001).

Chez l'enfant, la radiographie du squelette peut faire apparaître des bandes opaques au niveau métaphysaire, correspondant à des zones de stockage du plomb (Hartemann, 1994 ; George, 1998 ; INSERM, 1999 ; Lauwerys, 1999).

Le plomb est également stocké dans les **dents**, principalement au niveau de la dentine circumpulpale (Spevackova & Smid, 1999 ; Grobler *et al.*, 2000 ; Nowak & Chmielnicka, 2000 ; Rahman & Yousuf, 2002). La teneur en plomb des dents augmenterait avec l'âge et l'exposition professionnelle (Chew *et al.*, 2000).

Par ailleurs, l'exposition environnementale au plomb pourrait être associée à une élévation de la fréquence d'apparition de certaines caries dentaires (Moss *et al.*, 1999).

La teneur en plomb des tissus mous reflète une exposition récente et ne semblerait pas augmenter avec l'âge du sujet (Saltzman *et al.*, 1990).

Le plomb se concentre principalement dans les **reins** (teneurs corticale/médullaire dans un rapport 50/1), où il entraîne la formation d'inclusions intranucléaires, observées expérimentalement chez l'animal (Mahaffey-Six & Goyer, 1972 ; Mahaffey *et al.*, 1973 ; Anders *et al.*, 1982 ; Bankowska & Hine, 1985 ; Bogden *et al.*, 1992 ; Dieter *et al.*, 1993 ; Kaushal *et al.*, 1996 ; Fowler, 1998 ; Sanchez *et al.*, 2001).
L'estimation de la demi-vie biologique du plomb rénal est d'environ 7 jours (Hartemann, 1994).

Le plomb est également accumulé dans le **foie**, mais les teneurs hépatiques en plomb restent inférieures aux teneurs rénales, obtenues expérimentalement chez le rat (Quarterman & Morrison, 1975, 1978 ; Conrad & Barton, 1978 ; Suzuki & Yoshida, 1979 ; Aungst *et al.*, 1981 ; Bell & Spickett, 1981 ; Bankowska & Hine, 1985 ; Latta & Donaldson, 1986 ; Korsrud & Meldrum, 1988 ; Flora *et al.*, 1991 ; Tandon *et al.*, 1992 ; Crowe & Morgan, 1996 ; Freeman *et al.*, 1996 ; Kaushal *et al.*, 1996 ; Maldonado-Vega *et al.*, 1996 ; Tandon *et al.*, 1997 ; Batra *et al.*, 1998 ; Wright *et al.*, 1998).
La demi-vie hépatique du plomb varie, selon les auteurs, de 30 à 44 jours (Rabinowitz *et al.*, 1975, 1976 ; Wittmers *et al.*, 1988 ; Freeman *et al.*, 1996 ; DeVries *et al.*, 1998 ; INSERM, 1999).

Dans le **cerveau**, le plomb serait principalement concentré au niveau de l'hippocampe (Nicholls & McLachlan, 1990 ; Leggett, 1993). En outre, chez l'adulte, la concentration en plomb dans le liquide céphalo-rachidien correspondrait approximativement à 50 % de la teneur plasmatique, pour une plombémie inférieure à 200 $\mu g.L^{-1}$, mais pouvant atteindre 80-90 % en cas de saturnisme (Manton & Cook, 1984).
Enfin, concernant la moelle osseuse, elle pourrait contenir 50 fois plus de plomb que le sang (Lauwerys, 1999).

Le plomb s'accumulerait également au niveau de l'**appareil génital**, notamment dans les testicules et la prostate (Kaushal *et al.*, 1996 ; Batra *et al.*, 1998 ; Alhazza, 1999).

Chez l'homme, l'étude des concentrations en plomb dans le sang du cordon ombilical, du nouveau-né et de la mère, a permis de mettre en évidence le franchissement de la barrière placentaire par le plomb (Hernandez-Avila *et al.*, 1997 ; Mushak, 1998 ; Amitai *et al.*, 1999 ; Nashashibi *et al.*, 1999 ; Torres-Sánchez *et al.*, 1999 ; Campagna *et al.*, 2000 ; Furman & Laleli, 2001).

Des travaux sur l'animal (rat, mini-porc) confirment ce transfert du plomb du sang maternel vers le fœtus (Lü *et al.*, 1997 ; Mestek *et al.*, 1998). Toutefois, les teneurs en plomb retrouvées dans les organes du nouveau-né seraient inférieures à celles de la mère, suggérant une limitation de ce transfert par le placenta (Bogden *et al.*, 1995). Par ailleurs, chez le fœtus, la plus grande partie du plomb contenu dans les tissus mous se trouverait dans le foie. Ce stockage hépatique de plomb pourrait avoir une fonction protectrice envers les autres organes, surtout le système nerveux central en développement, où aucune variation de la teneur en plomb n'a été observée au cours de l'expérience (Lü *et al.*, 1997).

Dans ces organes cibles (reins, cerveau), ainsi que dans l'intestin, le plomb serait lié à des protéines connues pour transporter le calcium et appelées "calcium binding protein" (CaBP) ou "calbindin" (Quarterman & Morrison, 1975 ; Barton *et al.*, 1978 ; Eldenstein *et al.*, 1984 ; Mykkänen *et al.*, 1984 ; Fullmer, 1990, 1995, 1997 ; Bogden *et al.*, 1992 ; Fowler *et al.*, 1993). Bien qu'il y ait des différences selon l'organe, ces protéines semblent de structures chimiques proches, quelle que soit l'espèce étudiée (rat, poulet, singe). D'autre part, la variation de leur teneur tissulaire, en fonction de l'état physiologique de l'animal, pourrait jouer un rôle déterminant dans les variations individuelles de la biodisponibilité intracellulaire du plomb et donc de la sensibilité à la toxicité de ce métal (Fowler, 1998).

3) ELIMINATION DU PLOMB

Le plomb est un métal cumulatif, il est excrété très lentement (Galvin, 1996). L'élimination du plomb ingéré non absorbé se fait principalement par les fèces (Haguenoer & Furon, 1982 ; Ellinckson *et al.*, 2001).

Le plomb absorbé, quant à lui, est essentiellement éliminé par l'urine (75 %) (Rabinowitz *et al.*, 1976 ; Haguenoer & Furon, 1982 ; Christensen & Kristiansen, 1994 ; De Vries *et al.*, 1998 ; INSERM, 1999). Cette excrétion urinaire est assez lente ; elle se fait selon un mécanisme de filtration glomérulaire et de réabsorption tubulaire passive (Hartemann, 1994 ; Crowe & Morgan, 1996 ; INSERM, 1999).
Le métal absorbé peut également être éliminé dans les fèces, par l'intermédiaire des sécrétions gastriques (25 %), biliaires (9 %) et pancréatiques (6 %), sachant toutefois qu'une partie du plomb excrété dans le tube digestif peut être réabsorbé. Une élimination par la transpiration (1,5 %), la salive (1,6-3,3 %) et les phanères (6,1-7,3 %) est aussi à prendre en compte (Cikrt & Tichy, 1975 ; Haguenoer & Furon, 1982 ; Leggett, 1993 ; Christensen & Christiansen, 1994 ; Hartemann, 1994 ; De Vries, 1998 ; INSERM, 1999).
Enfin, le plomb accumulé dans l'intestin pourrait être éliminé par exfoliation des cellules de la muqueuse (Conrad & Barton, 1978).

4) MODELES BIOCINETIQUES

Un certain nombre d'auteurs ont tenté d'établir un modèle mathématique décrivant les taux de transfert et les temps de présence du plomb dans l'organisme, divisé en plusieurs compartiments, dont le nombre augmente avec la complexité des modèles proposés au fil des années.

Ainsi, en 1976, Rabinowitz et collaborateurs proposaient un modèle à 3 compartiments, c'est-à-dire le sang, les tissus mous avec la partie du squelette caractérisée par un turn-over rapide et le reste du squelette, contenant la majorité de la charge corporelle en plomb et caractérisé par une demi-vie du plomb très longue.

Le nombre de compartiments s'est ensuite élevé à 10, dans le modèle de Marcus (1979). Puis, en 1993, Leggett proposait un modèle à 23 compartiments, où le squelette et les tissus mous étaient divisés respectivement en 6 et 11 compartiments. Leur nombre atteint son maximum en 2000, avec 30 compartiments dans le modèle de Mason.
Plus simplement, un modèle à 4 compartiments semble convenir à De Vries (1998), avec le sang, les os, le foie et les reins.

TOXICITE DU PLOMB

1) TOXICITE AIGUE

Chez l'homme, l'intoxication aiguë au plomb ne se rencontre plus que très rarement dans le milieu professionnel où la prévention et la surveillance biologique se sont considérablement améliorées. Néanmoins, elle peut résulter d'une absorption massive, accidentelle ou volontaire, de sel de plomb.
Les organes cibles sont les mêmes que ceux concernés par une intoxication à long terme. Ainsi, les symptômes comprennent :

- Des troubles digestifs : œsophagite, gastrite avec vomissements blanchâtres et coliques de plomb noirâtres.
- Des troubles rénaux : syndrome du tube proximal, néphrite tubulaire interstitielle aiguë et réduction de la filtration glomérulaire. Cette néphropathie saturnine est caractérisée par l'apparition d'inclusions intranucléaires, principalement localisées dans les mitochondries et les membranes cytoplasmiques des cellules épithéliales du tubule rénal. Elles seraient constituées de protéines riches en groupements SH, en fer, calcium, glycogène, phosphore et plus rarement en cuivre. Cet emprisonnement du plomb semble être une réaction anti-toxique de l'organisme.
- Une anémie hémolytique donnant au sujet un teint pâle caractéristique.
- Des troubles nerveux : encéphalopathie saturnine s'exprimant par une apathie, des céphalées, des vomissements, une confusion mentale avec ou sans hallucination, une somnolence, des troubles de l'équilibre, des crises convulsives pouvant conduire au coma et à la mort en quelques heures en l'absence de traitement à l'aide de chélateurs. Même en cas de rémission, des séquelles invalidantes persistent. Chez l'enfant, il peut s'agir d'un retard mental, d'épilepsie, ou de neuropathie optique avec parfois cécité.

(Haguenoer & Furon, 1982 ; Gerson, 1990 ; Hartmann, 1994 ; Droz & Lantz, 1996 ; Duc, 1996 ; OMS, 1997 ; George, 1998 ; Lauwerys, 1999).

Chez les invertébrés et les poissons, les concentrations sublétales et létales en plomb à 50 % (CL 50) présentent une grande variabilité, selon l'organisme considéré, son âge, sa taille et la forme chimique du plomb (annexe 2). Ainsi, les valeurs de CL 50 s'étendent de 0,03 $mg.L^{-1}$ pour le crustacé *Daphnia* à 9113 $mg.L^{-1}$ pour le mollusque *Corbicula,* tous deux suite à une exposition de 2 jours. En fait, la toxicité du plomb dans le milieu aquatique est largement influencée par la dureté de l'eau, sachant que plus l'eau est dure, moins le plomb est soluble, suite à des phénomènes de complexation. Or, les formes solubles sont connues pour être les plus toxiques (Labrot *et al.*, 1996).

Chez les mammifères, les doses létales en plomb à 50 % (DL 50) varient selon l'organisme considéré, son âge, le mode d'administration et la forme chimique du plomb (annexe 2).

Cycle de Krebs

⇩

Succinyl CoA + glycine

⇩ **ALA-synthétase**

Acide delta-aminolévulinique (ALA)

⇩ **ALA-déshydratase**

Porphobilinogène

⇩ Porphobilinogne désaminase

Uroporphyrinogène III

⇩ Uroporphyrinogène III décarboxylase

Coproporphyrinogène III

⇩ **Coproporphyrinogène III décarboxylase**

Protoporphyrine IX

⇩ **Ferrochélatase**

Hème

Schéma 1 : Représentation de la synthèse de l'hémoglobine (Leleu *et al.*, 2000).

Ainsi, les études les plus complètes ont été réalisées chez le rat ; la voie d'administration la plus toxique serait l'injection intrapéritonéale, alors que l'ingestion serait la voie la moins toxique, avec toutefois une grande variabilité des DL 50 dans chaque voie d'administration testée. (Labrot *et al.*, 1996).

2) TOXICITE CHRONIQUE

Il est possible de distinguer trois degrés d'intoxication chronique au plomb :

- une imprégnation exagérée : l'absorption est entièrement compensée par la fixation osseuse, la plombémie est quasi-stationnaire, aucun signe clinique n'est observé,
- un saturnisme biologique : l'absorption n'est pas entièrement compensée par la fixation osseuse, conduisant à une élévation progressive de la plombémie et l'apparition de symptômes dits mineurs,
- un saturnisme clinique : l'absorption dépasse nettement les possibilités de fixation osseuse, entraînant une augmentation rapide de la plombémie et l'apparition de symptômes dits majeurs.

(Haguenoer & Furon, 1982 ; Duc, 1996 ; Lauwerys, 1999).

Suite à une intoxication chronique par le plomb, le fonctionnement de nombreux organes et tissus se retrouve perturbé, notamment les systèmes hématologique, nerveux, rénal, cardiovasculaire et reproducteur. Cependant, l'absence de symptomatologie clinique spécifique rend le diagnostique difficile, d'autant plus que les effets se font sentir après une période d'accumulation du métal dans l'organisme (Hartmann, 1994 ; Isnard, 1994 ; Duc, 1996 ; George, 1998 ; INSERM, 1999).
Si la santé de l'enfant attire tout particulièrement l'attention, il ne faut cependant pas négliger celle de l'adulte. En effet, la grande majorité des cas rapportés de saturnisme léger concernent des adultes exposés professionnellement (Gerson, 1990).

2.1) Système hématologique

Le plomb inhibe l'activité de plusieurs enzymes intervenant dans la synthèse de l'hémoglobine (schéma 1), soit directement pour l'acide delta-aminolévulinique déshydratase (ALAD) et l'hémosynthétase (ou ferrochélatase), soit indirectement pour l'acide delta-aminolévulinique synthétase et la coproporphyrinogène décarboxylase (Petering, 1980 ; Fell, 1984 ; Hartmann, 1994 ; Isnard, 1994 ; George, 1998, INSERM, 1999).
L'inhibition de l'ALAD serait due au remplacement du zinc par le plomb ; en effet, l'affinité de l'enzyme pour le plomb serait 25 fois supérieure à celle du zinc (Bergdhal *et al.*, 1998 ; Shen *et al.*, 2001). Campagna et collaborateurs (1999) ont pu évaluer une plombémie "seuil" comprise entre 32 et 48 $\mu g.L^{-1}$, au-delà de laquelle l'ALAD serait inhibée par le plomb et en-dessous de laquelle l'enzyme serait toujours activée. Cette inhibition de l'activité de

l'ALAD est observée non seulement dans le tissu érythropoïétique et les globules rouges circulants, mais également dans divers organes tels que le foie, les reins et le cerveau (Lauwerys, 1999).
L'une des conséquences de l'inactivation de ces enzymes est l'accumulation de leurs substrats, qui sont l'acide delta-aminolévulinique (ALA), la protoporphyrine (EP) et le coproporphyrinogène III (Tola *et al.*, 1973 ; Hartmann, 1994 ; George, 1998 ; Lauwerys, 1999). Neal et collaborateurs (1997) ont également pu constater la formation d'espèces réactives de l'oxygène, telles que l'ion superoxyde et le groupement hydroxyle, suite à une auto-oxydation de l'ALA accumulée dans les cellules.

Le plomb réduit également la durée de vie des hématies, conséquence probable de la fragilisation de la membrane cellulaire (Levander *et al.*, 1975, 1977a,b ; Hartmann, 1994 ; OMS, 1997 ; Lauwerys, 1999 ; Sinnaeve *et al.*, 1999).

Ces deux actions (inhibition de la synthèse de l'hémoglobine, effet toxique direct sur les érythrocytes) aboutiraient à l'apparition d'une anémie, dont le degré varie selon le niveau de la plombémie (OMS, 1997 ; INSERM, 1999). Dans le cas d'enfants âgés d'un an (groupe le plus sensible), le seuil d'apparition de l'anémie due au plomb serait de 200 $\mu g.L^{-1}$ (Schwartz *et al.*, 1990).

2.2) Système nerveux

Le système nerveux périphérique est sensible au plomb ; ainsi, des paralysies (particulièrement au niveau du nerf radial) ont pu être constatées lors de plombémies très élevées (supérieures à 1200 $\mu g.L^{-1}$). En outre, une diminution de la vitesse de conduction nerveuse peut survenir dès 140 $\mu g.L^{-1}$ (Hartemann, 1994, George, 1998 ; Lauwerys, 1999).
Mais c'est surtout au niveau du système nerveux central que le plomb est le plus toxique. Des troubles neurologiques multiples peuvent apparaître, à la suite d'une intoxication chronique conduisant à des plombémies de l'ordre de 400 à 700 $\mu g.L^{-1}$ (fatigue, maladresse, irritabilité, insomnie, anxiété, perte de mémoire, ...) (Hartmann, 1994 ; George, 1998 ; Lauwerys, 1999).

Chez l'enfant, les atteintes neurologiques apparaissent généralement dès 100 à 300 $\mu g.L^{-1}$ de plomb dans le sang ; elles consistent en troubles comportementaux, stagnation ou régression du développement intellectuel (Bellinger *et al.*, 1992 ; Pocock *et al.*, 1994 ; Tong *et al.*, 1996 ; Juberg *et al.*, 1997 ; OMS, 1997 ; Mendelsohn *et al.*, 1999 ; Schnaas *et al.*, 2000 ; Wasserman *et al.*, 2000). Un déficit des capacités intellectuelles aurait même été décelé dans le cas de plombémies inférieures à 50 $\mu g.L^{-1}$ (Lanphear *et al.*, 2000).
Selon certains auteurs, il n'y aurait pas de plombémie "seuil", en dessous de laquelle le jeûne enfant ne risquerait aucune atteinte neurologique (Bellinger *et al.*, 1992 ; Pocock *et al.*, 1994 ; Tong *et al.*, 1996 ; OMS, 1997).

Quant à la période de vulnérabilité, elle s'étendrait de 2 à 7 ans, avec une plus grande sensibilité chez les filles (Tong *et al.*, 1996 ; Lauwerys, 1999 ; Wasserman *et al.*, 2000).

Les mécanismes d'action du plomb restent non élucidés. Les hypothèses avancées font intervenir une modification de la libération de neurotransmetteurs (dopamine, norépinéphrine, acétylcholine) par l'intermédiaire du métabolisme calcique, en plus des effets sur l'activité de diverse enzymes (kinase C, calmoduline, tyrosine hydroxylase, monoamine oxydase, acétylcholinestérase, ...) (Malhotra *et al.*, 1982 ; Dhawan *et al.*, 1989 ; Ghosh *et al.*, 1992 ; Gupta & Gill, 2000a, b).

Actuellement, il semble difficile de définir l'effet réellement exercé par une faible exposition au plomb sur l'intelligence humaine (Juberg *et al.*, 1997 ; Wasserman *et al.*, 2000 ; Kaufman, 2001).
Une étude expérimentale chez le rat aurait montré le rôle bénéfique d'un environnement stimulant, conduisant les auteurs à proposer des activités socio-comportementales, afin de limiter les dommages cérébraux des enfants de milieu défavorisé (Schneider *et al.*, 2001).

2.3) Système rénal

Une exposition prolongée au plomb peut conduire à une insuffisance rénale chronique (OMS, 1997 ; Lauwerys, 1999 ; Lin *et al.*, 2001).
Cramer et collaborateurs (1974) distinguent trois phases :
- 1ère phase : si la durée de l'exposition est inférieure à un an, des inclusions intranucléaires apparaissent, accompagnées d'une excrétion urinaire de plomb élevée, mais sans perturbation de la fonction rénale ;
- 2ème phase : après quelques années d'exposition, les cellules tubulaires ont perdu leur capacité à former des inclusions intranucléaires, les reins excrètent moins de plomb et présentent un certain degré de fibrose interstitielle, mais la fonction rénale n'est pas particulièrement perturbée ;
- 3ème phase : la perturbation causée par l'exposition prolongée au plomb conduit à une insuffisance rénale.

Selon certains auteurs, le plomb accélèrerait le vieillissement de l'organe et accentuerait les altérations de la fonction rénale chez les insuffisants rénaux chroniques (Kim *et al.*, 1996 ; Lin *et al.*, 2001).

2.4) Système cardiovasculaire

Une exposition professionnelle chronique au plomb serait associée à une élévation de la tension artérielle (Carrington & Bolger, 1992 ; Carrington *et al.*, 1993 ; Isnard, 1994 ; Chang *et al.*, 1996 ; Glenn *et al.*, 2001) ; cette perturbation apparaîtrait pour des plombémies

de 300 $\mu g.L^{-1}$ (Gerson, 1990 ; Chang *et al.*, 1996). Toutefois, dans la population générale, cette relation entre hypertension et plombémie n'a pas été formellement mise en évidence et aucun seuil, ou groupe à risque, n'a pu être identifié (INSERM, 1999) ; de plus, les études restent contradictoires quant au paramètre affecté (pression diastolique ou systolique) (Staessen *et al.*, 1995, 1996 ; Bost *et al.*, 1999 ; Chu *et al.*, 1999 ; Nordberg *et al.*, 2000).
Selon un rapport de l'OMS (1997), cette association entre les taux sanguins de plomb et une augmentation de la pression artérielle, en particulier pour la pression systolique, serait peu importante, mais statistiquement significative, chez les hommes de 40-59 ans.
L'association entre l'hypertension et la teneur osseuse en plomb serait plus marquée (Fleet, 1996 ; Hu *et al.*, 1996 ; Houston & Johnson, 1999 ; Korrick *et al.*, 1999 ; Cheng *et al.*, 2001).

Les mécanismes expliquant l'action du plomb sur la tension artérielle comprendraient des effets directs (effet vasomoteur, possible stimulation sympathique) et des effets indirects (interférence du transport ionique à travers la membrane cellulaire, interaction avec les systèmes homéostatiques du calcium et les processus dont ce dernier est l'intermédiaire). L'hypertension induite par le plomb pourrait également faire intervenir les espèces réactives de l'oxygène (radical hydroxyle, ion superoxyde) et une péroxydation lipidique par des effets vasoconstricteurs directs ou par inactivation du facteur de relaxation vasodilatateur dérivé de l'épithélium (EDRF) (Staessen *et al.*, 1995 ; Ding *et al.*, 2001).

2.5) Système reproducteur

Chez l'homme, une intoxication chronique modérée, conduisant à une plombémie de l'ordre de 400 $\mu g.L^{-1}$, provoquerait une altération de la production de spermatozoïdes aussi bien qualitative (mobilité, altérations morphologiques) que quantitative (baisse du nombre de spermatozoïdes, ...), cependant sans répercussion évidente sur la fertilité (Isnard, 1994 ; Apostoli *et al.*, 1998 ; Gandley *et al.*, 1999 ; INSERM, 1999 ; Lauwerys, 1999).
Chez la femme, l'intoxication chronique en plomb serait associée à un accouchement prématuré, un risque plus élevé de fausse couche et une diminution du poids du nouveau né à la naissance (Campagna *et al.*, 1999, 2000 ; Odland *et al.*, 1999 ; Torres-Sanchez *et al.*, 1999 ; Hertz-Picciotto, 2000).

3) TERATOGENICITE, CANCEROGENICITE

Chez l'animal, l'administration de fortes doses de plomb, pendant la gestation, serait tératogène (INSERM, 1999).

Le plomb est classé dans la catégorie 2B par le Centre International de la Recherche sur le Cancer (IARC, 1987 ; OMS, 1997). Selon l'OMS (1997), sa cancérogénicité est

évidente chez l'animal, mais insuffisamment démontrée chez l'homme. Pour les composés de ce groupe, les experts déterminent la dose sans effet (NOAEL) ou la plus faible dose avec effet (LOAEL) (Hartmann, 1994).
In vitro, l'ion Pb^{2+} exerce un effet génotoxique indirect, notamment par l'altération des systèmes de réparation de l'ADN et de l'expression de certaines kinases régulant le contrôle du cycle cellulaire (Steenland & Boffeta, 2000).
Chez le rongeur, administré par intubation ou par inhalation, le plomb s'est révélé potentiellement génotoxique, par induction de dommages au niveau de l'ADN, et carcinogène entraînant la formation de tumeurs du rein, du cerveau et du poumon (Labrot *et al.*, 1996 ; INSERM, 1999 ; Devi *et al.*, 2000 ; Valverde *et al.*, 2001).
Chez l'homme exposé professionnellement, la fréquence d'apparition de cellules lymphatiques binucléées présentant un micronoyau serait liée au niveau de la plombémie (Vaglenov *et al.*, 2001 ; Fracasso *et al.*, 2002) ; toutefois, il n'y aurait qu'une faible association entre le plomb et l'incidence de certains cancers. Ainsi, si certains auteurs notent une plus grande sensibilité aux cancers des poumons, des reins, de l'estomac et du cerveau (INSERM, 1999 ; Steenland & Boffeta, 2000), Wong & Harris (2000) n'ont observé aucune élévation de la mortalité par cancer du rein, de la vessie, du système nerveux central, du système lymphatique ou hématopoïétique. En outre, l'estimation du risque de cancer ne montrerait pas de profil dose-réponse (Gerhardson *et al.*, 1995).
Selon Sildergeld et collaborateurs (2000), le plomb augmenterait le risque de cancer résultant de l'exposition à d'autres agents cancérigènes.

4) DEPISTAGE : INDICATEURS BIOLOGIQUES

La quantité de plomb présente dans l'organisme peut être évaluée grâce à différents indicateurs biologiques : la plombémie, l'activité de l'enzyme acide delta-aminolévulinique déshydratase (ALAD), le taux de protoporphyrine érythrocytaire, la plomburie provoquée et la teneur osseuse en plomb.

4.1) Plombémie

La mesure de la concentration sanguine en plomb ne représente pas le pool de plomb contenu dans l'organisme ; c'est un résultat ponctuel, reflétant l'exposition à un instant donné. Certains auteurs parlent d'un état d'équilibre momentané entre la quantité de plomb absorbé celle excrétée et celle stockée entre le compartiment osseux et celui des tissus mous (Hartemann, 1994 ; Sinnaeve *et al.*, 1999 ; Todd *et al.*, 2001a, b).

En pratique, la plombémie est considérée comme le meilleur indicateur de l'exposition au plomb, même si des variations du niveau d'exposition limitent sa représentativité (Mahaffey, 1985 ; Hartemann, 1994 ; Juberg *et al.*, 1997 ; OMS, 1997 ; Flurin *et al.*, 1998 ; Solé *et al.*,

Tableau VIII : Classement des enfants en fonction de leur plombémie (selon le CDC).

CLASSE	PLOMBEMIE ($\mu g.L^{-1}$)	INTERPRETATION - RECOMMANDATIONS
I	100	- absence d'intoxication - répéter le dosage tous les ans jusqu'à l'âge de 3 ans si l'enfant appartient à un groupe à risque
II A	100-149	- répéter le dosage tous les ans jusqu'à l'âge de 6 ans si l'enfant appartient à un groupe à risque - en cas de dépistage dans une communauté d'un nombre important d'enfants dont la plombémie dépasse 100 $\mu g.L^{-1}$, une recherche des sources de plomb devrait être réalisée
II B	150-249	- rechercher les sources de plomb dans l'environnement de l'enfant, une carence martiale. Donner des conseils diététiques et d'hygiène aux parents. Si 2 dosages consécutifs indiquent une plombémie de cet ordre, une enquête environnementale avec prélèvement et décontamination doit être envisagée. - répéter le dosage tous les 6 mois, jusqu'à 6 ans. Après 2 résultats inférieurs à 150 $\mu g.L^{-1}$, le délai entre 2 dosages peut être porté à 1 an.
III	250-449	- confirmer le résultat en répétant le dosage, puis adresser l'enfant à une structure médicale capable d'évaluer l'intoxication et, le cas échéant, de la traiter - identifier et éliminer les sources de plomb
IV	450-699	- confirmer le résultat en répétant le dosage, puis adresser l'enfant à une structure médicale capable d'évaluer l'intoxication et, le cas échéant, de la traiter - le traitement de l'intoxiqué, ainsi que l'identification et l'élimination des sources, devraient commencer dans les 48 heures
V	> 700	- confirmer le résultat en répétant le dosage, puis adresser l'enfant en milieu hospitalier : c'est une URGENCE médicale. - le traitement doit être entrepris sans délai. Parallèlement, les sources de plomb seront identifiées et éliminées

1998 ; Sinnaeve *et al.*, 1999). En effet, dans les premiers moments de l'exposition à ce métal, la plombémie surévalue l'imprégnation au plomb, puisqu'elle traduit le niveau d'exposition récente, avant que le plomb n'ait eu le temps de s'accumuler dans l'organisme. Inversement, après l'arrêt de la contamination, elle la sous-estime, puisqu'elle ne rend pas compte de la quantité de plomb stockée dans les tissus. Elle ne permet pas de mettre en évidence une imprégnation chronique ou ancienne (Hartemann, 1994 ; Sinnaeve *et al.*, 1999).

Ce test est largement utilisé, parce qu'il est relativement facile à réaliser, de faible coût, plus reproductible et plus sensible que les autres mesures indirectes de l'exposition au plomb (Juberg *et al.*, 1997).
Toutefois, de multiples précautions doivent être prises lors du prélèvement sanguin, afin d'éviter toute contamination de l'échantillon (effectuer les prélèvements dans des locaux non exposés au plomb ; nettoyer soigneusement la peau du sujet ; utiliser du matériel adapté à l'analyse du plomb ; préférer le sang veineux au sang capillaire, plus facilement souillé par la peau ...) (Hartemann, 1994 ; Sinnaeve *et al.*, 1999).
Compte tenu de ses avantages, et pour pallier ses inconvénients, certains auteurs recommandent de compléter la plombémie par la mesure d'un autre indicateur, tel que la zinc-protoporphyrine ou la plomburie provoquée (OMS, 1997 ; Sinnaeve *et al.*, 1999).

Il n'existe pas de plombémie normale, le plomb n'ayant aucun rôle physiologique connu. Flegal et Smith (1992) ont estimé à 0,16 $\mu g.L^{-1}$ la concentration sanguine en plomb des individus de "l'ère pré-industrielle" (à partir des teneurs osseuses en métal). Dans de nombreux pays, la plombémie de la population générale serait inférieure à 100 $\mu g.L^{-1}$ voire 50 $\mu g.L^{-1}$ (cf paragraphe : teneur sanguine en plomb p 27).

Concernant les enfants, le CDC (Center for Disease Control) propose une prise en charge selon les modalités présentées dans le tableau VIII (Hartemann, 1994 ; Sinnaeve *et al.*, 1999). Au fil des années, le seuil de plombémie associée à une absence d'intoxication n'a cessé de diminuer. Le taux le plus récent est de 100 $\mu g.L^{-1}$ chez l'enfant (Hartemann, 1994 ; Juberg *et al.*, 1997 ; INSERM, 1999). Le niveau correspondant chez l'adulte est de 300 $\mu g.L^{-1}$ aux USA (Carrington, 1993), 400 $\mu g.L^{-1}$ en France (Lauwerys, 1999).
Toutefois, de nombreux auteurs s'accordent à penser qu'une limite de sécurité reste difficile à établir, les teneurs actuellement retenues ne garantissant pas l'absence d'effets toxiques et notamment d'atteintes neuropsychiques (Bellinger *et al.*, 1992 ; Carrington *et al.*, 1993 ; Dieter *et al.*, 1993 ; Bovin & Giordani, 1995 ; Tong *et al.*, 1996).

4.2) Activité de l'acide delta-aminolévulinique déshydratase (ALAD)

L'activité de l'acide delta-aminolévulinique déshydratase (ALAD) érythrocytaire, hépatique ou rénale est un paramètre qui se retrouve dans de nombreuses études de la toxicité

du plomb chez l'homme et chez l'animal (Tola *et al.*, 1973 ; Bartlett *et al.*, 1974 ; Quarterman & Morrison, 1975 ; Cerklewski & Forbes, 1976 ; Cavalleri *et al.*, 1978 ; Bell & Spickett, 1981 ; Flora *et al.*, 1986, 1991 ; Tandon *et al.*, 1987, 1992, 1997 ; Dhawan *et al.*, 1988, 1989 ; Korsrud & Meldrum, 1988 ; Kulikowska *et al.*, 1989 ; Miniuk *et al.*, 1989 ; Flora & Tandon, 1990 ; Freeman *et al.*, 1996 ; Maldonada-Vega *et al.*, 1996 ; Batra *et al.*, 1998 ; Vij *et al.*, 1998 ; Campagna *et al.*, 1999 ; Santos *et al.*, 1999 ; Gupta & Gill, 2000a,b ; Pande *et al.*, 2001).

Cette métalloenzyme à 8 atomes de zinc est l'enzyme du système de l'hème la plus sensible à l'action de ce métal (Leleu *et al.*, 2000). Au niveau érythrocytaire, une faible intoxication (conduisant à une plombémie inférieure à 100 $\mu g.L^{-1}$) suffit à la déprimer significativement (OMS, 1997 ; George, 1998). Une relation exponentielle négative existe entre l'activité de l'ALAD et le niveau de plomb sanguin (OMS, 1997) ; par exemple, des concentrations sanguines de 150 et 300 $\mu g.L^{-1}$ correspondraient respectivement à 50 et 75 % d'inhibition de l'ALAD (Campagna *et al.*, 1999).
Toutefois, cet indicateur biologique présente deux inconvénients majeurs : d'une part, sa trop grande sensibilité rend le test inutile en milieu professionnel (Fell, 1984 ; Carrington *et al.*, 1993, Lauwerys *et al.*, 1999), d'autre part, il existe un décalage dans le temps entre l'exposition au plomb et la réponse de l'ALAD (Korsrud & Meldrum, 1988 ; Hartemann, 1994 ; Lauwerys, 1999).

4.3) Taux de protoporphyrine érythrocytaire

Le taux de protoporphyrine érythrocytaire est un paramètre qui se retrouve dans de nombreuses études de la toxicité du plomb, chez l'homme et chez l'animal (Cerklewski & Forbes, 1976 ; Flora *et al.*, 1986, 1991 ; Tandon *et al.*, 1987, 1992, 1997 ; Dhawan *et al.*, 1988, 1989 ; Flora & Tandon, 1990 ; Schwartz *et al.*, 1995 ; Chang *et al.*, 1996 ; Maldonada-Vega *et al.*, 1996 ; Soldatovic *et al.*, 1997 ; Ehrlich *et al.*, 1998 ; Masci *et al.*, 1998 ; Solé *et al.*, 1998 ; Bergdahl *et al.*, 1999 ; Santos *et al.*, 1999 ; Gupta & Gill, 2000a,b ; Cardenas-Bustamante *et al.*, 2001 ; Pande *et al.*, 2001).

L'accumulation de protoporphyrine érythrocytaire est principalement due à l'inhibition de la ferrochélatase, qui normalement catalyse l'incorporation de l'ion ferreux dans la structure en anneau de la porphyrine. La protoporphyrine en excès prend alors la place de l'hème dans la molécule d'hémoglobine et chélate du zinc à la place du fer.

Le taux de protoporphyrine est analysé par fluorimètrie. Le plus souvent, le dosage prend en compte la zinc-protoporphyrine (ZPP), en raison de sa simplicité et de sa rapidité. Toutefois, la mesure de protoporphyrine libre (FEP), après extraction du zinc, offre une meilleure reproductibilité (Fell, 1984 ; Gerson, 1990 ; Hartemann, 1994 ; OMS, 1997 ; George, 1998).

Le taux de protoporphyrine érythrocytaire est un indicateur sensible, puisqu'une élévation est décelable même lors d'une faible intoxication au plomb, conduisant à une plombémie de 150-250 $\mu g.L^{-1}$ (Gerson, 1990 ; Carrington *et al.*, 1993 ; OMS, 1997 ; Lauwerys, 1999).
Toutefois, ce test est peu spécifique ; effectivement, toute affection inhibant la synthèse de l'hème peut biaiser le résultat par excès (anémie due à une carence en fer, ...) (OMS, 1997 ; Sinnaeve *et al.*, 1999). De plus, il ne reflète qu'une exposition stable au plomb, la réponse ne survenant qu'après 2 à 10 semaines de contamination (Fell, 1984 ; Solé *et al.*, 1998 ; Lauwerys, 1999).

4.4) Plomburie provoquée

La plomburie provoquée correspond à la quantité de plomb éliminée dans l'urine, suite à l'administration d'un chélateur. Le rôle de ce chélateur est de mobiliser le plomb labile des tissus mous et osseux (os spongieux), représentatif du pool de plomb biologiquement actif dans l'organisme. Cependant, dans le cas d'une intoxication élevée, ce traitement peut s'avérer dangereux, en entraînant une redistribution rapide du plomb accumulé dans les organes via la circulation sanguine ; ce phénomène peut être à l'origine d'atteintes neurologiques ou rénales (Hartemann, 1994 ; OMS, 1997 ; George, 1998 ; Sinnaeve *et al.*, 1999).
Selon Gerson (1990), la plomburie provoquée permet surtout d'identifier les enfants nécessitant un traitement par chélateur, lorsque la plombémie est inférieure à 550 $\mu g.L^{-1}$.

4.5) Teneur osseuse en plomb

La teneur osseuse en plomb peut être mesurée *in vivo* de manière non invasive, par fluorescence aux rayons X (XRF).

La fluorescence aux rayons X est une technique de dosage du plomb utilisée dans de nombreuses études épidémiologiques pour évaluer divers paramètres, tels que la contribution du plomb osseux à la plombémie, l'action du plomb sur la pression artérielle ou encore l'influence du génotype sur la toxicité du plomb (Nilsson *et al.*, 1991 ; Hu *et al.*, 1996 ; Fleming *et al.*, 1998 ; Gulson *et al.*, 1999 ; Houston & Johnson, 1999 ; Korrick *et al.*, 1999 ; Rothenberg *et al.*, 2000, 2001 ; Cheng *et al.*, 2001 ; Glenn *et al.*, 2001 ; Lee *et al.*, 2001 ; Markowitz & Shen, 2001 ; Todd *et al.*, 2001b).

5) TRAITEMENTS

Le traitement d'une intoxication au plomb est essentiellement basé sur l'utilisation d'un chélateur, dont le rôle est de former avec le plomb, des composés de faible toxicité qui seront éliminés dans les urines.

Il comprend également un traitement symptomatique à base d'antispasmodiques, permettant de calmer les douleurs abdominales.

Les chélateurs les plus couramment utilisés sont les suivants :

- administré par voie intramusculaire ou intraveineuse, l'EDTA calcicodisodique est surtout actif sur la résorption du plomb des os spongieux et du rein. Ce n'est qu'après plusieurs administrations répétées qu'il atteint le plomb contenu dans les tissus mous.
Toutefois, ce composé s'avère néphrotoxique et favorise le transfert de plomb osseux vers le cerveau, ainsi que l'élimination urinaire de métaux essentiels.

- L'acide méso-2,3-dimercaptosuccinique (DMSA) présente un certain nombre d'avantages : une administration orale, une minimisation de la fuite urinaire en oligo-éléments et une toxicité rénale nulle.
Cependant, il mobilise exclusivement le plomb des tissus mous, à l'exception du cerveau.

- Le 2,3-dimercaptopropanol (BAL) est parfois associé à l'EDTA, par voie intramusculaire.
Il est cependant moins efficace que le DMSA, pour mobiliser le plomb contenu dans les tissus mous (George, 1998 ; Cremin *et al.,* 1999 ; INSERM, 1999 ; Lauwerys, 1999 ; Chisolm, 2000).

FACTEURS SUSCEPTIBLES D'INFLUENCER LA TOXICITE DU PLOMB

De nombreux paramètres modifient la sensibilité de l'organisme face au plomb. Leur influence peut s'exercer au niveau de l'absorption, de la distribution, de l'élimination du plomb, ainsi qu'au niveau des altérations biochimiques causées par ce métal.
Certains de ces facteurs n'ont été abordés qu'au travers de la plombémie, paramètre le plus couramment utilisé, dans les études épidémiologiques, pour estimer le degré d'intoxication au plomb.

1) ELEMENTS ESSENTIELS

1.1) Calcium

Du fait de l'analogie structurale entre le plomb et le calcium (valence 2+ et rayons ioniques très proches), le plomb peut entrer en compétition avec le calcium au niveau de sites de fixation de nombreuses protéines, telles que la calmoduline, la troponine C, les protéines de transport intestinales, érythrocytaires, nerveuses, mitochondriales. Il peut également perturber la fonction de certaines enzymes Ca-dépendantes (Ca^{2+}-ATPase, $Na^{+}K^{+}$-ATPase, protéine kinase C...) (Simons, 1988, 1993 ; INSERM, 1999 ; Marieb, 1999 ; Kern *et al.*, 2000 ; Fracasso *et al.*, 2002).

Dans le cas de l'absorption intestinale, l'interaction plomb-calcium est l'un des paramètres les plus étudiés, en raison de son influence sur la toxicité du plomb et de sa complexité, puisqu'elle fait intervenir la vitamine D et l'hormone 1,25-dihydroxy vitamine D (1,25 $(OH)_2$ D_3), connues pour influencer le métabolisme calcique (Pansu *et al.*, 1983 ; Spickett & Bell, 1983 ; Fullmer, 1990 ; Takito *et al.*, 1990 ; Paillard, 1992 ; Moon, 1994). Les conséquences de cette interaction portent sur la fraction de plomb absorbée par le tractus gastro-intestinal, sa distribution dans l'organisme et sur son excrétion.

De nombreuses études, menées chez l'homme et chez l'animal, ont montré qu'une alimentation carencée en calcium s'accompagnait d'une élévation des teneurs en plomb sanguine et tissulaire (Mahaffey *et al.*, 1973 ; Quarterman & Morrison, 1975 ; Sorrell *et al.*, 1977 ; Barton *et al.*, 1978a ; Ziegler *et al.*, 1978 ; Hart & Smith, 1981 ; Mykkänen & Wassemann, 1981 ; Aungst & Fung, 1985 ; Mahaffey *et al.*, 1986 ; Bogden *et al.*, 1992, 1995 ; Muldoon *et al.*, 1994 ; Weyermann & Brenner, 1998). A noter que la toxicité du plomb

ne semble pas influencée par la carence calcique, lorsqu'il est administré par voie intraveineuse (Quarterman & Morrison, 1975).
Fullmer (1990, 1995, 1997) a également constaté une stimulation de l'absorption intestinale, accompagnée d'une élévation du niveau de l'hormone $1,25(OH)_2D_3$ plasmatique et de la teneur intestinale en "calbindin D" (protéine de la muqueuse intestinale liant le calcium). Toutefois, dans un second temps, ces effets seraient annulés, du fait du prolongement de l'intoxication.
Concernant les mécanismes mis en jeu, certains auteurs émettent l'hypothèse d'une action indirecte au niveau intestinale, par l'intermédiaire de changements de la concentration sanguine en $1,25\ (OH)_2\ D_3$ (Mykkänen & Wasserman, 1981 ; Fullmer, 1995, 1997). En revanche, selon Morton *et al.* (1985), elle serait due à une élévation de la perméabilité cationique des jonctions serrées, causée par la perte de l'adhésion cellule à cellule.

Dans le cas d'un supplément alimentaire en calcium, les résultats sont plus controversés. En effet, certains auteurs n'ont observé aucune modification de l'absorption du plomb (Flanagan *et al.*, 1982 ; Kristal-Boneh *et al.*, 1998), tandis que d'autres font état d'une diminution de cette absorption (Barltrop & Khoo, 1976 ; Barton *et al.*, 1978a ; Conrad & Barton, 1978 ; Quatermann *et al.*, 1978a ; Ziegler *et al.*, 1978 ; Heard & Chamberlain, 1982 ; Blake & Mann, 1983 ; Mahaffey *et al.*, 1986 ; Muldoon *et al.*, 1994 ; Bogden *et al.*, 1997 ; Weyermann & Brenner, 1998 ; Hertz-Piccioto *al.*, 2000 ; Lacasana *al.*, 2000 ; Varnai *al.*, 2001).
En fait, lorsque le plomb et le calcium sont présents simultanément dans la lumière intestinale, l'absorption du plomb serait diminuée, du fait de la compétition entre les deux cations pour des sites de fixation similaires sur la muqueuse intestinale. A noter que ces sites de fixations seraient moins nombreux, lors d'un apport alimentaire en calcium adéquat ou en excès. Par ailleurs, la présence de calcium entraînerait une diminution du taux d'élimination urinaire du plomb (Barltrop & Khoo, 1976 ; Barton *et al.*, 1978a ; Conrad & Barton, 1978 ; Heard & Chamberlain, 1982 ; Quarterman *et al.*, 1978a).
D'autre part, l'apport de calcium aurait un effet protecteur vis-à-vis des effets génotoxiques du plomb (Aboul-Ela, 2002).

1.2) Fer

L'interaction entre le plomb et le fer est moins connue que celle entre le plomb et le calcium. Elle a surtout été étudiées dans le cas d'enfants de milieu socio-économique défavorisé, chez lesquels une carence en fer est souvent associée à une exposition au plomb à travers l'habitat (Mahaffey-Six & Goyer, 1972 ; Ragan, 1977 ; Sargent *et al.*, 1995 ; Sinnaeve *et al.*, 1999).
De nombreuses expériences, menées sur l'homme et l'animal, ont montré une association entre la carence alimentaire en fer et l'élévation de l'absorption intestinale du plomb, de la plombémie et de sa rétention dans les organes (Mahaffey-Six & Goyer, 1972 ; Ragan, 1977 ;

Barton *et al.*, 1978b ; Conrad & Barton, 1978 ; Flanagan *et al.*, 1979, 1980 ; Suzuki & Yoshida, 1989 ; Watson *et al.*, 1980, 1986 ; Yip *et al.*, 1981 ; Morrison & Quarterman, 1987 ; Crowe & Morgan, 1996 ; Hammad *et al.*, 1996 ; Cheng *et al.*, 1998 ; Wright *et al.*, 1998). Cependant, certains auteurs ne constatent aucune modification (Flanagan *et al.*, 1982 ; Serwint *et al.*, 1999).

En fait, selon Mahaffey et Rader (1980), une carence en fer provoquerait une diminution de la teneur intestinale en ferritine, ce qui favoriserait l'accélération du transfert de plomb dans le sang, au lieu de sa rétention dans l'intestin grêle. Par ailleurs, les mécanismes actifs impliqués dans le transport du plomb seraient stimulés, lors d'un besoin en fer de l'organisme (Flanagan *et al.*, 1979).

Si le plomb et une carence en fer affectent, tous deux, la synthèse de l'hème à différentes étapes, le degré d'anémie produit par leur combinaison est plus élevé que celui résultant de leur effet individuel (Mahaffey & Rader, 1980 ; Mahaffey, 1985).
D'autre part, le plomb entraînerait une élévation du fer plasmatique, de par son action inhibitrice sur la ferrochélatase, l'enzyme responsable de l'incorporation du fer dans la protoporphyrine IX (Miniuk *et al.*, 1989 ; Kulikowska *et al.*, 1989).

Inversement, un supplément alimentaire en fer s'accompagnerait d'une diminution de l'absorption intestinale du plomb, lorsque ces deux éléments sont présents simultanément dans la lumière intestinale. En revanche, l'excrétion urinaire du plomb ne serait pas influencée (Barton *et al.*, 1978b ; Conrad & Barton, 1978 ; Flanagan *et al.*, 1979, 1980 ; Suzuki & Yoshida, 1979 ; Barton, 1984).
Certains auteurs proposent l'existence d'un récepteur commun, au niveau de la muqueuse intestinale, qui transférerait préférentiellement le fer par rapport au plomb (Barton *et al.*, 1978b ; Flangan *et al.*, 1980 ; Morrison & Quarterman, 1987 ; Conrad *et al.*, 1992). Au contraire, Robertson et Worwood (1978) considèrent que le transport intracellulaire du plomb est radicalement différent de celui du fer ; il est à noter que, dans cette dernière étude, les rats étaient nourris à base de lait.

1.3) Phosphore

Etudiée à la fois chez l'homme et chez l'animal, l'influence du phosphore sur la toxicité du plomb n'a pourtant pas fait l'objet d'expériences récentes.

Selon certains auteurs, une carence en phosphore s'accompagnerait d'une élévation de la rétention tissulaire du plomb (Quarterman & Morrison, 1975 ; Barltrop & Khoo, 1976 ; Barton & Conrad, 1981).

En cas de supplément alimentaire en phosphore, les résultats sont plus controversés. Ainsi, si certains auteurs ont mis en évidence une réduction dose-dépendante de la rétention du plomb (Barltrop & Khoo, 1976 ; Quarterman *et al.*, 1978 ; Barton & Conrad, 1981 ; Aungst & Fung, 1983), quelques études ne constatent aucun effet bénéfique du phosphore et mentionnent même une augmentation de la teneur tissulaire en plomb, lorsque le supplément alimentaire est trop élevé (Spickett & Bell, 1983, Mykkänen *et al.*, 1984).

Les mécanismes proposés pour expliquer l'inhibition de l'absorption intestinale du plomb par le phosphore font intervenir une précipitation (sous forme de phosphate de plomb), ainsi qu'une compétition entre les deux éléments pour un transporteur de la muqueuse intestinale, également nécessaire au calcium (Barton & Conrad, 1981 ; Heard & Chamberlain, 1982 ; Blake & Mann, 1983 ; Mykkänen *et al.*,1984).

Chez l'homme, l'action protectrice du phosphore vis-à-vis du plomb apparaît plus faible que celle du calcium. De plus, l'action de ces deux éléments, administrés simultanément, serait plus efficace (Heard & Chamberlain, 1982 ; Blake & Mann, 1983).

1.4) Zinc

Chez l'homme, le zinc n'aurait montré aucune action bénéfique, sur la rétention du plomb (Flanagan *et al.*, 1982).
En revanche, chez l'animal, il a été établi que le zinc apportait un effet protecteur, lorsqu'il était présent simultanément au plomb, dans la lumière intestinale (Cerklewski & Forbes, 1976a ; Conrad & Barton, 1981 ; Flora *et al.*, 1989b, 1991 ; Tandon *et al.*, 1997 ; Batra *et al.*, 1998a).

Ainsi, un supplément alimentaire en zinc s'accompagnerait d'une diminution de l'absorption intestinale du plomb, du fait d'une compétition pour les sites de liaison à niveau d'une protéine de transport, de type métalloprotéine. Par suite, les concentrations sanguine, rénale, hépatique, testiculaire et osseuse en plomb seraient également réduites. De plus, le zinc permettrait un amoindrissement des altérations biochimiques causées par le plomb (inhibition de l'ALAD, de la Na^+-K^+ATPase, élévation du taux de ZPP et de l'ALA urinaire), ainsi que de ses effets sur la spermatogenèse (Cerklewski & Forbes, 1976a ; Flora *et al.*, 1989b, 1991 ; Tandon *et al.*, 1997 ; Batra *et al.*, 1998, 2001). La distribution cellulaire serait également modifiée sous l'action du zinc, le plomb n'étant plus accumulé préférentiellement dans le noyau mais dans les mitochondries (Batra *et al.*, 1998).

En revanche, l'administration intrapéritonéale de zinc, avant l'ingestion de plomb, ne réduirait pas l'accumulation du métal dans les différents organes. De même, un traitement oral après exposition au plomb, n'entraînerait aucune modification des teneurs en plomb, mais protégerait l'animal des principaux effets hématologiques du plomb, stimulerait l'élimination

du plomb contenu dans les érythrocytes et augmenterait l'efficacité de divers agents chélateurs (Cerklewski & Forbes, 1976a ; Cerklewski, 1984 ; Flora *et al.*, 1989b, 1991 ; Kulikowska *et al.*, 1989 ; Flora & Tandon, 1990).

1.5) Cuivre

Les données concernant l'influence du cuivre sur la toxicité du plomb sont controversées.

Ainsi, selon Cerklewski et Forbes (1977) et Malhotra et collaborateurs (1982) un apport alimentaire en cuivre augmenterait la toxicité du plomb, exprimée par l'élévation d'ALA urinaire, des concentrations rénale et hépatique en plomb, ainsi que des effets neurotoxiques et hématologiques.
Par contre, les études de Klauder et Petering (1975, 1977), de Flora et collaborateurs (1989a) et de Miniuk et collaborateurs (1989) ont montré qu'un supplément en cuivre (pendant ou après l'exposition au plomb) amoindrissait l'intoxication, puisqu'il abaissait les teneurs en plomb du sang, des reins, du foie et qu'il diminuait l'inhibition de l'activité de l'ALAD.
Toutefois, des différences constatées au niveau des protocoles expérimentaux pourraient en partie être responsables de ces résultats conflictuels. Elles portent notamment sur les paramètres étudiés, sur les durées d'exposition au plomb (quatre semaines pour Cerklewsky et Forbes, douze semaines pour Klauder et Petering), et sur le régime alimentaire (utilisation du glucose ou de l'amidon comme seule source de carbohydrates). A noter que, selon Klauder et Petering, l'absorption du cuivre serait réduite lors de l'utilisation de glucose, à la place de l'amidon.

1.6) Magnésium

Une carence en magnésium, même modérée, augmenterait l'absorption et la rétention du plomb (Fine *et al.*, 1976 ; Cerklewski, 1983).

Inversement, un supplément alimentaire en magnésium, administré simultanément ou après l'exposition au plomb, s'accompagnerait d'une diminution de la plombémie, de la concentration osseuse en plomb, de l'inhibition de l'activité de l'ALAD et de la teneur urinaire en ALA, probablement suite à une baisse de l'absorption intestinale du plomb accompagnée d'une stimulation de l'élimination urinaire (Fine *et al.*, 1976 ; Singh *et al.*, 1979 ; Soldatovic *et al.*, 1993, 1997).

1.7) Sélénium

Les effets du sélénium sur la toxicité du plomb ne sont pas homogènes. Si certains auteurs ont mis en évidence une action protectrice du sélénium, administré simultanément au plomb (Cerklewski & Forbes, 1976b ; Flora *et al.*, 1983 ; Tandon *et al.*, 1992 ; Nehru & Dua, 1997), d'autres études n'ont montré aucune modification (Stone & Soares, 1976), voire une amplification de la toxicité du plomb lors d'un excès de sélénium (1 ppm) (Cerklewski & Forbes, 1976b).
En traitement après l'exposition au plomb, le sélénium pourrait accélérer la réduction de la teneur en métal toxique du sang et de divers organes, mais surtout il améliorerait l'efficacité des agents chélateurs (Tandon *et al.*, 1992).

Concernant les mécanismes proposés, le sélénium pourrait réduire la pénétration du plomb dans les cellules, soit par compétition directe avec le plomb pour des sites de liaison avec des protéines fonctionnelles ou des bioligants, soit par formation d'un composé réversible (par exemple le séléniure de plomb (PbSe)), réduisant ainsi la quantité de plomb présente sous forme ionisée dans l'organisme (comme cela est le cas avec le cadmium). Cependant, à l'arrêt du traitement au sélénium, le composé Pb-Se pourrait se dissocier et libérer les ions Pb^{2+}, augmentant alors les effets toxiques du plomb (Flora *et al.*, 1983).
Quant à l'effet prophylactique du sélénium vis-à-vis de la péroxydation lipidique, les mécanismes impliqueraient, d'une part, la stimulation de l'élimination des radicaux libres générés par le plomb (élévation de l'activité de la superoxyde dismutase) et d'autre part, l'augmentation de pouvoir antioxydant de la cellule (élévation de l'activité de la glutathion réductase) (Othman & El Missiry, 1998).

2) VITAMINES

Les principales vitamines exerçant une influence sur la toxicité du plomb sont la vitamine D (cholécalciférol), la vitamine C (acide ascorbique), la vitamine E (α-tocophérol) et la vitamine B (thiamine).

2.1) Vitamine D

Chez l'homme, une carence alimentaire en vitamine D serait associé à des teneurs sanguine et osseuse en plomb plus élevées (Sorrell *et al.*, 1977 ; Cheng *et al.*, 1998).

Chez l'animal, l'augmentation de l'apport alimentaire en vitamine D entraînerait une élévation de l'absorption intestinale du plomb, accompagnée d'une plus grande accumulation du plomb dans les organes (Smith *et al.*, 1978 ; Hart & Smith, 1981 ; Smith *et al.*,

1981 ; Mykkänen & Wasserman, 1982 ; Edelstein *et al.*, 1984 ; Mykkänen *et al.*, 1984 ; Fullmer, 1990).

Les mécanismes proposés pour expliquer une absorption intestinale du plomb accrue par la vitamine D reposent sur une accélération du transfert sérosal du métal lors de la traversée de la muqueuse intestinale, ainsi que par un temps de transit intestinal plus long, suite à une baisse de la mobilité gastro-intestinale (Barton *et al.*, 1980 ; Mykkänen & Wasserman, 1982). Toutefois, les résultats sont controversés, quant au segment intestinal stimulé, le duodénum ou l'iléon (Smith *et al.*, 1978 ; Hart & Smith, 1981 ; Mykkänen & Wasserman, 1982 ; Moon, 1994).
A noter que le métabolite actif impliqué dans cette stimulation ne serait pas directement la vitamine D, mais la 1,25 $(OH)_2$ D_3, synthétisée dans le rein (Mahaffey, 1980 ; Bernier, 1984 ; Fullmer, 1990). D'autre part, l'interaction entre le plomb et la vitamine D serait sous contrôle du calcium, les réponses étant différentes en cas de carence ou d'excès calcique (Smith *et al.*, 1981 ; Fullmer, 1995, 1997).

Le plomb influence également le métabolisme de la vitamine D, puisqu'il inhibe la synthèse rénale de 1,25 $(OH)_2$ D_3 (Smith *et al.*, 1981 ; Edelstein *et al.*, 1984).

2.2) Vitamine C

Les données bibliographiques quant à l'influence de cette vitamine sur la toxicité du plomb restent contradictoires.

En effet, les expériences *in situ* de boucle intestinale ont montré une élévation de l'absorption intestinale du plomb, en présence de vitamine C dans la solution de perfusion, cette vitamine augmentant la solubilité du $PbCl_2$ (Barton *et al.*,1978b ; Conrad & Barton,1978b).
Inversement, les études *in vivo*, ainsi que les observations d'études épidémiologiques récentes chez l'homme, suggèrent un effet protecteur de la vitamine C (Flanagan *et al.*, 1982 ; Niazi *et al.*, 1982 ; Flora & Tandon, 1986 ; Dhawan *et al.*, 1988 ; Dalley *et al.*, 1990 ; Cheng *et al.*, 1998 ; Vij *et al.*, 1998 ; Alhazza, 1999 ; Dawson *et al.*, 1999 ; Simon & Hude, 1999 ; Patra *et al.*, 2001a).

D'autre part, administrée après l'intoxication au plomb, la vitamine C, ne réduirait pas la charge corporelle en cet élément ; cependant sa conjugaison à un agent chélateur augmenterait l'efficacité de ce dernier à éliminer le plomb par voie urinaire, à diminuer les concentrations en plomb des tissus mous et à restaurer l'activité de l'ALAD (Dhawan *et al.*, 1988 ; Alhazza, 1999).

2.3) Vitamine E

Une carence en vitamine E rendrait les animaux plus sensibles aux effets hémolytiques du plomb, en modifiant la morphologie des érythrocytes, ce qui résulterait en une élévation de leur fragilité mécanique (Levander *et al.*, 1975, 1977a,b).
D'autre part, selon Dhawan et collaborateurs (1989), l'apport en vitamine E, simultanément à l'exposition au plomb, réduirait les teneurs en métal dans le sang et le foie. Toutefois, ces effets n'ont pu être confirmés par Bartlett et collaborateurs (1974). Ce traitement simultané limiterait également l'inhibition de l'activité de l'ALAD, des neurotransmetteurs cérébraux et de leurs métabolites, l'élévation de l'ALA urinaire et de la ZPP (Dhawan *et al.*, 1989).
En revanche, l'administration de tocophérol, après l'exposition au plomb, serait sans effet sur la charge corporelle en plomb, mais restaurerait tout de même en partie l'activité de l'ALAD et diminuerait le stress oxydatif causé par le plomb (Dhawan *et al.*, 1989 ; Patra *et al.*, 2001a).

2.4) Vitamine B1

L'administration de thiamine réduirait l'accumulation de plomb dans le sang, le foie, les reins, mais pas dans l'os, ni dans le cerveau (Flora *et al.*, 1989b ; Kim *et al.*, 1990 ; Senapati *et al.*, 2000). Elle diminuerait également les altérations biochimiques, le niveau de la péroxydation lipidique et enfin stimulerait la libération du plomb tissulaire (Sasser *et al.*, 1984 ; Flora & Tandon, 1986 ; Ito *et al.*, 1987 ; Flora *et al.*, 1989b ; Kim *et al.*, 1990 ; Senapati *et al.*, 2000).

En fait, la vitamine B formerait un complexe insoluble avec le plomb, réduisant ainsi son absorption intestinale et/ou augmentant le transport du métal des tissus mous vers les os (Flora & Tandon, 1986 ; Flora *et al.*, 1989b). D'autre part, elle activerait le mécanisme de transport actif des sécrétions biliaires, ce qui favoriserait l'élimination du plomb dans les fèces (Ito *et al.*, 1987).

L'action d'un traitement conjugué de thiamine et d'acide ascorbique, ou de sel de zinc, se serait révélé plus efficace, pour mobiliser le plomb des tissus mous et restaurer les modifications biochimiques, que l'action individuelle de chaque élément (Flora & Tandon, 1986 ; Flora *et al.*, 1989b).
La combinaison de cette vitamine avec l'EDTA calcicodisodique produirait un effet synergique, reposant sur la formation d'un complexe plomb-thiamine facilement excrété, mais surtout par la facilitation de pénétration du chélateur dans les cellules et à travers la barrière céphalo-méningée, permettant un abaissement de la teneur en plomb du cerveau (Flora *et al.*, 1986).

3) AUTRES FACTEURS NUTRITIONNELS

3.1) Acides aminés et protéines

Certains acides aminés ont montré, expérimentalement chez l'animal, une influence sur la toxicité du plomb.

Ainsi, la liaison du plomb avec certains acides aminés, tels que la méthionine, la cystine, la cystéine, la tyrosine et l'arginine, augmenterait sa solubilité *in vitro*, à pH neutre ou alcalin, favorisant son absorption intestinale estimée par perfusion *in situ* (Conrad & Barton, 1978).

En revanche, *in vivo*, un supplément alimentaire en méthionine réduirait la teneur en plomb présente dans les reins et le muscle, mais pas dans le sang, le foie et le squelette ; cette action bénéfique reposerait sur une stimulation de l'excrétion du plomb. Enfin elle réduirait le stress oxydatif causé par le plomb (Conrad & Barton, 1978 ; Latta & Donaldson, 1986 ; Patra *et al.*, 2001a).

D'autre part, l'association de méthionine et de sel de zinc serait plus efficace que l'acide aminé ou le métal seul, sur la réduction de l'inhibition de l'activité de l'ALAD, l'élévation d'ALA urinaire et la concentration en plomb du sang, du foie et du rein (Flora *et al.*, 1991). Le résultat serait identique, lorsque la méthionine est remplacée par la L-lysine (Tandon *et al.*, 1997).
Enfin, l'administration de méthionine seule ou en présence de sel de zinc augmenterait l'efficacité d'un traitement par chélateur pour mobiliser le plomb et restaurer les altérations biochimiques (Flora & Tandon, 1995).

La méthionine n'agirait pas directement sur la toxicité du plomb, mais par l'intermédiaire du glutathion. En effet, ce peptide est composé d'acide glutamique, de glycine (capable de chélater certains métaux lourds dont le plomb, le complexe étant excrété dans la bile) et de cystéine, dont le groupement thiol est apporté par la méthionine (Latta & Donaldson, 1986).

L'influence qu'exerce la teneur en protéines de l'alimentation, sur la toxicité du plomb, n'est pas clairement définie.
Chez l'homme, aucune association n'a pu être mise en évidence (Lucas *et al.*, 1996).
Chez l'animal, les données sont controversées. Si Flora et collaborateurs (1989a) et Ghosh et collaborateurs (1992) ont mentionné une élévation de la teneur tissulaire et de la toxicité du plomb (élévation du taux de ZPP, diminution de l'activité de l'ALAD, des neurotransmetteurs et d'enzymes cérébrales) en cas de carence protéique, Conrad et Barton (1978) et Quarterman et collaborateurs (1978b) considèrent que la rétention en plomb dépendrait surtout du taux de croissance de l'animal. Toutefois, les auteurs sont en désaccord sur l'effet observé.

Il est à noter que, dans ces diverses expériences, la teneur en protéines de l'alimentation des rats était modulée par apport de caséine. Or, il a été montré expérimentalement que la toxicité du plomb était plus sévère chez les rats nourris avec de la caséine que chez ceux nourris avec des graines de soja (Anders *et al.*, 1982).

3.2) Lipides

Si une carence lipidique n'a montré aucun effet sur la toxicité du plomb, l'ingestion simultanée de plomb et de lipides augmenterait légèrement la plombémie et la rétention du plomb, chez l'homme et chez l'animal (Barltrop & Meek, 1975 ; Barltrop & Khoo, 1976 ; DeLuca *et al.*, 1982 ; Flanagan *et al.*, 1982 ; Lucas *et al.*, 1996).
Cet effet des lipides pourrait s'expliquer par la stimulation du flux biliaire durant la digestion, ce qui contribuerait à augmenter l'absorption intestinale du plomb par la formation de complexes solubles diffusibles avec les acides gras et/ou les sels biliaires (Cikrt & Tichy, 1975 ; Barltrop & Khoo, 1976 ; Lucas *et al.*, 1996).

3.3) Lait

Les données bibliographiques concernant l'influence du lait sur le métabolisme du plomb présentent des résultats contradictoires.

Ainsi, chez l'animal, le lait exercerait un effet stimulant sur l'absorption intestinale du plomb (Bell & Spicket, 1981 ; Bushnell & DeLuca, 1981).
Chez l'homme, si Flanagan et collaborateurs (1982) n'observent aucune modification, d'autres auteurs auraient mis en évidence une diminution de la teneur sanguine et de la rétention du plomb, lors d'une administration simultanée de métal et de lait (Blake *et al.*, 1983 ; James *et al.*, 1985 ; Liou *et al.*, 1996 ; Hernandez-Avila *et al.*, 1997 ; Weyermann & Brenner, 1997 ; Lacasana *et al.*, 2000). Toutefois, les auteurs constatent que l'inhibition observée est inférieure à celle attendue, compte tenu de la concentration en calcium et en phosphore du lait.

Concernant le composant du lait impliqué dans ces effets, certains auteurs ont mis en cause le lactose (Bushnell & DeLuca, 1981, 1983 ; Bell & Spickett, 1981). Cette hypothèse est cependant réfutée par James et collaborateurs (1985).
Selon d'autres auteurs, c'est la liaison du plomb à la caséine du lait, qui favoriserait l'absorption du plomb dans l'intestin grêle (Beach & Henning, 1988 ; Yannaï & Sachs, 1993 ; Palminger-Hallen & Oskarsson,1995). Ainsi, dans la lumière intestinale de rats non sevrés, le plomb resterait associé à la caséine et pénétrerait dans la muqueuse iléale, par pinocytose (Beach & Henning, 1988 ; Henning & Cooper, 1988 ; Palminger-Hallen *et al.*, 1996b). Mais le devenir du plomb est sujet à contradiction. En effet, Henning et Leeper (1984) suggèrent

que le métal est excrété par desquamation des cellules épithéliales, tandis que Palminger-Hallen et Oskarsson (1995) considèrent que le plomb serait absorbé, de manière lente et continue.
Chez l'homme, l'absorption de protéines par pinocytose a également été observée dans les premiers moments de la vie (Czaky, 1984 ; Walker, 1985). Toutefois, la composition du lait diffère de celle de l'animal. En effet, 30 % du plomb seraient retrouvés dans le petit lait; qui contient de l'albumine sérique et de la lactoferrine, protéines liant les éléments traces tels que le fer, le zinc, le cuivre et facilitant leur absorption intestinale (Palminger-Hallen & Oskarsson, 1995).

4) AGE

La plus grande sensibilité des enfants au plomb est bien connue. Elle serait en partie liée à une immaturité des organes et notamment du tractus gastro-intestinal, entraînant une élévation de l'absorption de cet élément, chez l'homme et chez l'animal (Kostial *et al.*, 1971 ; Alexander, 1972 ; Forbes & Reina, 1972 ; Barltrop & Meek, 1975 ; Ziegler *et al.*, 1978 ; Bushnell & DeLuca, 1983 ; Gulson *et al.*, 1998a ; Manton *et al.*, 2000).

Ainsi, si le site principal de l'absorption est le duodénum, des travaux menés sur le rat non sevré ont mis en évidence une voie supplémentaire de pénétration du plomb, dans les cellules épithéliales iléales par pinocytose. Toutefois, il n'a pas été déterminé si le plomb était ensuite libéré dans la circulation sanguine ou s'il était retenu dans les cellules épithéliales jusqu'à leur desquamation (Keller & Doherty, 1980 ; Henning & Leeper, 1984 ; Mahaffey, 1985 ; Morton *et al.*, 1985 ; Henning & Cooper, 1988 ; Mushak, 1991 ; Palminger Hallen *et al.*, 1996a).
L'immaturité du système rénal est également impliquée, entraînant une diminution de l'excrétion urinaire du plomb chez le nourrisson et le jeune enfant (OMS, 1997).
De plus, la distribution de cet élément absorbé dans les organes serait différente entre le jeune et l'adulte (Palminger Hallen *et al.*, 1996b).
Enfin, pour une même source d'exposition, l'apport en plomb peut s'avérer plus important chez l'enfant, compte tenu de son poids corporel, de ses besoins plus grands en calories et fluides, ainsi que de son métabolisme plus élevé (Mahaffey, 1985 ; Gulson *et al.*, 2001).
Il faut ajouter, à ces différents facteurs physiologiques, le rôle de l'environnement, lié au comportement particulier que peut avoir l'enfant, souvent appelé "pica", et qui consiste à ingérer des substances non alimentaires contaminées (Mahaffey, 1985 ; Brody *et al.*, 1994 ; Pirkle *et al.*, 1994 ; Juberg *et al.*, 1997 ; Lanphear *et al.*, 1998 ; Sinnaeva *et al.*, 1999 ; Manton *et al.*, 2000).

A côté de ce groupe sensible, différentes études se sont intéressées aux variations de la plombémie au cours de la vie. Ainsi, une élévation de la plombémie a pu être observée avec l'âge des sujets, estimée à 14 $\mu g.L^{-1}$ tous les 14 ans (Awad *et al.*, 1981 ; Maranelli *et al.*,

1990 ; Brody *et al.*, 1994 ; Huel, 1997 ; Lai *et al.*, 1997 ; Weyermann & Brenner, 1997 ; Cheng *et al.*, 1998 ; Solé *et al.*, 1998 ; Weyermann & Brenner, 1998 ; White & Sabbioni, 1998 ; Campagna *et al.*, 1999, 2000 ; Perrone *et al.*, 1999 ; Simons & Hudes, 1999 ; Hertz-Piccioto *et al*, 2000 ; Leroyer *et al.*, 2001 ; Todd *et al.*, 2001b ; Apostoli *et al.*, 2002).
Certains auteurs ont noté un léger déclin de la plombémie entre 50 et 70 ans, qui, selon eux, serait probablement lié à une diminution du métabolisme de base et donc des besoins énergétiques. Chez la femme, un pic de plombémie a pu être constaté en période post-ménopausale, vraisemblablement associé à une mobilisation du plomb présent dans le squelette, suite à la déminéralisation du tissus osseux (Bœcklund *et al.*, 1999 ; Hernandez-Avila *et al.*, 2000 ; Vig & Hu, 2000). Ces mêmes auteurs ont observé une nouvelle élévation de la plombémie au-delà de 70 ans. Toutefois, ces résultats sont à prendre avec précaution, d'autant qu'il pourrait s'agir d'un effet de cohorte, les sujets ayant été exposés dans une période où la réglementation relative à l'exposition au plomb était beaucoup moins rigoureuse, notamment concernant l'essence plombée et les rejets industriels (surtout avant les années 1970).

5) SEXE

En général, la femme présente une plombémie inférieure à celle de l'homme (Brody *et al.*, 1994 ; Christiensen & Kristiansen, 1994 ; Staessen, 1995 ; Liou *et al.*, 1996 ; Huel *et al.*, 1997 ; Khassouani *et al.*, 1997 ; Kristiansen *et al.*, 1997 ; Weyerman & Brenner, 1997 ; Solé *et al.*, 1998 ; White & Sabbioni, 1998 ; Bœcklund *et al.*, 1999 ; Furman & Laleli, 1999 ; Nordberg *et al.*, 2000 ; Chen *et al.*, 2001 ; Leroyer *et al.*, 2001 ; Todd *et al.*, 2001a ; Apostoli *et al.*, 2002).
Selon certains auteurs, cette différence pourrait s'expliquer par un taux d'hématies plus élevé chez l'homme (+ 10 %), la quasi-totalité du plomb présent dans le sang étant liée aux érythrocytes (Awad *et al.*, 1981 ; Bœcklund *et al.*, 1999 ; Leroyer *et al.*, 2001).
White & Sabbioni (1998), quant à eux, mettent en avant le fait que la masse osseuse est plus importante chez l'homme, ce qui entraînerait une différence de stockage entre les deux sexes pouvant se répercuter sur la plombémie.
Toutefois, l'explication majeure reste une exposition au plomb plus élevée chez les hommes, compte tenu de l'activité professionnelle et des loisirs (réparation automobile, chasse, pêche) (Lai *et al.*, 1997 ; Bœcklund *et al.*, 1999 ; Todd *et al.*, 2001b).

6) FACTEURS GENETIQUES

Certains auteurs se sont intéressés aux facteurs génétiques, qui pourraient expliquer une partie de l'importante variabilité inter-individuelle observée au niveau la plombémie, au cours d'études épidémiologiques.

Ainsi, des différences au niveau du génotype de l'ALAD, l'enzyme érythrocytaire la plus sensible au plomb, pourrait influencer la teneur sanguine de ce dernier. Effectivement, cette enzyme codée par un gène unique, situé dans la région q34 du chromosome 9, présente deux allèles codominants ALAD1 et ALAD2 (Schwartz *et al.*, 1995 ; Leleu *et al.*, 2000). Si la fréquence d'apparition d'ALAD2 varie selon le groupe ethnique (11 à 20 % dans la population blanche, 8 à 11 % dans la population asiatique et absence dans la population africaine), l'activité de cette enzyme semble indépendante du génotype (Schwartz *et al.*, 1995 ; Fleming *et al.*, 1998 ; Hsieh *et al.*, 2000 ; Shen *et al.*, 2001).

Selon certains auteurs, les sujets homozygotes ou hétérozygotes pour ALAD2, auraient une plombémie plus élevée que les sujets homozygotes pour l'allèle ALAD1, dans des conditions d'exposition similaires, professionnelle ou environnementale (Fleming *et al.*, 1998 ; Hsieh *et al.*, 2000 ; Shen *et al.*, 2001). Selon Schwartz et collaborateurs (1995), si l'influence d'ALAD2 semble moins évidente, les auteurs notent, néanmoins, une tendance à la sur-expression de l'allèle ALAD2, dans le groupe de travailleurs présentant une plombémie supérieure à 400 $\mu g.L^{-1}$.
En outre, les individus porteurs de l'allèle ALAD2 présenteraient une quantité de plomb plus importante sur l'enzyme ALAD. Certains auteurs considèrent cette propriété comme protectrice, la quantité de plomb biodisponible pour inhiber les autres enzymes du système de l'hème étant alors diminuée (Schwartz *et al.*, 1995 ; Fleming *et al.*, 1998 ; Leleu *et al.*, 2000) ; d'autres auteurs la trouvent aggravante, ALAD2 retenant plus de plomb, la quantité globale de plomb accumulée dans l'organisme augmenterait (Shen *et al.*, 2001).

De récents travaux se sont intéressés aux différences génétiques de la Na^+-K^+ ATPase et des récepteurs de la vitamine D (VDR), qui pourraient, en partie, expliquer l'inconstance de la relation entre la plombémie et la pression sanguine, observée dans certaines études (Glenn *et al.*, 2001 ; Lee *et al.*, 2001).

7) FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX

La **vétusté du logement** est associée à une plombémie élevée, surtout chez les enfants. Elle est liée à la présence de plomb dans les canalisations d'eau, ainsi qu'à l'utilisation de peintures au plomb, autorisée jusqu'en 1948 (Awad *et al.*, 1981 ; Brody *et al.*, 1994 ; Pirkle *et al.*, 1994 ; Huel, 1997 ; Juberg *et al.*, 1997 ; Lanphear *et al.*, 1998 ; Manton *et al.*, 2000 ; Leroyer *et al.*, 2001). En effet, les jeunes enfants peuvent porter des éclats de peintures à leur bouche (phénomène connu sous le nom de pica), ceux-ci pouvant contenir jusqu'à 10 000 ppm ($\mu g.g^{-1}$) de plomb (Gerson, 1990 ; Direction Générale de la Santé, 1993).

Par ailleurs, la **saison** pourrait également exercer une influence sur la plombémie, particulièrement chez les enfants ; les teneurs sanguines en plomb serait plus élevées pendant

les mois chauds (Pirkle *et al.*, 1994 ; Schell *et al.*, 1997 ; Jacob *et al.*, 2000 ; Ying *et al.*, 2000 ; Leroyer *et al.*, 2001 ; Rothenberg *et al.*, 2001). Cette variation saisonnière serait liée à une modification de la distribution de la poussière à l'intérieur des habitations et aux activités extérieures des enfants durant ces mois, ainsi qu'à la variation saisonnière du métabolisme de la vitamine D, dont l'effet stimulant sur l'absorption intestinale du plomb est connu depuis de nombreuses années (Rothenberg *et al.*, 2001).

8) AUTRES FACTEURS

8.1) Alcool

De nombreuses études épidémiologiques ont montré une association entre la consommation de boissons alcoolisées et l'incidence d'une plombémie élevée (Awad *et al.*, 1981 ; Gerson, 1990 ; Maranelli *et al.*, 1990 ; Muldoon *et al.*, 1994 ; Philip & Gerson, 1994 ; Liou *et al.*, 1996 ; Weyermann & Brenner, 1997 ; Kristal-Boneh *et al.*, 1998 ; Weyermann & Brenner, 1998 ; Leroyer *et al.*, 2000a, 2001 ; Apostoli *et al.*, 2002).
L'apport supplémentaire de plomb, estimé à 20 $\mu g.L^{-1}$ chez l'homme et à 7,6-10 $\mu g.L^{-1}$ chez la femme, pourrait résulter de la présence de plomb dans les boissons alcoolisées et/ou de l'interaction métabolique éthanol-plomb (Awad *et al.*, 1981 ; Maranelli *et al.*, 1990 ; Weyermann & Brenner, 1997, 1998 ; Santos *et al.*, 1999).

Toutefois, expérimentalement, l'influence de la consommation d'alcool sur la toxicité du plomb reste controversée.

Ainsi, James et collaborateurs (1985) mentionnent une diminution de cette toxicité, par un abaissement de la rétention du plomb, que les auteurs expliquent par une stimulation des sécrétions digestives.

Santos et collaborateurs (1999), quant à eux, n'ont observé aucun effet. Selon ces auteurs, l'association de la consommation d'alcool et d'une plombémie élevée chez les mêmes sujets pourrait être simplement due à une exposition simultanée, c'est-à-dire à une contamination des boissons alcoolisées plutôt qu'à une interaction biologique.

Enfin, d'autres études ont mis en évidence une augmentation de la toxicité du plomb, caractérisée par une élévation de la plombémie, des concentrations hépatique et cérébrale en plomb, un effet plus prononcé sur le système hématologique et l'annulation de l'effet protecteur du cuivre et du zinc sur certains paramètres de la toxicité du plomb (Kulikowska *et al.*, 1989 ; Miniuk *et al.*, 1989 ; Gupta & Gill, 2000a, b). La libération excessive du plomb osseux, ou la perturbation de l'excrétion du plomb due aux dommages hépatiques causés par l'éthanol, pourrait expliquer cette élévation de la teneur tissulaire en plomb (Kulikowska *et al.*, 1989 ; Miniuk *et al.*, 1989).

Par ailleurs, l'élévation de la concentration cérébrale en plomb serait due à l'altération de la perméabilité de la barrière hémato-méningée par l'éthanol, aggravant ainsi les dommages cellulaires induits par le plomb au niveau neurochimique et neurocomportemental en terme d'incoordination motrice, d'agressivité et d'hyperactivité (Gupta & Gill, 2000a, b).

8.2) Tabac

De nombreux auteurs s'accordent à impliquer l'usage du tabac, ainsi que l'exposition secondaire à la fumée de cigarette, dans l'élévation de la teneur sanguine en plomb (Rabinowitz *et al.*, 1977 ; Awad *et al.*, 1981 ; Fell, 1984 ; Maranelli *et al.*, 1990 ; Muldoon *et al.*, 1994 ; Liou *et al.*, 1996 ; Huel, 1997 ; Khassouani *et al.*, 1997 ; Kristal-Boneh *et al.*, 1998 ; Bœcklund *et al.*, 1999 ; Dawson *et al.*, 1999 ; Hernandez-Avila *et al.*, 2000 ; Hertz-Piccioto *et al*, 2000 ; Leroyer *et al.*, 2000a, 2001 ; Nordberg *et al.*, 2000 ; Todd *et al.*, 2001b ; Apostoli *et al.*, 2002). La surcharge sanguine en plomb a été évaluée à 6,6-8,4 $\mu g.L^{-1}$ chez l'homme et à 5,6-6 $\mu g.L^{-1}$ chez la femme, soit 0,33 $\mu g.L^{-1}$ par cigarette (Liou *et al.*, 1996 ; Weyermann & Brenner, 1997).
A signaler que la quantité de plomb inhalée par paquet de cigarettes fumé varie selon la marque et l'origine des cigarettes (Jung *et al.*, 1998).

8.3) Remèdes et maquillage traditionnels

La consommation de remèdes traditionnels et l'utilisation de "khôl", dans le maquillage, peuvent être des sources d'exposition au plomb non négligeables (Philip & Gerson, 1994 ; Mirghani, 1997 ; INSERM, 1999 ; Moore & Adler, 2000 ; Rothenberg *et al.*, 2000). Ainsi, plusieurs cas d'intoxication au plomb ont été observés suite à l'utilisation de poudres ou cachets d'origine asiatique contre l'infertilité ou l'impuissance. Les produits contenaient jusqu'à 60% de plomb en poids, cet élément entrant dans leur composition en tant que composant à part entière et étant parfois indiqué sur l'étiquette du flacon (Bayly *et al.*, 1995).

8.4) Poteries artisanales "vernies au plomb"

L'utilisation de poteries artisanales recouvertes de vernis à base de plomb, pour conserver les aliments, a pu être associée à une élévation de la plombémie, estimée à 14 $\mu g.L^{-1}$ (Hernandez-Avila *et al.*, 1997, 2000 ; Azcona-Cruz, *et al.*, 2000 ; Brown *et al.*, 2000 ; Lacasana *et al.*, 2000 ; Moline *et al.*, 2000 ; Rothenberg *et al.*, 2000).

Tableau IX : Constantes de solubilité de certains composés du plomb.

DENOMINATION	FORMULE	- log (K_{ps})
litharge	PbO	12,9[a]
anglésite	$PbSO_4$	7,7[a]
cérusite	$PbCO_3$	12,8[a]
galène	PbS	27,5[a]
fluoropyromorphite	$Pb_{10}(PO_4)_6F_2$	71,6[a,b]
hydroxypyromorphite	$Pb_{10}(PO_4)_6OH_2$	76,8[a,b]
bromopyromorphite	$Pb_{10}(PO_4)_6Br_2$	78,1[a]
chloropyromorphite	$Pb_{10}(PO_4)_6Cl_2$	84,4[a] ; 83,7[b]

(a : Ruby *et al.*, 1994 ; b : Ma *et al.*, 1994a).

IMMOBILISATION DU PLOMB PAR L'APATITE

Parallèlement aux différents traitements actuellement réalisés, pour limiter la corrosion des conduites d'eau de distribution contenant du plomb (neutralisation, reminéralisation, traitement filmogène de l'intérieur des tuyaux par des orthophosphates), il existe des cartouches, capables de retenir le plomb, au robinet du consommateur. Toutefois, ce système reste onéreux.
Dans ces conditions, il serait intéressant de trouver un nouveau traitement, capable d'immobiliser le plomb présent dans l'eau.

Parmi les différents composés réagissant avec le plomb pour former des précipités, l'apatite a fait l'objet de nombreux travaux, dans le but de décontaminer les sols pollués. Elle n'a toutefois jamais été étudiée dans le cadre de l'épuration de l'eau.

Il est vrai que ce phosphate de calcium présente un certain nombre d'avantages.
Ainsi, les phosphates de plomb (pyromorphites), produits de la réaction entre le plomb et l'apatite, ont été démontrés comme les formes environnementales de plomb les plus stables dans une grande variété de conditions. Ils sont moins solubles que les oxydes, hydroxydes, carbonates et sulfates de plomb. Parmi ces pyromorphites, la chloropyromorphite (CP) présente la constante de solubilité la plus faible (Tableau IX).
De plus, parmi toutes les sources de phosphates inorganiques, les apatites sont les plus économiques, de par leur abondance et leur faible coût (Ma *et al.*, 1994a). Cependant, ces minerais de phosphates sont généralement des fluorapatites (FA), de composition $Ca_{10}(PO_4)_6F_2$, dont l'efficacité à immobiliser le plomb aqueux se voit diminuée par la présence d'impuretés (substitutions), comparativement à l'hydroxyapatite $Ca_{10}(PO_4)_6OH_2$ (Ma *et al.*, 1994a).
A noter que l'hydroxyapatite est le principal composant des tissus osseux (Paillard, 1992 ; Kim *et al.*, 2000) ; elle est d'ailleurs utilisée dans la réalisation de biomatériaux, tels que des implants osseux ou dentaires (Saalfeld *et al.*, 1994 ; El Feki *et al.*, 2000).

Actuellement, les mécanismes de fixation du plomb par l'apatite ne sont pas clairement définis et font l'objet de deux théories différentes. Selon un certain nombre de chercheurs, majoritairement américains, les mécanismes de la réaction seraient dominés par la dissolution de l'apatite de calcium, suivie de la précipitation d'apatite de plomb (pyromorphite), quelques chercheurs japonais et canadiens proposent, quant à eux, une réaction d'échange ionique (ou substitution cationique) entre les cations Ca^{2+} et Pb^{2+}.

Par contre, les produits de la réaction du plomb et de l'apatite ne sont pas contestés, il s'agirait d'hydroxypyromorphite ($Pb_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), de chloropyromorphite ($Pb_{10}(PO_4)_6Cl_2$) ou de fluoropyromorphite ($Pb_{10}(PO_4)_6F_2$), selon les anions présents en solutions (Cl^- et F^-).

1) THEORIE DE LA DISSOLUTION/PRECIPITATION

La réaction principale de l'immobilisation du plomb par l'hydroxyapatite serait décrite par les équations suivantes :

$$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 14\ H^+ \xrightarrow[\text{dissolution}]{} 10\ Ca^{2+} + 6\ H_2PO_4^- + 2\ H_2O \text{ (équation 1)}$$

$$10\ Pb^{2+} + 6\ H_2PO_4^- + 2\ H_2O \xrightarrow[\text{précipitation}]{} Pb_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 14\ H^+ \text{(équation 2)}$$

En présence de chlorure, l'équation 2 deviendrait :

$$10\ Pb^{2+} + 6\ H_2PO_4^- + 2\ Cl^- \xrightarrow[\text{précipitation}]{} Pb_{10}(PO_4)_6Cl_2 + 12\ H^+$$

En présence de fluorure, ce qui est le cas avec les apatites naturelles (fluorapatite) :

$$10\ Pb^{2+} + 6\ H_2PO_4^- + 2\ F^- \xrightarrow[\text{précipitation}]{} Pb_{10}(PO_4)_6F_2 + 12\ H^+$$

Cette réaction principale de l'immobilisation du plomb par l'hydroxyapatite est la conclusion de nombreuses études et serait valable quelle que soit la forme chimique du plomb :

- $PbCl_2$ (Ma *et al.*, 1994a ; Xu & Schwartz, 1994 ; Furuta *et al.*, 2000 ; Manecki *et al.*, 2000a,b)
- $PbCO_3$ (Laperche *et al.*, 1996 ; Zhang *et al.*, 1998 ; Zhang & Ryan, 1999b)
- PbF_2 (Ma *et al.*, 1994a)
- $Pb(NO_3)_2$ (Ma *et al.*, 1993, 1994a, b, 1995 ; Xu & Schwartz, 1994 ; Chen *et al.*, 1997 ; Valsami-Jones *et al.*, 1998 ; Mavropoulos *et al.*, 2002 ; Sugiyama *et al.*, 2002)
- PbO (Laperche *et al.*, 1996)
- PbS (Zhang & Ryan, 1999a)
- $PbSO_4$ (Zhang & Ryan, 1998).

De plus, la forme synthétique (Bio-Rad, dans la majorité des études) ou naturelle de l'apatite ne semblerait pas influencer le produit de cette réaction (Ma *et al.*, 1993, 1995 ; Chen *et al.*, 1997 ; Manecki *et al.*, 2000a,b).

L'immobilisation du plomb aqueux par l'hydroxyapatite dépendrait du pH initial de la solution. En effet, le taux de dissolution de l'hydroxyapatite augmente lorsque le pH diminue

(Ma *et al.*, 1993 ; Valsami-Jones *et al.*, 1998 ; Zhang & Ryan, 1998,1999a, b ; Zhang *et al.*, 1998), conformément à l'équation 1 de la réaction principale du processus d'immobilisation du plomb.
Selon Chen et collaborateurs (1997), le pH initial de la solution influencerait la nature du produit final de la réaction. Ainsi, dans les profils obtenus par diffraction à rayons X, les pics des composés de type pyromorphite deviennent plus faibles à mesure que le pH initial de la solution est élevé, alors que ceux de la cérusite se renforcent (en présence d'apatite naturelle).

La formation de pyromorphite aurait été observée après la réaction de plomb aqueux avec le phosphate provenant d'apatite synthétique ou naturelle, mais également à partir de phosphates de sodium, de calcium, de potassium, de magnésium. L'efficacité des phosphates à réduire la concentration aqueuse de plomb serait corrélée à leur solubilité (Ma *et al.*, 1993, 1995 ; Shashkova *et al.*, 1999 ; Manecki *et al.*, 2000a,b ; Bothe & Brown, 2000 ; Pearson *et al.*, 2000 ; Yang *et al.*, 2001 ; Sugiyama *et al.*, 2002).

2) THEORIE DE L'ECHANGE IONIQUE

Les travaux aboutissant à cette théorie sont moins nombreux et généralement antérieurs à ceux de la théorie de la dissolution/précipitation.
L'apatite de plomb serait formée selon l'équation suivante :

$$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + xPb^{2+} \rightarrow (Ca_{(10-x)}Pb_x)(PO_4)_6(OH)_2 + xCa^{2+}$$

conduisant notamment au produit de composition $Ca_{3,6}Pb_{6,4}(PO_4)_6(OH)_2$ (Suzuki *et al.*, 1984 ; Shashkova *et al.*, 1999).

Le phénomène serait un simple échange ionique entre une partie des ions Ca^{2+} de la structure de l'apatite et les ions divalents M^{2+} de la phase aqueuse. Les cations métalliques susceptibles d'être échangés seraient Ni^{2+}, Zn^{2+}, Mg^{2+}, Ba^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Cd^{2+} et Pb^{2+} (Suzuki *et al.*, 1981, 1982 ; Takeuchi *et al.*, 1988 ; Takeuchi & Arai, 1990 ; Jeanjean *et al.*, 1994, 1996 ; Shashkova *et al.*, 1999).
L'échange entre les ions Ca^{2+} et les ions Pb^{2+} serait très rapide et aurait lieu à la surface des particules d'hydroxyapatite (Takeuchi *et al.*, 1988, Takeuchi & Arai, 1990). Si Suzuki et collaborateurs (1984) ont mis en évidence une rétention plus importante de plomb par l'hydroxyapatite, lorsque la concentration initiale en métal est plus élevée, les travaux de Takeuchi et Arai, (1990) sont en désaccord avec ce résultat, la quantité de plomb retenue restant constante, quelle que soit la concentration en cet élément dans la solution.

Les auteurs s'accordent à constater une légère dissolution de l'hydroxyapatite, au cours de leurs expériences. Ainsi, à pH = 3, la structure de l'hydroxyapatite serait instable (dissolution progressive des cristaux) ; les protons s'échangeraient facilement avec les ions Ca^{2+} de

Tableau X : Constantes de maille de diverses apatites.

COMPOSES	a (Å)	c (Å)	REFERENCES
	9,423	6,880	Suzuki *et al.*, 1984
Hydroxyapatite	9,416-9,418	6,879-6,881	Saalfeld *et al.*, 1994
	9,420	6,860	Mahapatra *et al.*, 1995
	9,4305	6,8911	Kim *et al.*, 2000
	9,426-9,435	6,886-6,894	Mavropoulos *et al.*, 2002
	9,882	7,417	Suzuki *et al.*, 1984
Hydroxypyromorphite	9,880	7,417	Myiake *et al.*, 1986
	9,871	7,241	Mahapatra *et al.*, 1995
	9,877	7,425	El Feki *et al.*, 2000
	9,8612	7,4242	Kim *et al.*, 2000
	9,864-9,885	7,379-7,425	Mavropoulos *et al.*, 2002
Chlorapatite	9,5902	6,7666	Kim *et al.*, 2000
Chloropyromorphite	9,990	7,276	Miyake *et al.*, 1986
	9,9767	7,3255	Kim *et al.*, 2000
Fluoropyromorphite	9,759	7,291	Miyake *et al.*, 1986

l'hydroxyapatite ou réagiraient avec les ions hydroxyles et détruiraient la structure de l'apatite. Mais en présence de chlorure, l'effet synergique des ions Pb^{2+} et Cl^- permettrait la reconstruction de l'apatite, ainsi stabilisée sous forme de chloropyromorphite (Suzuki *et al.*, 1984 ; Takeuchi & Arai, 1990).

L'échange ionique entre Ca^{2+} et Pb^{2+} ne serait pas modifié par la présence d'autres cations métalliques, comme Cu^{2+} et Cd^{2+} (Takeuchi & Arai, 1990). En fait, le rayon ionique de Pb^{2+} serait proche de celui des ions Ca^{2+} aux sites M1 (ou $Ca_{(1)}$) et M2 (ou $Ca_{(2)}$) de la structure de l'hydroxyapatite ; l'échange serait indifférent entre ces deux sites (Suzuki *et al.*, 1984 ; Miyake *et al.*, 1986). Par contre, le rayon ionique de Cu^{2+} serait trop faible. Quant à Cd^{2+}, bien que son rayon ionique soit proche de celui de Ca^{2+}, sa plus faible électronégativité par rapport à Pb^{2+} rendrait l'échange difficile avec Ca^{2+}. De plus, les ions Cu^{2+} et Cd^{2+} sont hydratés dans la phase aqueuse, ils doivent donc être dissociés avant l'échange avec Ca^{2+} (Suzuki *et al.*, 1982 ; Takeuchi & Arai, 1990).

Il est intéressant de signaler que des résultats similaires ont été obtenus au cours d'expériences menées par les chercheurs des deux théories, la différence se situant au niveau de l'interprétation.

Ainsi, l'argument majeur de la théorie de l'échange ionique est le rapport molaire entre les ions Pb^{2+} et les ions Ca^{2+}, proche de l'unité lors de la réaction d'immobilisation du plomb par l'apatite (Suzuki *et al.*, 1981, 1982, 1984). C'est également le cas avec les ions Cd^{2+} (Jeanjean *et al.*, 1994, 1996). Si ce rapport est inférieur à 1, l'hypothèse avancée serait l'apport d'ions Ca^{2+} par dissolution d'apatite ; si ce rapport est supérieur à 1, c'est parce qu'une partie des ions Ca^{2+} libérés seraient immobilisée par précipitation avec un anion (fluorure de calcium, en présence de F^-).
Or, selon Ma *et al.* (1993), ce phénomène peut également s'expliquer en terme de dissolution/précipitation : 10 moles de plomb sont consommées pour former chaque mole d'hydroxypyromorphite (équation 2) et 1 mole d'hydroxyapatite se dissout pour fournir le phosphate nécessaire (équation 1), donc 10 moles de calcium sont libérées en solution.

Par ailleurs, les auteurs mentionnent une élévation des dimensions *a* et *c* (tableau X) de la structure cristalline d'hydroxyapatite, au cours de la formation de pyromorphite. Si Takeuchi et Arai (1990), défenseurs de la théorie de l'échange ionique, considèrent que cette transformation aurait lieu sans effet sérieux sur la structure de l'apatite, certains auteurs favorables à la théorie de la dissolution/précipitation, considèrent qu'une telle extension (estimée à 20 % du volume de l'unité de cellule) serait difficilement supportable sans rupture du cristal d'hydroxyapatite (Xu et Schwartz, 1994 ; Mavropoulos *et al.*, 2002).

OBJECTIFS

Sur la base de cette synthèse bibliographique, il apparaît donc nécessaire d'abaisser l'apport global en plomb. Si la principal cause de saturnisme infantile, en France, reste le plomb contenu dans les peintures des anciennes habitations, il ne faut pas négliger la contribution de l'eau potable. En effet, la présence de canalisations en plomb massif, de soudures et de brasures à base de plomb, continue à poser des problèmes, conduisant à une nouvelle directive européenne (98/83/CE), difficile à respecter, puisqu'elle prévoit la réduction de la concentration maximale en plomb de 50 à 25 $\mu g.L^{-1}$ en 2003 et finalement à 10 $\mu g.L^{-1}$ en 2013.

Or, les différents traitements actuellement réalisés en Europe, pour limiter la corrosion des conduites d'eau de distribution contenant du plomb ne permettront pas de respecter cette nouvelle norme. En effet, ces procédés n'assurent le maintien que d'une concentration en plomb dans l'eau supérieure ou égale à 20 $\mu g.L^{-1}$ (Vilagines & Leroy, 1995 ; Hayes *et al.*, 1997 ; INSERM, 1999 ; Gaujous *et al.*, 2000).
Quant aux filtres, adaptables au robinet du consommateur pour améliorer la qualité et le goût de l'eau de distribution, ils sont essentiellement à base de charbon actif et ne retiennent le plomb que par adsorption (Culligan, Laugil, Eau Limpide, CPED, Aqua-Techniques, ...).
Par ailleurs, des systèmes de filtration, d'origines américaine et japonaise, ont été spécialement conçus pour retenir le plomb et ont fait l'objet de brevets ; cependant, nous n'avons pas d'information précise, quant à leur commercialisation.
Au niveau français, un robinet anti-plomb a été mis au point par la Générale des Eaux (Vivendi Environnement), en partenariat avec le LSGC et le LHRSP de Nancy. Composé de zéolithe synthétique et de charbon actif, il devrait être commercialisé durant l'été 2002. Toutefois son coût n'a pas encore été divulgué.

Aussi, avons nous cherché, parmi les composés capables de retenir le plomb, celui conciliant un faible coût avec une immobilisation pratiquement irréversible du métal, dans les conditions d'utilisation.
L'apatite est apparue particulièrement intéressante, de par son abondance naturelle dans certains pays et sa capacité à réagir avec le plomb pour former de la pyromorphite, composé caractérisé par une constante de solubilité extrêmement faible ; le plomb ne serait alors plus biodisponible, en cas d'ingestion.
Ce phosphate de calcium pourrait entrer dans la composition d'une cartouche de filtration, placée au niveau du robinet du consommateur, pour retenir le plomb présent dans l'eau de boisson, mais il pourrait également participer au traitement des eaux résiduelles, notamment des pays en voie de développement qui ne sont pas équipés de stations d'épuration.

Toutefois, les mécanismes mis en jeu dans la réaction entre l'apatite et le plomb ne sont pas encore clairement identifiés et font l'objet de deux théories. Une première théorie (dissolution/précipitation) implique l'utilisation d'apatite dissoute, afin de fournir des phosphates, qui réagissent avec le plomb pour former de la pyromorphite. Tandis qu'une seconde théorie (échange ionique) repose sur l'apatite solide, avec remplacement partiel du calcium par le plomb.
Il apparaissait donc indispensable d'approfondir les mécanismes de formation de la pyromorphite.
Cette étude a été menée sur une hydroxyapatite synthétique, pour des raisons de reproductibilité et de facilité d'approvisionnement.

Compte tenu de la dissolution partielle de l'apatite en milieu aqueux, ce travail de recherche a débuté par une étude *in vitro* (physico-chimique et cristallographique) de l'immobilisation du plomb aqueux par de l'hydroxyapatite dissoute. Une étude *in situ* (technique de perfusion intestinale), nous a permis d'évaluer l'absorption du plomb, dans ces conditions expérimentales, qui tiennent compte de l'influence de différents paramètres biologiques sur le mélange plomb-apatite et en particulier l'effet des variations de pH, dues aux sécrétions biliaires et pancréatiques.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la réaction entre le plomb aqueux et l'hydroxyapatite solide, *in vitro*, puis *in vivo* (traitement oral sur 31 jours consécutifs), afin de vérifier les effets sur la biodisponibilité du plomb, au travers des modifications de son accumulation tissulaire.

Enfin, compte tenu du coût relativement élevé de l'apatite de synthèse, utilisée dans ces études, nous avons estimé, par une approche *in vitro*, les capacités de rétention du plomb par une apatite naturelle, présentant l'avantage d'être abondante dans certains pays et donc d'être très bon marché.

CHAPITRE 2 :

ETUDE EXPERIMENTALE

ETUDE *IN VITRO* DE L'IMMOBILISATION DU PLOMB PAR L'HYDROXYAPATITE

Cette étude *in vitro*, réalisée à l'aide de tubes Centrisart, a permis d'évaluer l'influence de l'hydroxyapatite synthétique sur la biodisponibilité du plomb aqueux. Afin d'étudier les deux théories proposées, deux séries d'expériences ont été effectuées, dans lesquelles cette apatite a été apportée sous forme dissoute ou solide.
Les produits de la réaction de l'hydroxyapatite synthétique avec le plomb aqueux ont été analysés par microscopie électronique à balayage ainsi que par diffraction aux rayons X. Cette dernière partie a été réalisée au Laboratoire de Chimie du Solide Minérale (lcsm, Faculté des Sciences, Université H. Poincaré, Nancy) du professeur Pierre Steinmetz.

Etude physico-chimique :

Influence de la forme de l'hydroxyapatite et du pH sur la réaction entre le plomb et l'hydroxyapatite synthétique

1) MATERIEL ET METHODE

1.1) Matériel

1.1.1) Équipement

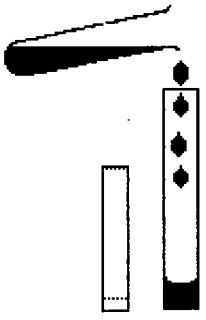
- Balance type 2442 (SARTORIUS)
- Centrifugeuse Labofuge 200 (HERAEUS SEPATECH)

- pH-mètre type Minisis 5000 (TACUSSEL)
  - électrode de référence au calomel saturée en chlorure de potassium, type TR 100
  - électrode de verre TCB, 10/HS
- Spectromètre d'émission à plasma d'argon DCP (Direct Current Plasma) type Spectraspan VII

1.1.2) Petit matériel

- Agitateurs aimantés en Téflon (FISHER SCIENTIFIC)
- Béchers en polypropylène 25 mL (POLY LABO)
- Béchers en polypropylène 250 mL Nalgène® (FISHER SCIENTIFIC)
- Fioles jaugées en polypropylène Nalgène® (FISHER SCIENTIFIC)
- Micropipettes (GILSON) avec embouts en polyéthylène (POLY LABO)
- Tubes à hémolyse en polystyrène cristal 13 x 75 mm (POLY LABO)

Figure 5 : Illustration schématique du principe d'ultrafiltration avec un tube Centrisart.



1

1. Après avoir enlevé le bouchon, le petit tube interne a été glissé hors du tube de centrifugation et posé, face ouverte, sur une surface propre, en évitant tout contact avec la membrane. L'échantillon de solution (2 mL) a été versé dans le tube de centrifugation.

2

2. Le petit tube interne a été replacé dans le tube de centrifugation, la membrane vers le bas. Un temps de repos de 5 minutes a été nécessaire pour assurer l'humidification de la membrane.

3

3. Le tube a été centrifugé à 2500 g pendant 20 minutes.

4

4. Le filtrat (contenu du petit tube interne) a été prélevé à l'aide d'une pipette, aussitôt après la fin de la centrifugation.

- Tubes en polystyrène 19 x 95 mm (POLY LABO)
- Tubes Centrisart I SM 13239 E (SARTORIUS)

1.1.3) Réactifs

- Acide chlorhydrique, HCl, 30 % Suprapur (MERCK)
- Acide nitrique, HNO_3, 65 % Suprapur (MERCK)
- Chlorure de plomb, $PbCl_2$ (MERCK)
- Chlorure de sodium, NaCl, Suprapur (MERCK)
- Eau purifiée par un système de purification type Milli-Q (MILLIPORE)
- Hydroxylapatite, $Ca_5HO_{13}P_3$ (FLUKA) ou hydroxyapatite
- Perchlorate de sodium, $NaClO_4.H_2O$, Pro Analysis (MERCK)
- Soude, NaOH, 30 % Suprapur (MERCK)

1.2) Méthode

La technique *in vitro* utilisée a pour but de séparer par ultrafiltration les complexes formés lors de la réaction du plomb aqueux et de l'hydroxyapatite synthétique dissoute ou solide. Pour cela, 2 mL de la solution testée ont été placés dans des tubes Centrisart présentant une masse de rupture de 10 000 daltons et centrifugés à 2500 g pendant 20 minutes. L'ultrafiltration a ainsi permis de séparer les molécules de la solution selon leur masse, l'ultrafiltrat ne contenant que les molécules de masse inférieure à la masse de rupture de la membrane, c'est-à-dire les molécules libres ou les petits complexes non précipités (Figure 5).

Les solutions testées contenaient du plomb sous forme de $PbCl_2$, à 10 $mg.L^{-1}$ et de l'hydroxyapatite dissoute à 4,85 $mg.L^{-1}$ ou solide à 0-10 000 $mg.L^{-1}$ (rapport HA/Pb de 0 à 1000). La solution d'hydroxyapatite dissoute a été obtenue en incorporant 1 g d'hydroxyapatite synthétique à 1 L d'eau purifiée, sous agitation pendant 24 h ; le surnageant a ensuite été prélevé, centrifugé 5 min à 3000 g, puis conservé à 4°C. La concentration de 4,85 $mg.L^{-1}$ devrait fournir la quantité de phosphate nécessaire pour précipiter la totalité des ions Pb^{2+} présents dans la solution (soit une concentration en phosphore de 0,90 $mg.L^{-1}$), selon l'équation de la réaction de dissolution/précipitation suivante :

$$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 14\,H^+ \xrightarrow{\text{dissolution}} 10\,Ca^{2+} + 6\,H_2PO_4^- + 2\,H_2O$$

$$10\,Pb^{2+} + 6\,H_2PO_4^- + 2\,H_2O \xrightarrow{\text{précipitation}} Pb_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 14\,H^+$$

Les solutions ont été préparées dans de l'eau purifiée Milli-Q, en absence ou en présence de sel, le chlorure de sodium (NaCl) ou le perchlorate de sodium ($NaClO_4$), ces sels ayant été utilisés ultérieurement dans l'étude de perfusion intestinale *in situ*. Toutes les solutions,

Tableau XI : Concentrations en plomb ($\mu g.L^{-1}$) dans l'ultrafiltrat de solutions de plomb (10 $mg.L^{-1}$) en présence ou en absence d'hydroxyapatite dissoute (4,85 $mg.L^{-1}$), avec ou sans sel (NaCl ou $NaClO_4$), au pH naturel ou ajusté à 3.

pH	Pb dans l'eau	HA-Pb dans l'eau	HA-Pb dans NaCl	HA-Pb dans $NaClO_4$
5,3-6,5	10 000 ± 200	< limite de détection	< limite de détection	< limite de détection
3,0	10 000 ± 200	8 500 ± 50	10 000 ± 250	10 000 ± 200

Tableau XII : Concentrations en plomb ($\mu g.L^{-1}$) dans l'ultrafiltrat de solutions de plomb (10 $mg.L^{-1}$), en présence ou en absence d'hydroxyapatite dissoute (4,85 $mg.L^{-1}$), avec du $NaClO_4$ et dans différentes conditions de pH.

	pH				Teneurs en Pb
	Pb avant	HA avant	HAPb t_0	HAPb t_{24h}	
a	3,0	7,1	3,1	3,2	10000 ± 78
b	3,0	3,0	3,0	3,0	10000 ± 334
c	5,3	7,1	3,0	3,0	10000 ± 325
d	5,3	7,1	5,3	5,6 ↓ 3,0	10000 ± 283
e	5,3	7,1	5,3	3,0 ↑ 5,6	82 ± 101
f	3,0	-	-	-	10000 ± 290
g	5,3	-	-	-	8887 ± 257
h	5,3 ↓ 3,0	-	-	-	10000 ± 499
i	3,0 ↑ 5,3	-	-	-	9741 ± 455
j	5,3	7,1	5,3	5,6	< limite de détection

réalisées au minimum en double, ont été testées au pH naturel (de 5,3 à 6,5) et à pH abaissé à 3 par ajout d'HCl, afin de simuler les conditions d'acidité rencontrées au niveau du duodénum. L'ultrafiltration a été réalisée après une période d'incubation de 24 h.

Le dosage du plomb dans l'ultrafiltrat a été réalisé avec un spectromètre d'émission à plasma d'argon, à une longueur d'onde de 283,3 nm. Le seuil de détection du plomb est de 20 $\mu g.L^{-1}$.

2) RESULTATS

D'après les résultats concernant la réaction du plomb aqueux et de **l'hydroxyapatite synthétique dissoute**, reportés dans le tableau XI, lorsque le pH du mélange n'est pas modifié (compris entre 5,3 et 6,5), la quantité de plomb dosée dans l'ultrafiltrat est inférieure à la limite de détection de l'appareil de mesure.
En revanche, après abaissement du pH à 3, 85 % du plomb présent dans le mélange "plomb-hydroxyapatite" dans l'eau sont retrouvés dans l'ultrafiltrat. Dans le cas de mélanges dissous dans une solution saline (NaCl ou $NaClO_4$), le plomb est totalement dosé dans l'ultrafiltrat.
Ce résultat reste inchangé quelles que soient les conditions utilisées pour amener le pH du mélange à 3 (tableau XII) :

- solution de plomb seule abaissée à pH = 3, avant le mélange (a)
- solutions d'hydroxyapatite et de plomb abaissées à pH = 3, avant le mélange (b)
- solutions d'hydroxyapatite et de plomb abaissées à pH = 3, après le mélange à t = 0 (c) ou à t = 24 h (d).

Lorsque le pH de cette dernière solution est remonté à sa valeur d'origine (5,6), la quantité de plomb libre dosée s'avère proche de la limite de détection du spectromètre d'émission à plasma d'argon (82 $\mu g.L^{-1}$). Cela signifie que le précipité formé au pH voisin de 6 est dissout à pH = 3, mais qu'il se reforme après remontée du pH aux alentours de 6.

Des solutions de plomb témoins ont été réalisées parallèlement, en reproduisant les variations de pH précédentes. Au pH = 3, la concentration en plomb est de 10 000 $\mu g.L^{-1}$ (f, h) ; une légère diminution est observée au pH = 5,3 (g, i), due à une précipitation partielle du plomb à ce pH moins acide.
Le mélange de plomb et d'apatite, en absence d'acidification, reste inférieur à la limite de détection.

Enfin, ces premiers résultats (tableau XI) montrent que la présence de sel, sous forme de chlorure ou de perchlorate de sodium, ne semble pas modifier la réaction entre l'apatite et le plomb au pH voisin de 6. Effectivement, les concentrations obtenues dans cette expérience sont identiques à celles obtenues lorsque le mélange est dissous dans de l'eau seule. Toutefois, à pH = 3, la présence de sel semble favoriser la remise en solution des ions Pb^{2+}, puisque 100 % du métal sont retrouvés dans l'ultrafiltrat, alors qu'en absence de sel ce pourcentage n'est que de 85%.

Tableau XIII : Concentrations en plomb ($\mu g.L^{-1}$) dans l'ultrafiltrat de solutions de plomb (10 $mg.L^{-1}$), en présence de diverses concentrations d'hydroxyapatite solide, au pH naturel ou ajusté.

Rapport HA/Pb	pH naturel	Concentrations en Pb	
		pH naturel	pH 3
0	5,6	10 000 ± 465	10 000 ± 424
1	5,4	7334 ± 1145	8104 ± 1577
5	5,2	5431 ± 214	6287 ± 434
6	5,4	937 ± 46	3129 ± 793*
7	5,6	278 ± 13	2581 ± 203*
8	5,5	66 ± 9	2288 ± 361*
9	7,1	< limite de détection	1991 ± 22*
10	7,2	< limite de détection	1633 ± 288*
50	7,4	< limite de détection	542 ± 49*
500	7,1	< limite de détection	190 ± 64*
1000	7,0	< limite de détection	135 ± 38*

* comparaison pH naturel-pH = 3, $p < 0,01$

L'étude de la réaction du plomb aqueux et de **l'hydroxyapatite synthétique solide** nous a permis d'évaluer la capacité de rétention du plomb par cette apatite synthétique (tableau XIII).
Ainsi, au pH naturel du mélange et pour une même teneur en plomb, la concentration en métal dans l'ultrafiltrat diminue lorsque la quantité d'hydroxyapatite apportée augmente. Dans le cas où le rapport massique HA/Pb est égal à 9, l'ultrafiltrat semble exempt de plomb biodisponible. Par conséquent, la capacité de rétention en plomb a été estimée à 111 mg de Pb par g de HA.

En revanche, lorsque le pH du mélange est abaissé à 3, la quantité de plomb dosée dans l'ultrafiltrat est plus importante (de manière statistiquement significative, à partir du rapport massique HA/Pb de 6). Cela signifie qu'une partie du plomb immobilisé par l'apatite solide au pH naturel s'est dissous.
Au rapport HA/Pb le plus élevé (1000), la quantité de plomb retrouvée dans l'ultrafiltrat à pH = 3 n'est pas négligeable, bien qu'elle ne représente que 1,3 % de la quantité de plomb introduite.

Etude cristallographique :

Identification des précipités obtenus après réaction entre le plomb et l'hydroxyapatite synthétique

1) MATERIEL ET METHODE

1.1) Matériel

- Microscope électronique à balayage (HITASHI) équipé d'un analyseur à dispersion d'énergie (EDS) aux rayons X (KEVEX)
- Diffractomètre à rayons X (PHILIPS X'PERT PRO) avec une source Cu (Kα, λ = 1,54056 Å) dans la géométrie θ-θ de Bragg Brentano
- Membranes de filtration en nitrate de cellulose, seuil de rétention de 0,2 µm, diamètre de 47 mm Whatman® (MERCK)
- Unité de filtration Nalgène® en polysulfone moulé (PSF) (FISHER SCIENTIFIC)

1.2) Méthode

Des solutions de 100 mL ont été préparées dans des béchers en polypropylène :

- plomb à 10 $mg.L^{-1}$ en présence d'hydroxyapatite dissoute à 4,85 $mg.L^{-1}$, au pH voisin de 6
- plomb à 10 $mg.L^{-1}$ en présence d'hydroxyapatite dissoute à 4,85 $mg.L^{-1}$, au pH abaissé à 3
- plomb à 10 $mg.L^{-1}$ en présence d'hydroxyapatite solide à 100 $mg.L^{-1}$, au pH voisin de 6.
- plomb à 10 $mg.L^{-1}$ en présence d'hydroxyapatite solide à 50 $mg.L^{-1}$, au pH voisin de 6.

Le mélange d'apatite solide et de plomb n'a pas été étudié, lorsque le pH a été abaissé à 3. En effet, l'acidification par apport d'HCl a conduit à une dissolution partielle de l'apatite, qui a entraîné une élévation du pH. Le maintien du mélange à pH = 3 aurait par conséquent nécessité la dissolution complète de l'apatite.

Après un temps de repos de 24 h, les solutions ont été filtrées sur une membrane en nitrate de cellulose présentant un seuil de rétention de 0,2 µm, dans le but de retenir les produits précipités issus de la réaction de l'hydroxyapatite synthétique avec le plomb aqueux. En effet, le microscope à balayage et le diffractomètre à rayons X ne peuvent analyser que des phases solides. A signaler également que l'analyse aux rayons X ne permet qu'une étude de la surface de l'échantillon.

Après séchage sous vide, une partie du filtre portant les précipités a été placée sur un support, puis métallisée au carbone pour l'analyse au microscope électronique à balayage. L'autre partie du filtre a été réservée à la diffraction aux rayons X.

2) RESULTATS

- L'analyse au microscope électronique à balayage (MEB) des précipités obtenus par la réaction entre **l'hydroxyapatite synthétique dissoute** et le plomb, au pH voisin de 6 ou à pH = 3, est illustrée par les figures 6 et 7.

Au pH voisin de 6, l'image MEB (figure 6) met en évidence un précipité déposé à la surface de la membrane de filtration, dont la morphologie est typique des produits amorphes. Aucune forme cristallisée n'a pu être identifiée, même à des grossissements supérieurs. Selon l'analyse EDS, ces composés contiendraient de l'oxygène à 68 % (en rapport atomique), du phosphore à 7 % et du plomb à 25 %. Cette composition conduit à un rapport atomique Pb/P proche de 4/1, différent du rapport caractéristique de la pyromorphite (1,67).

A pH = 3, l'aspect des précipités de la réaction (image MEB) est similaire à celui observé au pH voisin de 6 (figure 7) ; il s'agit encore de produits amorphes. Selon l'analyse EDS, ils seraient constitués à 77 % (en rapport atomique) d'oxyde de plomb (PbO) et à 23 % de phosphore. Le rapport atomique de Pb/P, proche de 1/1, est également différent de celui de la pyromorphite.

L'identification aux rayons X n'a pu être réalisée, en raison de la quantité insuffisante de précipités présents sur le filtre, aussi bien à pH = 3 qu'au pH voisin de 6.

Ces résultats permettent de conclure à l'absence de pyromorphite, dans ces conditions de pH.

- L'analyse par microscopie électronique à balayage (MEB) et par diffraction aux rayons X de **l'hydroxyapatite synthétique solide** seule et des précipités obtenus par la réaction entre l'hydroxyapatite synthétique solide et le plomb, au pH voisin de 6, est illustré par les figures 8 à 12.

Selon les images MEB, la taille moyenne des cristaux d'hydroxyapatite est proche de 200 nm (figure 8).
Le profil cristallographique obtenu par diffraction aux rayons X met en évidence la présence de pics caractéristiques d'hydroxyapatite, ainsi que la présence d'impuretés nommées "whitlockite" et de formule $Ca_3(PO_4)_2$ (figure 10).
L'analyse EDS de l'hydroxyapatite synthétique montre un rapport atomique Ca/Pb en conformité avec les valeurs caractéristiques (25/15 = 1,67).

Dans le cas du rapport massique **HA/Pb = 10** (pH 7,2), l'image MEB (figure 9) met en évidence de petits cristaux uniformément répartis sur la surface du filtre, d'aspect similaire à ceux obtenus lors de l'analyse concernant l'hydroxyapatite synthétique solide seule (figure 8) ; leur taille moyenne est de 200 nm.
Le profil cristallographique obtenu par diffraction aux rayons X (figure 10) se révèle identique à celui de l'hydroxyapatite seule ; l'impureté précédemment identifiée est toujours présente ("whitlockite"), suggérant que cette dernière ne réagit pas avec le plomb. De plus, on observe des pics caractéristiques de la pyromorphite.
L'analyse EDS conduit à un rapport atomique final de Ca/Pb/P de 20/5/18. Cette composition implique un enrichissement en plomb du produit de la réaction, le rapport initial de Ca/Pb étant égal à 20 (le nombre de moles de Pb est estimé à 0,05 mmole, pour une concentration de 10 $mg.L^{-1}$; le nombre de moles de Ca est de 1 mmole, pour une concentration de 100 $mg.L^{-1}$; 1/0,05 = 20).
Cette observation est en accord avec les mesures réalisées aux rayons X, qui n'analysent que la surface de l'échantillon et qui montrent la présence simultanée d'apatite et de pyromorphite. Il semble donc que les cristaux de pyromorphite se soient formés à la surface des grains d'apatite.

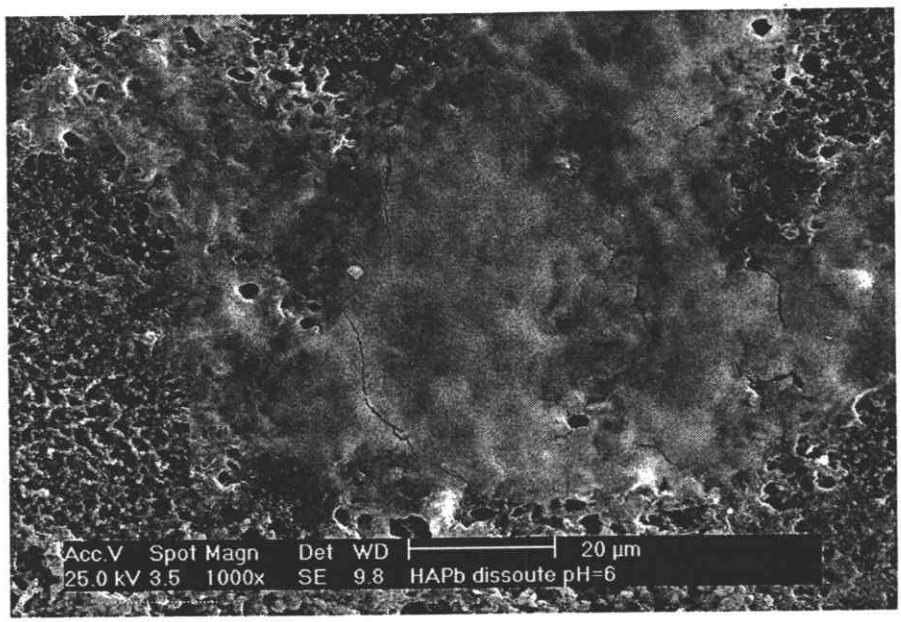


Figure 6 : Image au microscope électronique à balayage du produit de la réaction entre l'hydroxyapatite synthétique dissoute et le plomb, lorsque le pH du mélange est voisin de 6.

Figure 7 : Image au microscope électronique à balayage du produit de la réaction entre l'hydroxyapatite synthétique dissoute et le plomb, lorsque le pH du mélange est abaissé à 3.

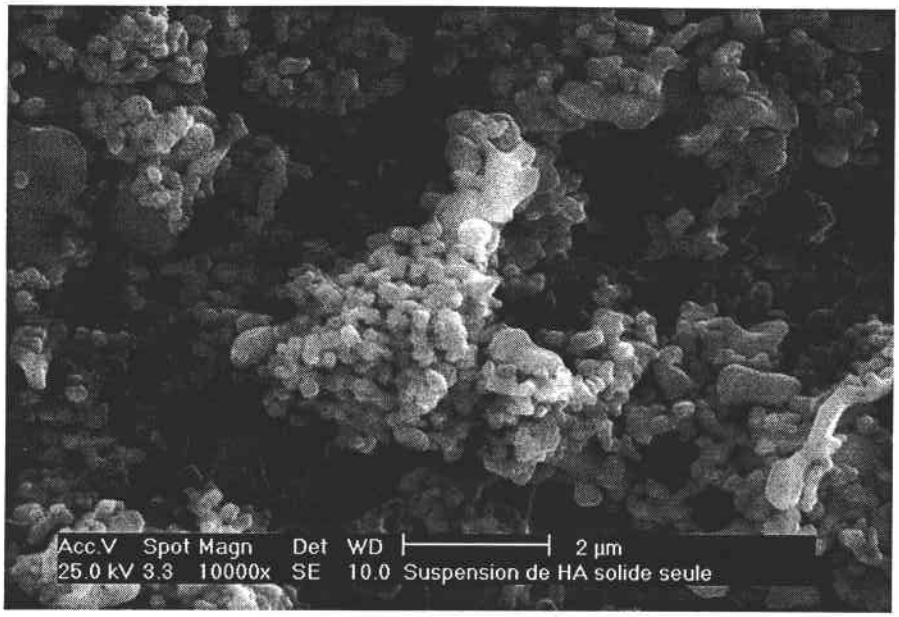


Figure 8 : Image au microscope électronique à balayage d'hydroxyapatite synthétique solide seule.

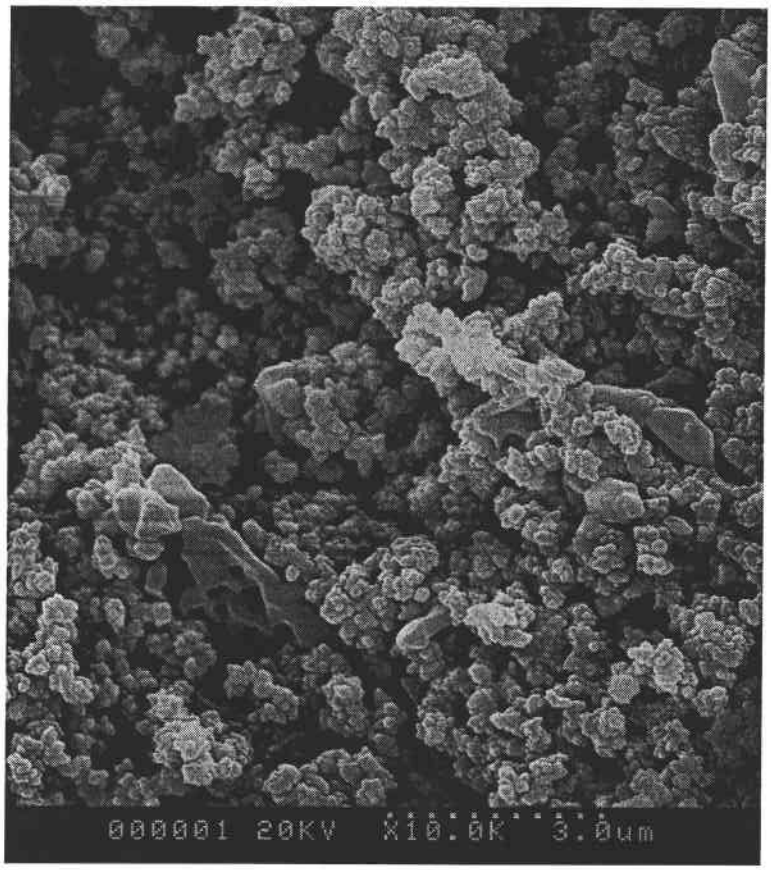
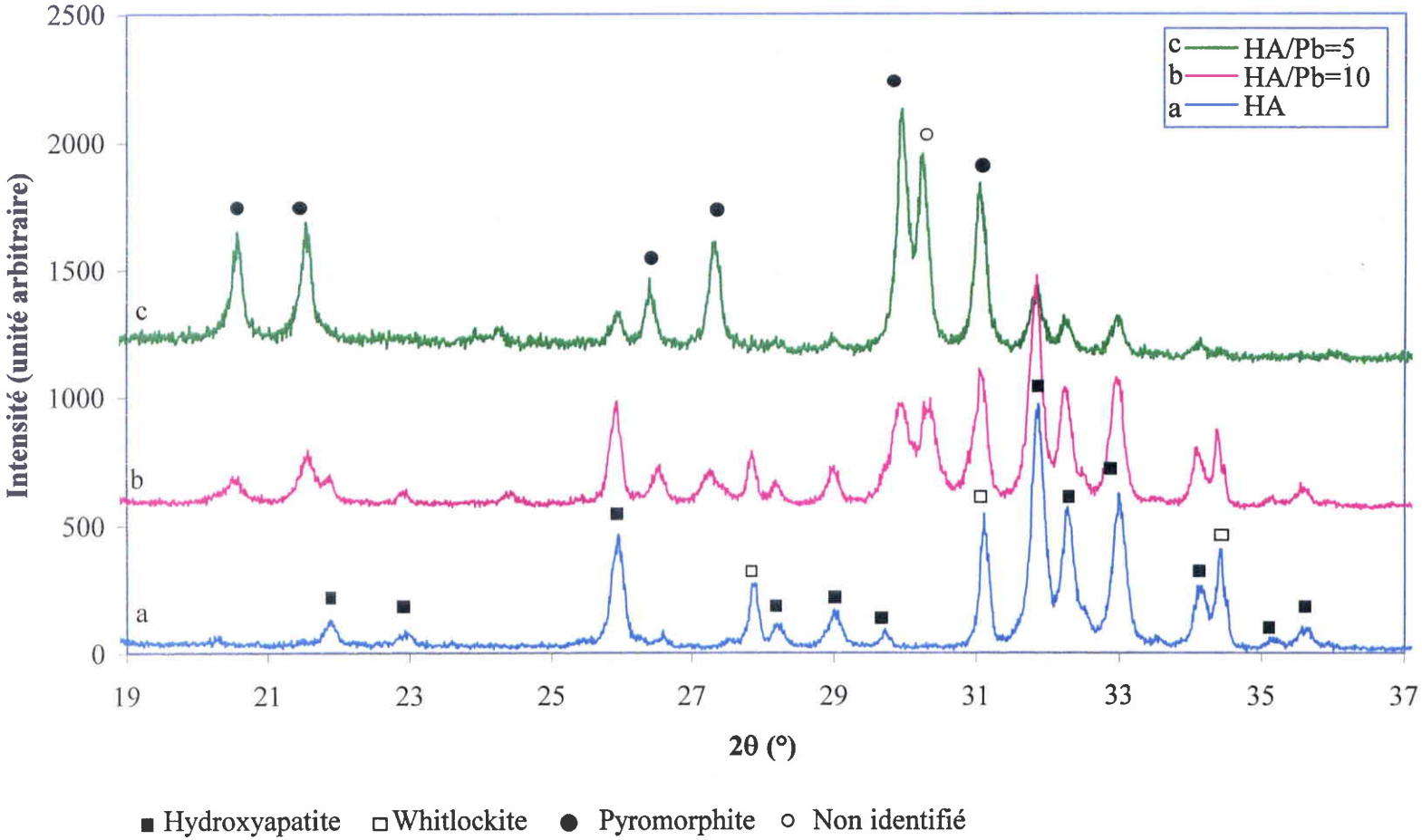


Figure 9 : Image au microscope électronique à balayage du produit de la réaction entre l'hydroxyapatite synthétique solide et le plomb, au rapport massique HA/Pb de 10/1.



■ Hydroxyapatite □ Whitlockite ● Pyromorphite ○ Non identifié

Figure 10 : Profils aux rayons X de l'hydroxyapatite seule et des produits de la réaction avec le plomb, aux rapports massiques HA/Pb de 5 et 10

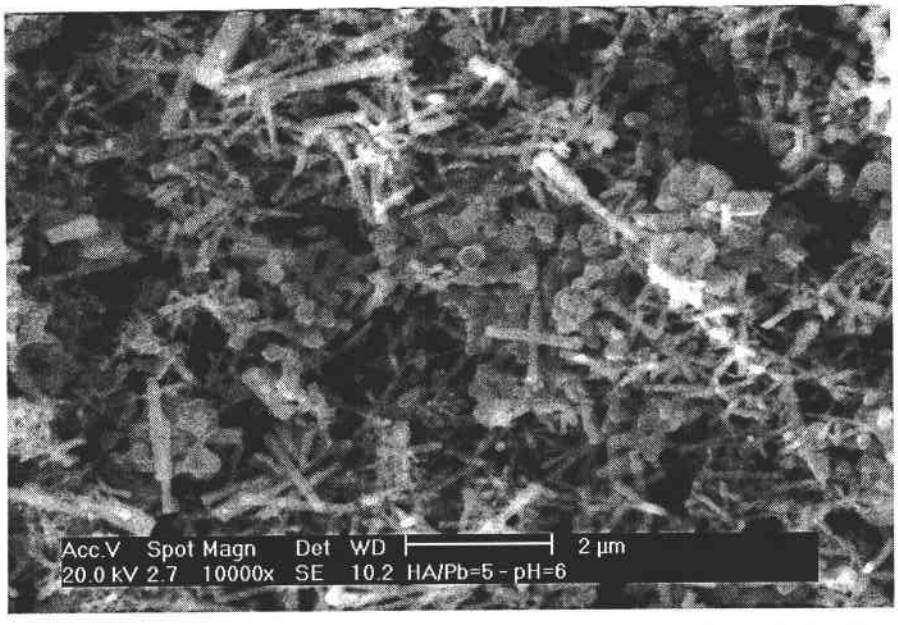


Figure 11 : Image au microscope électronique à balayage des produits de la réaction entre l'hydroxyapatite synthétique solide et le plomb, au rapport massique HA/Pb de 5/1, en mode SE.

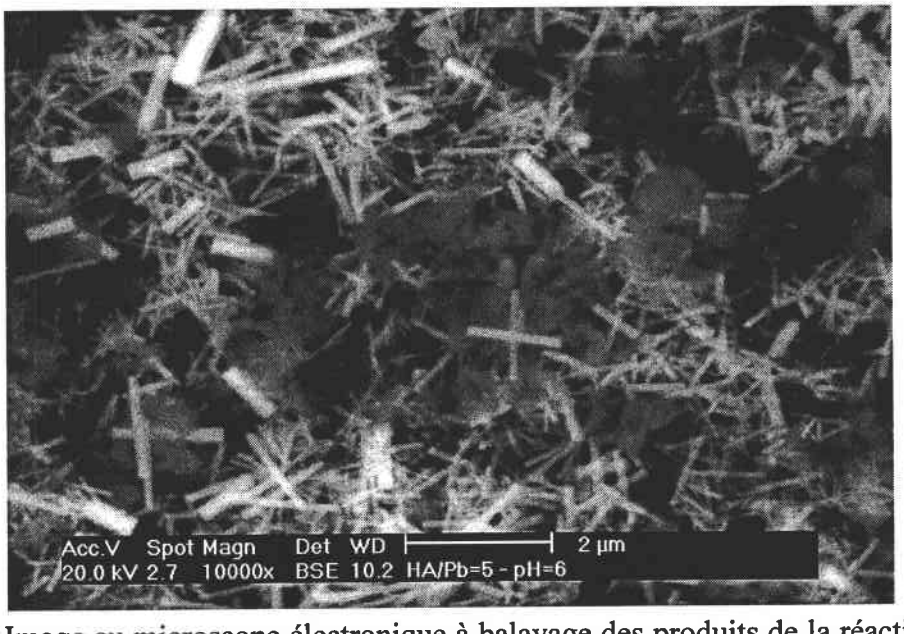


Figure 12 : Image au microscope électronique à balayage des produits de la réaction entre l'hydroxyapatite synthétique solide et le plomb, au rapport massique HA/Pb de 5/1, en mode BSE.

Dans le cas du rapport massique **HA/Pb = 5** (pH = 5,2), les images MEB (figures 11 et 12) montrent les cristaux d'hydroxyapatite et de pyromorphite, ainsi que des bâtonnets de 1,2 µm de longueur moyenne, distribués de manière aléatoire à la surface du filtre. L'image 11, réalisée en mode SE ("secondary electron") permet de mettre en évidence le relief de l'échantillon, la forme des précipités, alors que l'image 12, réalisée en mode BSE ("back scattered electron") traduit le contraste de composition chimique locale en s'affranchissant de la topographie, sachant que plus les produits apparaissent clairs, plus ils contiennent d'éléments de numéro atomique élevé.
La diffraction aux rayons X n'a pas permis d'identifier le composé présent sous forme de bâtonnets, caractérisé par un pic à 2 θ = 30°. Toutefois, selon l'analyse EDS, sa composition serait de formule générale $(Ca, Pb)_3P_2O_{10}$. Comme dans le cas du rapport massique HA/Pb = 10, on retrouve des pics caractéristiques de la pyromorphite, de l'hydroxyapatite et de la "whitlockite" (le pic caractéristique à 2 θ = 31° est confondu avec un pic caractéristique de la pyromorphite).
L'analyse EDS conduit à un rapport atomique final de Ca/Pb/P de 17/7/13, impliquant un enrichissement en plomb du produit de la réaction, le rapport initial de Ca/Pb étant égal à 10.

Discussion générale

Cette première étude avait pour objectif d'évaluer l'immobilisation du plomb par l'hydroxyapatite synthétique dissoute ou solide, en s'appuyant sur les deux théories émises dans la littérature pour expliquer les mécanismes conduisant à la formation de pyromorphite, à savoir la dissolution/précipitation et l'échange ionique.

Les travaux expérimentaux menés sur l'**hydroxyapatite synthétique dissoute**, ont permis de mettre en évidence la formation d'un précipité contenant du plomb, lorsque le pH du mélange est proche de 6, suivant la théorie de la dissolution/précipitation, la plus suivie dans la littérature. Toutefois, ce composé s'est révélé instable lorsque le pH est abaissé à 3, libérant alors le plomb en solution. Si les phosphates de plomb formés étaient des pyromorphites, ils ne devraient pas se dissoudre à pH = 3, compte tenu de leurs constantes de solubilité ($Kps < 10^{-70}$) ; il semble donc peu probable que ces composés se soient formés, dans nos conditions expérimentales.

Cette élévation de la solubilité du plomb, parallèlement à la diminution du pH, a également été observée dans des travaux portant sur du sol chargé en plomb traité par une solution de phosphate sodique, en comparant des essais réalisés à pH = 5 et pH = 3 (Stantforth & Qiu, 2001).

En revanche, l'absence de pyromorphite est en conflit avec les conclusions de précédentes études menées par les auteurs favorables à la théorie de la dissolution/précipitation, qui ont mis en évidence la formation d'hydroxypyromorphite quelques heures, voire quelques minutes, après le début de la réaction entre l'hydroxyapatite et le plomb contenu dans du sol (Ma *et al.*, 1993, 1994a, b, 1995 ; Xu & Schwartz, 1994 ; Laperche *et al.*, 1996 ; Chen *et al.*, 1997 ; Zhang *et al.*, 1998 ; Zhang & Ryan, 1998, 1999a, b). Ce désaccord pourrait s'expliquer par des différences portant sur le pH des divers essais, la forme chimique du plomb, l'utilisation d'hydroxyapatite solide et le mode de préparation de cette apatite.

Ainsi, la plupart de ces travaux ont été réalisés à des pH constants de 5, 6, 7 ou à des pH dynamiques, s'élevant de 2 à 7 en quelques minutes, puis maintenus à 7 pendant 30 min. Or, à pH = 7, la formation de pyromorphite serait favorisée et sa solubilité serait minimisée (Ruby *et al.*, 1994). Un certain nombre d'expériences, menées à pH acide (2-3) ont échoué dans l'identification de pyromorphite (Ma *et al.*, 1993 ; Zhang & Ryan, 1998 ; Zhang *et al.*, 1998).

Concernant la forme chimique du plomb, si notre étude a été entreprise avec du chlorure de plomb, les travaux précédemment cités ont considéré du plomb contenu dans du sol, sous forme de carbonate de plomb (Laperche *et al.*, 1996 ; Zhang *et al.*, 1998 ; Zhang & Ryan, 1999b), de nitrate de plomb (Ma *et al.*, 1993, 1994a, b, 1995 ; Xu & Schwartz, 1994 ; Chen *et al.*, 1997), d'oxyde de plomb (Laperche *et al.*, 1996), de sulfure de plomb (Zhang & Ryan, 1999a), de sulfate de plomb (Zhang & Ryan, 1998), de fluorure de plomb (Ma *et al.*, 1994a).

Par ailleurs, bien que ces auteurs soient favorables à la théorie de la dissolution/précipitation pour expliquer les mécanismes d'immobilisation du plomb par l'apatite, tous ont utilisé l'hydroxyapatite synthétique sous forme solide. A notre connaissance, une seule étude a été entreprise avec de l'hydroxyapatite préalablement dissoute (Manecki *et al.*, 2000b).
Toutefois, si de la chloropyromorphite a pu être identifiée, à pH acide (2,5), le protocole expérimental conduisant à ce résultat diffère de celui suivi dans notre étude. Effectivement, ces auteurs ont mélangé, goutte à goutte, 100 mL d'hydroxyapatite dissoute (pH = 6,8 ; P = $4{,}7.10^{-5}$ mol.L^{-1}) à 50 mL de solution de $PbCl_2$ (pH = 2,0 ; Pb = 0,05 mol.L^{-1}), à une vitesse de 0,6 mL.min^{-1} à l'aide d'une pompe péristaltique. Le mélange (pH = 2,5) a ensuite été laissé au repos durant deux jours. Dans notre étude, 100 mL de solution ont été préparés avec 25,9 mL d'hydroxyapatite dissoute (pH = 7,1 ; P = $1{,}1.10^{-4}$ mol.L^{-1}), 64,1 mL d'eau purifiée et 10 mL de $PbCl_2$ (pH = 5,3 ; Pb = $4{,}8.10^{-4}$ mol.L^{-1}). Le temps d'incubation choisi était de 24 h. A noter que les rapports molaires Pb/P de ces deux protocoles sont incomparables : respectivement 532 et 1,67.

Enfin, il est connu que l'hydroxyapatite de synthèse est caractérisée par une importante variabilité de sa cristallinité, sa morphologie, sa texture, sa stabilité et sa solubilité, selon les conditions de préparation (Da Rocha *et al.*, 2002).

Les travaux expérimentaux menés sur l'**hydroxyapatite synthétique solide**, ont permis d'étudier l'immobilisation du plomb par l'apatite, selon la théorie de l'échange ionique entre Ca^{2+} et Pb^{2+} (Suzuki *et al.*, 1981, 1982, 1984 ; Miyake *et al.*, 1986 ; Takeuchi *et al.*, 1988 ; Takeuchi & Arai, 1990 ; Shashkova *et al.*, 1999 ; Sugiyama *et al.*, 1999).

Les essais entrepris avec divers rapports massiques entre le plomb et l'apatite (de 0 à 1000) ont conduit à estimer sa capacité de rétention à 111 mg de plomb par g d'hydroxyapatite. Ce résultat est en accord avec les valeurs trouvées dans la littérature, qui s'étendent de 120 à 200 mg de Pb par g d'apatite synthétique commercialisée (Takeuchi *et al.*, 1988 ; Ma *et al.*, 1993, 1994a ; Xu & Schwartz, 1994). Lorsque l'apatite est préparée au laboratoire par les auteurs, la rétention varie de 210 à 536 mg de plomb par g d'apatite (Suzuki *et al.*, 1982, 1984 ; Sugiyama *et al.*, 1999). Concernant la capacité de rétention de l'apatite naturelle (fluorapatite), les résultats sont plus hétérogènes, variant de 0,99 à 151 mg de plomb par g d'apatite (Ma *et al.*, 1995 ; Chen *et al.*, 1997 ; Prasad *et al.*, 2000).

Dans les expériences réalisées avec un rapport massique HA/Pb de 5, si 46 % du plomb sont précipités au pH naturel (5,2), ce pourcentage s'abaisse à 37 % lorsque le pH est abaissé à 3. Ces 37 % pourraient correspondre à de la pyromorphite, insoluble dans ces conditions de pH et identifiée par diffraction aux rayons X. Par contre, les 9 % redissous lors de la diminution du pH pourraient correspondre à des phosphates de plomb autres que la pyromorphite. Ils seraient visualisés au MEB sous forme de bâtonnets et présenteraient une composition chimique de formule générale $(Ca, Pb)_3P_2O_{10}$ (analyse EDS).
A signaler que contrairement à certains travaux, la chloropyromorphite n'a pu être identifiée par diffraction aux rayons X, malgré la présence d'ions Cl^- résultant de la forme chimique du plomb utilisée dans cette étude ($PbCl_2$). Il est à noter que les auteurs utilisaient conjointement des concentrations élevées d'acide chlorhydrique (Suzuki *et al.*, 1984 ; Miyake *et al.*, 1986 ; Ma *et al.*, 1994a ; Sugiyama *et al.*, 1999 ; Furuta *et al.*, 2000 ; Manecki *et al.*, 2000a).

Au rapport massique HA/Pb de 10, la pyromorphite formée s'avère nettement plus importante, puisque 84 % de plomb restent précipités lorsque le pH est abaissé à 3 (100 % du plomb sont précipités au pH naturel de 7,2). Ce phénomène pourrait s'expliquer par l'élévation de la surface de contact, l'apatite étant apportée en plus grande quantité.
Les phosphates de plomb formés, autres que la pyromorphite, sont également plus importants (16 % contre 9 % à pH = 5,2). Cette augmentation pourrait s'expliquer par l'existence d'un pH naturel supérieur (7,2) favorable à leur précipitation. Ainsi, au pH naturel de 5,2 (rapport massique HA/Pb = 5), leur précipitation ne serait que partielle, les deux espèces ioniques (Pb^{2+} et phosphates) pouvant coexister en solution. Il est vrai qu'à ce pH, 54 % du plomb sont encore en solution alors qu'à pH = 7,2 la totalité du plomb est précipitée.

Il est intéressant de noter que la formation de ces phosphates de plomb autres que la pyromorphite implique une légère dissociation de l'hydroxyapatite, même à pH = 7,2 mais plus importante à pH = 5,2. Cette dissolution a également été constatée dans d'autres travaux

portant sur l'apatite solide (Saalfeld *et al.*, 1994 ; Shashkova *et al.*, 1999 ; Monteil-Rivera *et al.*, 2000) suivant la réaction :

$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 14\ H^+ \rightarrow 10\ Ca^{2+} + 6\ H_2PO_4^- + 2\ H_2O$.

Pour conclure cette étude *in vitro,* il semble que, dans nos conditions expérimentales, l'utilisation d'hydroxyapatite synthétique solide permette la précipitation du plomb essentiellement sous forme de pyromorphite, stable au pH naturel du mélange (5,3-6,5) comme à pH acidifié (3), proche de celui rencontré au niveau du duodénum. Cette immobilisation rendrait le plomb difficilement absorbable par l'intestin.
Ces observations nous amène à confirmer l'existence d'un échange ionique entre les ions Ca^{2+} de l'apatite et Pb^{2+}, conduisant à la formation de pyromorphite, pour expliquer l'immobilisation de ce métal. Toutefois, une légère dissolution de l'apatite pourrait également se produire, libérant des phosphates qui se complexeraient au plomb et au calcium et qui formeraient des précipités à des pH supérieurs à 5,2 instables à pH = 3.

Par contre, l'emploi d'hydroxyapatite dissoute ne paraît pas favorable à l'immobilisation du plomb sous forme de précipités stables à ce pH acide, selon la théorie de la dissolution/précipitation. Dans ces conditions, le plomb pourrait être absorbé au niveau du duodénum, connu comme étant le principal site d'absorption intestinal de ce métal (Conrad & Barton, 1978 ; Flanagan *et al.*, 1979 ; Barton *et al.*, 1980 ; Barton & Conrad, 1981 ; Mykkänen & Wasserman, 1982 ; Barton *et al.*, 1984 ; Edelstein *et al.*, 1984 ; Henning & Leeper, 1984 ; Henning & Cooper, 1988).

Toutefois, il ne faut pas écarter l'influence potentielle de la bile et du suc pancréatique, sur la formation de ces phosphates de plomb autres que la pyromorphite, du fait de leur action sur l'élévation du pH duodénal.
D'autre part, bien que les conditions de pH ne soient pas favorables, dans le duodénum, au maintien de ces composés sous forme précipitée, il est à noter que la dissolution de l'apatite fournit du calcium et du phosphore, deux éléments essentiels connus pour leur effet inhibiteur sur l'absorption intestinale du plomb (Barltrop & Khoo, 1976 ; Barton *et al.*, 1978 ; Conrad & Barton, 1978, 1981 ; Quarterman *et al.*, 1978a ; Aungst & Fung, 1983 ; Spickett & Bell, 1983 ; Bogden *et al.*, 1995).
Enfin, le pH remontant progressivement depuis le pylore jusqu'à l'iléon (supérieur à 7,5), il nous a paru intéressant de vérifier l'influence de ces différents paramètres sur le devenir de ces composés et donc sur l'absorption du plomb, tout au long du tractus intestinal.

La suite de notre travail a donc consisté en une vérification de l'influence de l'hydroxyapatite synthétique dissoute sur l'absorption intestinale du plomb, à l'aide de la technique de perfusion *in situ* de l'intestin grêle de rat.

ETUDE *IN SITU* DE L'IMMOBILISATION DU PLOMB PAR L'HYDROXYAPATITE

La perfusion *in situ* de l'intestin grêle de rat correspond au transit d'une solution comprenant le ou les éléments étudié (s), à une vitesse déterminée, pendant un temps donné. Ce modèle expérimental présente de nombreux avantages par rapport aux modèles *in vitro* (intestin inversé, chambre de diffusion), notamment l'affranchissement du milieu d'incubation dont certains constituants peuvent interagir avec le plomb (phosphates, carbonates, ...) et le maintien de l'organe dans son environnement naturel (conservation des réseaux nerveux, sanguin et lymphatique).

Cette technique est couramment employée dans l'étude de l'absorption des métaux (Ittel *et al.*, 1996 ; Gomez-Ayala *et al.*, 1997, 1998 ; Kuzuya *et al.*, 1998 ; Van der Voet & De Wolff, 1998 ; Tavares *et al.*, 2000 ; Febel *et al.*, 2001). Elle a précédemment été expérimentée au laboratoire de Chimie et Toxicologie des Métaux pour l'étude de l'absorption intestinale du nickel et de l'aluminium et a fait l'objet de publications internationales (Arnich *et al.*, 2000 ; Cunat *et al.*, 2000).

Dans cette étude *in* situ, l'hydroxyapatite a été utilisée dissoute. L'objectif était de déterminer si le produit de la réaction entre cette apatite et le plomb, formé au pH voisin de 6 mais solubilisé à pH= 3, pouvait précipiter lors de son passage à travers l'intestin grêle, sachant que le pH s'élève progressivement de 3 à plus de 7,5 du duodénum à l'iléon.

1) MATERIEL ET METHODE

1.1) Matériel

1.1.1) Équipement

- Bain-marie en plexiglas BMP 60 (FIRLABO)
- Balance type 2442 (SARTORIUS)
- Centrifugeuse Labofuge 200 (HERAEUS SEPATECH)
- Micro-ondes MDS-2000 (CEM)
- pH-mètre type Minisis 5000 (TACUSSEL)
  - électrode de référence au calomel saturée en chlorure de potassium, type TR 100
  - électrode de verre TCB, 10/HS
- Pousse seringue à perfusion modèle A-99 (RAZEL)
- Semi-micro-osmomètre type ML (KNAUER)
- Spectromètre d'émission à plasma d'argon DCP (Direct Current Plasma) type Spectraspan VII

1.1.2) Petit matériel

- Aiguilles 0,5 mm x 16 mm et 0,7 mm x 16 mm (TERUMO)
- Béchers en polypropylène 250 mL Nalgène® (FISHER SCIENTIFIC)
- Cathéter en polyéthylène n°2 : 0,38 mm x 1,09 mm et n°9 : 1,40 mm x 1,90 mm (POLY LABO)
- Compresses de gaze hydrophile de coton (SYLAMED)
- Fil mononylon chirurgical (ARCHIMED)
- Fioles jaugées en polypropylène Nalgène® (FISHER SCIENTIFIC)
- Matériel de dissection
- Micropipettes (GILSON) avec embouts en polyéthylène (POLY LABO)
- Seringues 1 mL, 2 mL (TERUMO)
- Seringues 60 mL (ONCE)
- Tubes hémolyse en polystyrène cristal 13 x 75 mm (POLY LABO)
- Tubes en polystyrène 19 x 95 mm (POLY LABO)

1.1.3) Réactifs

- Acide chlorhydrique, HCl, 30 % Suprapur (MERCK)
- Acide nitrique, HNO_3, 65 % Suprapur (MERCK)
- Chlorure de plomb, $PbCl_2$, (MERCK)
- Chlorure de sodium, NaCl, Suprapur (MERCK)
- Eau purifiée par un système de purification type Milli-Q (MILLIPORE)
- Héparine sodique (PANPHARMA)
- Hydroxylapatite, $Ca_5HO_{13}P_3$ (FLUKA) ou hydroxyapatite
- Pentobarbital sodique (SANOFI)
- Perchlorate de sodium, $NaClO_4.H_2O$, Pro Analysis (MERCK)
- Peroxyde d'hydrogène, H_2O_2, 30 % Suprapur (MERCK)

1.2) Animaux

Des rats mâles albinos (*Rattus norvegicus*) de souche Wistar, non consanguins, indemnes de tout organisme pathogène, provenant du centre d'élevage agréé IFFA CREDO (l'Arbresle, France) ont été utilisés.

A leur arrivée, les animaux ont été placés individuellement dans des cages en plastique (43 x 28 x 15 cm) recouvertes d'une grille en inox, avec une litière de copeaux de bois dépoussiérés (EXTRA LABO, Etablissements Pietrement, Provins, France). Ils ont séjourné dans une salle spécialement réservée de l'animalerie centrale de la Faculté de Médecine de Nancy, où la température est comprise entre 20 et 23°C. Le cycle jour/nuit était de 12h/12h, l'éclairage

étant maintenu de 20 h à 8 h, afin de réaliser les expériences durant la période d'activité de l'animal.
Les rats ont été nourris *ad libitum* avec des croquettes standard M 20 (EXTRA LABO, Etablissements Pietrement, Provins, France) et l'eau du robinet, conditionnée dans des biberons en plastique.
Avant toute expérimentation, les animaux ont été maintenus en période d'acclimatation durant une semaine. Une diète solide a été imposée 20 à 24 h avant l'expérience. Au moment des essais, le poids moyen des rats était compris entre 190 et 250 g.

1.3) Méthode

1.3.1) Contrôles préliminaires

La présence de plomb a été contrôlée dans les réactifs utilisés au cours de cette étude, ainsi que dans l'eau du robinet, les croquettes et la litière. La concentration en plomb de l'acide nitrique, de la soude, de l'acide chlorhydrique, du peroxyde d'hydrogène, de l'eau purifiée Milli-Q et de l'eau du robinet de l'animalerie était inférieure à 1 $\mu g.L^{-1}$. Les croquettes contenaient 110 $\mu g.kg^{-1}$ de plomb, ce qui correspond à un apport journalier moyen de 2 µg, quantité considérée négligeable par rapport à celle reçue lors de la perfusion. Les copeaux de bois présentaient une teneur en plomb de 55 $\mu g.kg^{-1}$.
D'autre part, afin de vérifier que les animaux n'aient pas été pré-exposés au plomb, deux rats de chaque lot commandé ont été sacrifiés dès leur arrivée (dosage du plomb dans le sang et les organes cibles).

1.3.2) Caractéristiques des solutions

- **Préparation des solutions de perfusion**

Trois catégories de solutions ont été testées, chaque lot étant composé de huit rats :
- les solutions de plomb seul
- les solutions du mélange "hydroxyapatite-plomb"
- les solutions témoins (NaCl ou $NaClO_4$ seul).

Le perchlorate de sodium ($NaClO_4$) a été utilisé pour mettre en évidence une éventuelle influence des chlorures, provenant de la dissociation du NaCl, sur l'absorption du plomb.

Dans un premier temps, une concentration en plomb de 10 $mg.L^{-1}$ (48,2 $\mu mol.L^{-1}$) a été retenue, de manière à obtenir des concentrations tissulaires supérieures à la limite de détection de l'appareil de mesure. De plus, une telle concentration s'avérait proche des teneurs mesurées au robinet de consommateur.

Suite aux premiers résultats obtenus, quatre autres concentrations ont été testées : 20, 5, 1 et 0,5 $mg.L^{-1}$.

La concentration d'hydroxyapatite nécessaire pour une concentration en plomb de 10 $mg.L^{-1}$ est de 4,85 $mg.L^{-1}$ (soit une concentration en phosphore de 0,90 $mg.L^{-1}$).
Dans le cas des concentrations en plomb de 1 $mg.L^{-1}$ et de 0,5 $mg.L^{-1}$, cette même quantité d'hydroxyapatite a été utilisée, fournissant ainsi un excès d'apatite par rapport au plomb (respectivement 10 et 20 fois la quantité nécessaire pour immobiliser totalement le plomb).
Les concentrations en plomb de 20 et 5 $mg.L^{-1}$ n'ont pas été étudiées en présence d'apatite.

Le mélange "hydroxyapatite-plomb" a été préparé le jour précédant la perfusion, afin de mimer une stagnation d'eau d'une nuit dans le réseau de distribution.

- **pH initial des solutions de perfusion**

Afin de représenter les conditions d'acidité rencontrées à la sortie de l'estomac, le pH des solutions a été abaissé à 3, par ajout d'HCl, juste avant la perfusion.

- **Détermination de l'osmolarité des solutions de perfusion**

Afin de respecter les conditions de tonicité du milieu interne de l'animal (300 $mosmol.L^{-1}$), les solutions perfusées ont été préparées dans une solution saline à 154 mM de NaCl ou de $NaClO_4$.
L'osmolarité de chaque catégorie de solutions de perfusion (NaCl, $NaClO_4$, Pb seul dans NaCl ou $NaClO_4$, Pb et HA dans NaCl, $NaClO_4$) a été vérifiée à l'aide d'un semi-micro-osmomètre, l'osmolalité mesurée étant assimilée à l'osmolarité, compte tenu de la masse volumique de l'eau à 25°C, pratiquement égale à 1 $kg.L^{-1}$.

1.3.3) Perfusion *in situ* de l'intestin grêle

- **Mise en place de la perfusion de l'intestin**

Le rat a été anesthésié au pentobarbital sodique (60 $mg.kg^{-1}$ en injection intrapéritonéale). La veine jugulaire gauche a été dégagée, puis canulée (cathéter de polyéthylène n° 2 préalablement hépariné) en direction du cœur, après ligature en amont. Le cathéter a été relié à une seringue de pentobarbital, assurant le maintien de l'anesthésie. Une compresse de gaze hydrophile de coton, imbibée de solution saline tiède, a été appliquée sur l'incision pour éviter tout dessèchement.

Après laparotomie médiane, le duodénum a été sorti de la cavité abdominale, canulé (cathéter de polyéthylène n°2) quelques cm en dessous du pylore, puis replacé dans la cavité

abdominale. L'extrémité libre du cathéter a été reliée à une seringue de 60 mL contenant la solution à perfuser à 37 °C (NaCl ou $NaClO_4$ pour le rinçage de l'intestin, puis solution de plomb). L'iléon a également été canulé (cathéter de polyéthylène n°9), afin de permettre le recueil de l'effluent. La cavité abdominale a ensuite été refermée, à l'aide de fil mononylon chirurgical ; une compresse imbibée de solution saline tiède, a été placée sur l'ouverture.

- **Rinçage**

La première étape a consisté en une perfusion de solution saline (NaCl ou $NaClO_4$), à 37 °C, à un taux de 2 $mL.min^{-1}$ pendant 15 min, de façon à éliminer rapidement les résidus alimentaires présents dans le segment intestinal.
Une période d'équilibration de 15 min a ensuite été respectée, par perfusion de la même solution saline au un taux de 1 $mL.min^{-1}$.

- **Perfusion du plomb**

Dans le cas du lot témoin, une perfusion de solution saline à 37 °C a été effectuée, pendant 60 min, à une vitesse de 0,6 $mL.min^{-1}$.
Les lots traités ont reçu la solution de plomb seul ou du mélange "hydroxyapatite-plomb", dans les mêmes conditions expérimentales.

1.3.4) Prélèvement du sang et des organes

La perfusion terminée, quelques mL de sang ont été prélevés dans la veine jugulaire et dans le cœur, à l'aide de seringues héparinées.

Les organes prélevés sont ceux connus pour être les organes cibles du plomb, c'est-à-dire le foie, les reins, le cerveau et le fémur. Les différents segments de l'intestin grêle, c'est-à-dire le duodénum (segment de 8 cm à partir du pylore), le jéjunum et l'iléon (segment de 8 cm en amont du cæcum) ont également été prélevés, afin d'étudier la rétention du plomb suite à la perfusion de solutions plombées. Après rinçage dans la solution saline appropriée, chaque segment a été ouvert longitudinalement, de façon à éliminer le mucus chargé en solution de plomb.

Les organes (excepté le fémur) ont été conservés au congélateur à – 18°C. Le fémur, quant à lui, a été conservé à température ambiante, après séchage une nuit à l'étuve (70 °C).

1.3.5) Analyse de la teneur en plomb des échantillons

La teneur en plomb du sang et des organes prélevés a été déterminée par ICP-MS (Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometer), au Laboratoire d'Hygiène et de Recherche en Santé Publique de Vandoeuvre-Les-Nancy (LHRSP), laboratoire répondant à un système d'assurance qualité conforme aux prescriptions de la norme NF EN ISO 9002 et accrédité depuis 1997 (n° 1-0764) par la section Essais du COFRAC.

Cette analyse a été effectuée sur les tissus préalablement minéralisés, à l'aide d'un minéralisateur à micro-ondes MDS-2000.
Concernant les prélèvements sanguins, 3 mL ont été placés dans des réacteurs en téflon, avec 1 mL d'acide nitrique à 65 % suprapur et 2 mL de peroxyde d'hydrogène à 30 % suprapur. Le programme de minéralisation prenait en compte la pression (150 PSI soit 10 bars) et le temps (2h).
Les organes de poids inférieur à 1g (duodénum, iléon, fémur) ont été placés dans les réacteurs, avec 1 mL d'acide nitrique, 2 mL d'eau oxygénée ; ils ont été minéralisés à 150 PSI pendant 45 minutes.
Les organes de poids plus élevé (jéjunum, foie, reins, cerveau) ont été placés dans les réacteurs (le foie a été fractionné en morceaux de 2 g), avec 2 mL d'acide nitrique et 4 mL d'eau oxygénée ; ils ont été minéralisés à 150 PSI pendant 2 h.
L'échantillon solubilisé a ensuite été récupéré ; le volume obtenu a été mesuré, pour permettre de calculer la concentration C en $\mu g.g^{-1}$ ($C = (c.V)/P$) et la quantité Q en µg ($Q = c.V$), où c est la concentration en $\mu g.L^{-1}$ donnée par l'ICP-MS, V le volume de solution en litre (L) et P le poids du segment en gramme (g).
Concernant le sang, la quantité de plomb dépend du volume de sang présent dans l'organisme de l'animal, estimé à 7 % du poids corporel (Conrad & Barton, 1978 ; Barton *et al.*, 1980 ; Aungst *et al.*, 1981 ; Barton & Conrad, 1981 ; Smith *et al.*, 2000).

Un blanc (1mL d'acide nitrique et 2 mL d'eau oxygénée) a été réalisé à chaque minéralisation.
Des échantillons de sang certifiés de niveau 1, soit 86 $\mu g.L^{-1}$ (Lyphocheck, BIO-RAD) ont été utilisés en tant que contrôles de qualité. Avec une moyenne de 84,95 ± 11,83 $\mu g.L^{-1}$, le taux de recouvrement est de 98,78 % ± 13,75 %.

Les minéralisats ont enfin été dilués, jusqu'à obtention d'une teneur en acide inférieure à 5 %, pour une concentration maximale en plomb de 100 $mg.L^{-1}$. Ils ont ensuite été chargés en indium 115 à 50 $\mu g.L^{-1}$ (standard interne). Le seuil de détection du plomb par l'ICP-MS est de 1 $\mu g.L^{-1}$; le seuil de quantification est de 5 $\mu g.L^{-1}$. Les analyses ont été réalisées en double.

<u>Remarque</u> : entre chaque programme de minéralisation, un programme de lavage des réacteurs a été effectué : 50 PSI pendant 60 min. Les réacteurs ont ensuite été rincés abondamment à l'eau déminéralisée, puis laissés à sécher sur un égouttoir recouvert de téflon.

1.3.6) Analyse histologique

Un échantillon d'intestin grêle (2 cm de jéjunum) pour chaque catégorie de solutions de perfusion a été placé dans du formol tamponné à 10 %, en vue d'une analyse histologique, réalisée par le Laboratoire d'Anatomie Pathologie Vétérinaire de Metz. Le protocole standard utilisé a fait intervenir une inclusion dans de la paraffine et une coloration HES (hématoxyline éosine safran) ; les échantillons ont ensuite été examinés au microscope optique, afin d'identifier d'éventuelles lésions dues au traitement.

1.3.7) Analyse statistique

L'analyse statistique des teneurs en plomb du sang et des organes prélevés a été réalisée à l'aide d'une analyse de variance multifactorielle ANOVA par le logiciel STATVIEW, après transformation logarithmique et vérification de l'homogénéité des variances par le test de Bartlett. Un test de Fisher a permis d'affiner les conclusions. Une probabilité inférieure à 0,05 (α = 5 %) a été associée à une différence statistiquement significative.

2) RESULTATS

2.1) Analyse histologique

L'analyse histologique des segments intestinaux, suite à la perfusion des différentes catégories de solutions (NaCl, $NaClO_4$, Pb seul dans NaCl ou $NaClO_4$, Pb et HA dans NaCl ou $NaClO_4$) révèle des altérations discrètes très superficielles de l'épithélium intestinal, affectant de manière sensiblement comparable les différents segments examinés. Les rapports entre villosités et glandes Lieberkühn sont normaux. Le chorion ne présente pas d'infiltration oedémateuse. L'épithélium glandulaire et les villosités intestinales ne présentent aucune anomalie de type spongiose ou atrophie cellulaire. On repère toutefois, à la surface des villosités, des débris cellulaires peu importants, ainsi que des images de nécrose très localisée de l'épithélium villositaire. Enfin, de rares images de fusion villositaire sont observées.

L'ensemble de ces observations nous permet de conclure à l'absence d'altération majeure de la paroi intestinale, qui pourrait biaiser les résultats obtenus dans les essais de perfusion *in situ* de l'intestin grêle, quant à l'absorption du plomb.

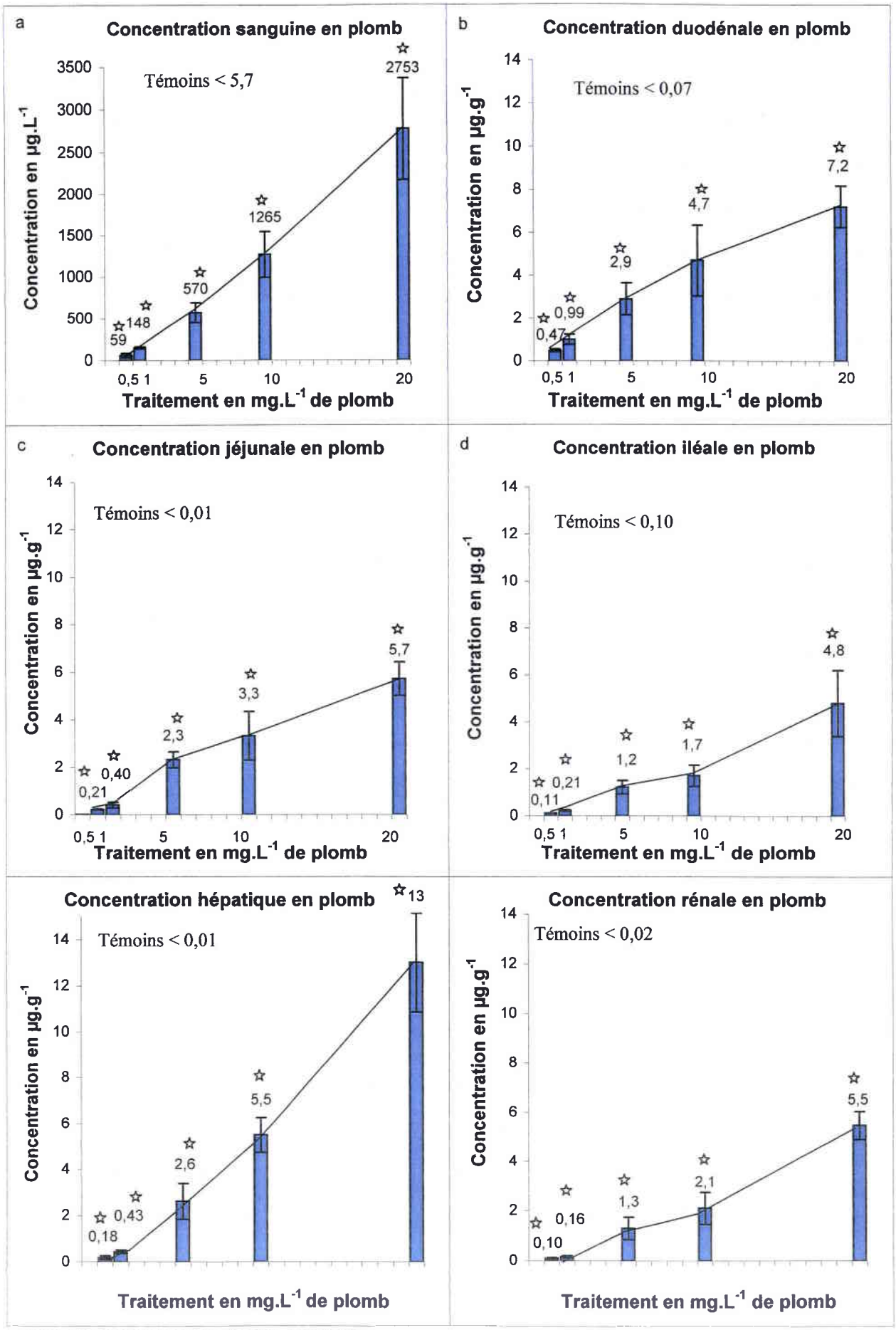


Figure 13 : Concentrations tissulaires en plomb de rats perfusés avec différentes solutions de plomb (0, 0,5, 1, 5, 10 et 20 mg.L^{-1})

2.2) Absorption et distribution du plomb seul

Afin de mieux comprendre les effets potentiels de l'hydroxyapatite sur l'absorption intestinale du plomb, l'absorption et la distribution du plomb seul ont été préalablement étudiées.

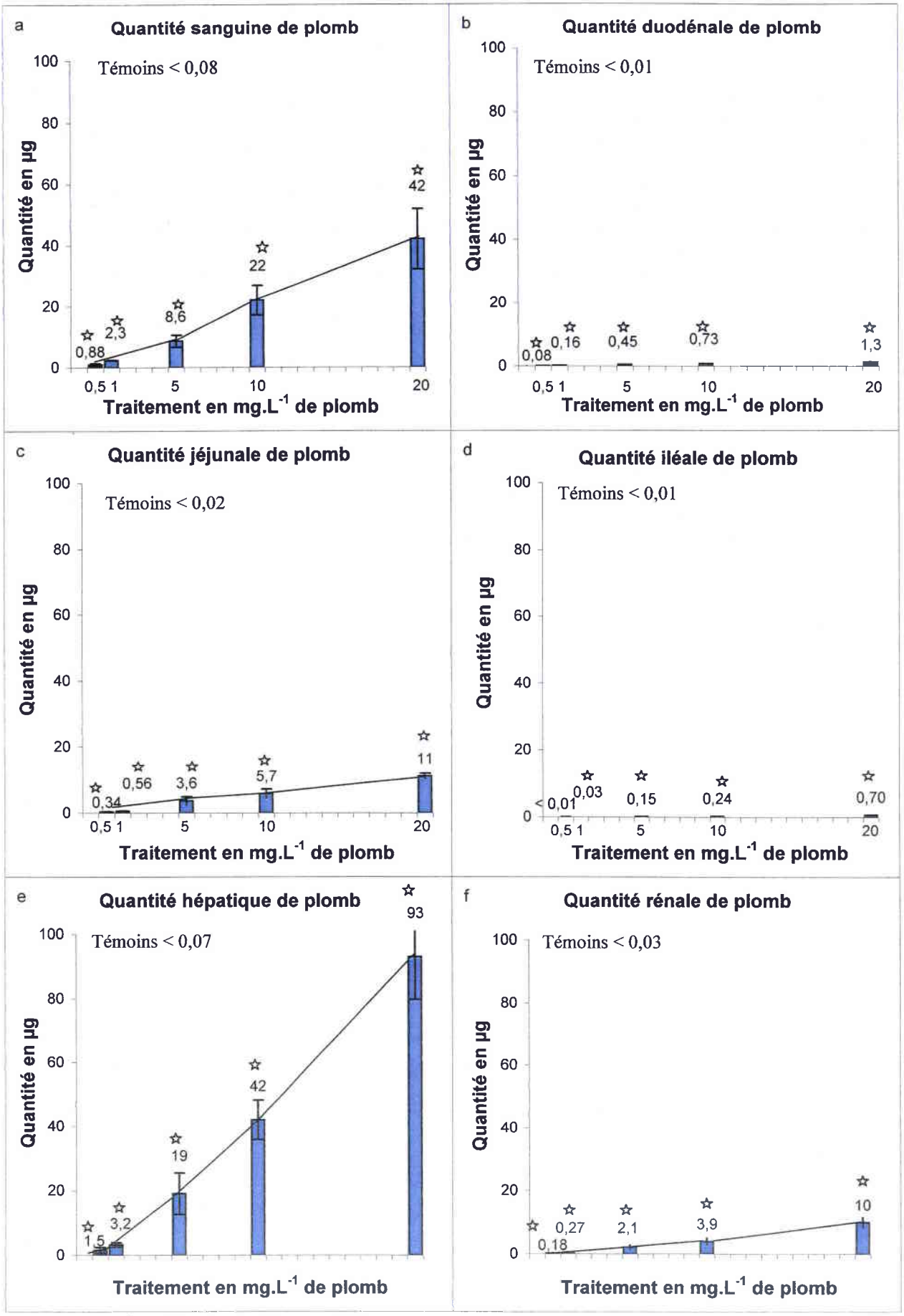
Dans un premier temps, l'influence du sel (NaCl, $NaClO_4$) sur l'absorption et la distribution du plomb a été testée avec la première concentration choisie, soit 10 $mg.L^{-1}$. Les résultats obtenus ont également été vérifiés avec deux autres concentrations sélectionnées ultérieurement, soit 1 et 5 $mg.L^{-1}$.
Pour ces trois concentrations, aucune différence statistiquement significative n'a pu être obtenue, entre les différents lots, au niveau de la distribution du métal dans les tissus cibles prélevés (sang, duodénum, jéjunum, iléon, foie, reins, cerveau, fémur), même si les teneurs en plomb sont légèrement plus élevée en présence de NaCl qu'en présence de $NaClO_4$ (annexe 4).
C'est pourquoi, les résultats présentés ci-après ne concernent que les solutions de plomb préparées dans du perchlorate de sodium, sel permettant de limiter l'apport en ions chlorures.

- Les histogrammes de la figure 13 présentent les **concentrations en plomb**, respectivement, dans le sang, le duodénum, le jéjunum, l'iléon, le foie et les reins de rats perfusés avec des solutions de plomb à 0,5, 1, 5, 10 ou 20 $mg.L^{-1}$. Les résultats, exprimés en moyenne ± écart-type, sont reportés dans l'annexe 4.

Les teneurs cérébrales et fémorales ne dépassent pas les limites de détection de l'ICP-MS, évaluées respectivement à 0,01-0,02 et 1,6-2,1 $\mu g.g^{-1}$ de tissus, à l'exception de la dose de 20 $mg.L^{-1}$, qui atteint 0,06 $\mu g.g^{-1}$ dans le cerveau et 1,9 $\mu g.g^{-1}$ dans le fémur. L'étendue de ces valeurs s'explique par les différences au niveau du poids des organes. De même, les valeurs plus élevées pour les rats sacrifiés, dès leur réception, résultent de leur poids tissulaire plus faible comparé aux rats traités, qui ont suivi une semaine d'acclimatation avant l'entrée dans le protocole expérimental. En outre, concernant le fémur, cette limite élevée résulte de la forte dilution (1/500) nécessaire pour l'analyse à l'ICP-MS, compte tenu de sa charge en calcium.

Tous les autres tissus étudiés présentent une élévation dose-dépendante de leur concentration en plomb, suite à la perfusion de solutions plombées. Ils sont tous statistiquement différents des tissus des rats sacrifiés à leur arrivée, ainsi que des rats témoins perfusés avec du perchlorate de sodium. D'autre part, pour un même tissu, la teneur en plomb augmente parallèlement à l'élévation de la concentration perfusée de manière statistiquement significative.

L'augmentation de la plombémie semble suivre de manière linéaire l'élévation des concentrations en plomb perfusées. Ainsi, lorsque la concentration de la solution de perfusion est doublée, la plombémie est elle aussi multipliée par un facteur voisin de 2. Cette hypothèse



☆ comparaison témoins-traités, $p < 0,05$

Figure 14 : Quantités tissulaires en plomb de rats perfusés avec différentes solutions de plomb (0, 0,5, 1, 5, 10 et 20 mg.L^{-1})

est confirmée par l'analyse des données en régression simple (annexe 5), donnant un coefficient de détermination (R^2) de 0,92, signifiant que 92 % de la plombémie est expliquée par la concentration de plomb perfusée.

Les concentrations en plomb les plus élevées sont retrouvées dans le sang, le duodénum et le foie, tandis que les organes les moins touchés sont le cerveau et le fémur.
Par ailleurs, l'élévation des concentrations en plomb des organes prélevés semble suivre le même profil d'augmentation que les plombémies, puisque lorsque la dose double, les concentrations sont multipliées par un facteur proche de 2.

- Les histogrammes de la figure 14 présentent **les quantités de plomb** accumulées, respectivement, dans le sang, le duodénum, le jéjunum, l'iléon, le foie et les reins de rats perfusés avec des solutions de plomb à 0,5, 1, 5, 10 ou 20 $mg.L^{-1}$. Les résultats, exprimés en moyenne ± écart-type, sont reportés dans l'annexe 4.

Les quantités cérébrales et fémorales en plomb, qui ne dépassent pas les limites de détection de l'ICP-MS, sont évaluées, respectivement, à 0,02-0,05 et 1,2 µg ; excepté pour la dose de 20 $mg.L^{-1}$ qui atteint 0,11 µg dans le cerveau et 1,3 µg dans le fémur.

Comme cela était le cas pour les concentrations en plomb des tissus cibles prélevés (exceptés le cerveau et le fémur), les quantités de plomb accumulées présentent une élévation dose-dépendante, suite à la perfusion de solutions plombées et sont toutes statistiquement différentes des tissus des rats sacrifiés et des rats témoins. D'autre part, pour un même tissu, la teneur en plomb augmente parallèlement à l'élévation de la concentration perfusée de manière statistiquement significative.

Les quantités de plomb les plus élevées sont retrouvées dans le foie et le sang, tandis que le cerveau et l'iléon accumulent très peu de métal. Il est à noter que la quantité de plomb retenue par un tissu dépend directement de son poids. Il est donc logique que le foie soit l'organe accumulant la plus grande quantité de métal, sachant qu'il pèse en moyenne 7,5 g, soit 4 fois plus que le jéjunum et les reins (< 2 g) et 25 fois plus que le duodénum et l'iléon (< 300 mg).
En outre, les quantités de plomb accumulées dans les organes prélevés semblent suivre le même profil d'augmentation constaté avec les concentrations tissulaires, puisque lorsque la dose double, les teneurs sont multipliées par un facteur proche de 2.

- La distinction entre le plomb absorbé dans l'intestin grêle et le plomb simplement retenu à la surface luminale ne pouvant être faite, le **pourcentage d'absorption** du métal perfusé est calculé en tenant compte uniquement de la somme des quantités de plomb accumulées dans les trois principaux tissus cibles prélevés (sang, foie, reins), rapportée à la quantité de métal

Tableau XV : Concentrations en plomb dans le sang ($\mu g.L^{-1}$) et les organes ($\mu g.g^{-1}$) de rats perfusés pendant, 60 min, avec différentes solutions : $NaClO_4$ seul, plomb (10, 1 ou 0,5 $mg.L^{-1}$) en présence ou en absence d'hydroxyapatite dissoute (4,85 $mg.L^{-1}$) dans du $NaClO_4$, à pH = 3.

Tissus	Sacrifiés	Témoins	Concentration perfusée	Pb	HA-Pb
Sang	< 20	< 5,71	0,5 $mg.L^{-1}$	59 ± 26	49 ± 13
			1 $mg.L^{-1}$	148 ± 12	134 ± 19
			10 $mg.L^{-1}$	1265 ± 277	1175 ± 223
Duodénum	< 0,07	< 0,07	0,5 $mg.L^{-1}$	0,47 ± 0,07	0,44 ± 0,01
			1 $mg.L^{-1}$	0,99 ± 0,24	0,57 ± 0,10
			10 $mg.L^{-1}$	4,7 ± 1,6	5,3 ± 0,8
Jéjunum	0,03 ± 0,05	< 0,01	0,5 $mg.L^{-1}$	0,21 ± 0,03	0,18 ± 0,02
			1 $mg.L^{-1}$	0,40 ± 0,12	0,32 ± 0,05
			10 $mg.L^{-1}$	3,3 ± 1,0	4,1 ± 1,2
Iléon	< 0,13	< 0,10	0,5 $mg.L^{-1}$	< 0,11	< 0,10
			1 $mg.L^{-1}$	0,21 ± 0,04	0,16 ± 0,06
			10 $mg.L^{-1}$	1,7 ± 0,5	1,8 ± 0,5
Foie	< 0,01	< 0,01	0,5 $mg.L^{-1}$	0,18 ± 0,08	0,17 ± 0,03
			1 $mg.L^{-1}$	0,43 ± 0,08	0,30 ± 0,06
			10 $mg.L^{-1}$	5,5 ± 0,8	5,5 ± 1,4
Reins	< 0,02	< 0,02	0,5 $mg.L^{-1}$	0,10 ± 0,03	0,05 ± 0,02
			1 $mg.L^{-1}$	0,16 ± 0,05	0,11 ± 0,02
			10 $mg.L^{-1}$	2,1 ± 0,6	2,0 ± 0,5
Cerveau	0,02 ± 0,02	< 0,01	0,5 $mg.L^{-1}$	< 0,02	< 0,02
			1 $mg.L^{-1}$	< 0,02	< 0,02
			10 $mg.L^{-1}$	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Fémur	< 2,1	< 1,9	0,5 $mg.L^{-1}$	< 1,7	< 1,7
			1 $mg.L^{-1}$	< 1,7	< 1,6
			10 $mg.L^{-1}$	< 1,6	< 1,7

présent dans la solution perfusée. Cette dernière dépend de la concentration en métal perfusée, ainsi que du volume de l'intestin grêle, estimé à 20 mL.

Les pourcentages d'absorption du plomb augmentent avec l'élévation de la concentration perfusée (tableau XIV). Toutefois, la différence n'est pas statistiquement significative entre les trois plus faibles concentrations perfusées (500 $\mu g.L^{-1}$, 1 et 5 $mg.L^{-1}$), ni entre les deux plus élevées (10 et 20 $mg.L^{-1}$). En revanche, la différence entre ces deux groupes est statistiquement significative.

Quant à la distribution du plomb accumulé dans les trois principaux tissus cibles (sang, foie, reins), un tiers de la quantité absorbée se trouve dans le compartiment sanguin, un peu moins des deux autres tiers dans le foie, et les 6 % restants dans les reins. Cette distribution n'est pas statistiquement influencée par l'élévation de la concentration de plomb perfusée, même si la fraction hépatique semble légèrement augmenter au détriment de la fraction sanguine.

Tableau XIV : Pourcentages de plomb accumulé dans les principaux tissus cibles prélevés (sang, foie, reins), de rats perfusés 60 min avec différentes solutions de plomb (0,5, 1, 5, 10 ou 20 $mg.L^{-1}$), dans du $NaClO_4$, à pH = 3.

Traitement	% d'absorption
500 $\mu g.L^{-1}$	23,5 % *
1 $mg.L^{-1}$	27,6 % *
5 $mg.L^{-1}$	29,3 % *
10 $mg.L^{-1}$	33,8 %
20 $mg.L^{-1}$	36,3 %

* comparaison avec les lots de 10 et 20 $mg.L^{-1}$ ($p < 0,05$)

Le pourcentage de plomb absorbé a été calculé selon la formule : $[(Q_T - Q_t)/Q_p].100$
Q_T= quantité totale de plomb accumulée dans les tissus prélevés chez les rats traités (μg)
Q_t= quantité totale de plomb accumulée dans les tissus prélevés chez les rats témoins (μg)
Q_p= quantité totale de plomb perfusée (μg), $Q_p = C.V$, avec C = concentration en plomb ($mg.L^{-1}$) et V = volume de l'intestin grêle (20 mL).

2.3) Absorption et distribution du plomb en présence d'hydroxyapatite synthétique dissoute

Suite aux précédents résultats obtenus avec le plomb seul, ne démontrant aucune influence du sel (NaCl, $NaClO_4$) sur l'absorption et la distribution du métal, il nous a paru intéressant de vérifier s'il ne était de même en présence d'hydroxyapatite synthétique dissoute (4,85 $mg.L^{-1}$), pour la première concentration en plomb retenue, soit 10 $mg.L^{-1}$. Les résultats

Tableau XVI : Quantités de plomb dans le sang et les organes (µg) de rats perfusés, pendant 60 min, avec différentes solutions : $NaClO_4$ seul, plomb (10, 1 ou 0,5 $mg.L^{-1}$) en présence ou en absence d'hydroxyapatite dissoute (4,85 $mg.L^{-1}$) dans du $NaClO_4$, à pH = 3.

Tissus	Sacrifiés	Témoins	Concentration perfusée	Pb	HA-Pb
Sang	< 0,24	< 0,08	0,5 $mg.L^{-1}$	0,88 ± 0,36	0,67 ± 0,12
			1 $mg.L^{-1}$	2,3 ± 0,1	2,2 ± 0,3
			10 $mg.L^{-1}$	22 ± 5,0	19 ± 3,6
Duodénum	< 0,01	< 0,01	0,5 $mg.L^{-1}$	0,08 ± 0,02	0,07 ± 0,004
			1 $mg.L^{-1}$	0,16 ± 0,03	0,09 ± 0,02
			10 $mg.L^{-1}$	0,73 ± 0,32	0,91 ± 0,24
Jéjunum	0,06 ± 0,08	< 0,02	0,5 $mg.L^{-1}$	0,34 ± 0,05	0,24 ± 0,04
			1 $mg.L^{-1}$	0,56 ± 0,06	0,49 ± 0,08
			10 $mg.L^{-1}$	5,7 ± 1,3	6,2 ± 1,7
Iléon	< 0,01	< 0,01	0,5 $mg.L^{-1}$	< 0,01	< 0,01
			1 $mg.L^{-1}$	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01
			10 $mg.L^{-1}$	0,24 ± 0,07	0,25 ± 0,08
Foie	< 0,11	< 0,07	0,5 $mg.L^{-1}$	1,5 ± 0,9	1,1 ± 0,1
			1 $mg.L^{-1}$	3,2 ± 0,7	2,3 ± 0,4
			10 $mg.L^{-1}$	42 ± 6,2	40 ± 8,8
Reins	< 0,02	< 0,03	0,5 $mg.L^{-1}$	0,18 ± 0,08	0,09 ± 0,05
			1 $mg.L^{-1}$	0,27 ± 0,07	0,20 ± 0,05
			10 $mg.L^{-1}$	3,9 ± 1,1	3,4 ± 0,9
Cerveau	0,05 ± 0,04	< 0,02	0,5 $mg.L^{-1}$	< 0,03	< 0,03
			1 $mg.L^{-1}$	< 0,03	< 0,03
			10 $mg.L^{-1}$	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,02
Fémur	< 1,2	< 1,2	0,5 $mg.L^{-1}$	< 1,2	< 1,2
			1 $mg.L^{-1}$	< 1,2	< 1,2
			10 $mg.L^{-1}$	< 1,2	< 1,2

(annexe 6) n'ayant révélé aucune différence statistiquement significative entre les différents lots, que le mélange soit en solution dans NaCl ou $NaClO_4$, les travaux suivants ont été réalisés avec de perchlorate de sodium.
Pour ces essais, trois concentrations en plomb ont été retenues, c'est-à-dire 10, 1 et 0,5 $mg.L^{-1}$, la concentration en apatite restant inchangée (4,85 $mg.L^{-1}$).

D'après les résultats présentés dans le tableau XV, même si les plombémies et les concentrations en plomb des organes de rats perfusés par le mélange "plomb-apatite dissoute" semblent souvent légèrement inférieures à celles des rats perfusés avec le plomb seul, la différence n'est jamais statistiquement significative.
Ce résultat reste inchangé lorsque l'on considère la quantité de plomb accumulée dans les organes cibles (tableau XVI).

De même, pour une concentration donnée, le pourcentage d'absorption du plomb est légèrement diminué par la présence d'apatite (tableau XVII), mais cet effet n'est pas statistiquement significatif.

De manière globale, les pourcentages d'absorption ne sont pas statistiquement différents, mis à part dans le cas de la concentration en plomb de 0,5 $mg.L^{-1}$ en présence d'apatite, où le pourcentage obtenu (17,2 %) s'avère statistiquement différent de celui obtenu avec la concentration de 1 $mg.L^{-1}$ sans apatite (27,6 %) et de ceux obtenus avec la concentration de 10 $mg.L^{-1}$ (33,8 et 30,8 %).

La distribution du plomb accumulé dans les trois principaux tissus cibles (sang, foie, reins), n'est pas influencée par la présence d'apatite. Ainsi, un tiers de la quantité absorbée se trouve dans le compartiment sanguin, un peu moins des deux autres tiers dans le foie, et les 5 % restants dans les reins).

Tableau XVII : Pourcentages de plomb accumulé dans les principaux tissus cibles prélevés (sang, foie, reins), de rats perfusés 60 min avec différentes solutions de plomb (0,5, 1 ou 10 $mg.L^{-1}$), avec ou sans hydroxyapatite dissoute (4,85 $mg.L^{-1}$), dans du $NaClO_4$, à pH = 3.

TRAITEMENT	PLOMB SEUL	PLOMB + APATITE
0,5 $mg.L^{-1}$	23,5 %	17,2 %
1 $mg.L^{-1}$	27,6 %	22,5 %
10 $mg.L^{-1}$	33,8 %	30,8 %

3) DISCUSSION

Cette deuxième étude avait pour objectif d'évaluer l'influence de l'hydroxyapatite synthétique dissoute sur l'absorption intestinale du plomb. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique de perfusion *in situ* de l'intestin grêle de rat, pour étudier l'absorption et la distribution du plomb dans les différents tissus cibles (sang, duodénum, jéjunum, iléon, foie, reins, cerveau et fémur).

La concentration en plomb dans l'intestin grêle (en $\mu g.g^{-1}$), qui représente moins de 5 % de la dose de métal perfusée dans notre étude, reflète la quantité de métal retenue par les constituants de la paroi intestinale ou adsorbée à la surface des entérocytes (Foulkes, 1984). Ce métal retenu est susceptible d'être ultérieurement libéré dans la lumière intestinale, ou d'être absorbé, c'est-à-dire de passer dans la circulation sanguine.
Suite à la perfusion, le duodénum est le segment intestinal présentant la concentration en plomb la plus élevée, suivie du jéjunum, puis de l'iléon. Toutefois, la quantité de métal retenue dans l'intestin grêle reste faible.

La concentration sanguine en plomb ($\mu g.L^{-1}$) représente la quantité de métal ayant traversé la paroi intestinale et circulant dans l'organisme, accessible aux différents organes. Sa présence dans le plasma étant généralement inférieure à 1 %, c'est la concentration en plomb dans le sang total qui a été prise en compte (DeSilva, 1981 ; Manton & Cook, 1984 ; Minoia *et al.*, 1990 ; O'Flaherty *et al.*, 1996 ; Schütz *et al.*, 1996 ; Bergdahl *et al.*, 1998, 1999).
Le pourcentage de plomb absorbé et accumulé dans les tissus cibles prélevés (sang, foie, reins) de rats perfusés par une solution de plomb seul varie de 23 à 36 %, selon la concentration initiale en plomb (0,5 à 20 $mg.L^{-1}$). Ces valeurs sont en accord avec les données bibliographiques concernant cette technique de perfusion intestinale, qui s'étendent de 22 à 31% (Barton *et al.*, 1978a, 1980).

Une telle élévation dose-dépendante de l'absorption intestinale du métal, accompagnée d'une relation linéaire entre la plombémie et la concentration en métal perfusée, pourraient traduire la dominance de la diffusion passive, parmi les mécanismes mis en jeu dans l'absorption du plomb, comme cela a été proposé par certains auteurs (Gruden & Stantic, 1975 ; Barltrop & Khoo, 1976 ; Blair *et al.*, 1979 ; Flanagan *et al.*, 1979 ; Karmakar & Jayaraman, 1988).

La présence d'hydroxyapatite synthétique dissoute, dans la solution de perfusion contenant du plomb, n'a pas modifié significativement l'absorption intestinale et la distribution du plomb au niveau des tissus cibles prélevés.
Ce résultat nous permet de répondre aux questions qui nous avaient conduit à réaliser cette étude *in situ*.

Ainsi, l'arrivée au niveau du duodénum de la bile et du suc pancréatique, tous deux de pH alcalin, n'a pas favorisé la précipitation du plomb. Le fait que le plomb soit apporté en solution a probablement conduit à une dilution de ces sécrétions. De plus, compte tenu de la vitesse de perfusion imposée par le pousse seringue, la réaction a pu se réaliser dans le jéjunum, sans influencer l'absorption au niveau du duodénum.

De plus, si la dissolution de l'hydroxyapatite libère du calcium et du phosphore, deux éléments connus pour diminuer l'absorption intestinale du plomb, dans nos conditions expérimentales, leurs concentrations se sont avérées trop faibles, en comparaison du plomb apporté, pour permettre une telle inhibition.

Enfin, l'élévation progressive du pH intestinal depuis le pylore jusqu'à l'iléon (> 7,5) n'a pas permis la formation de précipités contenant du plomb (mis en évidence au pH voisin de 6 dans l'étude *in vitro*), au niveau du duodénum. Il est possible que de tels précipités se soient formés dans la partie distale de l'intestin grêle (jéjunum, iléon), mais leur influence sur l'absorption globale s'est révélée négligeable.

Les résultats de cette étude de l'absorption intestinale du plomb, évaluée par une perfusion *in situ*, nous ont conduit à conclure à l'inefficacité de l'apatite apportée sous forme dissoute, pour immobiliser le plomb en solution, lors de son passage à travers l'intestin grêle de rat, même lorsque la quantité d'hydroxyapatite est 20 fois supérieure à celle stœchiométriquement nécessaire, selon l'équation de la réaction de dissolution/précipitation.

Aussi, notre recherche s'est-elle orientée vers l'utilisation d'hydroxyapatite solide, pour tenter d'immobiliser le plomb selon le mécanisme de l'échange ionique entre les ions Ca^{2+} et les ions Pb^{2+}, les essais *in vitro* ayant mis en évidence la formation de pyromorphite insoluble.
L'influence de l'hydroxyapatite solide sur la biodisponibilité du plomb *in vivo* a été évaluée grâce à un traitement oral réitéré chez le rat, la technique de perfusion n'étant pas utilisable dans le cas de produit solides en suspension.

ETUDE *IN VIVO* DE L'IMMOBILISATION DU PLOMB PAR L'HYDROXYAPATITE

Cette nouvelle étude se propose d'évaluer les effets de l'hydroxyapatite solide sur la biodisponibilité du plomb *in vivo*, à l'aide de la technique d'intubation gastrique de rats, pendant 31 jours consécutifs.

A notre connaissance, aucune autre recherche n'a été publiée sur ce sujet, à savoir l'étude de la biodisponibilité *in vivo* du plomb présent sous forme de pyromorphite, chez les mammifères. Les seuls animaux utilisés dans la littérature sont des vers de terre (Pearson *et al.*, 2000). La plupart des études de biodisponibilité ont été entrepris sur des plantes, après amendement de sols contaminés au plomb avec des phosphates (Laperche *et al.*, 1997 ; Boisson *et al.*, 1999 ; Grcman *et al.*, 2001).
Quelques auteurs ont mené des expériences *in vitro* simulant les processus chimiques ayant lieu dans le tractus digestif des mammifères ("pH dynamique"). Dans ces essais, le pH de la solution de plomb et d'apatite à 37 °C est augmenté d'une unité de pH, de 2 à 7, sur 30 minutes, puis il est maintenu à 7 pour un période supplémentaire de 30 minutes (Zhang & Ryan, 1998, 1999a, b ; Zhang *et al.*, 1999). Ruby et collaborateurs (1996) ont développé un test d'extraction du plomb contenu dans le sol, dénommé PBET (Physiologically Based Extraction Test) et utilisé également par d'autres (Hettiarachchi *et al.*, 2000, 2001 ; Yang *et al.*, 2001), incluant des enzymes digestives (pepsine, pancréatine) et des sels biliaires.

1) MATERIEL ET METHODE

1.1) Matériel

1.1.1) Équipement

- Balance type 2442 (SARTORIUS)
- Micro-ondes MDS-2000 CEM (ROUCAIRE)
- Spectromètre d'émission à plasma d'argon DCP (Direct Current Plasma) type Spectraspan VII

1.1.2) Petit matériel

- Aiguilles 0,5 mm x 16 mm et 0,7 mm x 16 mm (TERUMO)
- Aiguilles d'intubation droite en acier inoxydable, 18 G-2, 5 cm de longueur, avec une bille de 2,25 mm de diamètre, POPPER & SONS, Inc. (MERCK-EUROLAB)
- Matériel de dissection
- Micropipettes (GILSON) avec embouts en polyéthylène (POLY LABO)
- Seringues 1 et 10 mL (TERUMO)
- Tubes à prélèvement de sang sous vide 16 x 100 mm Vucatainer® (POLY LABO)

- Tubes en polypropylène, fond conique, 50 mL (FISHER SCIENTIFIC)
- Tubes en polystyrène 19 x 95 mm (POLY LABO)
- Tubes hémolyse en polystyrène cristal 13 x 75 mm (POLY LABO)

1.1.3) Réactifs

- Acide nitrique, HNO_3, 65 % Suprapur (MERCK)
- Chlorure de plomb, $PbCl_2$, (MERCK)
- Eau purifiée par un système de purification type Milli-Q (MILLIPORE)
- Héparine sodique (PANPHARMA)
- Hydroxylapatite, $Ca_5HO_{13}P_3$ (FLUKA) ou hydroxyapatite
- Pentobarbital sodique (SANOFI)
- Peroxyde d'hydrogène, H_2O_2, 30 % Suprapur (MERCK)

1.2) Animaux

Des rats mâles albinos (*Rattus norvegicus*) de souche Wistar, non consanguins, indemnes de tout organisme pathogène, provenant du centre d'élevage agréé IFFA CREDO (l'Arbresle, France) ont été utilisés.

A leur arrivée, les animaux ont été placés individuellement dans des cages en plastique (43 x 28 x 15 cm) recouvertes d'une grille en inox, avec une litière de copeaux de bois dépoussiérés (EXTRA LABO, Etablissements Pietrement, Provins, France). Ils ont séjourné dans une salle spécialement réservée de l'animalerie centrale de la Faculté de Médecine de Nancy, où la température est comprise entre 20 et 23°C. Le cycle jour/nuit était de 12h/12h, l'éclairage étant maintenu de 20 h à 8 h, afin de réaliser les expériences durant la période d'activité de l'animal.
Les rats ont été nourris *ad libitum* avec des croquettes standard M 20 (EXTRA LABO, Etablissements Pietrement, Provins, France) et l'eau du robinet, conditionnée dans des biberons en plastique.

Les rats utilisés pesaient entre 80 et 100 g à leur arrivée et ont suivi une période d'acclimatation de 10 jours.

1.3) Méthode

1.3.1) Contrôles préliminaires

La présence de plomb a été contrôlée dans les réactifs utilisés au cours de cette étude *in vivo*, ainsi que dans l'eau du robinet, les croquettes et la litière, comme cela était le cas dans l'étude *in situ* (cf page 80).

1.3.2) Caractéristiques des solutions

Trois catégories de solutions ont été intubées à des lots de huit rats :

- les solutions de plomb seul (Pb)
- les suspensions du mélange hydroxyapatite-plomb (HA-Pb)
- la solution témoin (eau Milli-Q) ou la suspension témoin (hydroxyapatite seule).

Les rats ont été intoxiqués au plomb ($PbCl_2$) à une dose de 10 $mg.kg^{-1}$ de poids corporel (48,2 $\mu mol.kg^{-1}$). Cette valeur, relativement élevée, a été sélectionnée de manière à obtenir des concentrations tissulaires en plomb supérieures à la limite de détection de l'appareil de mesure.
La dose d'hydroxyapatite synthétique solide retenue (100 $mg.kg^{-1}$) est basée sur les résultats de l'étude *in vitro* de l'immobilisation du plomb par l'apatite solide, sachant que la totalité du plomb en solution était retenue au rapport massique HA/Pb = 9.
Le rapport HA/Pb choisi pour cette étude *in vivo* est donc de 10.
Le mélange hydroxyapatite-plomb a été réalisé 30 minutes avant l'administration orale.

1.3.3) Intubation gastrique des rats

Après un jeun de 14 heures, les rats ont été gavés quotidiennement avec une solution de plomb à 2 $g.L^{-1}$ ou une suspension du mélange "plomb-apatite " (respectivement à 2 et 20 $g.L^{-1}$), à raison de 0,5 mL pour 100 g de poids corporel. Les croquettes ont été rendues 4 heures après l'intubation, afin d'éviter toute interaction entre la nourriture et la solution administrée.
Cet intervalle de temps est largement suffisant, compte tenu du temps de transit intestinal d'une solution administrée à 1 mL pour 100 g de poids corporel de rat, estimé à 101 min (Yuasa *et al.*, 1995).

Les rats ont été pesés tous les jours (ce qui permet d'ajuster le volume de solution administré), ainsi que la quantité de croquettes consommées, afin de suivre les éventuels effets du traitement sur leur évolution pondérale ou leur alimentation.

La durée du traitement, soit 31 jours consécutifs, a été sélectionnée en fonction de la littérature, un certains nombre d'auteurs considérant ce temps comme suffisant pour observer une accumulation de plomb dans les tissus cibles significativement supérieure aux valeurs témoins et pour engendrer des altérations biochimiques (Flora *et al.*, 1986 ; Freeman *et al.*, 1992, 1994, 1996 ; Dieter *et al.*, 1993 ; Polak *et al.*, 1996 ; Soldatovic *et al.*, 1997 ; Ruby *et al.*, 1999).

1.3.4) Prélèvement du sang et des organes

A la fin de l'expérimentation, les rats ont été anesthésiés au pentobarbital sodique (60 $mg.kg^{-1}$, en injection intrapéritonéale).

Le sang a été prélevé par ponction cardiaque, à l'aide de seringues héparinées ; il a été conservé au réfrigérateur à 4 °C, dans des tubes prévus à cet effet (Vucatainer®).

Les organes prélevés sont ceux connus pour être les organes cibles du plomb, c'est-à-dire le foie, les reins, la rate, le cerveau et le fémur. Les différents segments de l'intestin grêle, c'est-à-dire le duodénum (segment de 8 cm à partir du pylore), le jéjunum et l'iléon (segment de 8 cm en amont du cæcum) ont également été prélevés.
Les organes (excepté le fémur) ont été pesés, puis conservés au congélateur à – 18°C ; le fémur, quant à lui, a été conservé à température ambiante, après séchage une nuit à l'étuve (70 °C).

1.3.5) Analyse de la teneur en plomb des échantillons

La teneur en plomb du sang et des organes prélevés a été déterminée par ICP-MS (Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometer), au Laboratoire d'Hygiène et de Recherche en Santé Publique de Vandoeuvre-Les-Nancy (LHRSP).

Cette analyse a été réalisée sur des tissus préalablement minéralisés, à l'aide d'un minéralisateur à micro-ondes MDS-2000.
Concernant les prélèvements sanguins, 3 mL ont été placés dans des réacteurs en téflon avec 1 mL d'acide nitrique à 65 % suprapur et 2 mL de peroxyde d'hydrogène à 30 % suprapur. Le programme de minéralisation a pris en compte la pression (150 PSI soit 10 bars) et le temps (2h).

Les organes de poids inférieur à 1g (duodénum, iléon, fémur) ont été placés dans les réacteurs avec 1 mL d'acide nitrique et 2 mL d'eau oxygénée ; ils ont été minéralisés à 150 PSI pendant 45 minutes.
Les organes de poids plus élevé (jéjunum, foie, reins, cerveau) ont été placés dans les réacteurs (le foie a été fractionné en morceaux de 2 g), avec 2 mL d'acide nitrique et 4 mL d'eau oxygénée ; ils ont été minéralisés à 150 PSI pendant 2 h.
L'échantillon solubilisé a ensuite été récupéré ; le volume obtenu a été mesuré, pour permettre de calculer la concentration C en $\mu g.g^{-1}$ ($C = (c.V)/P$) et la quantité Q en µg ($Q = c.V$), où c est la concentration en $\mu g.L^{-1}$ donnée par l'ICP-MS, V le volume de solution en litre (L) et P le poids du segment en gramme (g).
Concernant le sang, la quantité de plomb dépend du volume de sang présent dans l'organisme de l'animal, estimé à 7 % du poids corporel (Conrad & Barton, 1978 ; Barton *et al.*, 1980 ; Aungst *et al.*, 1981 ; Barton & Conrad, 1981 ; Smith *et al.*, 2000).
Concernant le squelette, la quantité de plomb accumulée dépend de la masse osseuse de l'animal, estimée à 5 % du poids corporel (Davis *et al.*, 1992). La concentration fémorale est alors multipliée par la valeur ainsi obtenue.

Un blanc (1 mL d'acide nitrique et 2 mL d'eau oxygénée) a été réalisé à chaque minéralisation.
Des échantillons de sang certifiés de niveau 1, soit 86 ± 1,5 $\mu g.L^{-1}$ (Lyphocheck, BIO-RAD), ont été utilisés comme contrôles de qualité. Avec une moyenne de 84,95 ± 11,83 $\mu g.L^{-1}$, le taux de recouvrement est de 98,78 % ± 13,75 %.

Les minéralisats ont enfin été dilués jusqu'à obtention d'une teneur en acide inférieure à 5 %, pour une concentration maximale en plomb de 100 $mg.L^{-1}$. Ils ont ensuite été chargés en indium 115 à 50 $\mu g.L^{-1}$ (standard interne). Le seuil de détection du plomb par l'ICP-MS est de 1 $\mu g.L^{-1}$; le seuil de quantification est de 5 $\mu g.L^{-1}$.

Remarque : entre chaque programme de minéralisation d'organes, un programme de lavage des réacteurs a été effectué : 50 PSI pendant 60 minutes. Les réacteurs ont ensuite été rincés abondamment à l'eau déminéralisée, puis laissés à sécher sur un égouttoir recouvert de téflon.

1.3.6) Analyse des teneurs tissulaires en métaux essentiels

Afin de mettre en évidence une éventuelle influence de l'hydroxyapatite sur l'absorption d'autres métaux que le plomb, la teneur en calcium, phosphore, magnésium, zinc, cuivre et fer a été déterminée dans le sang total, le plasma (à l'exception du fer, compte tenu du risque d'hémolyse lors de la centrifugation), le duodénum, le jéjunum, l'iléon, le foie, les reins, la rate, le cerveau et le fémur (uniquement pour le calcium et le phosphore), à l'aide d'un spectromètre d'émission à plasma d'argon DCP (Direct Current Plasma) de type Spectraspan VII.

Une dilution au dixième des minéralisats a été réalisée, afin d'amener les concentrations dans la gamme de linéarité des éléments dosés et de fournir un volume suffisant à l'analyse de l'ensemble des métaux sélectionnés.

Tableau XVIII : Caractéristiques spectrométriques des éléments dosés

ELEMENTS	LONGUEUR D'ONDE	ZONE DE LINEARITE	LIMITE DE DETECTION
Calcium	317,933 nm	90 $\mu g.L^{-1}$ à 100 $mg.L^{-1}$	9 $\mu g.L^{-1}$
Cuivre	324,754 nm	20 $\mu g.L^{-1}$ à 10 $mg.L^{-1}$	2 $\mu g.L^{-1}$
Fer	371,994 nm	50 $\mu g.L^{-1}$ à 1000 $mg.L^{-1}$	5 $\mu g.L^{-1}$
Magnésium	279,553 nm	2 $\mu g.L^{-1}$ à 60 $mg.L^{-1}$	0,2 $\mu g.L^{-1}$
Phosphore	213,618 nm	900 $\mu g.L^{-1}$ à 1000 $mg.L^{-1}$	90 $\mu g.L^{-1}$
Zinc	202,548 nm	60 $\mu g.L^{-1}$ à 600 $mg.L^{-1}$	6 $\mu g.L^{-1}$

1.3.7) Analyse histologique de rein

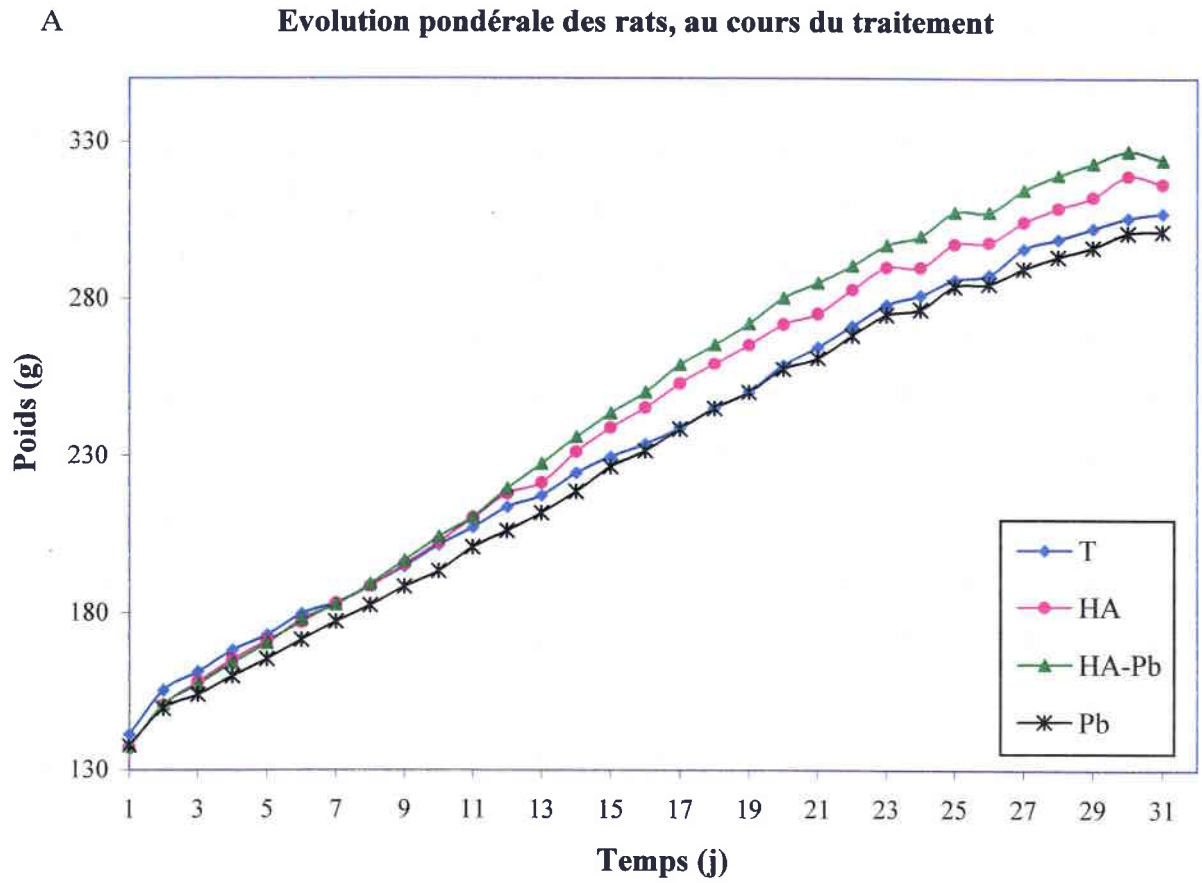
Cette analyse histologique a été réalisée au Laboratoire d'Anatomie Pathologique de Nancy, sous la direction du Docteur Yves Grignon, afin de mettre en évidence la présence d'inclusions intranucléaires, observées dans certaines études expérimentales d'intoxication au plomb (Goyer *et al.*, 1970 ; Mahaffey-Six & Goyer, 1972 ; Mahaffey *et al.*, 1973 ; Anders *et al.*, 1982 ; Bankowska & Hine, 1985 ; Dieter *et al.*, 1993).
Pour ce faire, le rein gauche de chaque rat a été conservé, individuellement, dans du formol à 10 %, tamponné à pH = 7,0.

Chaque prélèvement a été inclus dans de la paraffine, après déshydratation dans des bains d'éthanol à concentrations croissantes et éclaircissement dans des bains de toluène à concentrations croissantes. Des coupes de 5 µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un microtome (RM 2125TT, Leica), colorées par l'H.E.S. (Hématoxyline, Eosine, Safran), puis montées entre lame et lamelle pour être ensuite observées au microscope (BX 45, Olympus).

1.3.8) Analyse statistique

L'analyse statistique des teneurs en plomb du sang et des organes prélevés a été réalisée à l'aide d'une analyse de variance multifactorielle ANOVA par le logiciel STATVIEW, après transformation logarithmique et vérification de l'homogénéité des variances par un test F. Un test de Fisher a permis d'affiner les conclusions. Une probabilité inférieure à 0,05 (α = 5 %) a été associée à une différence statistiquement significative.

A



B

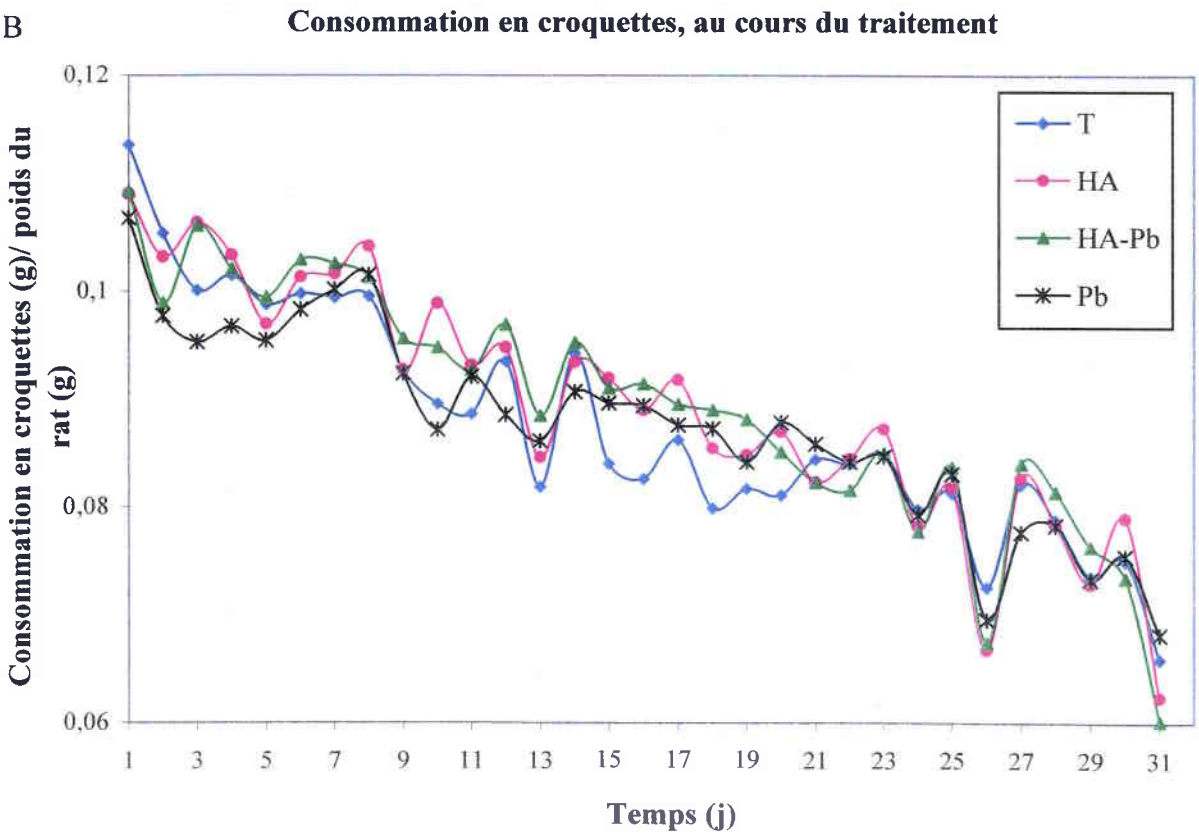


Figure 15 : Evolution du poids des rats (A) et de leur consommation en croquettes (B), au cours du traitement

2) RESULTATS

2.1) Evolution du poids et de la consommation en croquettes des rats, au cours du traitement

Les figures 15a et 15b présentent respectivement l'évolution pondérale et la consommation en croquettes des rats, au cours du traitement.
Aucune différence statistiquement significative durable n'est apparue entre les différents groupes.

Ainsi, à leur entrée dans le protocole expérimental, le poids moyen des rats était de 139 ± 6 g, distribué de la manière suivante : 142 ± 7 g pour les témoins eau, 137 ± 8 g pour les témoins hydroxyapatite, 139 ± 5 g pour les rats intoxiqués au plomb seul et 138 ± 4 g pour ceux traités avec le mélange "plomb-apatite". A la fin de l'expérimentation, le poids moyen des rats s'est élevé d'un facteur voisin de deux, atteignant 313 ± 24 g, distribué de la manière suivante : 307 ± 19 g pour les témoins eau, 317 ± 33 g pour les témoins hydroxyapatite, 302 ± 24 g pour les rats intoxiqués au plomb seul et 324 ± 17 g pour ceux traités avec le mélange "plomb-apatite". Ces données sont en accord avec une croissance normale des rats, selon les renseignements fournies dans la fiche technique des rats Wistar IOPS AF/HAN d'IFFA CREDO, avec des poids moyens de 131 ± 9 g et 291 ± 23 g, aux âges respectifs précédemment commentés.

La consommation quotidienne de croquettes a été rapportée au poids du rat, pour éviter le biais causé par les variations pondérales intra et interlots.
Cette consommation moyenne en croquettes a diminué légèrement au cours du traitement, de 0,11 ± 0,01 g/g au 1er jour à 0,06 ± 0,01 g/g au 31ème jour. Ce ralentissement pourrait s'expliquer par le vieillissement des rats, qui étaient de jeunes adultes (35 jours) encore en période de croissance rapide, au début de l'expérimentation.

2.2) Absorption et distribution du plomb, en présence d'hydroxyapatite synthétique solide

Les tableaux XIX et XX présentent, respectivement, les **concentrations** et les **quantités de plomb**, dosées dans les différents tissus cibles prélevés (sang, duodénum, jéjunum, iléon, foie, reins, rate, cerveau et fémur), après 31 jours de traitement.

Concernant le lot de rats intoxiqués au plomb seul, tous les tissus étudiés présentent une élévation statistiquement significative de la concentration et de la quantité de plomb, par rapport au lot de rats ayant reçu de l'eau purifiée et celui traité par une suspension d'hydroxyapatite seule (pas de différence significative entre ces deux lots témoins).
Les concentrations en plomb les plus élevées sont retrouvées dans le sang, le fémur, les reins et le foie, tandis que les organes les moins touchés sont le cerveau et l'intestin grêle.

Tableau XIX : Concentrations en plomb dans le sang ($\mu g.L^{-1}$) et les organes ($\mu g.g^{-1}$) de rats intubés pendant 31 jours consécutifs, avec une solution d'eau seule, d'hydroxyapatite seule, de plomb (10 $mg.kg^{-1}$), avec ou sans hydroxyapatite solide (100 $mg.kg^{-1}$).

TISSUS	TEMOINS EAU	TEMOINS HA	Pb	HA-Pb
Sang	< 6,9	< 6,6	172 ± 54*	88 ± 24*#
Duodénum	< 0,05	< 0,05	0,17 ± 0,09*	0,07 ± 0,02*#
Jéjunum	0,013 ± 0,002	0,013 ± 0,002	0,16 ± 0,06*	0,07 ± 0,03*#
Iléon	< 0,08	< 0,09	0,18 ± 0,05*	0,08 ± 0,02*#
Foie	0,014 ± 0,001	0,013 ± 0,001	0,62 ± 0,22*	0,31 ± 0,17*#
Reins	< 0,02	< 0,02	4,7 ± 2,6*	1,6 ± 0,4*#
Rate	< 0,02	< 0,02	0,26 ± 0,15*	0,08 ± 0,03*#
Cerveau	< 0,01	< 0,01	0,15 ± 0,06*	0,05 ± 0,03*#
Fémur	< 1,5	< 1,5	50 ± 20*	17 ± 6,8*#

* comparaison témoins-traités, $p < 0,0001$

comparaison Pb/HA-Pb, $p < 0,0001$

Tableau XX : Quantités de plomb dans le sang et les organes (μg) de rats intubés pendant 31 jours consécutifs, avec une solution d'eau seule, d'hydroxyapatite seule, de plomb (10 $mg.kg^{-1}$), avec ou sans hydroxyapatite solide (100 $mg.kg^{-1}$).

TISSUS	TEMOINS EAU	TEMOINS HA	Pb	HA-Pb
Sang	< 0,14	< 0,14	3,4 ± 1,2*	1,9 ± 0,5*#
Duodénum	< 0,01	< 0,01	0,04 ± 0,02*	0,02 ± 0,01*#
Jéjunum	0,03 ± 0,002	0,03 ± 0,002	0,35 ± 0,13*	0,17 ± 0,07*#
Iléon	< 0,01	< 0,01	0,03 ± 0,01*	0,013 ± 0,001*#
Foie	0,14 ± 0,02	0,14 ± 0,03	5,8 ± 2,6*	3,0 ± 1,5*#
Reins	< 0,03	< 0,03	9,8 ± 6,4*	3,1 ± 0,6*#
Rate	< 0,01	< 0,01	0,17 ± 0,11*	0,06 ± 0,02*#
Cerveau	< 0,03	< 0,02	0,29 ± 0,13*	0,10 ± 0,06*#
Fémur	< 1,3	< 1,3	39 ± 18*	15 ± 6,0*#

* comparaison témoins-traités, $p < 0,0001$

comparaison Pb/HA-Pb, $p < 0,0001$

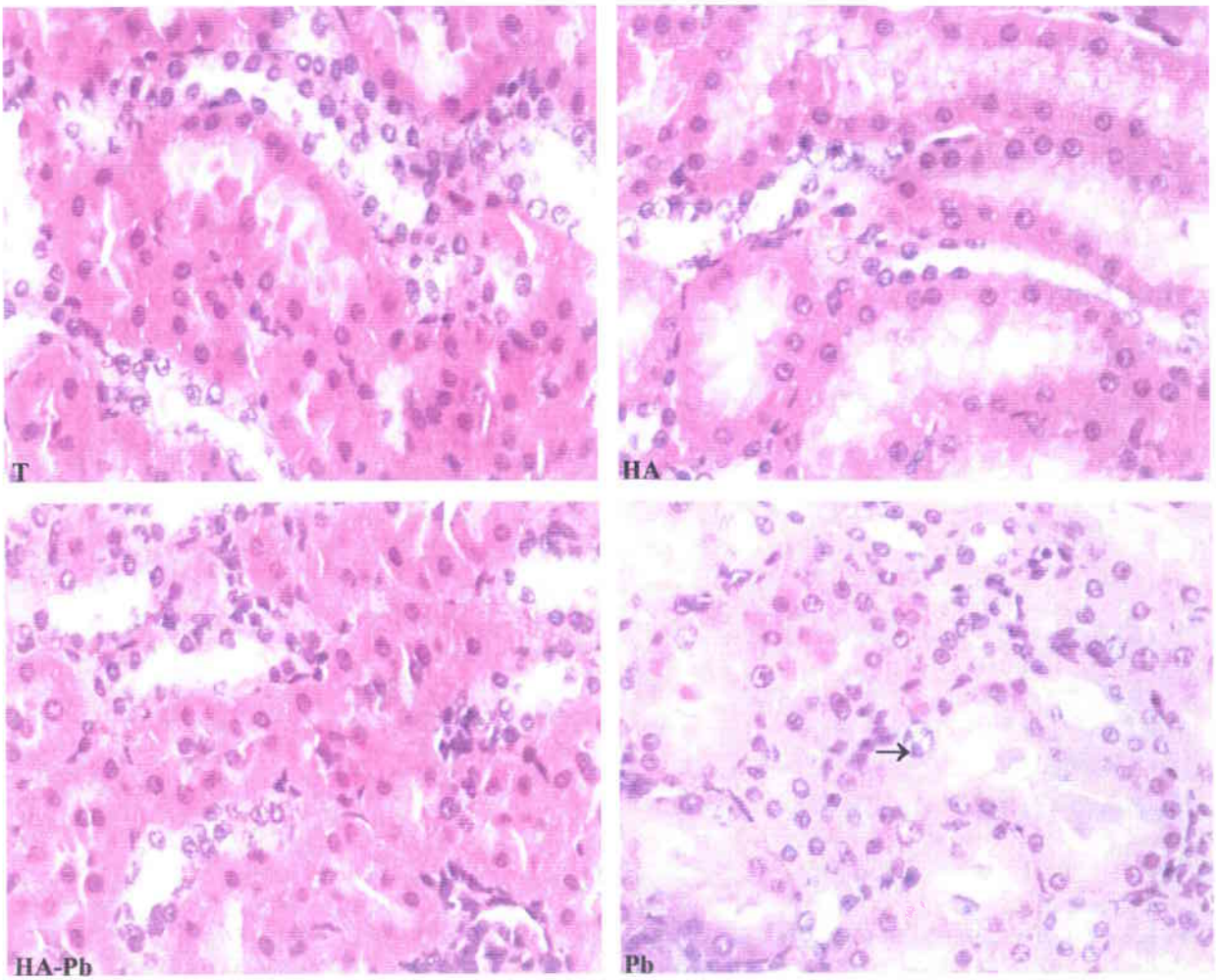


Figure 16 : Observation microscopique des coupes de reins de rats, traités oralement avec de l'eau Milli-Q seule (T), de l'hydroxyapatite solide seule (HA), un mélange de plomb et d'hydroxyapatite (HA-Pb) ou du plomb seul (Pb), pendant 31 jours, x 400.
(→ inclusion intranucléaire)

Les quantités de plomb les plus importantes sont retenues dans le fémur, les reins, le foie et le sang, alors que le duodénum et l'iléon accumulent très peu le métal.

La présence d'hydroxyapatite solide, dans la solution de plomb administrée aux rats, diminue significativement l'accumulation de plomb dans les organes prélevés, sans modifier le classement présenté ci-dessus. Ainsi, la quantité de métal accumulée dans l'ensemble des tissus cibles prélevés chez les rats traités avec le mélange de plomb et d'apatite représente environ 40 % de celle accumulée chez les animaux intoxiqués au plomb seul (respectivement 23,38 et 58,89 µg).
La diminution de la quantité en plomb accumulée varie selon le tissu considéré, de 43-44 % dans l'iléon et le sang à 68 % dans les reins.

2.3) Teneurs tissulaires en métaux essentiels

La teneur en certains métaux essentiels (calcium, phosphore, magnésium, zinc, cuivre, fer) des tissus cibles étudiés présente quelques fluctuations entre les différents lots de rats (tableaux reportés en annexe 7).
Toutefois, aucun effet significatif n'a pu être mis en évidence, mis à part pour la concentration en phosphore dans le sang total qui présente une légère augmentation chez les rats intoxiqués au plomb, en absence et en présence d'apatite (Pb et HA-Pb). Cette élévation ne semble pas due à l'hydroxyapatite puisqu'elle est plus prononcée chez les rats intoxiqués au plomb seul.

2.4) Analyse histologique du rein

L'observation microscopique des coupes de reins (figure 16) a permis de mettre en évidence la présence d'inclusions intranucléaires caractéristiques, chez les rats intoxiqués au plomb. Ces lésions sont localisées au niveau des tubules rénaux, particulièrement dans la bande externe de la médullaire externe et sont caractérisées par un élargissement prononcé des cellules et particulièrement des noyaux, avec apparition d'un groupement basophile.
Ces lésions n'ont pas été retrouvées chez les rats témoins (eau, apatite), ni chez ceux traités avec le mélange de plomb et d'apatite.

3) DISCUSSION

UNIVERSITE DE METZ

Cette étude avait pour objectif d'évaluer les effets de l'hydroxyapatite solide sur la biodisponibilité du plomb *in vivo*, compte tenu des résultats *in vitro*, ayant mis en évidence la présence de pyromorphite comme produit de la réaction entre le plomb aqueux et l'apatite apportée sous forme solide.

Pour cela, des rats ont été intoxiqués au plomb par une intubation gastrique quotidienne d'une solution plombée (10 $mg.kg^{-1}$ de poids corporel), pendant 31 jours consécutifs. La distribution du plomb dans divers tissus cibles a été comparée à celle obtenue suite à l'administration d'une suspension de plomb (10 $mg.kg^{-1}$ de poids corporel) et d'apatite (100 $mg.kg^{-1}$ de poids corporel).

Concernant les résultats obtenus chez les rats témoins (traitement avec de l'eau purifiée ou de l'apatite seule), il est intéressant de noter que les concentrations tissulaires en plomb sont nettement inférieures aux valeurs de la littérature (annexe 8). Par exemple, les plombémies de nos témoins sont inférieures à 7 $\mu g.L^{-1}$, alors que la plus faible valeur rapportée est de 17,5 $\mu g.L^{-1}$ (Tandon *et al.*, 1997). Ce phénomène pourrait s'expliquer, en partie, par la technique de dosage utilisée, l'ICP-MS, qui permet de minimiser l'effet de matrice, contrairement au spectromètre d'absorption atomique, employé par ces auteurs.
A signaler également que, dans la littérature, les plombémies et les teneurs hépatiques en plomb d'animaux témoins ont diminué d'un facteur proche de 10 entre les études publiées en 1986 et 1997. Ainsi, dans une même équipe de recherche, alors que les plombémies étaient estimées à 151 $\mu g.L^{-1}$ en 1986 (Flora *et al.*, 1986), elles diminuaient de moitié 3 ans plus tard (Flora *et al.*, 1989), pour n'atteindre que 17,5 $\mu g.L^{-1}$ en 1997 (Tandon *et al.*, 1997). Cette diminution pourrait traduire les progrès réalisés dans le domaine du dosage du plomb dans les matrices biologiques, ainsi que les multiples précautions indispensables pour éviter toute contamination.

Par ailleurs, dans le cas des rats intoxiqués au plomb, les concentrations tissulaires en cet élément sont relativement faibles comparées aux données de la littérature. Toutefois, la comparaison semble difficile, dans la mesure où les protocoles suivis diffèrent souvent quant à la forme chimique de plomb employée, la durée du traitement et l'appareil de mesure utilisés pour doser le plomb.

- Effectivement, la plupart des études d'intubation gastrique utilisent de l'acétate de plomb, alors que notre protocole a été entrepris avec du chlorure de plomb (Aungst & Fung, 1981, 1983, 1985 ; Anders *et al.*, 1982 ; Flora *et al.*, 1983, 1986, 1989b ; Flora & Tandon, 1986, 1990 ; Tandon *et al.*, 1987, 1997 ; Korsrud & Meldrum, 1988 ; Dhawan *et al.*, 1989 ; Batra *et al.*, 1998 ; Gupta & Gill, 2000b).

Cependant, une telle influence de la forme chimique du plomb n'a pu être confirmée, au cours d'essais complémentaires réalisés par perfusion intestinale *in situ*, selon le protocole décrit précédemment (deuxième partie). Ainsi, peu de variations (tendance à la baisse avec l'acétate de plomb), voire aucune, n'ont pu être constatées, quant à l'accumulation tissulaire du plomb (résultats en annexe 9). Le pourcentage d'absorption calculé dans le cas de l'acétate de plomb (22 %) s'est révélé inférieur à celui obtenu avec du chlorure de plomb (32 et 34 %, respectivement en présence de NaCl et de $NaClO_4$).

- Quant à la durée de l'intoxication, elle varie de 24 heures (Aungst *et al.*, 1981 ; Aungst & Fung, 1983, 1985) à 3 mois (Batra *et al.*, 1998), avec une majorité d'études réalisées durant 8

semaines (Flora *et al.*, 1983 ; Flora & Tandon, 1986, 1990 ; Tandon *et al.*, 1987 ; 1997 ; Gupta & Gill, 2000a, b).

- Enfin, l'absorption atomique est la technique de dosage du plomb la plus utilisée dans la littérature (Aungst & Fung, 1981, 1983, 1985 ; Anders *et al.*, 1982 ; Flora *et al.*, 1983, 1986, 1989b ; Flora & Tandon, 1986, 1990 ; Tandon *et al.*, 1987, 1997 ; Korsrud & Meldrum, 1988 ; Dhawan *et al.*, 1989 ; Batra *et al.*, 1998). A notre connaissance, aucune autre étude d'intoxication au plomb par gavage gastrique n'a utilisé l'ICP-MS.

A noter que, comme dans le cas des témoins, les teneurs tissulaires en plomb, suivant le même protocole d'intoxication orale réitérée, diminuent au fur et à mesure des années (Tandon *et al.*, 1987, 1997 ; Flora & Tandon, 1990).

Dans nos conditions expérimentales, l'administration orale, durant 31 jours, d'une suspension de plomb aqueux additionnée d'hydroxyapatite synthétique solide (au rapport massique HA/Pb de 10) a permis d'observer une immobilisation partielle du plomb, entraînant une diminution de 60 % de la quantité accumulée chez le rat. Cet effet s'avère inférieur à celui escompté à partir de l'étude *in vitro* (84 % du plomb précipités à pH = 3, donc non absorbables).

A noter qu'une élévation du rapport massique HA/Pb pourrait accentuer cet effet inhibiteur sur l'absorption du plomb, par suite d'une immobilisation plus quantitative de cet élément sous forme insoluble, comme cela a été mis en évidence *in vitro*. Cependant, un tel protocole n'a pu être appliqué *in vivo*, en raison des difficultés techniques de gavage.

Cette efficacité de l'hydroxyapatite solide à immobiliser le plomb, administré oralement, est d'autant plus intéressante que les conditions expérimentales utilisées étaient relativement extrêmes. Effectivement, la dose journalière de plomb devait être suffisamment élevée, pour obtenir une accumulation tissulaire compatible avec la technique de mesure et pour conduire à la manifestation de signes pathologiques caractéristiques de l'intoxication saturnine.

Ces lésions rénales, sous forme d'inclusions intranucléaires, seraient constituées de protéines (riches en groupements thiols, en acides aspartique et glutamique), de fer, de calcium, de phosphore et de glycogène ; leur taille varierait de 2 à 7 µm (Goyer, 1970 ; Haguenoer & Furon, 1982 ; Drotz & Lantz, 1996 ; Sanchez *et al.*, 2001). Selon Qu et collaborateurs (2002), cet emprisonnement du plomb serait un moyen de protection contre les effets toxiques du métal.

De telles lésions ont pu être observées, dans notre étude, chez les rats intoxiqués avec le métal, en absence d'hydroxyapatite, lorsque la concentration en plomb était supérieure à 7 $\mu g.g^{-1}$. Cette concentration minimale, conduisant à l'apparition d'inclusions intranucléaires, a également été observée dans les travaux d'Anders et collaborateurs (1982).

Par ailleurs, le traitement par l'hydroxyapatite, simultanément au plomb, s'est montré efficace pour éviter l'apparition de ces lésions, en abaissant les concentrations rénales en plomb à 1,1-2,4 $\mu g.g^{-1}$.

Un autre point intéressant de cette étude *in vivo* est l'absence de perturbation notable, au niveau de la distribution tissulaire de différents éléments essentiels (calcium, phosphore, fer, magnésium, cuivre, zinc) et en particulier au niveau du métabolisme phosphocalcique, que ce soit chez les animaux traités par l'hydroxyapatite seule, le plomb seul ou leur mélange. Ce résultat semble en accord avec la majorité des travaux antérieurs (Quarterman & Morrison, 1975 ; Hasan & Seth, 1981 ; Spickett & Bell, 1983 ; Flora *et al.*, 1989 ; Flora *et al.*, 1989 ; Flora & Tandon, 1990 ; Fullmer, 1990 ; Bogden *et al.*, 1992, 1995 ; Santos *et al.*, 1999 ; Patra *et al.*, 2001b). Seuls deux auteurs ont fait état d'une baisse de la concentration en calcium, en magnésium et en zinc dans certains tissus, suite à une intoxication au plomb (Flora *et al.*, 1991 ; Tandon *et al.*, 1997).

A notre connaissance, très peu de travaux ont été entrepris sur l'animal, dans le but d'évaluer l'absorption du plomb après réaction avec des phosphates, ayant conduit à la formation de pyromorphite. Citons une étude, réalisée sur des vers de terre, qui a montré une diminution partielle (- 30 %) de l'accumulation du plomb dans ces organismes vivants (Pearson *et al.*, 2000).

D'autres auteurs se sont intéressés à ce problème, par le biais d'essais *in vitro*, simulant certaines conditions rencontrées lors de la digestion gastro-intestinale des mammifères (pH, digestion enzymatique).
Ainsi, Zhang et collaborateurs (1998) ont soumis une suspension de sol, chargé en plomb et enrichi en apatite, à une variation de pH (2 à 7), à 37 °C. Cette élévation de pH a entraîné une diminution de la biodisponibilité du plomb plus marquées en présence d'apatite avec formation de pyromorphite.
D'autres auteurs ont simulé une digestion, tout d'abord gastrique (addition de pepsine), puis intestinale (ajout de bile et de pancréatine) (Ruby *et al.*, 1996). Selon la nature du sol et du phosphate utilisé (engrais, acide phosphorique, apatite naturelle), la diminution de la biodisponibilité du plomb variait de 5 à 60 %, avec, dans tous les cas, formation de pyromorphite (Hettiarachchi *et al.*, 2000, 2001 ; Yang *et al.*, 2001).

Enfin, il faut également mentionner l'intérêt porté à divers végétaux (chou rave, haricot, maïs, sorgho), plantés dans un sol chargé de plomb, en présence d'apatite synthétique ou naturelle. Selon l'espèce végétale et la quantité d'apatite apportée, la concentration en métal retrouvée dans les feuilles aurait diminué de 30 à 98 %. Toutefois, dans le cas de la bette, la présence d'apatite naturelle n'aurait entraîné aucune modification. Concernant les racines, les résultats sont plus controversés. Ainsi, si une diminution de 65 à 81 % a été constatée dans le cas du chou rave et du maïs, une élévation de l'accumulation en plomb a été observée pour le sorgho, lors d'un apport en phosphore supérieur à 3,2 $g.kg^{-1}$ de sol (Laperche *et al.*, 1997 ; Boisson *et al.*, 1999 ; Grcman *et al.*, 2001 ; Hettiarachchi & Pierzynski, 2002). Selon Laperche et collaborateurs (1997), la pyromorphite aurait été identifiée à la surface des racines.

Les résultats de cette étude *in vivo* permettent donc de conclure à l'efficacité de l'hydroxyapatite synthétique solide pour diminuer l'absorption gastro-intestinale de ce métal chez le rat, suite à une immobilisation partielle du plomb sous forme de pyromorphite.

Toutefois, afin de réduire le coût relatif à l'utilisation de ce composé (de l'ordre de 0,41 euros HT le gramme), une étude complémentaire a été engagée, dans le but de vérifier cette efficacité avec une apatite naturelle, présente en abondance dans certains pays et donc très bon marché.

ETUDE *IN VITRO* DE L'IMMOBILISATION DU PLOMB PAR L'APATITE NATURELLE

1) MATERIEL ET METHODE

Le protocole utilisé est identique à celui mis au point pour l'étude de l'hydroxyapatite synthétique, à savoir des essais physico-chimiques à l'aide de tubes Centrisart (SARTORIUS) et une analyse cristallographique par microscopie électronique à balayage et par diffraction aux rayons X.

Dans un premier temps l'immobilisation du plomb a été évaluée à l'aide de solutions contenant du plomb ($PbCl_2$) à 10 $mg.L^{-1}$ et de l'apatite naturelle (AN), à 0-100 mg.L-1, préalablement broyée (broyeur à boulets, RETSCH), pour augmenter la surface de contact.

Puis, d'autres métaux ont été testés à la concentration de 10 $mg.L^{-1}$, l'apatite naturelle broyée étant apportée à raison de 250 $mg.L^{-1}$, afin de reproduire le rapport massique ayant conduit à l'immobilisation complète du plomb (AN/Pb = 25).
Les métaux étudiés sont : cadmium ($CdCl_2$, PROLABO), nickel ($NiCl_2.6H_2O$, MERCK), manganèse ($MnCl_2.4H_2O$, FLUKA), zinc ($ZnCl_2$, MERCK) et cuivre ($CuCl_2.2H_2O$, MERCK).
Vingt-quatre heures après le mélange, les suspensions ont été ultrafiltrées dans des tubes Centrisart. Les essais ont été réalisés au pH naturel des suspensions, ainsi qu'à pH abaissé à 3 par ajout d'HCl.
L'analyse de la concentration en métal de l'ultrafiltrat a été faite par spectrométrie d'émission à plasma d'argon (SPECTRASPAN VII).

Tableau XXI : Caractéristiques spectrométriques des éléments dosés

Eléments	Longueurs d'onde	Zones de linéarité	Limites de détection
Cadmium	214,436 nm	50 $\mu g.L^{-1}$ à 300 $mg.L^{-1}$	5 $\mu g.L^{-1}$
Cuivre	324,754 nm	20 $\mu g.L^{-1}$ à 10 $mg.L^{-1}$	2 $\mu g.L^{-1}$
Manganèse	257,610 nm	30 $\mu g.L^{-1}$ à 100 $mg.L^{-1}$	3 $\mu g.L^{-1}$
Nickel	341,476 nm	20 $\mu g.L^{-1}$ à 100 $mg.L^{-1}$	2 $\mu g.L^{-1}$
Zinc	202,548 nm	60 $\mu g.L^{-1}$ à 600 $mg.L^{-1}$	6 $\mu g.L^{-1}$

2) RESULTATS

L'étude **physico-chimique** de la réaction du plomb aqueux et de l'apatite naturelle broyée nous a permis d'évaluer la capacité de rétention du plomb par cette apatite synthétique (tableau XXII).
Ainsi, au pH naturel du mélange et pour une même teneur en plomb, la concentration en métal dans l'ultrafiltrat diminue lorsque la quantité d'apatite apportée augmente. Dans le cas où le rapport massique AN/Pb est égal à 25, l'ultrafiltrat semble exempt de plomb. Par conséquent, la capacité de rétention en plomb a été estimée à 40 mg de Pb par g d'apatite.

Tableau XXII : Concentrations en plomb ($\mu g.L^{-1}$) dans l'ultrafiltrat de solutions de plomb (10 $mg.L^{-1}$), en présence de diverses concentrations d'apatite naturelle, au pH naturel ou ajusté.

Rapport AN/Pb	pH naturel	Concentrations en Pb	
		pH naturel	pH = 3
0	5,6	9978 ± 101	9976 ± 60
10	6,2	475 ± 71	3442 ± 131*
15	6,5	114 ± 3	3209 ± 62*
20	6,6	21 ± 13	3189 ± 90*
25	6,7	< limite de détection	3082 ± 422*
30	7,0	< limite de détection	2972 ± 57*
40	7,1	< limite de détection	2779 ± 49*
50	7,2	< limite de détection	1317 ± 92*
100	7,6	< limite de détection	1103 ± 115*

* comparaison pH naturel-pH = 3, $p < 0,01$

Tableau XXIII : Concentrations en métal ($\mu g.L^{-1}$) dans l'ultrafiltrat de solutions métalliques (10 $mg.L^{-1}$), en présence d'apatite naturelle, au rapport massique AN/métal = 25, au pH naturel ou ajusté.

Eléments	pH naturel	Concentrations en métal	
		pH naturel	pH = 3
Cd^{2+}	6,8	3651 ± 701	9894 ± 168*
Ni^{2+}	6,7	7967 ± 106	9971 ± 41*
Mn^{2+}	6,5	8072 ± 720	10090 ± 70*
Zn^{2+}	6,6	6630 ± 168	9547 ± 184*
Cu^{2+}	6,4	3629 ± 429	9395 ± 144*

* comparaison pH naturel-pH = 3, $p < 0,01$

En revanche, lorsque le pH du mélange est abaissé à 3, la quantité de plomb dosée dans l'ultrafiltrat est plus importante (de manière statistiquement significative). Cela signifie qu'une partie du plomb immobilisé par l'apatite au pH naturel s'est dissous, comme cela était le cas avec l'hydroxyapatite synthétique.

Par ailleurs, cette apatite naturelle s'est montrée capable de retenir d'autres métaux que le plomb, de manière plus ou moins efficace (tableau XXIII). Le classement de son affinité peut être décrit comme suit : cuivre (64 % de métal retenu) = cadmium (63 %) > zinc (34 %) > manganèse (20 %) = nickel (20 %).
En revanche, lorsque le pH du mélange est abaissé à 3, la quasi-totalité des métaux est présente dans l'ultrafiltrat.

L'analyse par **microscopie électronique à balayage** (MEB) et par diffraction aux rayons X de l'apatite naturelle seule et des précipités obtenus par la réaction entre l'apatite et le plomb aqueux, au pH voisin de 7, est illustrée par les figures 17 à 21.

Selon les images MEB, les grains d'apatite semblent se diviser en deux catégories, puisque de petits grains inférieurs à 100 µm se trouvent à la surface de grains plus gros, proches de 1 mm (figure 17). Cette hétérogénéité persiste après le broyage, les tailles étant respectivement réduites à quelques µm et 30-40 µm (figure 18 et 21).
Le profil cristallographique obtenu par diffraction aux rayons X met en évidence la présence de pics caractéristiques de l'hydroxyapatite (figure 19).
L'analyse EDS montre une composition atomique en calcium, phosphore et fluor proche d'une fluorapatite standard, ainsi que la présence de sodium et de silice, en impuretés.

L'image MEB des produits de la réaction de l'apatite naturelle broyée et du plomb (au rapport massique NA/Pb = 25) met en évidence quelques petits cristaux blancs, de forme hexagonale, répartis à la surface des grains d'apatite ; leur taille moyenne est inférieure à 5 µm (figures 20 et 21).
Le profil cristallographique obtenu par diffraction aux rayons X (figure 19) se révèle identique à celui de l'apatite naturelle seule, avec l'apparition d'un pic caractéristique de la pyromorphite.
L'analyse EDS révèle la présence de carbonate de plomb, correspondant aux cristaux blancs, ainsi que la présence de plomb à la surface des grains d'apatite.

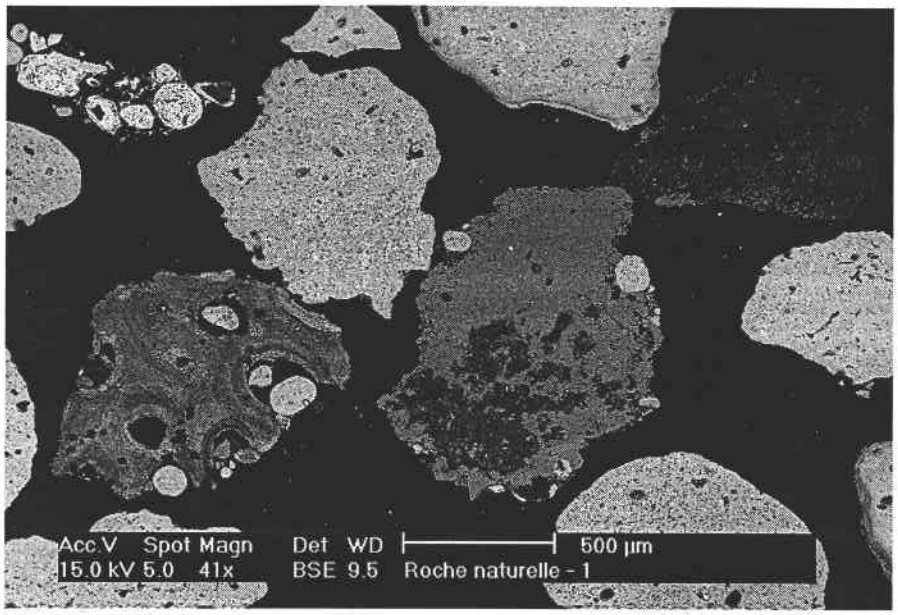


Figure 17 : Image au microscope électronique à balayage d'apatite naturelle.

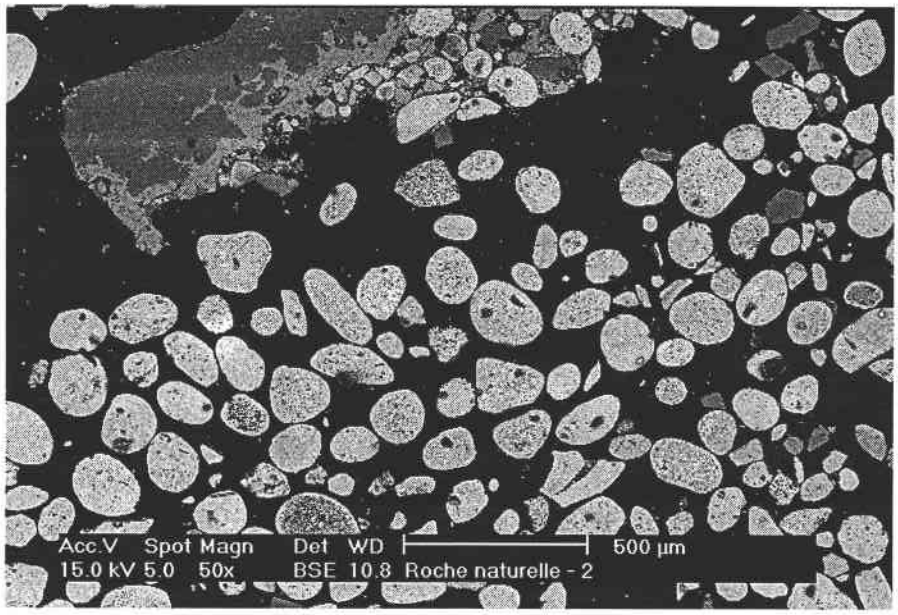


Figure 18 : Image au microscope électronique à balayage d'apatite naturelle broyée.

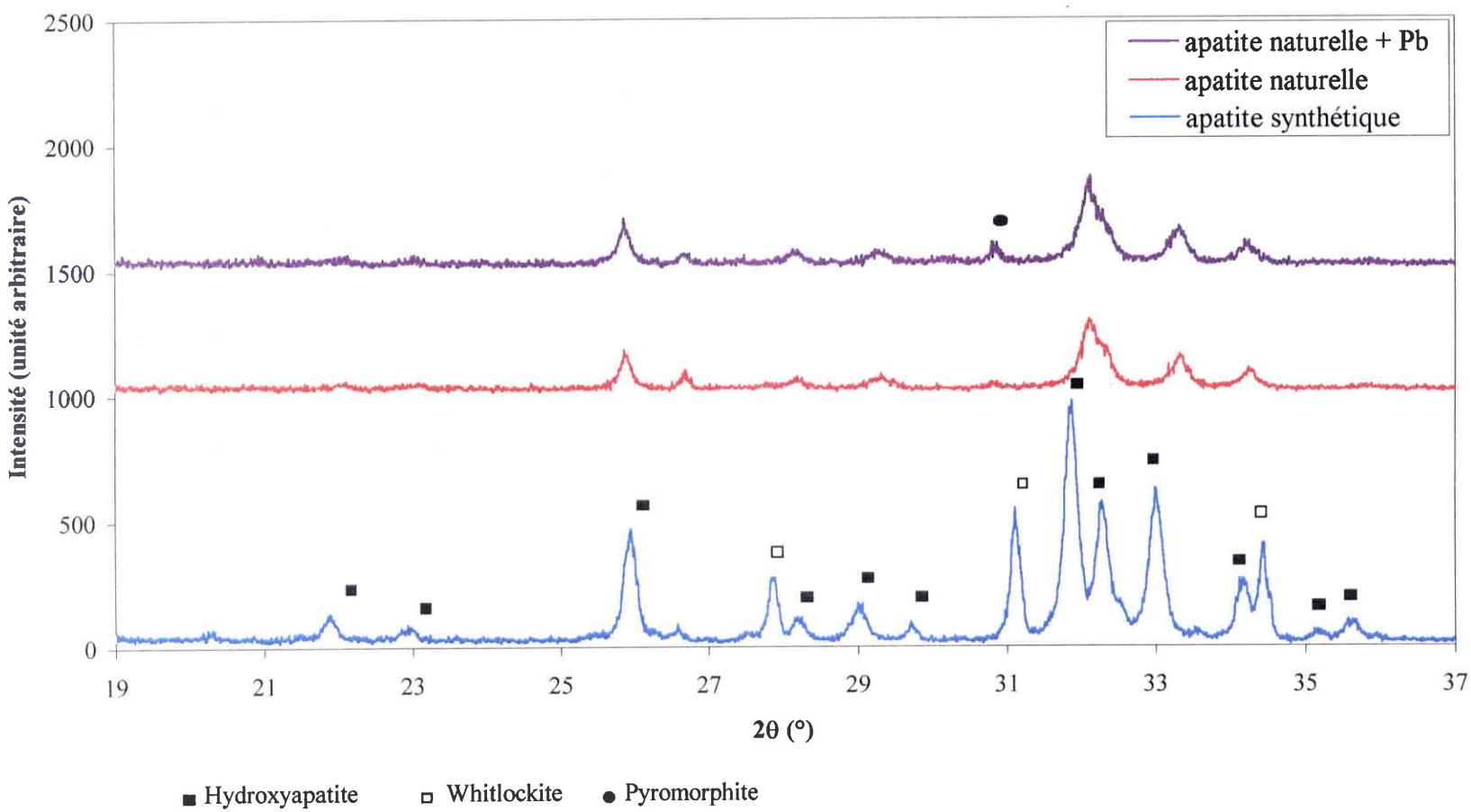


Figure 19 : Profils aux rayons X de l'hydroxyapatite synthétique, de l'apatite naturelle et des produits de la réaction entre l'apatite naturelle et le plomb

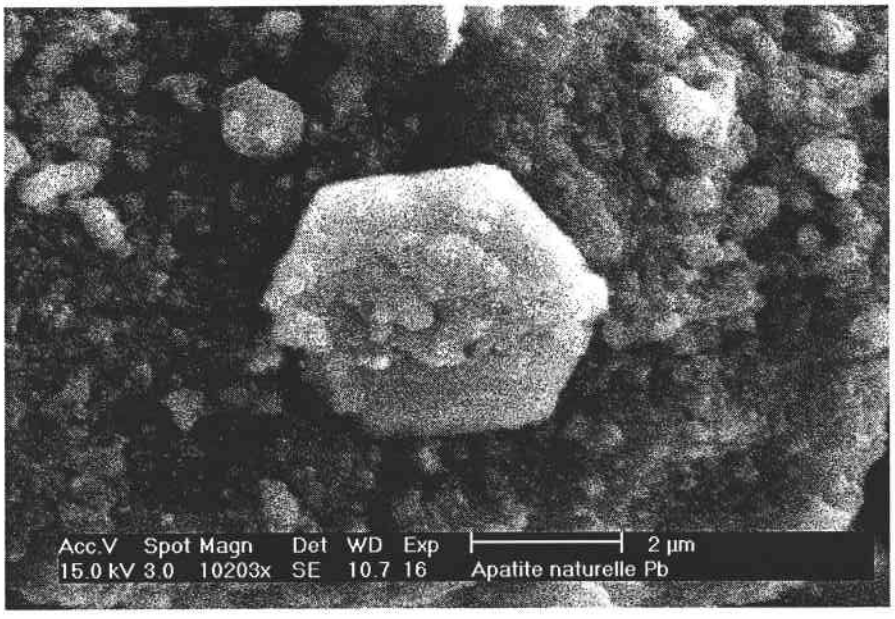


Figure 20 : Image au microscope électronique à balayage du produit de la réaction entre l'apatite naturelle broyée et le plomb aqueux, à fort grossissement.

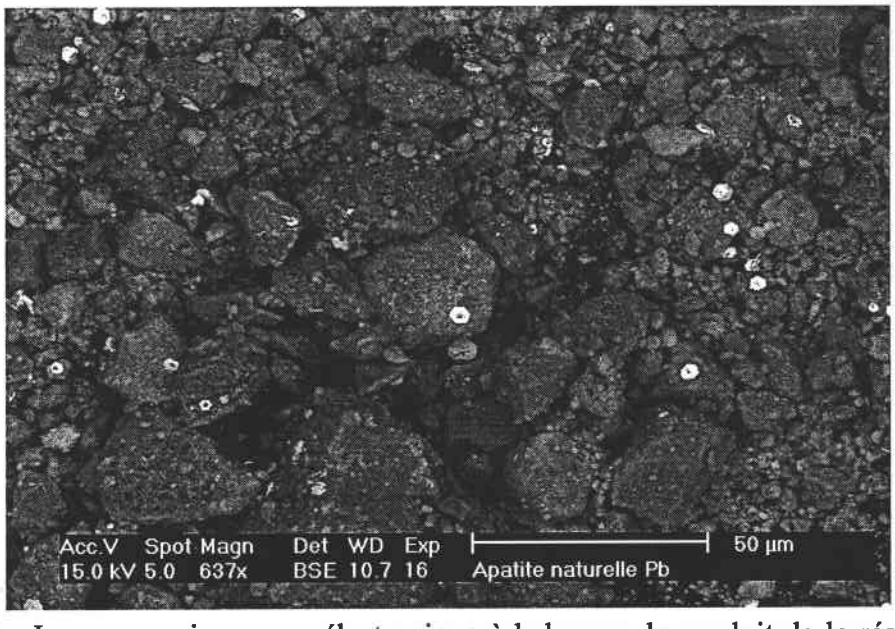


Figure 21 : Image au microscope électronique à balayage du produit de la réaction entre l'apatite naturelle broyée et le plomb aqueux, à faible grossissement.

3) DISCUSSION

Cette dernière étude avait pour objectif de vérifier, avec une apatite naturelle, l'efficacité de rétention du plomb, précédemment observée avec le composé synthétique.

Les essais entrepris avec divers rapports massiques entre le plomb et l'apatite (de 0 à 100) ont conduit à estimer sa capacité de rétention en plomb à 40 mg de Pb par g d'apatite broyée. Ce résultat est en accord avec les valeurs trouvées dans la littérature, concernant l'apatite naturelle (fluorapatite), qui s'étendent de 0,99 à 151 mg de plomb par g d'apatite (Ma *et al.*, 1995 ; Cheng *et al.*, 1997 ; Prasad *et al.*, 2000).
Elle est approximativement trois fois plus faible que celle de l'hydroxyapatite (HA) synthétique solide (111 mg de Pb par g de HA). Cette différence pourrait s'expliquer, en partie, par la taille des grains de ces deux apatites, puisque ceux d'HA ne dépassent pas 200 nm, tandis que ceux de l'apatite naturelle sont de l'ordre du micromètre. Or, la formation de pyromorphite, dans nos conditions expérimentales, serait basée sur un phénomène d'adsorption en surface, suivie d'un échange ionique entre Ca^{2+} et Pb^{2+}.

Les produits de la réaction, entre cette apatite naturelle et le plomb aqueux, comprennent de la pyromorphite, identifiée par diffraction aux rayons X, à hauteur de 70 %, pour les rapports massiques AN/Pb de 10 à 40, et de 90 % pour le rapport de 100, selon les essais physico-chimiques. Il se forme également des composés contenant du plomb, précipités au pH naturel du mélange, mais qui se solubilisent après acidification ; selon l'analyse cristallographique, il pourrait s'agir de carbonate de plomb.
Dans le cas du rapport massique NA/Pb de 25, qui permet l'immobilisation complète du plomb au pH naturel du mélange, la présence de ce composé n'a pu être mise en évidence par diffraction aux rayons X. Compte tenu des limites de détection de cette technique, le carbonate de plomb représenterait moins de 5 % de la masse totale de l'échantillon. Le restant (environ 25 %) pourrait correspondre à des phosphates de plomb amorphes, comme cela était le cas lors de la réaction entre l'hydroxyapatite synthétique solide et le plomb.

Par ailleurs, cette apatite naturelle s'est montrée plus ou moins efficace pour immobiliser d'autres éléments, tels que le cuivre, le cadmium, le zinc, le manganèse et le nickel. Le pourcentage de métal retenu varie de 20 % (Ni, Mn) à plus de 60 % (Cu, Cd), pour un rapport massique apatite/métal de 25.
A noter que la capacité de rétention pourrait être améliorée par un rapport massique apatite/métal plus élevé.

Par conséquent, l'affinité de l'apatite naturelle pour ces métaux est inférieure à celle du plomb. Les mécanismes mis en jeu dans la fixation de ces métaux étant probablement identiques à ceux plomb, cette différence pourrait s'expliquer, en partie, par la formation de composés plus solubles que la pyromorphite. En effet, comme dans le cas du plomb, les

auteurs sont partagés entre l'échange ionique et la dissolution de l'apatite, suivie par la précipitation des métaux sous une forme amorphe (Suzuki *et al.*, 1981, 1982 ; Takeuchi & Arai, 1990 ; Ingram *et al.*, 1992 ; Jeanjean *et al.*, 1994, 1996 ; Ma *et al.*, 1994b ; Xu *et al.*, 1994 ; Reichert & Binner, 1996 ; Chen *et al.*, 1997 ; Valsami-Jones *et al.*, 1998 ; Wakamura *et al.*, 1998 ; Shashkova *et al.*, 1999 ; Mc Grellis *et al.*, 2001 ; Da Rocha *et al.*, 2002).

D'autres métaux, tels que l'aluminium, le chrome ou le fer III, pouvant également être présents dans les eaux résiduelles, n'ont pas été testés dans cette étude, en raison de leurs propriétés physico-chimiques. Effectivement, au pH de la solution en présence d'apatite naturelle, des précipités de métaux sous forme d'hydroxydes sont susceptibles de se former, parallèlement à une fixation sur l'apatite, nécessitant des études approfondies de différenciation, qui pourraient faire l'objet d'un travail de recherche ultérieur.

CONCLUSION GENERALE

Dans le but de diminuer la concentration en plomb de l'eau de distribution, au niveau du robinet du consommateur à l'aide d'une cartouche de filtration, mais également dans les eaux résiduelles, notamment des pays en voie de développement qui ne sont pas équipés de station d'épuration, ce travail de recherche s'est proposé d'étudier un composé très bon marché, susceptible de retenir le plomb.

Notre choix s'est porté sur l'apatite, en raison de sa capacité à fixer les métaux, tant dans les sols que dans le tissus osseux. De surcroît, le produit de sa réaction avec le plomb, la pyromorphite, s'avère pratiquement insoluble, dans les conditions physico-chimiques de l'eau de distribution. Un autre avantage de ce composé est son abondance naturelle dans certains pays.
Les premiers essais expérimentaux ont porté sur une forme synthétique de l'apatite, pour une question de reproductibilité et de facilité d'approvisionnement.

Les mécanismes mis en jeu dans la formation de pyromorphite, à partir de la réaction entre l'apatite et le plomb, ne sont pas encore clairement définis. Ainsi, une première théorie implique la dissolution de l'apatite, suivie de la précipitation de pyromorphite, après réaction du plomb avec les phosphates ainsi libérés. Tandis qu'une seconde théorie repose sur l'apatite solide, avec remplacement partiel du calcium par le plomb, par échange ionique.

Afin d'approfondir les mécanismes de formation de la pyromorphite, nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, à l'apatite dissoute.
Cependant, nos conditions expérimentales *in vitro*, n'ont pas conduit à la formation de pyromorphite, mais à des phosphates de plomb de composition différente, qui se sont solubilisés lors de l'acidification de la solution.
Par ailleurs, l'absorption du plomb se faisant principalement au niveau duodénal (pH voisin de 3-4), nous avons pu confirmer, au travers d'une étude de perfusion *in situ* de l'intestin grêle de rat, que l'apatite dissoute ne permettait pas de diminuer la biodisponibilité du métal.

L'utilisation d'apatite solide a permis d'obtenir de la pyromorphite, selon un mécanisme essentiellement basé sur un échange ionique, entre les ions Ca^{2+} et les ions Pb^{2+}. Cette réaction s'accompagne d'une dissolution partielle de l'apatite, d'autant plus importante que le pH du milieu est bas et le rapport HA/Pb petit, conduisant à la formation d'autres phosphates de plomb, en faible proportion. Ces composés pourraient se solubiliser dans le tractus gastro-intestinal, compte tenu des conditions de pH, et ainsi libérer du plomb, susceptible d'être absorbé dans l'intestin grêle.

L'efficacité de l'apatite solide à immobiliser le plomb a été confirmée, par une approche *in vivo* (traitement oral de rats par gavage, durant 31 jours), un rapport massique HA/Pb de 10 (pH = 7,2) ayant conduit à une diminution de l'accumulation tissulaire en métal de 60 %.

A noter qu'une élévation du rapport HA/Pb, dans les essais *in vitro*, a permis d'augmenter la quantité de plomb précipitée sous forme de pyromorphite et donc non biodisponible (84 % au rapport massique HA/Pb de 10, 98 % au rapport de 1000). Toutefois, un tel protocole n'était pas réalisable, dans nos conditions expérimentales de gavage par intubation gastrique de rats.

Pour conclure ce travail de recherche, nous nous sommes intéressés, au travers d'une étude physico-chimique, à l'immobilisation du plomb par une apatite naturelle (fluorapatite), provenant des mines de Sfax (Tunisie), afin d'abaisser le prix de revient de ce traitement. En effet, le coût d'une apatite de synthèse n'est pas négligeable, tandis que l'apatite naturelle est présente en abondance dans certains pays et donc très bon marché.
Les résultats obtenus *in vitro* sont encourageants, même si la capacité de rétention du plomb est trois fois plus faible que celle obtenue avec la forme synthétique. En effet, il sera facile de pallier à cette différence, dans la mesure où cette apatite peut être utilisée en grande quantité, dans le cadre de l'épuration des eaux résiduelles.

Quant à l'incorporation de ce composé dans la réalisation d'une cartouche, le respect de la concentration maximale admissible de 10 $\mu g.L^{-1}$ ne pourra être garanti qu'en complément d'un traitement anti-corrosion, qui limite déjà la teneur en métal dans l'eau de distribution.
Le plomb étant immobilisé principalement sous forme de pyromorphite, les risques d'intoxication seront très faibles, en cas d'ingestion accidentelle de particules relarguées par la cartouche.

Enfin, si l'apatite a été sélectionnée dans cette étude en raison de son affinité particulière pour le plomb, elle n'est pas spécifique à cet élément. En effet, elle est également capable de retenir d'autres métaux, qui peuvent se révéler toxiques lorsqu'ils sont présents en fortes concentrations dans les eaux résiduelles, tels que le cuivre, le cadmium, le zinc, le manganèse et le nickel.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

1. ABOUL-ELA E.I., 2002, The protective effect of calcium against genotoxicity of lead acetate administration on bone marrow and spermatocyte cells of mice *in vivo*, *Mutation Research* **516** (1-2): 1-9.
2. ALEXANDER F.W., 1972, The uptake and excretion by children of lead and other contaminants, In: *Environmental Health Aspects of Lead: Proceedings of an International Symposium, Commission of the European Communities*, BARTH D., BERTIN A., ENGEL R., RECHT P. & SMEETS J. (eds.), October 1972, Luxembourg, p. 319-331.
3. ALHAZZA I.M., 1999, Protective effect of vitamin C against lead toxicity of the reproductive system of male rats, *Arab Gulf Journal of Scientific Research* **17** (3): 396-410.
4. AL-MALACK M.H., 2001, Migration of lead from unplasticized polyvinyl chloride pipes, *Journal of Hazardous Materials B* **82**: 263-274.
5. AMITAI Y., KATZ D., LIFSHITZ M., GOFIN R., TEPFERBERG M. & ALMOG S., 1999, Prenatal lead exposure in Israel: an international comparison, *Israel Medical Association Journal* **1** (4): 250-253.
6. ANDERS E., BAGNELL C.R., KRIGMAN M.R. & MUSHAK P., 1982, Influence of dietary protein composition on lead absorption in rats, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **28** (1): 61-67.
7. APOSTOLI P., KISS P., PORRU S., BONDE J.P., VANHOORNE M. & the ASCLEPIOS study group, 1998, Male reproductive toxicity of lead in animals and humans, *Occupational and Environmental Medicine,* **55**: 364-374.
8. APOSTOLI A., BAJ A., BAVAZZANO P., GANZI A., NERI G., RONCHI A., SOLEO L., DI LORENZO L., SPINELLI P., VALENTE T. & MINOIA C., 2002, Blood lead reference values: the results of an Italian polycentric study, *The Science of the Total Environment* **287** (1-2): 1-11.
9. ARNICH N., LANHERS M.C., CUNAT L., JOYEUX M. & BURNEL D., 2000, Nickel absorption and distribution from rat small intestine *in situ*, *Biological Trace Element Research* **74** (2): 141-151.
10. AUNGST B.J. & FUNG H.L., 1981, Kinetic characterization of *in vitro* lead transport across the rat small intestine, *Toxicology and Applied Pharmacology* **61**:39-47.
11. AUNGST B.J. & FUNG H.L., 1983, Inhibition of oral lead absorption in rats by phosphate-containing products, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **72** (4): 345-348.
12. AUNGST B.J. & FUNG H.L., 1985, The effects of dietary calcium on lead absorption, distribution, and elimination kinetics in rats, *Journal of Toxicology and Environmental Health* **16**: 147-159.
13. AUNGST B.J., DOLCE J.A. & FUNG H.L., 1981, The effect of dose on the disposition of lead in rats after intravenous and oral administration, *Toxicology and Applied Pharmacology* **61**:48-57.
14. AWAD L., HUEL G., LAZAR P. & BOUDENE C., 1981, Facteurs de variation interindividuelle de la plombémie, *Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique* **29** (2): 113-124.
15. AZCONA-CRUZ M.I., ROTHENBERG S.J., SCHNAAS L., ZAMORA-MUNOZ J.S. & ROMERO-PLACERES M., 2000, Lead-glazed ceramic ware and blood lead levels of children in the city of Oaxaca, Mexico, *Archives of Environmental Health* **55** (3): 217-222.

B

16. BÆCKLUND M., PEDERSEN N.L., BJÖRKMAN L. & VAHTER M., 1999, Variation in blood concentrations of cadmium and lead in the elderly, *Environmental Research* **80**: 222-230.

17. BANKOWSKA J. & HINE C., 1985, Retention of lead in the rat, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **14**: 621-629.
18. BARLTROP D. & MEEK F., 1975, Absorption of different lead compounds, *Postgraduate Medical Journal* **51**: 805-809.
19. BARON J., 1997, La mesure du plomb au robinet de l'usager. Etude des méthodes d'échantillonnage, *Techniques Sciences Méthodes* **5**: 47-54.
20. BARON J., 2000, Stratégie d'échantillonnage pour le contrôle du plomb dans l'eau au robinet du consommateur, *Techniques Sciences Méthodes* **6**: 106-120.
21. BARON J. & LEROY P., 2001, Impact de la qualité de l'eau et de la longueur du réseau sur la concentration en plomb au robinet de l'utilisateur, *Techniques Sciences Méthodes* **1** : 27-34.
22. BASTA N.T., GRADWOHL R., SNETHEN K.L. & SCHROEDER J.L., 2001, Chemical immobilization of lead, zinc, and cadmium in smelter-contaminated soils using biosolids and rock phosphate, *Journal of Environmental Quality* **30** (4): 1222-1230.
23. BATRA N., NEHRU B. & BANSAL M.P., 1998, The effect of zinc supplementation on the effects of lead on the rat testis, *Reproductive Toxicology* **12** (5): 535-540.
24. BATRA N., NEHRU B. & BANSAL M.P., 2001, Influence of lead and zinc on rat male reproduction at "biochemical and histopathological levels", *Journal of Applied Toxicology* **21** (6): 507-512.
25. BARLTROP D. & KHOO H.E., 1976, The influence of dietary minerals and fat on the absorption of lead, *The Science of the Total Environment* **6** (3): 265-273.
26. BARTLETT R.S., ROUSSEAU J. E., FRIER H.I. & HALL R.C., 1974, Effect of vitamin E on δ-aminolevulinic acid dehydratase activity in weanling rabbits with chronic plumbism, *Journal of Nutrition* **104**: 1637-1645.
27. BARTON J.C., 1984, Active transport of lead-210 by everted segments of rat duodenum, *American Journal of Physiology* **247**: 193-198.
28. BARTON J.C., 1989, Retention of radiolead by human erythrocytes *in vitro*, *Toxicology and Applied Pharmacology* **99**: 314-322.
29. BARTON J.C.& CONRAD M.E., 1981, Effect of phosphate on the absorption and retention of lead in rat, *American Journal of Clinical Nutrition* **34**: 2192-2198.
30. BARTON J.C., CONRAD M.E., HARRISON L. & NUBY S., 1978a, Effects of calcium on the absorption and retention of lead, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **91**: 366-376.
31. BARTON J.C., CONRAD M.E., NUBY S. & HARRISON L., 1978b, Effects of iron on the absorption and retention of lead, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **92** (4): 536-547.
32. BARTON J.C., CONRAD M.E., HARRISON L. & NUBY S., 1980, Effects of vitamin D on the absorption and retention of lead, *American Journal of Physiology* **238**: 124-130.
33. BAYLY G.R., BRAITHWAITE R.A., SHEEHAN T.M.T., DYER N.H., GRIMLEY C. & FERNER R.E., 1995, Lead poisoning from Asian traditional remedies in the West Midlands- report of a series of five cases, *Human and Experimental Toxicology* **14** (1): 24-28.
34. BEACH J.R. & HENNING S.J., 1988, The distribution of lead in milk and the fate of milk lead in the gastrointestinal tract of suckling rats, *Pediatric Research* **23**: 58-62.
35. BELL R.R. & SPICKET J.T., 1981, The influence of milk in the diet on the toxicity of orally ingested lead in rats, *Food and Cosmetics Toxicology* **19**: 429-436.
36. BELLINGER D.C., STILES K.M. & NEEDLEMAN H.L., 1992, Low-level lead exposure, intelligence and academic achievement: a long-term follow-up study, *Pediatrics* **90** (6): 855-861.
37. BERGDHAL I.A., SHEVELEVA M., SCHÜTZ A., ARTAMONOVA V.G. & SKERFVING S., 1998, Plasma and blood lead in humans: capacity-limited binding to δ-

aminolevulinic acid dehydratase and other lead-binding components, *Toxicological Sciences* **46** (2): 247-253.

38. BERGDHAL I.A., VAHTER M., COUNTER S.A., SCHÜTZ A., BUCHANAN L.H., ORTEGA F., LAURELL G. & SKERFVING S., 1999, Lead in plasma and whole blood from lead-exposed children, *Environmental Research* **80**: 25-33.
39. BIEGO G.H.M.A., 1999, *Estimation de l'apport en éléments minéraux des aliments et migration de micropolluants métalliques et organiques du fer-blanc vernis ou non : approches toxicologiques*, Thèse de doctorat en Biologie et Santé, Université Henri Poincaré, Nancy I, 249 p.
40. BLAIR J.A., COLEMAN I.P.L. & HILBURN M.E., 1979, The transport of the lead cation across the intestinal membrane, *Journal of Physiology* **286**: 343-350.
41. BLAKE K.C.H., 1976, Absorption of ^{203}Pb from gastrointestinal tract of man, *Environmental Research* **11**: 1-4.
42. BLAKE K.C.H., BARBEZAT G.O. & MANN M., 1983, Effect of dietary constituents on the gastrointestinal absorption of ^{203}Pb in man, *Environmental Research* **30**: 182-187.
43. BLAKE K.C.H. & MANN M., 1983, Effect of calcium and phosphorus on the gastrointestinal absorption of ^{203}Pb in man, *Environmental Research* **30**: 188-194.
44. BOGDEN J.D., GERTNER S.B., CHRISTAKOS S., KEMP F.W., YANG Z., KATZ S.R. & CHU C., 1992, Dietary calcium modifies concentrations of lead and other metals and renal calbindin in rats, *Journal of Nutrition* **122**: 1351-1360.
45. BOGDEN J.D., KEMP F.W., HANS S., MURPHY M., FRAIMAN M., CZERNIACH D., FLYNN C.J., BANUA M.L., SCIMONE A., CASTROVILLY L. & GERTNER S.B., 1995, Dietary calcium and lead interact to modify maternal blood pressure, erythropoiesis, and fetal and neonatal growth in rats during pregnancy and lactation, *Journal of Nutrition* **125**: 990-1002.
46. BOGDEN J.D., OLESKE J.M. & LOURIA D.B., 1997, Lead poisoning. One approach to a problem that won't go away, *Environmental Health Perspectives* **105**: 1284-1287.
47. BOIREAU A., 1997, Impact de la nouvelle directive européenne sur les branchements en plomb, In: Journée d'information du 20 Novembre 1997 "Conformité sanitaire des matériaux des installations publiques de distribution d'eau destinée à la consommation humaine", aghtm.
48. BOIREAU A. & PHILIPPE J.F., 2001, Panorama des techniques disponibles pour le remplacement ou la réhabilitation des conduites en plomb, *Techniques Sciences Méthodes* **1** : 49-54.
49. BOIREAU A., BENEZET- TOULZE M., RANDON G. & CAVARD J., 1997, Limitation de la solubilisation du plomb par ajout de produit filmogène. Transposition d'une étude sur pilote à un réseau réel, *Techniques Sciences Méthodes* **5**: 63-72.
50. BOIREAU A., PHILIPPE J.F. & MARTIEL P., 2001, Le plomb à l'intérieur des logements : diagnostic et techniques nouvelles, *Techniques Sciences Méthodes* **1** : 55-58.
51. BOISSON J., RUTTENS A., MENCH M. & VANGRONSVELD J., 1999, Evaluation of hydroxyapatite as a metal immobilizing soil additive for the remediation of polluted soils, Part I, Influence of hydroxyapatite on metal exchangeability in soil, plant growth and plant metal accumulation, *Environmental Pollution* **104** (2): 225-233.
52. BOIVIN M.J. & GIORDANI B., 1995, A risk evaluation of the neuropsychological effects of childhood lead toxicology, *Developmental Neuropsychology* **11** (2): 157-180.
53. BOLGER P.M., YESS N.J., GUNDERSSON E.L., TROXELL T.C. & CARRINGTON C.D., 1996, Identification and reduction of sources of dietary lead in the United States, *Food Additives and Contaminants* **13** (1): 53-60.
54. BONNEFOY X., HUEL G. & GUEGUEN R., 1985, Variation de la plombémie en fonction de la contamination par le plomb de l'eau livrée à la consommation, *Water Research* **19** (10): 1299-1303.

55. BOST L., PRIMATESTA P., DONG W. & POULTER N., 1999, Blood lead and blood pressure: evidence from the Health Survey for England 1995, *Journal of Human Hypertension* **13**: 123-128.
56. BOTHE J.V. & BROWN P.W., 2000, Apatite formation in the $CaO-PbO-P_2O_2-H_2O$ system at 23 ° ± 1 °C, *Journal of the American Ceramic Society* **83** (3): 612-616.
57. BRODSKY A.B., 1978, Physical science and engineering data, *Handbook of radiation measurement and protection*, section A, volume I, CRC Press, Inc. West Palm Beach, 693 p.
58. BRODY D.J., PIRKLE J.L., KRAMER R.A., FLEGAL K.M., MATTE T.D., GUNTER E.W. & PASCHAL D.C., 1994, Blood lead levels in the US population. Phase 1 of the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III, 1988 to 1991), *The Journal of the American Medical Association* **272** (4): 277-283.
59. BROWN M.J., HU H., GONZALES-COSSIO T., PETERSON K.E., SANUN L.H., KAGEYAMAM.D., PALAZUELOS E., ARO A., SCHNAAS L. & HERNANDEZ-AVILA M., 2000, Determinants of bone and blood lead concentrations in the early postpartum period, *Occupational and Environmental Medicine* **57** (8): 535-541.
60. BUSHNELL P.J. & DELUCAT H.F., 1981, Lactose facilitates the intestinal absorption of lead in weanling rats, *Science* **211**: 61-63.
61. BUSHNELL P.J. & DELUCAT H.F., 1983, The effects of lactose on the absorption and retention of dietary lead, *Journal of Nutrition* **113**: 365-378.

C

62. CABRIDENC R, CARBONNIER F., CORDONNIER J., LEGENTI L.& RIZET M., 1994, Le plomb dans l'environnement, *Techniques Sciences Méthodes* **2**: 64-69.
63. CAKE K.M., BOCOINS R.J., VAILLANCOURT C., GORDON C.L., McNUTT R.H., LAPORTE R., WEBBER C.E. & CHETTLE D.R., 1996, Partition of circulating lead between serum and red cells is different for internal and external sources of lead, *American Journal of Industrial Medicine* **29**: 440-445.
64. CAMPAGNA D., HUEL G., GIRARD F., SAHUQUILLO J. & BLOT P., 1999, Environmental lead exposure and activity of ∂-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) in maternal and cord blood, *Toxicology* **134**: 143-152.
65. CAMPAGNA D., HUEL G., HELLIER G., GIRARD F., SAHUQUILLO J., FAGOT-CAMPAGNA D., GODIN J. & BLOT P., 2000, Negative relationships between erythrocyte Ca-pump activity and lead levels in mothers and newborns, *Life Science* **68**: 203-215.
66. CARDENAS-BUSTAMANTE O., VARONA-URIBE M.E., NUNEZ-TRUJILLO S.M., ORTIZ-VARON J.E. & PENA-PARRA G.E., 2001, Correlation of zinc protoporphyrine with blood lead levels in car battery industry workers in Bogota, Colombia, *Salud Publica de Mexico* **43** (3): 203-210.
67. CARRINGTON C.D. & BOLGER M.P., 1992, An assessment of the hazards of lead in food, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **16**: 265-272.
68. CARRINGTON C.D., SHEEHAN D.M. & BOLGER M.P., 1993, Hazard assessment of lead, *Food Additives and Contaminants* **10** (3): 325-335.
69. CAVALLERI A., MINOIA C., POZZOLI L. & BARUFFINI A., 1978, Determination of plasma lead levels in normal subjects and in lead-exposed workers, *British Journal of Industrial Medicine* **35**: 21-26.
70. CERKLEWSKI F.L., 1983, Influence of maternal magnesium deficiency on tissue lead content of rats, *Journal of Nutrition* **113**: 1443-1447.
71. CERKLEWSKI F.L., 1984, Postabsorptive effect of increased dietary zinc on toxicity and removal of tissue lead in rats, *Journal of Nutrition* **114**: 550-554.
72. CERKLEWSKI F.L. & FORBES R.M., 1976a, Influence of dietary zinc on lead toxicity in the rat, *Journal of Nutrition* **106**: 689-696.

73. CERKLEWSKI F.L. & FORBES R.M., 1976b, Influence of dietary selenium on lead toxicity in the rat, *Journal of Nutrition* **106**: 778-783.
74. CERKLEWSKI F.L. & FORBES R.M., 1977, Influence of dietary copper on lead toxicity in the young male rat, *Journal of Nutrition* **107**: 143-146.
75. CHANG H.R., CHEN S.S., CHEN T.J., HO C.K., CHIANG H.C. & YU H.S., 1996, Lymphocyte β_2-adrenergic receptors and plasma catecholamine levels in lead-exposed workers, *Toxicology and Applied Pharmacology* **139**: 1-5.
76. CHEN X., WRIGHT J.V., CONCA J.L. & PEURRUNG L.M., 1997, Effects of pH on heavy metal sorption on mineral apatite, *Environmental Science & Technology* **31** (3): 624-631.
77. CHENG Y., WILLETT W.C., SCHWARTZ J., SPARROW D., WEISS S. & HU H., 1998, Relation of nutrition to bone lead and blood lead levels in middle-aged to elderly men, *American Journal of Epidemiology* **147** (2): 1162-1174.
78. CHENG Y., SCHWARTZ J., SPARROW D., ARO A., WEISS S.T. & HU H., 2001, Bone lead and blood lead levels in relation to baseline blood pressure and the prospective development of hypertension, *American Journal of Epidemiology* **153** (2): 164-171.
79. CHEW L.T., BRADLEY D.A., AMIN YUSOFF MOHD & MAAH MOHD JAMIL, 2000, Zinc, lead and copper in human teeth measured by induced coupled argon plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES), *Applied Radiation and Isotopes* **53**: 633-638.
80. CHISOLM J.J., 2000, Safety and efficacy of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) in children with elevated blood lead concentrations, *Journal of Clinical Toxicology* **38** (4): 365-375.
81. CHRISTENSEN J.M. & KRISTIANSEN J., 1994, Lead, **in** *Handbook on metals in clinical and analytical chemistry,* chap. 35, Sieler H.G., Sigel A. & Sigel H. eds, Marcel Dekker Inc, New York, pp 425-440.
82. CHU N.F., LIOU S.H., WU T.N. & CHANG P.Y., 1999, Reappraisal of the relation between blood lead concentration and blood pressure among the general population in Taiwan, *Occupational and Environmental Medicine* **56** (1): 30-33.
83. CHURCH H.J., DAY J.P., BRAITHWAITE R.A. & BROWN S.S., 1993, Binding of lead to a metallothionein-like protein in human erythrocytes, *Journal of Inorganic Biochemistry* **49**: 55-68.
84. CIKRT M. & TICHY M., 1975, Role of bile in intestinal absorption of ^{203}Pb in rats, *Experiencia* **31** (11): 1320-1321.
85. CONRAD M.E., UMBREIT J.N., MOORE E.G. & RODNING C.R., 1992, Newly identified iron-binding protein in human duodenal mucosa, *Blood* **79** (1): 244-247.
86. CONRAD M.E. & BARTON J.C., 1978, Factors affecting the absorption and excretion of lead in the rat, *Gastroenterology* **74**: 731-740.
87. CORDONNIER J., 1997, Protection des réseaux de distribution par les inhibiteurs de corrosion. Choix et optimisation, *Techniques Sciences Méthodes* **5**: 75-82.
88. CORDONNIER J. & BOIREAU A., 2001, Possibilités de réduction des teneurs en plomb offertes par un traitement complémentaire de l'eau, *Techniques Sciences Méthodes* **1**: 41-48.
89. CRAMER K., GOYER R.A., JAGENBURG R. & WILSON M.H., 1974, Renal ultrastructure, renal function, and parameters of lead toxicity in workers with different period of lead exposure, *British Journal of Industrial Medicine* **31** (2): 113-127.
90. CREMIN J.D., LUCK M.L., LAUGHLIN N.K. & SMITH D.R., 1999, Efficacy of succimer chelation for reducing brain lead in a primate model of human lead exposure, *Toxicology and Applied Pharmacology* **161** (3): 283-293.
91. CROWE A. & MORGAN E.H., 1996, Interaction between tissue uptake of lead and iron in normal and iron-deficient rats during development, *Biological Trace Element Research* **52** (3): 249-261.

92. CUNAT L., LANHERS M.C., JOYEUX M. & BURNEL D., 2000, Bioavailability and intestinal absorption of aluminium in rats : effects of aluminium compounds and some dietary constituents, *Biological Trace Element Research* **76** (1): 31-55.

93. CZÁKY T.Z., 1984, Intestinal absorption of xenobiotics, Chapter 18, *Handbook of Experimental Pharmacology* **70** (Part II): 1-30.

D

94. DALLEY J.W., GUNTA P.K. & HUNG C.T., 1990, A physiological pharmacokinetic model discribing the disposition of lead in the absence or presence of L-ascorbic acid in rats, *Toxicology Letters* **50**: 337-348.

95. DARNELL J., CODISH H. & BALTIMORE D., 1988, La membrane plasmique, In: La cellule. Biologie moléculaire, Vigot ed, Paris, chap 14: p 600-612.

96. DA ROCHA N.C.C., DE CAMPOS R.C., ROSSI A.M., MOREIRA E.L., BARBOSA A.D.F. & MOURE G.T., 2002, Cadmium uptake by hydroxyapatite synthetised in different conditions and submitted to thermal treatment, *Environmental Science and Technology* **36** (7): 1630-1635.

97. DAWSON E.B., EVANS D.R., HARRIS W.A., TETER M.C. & Mc GANITY W.J., 1999, The effect of ascorbic acid supplementation on the blood lead levels of smokers, *journal of the American College of Nutrition* **18** (2): 166-170.

98. DECLOÎTRE F., 1998, La part des différents aliments dans l'exposition au plomb, au cadmium et au mercure en France, *Cahier de Nutrition et de Diététique* **33** (3): 167-175.

99. DEKANEY C.M., HARRIS E.D., BRATTON G.R. & JAEGER L.A., 1997, Lead transport in IEC-6 intestinal epithelial cells, *Biological Trace Element Research* **58** (1-2): 13-24.

100. DeLUCA J., HARDY C.A., BURRIGHT R.G., DONOVICK P.J. & TUGGY R.L., 1982, The effects of dietary fat and lead ingestion on blood lead levels in mice, *Journal of Toxicology and Environmental Health* **10**: 441-447.

101. DESILVA P.E., 1981, Determination of lead in plasma and studies on its relationships to lead in erythrocytes, *British Journal of Industrial Medicine* **38**: 209-217.

102. DESJARDINS R. & LANDRY D., 1990, Le contrôle du plomb dans l'eau potable, *Techniques Sciences Méthodes- L'eau* **4**: 189-193.

103. DEVI K.D., BANU B.S., GROVER P. & JAMIL K., 2000, Genotoxic effect of lead nitrate on mice using SCGE (comet assay), *Toxicology* **145** (2-3): 195-201.

104. DEVRIES I., SPAANS E., Van DIJK A. & MEULENBELT J., 1998, Lead toxicokinetics. Development of a biokinetic model to understand and predict the outcome of treatment, *Przeglad Lekarski* **55** (10): 500-504.

105. DHAWAN M., KACHRU D.N. & TANDON S.K., 1988, Influence of thiamine and ascorbic acid supplementation on the antidotal efficacy of thiol chelators in experimental lead intoxication, *Archives of Toxicology* **62** (4): 301-304.

106. DHAWAN M., FLORA S.J.S. & TANDON S.K., 1989, Preventive and therapeutic role of vitamin E in chronic plumbism, *Biomedical and Environmental Sciences* **2**: 335-340.

107. DIETER M.P., MATTHEWS H.B., JEFFCOAT R.A. & MOSEMAN R.F., 1993, Comparison of lead bioavailability in F344 rats fed lead acetate, lead oxide, lead sulfide or lead ore concentrate from Skagway, Alaska, *Journal of Toxicology and Environmental Health* **39**: 79-93.

108. DING Y., GONICK H.C., VAZIRI N.D., LIANG K. & WEI L., 2001, Lead-induced hypertension III: increased hydroxyl radical production, *American Journal of Hypertension* **14** (2): 169-173.

109. DIRECTION GENERALE DE LA SANTE, 1993, *Intoxication par le plomb chez l'enfant*, Rapport du groupe de travail sur le saturnisme infantile, Commission de Toxicovigilance, Ministère des Affaires Sociales, de la Santé et de la ville, Paris, 101 p.

110. DIRECTION GENERALE DE LA SANTE, 1995, *La diagonale des métaux, Etude sur la teneur en métaux dans l'alimentation*, Paris.

111. DROTZ D. & LANTZ B., 1996, *La biopsie rénale*, édition INSERM, Paris, 605 p.

112. DUC M., 1996, Le saturnisme de l'homme, le point de vue du clinicien, In Morlot M., *Aspects analytiques du plomb dans l'environnement*, Lavoisier, Technique & Documentation, Paris, p. 17-25.

E

113. EDELSTEIN S., FULLMER C.S. & WASSERMAN R.H., 1984, Gastrointestinal absorption of lead in chicks: involvement of the cholecalciferol endocrine system, *Journal of Nutrition* **114**: 692-700.

114. EL FEKI H., NADDARI T., SAVARIAULT J.M. & BEN SALAH A., 2000, Localization of potassium in substituted lead hydroxyapatite: $Pb_{9,30}K_{0,60}(PO_4)_6(OH)_{1,20}$ by X-ray diffraction, *Solid State Sciences* **2** (7): 725-733).

115. ENVIRONMENTAL PROTESTION AGENCY (EPA), 1999, National primary drinking water regulations, Part 141, EPA, Code of Federal Regulation, 40 CFR ch. 1 (7-1-99 Edition).

116. EHRLICH R., ROBINS T., JORDAAN E., MILLER S., MBULI S., SELBY P., WYNCHANK S., CANTRELL A., DEBROE M., D'HAESE P., TODD A. & LANDRIGAN P., 1998, Lead absorption and renal dysfunction in a South African battery factory, *Occupational and Environmental Medicine* **55**: 453-460.

117. ELLICKSON K.M., MEEKER R.J., GALLO M.A., BUCKLEY B.T. & LIOY P.J., 2001, Oral bioavailability of lead and arsenic from a NIST standard reference soil material, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **40** (1): 128-135.

F

118. FALK H.L., 1977, Conclusions of the committee on human health consequences of lead exposure from automobile emissions, *Environmental Health Perspectives* **19**: 243-246.

119. FEBEL H., SZEGEDI B. & HUSZAR S., 2001, Absorption of inorganic, trivalent and hexavalent chromium following oral and intrajejunal doses in rats, *Acta Veterinaria Hungarica* **49** (2): 203-209.

120. FELL G.S., 1984, Lead toxicity: problems of definition and laboratory evaluation, *Annual Clinical Biochemistry* **21**: 453-460.

121. FINE B.P., BARTH A., SHEFFET A. & LAVENHAR M.A., 1976, Influence of magnesium on the intestinal absorption of lead, *Environmental Research* **12**: 224-227.

122. FLANAGAN P.R., HAMILTON D.L., HAIST J. & VALBERG L.S., 1979, Interrelationships between iron and lead absorption in iron-deficient mice, *Gastroenterology* **77**: 1074-1081.

123. FLANAGAN P.R., HAIST J. & VALBERG L.S., 1980, Comparative effects of iron deficiency induced by bleeding and a low-iron diet on the intestinal absorptive interactions of iron, cobalt, manganese, zinc, lead and cadmium, *Journal of Nutrition* **110**: 1754-1763.

124. FLANAGAN P.R., CHAMBERLAIN M.J. & VALBERG L.S., 1982, The relationship between iron and lead absorption in humans, *The American Journal of Clinical Nutrition* **36**: 823-829.

125. FLEET J.C., 1996, Bone lead as a risk factor for hypertension in men, *Nutrition Reviews* **54** (6): 180-182.

126. FLEGAL A.R. & SMITH D.R., 1992, Lead levels in preindustrial humans, *The New England Journal of Medicine* **326** (19): 1293-1294.

127. FLEMING D.E.B., CHETTLE D.R., WETMUR J.G., DESNICK R.J., ROBIN J.P., BOULEY D., RICHARD N.S., GORDON C.L. & WEBBER C.E., 1998, Effect of the ∂-

aminolevulinate dehydratase polymorphism on the accumulation of lead in bone and blood in lead smelter workers, *Environmental Research* **77**: 49-71.

128. FLORA S.J.S. & TANDON S.K., 1986, Preventive and therapeutic effects of thiamine, ascorbic acid and their combination in lead intoxication, *Acta Pharmacologica et Toxicologica* **58**: 374-378.

129. FLORA S.J.S. & TANDON S.K., 1990, Beneficial effects of zinc supplementation during chelation treatment of lead intoxication in rats, *Toxicology* **64** (2): 129-139.

130. FLORA S.J.S. & TANDON S.K., 1995, Adjuvants for therapeutic chelating drugs in lead intoxication, *Trace Elements and Electrolytes* **12** (3): 131-140.

131. FLORA S.J.S., SINGH S. & TANDON S.K., 1983, Role of selenium in protection against lead intoxication, *Acta Pharmacologica et Toxicologica* **53** (1): 28-32.

132. FLORA S.J.S., SINGH S. & TANDON S.K., 1986, Chelation in metal intoxication XVIII: combined effects of thiamine and calcium disodium versenate on lead toxicity, *Life Sciences* **38** (1): 67-71.

133. FLORA S.J.S., COULOMBE R.A., SHARMA R.P. & TANDON S.K., 1989a, Influence of dietary protein deficiency on lead-copper interaction in rats, *Ecotoxicology and Environmental Safety* **18**: 75-82.

134. FLORA S.J.S., SINGH S. & TANDON S.K., 1989b, Thiamine and zinc in prevention or therapy of lead intoxication, *The Journal of International Medical Research* **17** (1): 68-75.

135. FLORA S.J.S., KUMAR D. & DASGUBTA S., 1991, Interaction of zinc, methionine or their combination with lead at gastrointestinal or post-absorptive level in rats, *Pharmacology and Toxicology* **68**: 3-7.

136. FLORENCE T.M., LILLEY S.G. & STAUBER J.L., 1988, Skin absorption of lead, *The Lancet* **2**: 157-158.

137. FLORENCE T.M., STAUBER J.L., DALE L.S., HENDERSON D., IZARD B.E. & BELBIN K., 1998, The absorption of ionic lead compounds through the skin of mice, *Journal of Nutritional and Environmental Medicine* **8** (1): 19-23.

138. FLURIN V., MAURAS Y., LE BOUIL A., KRARI N., KERJAN A. & ALLAIN P., 1998, Etude de l'imprégnation saturnine d'enfants de moins de 6 ans de la région du Mans, *La Presse Médicale* **27** (2): 57-59.

139. FORBES G.B. & REINA J.C., 1972, Effect of age on gastrointestinal absorption (Fe, Sr, Pb) in the rat, , *Journal of Nutrition* **102**: 647-652.

140. FOULKES E.C., 1984, Intestinal absorption of heavy metals, **in** *Handbook of experimental pharmacology, Pharmacology of intestinal permeation*, T.Z. Csaky ed, Springer-Verlag, Berlin, vol 70, chap 14: 543-565.

141. FOWLER B.A., 1998, Roles of lead-binding proteins in mediating lead bioavailability, *Environmental Health Perspectives* (suppl 6):1585-1587.

142. FOWLER B.A., KAHNG M.W., SMITH D.R., CONNER E.A. & LAUGHLIN N.K., 1993, Implications of lead binding proteins for risk assessment of lead exposure, *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* **3** (4): 441-448.

143. FRACASSO M.E., PERBELLINI L., SOLDA S., TALAMINI G. & FRANCESCHETTI P., 2002, Lead induced DNA strand breaks in lymphocytes of exposed worker : role of reactive oxygen species and protein kinase C, *Mutation Research* **515** (1-2): 159-169.

144. FREEMAN G.B., JOHNSON J.D., KILLINGER J.M., LIAO S.C., FEDER P.I., DAVIS A.O., RUBY M.V., CHANEY R.L., LOVRE S.C. & BERGSTROM P.D., 1992, Relative bioavailability of lead from mining waste soil in rats, *Fundamental and Applied Toxicology* **19** (3): 388-398.

145. FREEMAN G.B., DILL J.A., JOHNSON J.D., KUTZ P.J., PARHAM F. & MATTHEWS H.B., 1996, Comparative absorption of lead from contaminated soil and lead salts by weanling Fisher 344 rats, *Fundamental and Applied Toxicology* **33**:109-119.

146. FULLMER C.S., 1990, Intestinal lead and calcium absorption: effect of 1,25-dihydroxycholecalciferol and lead status, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **194** (3): 258-264.

147. FULLMER C.S., 1995, Dietary calcium level and treatment interval determine the effects of lead ingestion on plasma 1,25-dihydroxyvitamin D concentration in chicks, *Journal of Nutrition* **125**: 1328-1333.

148. FULLMER C.S., 1997, Lead-calcium interactions: involvement of 1,25-dihydroxyvitamin D1, *Environmental Research* **72** (1): 45-55.

149. FURMAN A., & LALELI M., 1999, Analysis of lead body burden in Turkey, *The Science of the Total Environment* **234**: 37-42.

150. FURMAN A., & LALELI M., 2001, Maternal and umbilical cord blood lead levels: an Istanbul study, *Archives of Environmental Health* **56** (1): 26-28.

151. FURUTA S., KATSUKI H. & KOMARNENI S., 2000, Removal of lead ions using porous hydroxyapatite monoliths synthetized from gypsum waste, *Journal of the Ceramic Society of Japan* **108** (3): 315-317.

G

152. GALAL-GORCHEN H., 1993, Dietary intake levels in food and estimated intake of lead, cadmium and mercury, *Food Additives and Contaminants* **10** (1): 115-128.

153. GALVIN R.M., 1996, Occurrence of metals in water: an overview, *Water SA* **22** (1): 7-13.

154. GANDLEY R., ANDERSON L. & SILBERGELD E.K., 1999, Lead: male-mediated effects on reproduction and development in the rat , *Environmental Research* **80**: 355-363.

155. GAUJOUS D., CHRETIEN R., CORDONNIER J., LAURENT N. & PIRIOU P., 2000, Teneurs en plomb des eaux distribuées et essais de traitement filmogène dans la banlieue de Paris, *Journal Européen d'Hydrologie* **31** (2) : 183-197.

156. GAVAGHAN H., 2002, Lead, unsafe at any level, *Bulletin of the World Health Organisation* **80** (1): 82.

157. GEORGE E., 1998, Le saturnisme hydrique de l'adulte dans la région de Remiremont, Vosges, Thèse de Médecine, Université H. Poincaré de Nancy I, 114p.

158. GERHARDSSON L., HAGMAR L., RYLANDER L. & SKERFVING S., 1995, Mortality and cancer incidence among secondary lead smelter workers, *Occupational and Environmental Medicine* **52**: 667-672.

159. GERSON B., 1990, Lead, *Clinics in Laboratory Medicine* **10**: 441-457.

160. GHOSH S., CHATTERJEE A.K. & GUPTA M., 1992, Impact of lead toxicity on brain metabolisms of nucleic acid and catecholamine in protein malnourished rats, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **38** (5): 451-462.

161. GLENN B.S., STEWART W.F., SCHWARTZ B.S. & BRESSLER J., 2001, Relation of alleles of the sodium-potassium adenosine triphosphate α 2 gene with blood pressure and lead exposure, *American Journal of Epidemiology* **153** (6): 537-545.

162. GODET J.L. & LEROY P., 1999, Conformité sanitaire des matériaux des installations publiques de distribution d'eau, *Techniques Sciences Méthodes* **12** : 22-26.

163. GOMEZ-AYALA A.E., CAMPOS M.S., LOPEZ-ALIAGA I., PALLARES I., HARTITI S., BARRIONUELLO M., ALFAREZ M.J.M., RODRIGUEZ-MATAS M.C. & LISBONA F., 1997, Effects of source of iron on duodenal absorption of calcium, phosphorus, magnesium, copper a,d zinc in rats with ferropaenic anaemia, *International Journal of Vitamin and Nutrition Research* **67** (2): 106-114.

164. GOMEZ-AYALA A.E., LISBONA F., LOPEZ-ALIAGA I., PALLARES I., BARRIONUELLO M., HARTITI S., RODRIGUEZ-MATAS M.C. & CAMPOS M.S., 1998, The absorption of iron, calcium, phosphorus, magnesium, copper and zinc in the jejunum-ileum of control and iron-deficient rats, *Laboratory Animals* **32** (1): 72-79.

165. GOYER R.A., LEONARD D.L., MOORE J.F., RHYNE B., KRIGMAN M.R. & HILL C., 1970, Lead dosage and the role of the intranuclear inclusion body, *Archives of the Environmental Health* **20**: 705-711.

166. GRČMAN H., PERSOLJA J., LOBNIK F. & LEŠTAN D., 2001, Modifying lead, zinc and cadmium bioavailability in soil by apatite and EDTA addition, *Fresenius Environmental Bulletin* **10** (9): 727-730.

167. GROBLER S.R., THEUNISSEN F.S. & KOTZE T.J., 2000, The relation between lead concentrations in human dental tissues and in blood, *Archives of Oral Biology* **45**: 607-609.

168. GRUDEN N. & STANTIC M., 1975, Transfer of lead through the rat's intestinal wall, *The Science of the Total Environment* **3**: 288-292.

169. GUIET-BARA A., BARA M. & DURLACH J., 1990, Magnesium : a competitive inhibitor of lead and cadmium. Ultrastructural studies of the human amniotic epithelial cell, *Magnesium Research* **3** (1): 31-36.

170. GULSON B.L., SHEEMAN A., GIBLIN A.M., CHIARADIA M. & CONRADT B., 1997, The efficiency of removal of lead and other elements from domestic drinking water using a bench-top water filter system, *The Science of the Total Environment* **196**: 205-216.

171. GULSON B.L., JAMES M., GIBLIN A.M., SHEEMAN A. & MITCHELL P., 1997, Maintenance of elevated lead levels in drinking water from occasional use and potential impact on blood lead in children, *The Science of the Total Environment* **205**: 271-275.

172. GULSON B.L., MAHAFFEY K.R., JAMESON C.W., MIZON K.J., KORSCH M.J., CAMERON M.A. & EISMAN J.A., 1998, Mobilisation of lead from the skeleton during the postnatal period is larger than during pregnancy, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **131** (4): 324-329.

173. GULSON B.L., JAMESON C.W., MAHAFFEY K.R., MIZON K.J., PATISON N., LAW A.J., KORSCH M.J. & SOLFER M.A., 1998, Relationships of lead in breast milk to lead in blood, urine, and diet of the infant and mother, *Environmental Health Perspectives* **106** (10): 667-674.

174. GULSON B.L., POUNDS J.G., MUSHACK P., THOMAS B.J., GRAY B. & KORSCH M.J., 1999, Estimation of cumulative lead releases (lead flux) from the maternal skeleton during pregnancy and lactation, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **134** (6): 631-640.

175. GULSON B.L., MIZON K.J., PALMER J.M., PATISON N., LAW A.J., KORSCH M.J., MAHAFFEY K.R. & DONNELLY J.B., 2001, Longitudinal study of daily intake and excretion of lead in newly born infants, *Environmental Research Section A* **85** (3): 232-245.

176. GUPTA V. & GILL K.D., 2000a, Influence of ethanol on lead distribution and biochemical changes in rats exposed to lead, *Alcohol* **20**: 9-17.

177. GUPTA V. & GILL K.D., 2000b, Lead and ethanol coexposure: implications on the dopaminergic system and associated behavioral functions, *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **66** (3): 465-474.

H

178. HAGUENOER J.M. & FURON D., 1982, Plomb, in: *Toxicologie et Hygyiène Industrielle, tome 2: Les dérivés minéraux, 2ème partie,* Technique & Documentation, Paris, p 47-95.

179. HAMMAD T.A., SEXTON M. & LANGENBERG P., 1996, Relationship between blood lead and dietary iron intake in preschool children, *Annals of Epidemiology* **6**(1): 30-33.

180. HART M.H. & SMITH J.L., 1981, Effect of vitamin D and low dietary calcium on lead uptake and retention in rats, *Journal of Nutrition* **111**: 694-698.

181. HARTEMANN P., 1994, Contribution à la réflexion sur la fixation d'une CMA pour le plomb dans l'eau de distribution publique, Laboratoire d'Hygiène et de Recherche en Santé Publique, Université de Nancy I, Journée italo-franco-suisse (Mulhouse mai 1995), 76 p.

182. HASAN M.Z. & SETH T.D., 1981, Effect of lead and zinc administration on liver, kidney and brain level of copper, lead, manganese and zinc and on erythrocyte ALA-D activity in rats, *Toxicology Letters* **7**: 353-358.

183. HAYES C.R., BATES A.J., GOODMAN A.H., VINSON J.P. & SADLER T.P., 1997, Meeting standards for lead in drinking water, *J. CIWEM* **11**: 257-263.

184. HEARD M.J. & CHAMBERLAIN A.C., 1982, Effect of minerals and food on uptake of lead from the gastrointestinal tract in humans, *Human Toxicology* **1**: 411-415.

185. HENNING S.J. & COOPER L.C., 1988, Intestinal accumulation of lead salts and milk lead by suckling rats, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **187**: 110-116.

186. HENNING S.J. & LEEPER L.L., 1984, Duodenal uptake of lead by suckling and weanling rats, *Biology of the Neonate* **46**: 27-35.

187. HERNANDEZ-AVILA M., SANIN L.H., ROMIEU J., PALAZUELOS E., TAPIA-CONYER R., OLAIZ G., ROJAS R. & NAVARETTE J., 1997, Higher milk intake during pregnancy is associated with lower maternal and umbilical cord lead levels in postpartum women, *Environmental Research* **74**: 116-121.

188. HERNANDEZ-AVILA M., GONZALEZ VILLALPANDO C., PALAZUELOS E., HU H., GONZALEZ VILLALPANDO M.E. & RIVERA MARTINEZ D., 2000, Determinants of blood lead levels across the menopausal transition, *Archives of Environmental Health* **55** (5): 355-360.

189. HERTZ-PICCIOTTO I., 2000, The evidence that lead increases the risk for spontaneous abortion, *American Journal of Industrial Medicine* **38** (3): 300-309.

190. HERTZ-PICCIOTO I., SCHRAMM M., WATT-MORSE M., CHANTALA K., ANDERSON J. & OSTERLOH J., 2000, Patterns and determinants of blood lead during pregnancy, *American Journal of Epidemiology* **152** (9): 829-837.

191. HETTIARACHCHI G.M. & PIERZYNSKI G.M., 2002, *In situ* stabilization of soil lead using phosphorus and manganese oxide: influence of plant growth, *Journal of Environmental Quality* **31** (2): 564-572.

192. HETTIARACHCHI G.M., PIERZYNSKI G.M. & RANSOM M.D., 2000, *In situ* stabilization of soil lead using phosphorus and manganese oxide, *Environmental Science and Technology* **34**: 4614-4619.

193. HETTIARACHCHI G.M., PIERZYNSKI G.M. & RANSOM M.D., 2001, *In situ* stabilization of soil lead using phosphorus, *Journal of Environmental Quality* **30** (4): 1214-1221.

194. HISHAM H.J., CHUAH S.Y., SYARIF H.L., NASRI I.N. & FAIRULNIZAN M.N., 1998, Blood lead levels of pregnant women from the Klang valley, *Medical Journal of Malaysia* **53** (1): 76-81.

195. HITCHMOUGH M., 1997, Le plomb dans l'eau du robinet. Stratégie de résolution du problème, *Techniques Sciences Méthodes* **5**: 55-62.

196. HOUSTON D.K. & JOHNSON M.A., 1999, Lead as a risk factor for hypertension in women, *Nutrition Reviews* **57** (9 Pt1): 277-279.

197. HSIEH L.L., LIOU S.H., CHEN Y.H., TSAI L.C., YANG T. & WU T.N., 2000, Association between aminolevulinate dehydrogenase genotype and blood lead levels in Taiwan, *Journal of Occupational and Environmental Medicine* **42** (2): 151-155.

198. HU H., ARO A., PAYTON M., KORRICK S., SPARROW D., WEISS S.T. & ROTNITZKI A., 1996, The relationship of bone and blood lead to hypertension, *The Journal of the American Medical Association* **275** (15): 1171-1176.

199. HUEL G., 1997, Surveillance de la population française vis-à-vis du risque saturnin, Rapport final, INSERM.

200. HUSSEIN K.A., COGHILL S.B., MILNE G. & HOPWOOD D., 1984, The uptake of lead by small intestine, colon and gallbladder of the guinea pig *in vivo, Histochemistry* **81**: 591-596.

I

201. IARC, International Agency for Research on Cancer, 1987, *Lead and lead compounds, Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC monographs,* IARC monographs on the Evaluation of the carcinogenicity Risk of Chemicals to Humans, supplement 7, volume 1-42, Lyon, p 230-232.

202. IKEDA M., ZHANG Z.W., SHIMBO S., WATANABE T., NAKATSUKA H., MOON C.S., MATSUDA-INOGUCHI N. & HIGASHIKAWA K., 2000, Exposure of women in general population to lead via food and air in East and Southeast Asia, *American Journal of Industrial Medicine* **38** (3): 271-280.

203. INGRAM G.S., HORAY C.P. & STEAD W.J., 1992, Interaction of zinc with dental mineral, *Caries Research* **26**: 248-253.

204. INSERM, 1999, Expertise collective INSERM, *Plomb dans l'environnement. Quels risques pour la santé?*, Les Editions INSERM, Paris, 461 p.

205. ISNARD H., 1994, Toxicité du plomb et saturnisme infantile, *Techniques Sciences Méthodes* **2**: 70-72.

206. ITO Y., NIIYA Y., OTANI M. & SHIMA S., 1987, Effect of thiamine on the excretion of subcutaneously injected lead in rats, *Toxicology Letters* **37**: 221-228.

207. ITTEL T.H., KINZEL S., ORTMANN A. & SIEBERTH H.G., 1996, Effect of iron status on the intestinal absorption of aluminium: a reappraisal, *Nephrology International* **50** (6): 1879-1888.

J

208. JACKSON P.J., 1996, Respect de la CMA proposée pour le plomb: stratégie et coûts, *Techniques Sciences Méthodes* **7-8**: 536-540.

209. JACOB B., RITZ B., HEINRICH J., HOELSCHER B. & WICHMANN H.E., 2000, The effect of low-level blood lead on hematologic parameters in children, *Environmental Research* **82**: 150-159.

210. JAMES H.M., HILBURN M.E. & BLAIR J.A., 1985, Effects of meals and meal times on uptake of lead from the gastrointestinal tract in humans, *Human Toxicology* **4**: 401-407.

211. JEANJEAN J., VINCENT U. & FEDOROFF M., 1994, Structural modification of calcium hydroxyapatite induced by sorption of cadmium ions, *Journal of Solid State Chemistry***108**: 68-72.

212. JEANJEAN J., McGRELLIS S., ROUCHAUD J.C., FEDOROFF M., RONDEAU A., PEROCHEAU S. & DUBIS A., 1996, A crystallographic study of the sorption of cadmium on calcium hydroxyapatites: incidence of cationic vacancies, *Journal of Solid State Chemistry***126**: 195-201.

213. JUBERG D.R., KLEIMAN C.F. & KWON S.C., 1997, Position paper on the American Council on Science and Health: Lead and human health, *Ecotoxicology and Environmental Safety* **38**: 162-180.

214. JUNG M.C., THORNTON I. & CHON H.T., 1998, Arsenic, cadmium, copper, lead, and zinc concentrations in cigarettes produced in Korea and the United Kingdom, *Environmental Technology* **19** (2): 237-241.

K

215. KARHAUSEN L., 1972, Intestinal lead absorption, In: *Environmental Health Aspects of Lead: Proceedings of an International Symposium, Commission of the European Communities,* BARTH D., BERTIN A., ENGEL R., RECHT P. & SMEETS J. (eds.), October 1972, Luxembourg, p. 427-440.

216. KARMAKAR N. & JAYARAMAN G., 1988, Linear diffusion of lead in the intestinal wall: a theoretical study, *IMA Journal of Mathematics Applied in Medicine & Biology* **5**: 33-43.

217. KAUFMAN A.S., 2001, Do low levels of lead produce IQ loss in children ? A careful examination of the literature, *Archives of Clinical Neuropsychology* **16** (4): 303-341.

218. KAUSHAL D., GARG M.L., BANSAL M.R. & BANSAL M.P., 1996, Biokinetic of lead in various organs of rats using radiotracer technique, *Biological Trace Element Research* **53**: 249-260.

219. KELLER C.A. & DOHERTY R.A., 1980, Correlation between lead retention and intestinal pinocytosis in the suckling mouse, *American Journal of Physiology* **239**: 114-122.

220. KEOHE R.A., 1961, The metabolism of lead in man in health and disease, J R I P H & H J: 81-100, 101-121, 129-143, 177-203.

221. KERN M., WISNIEWSKI M., CABELL L. & AUDESIRK G., 2000, Inorganic lead and calcium interact positively in activation of calmodulin, *Neurotoxicology* **21** (3): 353-363.

222. KHASSOUANI C.E., ALLAIN P. & SOULAYMANI R., 1997, Etude de l'imprégnation saturnine des habitants de la région de Rabat (Maroc), *La Presse Médicale* **26** (36): 1714-1716.

223. KIM J.S., BLAKLEY B.R. & ROUSSEAUX C.G., 1990, The effects of thiamin on the tissue distribution of lead, *Journal of Applied Toxicology* **10** (2): 93-97.

224. KIM J.Y., FENTON R.R., HUNTER B.A. & KENNEDY B.J., 2000, Powder diffraction studies of synthetic calcium and lead apatite, *Australian Journal of Chemistry* **53** (8): 679-686.

225. KIM R., ROTNITZKI A., SPARROW D., WEISS S.T., WAGER C. & HU H., 1996, A longitudinal study of low-level lead exposure and impairment of renal function, *The Journal of the American Medical Association* **275** (15): 1177-1181.

226. KIRCHGEßNER M., PLASS D.L. & REICHLMAYR-LAIS A.M., 1991, Lead deficiency in swine, In: Trace Elements in Man and Animals 7, Berislav Momcilovic, IMI Zagreb: p 11-20 à 11-21.

227. KLAUDER D.S. & PETERING H.G., 1975, Protective value of dietary copper and iron against some toxic effects of lead in rats, *Environmental Health Perspectives* **12**: 77-80.

228. KLAUDER D.S. & PETERING H.G., 1977, Anemia of lead intoxication: a role for copper, *Journal of Nutrition* **107**: 1779-1785.

229. KORRICK S.A., HUNTER D.J., ROTNITZKI A., HU H. & SPEIZER F.E., 1999, Lead and hypertension in a sample of middle-aged women, *American Journal of Public Health* **89** (3): 330-335.

230. KORSRUD G.O. & MELDRUM J.B., 1988, Effect on blood, liver and kidney variables of age and of dosing rats with lead acetate orally or via the drinking water, *Biological Trace Element Research* **17**: 151-166.

231. KOSTIAL K., SIMONOVIC I. & PISONIC M., 1971, Lead absorption from the intestine in newborn rats, *Nature* **233**: 564-.

232. KRISTAL-BONEH E., FROOM P., YERUSHALMI N., ASHKANAZI R., PARDO A., SHINE R. & RIBAK J., 1998, Effect of dietary calcium on blood lead concentrations in occupationally exposed and nonexposed workers, *American Journal of Industrial Medicine* **34**: 512-516.

233. KRISTIANSEN J., CHRISTENSEN J.M., IVERSEN B.S. & SABBIONI E., 1997, Toxic trace element reference levels in blood and urine: influence of gender and lifestyle factors, *The Science of the Total Environment* **204**: 147-160.

234. KULIKOWSKA E., MONIUSZKO-JAKONIUK J. & MINIUK K., 1989, The effect of zinc on the toxic action of lead after administration of ethanol to rats, *Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy* **41**: 281-289.

235. KUNTZ C., GUEGUEN R. & HENNY J., 1999, *L'imprégnation saturnine chez les enfants de 4 à 6 ans en Lorraine. Prévalence et relation avec les sources d'exposition*, Service "Environnement" des DDASS de Meurthe-et-Moselle, de Moselle et des Vosges, Centre de Médecine Préventive, Ministère de l'Emploi et de la Solidarité, 41 p.

236. KUZUYA T., HASEGAWA T., OGURA Y. & NABESHIMA T., 1998, Effect of transmucosal fluid movement on zinc and copper absorption from rat small intestine, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **25** (6): 412-416.

L

237. LABROT F., RIBERA D., TISNERAT G., NARBONNE J.F. & CABRIDENC R., 1996, Contamination des écosystème et effets biologiques, In : MORLOT M., *Aspects analytiques du plomb dans l'environnement*, Technique & Documentation (éd), Paris, p 3-15.

238. LACASANA M., ROMIEU I., SANIN L.H., PALAZUELOS E. & HERNANDEZ-AVILA M., 2000, Blood lead levels and calcium intake in Mexico City children under five years of age, *International Journal of Environmental Health Research* **10** (4): 331-340.

239. LAI J.S., WU T.N., LIOU S.H., SHEN C.Y., GUU C.F., KO K.N., CHI H.Y. & CHANG P.Y., 1997, A study of the relationship between ambient lead and blood lead among lead battery workers, *International Archives of Occupational and Environmental Health* **69** (4): 295-300.

240. LANPHEAR B.P., MATTE T.D., ROGERS J., CLICKNER R.P., DIETZ B., BORNSCHEIN R.L., SUCCOP P., MAHAFFEY K.R., DIXON S., GALKE W., RABINOWITZ M., FARFEL M., ROHDE C., SCHWARTZ J., ASHLEY P. & JACOBS D.E., 1998, The contribution of lead-contaminated house dust and residential soil to children's blood lead levels, *Environmental Research* **79**: 51-68.

241. LANPHEAR B.P., DIETRICH K., AVINGER P. & COX C., 2000, Cognitive deficits associated with blood lead concentrations < 10 µg/L in US children and adolescents, *Public Health Reports* **115** (6): 521-529.

242. LAPERCHE V., TRAINA S.J., GODDAM P. & LOGAN T.J., 1996, Chemical and mineralogical characterizations of Pb in a contaminated soil: reactions with synthetic apatite, *Environmental Science and Technology* **30**: 3321-3326.

243. LAPERCHE V., LOGAN T.J., GODDAM P. & TRAINA S.J., 1997, Effect of apatite amendments on plant uptake of lead from contaminated soil, *Environmental Science and Technology* **31**: 2745-2753.

244. LATTA D.M. & DONALDSON W.E., 1986, Lead toxicity in chicks: interactions with dietary methionine and choline, *Journal of Nutrition* **116**: 1561-1568.

245. LAUWERYS R.R., 1999, Plomb, In: *Toxicologie Industrielle et Intoxications Professionnelles, 4ème édition*, Masson (ed), Paris, pp 255-294.

246. LEBLANC J.C., MALMAURET L., GUERIN T., BORDET F., BOURSIER B. & VERGER P., 2000, Estimation of the dietary intake of pesticide residues, lead, cadmium, arsenic and radionuclides in France, *Food Additives and Contaminants* **17** (11): 925-932.

247. LEE B.K., LEE G.S., STEWART W.S., AHN K.D., SIMON D., KELSEY K.T., TODD A.C. & SCHWARTZ B.S., 2001, Associations of blood pressure and hypertension with lead dose measures and polymorphisms in the vitamin D receptor and., *Environmental Health Perspectives* **109** (4): 383-389.

248. LEGGET R.W., 1993, An age-specific kinetic model of lead metabolism in humans, *Environmental Health Perspectives* **101** (7): 598-616.

249. LEGRAND L. & LEROY P., 1995, L'eau au contact avec des métaux plus nobles que le fer, In: *Prévention de la corrosion et de l'entartrage dans les réseaux de distribution d'eau,* Cifec (eds), Neuilly-sur-Seine, chap 6, p. 253-279.

250. LELEU B., SHIRALI P., HAGUENOER J.M. & FURON D., 2000, Biosusceptibilité au plomb: revue générale, *Archives des Maladies Professionnelles* **61** (1): 1-6.

251. LEROY P., 1993, Lead in drinking water- origins; solubility; treatment, *J Water SRT-Aqua* **45** (4): 233-238.

252. LEROYER A., HAGUENOER J.M., HEMON D., NISSE C. & SALOMEZ J.L., 2000a, Influence de l'environnement sur la plombémie d'une population d'adultes résidant dans la région Nord-Pas-de-Calais, *Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique* **48** (suppl 2): 2s90-.

253. LEROYER A., NISSE C., HEMON D., GRUCHOCIAK A., SALOMEZ J.L. & HAGUENOER J.M., 2000b, Environmental lead exposure in a population of children in Northern France: factors affecting lead burden, *American Journal of Industrial Medicine* **38** (3): 281-289.

254. LEROYER A., HEMON D., NISSE C., BAZERKES J., SALOMEZ J.L. & HAGUENOER J.M., 2001, Environmental exposure to lead in a population of adults living in northern France: lead burden levels and their determinants, *The Science of the Total Environment* **267** (1-3): 87-99.

255. LEVANDER O.A., MORRIS V.C., HIGGST D.J. & FERRETTI R.J., 1975, Lead poisoning in vitamin E-deficient rats, *Journal of Nutrition* **105**: 1481-1485.

256. LEVANDER O.A., FISHER M., MORRIS V.C & FERRETTI R.J., 1977a, Morphology of erythrocytes from vitamin E-deficient lead-poisoned rats, *Journal of Nutrition* **107**: 1828-1836.

257. LEVANDER O.A., MORRIS V.C. & FERRETI R.J., 1977b, Filterability of erythrocytes from vitamin E-deficient lead-poisoned rats, *Journal of Nutrition* **107**: 363-372.

258. LILLEY S.G., FLORENCE T.M. & STAUBER J.L., 1988, The use of sweat to monitor lead absorption through the skin, *The Science of the Total Environment* **76**: 267-278.

259. LIN J.L., TAN D.T., HSU K.H. & YU C.C., 2001, Environmental lead exposure and progressive renal insufficiency, *Archives of Internal Medicine* **161** (2): 264-271.

260. LIOU S.H., WU T.N., CHIANG H.C., YANG G.Y., YANG T., WU Y.Q., LAI J.S., HO S.T., LEE C.C., KO Y.C., KO K.N. & CHANG P.Y., 1996, Blood lead levels in Taiwanese adults: distribution and influencing factors, *The Science of the Total Environment* **180**: 211-219.

261. LÜ J., PETROIANU G., WIGJAJA B. & RÜFER R., 1997, Transplacental kinetics of lead in pregnant mini-pigs, *Archives of Toxicology* **71**: 187-192.

262. LUCAS S.R., SEXTON M. & LANGENBERG P., 1996, Relationship between blood lead and nutritional factors in preschool children: a cross-sectional study, *Pediatrics* **97** (1): 74-78.

M

263. MA Q.Y., TRAINA S.J. & LOGAN T.J., 1993, *In situ* lead immobilization by apatite, *Environmental Science and Technology* **27**: 1803-1810.

264. MA Q.Y., LOGAN T.J., TRAINA S.J. & RYAN J.A., 1994, Effects of NO_3^-, Cl^-, F^-, SO_4^{2-}, and CO_3^{2-} on Pb^{2+} immobilization by hydroxyapatite, *Environmental Science and Technology* **28**: 408-418.

265. MA Q.Y., TRAINA S.J., LOGAN T.J. & RYAN J.A., 1994, Effects of aqueous Al, Cd, Cu, Fe (II), Ni and Zn on Pb immobilization by hydroxyapatite, *Environmental Science and Technology* **28**: 1219-1228.

266. MA Q.Y., LOGAN T.J. & TRAINA S.J., 1995, Lead immobilization from aqueous solutions and contaminated soils using phosphates rocks, *Environmental Science and Technology* **29**: 1118-1126.

267. MAHAFFEY K.R., 1985, Factors modifying susceptibility to lead toxicity, In: *Dietary and environmental lead: human health effects*, Mahaffey (ed), Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division).

268. MAHAFFEY-SIX K.R. & GOYER R.A., 1972, The influence of iron deficiency on tissue content and toxicity of ingested lead in the rat, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **79** (1): 128-136.

269. MAHAFFEY K.R. & RADER J.I., 1980, Metabolic interactions: lead, calcium, and iron, *Annals of the New York Academic of Sciences* **355**: 285-297.

270. MAHAFFEY K.R., GARTSIDE P.S. & GLUECK C.J., 1986, Blood lead levels and dietary calcium intake in 1- to 11-year-old children: the Second National Health and Nutrition Examination Survey, 1976 to 1980, *Pediatrics* **78** (2): 257-262.

271. MAHAFFEY K.R., GOYER R. & HASEMAN J.K., 1973, Dose-response to lead ingestion in rats fed low dietary calcium, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **82**: 92-100.

272. MAHAPATRA P.P., SARANGI D.S. & MISHRA B., 1995, Kinetics of nucleation of lead hydroxylapatite and preparation of solid solutions of calcium-cadmium-lead hydroxylapatite : an X-ray and IR study, *Journal of Solid State Chemistry* **116**: 8-14.

273. MALDONADO-VEGA M., CERBÓN-SOLORZANO J., ALBORES-MEDINA A., HERNANDEZ-LUNA C. & CALDERÓN-SALINAS J.V., 1996, Lead: intestinal absorption and bone mobilization during lactation, *Human & Experimental Toxicology* **15**: 872-877.

274. MALHOTRA K.M., SHUKLA G.S. & CHANDRA S.V., 1982, Neurochemical changes in rats coexposed to lead and copper, *Archives of Toxicology* **49**: 331-336.

275. MANECKI M., MAURICE P.A. & TRAINA S.J., 2000a, Kinetics of aqueous Pb reaction with apatite, *Soil Science* **165** (12): 920-933.

276. MANECKI M., MAURICE P.A. & TRAINA S.J., 2000b, Uptake of aqueous Pb by Cl^-, F^-, and OH^- apatite: mineralogic evidence for nucleation mechanisms, *American Mineralogist* **85**: 932-942.

277. MANTON W.I. & COOK J.D., 1984, High accuracy (stable isotope dilution) measurements of lead in serum and cerebrospinal fluid, *British Journal of Industrial Medicine* **41**: 313-319.

278. MANTON W.I., ANGLE C.R., STANEK K.L., REESE Y.R. & KUEHNEMANN T.J., 2000, Acquisition and retention of lead by young children, *Environmental Research* **82**: 60-80.

279. MANTON W.I., ROTHENBERG S.J. & MANALO M., 2001, The lead content of blood serum, *Environmental Research Section A* **86**: 263-273.

280. MARANELLI G., APOSTOLI P. & FERRARI P., 1990, Influence of smoking, alcohol, and dietary habits on blood Pb and Cd levels, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **45** (6): 804-810.

281. MARCUS A.H., 1979, The body burden of lead: comparison of mathematical models for accumulation, *Environmental Research* **19**: 79-90.

282. MARIEB E.N., 1999, *Anatomie et physiologie humaines*, 4ème édition, Edition du Renouveau Pédagogique Inc., Paris, 1194 p.

283. MARIET C., 1999, La démarche de Lyonnaise des Eaux pour supprimer les branchements en plomb, *Techniques Sciences Méthodes* **9**: 4-6.

284. MARKOWITZ M.E. & SHEN X.M., 2001, Assessment of bone lead during pregnancy: a pilot study, *Environmental Research Section A* **85** (2): 83-89.

285. MASCI O., CARELLI G., VINCI F. & CASTELLINO N., 1998, Blood lead concentration and biological effects in workers exposed to very low lead levels, *Journal of Occupational and Environmental Medicine* **40** (10): 886-894.

286. MASON H.J., 2000, A biokinetic model for lead metabolism with a view to its extension to pregnancy and lactation, (1) further validation of the original model for non-pregnant adults, *The Science of the Total Environment* **246**: 69-78.

287. MAVROPOULOS E., ROSSI A.M., COSTA A.M., PEREZ C.A.C., MOREIRA J.C. & SALDANHA M., 2002, Studies of the mechanisms of lead immobilization by hydroxyapatite, *Environmental Science and Technology* **23** (2): 121-133.

288. MENDELSOHN A.L., DREYER B.P., FIERMAN A.H., ROSEN C.M., LEGANO L.A., KRUGER H.A., LIM S.W., BARASH S., AU L. & COURTLAND C.D., 1999, Low-level lead exposure and cognitive development in early childhood, *Journal of Developmental and Behavioural Pediatrics* **20** (6): 425-431.

289. MESTEK O., DEYL Z., MIKSIK I., NOVOTNA J, PFEIFFER I. & HERGET J., 1998, Accumulation of lead in tissues after its administration in drinking water to laboratory rats, *Physiological Research* **47**: 197-202.

290. MINISTERE DE L'AMENAGEMENT DU TERRITOIRE ET DE L'ENVIRONNEMENT, Service de la Recherche et des affaires économiques, 1997, *La qualité de l'air en France 1991-1996*, Paris, 97p.

291. MINISTERE DE L'ECONOMIE, DES FINANCES ET DE L'INDUSTRIE, 2002, http://www.industrie.gouv.fr/energie/petrole/textes/se_qualite.html

292. MINIUK K., MONIUSZKO-JAKONIUK J., KULIKOWSKA E. & OMIELJANIUK N., 1989, The interactions of copper, lead and ethanol in rats: effects on some biochemical parameters of blood, *Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy* **41**: 273-280.

293. MINOIA C., SABBIONI E., APOSTOLI P., PIETRA R., POZZOLI L., GALLORINI M., NICOLAOU G., ALESSIO L. & CAPODAGLIO E., 1990, Trace element references values in tissues from inhabitants of the European Community I. A study of 46 elements in urine, blood and serum of Italian subjects, *The Science of the Total Environment* **95**: 89-105.

294. MIRGHANI Z., 1997, Maternal and umbilical cord blood lead level in Abha Maternity Hospital, Southern Saudi Arabia, *Saudi Medical Journal* **18** (6): 563-566.

295. MIYAKE M., ISHIGAKI K. & SUZUKI T., 1986, Structure refinement of Pb^{2+} ion-exchanged apatites by X-ray powder pattern-fitting, *Journal of Solid State Chemistry* **61**: 230-235.

296. MOLINE J., LOPEZ CARILLO L., TORRES SANCHEZ L., GODBOLD J. & TODD A., 2000, Lactation and lead body burden turn over : a pilot study in Mexico, *Journal of Occupational and Environmental Medicine* **42** (11): 1070-1075.

297. MONTIEL A., BOUSSET P., DUGUET J.P. & WELTE B., 2001, Tests rapides pour connaître le risque de migration du plomb des canalisations dans l'eau, *Techniques Sciences Méthodes* **1** : 35-40.

298. MOON J., 1994, The role of vitamin D in toxic metal absorption: a review, *Journal of the American College of Nutrition* **13** (6): 559-564.

299. MOORE C. & ADLER R., 2000, Herbal vitamins: lead toxicity and developmental delay, *Pediatrics* **106** (3): 600-602.

300. MORLOT M., 1996, *Aspects analytiques du plomb dans l'environnement*, Lavoisier, Technique & Documentation, Paris, 483 p.

301. MORRISON J.N. & QUARTERMAN J., 1987, The relationship between iron status and lead absorption in rats, *Biological Trace Element Research* **14**: 115-126.

302. MORTON A.P., PARTRIDGE S. & BLAIR J.A., 1985, The intestinal uptake of lead, *Chemistry in Britain,* 923-927.

303. MOSS M.E., LANPHEAR B.P. & AUINGER P., 1999, Association of dental caries and blood lead levels, *The Journal of the American Medical Association* **281** (24): 2294-2298.

304. MUSHAK P., 1991, Gastro-intestinal absorption of lead in children and adults: Overview of biological biophysico-chemical aspects, *Chemical Speciation and Bioavailability* **3** (3/4): 87-104.

305. MUSHAK P., 1998, Lead's toxic legacy for human reproduction: new studies establish significant bone lead release during pregnancy and nursing, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **131**: 295-297.

306. MŸKKANEN H.M. & WASSERMAN R.H., 1981, Gastrointestinal absorption of lead (^{203}Pb) in chicks: influence of lead, calcium and age, *Journal of Nutrition* **111**: 1757-1765.

307. MŸKKANEN H.M. & WASSERMAN R.H., 1982, Effect of vitamin D on the intestinal absorption of ^{203}Pb and ^{47}Ca in chicks, *Journal of Nutrition* **112**: 520-527.

308. MŸKKANEN H.M., FULLMER C.S. & WASSERMAN R.H., 1984, Effect of phosphate on the intestinal absorption of lead (^{203}Pb) in chicks, *Journal of Nutrition* **114**: 68-74.

N

309. NASHASHIBI N., CARDAMAKIS E., BOLBOS G. & TZINGOUNIS V., 1999, Investigation of kinetic of lead during pregnancy and lactation, *Gynecologic and Obstetric Investigation* **48** (3): 158-162.

310. NEAL R., YANG P., FIECHTL J., YILDIZ D., GURER H. & ERCAL N., 1997, Pro-oxydant effects of δ-aminolevulinic acid (δ-ALA) on Chinese hamster ovary (CHO) cells, *Toxicology Letters* **91**: 169-178.

311. NEHRU B. & DUA R., 1997, The effect OF dietary selenium on lead neurotoxicity, *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* **16** (1): 47-50.

312. NIAZI S., LIM J. & BEDERKA J.P., 1982, Effect of ascorbic acid on renal excretion of lead in the rat, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **71** (10): 1189-1190.

313. NICHOLLS D.M. & McLACHLAN D.R.C., 1990, Issues of lead toxicity, In: *Advances in in vivo body composition studies,* Yasumura *et al.* (ed), Plenum Press, New York, p. 237-246.

314. NILSSON U., ATTEWELL R., CHRISTOFFERSSON J.O., SCHÜTZ A., AHLGREN L., SKERFVING S. & MATTSSON S., 1991, Kinetics of lead in bone and blood after end of occupational exposure, *Pharmacology and Toxicology* **68** (6): 477-484.

315. NORDBERG M., WINBLAD B., FRATIGLIONI L. & BASUN H., 2000, Lead concentrations in elderly urban people related to blood pressure and mental performance: results from a population-based study, *American Journal of Industrial Medicine* **38** (3):290-294.

316. NOWAKB. & CHMIELNICKA J., 2000, Relationship of lead and cadmium to essential elements in hair, teeth, and nails of environmental exposed people, *Ecotoxicology and Environmental Safety* **46**: 265-274.

O

317. ODLAND J.O.E., NIEBOER E., ROMANOVA N., THOMASSEN Y. & LUND E., 1999, Blood lead and cadmium and birth weight among sub-arctic and arctic populations of Norway and Russia, *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica* **78** (10): 852-860.

318. O'FLAHERTY E.J., INSKIP M.J., YAGMINAS A.P. & FRANKLIN C.A., 1996, Plasma and blood lead concentrations, lead absorption and lead excretion in nonhuman primates, *Toxicology and Applied Pharmacology* **138**: 121-130.

319. O'FLAHERTY E.J., 1998, A physiologically based kinetic model for lead in children and adults, *Environmental Health Perspectives* **106** (6): 1495-1503.

320. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE (O.M.S.), 1997, *Aspects sanitaires et nutritionnels des oligo-éléments et des éléments traces*, Genève, 350 p.

321. OTHMAN A.I. & EL MISSIRY M.A., 1998, Role of selenium against lead toxicity in male rats, *Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology* **12** (6): 345-349.

P

322. PAILLARD M., 1992, *Physiologie rénale et désordres hydroélectrolytiques*, Hermann éditeurs des Sciences et des Arts, Paris, 305 p.

323. PALMINGER HALLEN I. & OSKARSSON A., 1995, Bioavailability of lead from various milk diets studied in a suckling rat model, *Biometals* **8**: 231-236.

324. PALMINGER HALLEN I., JÖNSSON S., KARLSSON M.O. & OSKARSSON A., 1996a, Toxicokinetics of lead in lactating and non lactating mice, *Toxicology and Applied Pharmacology* **136**: 342-347.

325. PALMINGER HALLEN I., JÖNSSON S., KARLSSON M.O. & OSKARSSON A., 1996b, Kinetic observations in neonatal mice exposed to lead via milk, *Toxicology and Applied Pharmacology* **140**: 13-18.

326. PANDE M., MEHTA A., PANT B.P. & FLORA S.J.S., 2001, Combined administration of a chelating agent and an antioxidant in the prevention and treatment of acute lead intoxication in rats, *Environmental Toxicology and Pharmacology* **9** (4): 173-184.

327. PANSU D., BELLATON C., ROCHE C. & BRONNER F., 1983, Duodenal and ileal calcium absorption in the rat and effects of vitamin D, *American Journal of Physiology* **244** (Gastrointestinal Liver Physiology 7): G695-G700.

328. PATRA R.C., SWARUP D. & DWIVEDI S.K., 2001a, Antioxidant effects of α tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to liver, kidney and brain in rats, *Toxicology* **162** (2): 81-88.

329. PATRA R.C., SWARUP D., DWIVEDI S.K. & Sahoo A., 2001b, Trace minerals in blood of young calves during exposure to lead, *Indian Journal of Animal Sciences* **71** (6): 507-510.

330. PEARSON M.S., MAENPAA K., PIERZYNSKI G.M. & LYDY M.J., 2000, Bioremediation and biodegradation, effects of soil amendments on the bioavailability of lead, zinc, and cadmium to earthworms, *Journal of Environmental Quality* **29**: 1611-1617.

331. PERRONE L., PONTICIELLO E., DEL-GIUDICE M.M., MAROTTA A. & DI-TORO R., 1999, Epidemiological study of blood lead levels of children and adolescents living in Campania, Italy, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **13** (4): 220-223.

332. PETERING H.G., 1980, The influence of dietary zinc and copper on the biologic effects of orally ingested lead in the rat, *Annals of the New York Academy of Sciences* **355**: 298-308.

333. PHILIP A.T. & GERSON B., 1994, Lead poisoning, Part I, Incidence, etiology, and toxicokinetics, *Clinics in Laboratory Medicine* **14** (2): 423-444.

334. PIRKLE J.L., BRODY D.J., GUNTER E.W., KRAMER R.A., PASCHAL D.C., FLEGAL K.M. & MATTE T.D., 1994, The decline in blood lead levels in the United States, The National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES), *The Journal of the American Medical Association* **272** (4): 284-291.

335. POCOCK S.J., SHAPER A. G., WALKER M, WALE C.J., CLAYTON B., DELVES T., LACEY R.F., PACKHAM R.F. & POWELL P., 1983, Effects of tape water lead hardness, alcohol, and cigarettes on blood lead concentration, *Journal of Epidemiology and Community Health* **37**: 1-7.

336. POCOCK S.J., SMITH M. & BAGHURST P., 1994, Environmental lead and children's intelligence: a systematic review of the epidemiological evidence, *BMJ* **309**: 1189-1197.

337. PÖNKÄ A., 1998, Lead in the ambient air and blood of children in Helsinki, *The Science of the Total Environment* **219**: 1-5.

338. PRASAD M., AMRITPHALE S.S., SAXENA S. & CHANDRA N., 2000, Separation of lead ions on francolite surfaces, *Separation Science and Technology* **35** (15): 2431-2442.

Q

339. QU W., DIWAN B.A., LIU J., GOYER R.A., DAWSON T., HORTON J.L., CHERIAN M.G. & WAALKES M.P., 2002, The metallothionei-null phenotype is associated with heightened sensitivity to lead toxicity and an inability to form inclusion bodies, *American Journal of Pathology* **160** (3): 1047- 1056.

340. QUARTERMAN J. & MORRISON J.N., 1975, The effects of dietary calcium and phosphorus on the retention and excretion of lead in rats, *British Journal of Nutrition* **34**: 351-362.

341. QUARTERMAN J. & MORRISON E., 1978, The effects of age on the absorption and excretion of lead, *Environmental Research* **17**: 78-83.

342. QUARTERMAN J., MORRISON J.N. & HUMPHRIES W.R., 1978a, The influence of high dietary calcium and phosphate on lead uptake and release, *Environmental Research* **17**: 60-67.

343. QUARTERMAN J., MORRISON E., MORRISON J.N. & HUMPHRIES W.R., 1978b, Dietary protein and lead retention, *Environmental Research* **17**: 68-77.

R

344. RABINOWITZ M., KOPPLE J.D. & WETHERILL G.W., 1980, Effect of food intake and fasting on gastrointestinal lead absorption in humans, *The American Journal of Clinical Nutrition* **33**: 1784-1788.

345. RABINOWITZ M., WETHERILL G.W. & KOPPLE J.D., 1974, Studies of humans lead metabolism by use of stable isotope tracers, *Environmental Health Perspectives* **7**: 145-153.

346. RABINOWITZ M.; WETHERILL G.W. & KOPPLE J.D., 1975, Absorption, storage, and excretion of lead by normal humans, In: *Trace Substances in Environmental Health, vol IX*, Hemphill D.D. (ed), Columbia, p. 361-368.

347. RABINOWITZ M.B., WETHERILL G.W. & KOPPLE J.D., 1976, Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans, *The Journal of Clinical Investigation* **58**:260-270.

348. RAGAN H.A., 1977, Effects of iron deficiency on the absorption and distribution of lead and cadmium in rats, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **90** (4): 700-706.

349. RAHMAN A. & YOUSUF F.A., 2002, Lead levels in primary teeth of children in Karachi, *Annals of Tropical Paediatrics* **22** (1): 79-83.

350. RAPINAT M., 2001, Respect des normes "eau potable" au robinet de l'abonné : vers un partage des responsabilités, *Techniques Sciences Méthodes* **1** : 59-62.

351. REICHERT J. & BINNER J.G.P., 1996, An evaluation of hydroxyapatite-based filters for removal of heavy metal ions from aqueous solutions, *Journal of Materials Science* **31** (5): 1231-1241.

352. RENDALL R.E.G., BAILY P. & SOSKOLNE C.L., 1975, The effect of particle size on absorption of inhaled lead, *American Industrial Hygiene Association Journal* **36**: 207-213.

353. ROBERTSON I.K. & WORWOOD M., 1978, Lead and iron absorption from rat small intestine: the effect of dietary Fe deficiency, *British Journal of Nutrition* **40**: 253-260.

354. ROTHENBERG S.J., KHAN F., MANALO M., JIANG J., CUELLAR R., REYES S., ACOSTA S., JAUREGUI M.,DIAZ M., SANCHEZ M., TODD A.C. & JOHNSON C., 2000, Maternal bone lead contribution to blood lead during and after pregnancy, *Environmental Research Section A* **82**: 81-90.

355. ROTHENBERG S.J., KONDRASHOV V., MANALO M., MANTON W.I., KHAN F., TODD A.C. & JOHNSON C., 2001, Seasonal variation in bone lead contribution to blood lead during pregnancy, *Environmental Research Section A* **85** (3): 191-194.

356. ROYER-MORROT M.J., 1996, Le plomb dans l'organisme humain: aspects toxicocinétique et analytique, In: MORLOT M., *Aspects analytiques du plomb dans l'environnement*, Technique & Documentation, Paris, Chapitre IV.3, p313-324.

357. RUBY M.V., DAVIS A. & NICHOLSON A., 1994, *In situ* formation of lead phosphates in soil as a method to immobilize lead, *Environmental Science and Technology* **28**: 648-654.

358. RUBY M.V., DAVIS A., SCHOOF R., EBERLE S. & SELLSTONE C.M., 1996, Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physically based extraction test, *Environmental Science and Technology* **30**: 422-430.

S

359. SAALFELD U., MEENEN N.M., JÜRES T.T. SAALFELD H., 1994, Solubility behaviour of synthetic hydroxyapatites in aqueous solution: influence of amorphous constituents on pH value, *Biomaterials* **15** (11): 905-908.

360. SALTZMAN B.E., GROSS S.B., YEAGER D.W., MEINERS B.G. & GARTSIDE P.S., 1990, Total body burdens and tissue concentrations of lead, cadmium, copper, zinc, and ash in 55 human cadavers, *Environmental Research* **52**: 126-145.

361. SANCHEZ S., PERES AGUILLAR R., GENTA S., AYBAR M., VILLECO E. & SANCHEZ RIERA A., 2001, Renal extracellular matrix alterations in lead-treated rats, *Journal of Applied Toxicology* **21** (5): 417-423.

362. SANTOS J.L., FONTANELLAS A., MORAN M.J. & ENRIQUEZ DE SALAMANCA R., 1999, Nonsynergic effect of ethanol and lead on heme metabolism in rats, *Ecotoxicology and Environmental Safety* **43** (1): 98-102.

363. SANTOSA E.B., FORSTER S., GRIMM F. & STOLLE A., 2001, Comparative studies of the effects of lead, iron and zinc shot on the bones of chickens and the subsequent contamination of the surrounding tissue, part 2, *Fleischwirtschaft* **81** (2): 72-74.

364. SARGENT J.D., BROWN M.J., FREEMAN J.L., BAILEY A., GOODMAN D. & FREEMAN D.H., 1995, Childhood lead poisoning in Massachusetts Communities: its association with sociodemographic and housing characteristics, *American Journal of Public Health* **85** (4): 528-534.

365. SCHELL L.M., STARK A.D., GOMEZ M.I. & GRATTAN W.A., 1997, Blood lead level, by year and season, among poor pregnant women, *Archives of Environmental Health* **52** (4): 286-291.

366. SCHNAAS L., ROTHENBERG S.J., PERRONI E., MARTINEZ S., HERNANDEZ C. & HERNANDEZ R.M., 2000, Temporal pattern in the effect of postnatal blood lead level on intellectual development of young children, *Neurotoxicology and Teratology* **22**: 805-810.

367. SCHNEIDER J.S., LEE M.H., ANDERSON W., ZUCK L. & LIDSKY T.I., 2001, Enriched environment during development is protective against lead-induced neurotoxicity, *Brain Research* **896** (1-2): 48-55.

368. SCHÜTZ A., SKERFVING S., CHRISTOFFERSSON J.O. & TELL I., 1987, Chelatable lead versus lead in trabecular and compact bone, *Science of the Total Environment* **61**: 201-209.

369. SCHÜTZ A., BERGDAHL I.A., AKHOLM A. & SKERFVING S., 1996, Measurement by ICP-MS of lead in plasma and whole blood of lead workers and controls, *Occupational and Environmental Medicine* **53**: 736-740.

370. SCHWARTZ J., LANDRIGAN J.L., BAKER E.L., ORENSTEIN W.A. & VON LINDERN I.H., 1990, Lead-induced anemia: dose-response relationships and evidence for a threshold, *American Journal of Public Health* **80** (2): 165-168.

371. SCHWARTZ B.S., LEE B.K., STEWART W., AHN K.D., SPRINGER K. & KELSEY K., 1995, Association of δ-aminolevulinic acid dehydratase genotype with plant, exposure duration, and blood lead and zinc protoporphyrin levels in Korean lead workers, *American Journal of Epidemiology* **142** (7): 738-745.

372. SEIFERT M. & ANKE M., 2000, Alimentary lead intake of adults in Thuringia/Germany determined with the duplicate portion technique, *Chemosphere* **41**: 1037-1043.

373. SENAPATI S.K., DEY S., DWIVEDI S.K., PATRA R.C. & SWARUP D., 2000, Effect of thiamine hydrochloride on lead induced lipid peroxidation in rat liver and kidney, *Veterinary and Human Toxicology* **42** (4): 236-237.

374. SERVICE CANADIEN DE LA FAUNE, Environnement Canada, 1999, adresse internet: http://www.cws-scf.ec.gc.ca/pub/ops/hs88/chapit1.html

375. SEUX R. & DAB W., 1994, Evaluation de l'exposition au plomb et stratégie de prévention, *Techniques Sciences Méthodes* **2**: 73-78.

376. SEUX R., CLEMENT M., GRALL B. & DELANGLE A., 1994, Etude expérimentale des facteurs qui conditionnent le comportement de l'eau au contact des canalisations qui contiennent du plomb, *Techniques Sciences Méthodes* **3**: 145-151.

377. SHASHKOVA I.L., RAT'KO A.I. & KITIKOVA N.V., 1999, Removal of heavy metal ions from aqueous solutions by alkaline-earth metal phosphates, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **160** (3): 207-215.

378. SHEN X.M., WU S.H., YAN C.H., ZHAO W., AO L.M., ZHANG Y.W., HE J.M., YING J.M., LI R.Q., WU S.M. & GUO D., 2001, Delta-aminolevulinate dehydratase polymorphism and blood lead levels in Chinese children, *Environmental Research Section A* **85** (3): 185-190.

379. SHERLOCK J.C., ASHBY D., DELVES H.T., FORBES G.I., MOORE M.R., PATTERSON W.J., POCOCK S.J., QUINN M.J., RICHARDS W.N. & WILSON T.S, 1984, Reduction in exposure to lead from drinking water and its effect on blood lead concentrations, *Human Toxicology* **3**: 383-392.

380. SILBERGELD E.K., WAALKES M. & RICE J.M., 2000, Lead as a carcinogen: experimental evidence and mechanisms of action, *American Journal of Industrial Medicine* **38** (3): 316-323.

381. SIMON J.A. & HUDES E.S., 1999, Relation of ascorbic acid to blood lead levels, *The Journal of the American Medical Association* **281** (24): 2289-2293.

382. SIMONS T.J.B., 1988, Lead-calcium interactions and lead toxicity, *Handbook Experimental Pharmacology* **83**: 509-525.

383. SIMONS T.J.B., 1993, Lead-calcium interactions in cellular lead toxicity, *Neurotoxicology* **14** (2-3): 77-86.

384. SINGH N., THIND I.S., VITALE L.F. & PAWLOW M., 1979, Intake of magnesium and toxicity of lead: an experimental model, *Archives of Environmental Health* **34** (3): 168-173.

385. SINNAEVE O., BERTHIER M., GUILLARD O., PERAULT M.C. & ORIOT D., 1999, Le saturnisme chronique chez l'enfant aujourd'hui. Une pathologie de la pauvreté et de l'exclusion, *Archives de Pédiatrie* **6** (7): 762-767.

386. SMITH C.M., DELUCAS H.F., TANAKA Y. & MAHAFFEY K.R., 1978, Stimulation of lead absorption by vitamin D administration, *Journal of Nutrition* **108**: 843-847.

387. SMITH C.M., DELUCAS H.F., TANAKA Y. & MAHAFFEY K.R., 1981, Effect of lead ingestion on functions of vitamin D and its metabolites, *Journal of Nutrition* **111**: 1321-1329.

388. SMITH D., HERNANDEZ-AVILA M. TELLEZ-ROJO M.M., MERCADO A. & HU H., 2002, The relationship between lead in plasma and whole blood in women, *Environmental Health Perspectives* **110** (3): 263-268.

389. SMITH D.R., WOOLARD D., LUCK M.L. & LAUGHLIN N.K., 2000, Succimer and the reduction of tissue lead in juvenile monkeys, *Toxicology and Applied Pharmacology* **166**: 230-240.

390. SOLDATOVIC D., MATOVIC V. & VUJANOVIC D., 1993, Prophylactic effect of high magnesium intake in rabbits exposed to prolonged lead intoxication, *Magnesium Research* **6** (2): 145-148.

391. SOLDATOVIC D., VUJANOVIC D., MATOVIC V. & PLAMENAC Z., 1997, Compared effects of high oral Mg supplements and of EDTA chelating agent on chronic lead intoxication in rabbits, *Magnesium Research* **10** (2): 127-133.

392. SOLÉ E., BALLABRIGA A. & DOMINGUEZ C., 1998, Lead exposure in the general population of the metropolitan area of Barcelona: blood levels and related factors, *The Science of the Total Environment* **224** (1-3): 19-27.

393. SORRELL M., ROSEN J.F. & ROGINSKY M., 1977, Interactions of lead, calcium, vitamin D, and nutrition in lead-burdened children, *Archives of Environmental Health* :160-164.

394. SPEVACKOVA V. & SMID J., 1999, Determination of lead in teeth of children for monitoring purposes by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B* **54**: 865-871.

395. SPICKETT J.T. & BELL R.R., 1983, The influence of dietary phosphate on the toxicity of orally ingested lead in rats, *Food and Chemical Toxicology* **21** (2): 157-161.

396. STAUBER J.L., FLORENCET.M.,GULSON B.L. & DALE L.S., 1994, Percutaneous absorption of inorganic lead compounds, *The Science of the Total Environment* **145**: 55-70.

397. STAESSEN J.A., 1995, Low-level lead exposure, renal function and blood pressure, *Verk K Acad Geneeskd Belg* **57** (6): 527-574.

398. STAESSEN J.A., ROELS H., LAUWERYS R.R. & AMERY A., 1995, Low-level lead exposure and blood pressure, *Journal of Human Hypertension* **9** (5): 303-328.

399. STAESSEN J.A., ROELS H. & FAGARD R., 1996, Lead exposure and conventional and ambulatory blood pressure: a prospective population study, *the Journal of the American Medical Association* **275** (20): 1563-1570.

400. STANFORTH R. & QIU J., 2001, Effect of phosphate treatment on the solubility of lead in contaminated soil, *Environmental Geology* **41** (1-2): 1-10.

401. STEENLAND K. & BOFFETTA P., 2000, Lead and cancer in humans: where are we now?, *American Journal of Industrial Medicine* **38** (3):295-299.

402. STONE C.L. & SOARES J.H., 1976, The effect of dietary selenium level on lead toxicity in the Japanese Quail, *Poultry Science* **55**: 341-349.

403. SUGIYAMA S., FUKUDA N., MATSUMOTO H., HAYASHI H., SHIGEMOTO N., HIRAGA Y. & MOFFAT J.B., 1999, Interdependence of anion and cation exchanges in calcium hydroxyapatite: Pb^{2+} and Cl^{-}, *Journal of Colloid and Interface Science* **220**: 324-328.

404. SUGIYAMA S., ICHII T., HAYASHI H. & TOMIDA T., 2002, Lead immobilization by non-apatite-type calcium phosphates in aqueous solutions, *Inorganic Chemistry Communications* **5** (2): 156-158.

405. SUZUKI T. & YOSHIDA A., 1979, Effect of dietary supplementation of iron and ascorbic acid on lead toxicity in rats, *Journal of Nutrition* **109**: 982-988.

406. SUZUKI T., HATSUSHIKA T. & HAYAKAWA Y., 1981, Synthetic hydroxyapatites employed as inorganic cation-exchangers, *J Chem Soc Faraday Trans 1* **77**: 1059-1062.

407. SUZUKI T., HATSUSHIKA T. & MIYAKE M., 1982, Synthetic hydroxyapatites as inorganic cation exchangers, part 2, *J Chem Soc Faraday Trans 1* **78**: 3605-3611.

408. SUZUKI T., ISHIGAKI K. & MIYAKE M., 1984, Synthetic hydroxyapatites as inorganic cation exchangers, part 3: exchange characteristics of lead ions (Pb^{2+}), *J Chem Soc Faraday Trans 1* **80**: 3157-3165.

T

409. TAKEUCHI Y. & ARAI H., 1990, Removal of coexisting Pb^{2+}, Cu^{2+} and Cd^{2+} ions from water by addition of hydroxyapatite powder, *Journal of Chemical Engineering of Japan* **23** (1): 75-80.

410. TAKEUCHI Y., SUZUKI T. & ARAI H., 1988, A study of equilibrum and mass transfer in processes for removal of heavy-metals ions by hydroxyapatite, *Journal of Chemical Engineering of Japan* **21** (1): 98-100.

411. TAKITO J., SHINKI T., SASAKI T. & SUDA T., 1990, Calcium uptake by brush-border and basolateral membrane vesicles in chick duodenum, *American Journal of Physiology* **258** (Gastrointestinal Liver Physiology 21): G16-G23.

412. TANDON S.K., FLORA S.J.S. & SINGH S., 1987, Chelation in metal intoxication XXIV: Influence of various components of vitamin B complex on the therapeutic efficacy of disodium calcium versenate in lead intoxication, *Pharmacology and Toxicology* **60** (1): 62-65.

413. TANDON S.K., DHAWAN M., KUMAR A. & FLORA S.J.S., 1992, Influence of selenium supplementation during chelation of lead in rats, *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* **36** (3): 201-204.

414. TANDON S.K., SINGH S., PRASAD S. & MATHUR N., 1997, Influence of L-lysine and zinc administration during exposure to lead or lead and ethanol in rats, *Biological Trace Element Research* **57**: 51-58.

415. TAVARES E. CARRERAS O., GOMEZ-TUBIO A., MURILLO D. & MURILLO M.L., 2000, Effects of folic acid and amino acids supplementation on zinc intestinal absorption in the progeny of ethanol-treated rats, *Journal of Physiology and Biochemistry* **56** (3): 247-256.

416. THIRIAT-DELON H., STEFFAN J., NICOLAS D. & DUC M., 1994, Enquête de dépistage du saturnisme infantile d'origine hydrique dans les Vosges, *Santé Publique* **3**: 263-273.

417. THOMAS K.W., PELLIZARI E.D. & BERRY M.R., 1999, Population-based dietary intakes and tap water concentrations for selected elements in the EPA Region V National Human Exposure Assessment Survey (NHEXAS), *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* **9**: 402-413.

418. THOMAS V.M., SOCOLOW R.H., FANELLI J.J. & SPIRO T.G., 1999, Effects of reducing lead in gasoline: an analysis of the international experience, *Environmental Science and Technology* **33** (22): 3942-3948.

419. THOMPSON J.A., 1971, Balance between intake and output of lead in normal individuals, *British Journal of Industrial Medicine* **28**: 189-194.

420. TODD A.C., CARROLL S., GODBOLD J.H., MOSHIER E.L. & KHAN F.A., 2001a, The effect of measurement location on tibia lead XRF measurement results and uncertainty, *Physics in Medicine and Biology* **46**: 29-40.

421. TODD A.C., LEE B.K., LEE G.S., AHN K.D., MOSHIER E.L. & SCHWARTZ B.S., 2001b, Predictors of DMSA chelatable lead, tibial lead, and blood lead in 802 Korean lead workers, *Occupational and Environmental Medicine* **58** (2): 73-80.

422. TOLA A., HERNBERG S., ASP S. & NIKKANEN J., 1973, Parameters indicative of absorption and biological effect in new lead exposure: a prospective study, *British Journal of Industrial Medicine* **30**: 134-141.

423. TONG S., BAGHURST P., McMICKAEL A., SAWYER M. & MUDGE J., 1996, Lifetime exposure to environmental lead and children's intelligence at 11-13 years: the Port Pirie cohort Study, *BMJ* **312**: 1569-1575.

424. TORRES-SANCHEZ L.E., BERKOWITZ G., LOPEZ-CARRILLO L., TORRES-ARREOLA L., RIOS C. & LOPEZ-CERVANTES M., 1999, Intrauterine lead exposure and preterme birth, *Environmental Research* **81** (4): 297-301.

V

425. VAGLENOV A., CREUS A., LALTCHEV S., PETKOVA V., PAVLOVA S. & MARCOS R., 2001, Occupational exposure to lead and induction of genetic damage, *Environmental Health Perspective* **109** (3): 295-298.

426. VALSAMI-JONES E., RAGNARSDOTTIR K.V., PUTNIS A., BOSBACH D., KEMP A.J. & CRESSEY G., 1998, The dissolution of apatite in the presence of aqueous metal cations at pH 2-7, *Chemical Geology* **151** (1-4): 215-233.

427. VALVERDE M., TREJO C. & ROJAS E., 2001, Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction, *Mutagenesis* **16** (3): 265-270.

428. VAN DER VOET G.B. & DE WOLFF F.A., 1998, Intestinal absorption of aluminium: effect of sodium and calcium, *Archives of Toxicology* **72** (2): 110-114.

429. VARNAI V.M., PIASEK M., BLANUSA M., SARIC M.M., SIMIC D. & Kostial K., 2001, Calcium supplementation efficiently reduces lead absorption in suckling rats, *Pharmacology and Toxicology* **89** (6): 326-330.

430. VIG E.K. & HU H., 2000, Lead toxicity in older adults, *Journal of the American Geriatrics Society* **48** (11): 1501-1506.

431. VIJ A.G., SATIJAN K. & FLORA S.J.S., 1998, Lead induced disorders in hematopoietic and drug metabolising enzyme system and their protection by ascorbic acid supplementation, *Biomedical and Environmental Sciences* **11** (7): 7-14.

432. VILAGINES R. & LEROY P., 1995, Le plomb dans les eaux d'alimentation, détermination de sa concentration et incidence des nouvelles recommandations de l'Organisme Mondial de la Santé (OMS) sur la gestion des réseaux de distribution publics et privés, *Bull Acad Nattle Med* **179** (7): 1393-1408.

W

433. WASSERMAN G.A., LIU X., POPOVAC D., FACTOR-LITVAK P. KLINE J., WATERNAUX C., LOLACONO N. & GRAZIANO J.H., 2000, The Yugoslavia prospective lead study: contributions of prenatal and postnatal lead exposure to early intelligence, *Neurology and Teratology* **22**: 811-818.

434. WALKER W.A., 1985, Absorption of protein and protein fragments in developing intestine: role in immunologic/allergic reactions, *Pediatrics* **75**: 167-171.

435. WATSON W.S., HUME R. & MOORE M.R., 1980, Oral absorption of lead and iron, *The Lancet* **2**: 236-237.

436. WATSON W.S., MORRISON J., BETHEL M.I.F., BALDWIN N.M., LYON D.T.B., DOBSON H., MOORE M.R. & HUME R., 1986, Food iron and lead absorption in humans, *The American Journal of Clinical Nutrition* **44**: 248-256.

437. WATT G.C.M., BRITTON A., GILMOUR W.H., MOORE M.R., MURRAY G.D., ROBERTSON S.J. & WOMERSLEY J., 1996, Is lead in tap water still a public health problem? An observation study in Glasgow, *BMJ* **313**: 979-981.

438. WATT G.C.M., BRITTON A., GILMOUR W.H., MOORE M.R., MURRAY G.D. & ROBERTSON S.J., 2000, Public health implications of new guidelines for lead in drinking water: a case study in an area with historically high water lead levels, *Food and Chemical Toxicology* **38**: S73-S79.

439. WEYERMANN M. & BRENNER H., 1997, Alcohol consumption and smoking habits as determinants of blood lead levels in a national population sample from Germany, *Archives of Environmental Health* **52** (3): 233-236.

440. WEYERMANN M. & BRENNER H., 1998, Factors affecting bone demineralization and blood lead levels of postmenopausal women. A population-based study from Germany, *Environmental Research* **76** (1): 19-25.

441. WHITE M.A. & SABBIONI E., 1998, Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European Union X, A study of 13 elements in blood and urine of a United Kingdom population, *The Science of the Total Environment* **216**: 253-270.

442. WITTMERS L.E., WALLGREN J., ALICH A., AUFDERHEIDE A.C. & RAPP G., 1988, Lead in bone IV: distribution of lead in the human skeleton, *Archives of Environmental Health* **43** (6): 381-391.

443. WONG O. & HARRIS F., 2000, Cancer mortality study of employees at lead battery plants and lead smelters, 1947-1995, *American Journal of Industrial Medicine* **38** (3): 255-270.

444. WRIGHT R.O., HU H., MAHER T.J., AMARASIRIWARDENA C., CHAIYAKUL P., WOOLF A.D. & SHANNON M.W., 1998, Effect of iron deficiency anemia on lead distribution after intravenous dosing in rats, *Toxicology and Industrial Health* **14** (4): 547-551.

X

445. XU Y. & SCHWARTZ F.W., 1994, Lead immobilization by hydroxyapatite in aqueous solutions, *Journal of Contaminant Hydrology* **15**: 187-206.

Y

446. YANAI S.& SACHS K.M., 1993, Absorption and accumulation of cadmium, lead and mercury from foods by rats, *Food and Chemical Toxicology* **31** (5): 351-355.

447. YANG J., MOSBY D.E., CASTEEL S.W. & BLANCHAR R.W., 2001, Lead immobilization using phosphoric acid in a smelter-contaminated urbansoil, *Environmental Science and Technology* **35** (17): 3553-3359.

448. YIING L.M., RHOADS G.G. & LIOY P.J., 2000, Seasonal influence on childhood lead exposure, *Environmental Health Perspectives* **108** (2): 177-182.

449. YIP P., NORRIS T.N. & ANDERSON A.S., 1981, Mild lead poisoning is strongly associated with iron deficiency, *Pediatric Research* **15** (4, Pt2): 550-.

450. YSART G., MILLER P., CROASHDALE M., CREWS H., ROBB P., BAXTER M., DE L'ARGY C. & HARRISON N., 2000, 1997 UK total diet study-dietary exposures to aluminium, arsenic, cadmium, chromium, copper, lead, mercury, nickel, selenium, tin and zinc, *Food Additives and Contaminants* **17** (9): 775-786.

451. YUASA H., NUMATA W., OZEKI S. & WATANABE J., 1995, Effect of dosing volume on gastrointestinal absorption in rats : analysis of the gastrointestinal disposition of L-glucose and estimation of *in vivo* intestinal membrane permeability, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **84** (4): 476-481.

Z

452. ZHANG P. & RYAN J.A., 1998, Formation of pyromorphite in anglesite-hydroxyapatite suspension under varying pH conditions, *Environmental Science and Technology* **32**: 3318-3324.

453. ZHANG P. & RYAN J.A., 1999a, Formation of chloropyromorphite from galena (PbS) in the presence of hydroxyapatite, *Environmental Science and Technology* **33**: 618-624.

454. ZHANG P. & RYAN J.A., 1999b, Transformation of Pb(II) from cerrusite to chloropyromorphite in the presence of hydroxyapatite under varying conditions of pH, *Environmental Science and Technology* **33**: 625-630.

455. ZHANG Z.W., MOON C.S., SHIMBO S., WATANABE T., NAKATSUKA H., MATSUDA-INOGUCHI N., HIGASHIKAWA K. & IKEDA M., 2000, Further reduction in lead exposure in women in general populations in Japan in the 1990s, and comparison with levels in east and south-east Asia, *International Archives of Occupational and Environmental Health* **73** (2): 91-97.

456. ZHANG P., RYAN J.A. & YANG J., 1998, *In vitro* Pb solubility in the presence of hydroxyapatite, *Environmental Science and Technology* **32**: 2763-2768.

457. ZHANG Z.W., SHIMBO S., WATANABE T., SRIANUJATA S., BANJONG O., CHITCHUMROONCHOKCHAI C., NAKATSUKA H., MATSUDA-INOGUCHI N., HIGASHIKAWA K. & IKEDA M., 1999a, Non-occupational lead and cadmium exposure of adult women in Bangkok, Thailand, *The Science of the Total Environment* **226**: 65-74.

458. ZHANG Z.W., QU J.B., WATANABE T., SHIMBO S., MOON C.S. & IKEDA M., 1999b, Exposure of citizens in China and in Japan to lead and cadmium: a comparative study, *Toxicology Letters* **108**: 167-172.

459. ZIEGLER E.E., EDWARDS B.B., JENSEN R.L., MAHAFFEY K.R. & FOMON S.J., 1978, Absorption and retention of lead by infants, *Pediatric Research* **12**: 29-34.

ANNEXES

SOMMAIRE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : Code de bonne pratique du consommateur : l'eau potable est un produit alimentaire (Rapinat, 2001) 145

ANNEXE 2 : Toxicité aiguë et sub-aiguë du plomb 146

ANNEXE 3 : Contrôles de qualité des croquettes et des copeaux 148

ANNEXE 4 : Influence du sel (NaCl ou $NaClO_4$) sur l'absorption du plomb par perfusion intestinale *in situ* 150

ANNEXE 5 : Droite de régression entre la plombémie des rats et la concentration en plomb perfusée 152

ANNEXE 6 : Influence du sel (NaCl ou $NaClO_4$) sur l'absorption du plomb, en présence d'hydroxyapatite dissoute, par perfusion intestinale in situ 153

ANNEXE 7 : Teneurs tissulaires en métaux essentiels, chez les rats intubés 31 jours 154

ANNEXE 8 : Concentrations en plomb dans les tissus de rats témoins, selon diverses études 157

ANNEXE 9 : Influence de la forme chimique du plomb (chlorure ou acétate) sur son absorption, par perfusion intestinale *in situ* 158

ANNEXE 10 : Publication internationale 159

ANNEXE 11 : Publication internationale 170

ANNEXE 1 : Code de bonne pratique du consommateur : l'eau potable est un produit alimentaire (Rapinat, 2001)

ALIMENTS		EAU
Ne pas consommer un aliment après la date de péremption	1. Un vieillissement peut induire une dégradation de sa qualité	Faire couler l'eau après une absence de plusieurs jours (attention aux longues stagnations dans le réseau intérieur)
Nettoyage des récipients utilisés pour les aliments (emballages)	2. Veiller à la propreté du contenant	Purger 2 fois par an les équipements du réseau intérieur (ballon d'eau chaude ...)
Stockage au réfrigérateur de certains aliments périssables	3. Respecter les températures de conservation	Ne pas consommer l'eau des réseaux d'eau chaude Eviter de soutirer l'eau pour la boisson au mitigeur
Ne pas mettre en contact un aliment avarié avec un aliment sain	4. Eviter de propager une contamination	Mise en place de dispositif anti-retour sur le branchement Equipement auto-protégé contre le risque de retour d'eau
Bouchage hermétique de certains récipients Envelopper dans du papier d'argent certains aliments	5. Utiliser des matériels adaptés de manière correcte	Absence de corrosion par effet de pile (corrosion résultant du contact de matériaux différents : cuivre, acier galvanisé ...) Les accessoires et équipements doivent répondre aux spéciations sanitaires (flexible de douche, adoucisseurs ...)
Aération pour conserver les légumes Stockage de certains aliments (fromages, jambons secs) dans un milieu relativement sec	6. Respecter les modalités de bonne conservation	Eviter les points bas ou les zones chaudes Supprimer les bouts morts Eliminer les équipements inutilisés et donc non entretenus

ANNEXE 2 : Toxicité aiguë et sub-aiguë du plomb, d'après Morlot, 1996

Tableau XXIV : Toxicité aiguë du plomb chez les invertébrés et les poissons

	CL 50 en $mg.L^{-1}$				
Durée de l'exposition en jours	2	3	4	7	> 14
POISSONS					
Brachidanio rerio	493-517	474-493	406-474	-	-
Carassius auratus	-	-	-	4-121	-
Lepomis macrichirus	-	-	23-44	-	-
Pimephales promelas	-	-	4-8	-	-
Salmo gairdneri	-	-	1,2-1,5	-	-
Salvelinus fontinalis	-	-	336-410	-	-
MOLLUSQUES					
Corbicula sp.	5595-9113	2275-2424	933-1023	-	-
Lymnea emarginata	71	-	-	-	-
Mytilus edulis	-	-	-	-	< 5
INSECTES ET CRUSTACES					
Artemia salina	-	-	-	-	-
Daphnia hyalina	0,6	-	-	-	-
Daphnia magna	0,03-0,45	-	-	-	-
Ephemerella subvaria	-	-	-	16	3,5
Gammarus pseudolimnaeus	-	-	-	-	0,03
ANNELIDES					
Capitella capitata	-	-	1,2-6,8	-	-

Tableau XXV : Toxicité aiguë du plomb organique chez les mammifères, selon différentes voies d'administration

	DL 50 en $mg.kg^{-1}$					
Organisme	Dermique	Ingestion	Inhalation	Intragastrique	Intrapéritonéale	Intraveineuse
Rat	500-10 000	12,3-35 000	> 9 soit 85 $mg.L^{-1}.h^{-1}$	15	8-33	> 35
Souris	-	18->4 000	-	40	11-18	-
Lapin	147- >10 000	-	-	7	-	-
Cobaye	120 - > 10 000	-	-	-	-	-

Tableau XXVI : Toxicité sub-aiguë du plomb

ORGANISMES	EFFETS	DOSE
MAMMIFERES		
rat	accélération de la synthèse du glucose à partir de précurseurs non glucidiques augmentation de l'excrétion urinaire d'uroporphyrine et de protoporphyrine modification de la structure cellulaire, indiquant une mauvaise synthèse des protéines hépatiques	0,2 ou 1 $mg.kg^{-1}.j^{-1}$ par injection, 45 j
POISSONS		
Brachidanio rerio	péroxydation lipidique	0,01 à 0,20 $g.L^{-1}$
Carassius auratus	coagulation du mucus sur la totalité de l'épiderme	-
Catostomas commersoni	diminution de la ponte et augmentation de la mortalité du frai	0,10 à 0,30 $g.L^{-1}$
Cyprinus carpo	augmentation de la glycémie et du glycogène tissulaire	3,50 $g.L^{-1}$
Ictalarus punctatus	diminution de la ponte et augmentation de la mortalité du frai	0,07 à 0,12 $g.L^{-1}$
Lepomis macrichirus	diminution de la ponte et augmentation de la mortalité du frai	0,07 à 0,12 $g.L^{-1}$
Oncorhynchs kisutch	perturbation de la perméabilité des branchies	3,50 $g.L^{-1}$
Salmo gairdneri	diminution de la ponte et augmentation de la mortalité du frai lésions neurologiques : paralysie de la région caudale, atrophie musculaire	0,07 à 0,15 $g.L^{-1}$ 0,06 à 3,20 $g.L^{-1}$
Salvelinus namaycush	diminution de la ponte et augmentation de la mortalité du frai	0,05 à 0,08 $g.L^{-1}$
Lebistes reticulatus	modifications structurales au niveau du cœur et des reins	1,20 à 2,30 $g.L^{-1}$
MOLLUSQUES		
Mytilus edulis	inhibition de 50 % de la formation de filaments du byssus	2,50 $g.L^{-1}$
ANNELIDES		
Eisenia fetida andrei	péroxydation lipidique	0,13 à 4,0 $\mu g.cm^{-2}$

ANNEXE 3 : Contrôles de qualité des croquettes et des copeaux

CROQUETTES M 20 EXTRALABO
(établissements Piétrement, Provins, France)

INGREDIENTS

Blé, orge, son fin, tourteaux de soja, farine de cretons, farine de poisson, concentré de protéines de poisson, levure de bière, mélasse, sel, huile de maïs, carbonate de calcium, phosphate bicalcique, composé minéral, complexe vitaminique.

CONTROLES DE QUALITE PHYSIQUE

Dureté (indice Kahl)	:13
Durabilité	: 96,6 %
Diamètre moyen	: 13 mm
Longueur moyenne	: 23,5 mm

CONTROLES DE QUALITE CHIMIQUE (valeurs moyennes)

COMPOSITION GENERALE

Matières protéiques brutes	: 18,0 %
Matières grasses	: 3,2 %
Cellulose brute	: 3,6 %
Matières minérales	: 5,4 %
Humidité	: 11,0 %
Matières sèches	: 89,0 %
Extractif non azoté	: 59,8 %
Énergie métabolisable	: 3010 cal.kg^{-1}

MINERAUX (g.kg^{-1})

Calcium	: 10,0
Phosphore	: 7,2
Sodium	: 2,4
Potassium	: 7,3
Chlore	: 3,2
Magnésium	: 1,4

VITAMINES (UI.kg^{-1})

A	: 20000
D3	: 2000

VITAMINES ($mg.kg^{-1}$)

E	: 34,90
K3	: 2,26
B1	: 6,20
B2	: 6,30
B5	: 22,40
B6	: 4,20
B12	: 0,31
PP	: 103,30
H	: 0,22
Acide folique	: 0,83
Choline	: 2210,00

OLIGO ELEMENTS ($mg.kg^{-1}$)

Manganèse	: 85,0
Zinc	: 56,0
Cuivre	: 19,0
Cobalt	: 1,3
Iode	: 0,9
Fer	: 90,0
Sélénium	: 0,1

ACIDES AMINES ($g.kg^{-1}$)

Arginine	: 10,6
Lysine	: 8,9
Méthionine	: 4,0
Méthionine + cystine	: 6,0
Triptophane	: 2,1
Isoleucine	: 7,6
Phénylalanine	: 7,9
Thréonine	: 6,0
Valine	: 7,9
Histidine	: 4,0
Glycine	: 9,6
Leucine	: 12,5

METAUX TOXIQUES ($\mu g.kg^{-1}$)

Plomb	**: 110**
Arsenic	: 76
Cadmium	: 38
Mercure	: <5

COPEAUX DEPOUSSIERES EXTRALABO

METAUX TOXIQUES ($\mu g.kg^{-1}$)

Plomb	**: 55**
Arsenic	: <20
Cadmium	: 34
Mercure	: <10
Bore	: <20

ANNEXE 4 : Influence du sel (NaCl ou $NaClO_4$) sur l'absorption du plomb par perfusion intestinale *in situ*

Tableau XXVII : Concentrations en plomb dans le sang ($\mu g.L^{-1}$) et les organes ($\mu g.g^{-1}$) de rats perfusés pendant 60 min avec différentes solutions de plomb à 0,5, 1, 5, 10 ou 20 $mg.L^{-1}$ dans du $NaClO_4$, à pH = 3.

Tissus	Sacrifiés	Témoins	0,5 $mg.L^{-1}$	1 $mg.L^{-1}$	5 $mg.L^{-1}$	10 $mg.L^{-1}$	20 $mg.L^{-1}$
Sang	< 20	< 5,7	59 ± 26	148 ± 12	570 ± 121	1265 ± 277	2753 ± 600
Duodénum	< 0,07	< 0,07	0,47 ± 0,07	0,99 ± 0,24	2,9 ± 0,7	4,7 ± 1,6	7,2 ± 1,0
Jéjunum	0,03 ± 0,05	< 0,01	0,21 ± 0,03	0,40 ± 0,12	2,3 ± 0,7	3,3 ± 1,0	5,7 ± 0,7
Iléon	< 0,13	< 0,10	< 0,11	0,21 ± 0,03	1,2 ± 0,3	1,7 ± 0,5	4,8 ± 1,4
Foie	< 0,01	< 0,01	0,18 ± 0,08	0,43 ± 0,08	2,6 ± 0,8	5,5 ± 0,8	13 ± 2,1
Reins	< 0,02	< 0,02	0,10 ± 0,03	0,16 ± 0,05	1,3 ± 0,4	2,1 ± 0,6	5,5 ± 0,6
Cerveau	0,02 ± 0,02	< 0,01	< 0,02	< 0,02	< 0,02	0,02 ± 0,01	0,06 ± 0,01
Fémur	< 2,1	< 1,9	< 1,7	< 1,7	< 1,7	< 1,6	1,9 ± 0,13

Tableau XXVIII : Concentrations en plomb dans le sang ($\mu g.L^{-1}$) et les organes ($\mu g.g^{-1}$) de rats perfusés pendant 60 min avec différentes solutions de plomb à 1, 5 ou 10 $mg.L^{-1}$ dans du NaCl, à pH = 3.

Tissus	Sacrifiés	Témoins	1 $mg.L^{-1}$	5 $mg.L^{-1}$	10 $mg.L^{-1}$
Sang	< 20	< 7,8	154 ± 41	580 ± 89	1179 ± 283
Duodénum	< 0,07	< 0,10	1,1 ± 0,4	2,6 ± 0,6	5,2 ± 2,7
Jéjunum	0,03 ± 0,05	< 0,02	0,61 ± 0,14	1,7 ± 0,6	4,2 ± 1,1
Iléon	< 0,13	< 0,06	0,26 ± 0,05	1,4 ± 0,4	2,2 ± 1,0
Foie	< 0,02	< 0,02	0,53 ± 0,14	2,7 ± 0,6	4,9 ± 1,5
Reins	< 0,02	< 0,02	0,28 ± 0,08	1,6 ± 0,5	3,3 ± 1,1
Cerveau	0,02 ± 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02	0,06 ± 0,03
Fémur	< 2,1	< 1,7	< 1,7	< 1,7	< 1,6

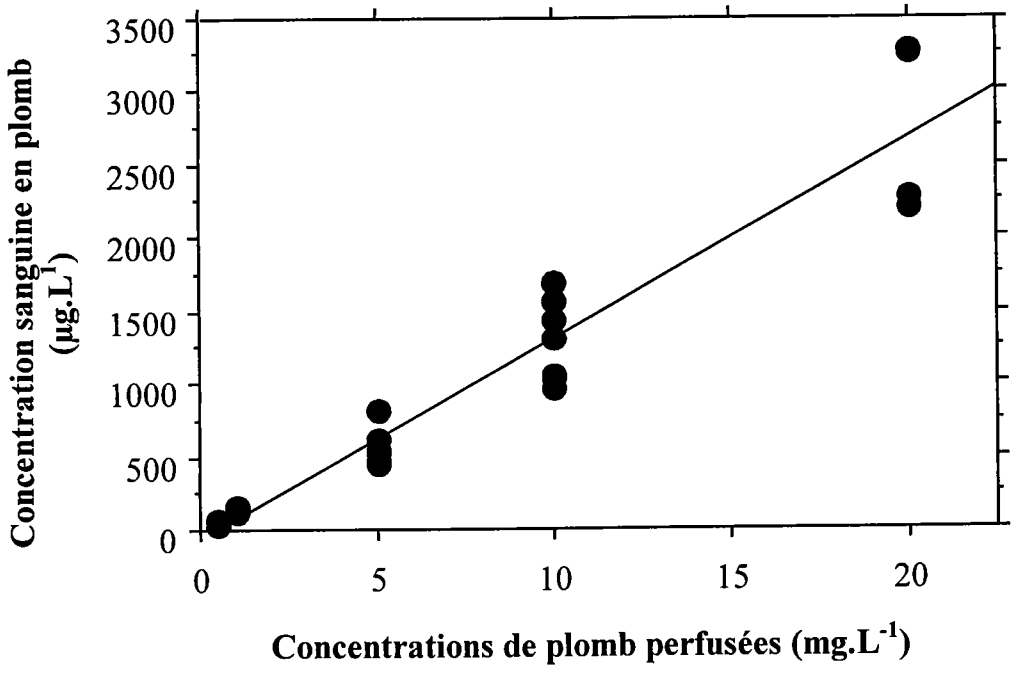
Tableau XXIX : Quantités de plomb dans le sang et les organes (µg) de rats perfusés pendant 60 min avec différentes solutions de plomb à 0,5, 1, 5, 10 ou 20 $mg.L^{-1}$ dans du $NaClO_4$, à pH = 3.

Tissus	Sacrifiés	Témoins	0,5 $mg.L^{-1}$	1 $mg.L^{-1}$	5 $mg.L^{-1}$	10 $mg.L^{-1}$	20 $mg.L^{-1}$
Sang	< 0,24	< 0,08	0,88 ± 0,36	2,3 ± 0,1	8,6 ± 1,9	22 ± 5,0	42 ± 9,8
Duodénum	< 0,01	< 0,01	0,08 ± 0,02	0,16 ± 0,03	0,45 ± 0,11	0,73 ± 0,32	1,3 ± 0,1
Jéjunum	0,06 ± 0,08	< 0,02	0,34 ± 0,05	0,56 ± 0,06	3,6 ± 1,2	5,7 ± 1,3	11 ± 0,8
Iléon	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,03 ± 0,01	0,15 ± 0,04	0,24 ± 0,07	0,70 ± 0,13
Foie	< 0,11	< 0,07	1,5 ± 0,9	3,2 ± 0,7	19 ± 6,4	42 ± 6,2	93 ± 13
Reins	< 0,02	< 0,03	0,18 ± 0,08	0,27 ± 0,07	2,1 ± 0,7	3,9 ± 1,1	10 ± 1,6
Cerveau	0,05 ± 0,04	< 0,02	< 0,03	< 0,03	< 0,03	0,05 ± 0,02	0,11 ± 0,02
Fémur	< 1,2	< 1,2	< 1,2	< 1,2	< 1,2	< 1,2	1,3 ± 0,04

Tableau XXX : Quantités de plomb dans le sang et les organes (µg) de rats perfusés pendant 60 min avec différentes solutions de plomb à 1, 5 ou 10 $mg.L^{-1}$ dans du NaCl, à pH = 3.

Tissus	Sacrifiés	Témoins	1 $mg.L^{-1}$	5 $mg.L^{-1}$	10 $mg.L^{-1}$
Sang	< 0,24	< 0,14	2,5 ± 0,6	9,1 ± 1,2	20,4 ± 7,1
Duodénum	< 0,01	< 0,02	0,17 ± 0,06	0,46 ± 0,13	0,99 ± 0,54
Jéjunum	0,06 ± 0,08	< 0,05	0,95 ± 0,11	2,7 ± 0,9	7,9 ± 3,6
Iléon	< 0,01	< 0,01	0,03 ± 0,01	0,21 ± 0,14	0,39 ± 0,25
Foie	< 0,11	< 0,15	3,3 ± 1,1	20,1 ± 3,3	37,7 ± 9,6
Reins	< 0,02	0,02	0,45 ± 0,15	2,4 ± 0,7	5,7 ± 2,1
Cerveau	0,05 ± 0,04	< 0,03	< 0,03	< 0,03	0,10 ± 0,04
Fémur	< 1,2	< 1,2	< 1,2	< 1,2	< 1,2

ANNEXE 5 : Droite de régression entre la plombémie des rats et la concentration en plomb perfusée



$$Y = -62{,}059 + 137{,}373\ X$$
$$R^2 = 0{,}918$$

ANNEXE 6 : Influence du sel (NaCl ou $NaClO_4$) sur l'absorption du plomb, en présence d'hydroxyapatite dissoute, par perfusion intestinale *in situ*

Tableau XXXI : Pourcentage de plomb absorbé par des rats perfusés 60 min avec différentes solutions de plomb à 10 $mg.L^{-1}$ avec ou sans hydroxyapatite dissoute (4,85 $mg.L^{-1}$) dans du NaCl ou du $NaClO_4$, à pH = 3.

Traitement	% d'absorption
10 $mg.L^{-1}$ Pb NaCl	31,8 %
10 $mg.L^{-1}$ HA-Pb NaCl	28,9 %
10 $mg.L^{-1}$ Pb $NaClO_4$	33,8 %
10 $mg.L^{-1}$ HA-Pb $NaClO_4$	30,8 %

Tableau XXXII : Concentrations en plomb dans le sang ($\mu g.L^{-1}$) et les organes ($\mu g.g^{-1}$) de rats perfusés pendant 60 min avec différentes solutions de plomb à 10 $mg.L^{-1}$ avec ou sans hydroxyapatite dissoute (4,85 $mg.L^{-1}$) dans du NaCl ou du $NaClO_4$, à pH = 3.

Tissus	Pb $NaClO_4$	HA-Pb $NaClO_4$	Pb NaCl	HA-Pb NaCl
Sang	1265 ± 277	1175 ± 223	1179 ± 283	1183 ± 265
Duodénum	4,7 ± 1,6	5,3 ± 0,8	5,2 ± 2,7	3,9 ± 0,9
Jéjunum	3,3 ± 1,0	4,1 ± 1,2	4,2 ± 1,1	3,0 ± 0,7
Iléon	1,7 ± 0,5	1,8 ± 0,5	2,2 ± 1,0	2,1 ± 0,7
Foie	5,5 ± 0,8	5,5 ± 1,4	4,9 ± 1,5	4,7 ± 0,9
Reins	2,1 ± 0,6	2,0 ± 0,5	3,3 ± 1,1	2,8 ± 1,1
Cerveau	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,06 ± 0,03	0,04 ± 0,02
Fémur	< 1,6	< 1,7	< 1,6	< 1,6

Tableau XXXIII : Quantités de plomb dans le sang et les organes (μg) de rats perfusés pendant 60 min avec différentes solutions de plomb à 10 $mg.L^{-1}$ avec ou sans hydroxyapatite dissoute (4,85 $mg.L^{-1}$) dans du NaCl ou du $NaClO_4$, à pH = 3.

Tissus	Pb $NaClO_4$	HA-Pb $NaClO_4$	Pb NaCl	HA-Pb NaCl
Sang	22 ± 5,0	19 ± 3,6	20 ± 7,1	18 ± 3,4
Duodénum	0,73 ± 0,32	0,91 ± 0,24	0,99 ± 0,54	0,70 ± 0,17
Jéjunum	5,7 ± 1,3	6,2 ± 1,7	7,9 ± 3,6	4,5 ± 0,7
Iléon	0,24 ± 0,07	0,25 ± 0,08	0,39 ± 0,25	0,29 ± 0,09
Foie	42 ± 6,2	40 ± 8,8	38 ± 9,6	35 ± 3,6
Reins	3,9 ± 1,1	3,4 ± 0,9	5,7 ± 2,1	4,8 ± 1,8
Cerveau	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,10 ± 0,04	0,08 ± 0,03
Fémur	< 1,2	< 1,2	< 1,2	< 1,2

ANNEXE 7 : Teneurs tissulaires en métaux essentiels, chez les rats intubés 31 jours

Tableau XXXIV : Concentrations en calcium dans le sang total, le plasma ($mg.L^{-1}$) et les organes ($\mu g.g^{-1}$, excepté le fémur $mg.g^{-1}$) de rats intubés 31 jours consécutifs, avec une solution d'eau seule, d'hydroxyapatite seule, de plomb (10 $mg.kg^{-1}$) avec ou sans hydroxyapatite solide (100 $mg.kg^{-1}$).

Tissus	Témoins eau	Témoins HA	Pb	HA-Pb
Sang total	68 ± 2,4	67 ± 2,7	65 ± 1,2	65 ± 2,7
Plasma	124 ± 6,0	134 ± 5,1	125 ± 10,1	132 ± 7,9
Duodénum	105 ± 21	93 ± 12	91 ± 9,2	91 ± 11
Jéjunum	141 ± 12	134 ± 12	161 ± 26	134 ± 17
Iléon	180 ± 35	182 ± 41	168 ± 21	174 ± 32
Foie	34 ± 1,5	33 ± 1,3	36 ± 2,5	38 ± 2,2
Reins	74 ± 3,4	79 ± 12	77 ± 3,5	74 ± 3,6
Rate	37 ± 1,4	35 ± 1,9	36 ± 2,6	36 ± 0,8
Cerveau	57 ± 9,2	68 ± 13	58 ± 5,8	59 ± 5,1
Fémur	115 ± 8,2	114 ± 3,7	108 ± 4,7	104 ± 2,8

Tableau XXXV : Concentrations en phosphore dans le sang total, le plasma ($mg.L^{-1}$) et les organes ($mg.g^{-1}$) de rats intubés 31 jours consécutifs, avec une solution d'eau seule, d'hydroxyapatite seule, de plomb (10 $mg.kg^{-1}$) avec ou sans hydroxyapatite solide (100 $mg.kg^{-1}$).

Tissus	Témoins eau	Témoins HA	Pb	HA-Pb
Sang total	284 ± 29	291 ± 12	404 ± 89*	369 ± 89*
Plasma	186 ± 39	188 ± 55	190 ± 29	165 ± 40
Duodénum	2,4 ± 0,10	2,5 ± 0,15	2,3 ± 0,06	2,4 ± 0,07
Jéjunum	2,5 ± 0,06	2,5 ± 0,11	2,5 ± 0,15	2,5 ± 0,11
Iléon	2,5 ± 0,24	2,5 ± 0,16	2,6 ± 0,11	2,7 ± 0,24
Foie	2,9 ± 0,11	2,9 ± 0,10	3,1 ± 0,18	3,1 ± 0,06
Reins	2,5 ± 0,11	2,6 ± 0,08	2,6 ± 0,06	2,5 ± 0,13
Rate	2,9 ± 0,11	2,9 ± 0,13	2,9 ± 0,11	3,0 ± 0,07
Cerveau	2,8 ± 0,17	2,9 ± 0,12	2,9 ± 0,28	2,8 ± 0,06
Fémur	56 ± 4,1	56 ± 2,1	56 ± 2,5	55 ± 1,8

* comparaison témoins-traités

Tableau XXXVI : Concentrations en fer dans le sang total ($mg.L^{-1}$) et les organes ($\mu g.g^{-1}$) de rats intubés 31 jours consécutifs, avec une solution d'eau seule, d'hydroxyapatite seule, de plomb (10 $mg.kg^{-1}$) avec ou sans hydroxyapatite solide (100 $mg.kg^{-1}$).

Tissus	Témoins eau	Témoins HA	Pb	HA-Pb
Sang total	473 ± 60	490 ± 40	477 ± 15	461 ± 30
Duodénum	29 ± 3,3	27 ± 6,2	24 ± 1,4	26 ± 1,5
Jéjunum	20 ± 1,0	20 ± 1,6	20 ± 2,3	21 ± 2,5
Iléon	23 ± 3,1	22 ± 2,2	22 ± 1,7	22 ± 2,2
Foie	104 ± 12	106 ± 47	109 ± 17	114 ± 9,0
Reins	65 ± 6,6	64 ± 5,7	61 ± 5,9	61 ± 4,2
Rate	360 ± 71	341 ± 74	404 ± 72	281 ± 46
Cerveau	21 ± 4,3	20 ± 1,9	22 ± 3,0	21 ± 3,2

Tableau XXXVII : Concentrations en magnésium dans le sang total, le plasma ($mg.L^{-1}$) et les organes ($\mu g.g^{-1}$) de rats intubés 31 jours consécutifs, avec une solution d'eau seule, d'hydroxyapatite seule, de plomb (10 $mg.kg^{-1}$) avec ou sans hydroxyapatite solide (100 $mg.kg^{-1}$).

Tissus	Témoins eau	Témoins HA	Pb	HA-Pb
Sang total	47 ± 2,6	49 ± 3,1	52 ± 2,8	50 ± 1,5
Plasma	45 ± 8,1	47 ± 11	43 ± 10	45 ± 8,5
Duodénum	201 ± 10	201 ± 12	189 ± 4,2	199 ± 4,9
Jéjunum	229 ± 6,8	226 ± 8,5	247 ± 38	231 ± 14
Iléon	195 ± 15	198 ± 12	198 ± 5,8	209 ± 17
Foie	251 ± 8,2	252 ± 9,6	256 ± 26	261 ± 8,5
Reins	225 ± 7,9	232 ± 8,7	236 ± 7,4	228 ± 7,7
Rate	218 ± 9,7	211 ± 6,4	212 ± 8,3	215 ± 3,3
Cerveau	170 ± 9,2	180 ± 4,9	179 ± 17	173 ± 4,1

Tableau XXXVIII : Concentrations en zinc dans le sang total, le plasma ($\mu g.L^{-1}$) et les organes ($\mu g.g^{-1}$) de rats intubés 31 jours consécutifs, avec une solution d'eau seule, d'hydroxyapatite seule, de plomb (10 $mg.kg^{-1}$) avec ou sans hydroxyapatite solide (100 $mg.kg^{-1}$).

Tissus	Témoins eau	Témoins HA	Pb	HA-Pb
Sang total	5045 ± 223	5057 ± 214	5160 ± 261	4932 ± 176
Plasma	1869 ± 214	2096 ± 253	2109 ± 207	2173 ± 441
Duodénum	20 ± 2,0	19 ± 1,1	18 ± 0,61	19 ± 1,2
Jéjunum	28 ± 1,5	27 ± 2,8	28 ± 3,6	26 ± 1,8
Iléon	46 ± 5,5	51 ± 17	35 ± 9,1	34 ± 7,4
Foie	25 ± 0,85	25 ± 1,1	27 ± 1,1	28 ± 0,89
Reins	18 ± 0,87	19 ± 0,89	19 ± 0,35	19 ± 2,8
Rate	15 ± 0,40	15 ± 0,68	15 ± 0,56	15 ± 0,35
Cerveau	9,5 ± 0,76	10 ± 0,20	10 ± 0,64	9,5 ± 0,28

Tableau XXXIX : Concentrations en cuivre dans le sang total, le plasma ($\mu g.L^{-1}$) et les organes ($\mu g.g^{-1}$) de rats intubés 31 jours consécutifs, avec une solution d'eau seule, d'hydroxyapatite seule, de plomb (10 $mg.kg^{-1}$) avec ou sans hydroxyapatite solide (100 $mg.kg^{-1}$).

Tissus	Témoins eau	Témoins HA	Pb	HA-Pb
Sang total	1058 ± 208	950 ± 65	993 ± 62	921 ± 83
Plasma	1134 ± 105	1249 ± 102	1398 ± 111	1333 ± 258
Duodénum	1,1 ± 0,15	1,2 ± 0,22	1,1 ± 0,14	1,1 ± 0,09
Jéjunum	1,7 ± 0,07	1,7 ± 0,14	1,8 ± 0,27	1,7 ± 0,09
Iléon	0,98 ± 0,46	0,65 ± 0,45	0,60 ± 0,22	0,69 ± 0,32
Foie	4,6 ± 0,51	4,6 ± 0,35	4,8 ± 0,39	5,2 ± 0,97
Reins	8,7 ± 0,91	8,6 ± 1,6	8,2 ± 0,77	8,2 ± 2,0
Rate	1,0 ± 0,09	1,0 ± 0,02	0,96 ± 0,09	1,0 ± 0,44
Cerveau	2,0 ± 0,20	2,1 ± 0,07	2,1 ± 0,26	1,9 ± 0,11

ANNEXE 8 : Concentrations en plomb dans les tissus de rats témoins, selon diverses études

Références	Sang $\mu g.L^{-1}$	Foie $\mu g.g^{-1}$	Reins $\mu g.g^{-1}$	Cerveau $\mu g.g^{-1}$	Fémur $\mu g.g^{-1}$
Flora *et al.*, 1986	151 ± 4,8	3,62 ± 0,41	1,88 ± 0,19	0,63 ± 0,09	-
Flora & Tandon, 1986	91,2 ± 4,0	0,73 ± 0,08	0,94 ± 0,09	0,32 ± 0,04	-
Tandon *et al.*, 1987	134 ± 5,3	1,65 ± 0,20	2,24 ± 0,24	0,39 ± 0,05	-
Dhawan *et al.*, 1988	190 ± 40	0,42 ± 0,08	0,78 ± 0,05	0,09 ± 0,01	-
Dhawan *et al.*, 1989	115 ± 7,6	0,79 ± 0,06	1,22 ± 0,06	0,12 ± 0,02	-
Flora *et al.*, 1989b	61,6 ± 4,9	0,83 ± 0,11	0,68 ± 0,12	0,21 ± 0,007	-
Flora & Tandon, 1990	69,5 ± 5,8	0,56 ± 0,04	1,12 ± 0,10	0,09 ± 0,01	4,01 ± 0,25
Freeman *et al.*, 1996	12 à 50	0,009 à 0,232	0,124 à 0,551	-	2,23 à 3,69
Tandon *et al.*, 1997	17,5 ± 2,0	0,45 ± 0,22	0,48 ± 0,14	0,12 ± 0,10	-
Vij *et al.*, 1998	46,7 ± 14,9	0,63 ± 0,22	0,82 ± 0,24	-	-
Patra *et al.*, 2001	90 ± 10	0,42 ± 0,08	0,92 ± 0,11	0,71 ± 0,37	-

ANNEXE 9 : Influence de la forme chimique du plomb (chlorure ou acétate) sur son absorption, par perfusion intestinale *in situ*

Tableau XXXXI : Concentrations en plomb dans le sang ($\mu g.L^{-1}$) et les organes ($\mu g.g^{-1}$) de rats perfusés pendant 60 min avec différentes solutions de plomb (10 $mg.L^{-1}$) dans du NaCl, du $NaClO_4$, à pH = 3, ou dans du tampon acétate à pH = 5,8.

Tissus	$PbCl_2$ NaCl	$PbCl_2$ $NaClO_4$	Pb acétate
Sang	1179 ± 283	1265 ± 277	984 ± 74
Duodénum	5,2 ± 2,7	4,7 ± 1,6	1,8 ± 0,2
Jéjunum	4,2 ± 1,1	3,3 ± 1,0	2,7 ± 0,3
Iléon	2,2 ± 1,0	1,7 ± 0,5	2,9 ± 0,3
Foie	4,9 ± 1,5	5,5 ± 0,8	3,5 ± 0,2
Reins	3,3 ± 1,1	2,1 ± 0,6	2,8 ± 0,5
Cerveau	0,06 ± 0,03	0,02 ± 0,01	< 0,02
Fémur	< 1,6	< 1,6	< 1,8

Tableau XXXXII : Quantités en plomb dans le sang et les organes (μg) de rats perfusés pendant 60 min avec différentes solutions de plomb (10 $mg.L^{-1}$) dans du NaCl, du $NaClO_4$, à pH = 3, ou dans du tampon acétate à pH = 5,8.

Tissus	$PbCl_2$ NaCl	$PbCl_2$ $NaClO_4$	Pb acétate
Sang	20,4 ± 7,1	22,2 ± 5,0	14,6 ± 1,2
Duodénum	0,99 ± 0,54	0,73 ± 0,32	0,41 ± 0,03
Jéjunum	7,9 ± 3,6	5,7 ± 1,3	4,7 ± 0,7
Iléon	0,39 ± 0,25	0,24 ± 0,07	0,48 ± 0,23
Foie	37,7 ± 9,6	41,8 ± 6,2	24,8 ± 1,6
Reins	5,7 ± 2,1	3,9 ± 1,1	4,7 ± 1,4
Cerveau	0,10 ± 0,04	0,05 ± 0,02	< 0,03
Fémur	< 1,2	< 1,2	< 1,2

©Copyright 2000 by Humana Press Inc.
All rights of any nature, whatsoever, reserved.
0163–4984/00/7402–0141 $12.75

Nickel Absorption and Distribution from Rat Small Intestine *In Situ*

NATHALIE ARNICH, MARIE-CLAIRE LANHERS, LISIANE CUNAT, MICHEL JOYEUX, AND DANIEL BURNEL*

Département Environnement et Santé Publique, Laboratoire de Chimie Générale Appliquée à la Médecine, Faculté de Médecine, Université Henri Poincaré, Nancy I, 9 av de la Forêt de Haye, B.P. 184, 54505 Vandoeuvre les Nancy Cedex, France

Received March 17, 1999; Revised May 25, 1999; Accepted June 28, 1999

ABSTRACT

The aim of this work was to study the absorption of nickel chloride in rats by means of the intestinal perfusion *in situ* technique at nickel concentrations of 1, 5, 10, 25, and 100 mg/L. Active transport and facilitated diffusion seem to play an important role in the intestinal absorption of nickel at concentrations ≤ 10 mg/L. At higher concentrations, the absorption rate would be limited by saturation of the carriers. The distribution of the absorbed nickel was studied by intestinal perfusion of a 10-mg Ni/L solution for 30 or 60 min. Both in concentration and amount, the jejunum showed the higher values of absorbed nickel, followed by the kidneys and liver. When all of the collected organs (brain, heart, liver, lungs, spleen, kidneys, and testicles) and blood, but not the small intestine, are analyzed following a 60-min perfusion, it was found that 1% of the initial concentration had passed through the intestinal barrier.

Index Entries: Nickel chloride; intestinal absorption; nickel distribution; rat intestine.

INTRODUCTION

In view of the ever-increasing accumulation of heavy metals in water and in foods, it is necessary to have a better understanding the intestinal absorption of metal ions.

*Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed.

Nickel (Ni) is a first-row transition metal widely found in the environment. There are many studies on the effects of Ni by contact with the skin *(1–4)* and on respiratory effects following inhalation of nickel-containing dusts *(5–9)*. Few articles have focused on the intestinal absorption of this element *(10–12)*.

In our laboratory, experiments of oral and intraperitoneal nickel absorption in vivo and by the everted gut sacs and Ussing chamber techniques in vitro have been previously published *(13,14)*. The first type of experiment is time-consuming and the latter allows only the study of the isolated organs. These reasons led us to try an *in situ* technique to study the absorption of nickel by the small intestine of the rat. This approach offer several advantages: First, the target organ is maintained in its natural environment with preservation of the circulation of blood and lymph, thus avoiding cellular damage often found in in vitro experiments. Second, the equipment used in this type of experiment is inexpensive and the technique itself is easy to conduct. The *in situ* technique shows good reproducibility of the results *(15,16)* in the nickel concentration ranges that are typical in human foodstuffs, estimated to be between 100 and 300 μg/d *(17–20)*.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Sixty-four male albino rats of the Wistar strain (Iffa Credo, l'Arbresle, France) weighing 300 ± 50 g were used in groups of eight for each experiment. The animals were housed in plastic cages in an air-conditioned room maintained at 22–23°C, in a 12-h light–dark cycle for at least 1 wk before the experiment. Food (Extra Labo standard pellets, Provins, France) and water were made available *ad libitum*.

Experimental Design

Following a 20- to 24-h fast and under sodium pentobarbital anesthesia (60 mg/kg), the jugular vein was fitted with a No. 1 catheter (Biotrol Pharma). Another catheter of the same type was used for the duodenum, connecting the free end of the catheter to a pump syringe (A-99, Bioblock). The ileum was fitted with a No. 2 catheter (Biotrol Pharma) to allow collection of the effluent. The intestine was first perfused with 0.9% saline at 37°C at a rate of 2 mL/min for 15 min to make sure that it was free of particulate matter. Afterward, the perfusion was continued at a rate of 1 mL/min for 15 min to ensure a steady-state condition of the intestinal membrane. Perfusion with nickel was carried out at a rate of 0.6 mL/min *(21)* using a isotonic solution of nickel(II) chloride ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$, Merck) in 0.9% saline for treated rats. The controls were perfused with 0.9% saline only. In both cases, the effluent was collected every

10 min. The measured concentration of nickel in the effluent was allowed to follow the progress of the nickel solution as it was absorbed through the small intestine.

Several experiments were conducted. First, we studied the influence of several concentrations of nickel: 1.0, 5.0, 10., 25.0, and 100 mg/L on the concentration of this element in the whole small intestine and in blood after perfusion on the small intestine for 60 min. The blood was collected by cardiac and jugular vein puncture following standard laboratory techniques.

Second, nickel distribution in the body was studied by collecting various organs: duodenum, jejunum, ileum, brain, heart, liver, lungs, spleen, kidneys and testicles. The organs were removed from the animal sacrificed after perfusion with a 10-mg Ni/L solution for 30 or 60 min. The water flux in the small intestine during perfusion was verified by the red phenol technique *(22)* using 0.9% saline in the same perfusion conditions as for nickel solutions. Subsequently, use of a 10-mg/L solution of nickel chloride allowed verification that the water flux was indeed not modified by the presence of nickel ions.

Nickel Determination

The tissues were treated with concentrated nitric acid (Suprapur, Merck) to dissolve all mineral material. Blood was first diluted 1:2 with 0.9% saline. Nickel concentrations were established by means of an atomic emission spectrometer (Spectrametrics Spectraspan V) at a wavelength of 341.48 nm. The technique has a detection limit of 2 μg/L.

Statistical Analysis

Results are expressed as the mean ± SD. Experimental groups consisted of eight rats. The Bartlett test was used to verify homogeneity of the variances. Comparison between groups was done by analysis of variance (ANOVA). For the study concerning perfusion of nickel at different concentrations, the Fisher test was used in cases in which ANOVA showed significant effects. The results obtained from the organs were compared by use of Student's *t*-test. The null hypothesis was rejected at $p < 0.05$.

RESULTS

Figure 1 shows the results obtained in the perfusion effluents. The data show the appearance of nickel in two successive phases. First, a rapid increase of nickel concentration appears during the first 30 min of perfusion until a mean near 75% of the initial concentration is reached. This value is observed in the 1-, 5-, and 25-mg Ni/L experiments and is slightly lower than that of the experiments at 10 and 100

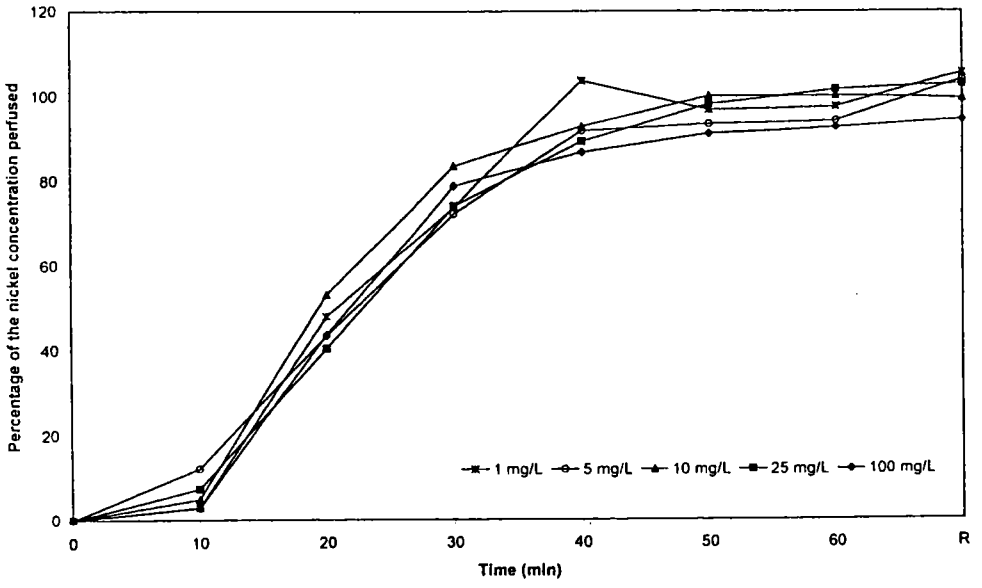


Fig 1. Concentration of nickel (percentage of the perfused concentration) in the effluent according to time.

mg/L concentrations. During this phase, significant variability of the data was observed.

During the following 30 min of perfusion, a second phase with a slower rate of increase is observed until values that are about 100% of the initial concentration when 60 min have elapsed. In this second phase, there was less variability of the data than that observed in the first stage of perfusion. In the plot in Fig. 1, the *R* values (for rest) represent values obtained for the effluent that continued to flow after the pump had been stopped.

The results of the red phenol test showed that the water flux through the small intestine had variations of up to 10%, both in the presence and absence of nickel.

Figure 2 shows the results obtained in the intestine and in blood samples after 60 min perfusion with solutions at different nickel concentrations. The concentrations of nickel in organs and in blood samples showed a direct relationship to the initial concentration of nickel used for perfusion. In the small intestine, the nickel concentrations were significantly different from those of the controls (0.19 μg/g of nickel) for perfusions at 10, 25, and 100 mg Ni/L, which had values of 5, 7, and 19 μg/g nickel, respectively.

In blood, there were no differences between nickel concentrations of the samples obtained by either jugular vein or cardiac puncture, allowing us to use either method for sample collection performing duplicate runs. The nickel concentration obtained with perfusion at the lowest

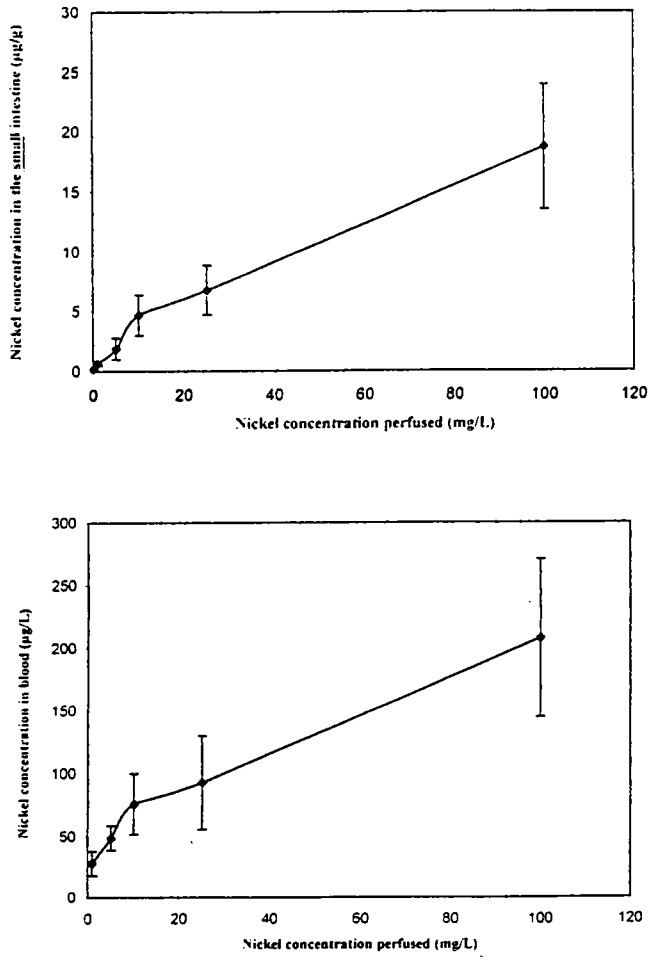


Fig. 2. Nickel concentrations in the small intestine and in blood of rats according to different concentrations of nickel perfused.

nickel concentration of 1.0 mg/L was 28 µg/L, significantly different from the values obtained at higher concentrations of 10 mg/L (76 µg/L), 25 mg/L (93 µg/L), and 100 mg/L (208 µg/L). The effects at 10 mg Ni/L were significantly different from those obtained at 1.0 and 100 mg/L. The effects of 100 mg Ni/L were significantly different from the remaining concentrations tested.

The results obtained in the different organs studied and in the blood of rats by perfusion of the small intestine with a concentration of 10 mg Ni/L for 30 or 60 min are given in Table 1. In relation to the levels of nickel in the tissues, the values for controls were low, ranging from 0.06 µg Ni/g for jejunum to 0.21 µg Ni/g for the ileum and spleen.

After perfusion for 30 min, the highest nickel concentration was found in the jejunum, which had a value 33.8 times higher than the

Table 1
Nickel Concentration (μg/g) and Amount (μg) in Various Organs and in Blood (μg/L) (Mean ± SD)

	Controls		Perfused 30 min		Perfused 60 min	
Organs	**μg/g**	**μg**	**μg/g**	**μg**	**μg/g**	**μg**
Duodenum	0.16 ± 0.03	0.07 ± 0.02	1.46 ± 1.22*	0.27 ± 0.24*	2.98 ± 2.30*	1.46 ± 1.3*
Jejunum	0.06 ± 0.03	0.33 ± 0.17	2.03 ± 0.74*	4.39 ± 1.16*	6.66 ± 2.86*°	29.14 ± 12.17*°
Ileum	0.21 ± 0.11	0.07 ± 0.2	1.56 ± 0.40*	0.33 ± 0.12*	6.80 ± 2.41*°	3.09 ± 0.88*°
Brain	0.10 ± 0.03	0.20 ± 0.06	0.09 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.10 ± 0.03	0.20 ± 0.05
Heart	0.14 ± 0.05	0.13 ± 0.03	0.16 ± 0.03	0.09 ± 0.03	0.25 ± 0.10*	0.18 ± 0.08
Liver	0.12 ± 0.03	1.23 ± 0.26	0.26 ± 0.05*	1.91 ± 0.49*	0.26 ± 0.05*	2.35 ± 0.19*
Lungs	0.14 ± 0.05	0.18 ± 0.05	0.20 ± 0.03*	0.20 ± 0.02	0.25 ± 0.05*	0.29 ± 0.06*°
Spleen	0.21 ± 0.07	0.13 ± 0.04	0.20 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.35 ± 0.12*°	0.21 ± 0.07*°
Kidneys	0.15 ± 0.03	0.32 ± 0.08	0.54 ± 0.09*	0.85 ± 0.15*	0.64 ± 0.23*	1.20 ± 0.46*
Testicles	0.07 ± 0.01	0.23 ± 0.03	0.07 ± 0.01	0.18 ± 0.03	0.10 ± 0.02*°	0.30 ± 0.04*
	μg/L		**μg/L**		**μg/L**	
Blood	< 10		45 ± 9		81 ± 21*°	

*Significantly different from the controls.
°Significantly different from the rats perfused for 30 min.

Table 2
Nickel Accumulation (μg) in Various Organs
(Control Values Removed)

Organs	Perfused 30 min	Perfused 60 min
Duodenum	0.2	1.39
Jejunum	4.06	28.81
Ileum	0.26	3.02
Subtotal	**4.52**	**33.22**
Brain	0	0
Heart	0	0.05
Liver	0.68	1.12
Lungs	0.02	0.11
Spleen	0	0.08
Kidneys	0.53	0.88
Testicles	0	0.07
Subtotal	**1.23**	**2.31**

controls. This was followed by the nickel content of the duodenum and ileum that were 9.1 and 7.4 higher than the controls, respectively. These three segments that constitute the small intestine appear as a distinct group with values above 1 μg Ni/g. The kidneys, liver, and lungs also showed concentrations significantly different from those of the controls: 3.6, 2.2, and 1.4, respectively.

After perfusion for 60 min the organ with the highest nickel concentration was the jejunum, with a value 111 times that of the controls, followed by the ileum (32 times) and the duodenum, 19 times the control value. These tissues were again higher than the remaining organs, which showed always levels below 1 μg Ni/g.

If the results for 30- and 60-min perfusions are compared, values are consistently higher for longer perfusion times. Thus, in addition to kidneys (with a factor of 4.3 compared to controls), liver (2.2), lungs (1.8), heart (1.8), spleen (1.7), and testicles (1.4), all had nickel concentrations significantly higher than those of the controls. Only the brain was not affected after perfusion for 60 min. In turn, concentrations of nickel in the jejunum, ileum, lungs, and spleen were significantly different from those obtained after perfusion for 30 min (Table 1).

With regard to the amounts of nickel found in a number of organs, it appeared that those in the controls were low, ranging from 0.07 μg for the duodenum and ileum to 0.33 μg for the jejunum, except for the liver, which had a value of 1.23 μg.

Table 2 presents the mean value of each organ treated, expressed in micrograms of nickel present. The mean nickel concentration obtained in the controls is removed, because only the amount of nickel due to the perfusion is of interest. Following perfusion for 30 min, the three segments

of the small intestine had the largest total nickel content of 4.52 μg. The values for the brain, heart, lungs, spleen, and testicles were not statistically significant from the controls; thus, the total amount accumulated in the remaining organs (1.23 μg) derives mainly from liver and kidneys.

Following perfusion for 60 min, the small intestine again showed the highest accumulation of nickel, with a total of 33.22 μg, compared to 2.31 μg in all other organs. The amounts of nickel found in the brain and heart were not statistically different from the corresponding controls.

In the blood samples, the concentrations in the treated rats at 30 and 60 min (45 μg Ni/L and 81 μg Ni/L, respectively) were also significantly higher than the values found in blood obtained from the control animals (<10 μg Ni/L). A significant difference was observed between the two perfusion times.

DISCUSSION

The concentration of nickel in the effluent showed that it took at least 30 min for the nickel solution to pass through the entire small intestine. After this time, the concentration of nickel reaches a relatively stable level. This result suggests that perfusion for shorter periods of time will not produce suitable results.

Although the results for the water flux experiments are not reported here, our values agree well with those reported in the literature *(23–26)*. They showed that the water flux through the small intestine had variations of 10% or lower, both in the presence or absence of nickel, suggesting that the rats are in relatively the same conditions throughout the perfusion experiments. The relatively large variations observed for experiments with or without nickel could explain the fact that in some samples, the nickel concentration in the effluent was 10% higher than the initial concentrations used.

For experiments carried out at different nickel concentrations for 60-min perfusion and considering that the weight of the small intestine and the blood volume are relatively the same for the experimental animals, the plots in Fig. 2 are taken to be representative of the amounts of nickel in these organs. These curves present similar profiles, with two successive stages. The first three points in the plot (1.0, 5.0, and 10 mg Ni/L) have a steeper slope. The subsequent points (25 and 100 mg Ni/L) show a less pronounced slope, so the break point can be situated at a concentration of about 10 mg Ni/L.

These results suggest that different absorption mechanisms are involved in the intestinal absorption of nickel. When the concentration of the nickel solution used for the experiment is 10 mg/L or less, the active transport and facilitated diffusion mechanisms could be involved. However, if the nickel concentration goes beyond 10 mg/L, the nonspecific carriers of nickel (at the surface of the erythrocytes) involved in the

mechanisms of absorption would be saturated. Thus, the second part of the plots arises from passive diffusion taking place, which would take into account the concentration gradient.

This hypothesis would agree, at least partially, with previous suggestions that an active transfer of nickel takes place in the jejunum *(10–12)* and a passive mechanism takes over in the ileum *(11,12)*. Another study, using the same perfusion technique *(10)*, reported saturation of carriers at around 20 μM Ni (1 mg Ni/L), which is lower than our estimation. In addition, it was concluded that nickel is not appreciably retained by the intestinal wall, in direct contradiction with our findings.

The distribution of absorbed nickel after an *in situ* intestinal perfusion was studied at the 10-mg Ni/L concentration for two reasons. First, it was the lowest concentration tested that presented significant results for the small intestine and for blood. Second, in view of the results for the nickel determination in the effluent, it took 30 min for the solution to reach the end of the small intestine. With a rate of perfusion of 0.6 mL/min, this corresponds to approximately 20 mL of solution at 10 mg Ni/L, which is equivalent to 200 μg of nickel in direct contact with the intestinal wall. This would represent roughly the same amounts of nickel present in human foodstuffs, estimated to be between 100 and 300 μg Ni/d *(17–20)*.

The nickel content in different organs reflects their ability to bind this element after 30 and 60 min of perfusion. At 30 min perfusion, the small intestine is expected to show the highest concentrations of nickel because it is the organ in direct contact with the metal solution, agreeing well with results reported elsewhere *(11,12, 27–29)*. Moreover, it is considered as a barrier *(30)* because nickel is retained by the constituents of the small intestine wall or adsorbed at the cells surface *(10)*. After the small intestine, the highest organ concentrations are in the kidneys and liver. Based on these results, 1.2% of the nickel perfused passed through the intestinal barrier.

Although lungs show significantly higher values than the controls, no conclusions can be derived from our data because they show a large standard deviation.

At 60 min perfusion, the results are similar and, as expected, show higher nickel concentrations. Again, the small intestine has the highest values, followed by the kidneys, which are the elimination organs for nickel *(31–34)*. The amount of nickel absorbed is estimated at 1.1%.

When the two perfusion times are compared in the case of liver, the same factor of increase between the experimental animals and the controls is observed, but not so for blood, which continues to increase at longer perfusion times. This may be an indication that hepatic cells are able to retain nickel until a stable concentration is reached after 30 min perfusion.

Overall, the results presented here are in good agreement with literature values for intestinal absorption since the estimation varies from 1 to 10% *(31,35,36)*.

Considering the advantages of low cost, ease, and short times of the experiments, the *in situ* technique can be used for other studies involving the intestinal absorption of other metal ions at concentrations of toxicological importance, or to assess the influence of other substances of inorganic or organic origin on the intestinal absorption of metals. It should be taken into consideration that the method requires the use of an anesthetic, which may be a factor affecting some properties of the intestinal membrane *(37)* and perhaps also interfering with intestinal absorption. This drawback may be overcome if the same experimental conditions are used to compare the patterns of intestinal absorption of different metals or compounds.

REFERENCES

1. V. Simonetti, B. M. Manzini, and S. Sedenari, *Contact Dermatitis* **39,** 187–191 (1998).
2. M. Hindsen and M. Bruze, *Acta Dermatol. Venereol.* **78,** 367–370 (1998).
3. B. Santucci, C. Cannistraci, A. Cristaudo, E. Camera, and M. Picardo, *Exp. Dermatol.* **7,** 162–167 (1998).
4. W. Sosroseno, *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* **13,** 173–181 (1995).
5. Q. Zhang, Y. Kusaka, K. Sato, K. Nakakuki, N. Kohyama, and K. Donaldson, *J. Toxicol. Environ. Health* **53,** 423–438 (1998).
6. T. Toya, F. Serita, K. Sawatari, and K. Fukuda, *Ind. Health* **35,** 69–77 (1997).
7. J. M. Benson, I. Y. Chang, Y. S. Cheng, F. F. Hahn, C. H. Kennedy, E. B. Barr, et al., *Fundam. Appl. Toxicol.* **28,** 232–244 (1995).
8. J. M. Benson, Y. S. Cheng, A. F. Eidson, F. F. Hahn, R. F. Henderson, and J. A. Pickrell, *Toxicology* **103,** 9–22 (1995).
9. R. Bajpai, M. Waseem, and J. L. Kaw, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **13,** 251–257 (1994).
10. E. C. Foulkes and D. M. McMullen, *Toxicology* **38,** 35–42 (1986).
11. J. Tallkvist and H. Tjälve, *Pharmacol. Toxicol.* **75,** 233–243 (1994).
12. J. Tallkvist, A. M. Wing, and H. Tjâlve, *Pharmacol. Toxicol.* **75,** 244–249 (1994).
13. S. Pluvinage, *DEA de Toxicologie de l'Environnement*, Metz (1996).
14. A. Morel, *DEA de Toxicologie de l'Environnement*, Metz (1997).
15. T. Morishita, N. Yata, A. Kamada, and M. Aoki, *Chem. Pharm. Bull.* **19,** 1925–1928 (1971).
16. J. V. Swintosky and E. Pogonowska-Wala, *Pharm. Int.* **3,** 163–167 (1982).
17. H. A. Schroeder, J. J. Balassa, and I. H. Tipton, *J. Chron. Dis.* **15,** 51–65 (1962).
18. B. G. Bennett, Summary exposure assessment for nickel, in *MARC Reports on Exposure Commitment Assessments of Environmental Pollutants I*, Monitoring and Assessment Research Center, Chelsea College, University of London, London, pp. 1730 (1981).
19. J. A. Pennington and J. W. Jones, *J. Am. Dietet. Assoc.* **87,** 1644–1650 (1989).
20. OMS, *Directives de la Qualité de l'Eau de Boisson*, 2nd ed., Organisation Mondiale de la Santé (OMS), Geneva (1994).
21. P. N. Savina, A. E. Staubus, T. S. Gaginella, and D. F. Smith, *J. Pharm. Sci.* **70,** 239–243 (1981).
22. T. Koizumi, T. Arita, and K. Kakemi, *Chem. Pharm. Bull.* **12,** 421–427 (1964).
23. K. S. Shanker, D. J. Tocco, B. B. Brodie, and C. A. M. Hogben, *J. Pharm.* **123,** 81–88 (1958).
24. E. C. Foulkes, *Toxicology* **37,** 117–125 (1985).
25. T. Endo, S. Nakaya, and R. Kimura, *Physiol. Toxicol.* **63,** 8–15 (1988).
26. M. Cochran, G. Goddar, and N. Ludwigston, *Toxicol. Lett.* **51,** 287–294 (1990).
27. A. E. Gómez-Ayala, M. S. Campos, I. López-Aliaga, I. Pallares, S. Hartiti, M. Barrionuello, et al., *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **67,** 106–114 (1997).

28. A. E. Gómez-Ayala, F. Lisbona, I. López-Aliaga, I. Pallares, M. Barrionuello, S. Hartiti, et al., *Lab. Anim.* **32,** 72–79 (1998).
29. E. Tavares, O. Carreras, A. Gómez-Rubio, C. Herce-Pagliali, and M. L. Murillo, *Life Sci.* **62,** 787–797 (1998).
30. E. C. Foulkes, Intestinal absorption of heavy metals, in *Handbook of Experimental Pharmacology,* T. Z. Csaky Ed., Springer-Verlag, Berlin, Vol. 70, pp. 543–565 (1984).
31. J. M. Haguenoer and D. Furon, Nickel, in *Toxicologie et Hygiène Industrielle, Tome 2: Les dérivés minéraux,* Technique et Documentation, Paris, pp. 543–592 (1982).
32. B. Sarkar, *Biol. Trace Element Res.* **21,** 137–144 (1989).
33. K. Merrit, T. D. Crowe, and S. A. Brown, *J. Biomed. Mater. Res.* **23,** 845–862 (1989).
34. E. Nieboer, W. E. Sanford, and B. C. Stace, Absorption, distribution and excretion of nickel, in *Nickel and Human Health: Current Perspectives,* E. Nieboer and J. O. Nriagu, eds., Wiley, New York, pp. 49–68 (1992).
35. W. N.Solomon, F. Viteri, T. R. Schuler, and F. H. Nielsen, *J. Nutr.* **112,** 39–59 (1982).
36. C. G. Elinder, L. Friberg, T. Kjellstrom, G. Nordberg, and G. Oberdoester, *Biological Monitoring of Metals,* WHO, Geneva (1994).
37. H. Yuasa, K. Matsuda, and J. Watanabe, *Biol. Pharmacol. Bull.* **18,** 747–752 (1995).

ENVIRONMENTAL POLLUTION

Editor-in-Chief
Professor William J. Manning
Department of Microbiology
203 Morrill Science Center IVN
University of Massachusetts
639 North Pleasant Street
Amherst, MA 01003-9298
Fax: 413-545-2532
E-mail: wmanning@microbio.umass.edu

Editorial Associate
Arlene A. Manning
E-mail: aamanning @ mindspring.com

September 14, 2002

Professeur Daniel Burnel
Dépt. Environnement et Santé Publique
Unité INSERM U420
Faculté de Médecine de Nancy; BP 184
54505 Vandoeuvre-Les-Nancy, Cedex, France

Dear Professeur Burnel: re: ENPO 03370

Enclosed are three reviews of your manuscript: "*In vitro, in situ* and *in vivo* studies of lead immobilization by synthetic hydroxyapatite".

I am very pleased to inform you that the reviewers recommend that your manuscript should be accepted for publication, after satisfactory revision. Reviewer #1 has only a few minor comments. Reviewer #2 has three major concerns and a series of minor points. Reviewer #3 has numerous minor points to improve the manuscript.

Please provide a detailed written response to the reviewers' comments, concerns, suggestions, etc. and send this to me together with one hard copy of the revised manuscript, a version on a disk and any original illustrations. (Note that the hard copy and disk version must be identical.) Please be sure that the corresponding author's e-mail address is listed on the first page of the manuscript.

I am looking forward to receiving your revised manuscript.

Sincerely yours,

William J. Manning
Editor

In vitro, in situ and *in vivo* studies of lead immobilization by synthetic hydroxyapatite

Nathalie ARNICH[a], Marie-Claire LANHERS[a], Franck LAURENSOT[b], Renaud PODOR[c], Antoine MONTIEL[d] and Daniel BURNEL[a]*

[a]Unité INSERM U420, Laboratoire de Chimie et Toxicologie des Métaux, Département Environnement et Santé Publique, Faculté de Médecine de Nancy, 9 avenue de la Forêt de Haye, B.P. 184, 54505 Vandoeuvre-Les-Nancy Cedex, France

[b]Laboratoire d'Hygiène et de Recherche en Santé Publique, 11 bis rue Gabriel Péri, B.P. 288, 54515 Vandoeuvre-Les-Nancy Cedex, France

[c] Laboratoire de Chimie du Solide Minéral, UMR 7555, Faculté des Sciences de Nancy, B.P. 239, 54506 Vandoeuvre-Les-Nancy Cedex, France

[d]Société Anonyme de Gestion des Eaux de Paris, 9 rue Schœlcher, 75675 Paris cedex 14, France

*Corresponding author. Tel: 03-83-68-33-71,
Fax: 03.83.68.33.79, E-mail : Daniel.Burnel@medecine.uhp-nancy.fr

"**Capsule**: *Lead immobilization by solid hydroxyapatite significantly reduces lead concentration and bioavailability in water.*"

Abstract

Apatite appears a useful compound for removing lead from water, due to its ability to immobilize the metal by precipitation. In dilute solution, dissolved hydroxyapatite (HA, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) provided phosphates that were reactive with aqueous lead (molar ratio HA/Pb = 1/10) forming precipitates at around pH 6. These dissolved at a more acidic pH (3). Solid HA in contact with Pb^{2+} ions, led to the formation of pyromorphite ($Pb_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), identified by X-ray diffraction and insoluble at pH tested (3 to 8). The amount of pyromorphite increased with the weight ratio of HA/Pb. Between 1 to 1000, lead, precipitated as pyromorphite, rose from 19 to 99 %. *In situ* and *in vivo* experiments on rats confirmed the *in vitro* results. In fact, lead bioavailability was unchanged in the presence of dissolved HA (assessed by intestinal perfusion), whereas it was significantly lower in the presence of solid HA (gastric intubation), at a weight ratio equal to 10 (amount of lead absorbed decreased by 60 %). Apatite could be an effective means of immobilizing lead in drinking or sewage, since accidental pyromorphite ingestion does not yield bioavailable lead.

Keywords: Lead, Hydroxyapatite, Immobilization, Pyromorphite, Bioavailability

1. Introduction

Lead is a serious public health issue worldwide. The number of children presenting with high blood concentrations of lead remains a problem. To decrease total lead intake, it is necessary to act on all known sources. One is drinking water. In Europe, on WHO recommendations, a new directive (98/83/CE) requires a decrease in the maximal concentration from 50 to 25 $\mu g.L^{-1}$ by 2003 and to 10 $\mu g.L^{-1}$ by 2013 (Baron and Leroy, 2001).

Current processes try to limit corrosion in lead piping (neutralization, remineralization, adding orthophosphates, etc.), but none can guarantee this 10 $\mu g.L^{-1}$ threshold (Vilagines and Leroy, 1995). In a novel approach, we have tried to remove lead from water by precipitation, in a non bioavailable form. This process could either improve the quality of drinking water, with regard to lead, or decontaminate sewage. Amongst the compounds able to retain lead, phosphates, and more particularly apatite, react with lead to form pyromorphite, a compound characterized by very low solubility (Ma et al., 1994a; Ruby et al., 1994). Lead immobilization was assessed principally in *in vitro* studies that reproduced the physiological conditions found in the gastrointestinal tract of mammals, like pH variations (from 2 to 7) (Zhang and Ryan, 1998, 1999a, b; Zhang et al., 1998) or presence of digestive enzymes

(pepsin, pancreatine) and biliary salts (Ruby et al., 1996; Hettiarachchi et al., 2000, 2001; Stanforth and Qu, 2001; Yang et al., 2001).
Before animal experiments, an *in vitro* study (physicochemical and crystallographic) with aqueous lead and hydroxyapatite was needed to determine which form of apatite (dissolved or solid) should be used. Actually, the mechanisms involved in the reaction have not yet been clearly identified and two theories have been put forward.
According to the first, (dissolution/precipitation) apatite would provide phosphates (Ma et.al., 1993, 1994a, b, 1995; Ruby et al., 1994; Laperche et al., 1996, 1997; Chen et al., 1997; Zhang and Ryan, 1998, 1999a, b; Zhang et al., 1998). The principal reaction would follow the following equations:
$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 14\ H^+ \rightarrow 10\ Ca^{2+} + 6\ H_2PO_4^- + 2\ H_2O$ (dissolution of hydroxyapatite)
$10\ Pb^{2+} + 6\ H_2PO_4^- + 2\ H_2O \rightarrow Pb_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 14\ H^+$ (precipitation of pyromorphite).
According to the second theory (ion exchange), lead would be adsorbed first on the surface of the apatite particle, then, by diffusion, cation exchange would take place between apatite Ca^{2+} ions and Pb^{2+} ions in solution (Suzuki et al., 1984; Miyake et al., 1986; Takeuchi et al., 1988; Takeuchi and Arai, 1990; Shashkova et al., 1999; Sugyiama et al., 1999). The reaction would follow the equation:
$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + x\ Pb^{2+} \rightarrow (Ca_{10-x}Pb_x)(PO_4)_6(OH)_2 + x\ Ca^{2+}$ (Shashkova et al., 1999).
An *in situ* study using perfusion of the small intestine of rats, and an *in vivo* study using gastric intubation, evaluated the stability of the complexes formed, from lead absorption after reaction with hydroxyapatite, both dissolved and solid.

2. Materials and methods

2.1 In vitro experiments

Two milliliters of solution were placed in Centrisart tubes (Sartorius) with a mass rupture of 10,000 daltons, and then centrifuged at 2500 g during 20 min. Tested solutions contained lead as $PbCl_2$ (Merck) at 10 $mg.L^{-1}$ and hydroxyapatite (HA) (Fluka). When HA was tested as the dissolved form, the concentration used was 4.85 $mg.L^{-1}$, to provide the amount of phosphate required to precipitate all the lead ions present in the solution, according to the equations of the dissolution/precipitation reaction (molar ratio HA/Pb = 1/10). Solutions were prepared with or without salt, namely sodium chloride (NaCl, suprapur, Merck) or sodium perchlorate ($NaClO_4$, normapur, Prolabo), to mimic conditions used in *in situ* experiments. Compared to sodium chloride, the presence of Cl^- is minimized with sodium perchlorate, as this ion is only provided by $PbCl_2$. The comparison between the 2 salts will reveal a potential effect of Cl^- on the reaction between lead and apatite. When HA was tested as the solid form, the concentration varied from 0 to 10,000 $mg.L^{-1}$ (HA/Pb weight ratio from 0 to 1000) in suspension. All the solutions were prepared in Milli-Q purified water (Millipore). They were performed at least in duplicate and tested at original pH and at pH adjusted to 3 with HCl (suprapur, Merck), to simulate the acidity of the upper duodenum. Ultrafiltration was performed after a 24 hour incubation period.

2.2 Characterization of the precipitates

Identification of the reaction products between aqueous lead and dissolved or solid synthetic hydroxyapatite was by a scanning electron microscope (Hitashi) equipped with an energy-dispersive (EDS) X-ray analyser (Kevex). Powder X-ray measurements were performed by means of a diffractometer (Philips X'Pert Pro) with Cu (Kα) source (λ = 1.54056 Å) in the Bragg Brentano θ-θ geometry. Solutions (100 mL) were filtered 24 h after preparation through 0.2 μm pore diameter, nitrate cellulose membrane filters (Whatman). After drying,

the samples were mounted on stainless steel stubs using double-stick tape and then coated with C or Au.

2.3 Animals

Male albino rats (Wistar strain, Iffa Credo, l'Arbresle, France) weighing 200-250 g were used in groups of 8 for each treatment. The animals were housed individually in plastic cages with bedding of wood shavings (Pb < 0.05 ppm) in an air-conditioned room maintained at 22-23 °C, in a 12-h light-dark cycle for at least 1-week before handling. Food (Pb < 0.11 ppm, Extralabo standard pellet M20, France) and water (Pb < 1 $\mu g.L^{-1}$) was available *ad libitum*. The rats were treated in compliance with the ethical principles applied to animal experimentation.

2.4 In situ experiments

Following a 20- to 24-h fast, and under sodium pentobarbital anesthesia (60 $mg.kg^{-1}$ bw, ip), the animals were prepared for perfusion following a protocol elaborated in a previous study (Arnich et al., 2000). Briefly, after median laparotomy, the duodenum and ileum were canulated with N°2 polyethylene catheter (Biotrol Pharma), connecting the duodenal free end of the catheter to a pump syringe (A-99, Bioblock). The intestine was first perfused with 0.9 % NaCl (suprapur, Merck) at 37 °C at a rate of 2 mL/min for 15 min to remove particulate matter. Afterwards, the perfusion was continued at a rate of 1 mL/min for 15 min to ensure a steady-state condition of the intestinal membrane. The perfusion of tested solutions was carried out at a rate of 0.6 $mL.min^{-1}$ for 60 min. Control animals were perfused with 154 mM NaCl or $NaClO_4$ (normapur, Prolabo), to ensure osmolarity of the solution perfused with the physiological conditions of the small intestine (300 $mosm.L^{-1}$). Treated animals were perfused with $PbCl_2$ at 10, 1 or 0.5 $mg.L^{-1}$ of lead in NaCl or in $NaClO_4$, with or without dissolved hydroxyapatite at 4.85 $mg.L^{-1}$. Solutions with lead were prepared in purified water only, the day before the experiment, to allow sufficient time for the reaction between lead and hydroxyapatite. Just before perfusion, salts were introduced in the solution (to minimize any influence on this reaction) and the pH was adjusted to 3 with HCl, to simulate the acidic conditions at the exit of the stomach. At the end of the experiment, blood was collected by cardiac and jugular vein puncture, using heparin as anticoagulant and was stored at 4 °C. Various organs were removed: duodenum (8 cm after the pylorus), jejunum, ileum (8 cm before the caecum), liver, kidneys, brain and the right femur. Bone was dried, the other tissues were frozen at – 18 °C. Two rats from each group of animals ordered were sacrificed on arrival to ensure that there was no previous lead intoxication.

2.5 In vivo experiments

Following a 14-h fast, rats were treated daily by gastric intubation with 0.5 mL of solution per 100 g of weight for 31 consecutive days. Solutions were prepared 30-min before administration. Rats were divided into four groups:

(I) ***controls*** receiving purified water only,
(II) ***HA*** receiving hydroxyapatite in suspension at 100 $mg.kg^{-1}$ bw,
(III) ***HA-Pb*** receiving a suspension of lead at 10 $mg.kg^{-1}$ bw and hydroxyapatite at 100 $mg.kg^{-1}$ bw,
(IV) ***Pb*** receiving lead at 10 $mg.kg^{-1}$ bw.

Food was returned 4-h after the gavage, to avoid any interaction with lead. Rats were weighed daily. At the end of the experiment, rats were anesthetized with sodium pentobarbital (60 $mg.kg^{-1}$ bw, ip). Blood was collected by cardiac puncture and stored at 4°C. Various organs

were removed: duodenum (8 cm after the pylorus), jejunum, ileum (8 cm before the caecum), liver, kidneys, spleen, brain and the right femur. Bone was dried and the other tissues were frozen at – 18 °C.

2.6 Histological analysis

A sample of small intestine (2 cm of jejunum) from each group of perfused rats and a kidney from each rat dosed by gastric intubation were placed in formol and retained for histological analysis, following the standard protocol, i.e. inclusion in paraffin and HES (hematoxylin eosin saffron) staining. They were examined microscopically for the presence of treatment-related lesions.

2.7 Samples preparation and analytical method

Blood and tissue samples were treated with 65 % nitric acid and 30 % perhydrol (suprapur, Merck) in closed Teflon digestion vessels, using a MDS-2000 microwaves (CEM).
In vitro samples were analysed with an atomic emission spectrometer (Spectrametrics Spectraspan VII) at a wavelength of 283.3 nm, with a detection limit of 20 $\mu g.L^{-1}$. Blanks of acidic digestion, quality control samples (Bio-Rad, level 1) were regularly submitted blindly, with rat samples in duplicate, to the LHRSP analytical laboratory (NF EN ISO 9002, Vandoeuvre-Les-Nancy, France). Lead concentration was determined by means of an ICP-MS. Samples were diluted to obtain an acidic level lower than 5 % and charged with Indium 115 at 50 $\mu g.L^{-1}$ (internal standard). The detection limit is equal to 1 $\mu g.L^{-1}$.

2.8 Data analysis

The results are expressed as mean ± SD. Statistical analysis was performed using Statview software. If the metal concentration was below the detection limit, values were set at detection limit to allow statistical analysis of the data. Lead concentration data in blood and tissues were analysed after logarithmic transformation. Groups were compared by analysis of variance (ANOVA). The Fisher test was used in cases where ANOVA showed significant effects. The null hypothesis was rejected at $p < 0.05$.

3. Results

3.1 In vitro experiments

Lead concentration in ultrafiltrates revealed that lead at 10 $mg.L^{-1}$ was totally immobilized in the presence of dissolved hydroxyapatite at 4.85 $mg.L^{-1}$ when the pH was not modified (5.3-6.5). Moreover, the presence of salts, (NaCl or $NaClO_4$) had no influence on the reaction. However, when the pH was adjusted to 3 with HCl, 85 to 100 % of the lead was bioavailable (present in the ultrafiltrate), whatever the acidification conditions (table 1): solution of Pb alone at t = 0 (*a*), solution of Pb and HA before the mixture (*b*), after the mixture at t = 0 (*c*) or t = 24 h (*d*). When the pH of this last solution had risen to its original value (*e*), the lead content in the ultrafiltrate returned to a very low level (82 $\mu g.L^{-1}$). Control solutions of lead alone, showed concentrations of lead equal to 10,000 $\mu g.L^{-1}$ at pH = 3 (*f, h*) and a slight decrease at pH = 5.3 (*g, i*) due to a small precipitation of lead at less acidic pH. The lead with apatite control at pH = 5.6 (*j*) was under the detection limit.
As seen in table 2, the lead concentration in ultrafiltrates revealed that lead at 10 $mg.L^{-1}$ was immobilized in the presence of solid hydroxyapatite. The quantity immobilized was always greater at original pH (5.2-7.4) than at pH adjusted to 3 and it increased as a function of the amount of HA added. When HA/Pb = 5, 46 % of the lead precipitated at the original pH,

compared to 37 % at pH = 3, and when HA/Pb = 10, these percentages became 100 and 84 %, respectively. The retention capacity of this synthetic hydroxyapatite was estimated at 111 mg Pb/g HA, corresponding to a ratio of 9. Conversely, at pH adjusted to 3, it was more difficult for apatite to immobilize lead totally. Nevertheless, at a ratio of 1000, 99 % of the lead was precipitated.

3.2 Characterization of the precipitates

SEM images of the precipitated reaction products of aqueous lead and dissolved synthetic hydroxyapatite are presented in figures 1 and 2. At a pH of around 6, SEM images showed compounds deposited at the surface of the filter (figure 1), with a morphology typical of amorphous products. Even higher magnifications were unable to identify crystallized forms. According to EDS analysis, the compounds would contain oxygen at 68 % (in an atomic ratio), phosphorus at 7 % and lead at 25 %. This composition leads to an atomic ratio of Pb/P close to 4/1, which is different from pyromorphite with a characteristic ratio of 1.67. At pH = 3, SEM image showed compounds with similar morphology as at pH of around 6, corresponding to amorphous products (figure 2). According to EDS analysis, they would contain phosphorus at 23 % and lead oxide at 77 %. The atomic ratio of Pb/P of approx' 1/1 is still different from that of pyromorphite. The amount of precipitate present on the filter was insufficient to identify by powder X-ray diffraction (XRD).
According to SEM images of the synthetic solid hydroxyapatite (figure 3), the mean size of the apatite crystals was close to 200 nm. EDS analysis showed an atomic ratio of Ca/P consistent with apatite characteristics (25/15 = 1.67), and XRD measurements (figure 4) revealed the presence of "whitlockite" ($Ca_3(PO_4)_2$) as an impurity. At the original pH, SEM image of HA/Pb = 10 (figure 5) showed little crystals uniformly distributed at the surface of the filter, with a mean size of 200 nm. These crystals were also present at HA/Pb = 5 (figure 6), together with the appearance of small sticks (mean length of 1.2 µm), randomly distributed at the filter's surface, but always in the same plane. Pyromorphite was identified in the two ratios tested, by characteristic crystallographic parameters in XRD measurements (figure 4), together with a new peak at 2 θ = 30°, which couldn't be identified. The "whitlockite" peaks were still present (together with one pyromorphite peak at 2 θ = 31° when HA/Pb = 5). According to EDS analysis, it would be composed of a mixture of calcium and lead phosphate, with a global formula of $(Ca,Pb)_3P_2O_{10}$.

3.3 In situ experiments

The histological analysis of intestine following perfusion with different solutions (NaCl, $NaClO_4$, Pb alone in NaCl or in $NaClO_4$, Pb and HA in NaCl or in $NaClO_4$) revealed superficial and discreet alterations of the intestinal epithelium, of different samples examined in the same manner. According to the histology, the results obtained after the *in situ* perfusion of the small intestine were not influenced by any serious alteration in the intestinal wall caused by lead. The first results revealed no statistical difference between lead concentrations in the tissues of rats perfused with Cl^- ions (NaCl) from those perfused with ClO_4^- ions ($NaClO_4$), which do not form complexes with lead. Further experiments were performed with $NaClO_4$ only. As seen in table 4, lead concentrations in different tissues showed an increase concomitant, but not proportional, to the concentration of lead perfused (from 500 $\mu g.L^{-1}$ to 10 $mg.L^{-1}$). The presence of dissolved apatite in the perfusion solution did not significantly alter the concentration of lead in blood and organs studied, nor the fraction of lead absorbed (table 4).

3.4 In vivo experiments

The body weight and food consumption of rats were not altered by the treatment (results not reported). As shown in table 5, lead concentrations in the various organs of lead-treated rats was greater than in controls. Rats receiving lead (10 $mg.L^{-1}$) with solid hydroxyapatite (100 $mg.L^{-1}$) showed a significant decrease in lead absorption compared to rats treated with lead alone, after 31 days of gavage. The smallest decreases were in the blood and liver, where the lead content was reduced by 50 %. Then, the efficacy increased to 60 % in the small intestine, up to 70 % in the kidneys, spleen, brain and femur. Overall, the amount of lead accumulated in the tissues was reduced by 63 %.
The histological analysis of kidneys revealed the intranuclear inclusion bodies characteristic of lead intoxication only in the lead-treated rats without hydroxyapatite.
Determination of some essential elements (calcium, phosphorus, magnesium, zinc, copper, iron) in whole blood, plasma and the organs revealed no statistically significant difference (results not reported).

4. Discussion

The aim of this study was to investigate a process to remove lead present in drinking water and sewage. The efficacy of hydroxyapatite to immobilize lead, was assessed using an apatite dissolution reaction followed by precipitation of pyromorphite, and using ion exchange between Ca^{2+} ions and Pb^{2+} ions. The lead concentration in the different studies (10 $mg.L^{-1}$) was selected to fall within the detection limit of the measuring equipment and yet be similar to the lead levels likely to be found in drinking water.
In vitro physicochemical studies showed the inefficacy of previously dissolved apatite. If lead is precipitated at the original pH of about 6, the complexes formed dissolve at pH = 3, releasing lead into the solution. This indicates that under test conditions there is an absence of pyromorphite, since this compound is practically insoluble (-log (Ksp) more than 70) (Ma et al., 1994a; Ruby et al., 1994). This was confirmed by EDS analysis, since the composition of reaction products (at the original pH) resulted in a Pb/P atomic ratio close to 4/1, far removed from the characteristic ratio of pyromorphite (1,67).
This absence of pyromorphite is not compatible with the conclusions of previous studies by authors favorable to the dissolution/precipitation theory, because of the formation of hydroxypyromorphite shortly after the start of the reaction between hydroxyapatite and lead in soil (Ma *et al.*, 1993, 1994a, b, 1995 ; Xu & Schwartz, 1994 ; Laperche *et al.*, 1996 ; Chen *et al.*, 1997 ; Zhang *et al.*, 1998 ; Zhang & Ryan, 1998, 1999a, b). This difference could be explained by differences in pH in the various tests, the chemical form of the lead and the use of solid hydroxyapatite.
Most of the studies mentioned above were carried out at a constant pH (5, 6, 7) or with dynamic pH increasing from 2 to 7 within a few minutes, then maintained at 7 for 30 minutes. At pH = 7, the formation of pyromorphite would be encouraged and its solubility minimized (Ruby *et al.*, 1994). Some experiments with an acid pH (2-3) failed to identify pyromorphite (Ma *et al.*, 1993 ; Zhang & Ryan, 1998 ; Zhang *et al.*, 1998).
With regard to the chemical form of lead, although our study was carried out using lead chloride, the studies cited above used lead carbonate in soil (Laperche *et al.*, 1996 ; Zhang *et al.*, 1998 ; Zhang & Ryan, 1999b), lead nitrate (Ma *et al.*, 1993, 1994a, b, 1995 ; Xu & Schwartz, 1994 ; Chen *et al.*, 1997), lead oxide (Laperche *et al.*, 1996), lead sulfide (Zhang & Ryan, 1999a), lead sulfate (Zhang & Ryan, 1998) or lead fluoride (Ma *et al.*, 1994a).
Although all these authors are favorable to the dissolution/precipitation theory to explain the lead immobilization mechanisms by apatite, they all used solid apatite. To our knowledge, only one study has been carried out with previously dissolved hydroxyapatite (Manecki *et al.*, 2000). However, if chloropyromorphite has been identified at acid pH (2.5), the experimental

protocol differs from ours, especially the Pb/P ratio, which is 532 (1.67 in our study). Reproduction of this protocol resulted in partial formation of pyromorphite (not reported), but this technique is not applicable to our study since test conditions were far removed from reality (high lead concentration and incomplete immobilization).

An intestinal perfusion study in rats confirmed the first *in vitro* studies; the presence of dissolved HA did not significantly modify absorption or tissue distribution of the metal.

The gradual increase in intestinal pH from the duodenum to the ileum (> 7.5) did not notably affect the fate of precipitates. Although these were formed as pH increased (jejunum, ileum), the effect on total lead absorption was negligible. Its principal absorption site is the duodenum, characterized by an acidic pH (Conrad & Barton, 1978 ; Edelstein *et al.*, 1984 ; Henning & Cooper, 1988). Furthermore, bile and pancreatic juices in the duodenum did not increase lead precipitation.

Finally, although apatite dissolution releases calcium and phosphorus, both known to decrease the intestinal absorption of lead (Conrad & Barton, 1978 ; Aungst & Fung, 1983 ; Bogden *et al.*, 1992, 1995), in our test conditions Ca and P concentrations were too low to produce such inhibition.

In vitro experiments on solid synthetic hydroxyapatite showed that this compound was effective in immobilizing lead in the pyromorphite form and showed its capacity to retain lead at 111 mg of Pb per gram of hydroxyapatite. This estimate is consistent with values found in the literature which range from 0.99 mg to 2 grams of Pb per gram of apatite, depending on the nature of the apatite (commmercialized synthetic, laboratory prepared or natural) (Suzuki *et al.*, 1984 ; Takeuchi *et al.*, 1988 ; Ma *et al.*, 1993, 1994a, 1995 ; Xu & Schwartz, 1994 ; Cheng *et al.*, 1997 ; Sugiyama *et al.*, 1999; Prasad *et al.*, 2000).

Under our experimental conditions, insoluble pyromorphite, identified by XRD, was formed proportionally to the HA/Pb mass ratio (37 and 84 % respectively for ratios of 5 and 10). This might be explained by the increased contact area of the apatite. In parallel with pyromorphite, other lead phosphates are formed (9 and 16 % for HA/Pb ratios of 5 and 10), insoluble at the original pH (5.2 and 7.2 respectively), but redissolved at pH = 3. These could be seen under the microscope as small sticks and had a chemical composition with a general formula $(Ca, Pb)_3P_2O_{10}$. Their presence in higher amounts than the HA/Pb ratio of 10, could be explained by their greater precipitation at pH 7.2. Conversely, at pH 5.2 (ratio 5), the two ionic species (Pb^{2+} and phosphates) may coexist in solution. It is interesting to note that the formation of these lead phosphates other than pyromorphite involves a slight dissociation of hydroxyapatite, which is greater at pH = 5.2. This dissolution has also been seen in other studies concerning solid apatite (Saalfeld *et al.*, 1994 ; Shashkova *et al.*, 1999 ; Monteil-Rivera *et al.*, 2000).

The action mechanisms of solid HA on lead may involve ionic exchange between apatite Ca^{2+} ions and Pb^{2+} ions, resulting in the formation of pyromorphite, and by a slight dissociation of the apatite, releasing phosphates which would form a complex with lead and calcium which would precipitate when the pH exceeds 5.2 and dissolve at pH = 3.

The efficacy of solid HA in immobilizing lead and so decreasing its gastrointestinal absorption was verified *in vivo,* by sub-chronic oral administration of an aqueous lead suspension spiked with solid hydroxyapatite (HA/Pb weight ratio of 10). Partial lead immobilization was observed, causing a 60 % decrease in the total amount of accumulated metal in different target organs (blood, small intestine, liver, kidneys, spleen, brain, femur). Moreover, these protective effects also resulted in the absence of the characteristic lesions in the renal cells (intranuclear inclusions) seen in rats poisoned with lead alone. It is significant that, under our experimental conditions, this compound, rich in calcium and phosphorus, and known to immobilize other metals (Mg, Cu, Fe, Zn) did not affect the animals' calcium-phosphorus metabolism or modify the essential element content of the tissues.

Any comparison with the literature is difficult, since few experiments have been carried out on animals. The only known study (Pearson *et al.*, 2000), was carried out on earthworms

present in lead-contaminated soil and treated with phosphates. This study revealed a partial decrease (- 30 %) in lead accumulation in these organisms and the formation of pyromorphite. A decrease in lead bioavailability, due to apatite, was also seen in *in vitro* studies simulating certain gastrointestinal conditions in mammals. Zhang et al. (1998) submitted a suspension of soil loaded with lead and enriched in apatite to pH variation ranging from 2 to 7, at 37 °C. The increase in pH resulted in a decrease in lead bioavailability, higher in the presence of apatite and formation of pyromorphite.
Other authors have simulated digestion in a suspension of soil loaded with lead and enriched in apatite: first gastric digestion (pepsin added), then intestinal digestion (bile and pancreatine added). Depending on the nature of the soil and phosphate used (fertilizer, phosphoric acid, natural apatite), the decrease in lead bioavailability varied from 5 to 60 %, and in all cases pyromorphite was formed (Hettiarachchi *et al.*, 2000, 2001 ; Yang *et al.*, 2001).

5. Conclusion

Hydroxyapatite was effective in immobilizing lead under an insoluble form (pyromorphite), following ion exchange between apatite Ca^{2+} ions and Pb^{2+} ions in solution. Although partial dissociation of apatite leads to the formation of soluble lead phosphates at acid pH and therefore likely to release the metal, these compounds are present in negligible amounts when the weight ratio between apatite and lead is high (> 1000).
The accidental presence of pyromorphite in drinking water does not present any danger, since the precipitated lead is no longer bioavailable.
As for the decontamination of lead-loaded sewage, it should be possible to add a purification process with crushed natural apatite in order to provide a high contact area encouraging ion exchange. This process would be particularly interesting since a natural Tunisian apatite, tested in the laboratory, also had the capacity to retain other metals, such as chromium, iron III, aluminium, copper, nickel, zinc, cadmium, manganese (not reported data), a characteristic already observed with other apatites on a few metals (Reichert & Binner, 1996 ; Chen *et al.*, 1997 ; Shahshkova *et al.*, 1999).

Acknowledgments

This study was supported by a grant from the Société Anonyme de Gestion des Eaux de Paris. The authors would like to thank Dr.A. Kohler and J.P. Emeraux for their assistance in SEM and XRD analysis.

References

Arnich, N., Lanhers, M.C., Cunat, L., Joyeux, M., Burnel, D., 2000. Nickel absorption and distribution from rat small intestine *in situ*. Biological Trace Element Research 74 (2), 141-151.
Aungst, B.J., Fung, H.L., 1983. Inhibition of oral lead absorption in rats by phosphate-containing products. Journal of Pharmaceutical Sciences 72 (4), 345-348.
Baron, J., Leroy, P., 2001. Impact de la qualité de l'eau et de la longueur du réseau sur la concentration en plomb au robinet de l'utilisateur. Techniques Sciences Méthodes 1, 27-34.
Bogden, J.D., Gertner, S.B., Christakos, S., Kemp, F.W., Yang, Z., Katz, S.R., Chu, C., 1992. Dietary calcium modifies concentrations of lead and other metals and renal calbindin in rats. Journal of Nutrition 122, 1351-1360.
Bogden, J.D., Kemp, F.W., Hans, S., Murphy, M., Fraiman, M., Czerniach, D., Flynn, C.J., Banua, M.L., Scimone, A., Castrovilly, L., Gertner, S.B., 1995. Dietary calcium and lead interact to modify maternal blood pressure, erythropoiesis, and fetal and neonatal growth in rats during pregnancy and lactation. Journal of Nutrition 125; 990-1002.

Chen, X., Wright, J.V., Conca, J.L., Peurrung, L.M., 1997. Effects of pH on heavy metal sorption on mineral apatite. Environmental Science and Technology 31 (3), 624-631.
Conrad, M.E., Barton, J.C., 1978. Factors affecting the absorption and excretion of lead in the rat. Gastroenterology 74, 731-740.
Edelstein, S., Fullmer, C.S., Wasserman, R.H., 1984. Gastrointestinal absorption of lead in chicks: involvement of the cholecalciferol endocrine system. Journal of Nutrition 114, 692-700.
Henning, S.J., Cooper, L.C., 1988. Intestinal accumulation of lead salts and milk lead by suckling rats. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 187, 110-116.
Hettiarachchi, G.M., Pierzynski, G.M., Ransom, M.D., 2000. *In situ* stabilization of soil lead using phosphorus and manganese oxide. Environmental Science and Technology 34, 4614-4619.
Hettiarachchi, G.M., Pierzynski, G.M., Ransom, M.D., 2001. *In situ* stabilization of soil lead using phosphorus. Journal of Environmental Quality 30 (4), 1214-1221.
Laperche, V., Logan, T.J., Gaddam, P., Traina, S.J., 1997. Effect of apatite amendments on plant uptake of lead from contaminated soil. Environmental Science and Technology 31, 2745-2753.
Laperche, V., Traina, S.J., Gaddam, P., Logan, T.J., 1996. Chemical and mineralogical characterizations of Pb in a contaminated soil: reactions with synthetic apatite. Environmental Science and Technology 30, 3321-3326.
Ma, Q.Y., Traina, S.J., Logan, T.J., 1993. *In situ* lead immobilization by apatite. Environmental Science and Technology 27, 1803-1810.
Ma, Q.Y., Logan, T.J., Traina, S.J., Ryan, J.A., 1994a. Effects of NO_3^-, Cl^-, F^-, SO_4^{2-}, and CO_3^{2-} on Pb^{2+} immobilization by hydroxyapatite. Environmental Science and Technology 28, 408-418.
Ma, Q.Y., Traina, S.J., Logan, T.J., Ryan, J.A., 1994b. Effects of aqueous Al, Cd, Cu, Fe (II), Ni and Zn on Pb immobilization by hydroxyapatite. Environmental Science and Technology 28, 1219-1228.
Ma, Q.Y., Logan, T.J., Traina, S.J., 1995. Lead immobilization from aqueous solutions and contaminated soils using phosphates rocks. Environmental Science and Technology 29, 1118-1126.
Manecki, M., Maurice, P.A., Traina, S.J., 2000. Uptake of aqueous Pb by Cl^-, F^-, and OH^- apatite: mineralogic evidence for nucleation mechanisms. American Mineralogist 85, 932-942.
Miyake, M., Ishigaki, K., Suzuki, T., 1986. Structure refinement of Pb^{2+} ion-exchanged apatites by X-ray powder pattern-fitting. Journal of Solid State Chemistry 61, 230-235.
Monteil-Rivera, F., Fedoroff, M., Jeanjean, J., Minel, L., Barthes, M.G., Dumonceau, J., 2000. Sorption of selenite (SeO_3^{2-}) on hydroxyapatite : an exchange process. Journal of Colloid and Interface Science 221, 291-300.
Pearson, M.S., Maenpaa, A K., Pierzynski, G.M., Lydy, M.J., 2000. Bioremediation and biodegradation, effects of soil amendments on the bioavailability of lead, zinc, and cadmium to earthworms. Journal of Environmental Quality 29, 1611-1617.
Prasad, M., Amritphale, S.S., Saxena, S., Chandra, N., 2000. Separation of lead ions on francolite surfaces. Separation Science and Technology 35 (15), 2431-2442.
Reichert, J., Binner, J.G.P., 1996. An evaluation of hydroxyapatite-based filters for removal of heavy metal ions from aqueous solutions. Journal of Materials Science 31 (5), 1231-1241.

Ruby, M.V., Davis, A., Nicholson, A., 1994. *In situ* formation of lead phosphates in soil as a method to immobilize lead. Environmental Science and Technology 28, 648-654.

Ruby, M.V., Davis, A., Schoof, R., Eberle, S., Sellstone, C.M., 1996. Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physically based extraction test. Environmental Science and Technology 30, 422-430.
Saalfeld, U., Meenen, N.M., Jures, T.T., Saalfeld, H., 1994. Solubility behaviour of synthetic hydroxyapatites in aqueous solution: influence of amorphous constituents on pH value, Biomaterials 15 (11), 905-908.
Shashkova, I.L.., Rat'Ko, A.I., Kitikova, N.V., 1999. Removal of heavy metal ions from aqueous solutions by alkaline-earth metal phosphates. Colloids and Surfaces A: Physiochemical and Engeneering aspects 160 (3), 207-215.
Stanforth, R. & Qiu, J., 2001. Effect of phosphate treatment on the solubility of lead in contaminated soil. Environmental Geology 41 (1-2), 1-10.
Sugyiama, S., Fukuda, N., Matsumoto, A., Hayashi, H., Shigemoto, N., Hiraga, Y., Moffat, J.B., 1999. Interdependence of anion and cation exchanges in calcium hydroxyapatite: Pb^{2+} and Cl^{-}. Journal of Colloid and Interface Science 220 (2), 324-328.
Suzuki, T., Ishigaki, K., Miyake, M., 1984. Synthetic hydroxyapatites as inorganic cation exchangers, part 3: exchange characteristics of lead ions (Pb^{2+}). J Chem Soc Faraday Trans 1 80, 3157-3165.
Takeuchi, Y., Arai, H., 1990. Removal of coexisting Pb^{2+}, Cu^{2+} and Cd^{2+} ions from water by addition of hydroxyapatite powder. Journal of Chemical Engineering of Japan 23 (1), 75-80.
Takeuchi, Y., Suzuki, T., Arai, H., 1988. A study of equilibrum and mass transfer in processes for removal of heavy-metals ions by hydroxyapatite. Journal of Chemical Engineering of Japan 21 (1), 98-100.
Vilagines, R ., Leroy, P., 1995. Le plomb dans les eaux d'alimentation, détermination de sa concentration et incidence des nouvelles recommandations de l'Organisme Mondial de la Santé (OMS) sur la gestion des réseaux de distribution publics et privés. Bull. Acad. Nattle Med. 179 (7), 1393-1408.
Xu, Y., Schwartz, F.W., 1994. Lead immobilization by hydroxyapatite in aqueous solutions. Journal of Contaminant Hydrology 15, 187-206.
Yang, J., Mosby, D.E., Casteel, S.W., Blanchar, R.W., 2001. Lead immobilization using phosphoric acid in a smelter-contaminated urbansoil. Environmental Science and Technology 35 (17), 3553-3359.
Zhang, P., Ryan, J.A., 1998. Formation of pyromorphite in anglesite-hydroxyapatite suspension under varying pH conditions. Environmental Science and Technology 32, 3318-3324.
Zhang, P., Ryan, J.A., 1999a. Formation of chloropyromorphite from galena (PbS) in the presence of hydroxyapatite. Environmental Science and Technology 33 (4), 618-624.
Zhang, P., Ryan, J.A., 1999b. Transformation of Pb(II) from cerrusite to chloropyromorphite in the presence of hydroxyapatite under varying conditions of pH. Environmental Science and Technology 33 (4), 625-630.
Zhang, P., Ryan, J.A., Yang, J., 1998. *In vitro* Pb solubility in the presence of hydroxyapatite. Environmental Science and Technology 32, 2763-2768.

Table 1: Lead concentration ($\mu g.L^{-1}$) in ultrafiltrate of different solutions of lead (10 $mg.L^{-1}$) with or without dissolved hydroxyapatite (4.85 $mg.L^{-1}$), at original or adjusted pH, in $NaClO_4$.

	pH				Pb content
	Pb before	**HA before**	**HAPb t_0**	**HAPb t_{24h}**	
a	3,0	7,1	3,1	3,2	10000 ± 78
b	3,0	3,0	3,0	3,0	10000 ± 334
c	5,3	7,1	3,0	3,0	10000 ± 325
d	5,3	7,1	5,3	5,6 ↓ 3,0	10000 ± 283
e	5,3	7,1	5,3	3,0 ↑ 5,6	82 ± 101
f	3,0	-	-	-	10000 ± 290
g	5,3	-	-	-	8887 ± 257
h	5,3 ↓ 3,0	-	-	-	10000 ± 499
i	3,0 ↑ 5,3	-	-	-	9741 ± 455
j	5,3	7,1	5,3	5,6	< detection limit

Table 2: Lead concentration ($\mu g.L^{-1}$) in ultrafiltrate of solutions of lead (10 000 $\mu g.L^{-1}$) with different concentrations of solid hydroxyapatite, at original or adjusted pH.

HA/Pb weight ratio	**Original pH**	**Concentration of lead ($\mu g.L^{-1}$)**	
		at original pH	**at pH 3**
0	5.5	10 000 ± 465	10 000 ± 424
1	5.4	7334 ± 1145	8104 ± 1577
5	5.2	5431 ± 214	6287 ± 434
6	5.4	937 ± 46	3129 ± 793
7	5.6	278 ± 13	2581 ± 203
8	5.5	66 ± 9	2288 ± 361
9	7.1	< detection limit	1991 ± 22
10	7.2	< detection limit	1633 ± 22
50	7.4	< detection limit	542 ± 49
500	7.1	< detection limit	190 ± 64
1000	7.0	< detection limit	135 ± 38

Table 3: Lead concentration in blood ($\mu g.L^{-1}$) and tissues ($\mu g.g^{-1}$) of rats perfused for 60 min with different solutions: $NaClO_4$ alone, lead (0.5, 1 or 10 $mg.L^{-1}$) with or without dissolved hydroxyapatite (4.85 $mg.L^{-1}$) in $NaClO_4$, at pH = 3. (* significantly different from controls)

Tissues	Sacrificed	Controls	Concentration perfused	Pb	HA-Pb
Blood			0.5 $mg.L^{-1}$	59 ± 26*	49 ± 13*
$\mu g.L^{-1}$	< 20	< 5.7	1 $mg.L^{-1}$	148 ± 12*	134 ± 19*
			10 $mg.L^{-1}$	1265 ± 277*	1175 ± 223*
Duodenum			0.5 $mg.L^{-1}$	0.47 ± 0.07*	0.44 ± 0.01*
$\mu g.g^{-1}$	< 0.07	< 0.07	1 $mg.L^{-1}$	0.99 ± 0.24*	0.57 ± 0.10*
			10 $mg.L^{-1}$	4.70 ± 1.64*	5.30 ± 0.81*
Jejunum			0.5 $mg.L^{-1}$	0.21 ± 0.03*	0.18 ± 0.02*
$\mu g.g^{-1}$	0.03	< 0.01	1 $mg.L^{-1}$	0.40 ± 0.12*	0.32 ± 0.05*
	± 0.05		10 $mg.L^{-1}$	3.31 ± 1.03*	4.08 ± 1.23*
Ileum			0.5 $mg.L^{-1}$	< 0.11	< 0.10
$\mu g.g^{-1}$	< 0.13	< 0.10	1 $mg.L^{-1}$	0.21 ± 0.04*	0.16 ± 0.06*
			10 $mg.L^{-1}$	1.74 ± 0.46*	1.79 ± 0.51*
Liver			0.5 $mg.L^{-1}$	0.18 ± 0.08*	0.17 ± 0.03*
$\mu g.g^{-1}$	0.02	< 0.01	1 $mg.L^{-1}$	0.43 ± 0.08*	0.30 ± 0.06*
	± 0.03		10 $mg.L^{-1}$	5.48 ± 0.77*	5.55 ± 1.42*
Kidneys			0.5 $mg.L^{-1}$	0.10 ± 0.03*	0.05 ± 0.02*
$\mu g.g^{-1}$	< 0.02	< 0.02	1 $mg.L^{-1}$	0.16 ± 0.05*	0.11 ± 0.02*
			10 $mg.L^{-1}$	2.11 ± 0.64*	2.01 ± 0.53*
Brain			0.5 $mg.L^{-1}$	< 0.02	< 0.02
$\mu g.g^{-1}$	0.02	< 0.01	1 $mg.L^{-1}$	< 0.02	< 0.02
	± 0.02		10 $mg.L^{-1}$	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01

Table 4: Fraction of lead absorbed by rats perfused for 60 min with different solutions of lead (0.5, 1 or 10 $mg.L^{-1}$) with or without dissolved hydroxyapatite (4.85 $mg.L^{-1}$) in $NaClO_4$, at pH = 3.

TREATMENT	ABSORPTION
0.5 $mg.L^{-1}$ Pb	23.5 %
0.5 $mg.L^{-1}$ HA-Pb	17.2 %
1 $mg.L^{-1}$ Pb	27.6 %
1 $mg.L^{-1}$ HA-Pb	22.5 %
10 $mg.L^{-1}$ Pb	33.8 %
10 $mg.L^{-1}$ HA-Pb	30.8 %

Fraction of lead absorbed was calculated as follow: $[(A_t - A_c)/A_p].100$
A_t= total amount of lead in the tissues sampled of the treated rats (μg)
A_c= total amount of lead in the tissues sampled of the control rats (μg)
A_p= total amount of lead perfused (μg), $A_p = C.V$, with C = concentration of lead ($mg.L^{-1}$) and V = volume of the small intestine (20 mL).

Table 5: Lead concentration in blood ($\mu g.L^{-1}$) and tissues ($\mu g.g^{-1}$) of rats treated for 31 consecutive days with different solutions: water alone, apatite alone, lead at 10 $mg.kg^{-1}$ with or without solid hydroxyapatite at 100 $mg.kg^{-1}$.

Tissues	Controls water	Controls HA	HA-Pb	Pb
Blood $\mu g.L^{-1}$	< 6.92	< 6.57	87.64 ± 23.83^{ab}	172.21 ± 54.08^{a}
Duodenum $\mu g.g^{-1}$	< 0.05	< 0.05	0.07 ± 0.02^{ab}	0.17 ± 0.09^{a}
Jejunum $\mu g.g^{-1}$	0.01 ± 0.002	0.01 ± 0.002	0.07 ± 0.03^{ab}	0.16 ± 0.06^{a}
Ileum $\mu g.g^{-1}$	< 0.08	< 0.09	0.08 ± 0.02^{b}	0.18 ± 0.05^{a}
Liver $\mu g.g^{-1}$	0.01 ± 0.001	0.01 ± 0.001	0.31 ± 0.17^{ab}	0.62 ± 0.22^{a}
Kidneys $\mu g.g^{-1}$	< 0.02	< 0.02	1.57 ± 0.41^{ab}	4.69 ± 2.65^{a}
Spleen $\mu g.g^{-1}$	< 0.02	< 0.02	0.08 ± 0.03^{ab}	0.26 ± 0.15^{a}
Brain $\mu g.g^{-1}$	< 0.01	< 0.01	0.08 ± 0.03^{ab}	0.26 ± 0.15^{a}
Femur $\mu g.g^{-1}$	< 1.5	< 1.5	17.1 ± 6.8^{ab}	50 ± 20^{a}

[a]: significantly different from the controls $p < 0.05$, [b]: significantly different from Pb $p < 0.05$

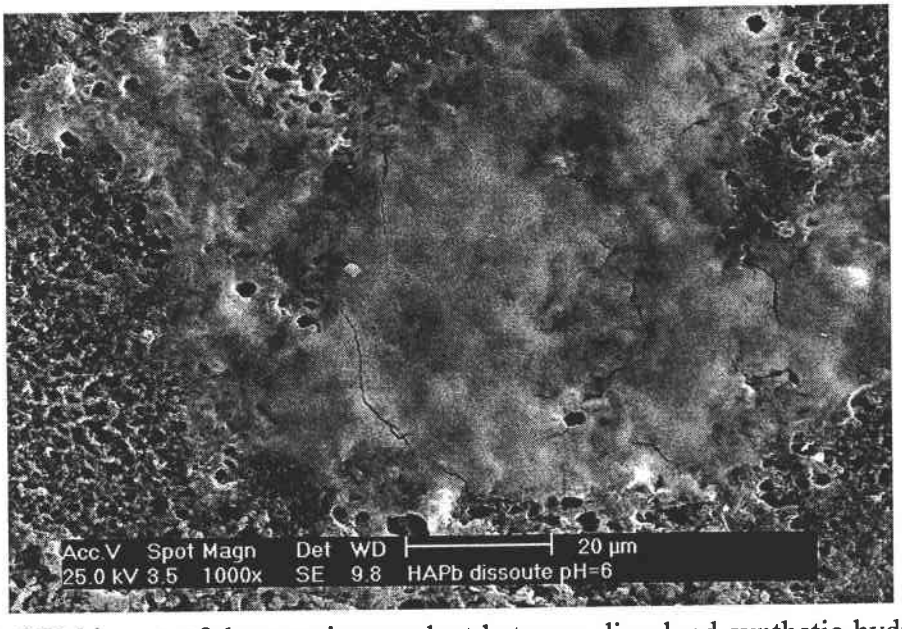


Figure 1: SEM image of the reaction product between dissolved synthetic hydroxyapatite and aqueous lead, at pH approx' 6.

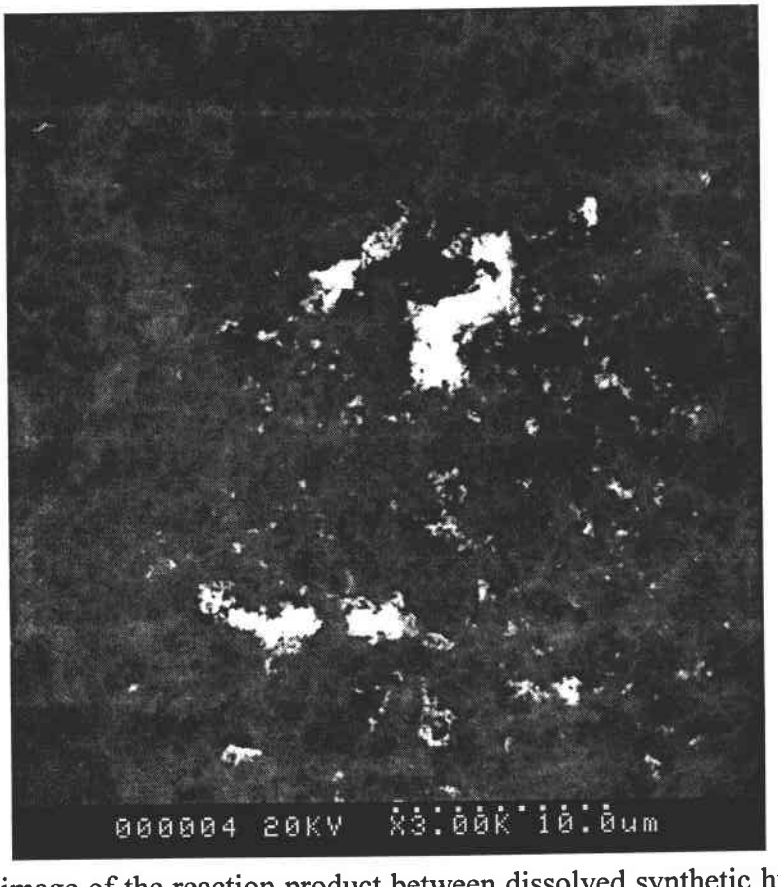


Figure 2: SEM image of the reaction product between dissolved synthetic hydroxyapatite and aqueous lead, at pH adjusted to 3.

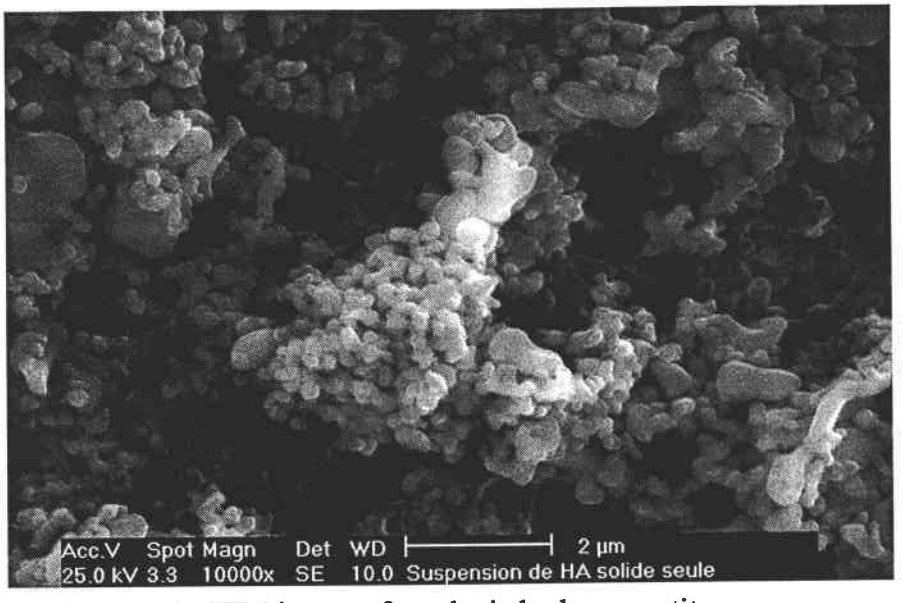


Figure 3: SEM image of synthetic hydroxyapatite

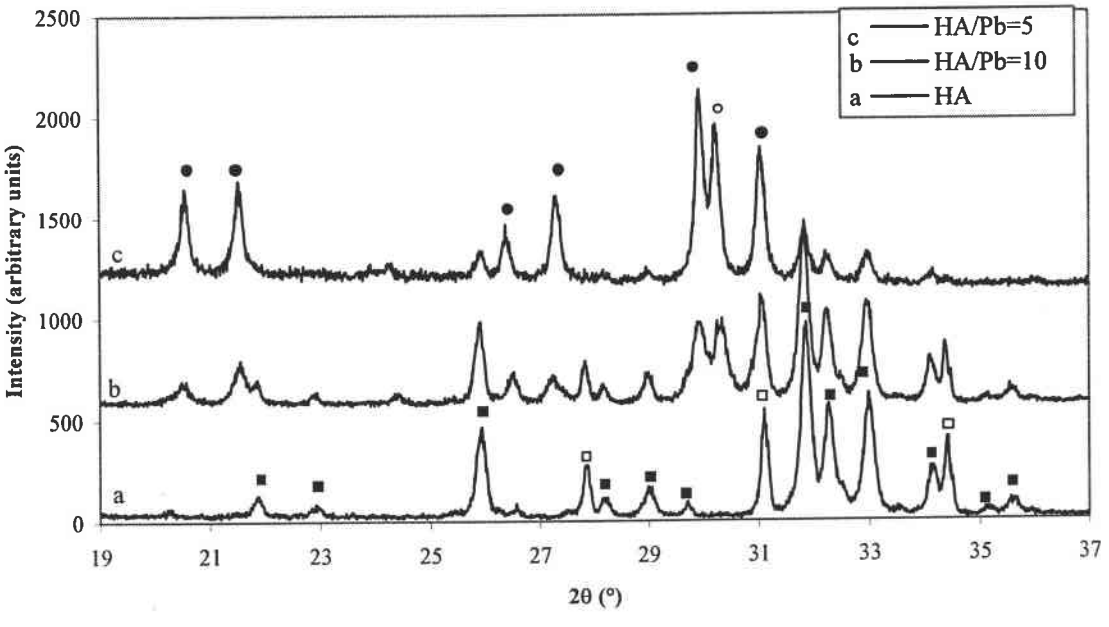


Figure 4: XRD patterns of synthetic hydroxyapatite and the reaction between solid hydroxyapatite and aqueous lead at a weight ratio of 10/1 or 5/1. Characteristic peaks are identified as follow: ■ = hydroxyapatite, □ = whitlockite, ● = pyromorphite, ○ = non identified

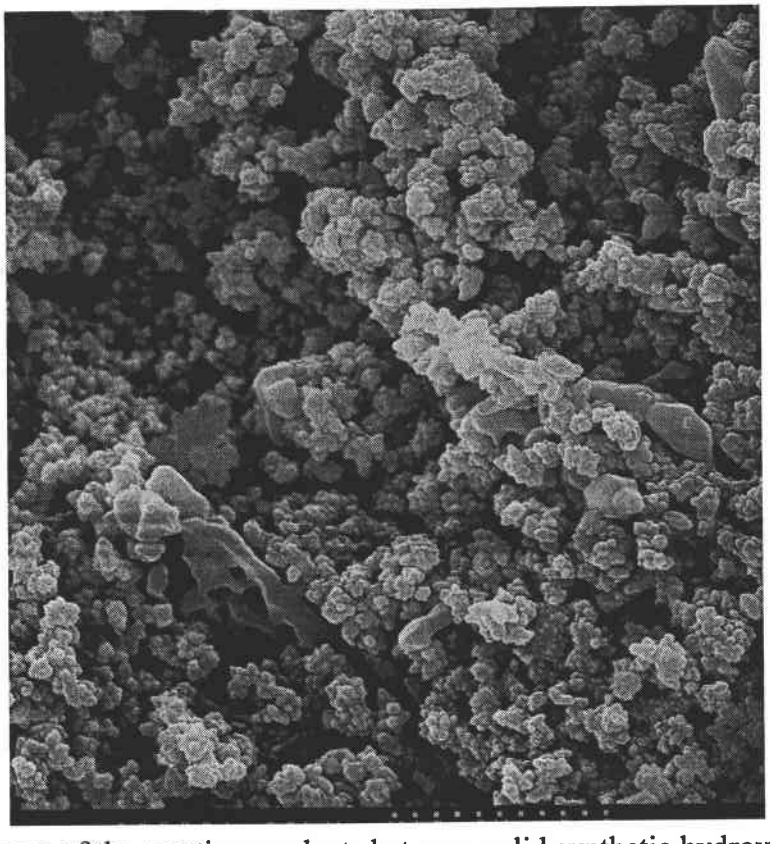


Figure 5: SEM image of the reaction products between solid synthetic hydroxyapatite and aqueous lead at a weight ratio of 10/1

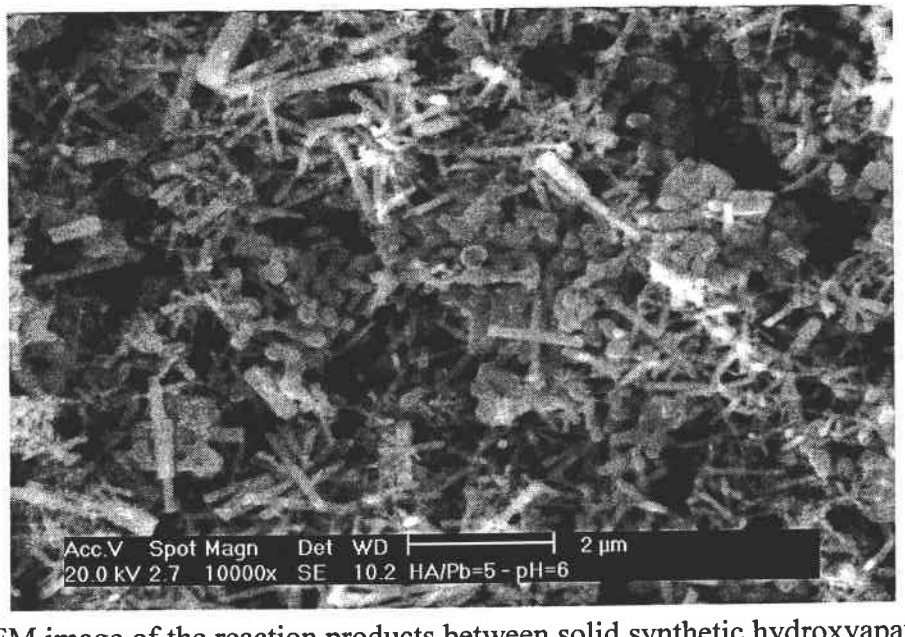


Figure 6: SEM image of the reaction products between solid synthetic hydroxyapatite and aqueous lead at a weight ratio of 5/1

IMMOBILISATION *IN VITRO* DU PLOMB PAR L'APATITE. INFLUENCE SUR LA BIODISPONIBILITE DE CE METAL CHEZ LE RAT

L'apatite est apparue comme un composé intéressant pour retenir le plomb présent dans l'eau de boisson (cartouche) ou dans les eaux résiduelles (épuration par filtration), de par sa capacité à réagir avec le métal pour former de la pyromorphite.
En solution diluée, l'hydroxyapatite synthétique (HA, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) dissoute a fourni des phosphates, réagissant avec le plomb (rapport molaire HA/Pb = 1/10) pour former des précipités, au pH voisin de 6, qui se solubilisent à pH plus acide (3).
En revanche, l'hydroxyapatite synthétique solide, au contact d'ions Pb^{2+}, a conduit à la formation de pyromorphite ($Pb_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), insoluble aux pH testés (3 à 8). Par ailleurs, la quantité de pyromorphite formée a augmenté avec l'élévation du rapport massique HA/Pb. Ainsi, entre 1 et 1000, le plomb précipité sous forme de pyromorphite est passé de 19 à 99 %.
Les études *in situ* et *in vivo* chez le rat ont confirmé ces résultats *in vitro*, dans la mesure où la biodisponibilité du plomb était inchangée en présence d'HA dissoute (évalué par perfusion intestinale), alors qu'elle était significativement diminuée en présence d'HA solide (intubation gastrique). En effet, pour un rapport massique HA/Pb de 10, la quantité de métal absorbée s'est abaissée de 60 %.
Enfin, une étude physico-chimique s'est intéressée à l'immobilisation du plomb par une apatite naturelle, afin d'abaisser le prix revient de ce traitement. Cette fluorapatite s'est montrée capable de retenir le plomb, ainsi que d'autres métaux, tels que le cuivre, le cadmium, le zinc, le manganèse et le nickel.

DISCIPLINE : Toxicologie de l'Environnement
MOTS-CLES : Plomb, Hydroxyapatite, Immobilisation, Pyromorphite, Biodisponibilité

IN VITRO, IN SITU AND *IN VIVO* STUDIES OF LEAD IMMOBILIZATION BY SYNTHETIC HYDROXYAPATITE

Apatite appears a useful compound for removing lead from drinking water (cartridge) or sewage (purification by filtration), due to its ability to immobilize the metal by precipitation.
In dilute solution, dissolved hydroxyapatite (HA, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) provided phosphates that were reactive with aqueous lead (molar ratio HA/Pb = 1/10) forming precipitates at around pH 6. These dissolved at a more acidic pH (3).
Solid HA in contact with Pb^{2+} ions, led to the formation of pyromorphite ($Pb_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), identified by X-ray diffraction and insoluble at pH tested (3 to 8). The amount of pyromorphite increased with the weight ratio of HA/Pb. Between 1 to 1000, lead, precipitated as pyromorphite, rose from 19 to 99 %.
In situ and *in vivo* experiments on rats confirmed the *in vitro* results. In fact, lead bioavailability was unchanged in the presence of dissolved HA (assessed by intestinal perfusion), whereas it was significantly lower in the presence of solid HA (gastric intubation), at a weight ratio equal to 10 (amount of lead absorbed decreased by 60 %).
Apatite could be an effective means of immobilizing lead in drinking water or sewage, since accidental pyromorphite ingestion does not yield bioavailable lead. Moreover, natural apatite (fluorapatite) was able to retain lead and other metals, such as copper, cadmium, zinc, manganese and nickel, leading to a cheap treatment.

KEYWORDS : Lead, Hydroxyapatite, Immobilization, Pyromorphite, Bioavailability

Laboratoire de Chimie et Toxicologie des Métaux, Unité INSERM U- 420, Faculté de Médecine de Nancy