



Recherche et étude de nouveaux chélateurs de l'aluminium et du phosphore utilisables en médecine

Lionel Graff

► To cite this version:

Lionel Graff. Recherche et étude de nouveaux chélateurs de l'aluminium et du phosphore utilisables en médecine. Toxicologie. Université Paul Verlaine - Metz, 1996. Français. NNT : 1996METZ002S . tel-01777105

HAL Id: tel-01777105

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01777105v1>

Submitted on 24 Apr 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.



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>

THESE

**Recherche et étude de nouveaux chélateurs de
l'aluminium et du phosphore utilisables en Médecine.**

**Présentée devant l'Université de METZ
pour obtenir le Diplôme de Doctorat d'Université**

**Spécialité:
*Toxicologie de l'Environnement***

par

Lionel GRAFF

Soutenue le 26 Janvier 1996

Membres du jury:

Pr. P. VASSEUR, Université de Metz: Président.

Pr. J.P. ANGER, Université de Rennes: Rapporteur.

Pr. P. HARTEMANN, Université Henri Poincaré, Nancy 1: Rapporteur.

Pr. D. BURNEL, Université Henri Poincaré, Nancy 1: Directeur de Thèse.

Dr. P.R. LEHR, Directeur de Recherche CNRS, Nancy.

A Manue,

pour sa compréhension et son soutien tout au long de ces dernières années.

A mes parents,

pour tout le soutien et l'aide qu'ils m'ont apportés.

A Hervé.

A Monsieur et Madame STURN et Delphine.

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	19960045
Cote	S/M3 96/2
Loc	Magasin

Vb 77807.

S/M 8 96/2

THESE

**Recherche et étude de nouveaux chélateurs de
l'aluminium et du phosphore utilisables en Médecine.**

Présentée devant l'Université de METZ
pour obtenir le Diplôme de Doctorat d'Université

Spécialité:
Toxicologie de l'Environnement

par

Lionel GRAFF

Soutenue le 26 Janvier 1996

Membres du jury:

Pr. P. VASSEUR, Université de Metz: Président.

Pr. J.P. ANGER, Université de Rennes: Rapporteur.

Pr. P. HARTEMANN, Université Henri Poincaré, Nancy 1: Rapporteur.

Pr. D. BURNEL, Université Henri Poincaré, Nancy 1: Directeur de Thèse.

Dr. P.R. LEHR, Directeur de Recherche CNRS, Nancy.

Publications internationales en rapport avec le thème de recherche (voir annexe).

GRAFF L., MULLER G. & BURNEL D. (1995).

In vitro and *in vivo* comparative studies on chelation of aluminum by some polyaminocarboxylic acids.

Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology. 88: 271-292.

GRAFF L., MULLER G. & BURNEL D. (1995).

In vitro and *in vivo* evaluation of potential aluminum chelators.

Veterinary and Human Toxicology. 37: 455-461.

GRAFF L. & BURNEL D. (1995).

A possible nonaluminium oral phosphate binder ? A comparative study on dietary phosphorus absorption.

Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology. 89: 373-388.

GRAFF L. & BURNEL D. (1995).

Reduction of dietary phosphorus absorption by oral phosphorus binders.

Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology (soumis à publication).

Avant-propos

Le présent travail nous a été proposé par Monsieur le Professeur D. BURNEL et a été effectué sous sa bienveillante direction au Laboratoire de Chimie Générale Appliquée à la Médecine de la Faculté de Médecine de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1.

Nous lui sommes profondément reconnaissant pour l'accueil qu'il nous a réservé; son encouragement permanent, ses qualités humaines et son dynamisme organisateur, nous ont permis d'apprécier ses très grandes qualités d'enseignant et de chercheur.

Nous tenons également à remercier sincèrement Mademoiselle le Professeur P. VASSEUR d'avoir accepté de présider ce jury et de juger ce travail.

Nos remerciements s'adressent également à Monsieur le Professeur J.P. ANGER qui a accepté avec enthousiasme de siéger dans ce jury et d'être rapporteur de cette thèse.

Nous voudrions aussi exprimer toute notre gratitude pour Monsieur le Professeur P. HARTEMANN, qui a accepté de faire partie de ce jury et d'être rapporteur de ce mémoire.

Merci enfin à Monsieur P.R. LEHR, directeur de recherche au CNRS, d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Nous devons adresser, dans nos remerciements une mention particulière à Madame M. ZANARDO, Mademoiselle L. CUNAT, Monsieur G. MULLER et à Monsieur J.C. RAT pour leur sympathie, leur aide et leur soutien dans la conduite de nos expériences.

Abréviations

AAN	Analyse par Activation Neutronique
AMP	Adénosine monophosphate
ANOVA	Analyse de variance
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
ATP	Adénosine Triphosphate
CAE	Choline Acétyl Estérase
CAT	Choline Acétyl Transférase
CMA	Concentration Maximale Admissible
coll.	Collaborateurs
DCP	Direct Current Plasma
DFO	Desferrioxamine, Deferoxamine ou Desferal®
DHPR	Dihydroptéridine réductase
DL₅₀	Dose létale à 50%
DNF	Dégénérescence Neurofibrillaire
DTA	Démence de Type Alzheimer
E_{1/2}	Potentiel de demi-vague
ECS	Electrode au calomel saturé en chlorure de potassium
EEG	Electroencéphalogramme
EPD	Encéphalopathie Progressive des Dialysés
F.D.A. ou FDA	Food and Drug Administration
g	Intensité de la pesanteur
GABA	Acide δ-aminobutyrique
g.kg⁻¹	gramme par kilogramme
g.l⁻¹	gramme par litre
h	Heure
I	Intensité
i.m. ou im	intramusculaire
i.p. ou ip	intrapéritonéal
i.v. ou iv	intraveineux
J ou j	Jour
LAMMA	Laser Microprobe Mass Analysis
log K	Logarithme de la constante de stabilité
M ou mol.l⁻¹	Mole par litre
mg	milligramme
mg.l⁻¹	milligramme par litre
min	minute

ml	millilitre
n	Nombre d'échantillons par lot
nm	nanomètre
P	Probabilité d'erreur, risque de première espèce
pH	Cologarithme de la concentration en ion H_3O^+
p.p.b. ou ppb	partie par billion
p.p.m. ou ppm	partie par million
PTH	Parathormone
S.A.A. ou SAA	Spectrophotométrie d'Absorption Atomique
SAL	Sclérose Amyotrophique Latérale
S.E.A. ou SEA	Spectrophotométrie d'Emission Atomique
VME	Valeur Maximale d'Exposition
µg	microgramme
µg.g⁻¹	microgramme par gramme
µl	microlitre
µg.l⁻¹	microgramme par litre

Sommaire

SOMMAIRE

	page
<i>I. Analyse bibliographique.</i>	<i>1</i>
1. INTRODUCTION.	1
2. PROPRIETES PHYSICO CHIMIQUES.	1
3. METHODE D'ANALYSE.	3
3.1. Méthodes de dosage de l'aluminium dans l'eau et les tissus biologiques.	4
. Spectrométrie d'absorption atomique (S.A.A.) ou Spectrométrie d'absorption atomique électrothermique (S.A.A.E.).	4
. Spectrométrie d'émission atomique en plasma à couplage inductif(S.E.A. à ICP) ou Spectrométrie d'émission atomique DCP (Direct Current Plasma) (S.E.A. à DCP).	6
. Analyse par activation neutronique (A.A.N.).	5
. Polarographie impulsionnelle.	6
3.2. Méthodes de localisation tissulaire de l'aluminium.	6
. Colorations histochimiques.	6
. Laser Microprobe Mass Analysis: LAMMA.	7
4. VALEURS LIMITES REGLEMENTAIRES.	7
5. UTILISATIONS ET SOURCES D'EXPOSITION.	8
5.1. Aluminium dans l'environnement général.	8
5.2. Utilisations industrielles de l'aluminium.	12
5.3. Aluminium dans les produits alimentaires.	13
. Emballages.	13
. Alimentation.	14
5.4. Aluminium dans les produits pharmaceutiques.	16
. Médicaments contenant un sel d'aluminium dans l'excipient ou l'enrobage.	16
. Médicaments à base d'un sel d'aluminium.	17
. Cas particulier des laits infantiles.	19
6. METABOLISME DE L'ALUMINIUM.	19

6.1. Pénétration dans l'organisme.	20
. <i>Absorption cutanée.</i>	20
. <i>Pénétration pulmonaire.</i>	20
. <i>Pénétration par la voie digestive.</i>	22
. <i>Pénétration par la voie parentérale.</i>	29
6.2. Transport de l'aluminium dans l'organisme.	33
6.3. Fixation tissulaire et Localisation intracellulaire.	35
6.4. Elimination.	36
. <i>Fécale.</i>	37
. <i>Urinaire.</i>	37
. <i>Biliaire.</i>	38
. <i>Autres voies d'élimination.</i>	38
6.5. Mode d'action.	38
7. TOXICITE DE L'ALUMINIUM.	42
7.1. Toxicité aiguë.	42
7.2. Toxicité chronique.	43
7.2.1. Pathologies provoquées par une intoxication aluminique.	43
. <i>Encéphalopathie progressive des dialysés.</i>	43
. <i>Ostéomalacies.</i>	45
. <i>Arthropathies.</i>	46
. <i>Anémies.</i>	46
. <i>Autres pathologies liées à une intoxication aluminique.</i>	47
7.2.2. Pathologies d'origine inconnue et dans lesquelles l'aluminium pourrait être un facteur favorisant.	49
. <i>La maladie d'Alzheimer.</i>	49
. <i>La sclérose amyotrophique latérale (SAL) et la maladie de Parkinson.</i>	55
7.3. Tératogénicité, Mutagénicité et Carcinogénicité.	57
8. TRAITEMENT DE L'INTOXICATION ALUMINIQUE.	58
8.1. Traitement des complications cliniques et Evaluation de la contamination.	58
. <i>Application à la dialyse.</i>	60
. <i>Encéphalopathie des dialysés.</i>	61
. <i>Ostéomalacies.</i>	62
. <i>Anémies.</i>	63

. <i>Diagnostic de surcharge aluminique: test au DFO.</i>	63
8.2. Etudes expérimentales-Recherche d'une alternative à la desferrioxamine.	66
. <i>Les fluorures.</i>	67
. <i>Les acides carboxyliques.</i>	68
. <i>Les aminoacides.</i>	70
. <i>Les dérivés dihydroxyphénoliques (Catécholates).</i>	70
. <i>Les acides polyaminocarboxyliques.</i>	70
. <i>Les acides phénylcarboxyliques.</i>	71
. <i>Le Maltol et les hydroxypyridinones.</i>	71
. <i>Les acides hydroxamiques.</i>	72
9. ALTERNATIVE AUX COMPOSES ALUMINIQUES.	73
CONCLUSION.	75
OBJECTIF DE L'ETUDE.	77
 II. Etude expérimentale.	 78
PROTOCOLE GENERAL.	78
1. Origine des animaux et conditions d'hébergement.	78
2. Déterminations analytiques.	78
2.1. Polarographie impulsionnelle différentielle.	80
2.2. Spectrophotométrie d'émission atomique à plasma d'argon (SEA-DCP).	83
3. Traitement des résultats.	85
3.1. Expression des données.	85
3.2. Analyses statistiques.	86

CHAPITRE I

PREMIERE PARTIE

Cinétique de fixation de l'aluminium sur les divers chélateurs en milieu aqueux tamponné, à température ambiante et à 37°C-Action des divers chélateurs sur l'aluminium complexé aux protéines sériques.

87

INTRODUCTION

87

1. MATERIELS ET METHODES.

89

1.1. Critères de sélection des chélateurs.

89

1.2. Chélateurs sélectionnés et autres réactifs utilisés.

90

1.3. Matériel.

92

2. PROTOCOLES EXPERIMENTAUX.

92

2.1. Complexation de l'aluminium dans l'eau.

92

2.2. Action des chélateurs sur l'aluminium complexé aux protéines sériques.

96

3. RESULTATS.

99

3.1. Complexation de l'aluminium dans l'eau.

99

A. A température ambiante.

99

. Sans calcium.

99

. En présence de calcium.

100

B. A 37°C.

101

. Sans calcium.

101

. En présence de calcium.

101

3.2. Capacité des différents chélateurs à mobiliser l'aluminium fixé aux protéines sériques.

103

4. CONCLUSION-DISCUSSION.

107

DEUXIEME PARTIE

Etude de nouveaux chélateurs de l'aluminium chez le Rat préalablement intoxiqué au chlorure d'aluminium.

115

INTRODUCTION

115

1. MATERIEL ET METHODE.

117

1.1. Choix de la voie d'administration.	117
1.2. Protocoles expérimentaux.	117
A. Protocole d'intoxication aluminique des animaux.	117
B. Protocole de traitement des animaux par les différents chélateurs.	118
C. Collecte des urines.	119
D. Sacrifice des animaux, prélèvements de sang, des organes et du fémur.	119
E. Déterminations analytiques.	120
2. RESULTATS.	120
3. CONCLUSION-DISCUSSION.	128
CONCLUSION DU CHAPITRE I	131

CHAPITRE II

Recherche et étude de nouveaux composés susceptibles de réduire l'absorption du phosphore alimentaire et administrables par voie orale. **132**

INTRODUCTION	132
1. MATERIEL ET METHODE	135
1.1. Critères de choix des complexants utilisés.	135
1.2. Protocoles expérimentaux.	136
A. Voie et mode d'administration.	136
B. Protocole de traitement des animaux par les différents complexants.	136
C. Collecte des urines et des fèces.	138
D. Protocole d'intoxication à long terme au chlorure de lanthane (100 jours).	139
E. Sacrifice des animaux, prélèvements de sang, des organes et du fémur.	140
F. Déterminations analytiques.	141
2. RESULTATS	141
2.1. Evolution pondérale des animaux traités par les différents complexants.	141
2.2. Evolution des teneurs en phosphore et en différents minéraux dans le plasma.	143
2.3. Effet des différents traitements complexants sur les teneurs en phosphore, en calcium, en zirconium, en lanthane et en aluminium dans les différents tissus.	144

2.4. Evolution de l'excrétion urinaire et fécale du phosphore et du calcium tout au long du traitement chélateur.	148
2.5. Etude de l'accumulation du lanthane dans l'organisme du rat après traitement à long terme (100 jours) au chlorure de lanthane hydraté.	153
3. CONCLUSION-DISCUSSION	156
 <i>III. Conclusion Générale.</i>	 <i>165</i>
 <i>VI. Références bibliographiques.</i>	 <i>169</i>
 <i>VII. Annexes.</i>	 <i>213</i>

Analyse bibliographique

I. Analyse bibliographique.

1. INTRODUCTION.

Ce chapitre est consacré au rappel des principales données de la littérature sur la chimie et la toxicologie de l'aluminium. Cependant, compte-tenu de l'importance et du nombre de publications sur ce sujet, cette étude sera limitée au rappel des principaux travaux réalisés depuis 1970 relatifs aux contaminations, aux phénomènes toxiques et aux pathologies observées chez l'Homme. L'aluminium dans l'environnement ne sera présenté qu'au travers des aspects essentiels.

Une première revue générale sur l'aluminium a été réalisée en 1957 par CAMPBELL et coll. Ce travail a été repris et complété par SORENSON et coll. en 1974.

2. PROPRIETES PHYSICO CHIMIQUES.

L'aluminium (Al) appartient au groupe III B de la classification périodique avec le gallium (Ga), l'indium (In) et le thallium (Tl) dont il partage certaines propriétés physico-chimiques. De densité 2,7, son point de fusion est de 658°C, son point d'ébullition de 2467°C. Sa pléiade (masses atomiques de 24 à 29, numéro atomique de 13) ne comporte qu'un seul isotope stable ^{27}Al . Les isotopes radioactifs n'étaient pratiquement pas utilisés pour les études biologiques car leur demi-vie est soit trop brève (23 minutes pour ^{28}Al), soit trop longue (740000 ans pour ^{26}Al). Cependant, des travaux récents (DAY et coll., 1991; BJORNSTAD et coll., 1992; OUGHTON et coll., 1992) ont démontré l'utilisation possible d' ^{26}Al comme traceur dans les tissus biologiques.

Le rayon ionique court (0,54 Å) (MARTIN, 1986 b) de l'atome d'aluminium confère à ce cation une forte attirance pour les anions, formant ainsi des sels très stables. Ainsi, les sels d'aluminium sont-ils souvent peu solubles dans l'eau. Les sels solubles forment des solutions incolores.

Le potentiel d'électrode du système redox (Al^{3+}/Al) est de -1,66 V.

À l'état cristallin, les sels d'aluminium renferment l'ion trivalent Al^{3+} .

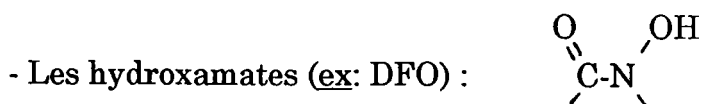
En solution aqueuse, l'aluminium conduit facilement à la formation d'hydroxyde d'aluminium $\text{Al}(\text{OH})_3$ qui donne naissance, en présence d'acides forts, à des composés amphotères du type chlorure ou sulfate d'aluminium (AlCl_3 ou $\text{Al}(\text{SO}_4)_3$) pour des pH très bas ou du type aluminate (aluminate de sodium (AlO_2Na) par exemple) en milieu alcalin.

En effet, le cation aluminique Al^{3+} n'existe que pour des $\text{pH} \leq 3$ alors que l'anion aluminate AlO_2^- n'existe qu'en milieu fortement alcalin ($\text{pH} \geq 11$).

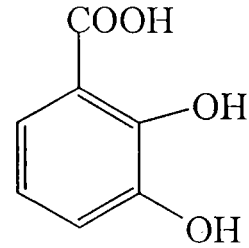
À $3 \leq \text{pH} \leq 11$, l'aluminium forme des sels très peu solubles, notamment avec des ions phosphates, mais il se forme également de nombreux complexes solubles. L'aluminium forme notamment des complexes solubles grâce aux doublets libres de l'oxygène présents dans les acides-alcools (citrique, tartrique, lactique,...) et aussi avec les groupements OH des phénols (TAM et Mc COLL, 1990).

Par ailleurs, l'aluminium peut exister sous forme de nombreuses combinaisons hydroxylées, pouvant prendre une forme colloïdale, telles: $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$, $\text{Al}(\text{OH})_3$, $\text{Al}(\text{OH})_4^-$, $\text{Al}_2(\text{OH})_2^{4+}$ (BAES et MESMER, 1976).

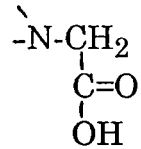
Les groupements possédant une certaine affinité à fixer Al^{3+} sont sensiblement identiques à ceux capables de complexer le Fer(III). Ils correspondent le plus souvent à des groupements comprenant des atomes d'oxygène. Ainsi, on retrouvera comme groupements fonctionnels susceptibles de fixer l'aluminium:



- Les catecholates (ex: acide 2,3-dihydroxybenzoïque) :



- Les amino-carboxylates (ex: EDTA) :



- Les phosphates

3. METHODES D'ANALYSE.

Le dosage de l'aluminium, métal longtemps considéré comme atoxique, n'avait jusqu'à une époque assez récente, que peu retenu l'attention des biologistes.

Depuis les travaux d'ALFREY et coll. en 1972, de nombreuses techniques de dosage de l'aluminium dans les milieux biologiques ont été décrites dans la littérature. Compte-tenu de l'abondance de l'aluminium dans l'environnement, il est nécessaire de souligner l'important risque de contamination qui représente une des principales difficultés rencontrées lors du dosage de cet élément à l'état de traces.

De plus, l'omniprésence de l'aluminium dans les réactifs et matériaux d'analyse accentue encore la difficulté de quantification de ce métal (CLAVEL et coll., 1983). C'est pourquoi, il convient de considérer les chiffres cités avec réserve, en raison des difficultés de dosages rencontrées lors de travaux antérieurs à 1972.

Depuis, l'utilisation de tubes de prélèvement en polypropylène ou en polyéthylène, indemnes de contamination aluminique, est recommandée (CLAVEL et coll., 1983). De même, les réactifs utilisés (acides chlorhydrique, nitrique, ...) doivent être de qualité ultra pure afin d'éviter

toute contamination des échantillons à analyser (CORNELIS et SCHUTYSER, 1984).

La conservation des échantillons est réalisée à 4°C; toutefois, les échantillons doivent être congelés à -20°C s'ils doivent être stockés. L'acidification des échantillons d'eau est nécessaire alors que l'acidification des échantillons d'urine et de liquide de dialyse est fortement recommandée afin d'éviter une précipitation des métaux (WILHELM et OHNESORGE, 1990).

Les progrès dans les techniques de dosage et la diminution des risques de contamination ainsi obtenue ont permis, depuis plusieurs années d'obtenir des valeurs très sûres.

Certaines méthodes, comme la colorimétrie et la fluorimétrie, ne sont pratiquement plus utilisées (CHOLAK et coll., 1943; NOLL et STEFANELLI, 1963; WILL, 1961). Seules les méthodes actuellement employées seront citées dans ce chapitre.

3.1. Méthodes de dosage de l'aluminium dans l'eau et les tissus biologiques:

. *Spectrométrie d'absorption atomique (S.A.A.) ou Spectrométrie d'absorption atomique électrothermique (S.A.A.E.).*

Ces techniques d'absorption atomique sont actuellement parmi les plus utilisées. En effet, de nombreux auteurs rapportent leur utilisation dans les milieux biologiques:

- KRISHNAN et coll., 1972; ANDERSEN, 1988; KOCH et coll., 1989; WANG et coll., 1991, pour la S.A.A. .

- ALDERMAN et GITELMAN, 1980; BRETHOLF et coll., 1983; GITELMAN et ALDERMAN, 1989; VAN GINKEL et coll., 1990, pour la S.A.A.E. .

La S.A.A. de flamme (S.A.A.F.) ne possède qu'une sensibilité pour l'aluminium de 30 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (soit $1,11 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$) (TAYLOR et WALKER, 1992). L'utilisation de la S.A.A. à four graphite a permis de ramener la limite de détection pour l'aluminium, dans les liquides biologiques à environ

2 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (soit $8.10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$) (VAN DER VOET et DE WOLFF, 1985; WANG et coll., 1991).

Dans les échantillons biologiques, il est fréquent d'atteindre avec la S.A.A.E. une limite de détection pour l'aluminium de l'ordre du $\mu\text{g.l}^{-1}$ (soit $4.10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$) (TAYLOR et WALKER, 1992).

. *Spectrométrie d'émission atomique en plasma à couplage inductif (S.E.A. à ICP) ou Spectrométrie d'émission atomique DCP (Direct Current Plasma) (S.E.A. à DCP).*

Avec les S.A.A. , ce sont les méthodes les plus utilisées dans le domaine biologique. Ce sont des techniques rapides et sensibles.

Grâce à la S.E.A, la limite de détection de l'aluminium dans les solutions aqueuses a été abaissée, approximativement, à $0,6 \mu\text{g.l}^{-1}$ (soit $2.10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$) (TAYLOR et WALKER, 1992).

. *Analyse par activation neutronique (A.A.N.).*

L'analyse par activation neutronique est une technique permettant, après bombardement neutronique de l'échantillon, de quantifier un métal par comptage du radioisotope formé.

C'est une méthode peu utilisée dans le domaine biologique en raison d'une méthodologie complexe et d'un coût généralement trop conséquent.

C'est une technique relativement sensible, basée sur l'activation de l'aluminium qui produit l' ^{28}Al et rapportée par BLOTCKY et coll. en 1976. Sa sensibilité équivalente à celle de la S.A.A.E. , pour un coût nettement plus élevé et une préparation beaucoup plus longue, explique sa faible utilisation dans le domaine biologique.

Récemment, ALFASSI et RIETZ (1994) ont suggéré une méthode permettant la détermination de l'aluminium dans les échantillons biologiques par A.A.N.I. (Analyse par Activation Neutronique Instrumentale). Cependant, cette méthodologie reste complexe.

. Polarographie impulsionnelle.

Cette méthode est basée sur l'électroactivité d'un complexe formé entre l'aluminium et le solochrome.

La nécessité de posséder des volumes d'échantillons relativement important et la longueur de cette technique font que la polarographie ne soit pratiquement plus utilisée pour le dosage de l'aluminium dans les milieux biologiques. Cependant, elle permet de déterminer des concentrations en aluminium de l'ordre de $1,3 \mu\text{g.l}^{-1}$ (soit $5.10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$) (BURNEL et coll., 1982a).

D'autres techniques de dosage peuvent être rencontrées dans la littérature mais restent le plus souvent très peu employées.

La *Résonance magnétique nucléaire (R.M.N.)*, qui a été utilisée à plusieurs reprises (KOCH, 1990; NAGATA et coll., 1992), présente l'avantage de nécessiter très peu de volume d'échantillon mais ne permet pas de déterminer des concentrations très faibles.

DATTA et coll. en 1990 ont utilisé l'*HPLC (High Performance Liquid Chromatography)* pour détecter le citrate d'aluminium dans une étude sur la spéciation de ce métal.

3.2. Méthodes de localisation tissulaire de l'aluminium:

. Colorations histochimiques.

La méthode la plus utilisée est la méthode à l'aluminon, décrite par IRWIN en 1954. Cette technique est basée sur la réaction histochimique entre l'aurine tricarboxylate d'ammonium ou "aluminon" et l'aluminium (III), qui forme, en milieu peu acide, un composé colloïdal rouge (IRWIN, 1955).

La limite de sensibilité de cette technique est de l'ordre de 3 p.p.m.. Cependant, des séparations sont généralement nécessaires car un certain nombre de composés (Be, Fe, Ti, Ga, ...) donnent également des colorations (CHARLOT, 1963).

. Laser Microprobe Mass Analysis: LAMMA.

La microsonde à impact laser permet l'analyse semi-quantitative des ions minéraux. Un rayon laser provoque l'ionisation des molécules de l'échantillon. Ces ions sont alors analysés par spectrométrie de masse.

Cette technique nécessite une lyophilisation préalable des échantillons et présente une assez mauvaise limite de détection.

Cette méthode a été appliquée à la détermination de l'aluminium dans le sérum et le liquide synovial de patients dialysés (MULLER et coll., 1982) . Elle est également utilisée pour la localisation ultra structurale et la détermination des métaux sur des coupes histologiques de tissu (VANDEPUTTE et coll., 1989). De même, GOOD et coll. (1992) ont utilisé cette technique pour mettre en évidence la présence d'aluminium dans le cerveau de patients atteints par la maladie d'Alzheimer.

Il existe également d'autres techniques de localisation tissulaire mais leur emploi est beaucoup plus restreint. En effet, la littérature rapporte l'utilisation de techniques de *microanalyse ionique* (TRUCHET, 1976; GALLE, 1981; BONHOMME et coll., 1989) .

4. VALEURS LIMITES REGLEMENTAIRES.

Actuellement, une législation spécifique concernant les rejets liquides et atmosphériques d'aluminium à partir des installations classées n'a pas encore été définie.

Seuls, certains ateliers de traitement de surface doivent respecter, par arrêtés préfectoraux, une teneur maximale de 5 mg.l^{-1} de rejets liquides (Décret du 26 septembre 1985) . Concernant les émissions atmosphériques d'aluminium, la limite de rejet a été fixée pour les fonderies à 5 mg.m^{-3} .

Cependant, la circulaire du 13 mai 1987, concernant la valeur limite réglementaire de concentration des agents chimiques dans l'atmosphère des locaux de travail, fixe , pour l'aluminium pulvérulent, fumées de soudage et composés alkylés, des valeurs maximales d'exposition (V.M.E.) respectives de 5, 5 et 2 mg.m^{-3} .

Certaines substances (dioxyde d'azote, NO_2 et dioxyde de soufre, SO_2), lorsqu'elles sont oxydées, sont capables de donner naissance aux acides nitrique et sulfurique qui favorisent la solubilisation des métaux, dont l'aluminium. C'est pourquoi, les émissions atmosphériques de telles substances font l'objet d'une réglementation stricte.

5. UTILISATIONS ET SOURCES D'EXPOSITION.

Du fait de son ubiquité, la pénétration de l'aluminium dans l'organisme humain est quasi inévitable aussi bien par voie pulmonaire (inhalation des poussières) que par voie digestive (boissons, aliments, ...) .

Il faut cependant considérer certains chiffres cités avec réserve en raison des difficultés de dosages rencontrées lorsque ces travaux ont été réalisés.

5.1. Aluminium dans l'environnement général.

L'aluminium est très répandu dans l'écorce terrestre (8,13%), étant par ordre d'abondance, le troisième élément de la nature après l'oxygène (46,6%) et le silicium (27,7%) (SORENSEN et coll., 1974).

Cependant, les teneurs en aluminium ne donnent que peu d'informations sur la biodisponibilité et la toxicité du métal.

La biodisponibilité du métal dépend du type d'exposition, des conditions physico-chimiques du milieu (pH, présence de complexants, température, environnement ionique et moléculaire), ainsi que des conditions physiologiques et du stade de développement des organismes considérés.

L'aluminium, en général sous forme insoluble, se trouve dans le sol en concentrations variables. Ainsi, certains sols sont très "chargés" en aluminium comme par exemple, le sol de Virginie ($265 \mu\text{g.g}^{-1}$) ou certains sols de Hawaï (179 à $318 \mu\text{g.g}^{-1}$) (SORENSEN, 1974).

La concentration atmosphérique en aluminium est très variable (de 0,1 à 100 $\mu\text{g.m}^{-3}$) (SORENSEN et coll., 1974). L'aluminium est présent dans l'atmosphère sous forme de très fines particules submicroscopiques dont la constitution dépend de notre environnement.

Ces particules, le plus souvent des aluminosilicates, sont captées par les macrophages des alvéoles pulmonaires. Certaines de ces particules sont ensuite dissoutes par les lysosomes des macrophages, libérant ainsi l'ion aluminium qui diffuse dans l'organisme (BERRY et coll., 1978). Les concentrations les plus élevées se rencontreront dans les grandes agglomérations. De plus, la proximité de certaines industries polluantes et les conditions météorologiques favoriseront l'élévation de la concentration atmosphérique en aluminium.

La teneur en aluminium des eaux va dépendre de l'origine de l'eau brute et des conditions physico-chimiques rencontrées par cette eau. Ainsi, une eau acide pourra solubiliser l'aluminium contenu dans un sol et l'entraîner, par des phénomènes de lessivage, dans les eaux superficielles des cours d'eau ou dans les eaux souterraines (DRISCOLL, 1985).

Inversement, dans des eaux à pH neutre, les minéraux aluminiques sont insolubles et les concentrations en aluminium dissout sont extrêmement faibles. Des effluents chargés en aluminium et rejetés dans un cours d'eau dont le pH est voisin de 7 favoriseront donc l'enrichissement des sédiments en aluminium.

Par conséquent, comme un pH inférieur à 5 favorise l'élévation de la teneur en aluminium dissout dans l'eau (SORENSEN et coll., 1974), les pluies acides pourront induire, dans certaines régions, une augmentation importante de cette teneur dans les eaux des lacs et des rivières. Ainsi, la concentration en aluminium dissout dans l'eau variera de 10 à 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (PLATTS et coll., 1977; BIRCHALL et CHAPPELL, 1987).

L'aluminium, à l'état soluble peut passer dans les différents niveaux de la chaîne trophique. L'acidité des lacs et des rivières, avec pour conséquence une augmentation de leur teneur en aluminium, perturbe plus ou moins gravement le métabolisme des animaux.

En effet, en milieu acide, l'aluminium, lorsqu'il est abondant, réduit la survie de certaines espèces de poissons (BROWN, 1983) et d'invertébrés aquatiques (FRANCE et STOCKES, 1987). Les formes inorganiques et

ioniques du métal affectent les échanges ioniques au niveau des branchies ainsi que les mécanismes de transfert ionique.

Dans des lacs acidifiés canadiens, STOCKES et coll. (1985) ont montré l'élévation de la concentration en aluminium chez des algues.

De même, la présence d'aluminium a été observée chez des mollusques (huître, moule) et chez des crustacés marins (crevette, crabe) d'origines diverses (CHASSARD-BOUCHAUD et GALLE, 1986).

Lorsque le pH est supérieur à 7, l'éclosion des oeufs du poisson *Brachydanio rerio* est soit retardée, soit avancée suivant la concentration en aluminium (DAVE, 1985).

Toutefois, il faut noter que les populations aquatiques sont très sensibles aux variations de pH indépendamment des teneurs minérales.

En effet, la survie des poissons dans des eaux ayant un pH acide peut être liée au rapport Ca/Al, l'aluminium s'avérant plus toxique pour des faibles teneurs en calcium (HUNN et coll., 1987; SAYER et coll., 1991). L'étude de CHEVALIER et coll. (1985), réalisée chez des ombles de fontaine, *Salvelinus fontinalis*, provenant de lacs acidifiés, montre un impact sur les branchies. L'exposition chronique à un pH faible et à une faible concentration en calcium, éventuellement associée à une concentration en aluminium importante, serait responsable d'un déséquilibre de l'osmorégulation du poisson.

Pour l'ensemble des familles de poissons, c'est le pH qui sera le principal responsable de la présence d'une population dans un cours d'eau. En effet, l'ensemble des espèces cessent de se reproduire, déclinent ou disparaissent suite à l'acidification de leur milieu. Cependant, le métal peut s'avérer toxique selon la forme chimique dans laquelle il se présente. Les fractions ioniques sont généralement les plus nocives, principalement chez les alevins (WEATHERLEY et coll., 1990). La toxicité de l'aluminium dans l'eau est directement contrôlée par le pH et les concentrations en ligands potentiels avec lesquels le métal peut s'unir.

Des études en laboratoire sur des poissons exposés à des eaux acides mettent en évidence une fuite d'électrolytes à partir du plasma, corrélée à une réduction de l'osmolarité, pouvant altérer les fonctions physiologiques des animaux. A ces perturbations physiologiques, imputables à l'acidité trop élevée des eaux, peuvent s'ajouter des effets toxiques de métaux, dont l'aluminium.

Le métal a pour principale origine les sédiments et les minéraux du sol à partir desquels il est mobilisé, mais aussi les retombées atmosphériques.

Les effets toxiques de l'acidité et de l'aluminium ont été démontrés chez le poisson, *Salmo gairdneri*. L'acidité et l'aluminium provoquent une toxicité ionorégulatrice et l'aluminium entraîne une toxicité respiratoire (PLAYLE et coll., 1989).

Cependant, à pH acide et en présence d'un excès de silicium, l'aluminium forme des complexes d'hydroxy-aluminosilicates qui réduisent la biodisponibilité et la toxicité de l'aluminium (BIRCHALL et coll., 1989).

Par conséquent, chez les animaux aquatiques, les principaux facteurs intervenant dans la toxicité des eaux acides sont le pH et les teneurs en calcium, silicium et aluminium.

L'aluminium est présent dans toutes les plantes mais généralement en quantité inférieure à 1 p.p.m. . Cependant, certaines espèces végétales (cryptogames), qui vivent sur des terrains acides, peuvent concentrer l'aluminium sans pour autant être affectées par des effets toxiques. Par exemple, la quantité d'aluminium présente dans les feuilles de thé peut varier de 2 à 6 mg.l⁻¹ (FLATEN et ODEGARD, 1988).

Toutefois, lorsque l'aluminium est abondant dans la rhizosphère, il peut ralentir la croissance de nombreuses plantes car la dissolution du métal dans les sols est un facteur limitant de cette croissance (BENNET et BREEN, 1989). En effet, en 1988, GODBOLD et coll. ont montré que l'aluminium inhibait l'élongation racinaire de *Picea abies*, en entrant en compétition avec l'absorption du calcium et du magnésium. De plus, l'aluminium, en complexant les phosphates inorganiques au niveau racinaire, va inhiber la biodisponibilité de ces phosphates pour la plante (JENSEN et coll., 1989). L'élongation racinaire n'apparaît que si le méristème racinaire est en contact avec l'aluminium du sol (DELHAIZE et RYAN, 1995).

Ainsi, l'aluminium du sol, en relation avec les pluies acides, pourrait être une cause du dépérissement des forêts (Vosges, ...).

5.2. Utilisations industrielles de l'aluminium.

L'aluminium est utilisé depuis l'antiquité, à l'état d'alun, pour la purification des eaux. En 1746, POTT montre que l'alun dérive d'une "terre" particulière, l'alumine, que MARGGRAF isole de l'argile en 1754. DAVID en 1810 puis OERSTED en 1825 isolent pour la première fois l'aluminium sous la forme d'un métal encore très impur.

Ce n'est qu'en 1827 que WOHLER isola le métal pur, par réduction du chlorure d'aluminium anhydre par le potassium.

Par la suite, on prit rapidement conscience des remarquables propriétés physiques et de l'intérêt industriel de l'aluminium. C'est pourquoi, grâce aux procédés d'électrolyse (1886) sous forme d'hexafluorure d'aluminium (AlF_6^{3-}), la fabrication de l'aluminium en quantités industrielles fut rapidement mise en oeuvre.

Depuis, la production d'aluminium n'a cessé de croître. Actuellement, sa production annuelle dépasse celle de tous les autres métaux, à l'exception de celle du fer. La production mondiale est passée de 602 000 tonnes en 1938 (BAUDART, 1975) à 19,3 millions de tonnes en 1990 (sources: World Metal Statistics). A l'heure actuelle, le métal peut être obtenu à 99,9% pur.

L'aluminium est aujourd'hui utilisé dans de nombreuses industries. Il peut être utilisé pur ou sous forme d'alliages, dans diverses constructions (aéronautiques, automobiles, navales).

L'alumine, l'alumine hydratée, le borate d'aluminium et d'autres sels d'aluminium sont utilisés selon leurs propriétés en verrerie, en teinturerie, en céramique, dans les peintures, le tannage des peaux, ...

Le kaolin rentre dans la composition de certains élastomères.

Longtemps réputé comme non toxique, l'aluminium a remplacé le fer dans la fabrication d'ustensiles divers et d'emballages de produits alimentaires. De plus, plusieurs composés aluminiques participent à la fabrication ou entrent dans la composition de cosmétiques, adjuvants alimentaires ou médicaments.

L'inaltérabilité de l'aluminium à l'air est due à la formation, à la surface du métal, d'une pellicule protectrice extrêmement fine et homogène d'oxyde d'aluminium (Al_2O_3) qui confère au métal sa résistance chimique.

L'Homme est surtout exposé aux poussières ou fumées rejetées lors des différents procédés de fabrication (concassage, électrolyse, soudage,...).

5.3. Aluminium dans les produits alimentaires.

. Emballages.

Il est actuellement bien établi que le contact des produits alimentaires avec certains métaux, dont l'aluminium, peut entraîner des modifications (LIONE et coll., 1984; INOUE et coll., 1988). Parmi les métaux toxiques, le plomb et le cadmium ont été retirés de tout contact avec les produits alimentaires. Pour l'aluminium, la contamination reste faible comparée aux fortes teneurs rencontrées dans les aliments. En 1989, LEE a évalué cette contamination à moins de 5% .

Jusqu'à aujourd'hui, la toxicité des alliages à base d'aluminium n'a jamais pu être mise en évidence. Ces derniers sont donc largement employés dans l'emballage des aliments. L'industrie du verre et de la porcelaine utilise également de l'aluminium. Cependant, une étude récente (KANDIAH et KIES, 1994) montre une atteinte non négligeable du fémur (perte de poids de l'os et élévation de la concentration osseuse en aluminium) causée par la consommation d'aluminium contenu dans des boissons non alcoolisées conditionnées dans des boîtes en aluminium.

Devant l'inquiétude des consommateurs, en raison des nombreux ustensiles de cuisine à base d'aluminium, la "US Food and Drug Administration" avait ouvert une enquête (F.D.A., 1955). Ce travail reconnaissait l'innocuité de l'aluminium utilisé dans l'industrie alimentaire. Des travaux plus récents (HENRY et coll., 1984) précisent, en effet, que la part d'aluminium absorbée, par rapport à la quantité ingérée est de 10%. Malgré tout, NAGY et JOBST (1994) émettent des réserves quant à

l'importance actuelle de la distribution et de l'utilisation d'ustensiles de cuisines à base d'aluminium.

. Alimentation.

L'eau destinée à la distribution peut contenir, dès son origine de captation, de l'aluminium sous forme soluble et/ou sous forme particulaire d'argile en suspension (aluminosilicates).

Les sels d'aluminium sont, avec les sels de fer, les réactifs les plus utilisés lors des traitements de clarification des eaux de surface destinées à la préparation de l'eau de consommation, d'où une augmentation possible de la teneur en aluminium de celle-ci.

La teneur en aluminium des eaux de distribution dépend donc de l'origine de l'eau brute et des conditions de traitement de cette eau (SIMPSON et coll., 1988).

Sa qualité est néanmoins très contrôlée dans la plupart des pays du monde. En Europe, il existe actuellement des normes sur la teneur en aluminium dans les eaux suivant leur utilisation; soit, pour les eaux de consommation, un niveau guide de $50 \mu\text{g.l}^{-1}$ et une concentration maximale admissible (C.M.A.) de $200 \mu\text{g.l}^{-1}$ (C.E.E., loi du 15 juillet 1980). Cette C.M.A. est la même que celle préconisée par l'Organisation Mondiale de la Santé dans son rapport publié en 1984 et intitulé: "Guide pour la qualité des eaux de boisson". En France, cette concentration a été retenue par le décret du 3 janvier 1989.

Parmi les autres boissons ou aliments liquides, la concentration en aluminium reste généralement très faible, exceptée pour le vin qui peut apporter des concentrations supérieures à 4 mg.l^{-1} (vin blanc en contact avec l'aluminium), en raison de son acidité et du contact avec le bouchon, le capuchon recouvrant le bouchon et la bouteille en verre. La bière et le "cola" contiennent des teneurs en aluminium de l'ordre de $800 \mu\text{g.l}^{-1}$ (DUGGAN et coll., 1992).

L'ingestion d'aluminium par l'eau de boisson reste très faible, en comparaison de l'apport par les aliments (DUGGAN et coll., 1992).

De nombreux produits alimentaires contiennent moins de $10 \mu\text{g.g}^{-1}$ d'aluminium. La teneur en aluminium des aliments dépend de la teneur du sol en aluminium, ce qui explique les variations géographiques rencontrées.

Néanmoins, certains aliments d'origine végétale sont riches en aluminium. En effet, il est fréquent de rencontrer des quantités assez importantes (10 à 140 mg.kg^{-1}) dans certains végétaux (laitue, champignons, cerises, pommes de terre, petits pois, ...). Les produits d'origine animale renferment généralement des teneurs beaucoup plus faibles (SCHAMSCHULA et coll., 1988; WANG et coll., 1991).

Le thé peut renfermer des teneurs importantes en aluminium, mais des travaux expérimentaux réalisés chez le Rat montrent que le métal présent dans le thé est très peu absorbé au niveau intestinal (FAIRWEATHER-TAIT et coll., 1991).

L'industrie alimentaire utilise plusieurs sels d'aluminium comme additifs alimentaires, par exemple l'additif E 173 (LIONE, 1983). Les levures artificielles peuvent également être à l'origine de contaminations importantes.

Les concentrations en aluminium des aliments sont donc très variables. C'est pourquoi, plusieurs études ont été réalisées afin de déterminer l'apport d'aluminium dû à l'alimentation.

En 1966, TIPTON et coll. ont étudié étudié 17 éléments de l'alimentation d'une femme et d'un homme pendant 30 jours. Il a déterminé que le mari avait absorbé 22 mg.jour^{-1} d'aluminium et la femme 18 mg.jour^{-1} .

D'autres études donnent un apport alimentaire journalier moyen en aluminium de 4 mg (ALFREY, 1984), $10\text{-}12 \text{ mg}$ (JAULMES et HAMELLE, 1971) ou de 50 mg (GREGER, 1985).

D'une façon générale, l'apport quotidien en aluminium devrait être compris entre 10 et $100 \text{ mg Al.jour}^{-1}$ (CAMPBELL et coll., 1957).

Il semblerait que les teneurs aluminiques moyennes soient plus réduites en Europe ($5\text{-}20 \text{ mg d'aluminium.jour}^{-1}$) qu'en Amérique du nord ($50 \text{ mg d'aluminium.jour}^{-1}$) car les adjuvants à base d'aluminium sont moins utilisés et le mode d'alimentation est différent.

Récemment, dans une étude réalisée aux Etats-Unis, la F.D.A. concluait que la teneur en aluminium dans l'alimentation (probablement

inférieure à 15 mg.jour⁻¹) ne semblait pas suffisante pour entraîner une rétention du métal dans l'organisme.

5.4. Aluminium dans les produits pharmaceutiques.

. Médicaments contenant un sel d'aluminium dans l'excipient ou l'enrobage.

On oublie trop souvent que l'aluminium peut être contenu dans l'excipient ou l'enrobage de médicaments, mais les concentrations sont en général très faibles.

En effet, il existe des teneurs substantielles d'aluminium dans des solutés de perfusion (SEDMAN et coll., 1985; MESSING et coll., 1986; HEWITT et coll., 1987) et dans des solutions prêtes à l'emploi pour dialyse péritonéale et pour hémofiltration. Les dosages de solutions commerciales d'albumine utilisées en plasmaphérèse ont révélé des teneurs en aluminium supérieures à 300 µg.l⁻¹ (MILLINER et coll., 1985) et de 10 à 1109 µg.l⁻¹ (GAMMELGAARD et SANDBERG, 1989).

De même, l'aluminium peut entrer comme adjuvant dans la composition de vaccins, sous forme d'hydroxyde d'aluminium colloïdal. En effet, dès 1926, l'incorporation d'aluminium en, tant qu'adjuvant, a été réalisée dans la préparation du vaccin antidiphtérique afin d'en augmenter les propriétés antigéniques. Les vaccins, qui comportent de l'aluminium en tant qu'adjuvant, résultent du mélange de l'antigène avec le métal (hydroxyde ou phosphate d'aluminium). Ainsi, l'aluminium est-il souvent rencontré dans les vaccins contre la diphtérie et le tétanos (PHANUPHAK et coll., 1989; SHIRODKAR et coll., 1990). Les composés aluminiques retrouvés dans les vaccins peuvent stimuler la synthèse des immunoglobulines E (IgE) et engendrer des réactions d'hypersensibilité allergique chez l'Homme (NAGEL et coll., 1977; VASSILEV, 1978; POULSEN et WEEKE, 1985). L'injection i.m. d'hydroxyde d'aluminium chez la Souris entraîne l'apparition de granulomes inflammatoires qui persistent dans le temps (GOTO et AKAMA, 1982). L'injection intrapéritonéale de vaccins (diphtérie, tétanos, polyomyélite), contenant de l'aluminium comme adjuvant, entraîne une élévation transitoire de la

concentration aluminique du cerveau chez la Souris (REDHEAD et coll., 1992).

Les caractéristiques de l'eau et des solutions salines, appelées dialysats, utilisées en hémodialyse sont définies dans une monographie "Eau pour hémodialyse" dans la dixième édition de la Pharmacopée Française. La norme "eau pour dilution des solutions concentrées pour hémodialyse" fixe la limite à 30 µg d'aluminium par litre. L'amélioration des techniques analytiques qui fait reculer la limite de détection a permis le projet de directive européenne fixant une valeur maximale admissible dans le liquide de dialyse de 10 µg d'aluminium par litre.

Pour tous ces produits pharmaceutiques, la contribution des matériaux de conditionnement n'est pas toujours négligeable. En effet, selon le matériau (utilisation ou non de catalyseurs aluminiques dans le procédé de fabrication), les teneurs en aluminium pourront être plus ou moins élevées.

De même, le temps de séjour du produit dans son emballage augmentera le risque de migration du contenant vers le contenu, à condition que le matériau contienne des teneurs élevées en aluminium. Un pH acide favorisera également cette migration de l'aluminium (KAEHNY et coll., 1977).

Le choix du conditionnement sera aussi très important. Le verre possède dans sa composition de l'alumine. Les bouchons sont parfois chargés en kaolin (silicate d'aluminium).

Enfin, le choix du traitement stérilisant aura son influence car le temps et la température peuvent dégrader le bouchon ou la solution.

. Médicaments à base d'un sel d'aluminium.

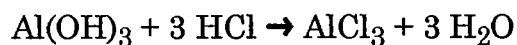
Certaines propriétés physico-chimiques de l'aluminium ont conduit à l'utilisation de ce métal dans le domaine thérapeutique. Ainsi, les antiacides à base d'aluminium (HURWITZ et coll., 1976; GORSKY et coll., 1979; DI JOSEPH et coll., 1990) et les gels d'alumine (BERLYNE et coll., 1970; BOUKARI et coll., 1978; BRAHM, 1986; LARSON et coll., 1986; BURGESS et coll., 1992) sont les principales sources d'apport chez l'Homme.

La propriété chimique de l'aluminium à former avec les phosphates des complexes insolubles de phosphates d'aluminium est à la base de l'utilisation des gels d'alumine en thérapeutique, afin de diminuer l'absorption intestinale du phosphore chez des patients insuffisants rénaux et ainsi de diminuer les calcifications des tissus mous (SPENCER et LENDER, 1979).

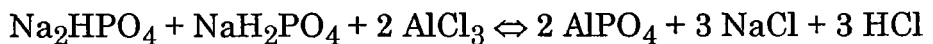
Parmi tous les composés d'aluminium, l'hydroxyde d'aluminium est le plus utilisé chez l'insuffisant rénal chronique car ses taux de solubilité et d'absorption intestinale sont les plus faibles. Par conséquent, cette formulation chimique du métal se caractérisera par une action antiacide et une capacité à précipiter les phosphates afin de mieux les éliminer par les matières fécales (YOKEL, 1989).

Au niveau stomacal, le mécanisme de fixation des phosphates par l'hydroxyde d'aluminium se résumera ainsi:

. Sous l'action de l'acide chlorhydrique gastrique, il y aura formation de chlorure d'aluminium.



. Le chlorure d'aluminium réagira ensuite avec les phosphates.



. Les phosphates d'alumine (AlPO_4) seront alors éliminés dans les fèces. La phosphatémie et la phosphaturie seront donc diminuées (DIAMANT et GAMBERTOGLIO, 1976)

D'autres sels d'aluminium, minéraux et organiques, sont utilisés comme antiacides gastriques, astringents, antiseptiques, analgésiques et antidiarrhéiques (LIONE, 1983).

Par exemple, le phosphate d'aluminium a été utilisé dans le traitement de l'ulcère duodénal (POYNARD et coll., 1990). La plupart des sels insolubles administrés per os (carbonate basique, hydroxyde, ...) sont d'ailleurs utilisés pour leur propriété antiacide au niveau stomacal. Ces derniers sont généralement associés à d'autres composés car ils ne

présentent pas d'activité neutralisante puissante, exceptés le Phosphalugel et l'Alternagel, constitués d'un seul sel d'aluminium.

Les sels solubles d'aluminium (acétates, acétolactates, acétotartrates, chlorates, ...) sont quant à eux plus généralement utilisés pour leur caractère astringent et légèrement antiseptique.

D'autres sels solubles possèdent des propriétés antisudorales (formiate d'aluminium) ou un pouvoir antidiarrhéique (salicylate d'aluminium).

Des solutions anhydres de chlorure d'aluminium à 6,25% dans de l'alcool éthylique sont utilisées dans le traitement des folliculites chroniques (SHELLEY et THURLEY, 1980).

. Cas particulier des laits infantiles.

En 1987, HEWITT et coll. montrent que certains laits infantiles, pour le 1^{er} et le 2^{ème} âge, renferment des teneurs en aluminium de 1 à 2 mg.kg⁻¹. Ils ont retrouvé dans ces laits des concentrations de 35 à 2080 µg Al.l⁻¹ pouvant induire des intoxications chez de jeunes enfants.

En effet, en 1985, FREUNDLICH et coll. avaient montré que des concentrations de 230 µg Al.l⁻¹ pouvaient induire des intoxications létales chez de très jeunes enfants urémiques. De même, HAWKINS et coll. (1994) concluent que des laits contenant plus 300 µg.l⁻¹ d'aluminium pouvaient induire des phénomènes toxiques chez l'enfant.

6. METABOLISME DE L'ALUMINIUM.

Il existe peu d'informations précises concernant le métabolisme de l'aluminium chez l'Homme. En effet, la plupart des études porte sur la comparaison des teneurs en aluminium de plusieurs tissus ou celle entre tissus sains et tissus malades (GANROT, 1986).

On pensait, à la suite des travaux de TIPTON et coll. (1966), que la balance (absorption-élimination) de l'aluminium était nulle et que son absorption était par conséquent très faible. En fait, celle-ci est beaucoup plus importante, et on peut penser que la quantité totale d'aluminium chez

un sujet sain est comprise entre 30 et 50 mg, dont la moitié serait contenue dans le squelette et un quart dans les poumons.

6.1. Pénétration dans l'organisme.

. Absorption cutanée.

Certains composés aluminiques entrent dans la composition de déodorants et de divers cosmétiques. L'aluminium semble pénétrer dans la couche cornée mais ne traverse pas l'épiderme. La peau pourrait être une barrière efficace, la pénétration transcutanée devenant ainsi négligeable (ALFREY, 1983; SKALSKY et CARCHMAN, 1983).

Il faut cependant rester prudent car les potentialités d'absorption cutanée de l'aluminium à partir de tels produits sont encore insuffisamment étudiées.

. Pénétration pulmonaire.

L'absorption pulmonaire d'aluminium est possible car de nombreuses poussières inhalées (aérosols) contiennent de l'aluminium qui est capté par les macrophages alvéolaires (TARTRAI et coll., 1983). C'est d'ailleurs la principale voie de pénétration en pathologie professionnelle.

Les personnes travaillant dans les industries de l'aluminium sont les plus exposées. En effet, dès 1962, Mc LAUGHLIN et coll. décrivent une intoxication professionnelle chez un ouvrier exposé pendant plus de 13 ans à des poussières d'aluminium et décédé d'encéphalopathie et de fibrose pulmonaire.

L'autopsie a révélé des teneurs particulièrement importantes dans les poumons (18 fois supérieure à la normale) mais aussi dans le foie et le cerveau.

Dans une usine dont l'atmosphère est chargée en poussières d'alumine, WALDRON EDWARD et coll. (1971) constatent une élévation significative de l'aluminémie chez les ouvriers. Le personnel exposé aux poussières d'alumine n'excréterait, que très lentement et à de faibles concentrations, le métal accumulé (LJUNGGREN et coll., 1991). En effet, la

clairance de l'aluminium stocké est relativement longue (UNGVARY et coll., 1983).

SZCZEKOcki et CHMIELEWSKI (1978) ont mis en évidence une relation linéaire entre la concentration en oxyde d'aluminium dans l'air et la quantité d'aluminium présent dans le sérum et les urines d'ouvriers exposés à des poussières d'alumine. De plus, ils observent une corrélation entre aluminium sérique et aluminium urinaire. En 1983, SJÖGREN et coll. confirment ces observations, à partir d'études sur des ouvriers fabriquant des poudres à base d'aluminium et de sulfate d'aluminium. L'aluminémie et l'aluminurie dépendent donc de la teneur en aluminium de l'environnement professionnel, de la durée d'exposition et de la nature des émissions (poussières, fumées, ...) (SJÖGREN et coll., 1988). L'aluminium inhalé sous forme de poussières est phagocyté par les macrophages alvéolaires puis dissout par des phagolysosomes. Les substances, et en particulier l'aluminium, sont ensuite véhiculées dans l'organisme par les voies sanguines et lymphatiques, d'où une élévation de l'aluminémie (BERRY et coll., 1978). Une fraction de l'aluminium inhalé est rapidement excrétée dans l'urine alors que l'autre fraction est excrétée beaucoup plus lentement, certainement après redistribution du métal dans l'organisme (SJÖGREN et coll., 1985).

Lorsque la quantité inhalée est très importante, il y a accumulation dans les poumons dont la teneur peut alors atteindre des valeurs 10 à 20 fois supérieures à la normale.

L'inhalation d'oxydes d'aluminium entraîne l'apparitions d'irritations et d'inflammations pulmonaires chez le Rat (WHITE et coll., 1987). JEDERLINIC et coll. (1990) confirment cette observation chez des ouvriers exposés au métal et présentant des fibroses pulmonaires.

Néanmoins, ces substances possèdent des potentialités fibrotiques inférieures à celles de l'amiante, du charbon ou de la silice (ABRAMSON et coll., 1989).

MUSSI et coll. (1984) démontrent, en réalisant des études chez des ouvriers exposés à l'aluminium, que celui-ci pénètre plus facilement au travers des poumons à l'état gazeux qu'à l'état de poussières.

Il faut noter que d'anciens documents du début du siècle relatent l'utilisation de l'aluminium pour ses effets curatifs chez des patients atteints de silicose, jusqu'à la découverte des effets fibrotiques du métal chez l'Homme.

En 1988, DUBOIS et coll. montrent que l'inhalation de lactate d'aluminium réduit significativement la silicose chez le Mouton en diminuant les processus pathologiques et la rétention des cristaux au niveau pulmonaire. BROWN et coll. (1989) confirment ces résultats chez le Rat. Ainsi, des ouvriers exposés à des silicates d'alumine ne montrent pas de pathologies pulmonaires. MUSK et coll. (1988) confirment expérimentalement cette absence d'effet chez le Hamster. Toutefois, l'aluminémie est significativement augmentée chez des ouvriers exposés à des teneurs atmosphériques en Al_2O_3 (RÖLLIN et coll., 1991).

Ce phénomène d'absorption pulmonaire se produit en permanence, chez tout individu exposé à de faibles teneurs atmosphériques en aluminium. L'aluminium est alors normalement éliminé par voie fécale et urinaire sans apparition de phénomènes pathologiques.

Il faut soulever l'hypothèse émise par ROBERTS (1986) selon laquelle les aluminosilicates franchiraient la barrière olfactive et atteindraient les lobes olfactifs. Ils favoriseraient alors la létalité des cellules cérébrales en accélérant la production de protéines amyloïdes. L'aluminium et le silicium ont été localisés au centre de plaques séniles, leurs teneurs étant corrélées à l'âge de l'individu.

. Pénétration par la voie digestive.

La quantité d'aluminium normalement ingérée par jour peut varier de façon importante. 16% de cette quantité seraient présent à l'état naturel dans les aliments, 80% proviendraient d'additifs et 4% seulement de la contamination par les ustensiles de cuisine (LEE, 1989).

Néanmoins, l'absorption digestive d'aluminium reste normalement faible par rapport à la quantité ingérée car l'aluminium forme dans le tractus gastro-intestinal des complexes insolubles éliminés dans les fèces. D'après ALFREY (1984), la quantité absorbée ne serait que de 15 $\mu\text{g}/\text{jour}$.

Cependant, cette absorption peut être nettement augmentée en fonction de certains facteurs, notamment chez des patients insuffisants rénaux, à qui l'on prescrit des gels d'alumine, chez des personnes atteintes d'ulcères à l'estomac traitées avec des antiacides ou encore chez de très jeunes enfants dont le tractus gastro-intestinal est encore immature...

En effet, chez des rats adultes soumis à un régime à base d'aluminium (dose de 25 p.p.m., par voie orale) pendant 24 jours, l'aluminémie augmente significativement (ONDREICKA et coll., 1966). De même, dès 1970, BERLYNE et coll. décèlent une hyperaluminémie chez des insuffisants rénaux à qui l'on avait prescrit des composés aluminiques, par intermittence. Ils préconisaient alors de ne pas employer de tels composés qui, selon eux, pouvaient entraîner une élévation de l'aluminémie chez 30% des patients (BERLYNE et coll., 1970, 1972).

Si l'absorption de l'aluminium par la voie digestive a été longtemps discutée, de nombreuses études cliniques et travaux expérimentaux ont montré qu'elle était loin d'être négligeable. Les travaux de KAEHNY et coll. (1977 a) confirment que le tractus gastro-intestinal n'est pas une barrière totalement imperméable à l'aluminium.

L'administration orale de carbonate d'aluminium durant trois jours chez des sujets dont la fonction rénale est normale, provoque une élévation de l'aluminurie de quatre à dix fois suivant les individus (RECKER et coll., 1977).

L'administration orale et quotidienne d'aluminium, pendant quelques jours, à des patients urémiques non dialysés entraîne une hyperaluminémie (MAURAS et coll., 1982; BRAHM, 1986; ALLAIN et coll., 1990).

L'élévation des teneurs aluminiques est corrélée à la dose ingérée, à la durée du traitement et à l'état physiologique des sujets concernés. Ainsi, pour la même quantité de métal ingérée, l'aluminémie sera supérieure chez des patients dialysés (KNOLL et coll., 1984).

En effet, chez le sujet urémique dialysé, l'ingestion d'aluminium entraîne une élévation de l'aluminémie. En 1978, BUGÉ et coll. citent le cas d'une personne hémodialysée, atteinte d'hyperphosphorémie, à qui l'on a fait ingérer, en 43 mois, environ 3,12 kg d'aluminium métal, sous forme d'hydrocarbonate d'alumine. L'apparition de signes d'encéphalopathie a entraîné l'interruption du traitement. Son aluminémie était alors de 300 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Neuf mois après l'arrêt du traitement, les troubles ont disparu et l'aluminémie avait chuté à 145 $\mu\text{g.l}^{-1}$.

CAMPISTOL et coll. (1989) décrivent le cas d'un malade adulte urémique qui a développé une encéphalopathie après avoir pris de fortes doses d'antiacides sous forme de sucralfate (mélange de sulfate de sucrose et d'hydroxyde d'aluminium) alors qu'il était hémodialysé depuis 3 ans. Son

taux sérique d'aluminium est passé de $40 \mu\text{g.l}^{-1}$ à $400 \mu\text{g.l}^{-1}$ au bout de 30 jours de traitement.

Depuis une dizaine d'années, les enfants urémiques sont de plus en plus nombreux à être dialysés par la technique de dialyse péritonéale ambulatoire continue. Ce procédé ne permet pas de contrôler une hyperphosphatémie très élevée, surtout chez les plus jeunes enfants ingérant les phosphates contenus dans le lait. Par conséquent, l'utilisation de grandes quantités de gels d'aluminium est très répandue.

En effet, en 1984, SALUSKY et coll. rapportent les résultats d'un dosage sanguin effectué chez 16 enfants en dialyse péritonéale ambulatoire.

Ils constatent que l'aluminémie corrélée avec la quantité de métal ingérée est inversement proportionnelle à l'âge et au poids corporel des enfants. MILLINER et coll. (1987) arrivent aux mêmes conclusions. De plus, SALUSKY et coll. (1991) montrent chez des enfants régulièrement dialysés par voie péritonéale et qui ont ingéré de l'hydroxyde d'aluminium pendant 12 mois à la dose conseillée par WINNEY et coll. (1986) ($30 \text{ mg d'Al.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$), que l'aluminémie subit une augmentation notable.

De même, chez des enfants urémiques non dialysés, la quantité d'aluminium absorbée peut être tellement importante qu'elle entraîne à elle seule un effet toxique grave. NATHAN et PEDERSEN (1980) rapportent le cas d'un enfant urémique non dialysé décédé à l'âge de 6 ans d'encéphalopathie consécutive à la prise orale d'hydroxyde d'aluminium. L'autopsie a révélé une quantité d'aluminium présente dans la matière grise de $47 \mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec. RANDALL (1983) décrit aussi le cas d'une fillette âgée de 11 mois atteinte d'encéphalopathie à qui l'on avait prescrit du carbonate d'aluminium et dont l'aluminémie était de $319 \mu\text{g.l}^{-1}$. GRISWOLD et coll. (1983) décrivent également le cas d'un enfant urémique atteint d'encéphalopathie et d'ostéomalacie ayant pris de l'hydroxyde d'aluminium de l'âge de 6 mois à l'âge de 31 mois, âge auquel son aluminémie était de $334 \mu\text{g.l}^{-1}$.

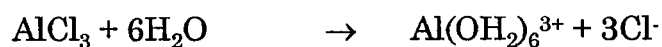
ANDREOLI et coll. (1984) citent le cas de trois enfants atteints d'urémie, à qui l'on avait prescrit $100 \text{ mg d'Al.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$ depuis l'âge de un mois et qui ont développé une ostéomalacie.

Cette augmentation de l'absorption chez l'enfant, comparativement à l'adulte, serait liée à une immaturité de la barrière gastro-intestinale comme les travaux de TSOU et coll. (1991) tendent à le démontrer. Selon BISHOP (1989), cette potentialité d'absorption pourrait être de 10 à 100 fois plus importante chez l'enfant que chez l'adulte.

L'absorption gastro-intestinale de l'aluminium dépend donc de l'état physiologique de l'individu, de la dose ingérée et de la forme physico-chimique du métal (YOKEL et Mc NAMARA, 1988).

En effet, la quantité d'aluminium absorbée va dépendre de l'importance de la fraction se trouvant à l'état soluble dans l'intestin. Or la solubilité de l'aluminium dépend entre autre du pH.

Les sels contenus dans les antiacides et les gels d'aluminium sont très solubles au niveau stomacal (pH 2±1). Selon PARTRIDGE et coll. (1989), l'hydroxyde et le chlorure d'aluminium réagissent respectivement de la façon suivante:



Puis, au cours de son cheminement dans le tractus digestif, les sécrétions de l'appareil digestif élèvent le pH jusqu'à 7,5 et les cations solubilisés précipitent à nouveau, sous forme de carbonate, d'hydroxyde ou de phosphate d'aluminium.

Comme l'aluminium doit être sous forme soluble pour être biodisponible, l'absorption du métal a lieu en milieu acide, donc essentiellement au niveau du duodénum chez les mammifères. La réduction des sécrétions acides stomacales par la ranitidine diminue la biodisponibilité des sels d'aluminium ingérés (RODGER et coll., 1991).

De plus, la solubilité de l'aluminium va dépendre de la présence ou non de certains composés fréquents dans les aliments, comme le citrate, le lactate ou le nitrilotriacétate (EBINA et coll., 1986). Selon SLANINA et coll. (1984), des rats intoxiqués au citrate d'aluminium ont un taux d'aluminium osseux 41 fois plus élevé que des rats intoxiqués à l'hydroxyde d'aluminium dans les mêmes conditions. Le citrate augmenterait la solubilité de

l'aluminium et formerait avec le métal un complexe facilement absorbé dans la partie supérieure du tractus gastro-intestinal (MARTIN, 1986 a; FROMENT et coll., 1989; VAN DER VOET et coll., 1989; WALKER et coll., 1990). En effet, MARTINEZ-PALOMA et coll. (1980), cité par MOLITORIS et coll. (1989), ont montré, à partir de cultures cellulaires, que le citrate diminue la résistance électrique transmembranaire et ouvre les *tight junctions* des cellules épithéliales, contrairement au chlorure et au lactate d'aluminium. Selon ALVAREZ-HERNANDEZ et coll. (1994), le transport et le passage de l'aluminium seraient conditionnés par le complexe formé (citrate, lactate ou nitrilotriacétate) et l'aluminium utiliserait les mêmes voies que le fer. Par conséquent, le passage de l'aluminium ne résulterait pas de l'altération de la résistance électrique transmembranaire et de l'ouverture des *tight junctions*.

Selon MOLITORIS et coll. (1989), l'aluminium présent dans l'intestin se lie préférentiellement à la transferrine et passe avec le citrate lorsque la transferrine est saturée.

WEBERG et BERSTAD (1986) donnent des tablettes d'antiacides à des patients ayant une fonction rénale normale. Lorsque ces tablettes sont prises en même temps que du jus d'orange ou de l'acide citrique, les taux d'aluminium sériques sont 50 fois plus élevés que lorsqu'elles sont prises avec de l'eau.

OWEN et coll. (1994) montrent que le taux d'aluminium incorporé dans l'os augmente chez le Porc si l'absorption de nourriture est concomitante à la prise de jus d'orange

BAKIR et coll. (1986) décrivent le cas de quatre patients urémiques, dont deux étaient dialysés, qui décédèrent d'encéphalopathie après avoir été traités par une combinaison d'hydroxyde d'aluminium et de solution de Shoh (solution tampon d'acide citrique et de citrate de sodium).

Cependant, GREGER et POWERS (1992) constatent que les citrates favorisent la rétention de l'aluminium, mais pas plus que les autres constituants du régime alimentaire.

Des travaux expérimentaux, réalisés chez le Rat, montrent que d'autres acides (acide ascorbique, glucuronique, lactique, malique, oxalique, tartrique...) favorisent également l'absorption intestinale d'aluminium (DOMINGO et coll., 1991b; GOMEZ et coll., 1994).

A l'inverse du citrate, certains composés présents dans les aliments (phosphate ou fluor) forment des complexes insolubles avec l'aluminium et

réduisent ainsi sa biodisponibilité (SPENCER et coll., 1980; ALFREY, 1983).

Les mécanismes de l'absorption intestinale de l'aluminium ne sont pas entièrement élucidés. Selon SKALSKY et CARCHMAN (1983), ainsi que ADLER et BERLYNE (1985), l'aluminium pénètre dans la lumière intestinale, d'abord par transport actif jusqu'à un palier de saturation, à partir duquel il entre par diffusion, en fonction de la concentration.

La muqueuse intestinale qui comporte des anions complexants et des protéines (notamment la transferrine) retiendrait l'aluminium (PURVES et coll., 1988; MOLITORIS et coll., 1989). Puis, la muqueuse se saturerait et relarguerait progressivement l'aluminium vers les surfaces absorbatives, précédant le passage du métal dans le flux circulant (VAN DER VOET et DE WOLFF, 1984, 1986 et 1987 a, b).

Au cours de l'absorption, l'aluminium entre en compétition avec différents ions.

Le magnésium et surtout le calcium ont une influence sur l'absorption de l'aluminium.

En effet, des études portant sur la sclérose amyotrophique latérale, à la fois cliniques (GARRUTO et coll., 1990) et expérimentales sur le Singe (GARRUTO et coll., 1989), montrent qu'une déficience en magnésium ou en calcium dans les aliments favorise l'absorption intestinale de l'aluminium.

De même, PROVAN et YOKEL (1990) montrent, à partir d'intestin perfusé chez le Rat, qu'une diminution du taux de Ca^{2+} dans le perfusat s'accompagne d'une disparition de l'aluminium présent dans ce même liquide et de son apparition concomitante dans le sang portal.

YOKEL et Mc NAMARA (1990) obtiennent des résultats similaires chez le Lapin.

L'aluminium inhiberait le transport actif du calcium au niveau du duodénum, mais serait inefficace quant au passage passif du calcium au niveau de l'iléon (ADLER et coll., 1989).

Selon ADLER et BERLYNE (1985), au niveau du duodénum, le calcium entre en compétition avec l'aluminium au cours de la phase de transport actif. En effet, le palier de saturation qui correspond à la fin de cette phase est plus vite atteint si le perfusat ne contient pas de vitamine D. De plus, la présence d'aluminium dans le liquide de perfusion entraîne une

réduction de l'absorption du calcium uniquement en présence de vitamine D. Le phénomène de compétition calcium-aluminium aurait lieu pour les sites de fixation des protéines solubles (PM de 9000 à 10000 daltons) de la barrière intestinale (ADLER et coll., 1986). COCHRAN et coll. (1990 a) confirment que cette absorption de l'aluminium au niveau duodénal est liée à un transport actif.

Ces résultats suggèrent que l'aluminium est absorbé à la fois par des mécanismes saturable et non saturable, sous le contrôle de la vitamine D, en compétition avec le calcium. En effet, l'administration de vitamine D3 à des patients hémodialysés recevant des gels d'alumine induit une hyperaluminémie, liée à une augmentation de l'absorption du métal (DEMONTIS et coll., 1986, 1989). Par contre, ce phénomène n'est pas constaté par Mc CARTHY et coll. (1986). Pourtant, il semblerait que le transport saturable d'absorption aluminique soit inhibé par le dinitrophénol (DNP), l'absence de glucose ou par le froid (4°C) (FEINROTH et coll., 1982; VAN DER VOET et coll., 1989).

D'après PROVAN et YOKEL (1988 b), le passage de l'aluminium au travers de la barrière intestinale dépend des teneurs sodique et calcique de la lumière intestinale, et semble lié aux pompes Ca^{2+} -ATPase et Na^+/K^+ -ATPase des entérocytes.

L'aluminium pourrait principalement utiliser les structures trans-intestinales du Calcium (Ca^{2+}), Fer (Fe^{3+}), Sodium (Na^+) par analogie de charge, de taille et d'hydratation (VAN DER VOET et DE WOLFF, 1987 a).

Toujours en relation avec le calcium, l'hyperparathyroïdie constituerait un facteur favorisant l'absorption intestinale de l'aluminium (MAYOR et coll., 1977, 1980). RANDALL et coll. (1982) démontrent que l'injection de parathormone (PTH) à des rats entraîne une élévation de l'aluminémie. Cependant, l'aluminium peut s'accumuler dans les glandes parathyroïdiennes et réduire la sécrétion de parathormone.

Le rôle du sodium reste encore très discuté. PROVAN et YOKEL (1988 a) constatent expérimentalement que l'absorption intestinale de l'aluminium est diminuée en absence de sodium ou lors de l'utilisation d'inhibiteurs des canaux sodiques (verapamil). Inversement, elle peut être augmentée en présence d'activateurs des canaux sodiques.

Cependant, d'après VAN DER VOET et DE WOLFF (1987 a), la perfusion d'un fragment d'intestin de Rat avec une solution dépourvue de sodium stimule l'absorption d'aluminium, prouvant ainsi qu'il existe une

corrélation négative entre l'absorption du sodium et celle de l'aluminium; cependant les auteurs ne précisent pas l'osmolalité des solutions utilisées.

Des métaux, comme le Zinc et le Fer, stimuleraient l'absorption de l'aluminium. En effet, pour WENK et STEMMER (1983), une alimentation enrichie en zinc stimulerait l'absorption intestinale de l'aluminium et favoriserait l'accumulation de celui-ci dans le cerveau et dans le foie.

De même, le fer à l'état ferreux (Fe^{2+}) stimulerait l'absorption de l'aluminium par la muqueuse intestinale mais réduirait son relargage dans le sang. La muqueuse aurait alors tendance à retenir l'aluminium. Fe^{2+} pourrait aussi stimuler la synthèse de ferritine et par conséquent augmenter la rétention de l'aluminium par la muqueuse, celui-ci se fixant alors à la transferrine (VAN DER VOET et DE WOLFF, 1987 c). Cependant, d'après ITTEL et coll. (1992), la quantité de fer présente dans le corps ne semble pas avoir d'influence sur l'absorption de l'aluminium.

En résumé, les paramètres qui influenceront l'absorption de l'aluminium seront le degré de maturité de la barrière intestinale, le type de sel aluminique, sa solubilité (en fonction du pH, des ions d'accompagnement...). Plusieurs mécanismes, pour certains encore mal connus, interviendront dans ce phénomène d'absorption: calcium, fer, zinc, vitamine D, parathormone, transferrine, citrate et peut-être le sodium. Enfin, du point de vue localisation anatomique, l'absorption du métal est maximale en milieu acide, donc essentiellement au niveau de l'estomac, du duodénum et du jéjunum (PROVAN et YOKEL, 1988 a).

. Pénétration par la voie parentérale.

L'aluminium pénètre dans l'organisme par la voie parentérale chez des patients transfusés (plasmaphérèse), perfusés par des solutés contaminés ou recevant une nutrition parentérale.

Mais ce passage direct dans le flux hémique de l'aluminium concernera surtout les insuffisants rénaux subissant des dialyses péritonéales ambulatoire ou des hémodialyses.

En dehors des séances de dialyse, il existe deux types de pénétration par voie intraveineuse. En effet, en 1985, MILLINER et coll. démontrent que les solutions d'albumine utilisées en plasmaphérèse peuvent contenir

jusqu'à 1200 $\mu\text{g.l}^{-1}$ d'aluminium. Le taux d'aluminium plasmatique augmente alors fortement au cours des transfusions. Lorsque ces malades sont déficients rénaux, cet aluminium n'est éliminé que très lentement et peut s'accumuler dans les tissus.

De plus, expérimentalement, l'aluminium administré par voie parentérale à des rats normaux et urémiques, entraîne une augmentation importante des concentrations aluminiques dans le sérum, le foie, la rate, le coeur, les muscles striés, le cerveau et les os (BERLYNE et coll., 1972; YOKEL, 1983). Une injection intraveineuse de lactate ou de citrate d'aluminium chez le Lapin conduit rapidement à une élévation de la teneur aluminique hépatique (YOKEL et coll., 1991 a).

Le passage de l'aluminium dans l'organisme peut également avoir lieu lors de nutrition par voie parentérale.

En effet, KLEIN et coll. (1982) citent le cas de malades adultes nourris par voie parentérale depuis plusieurs années et qui ont des taux d'aluminium élevés dans le plasma, l'os et dans l'urine. La contamination serait due à la caséine.

MESSING et coll. (1986) ont évalué le taux d'aluminium dans les différents solutés utilisés en nutrition parentérale chez l'adulte. Ces taux varient considérablement d'un soluté à l'autre. Ils estiment que l'apport moyen est de 5 $\mu\text{moles.jour}^{-1}$ (ou 135 $\mu\text{g.jour}^{-1}$) et préconisent d'effectuer des expertises toxicologiques sur les différentes solutions.

Ainsi, chez l'adulte, l'aluminium contenu dans les solutions nutritives finit par s'accumuler dans les tissus lorsque ces solutés sont administrés pendant une période suffisamment longue.

HENRY et coll. (1984) constatent une augmentation de la concentration du métal dans le foie, le rein, la rate et l'os chez des chiens ayant reçu des injections intraveineuses d'aluminium à raison de 1 mg.kg.⁻¹jour⁻¹ pendant trois à cinq semaines.

Chez des enfants âgés de 29 à 41 semaines, KOO et coll. (1986) montrent qu'il existe une corrélation directe entre l'aluminurie et les taux d'aluminium trouvés dans des solutions nutritives administrées par voie intraveineuse. L'aluminémie passe de 6 à 318 $\mu\text{g.l}^{-1}$ en 43 jours. Le rapport aluminium/créatinine, multiplié par trois, révèle que l'élimination est

incomplète. Il n'existe pas de différence entre enfants nés à terme et enfants prématurés.

Des enfants prématurés ayant été alimentés par voie parentérale par différents solutés contaminés présentent une augmentation de l'aluminémie qui est inversement corrélée à l'âge de l'enfant (STOCKHAUSEN et coll., 1990). De plus, SEDMAN et coll. (1985) ont évalué les risques d'intoxication par l'aluminium à partir d'une étude réalisée chez 18 enfants prématurés, alimentés par voie parentérale pendant des durées de trois semaines. Les concentrations aluminiques retrouvées dans le plasma, l'urine et les os de ces enfants sont significativement supérieures à celles d'enfants nés à terme et nourris par voie orale.

BISHOP et coll. (1989) décrivent le cas d'un enfant nourri dès sa naissance par voie parentérale et qui décéda d'encéphalopathie à l'âge de 93 jours. L'autopsie révéla que sa matière grise contenait 20 fois plus d'aluminium que celle d'un témoin de même âge. L'origine du métal était liée à une contamination aluminiques des solutés nutritifs. Selon ces auteurs, les nourrissons peuvent retenir jusqu'à 80% de l'aluminium qui parvient dans leur milieu intérieur.

Chez 35 nouveaux nés alimentés par voie parentérale, MORENO et coll. (1994) démontrent que l'aluminium est susceptible de s'accumuler dans les tissus des prématurés aussi bien que dans les tissus des enfants nés à terme.

En 1976, ALFREY et coll. pensent, qu'en dehors de la prise prolongée de gels d'alumine, c'est l'aluminium contenu dans les liquides de dialyse qui est la cause probable de l'encéphalopathie progressive des dialysés. FLENDRIG et coll. (1976) rapportent qu'en l'espace de 4 ans, 6 patients sont décédés d'encéphalopathies dans leur centre de dialyse. Le dialysat, réchauffé par des anodes en aluminium contenait 1 mg.l^{-1} d'aluminium.

La concordance entre la fréquence d'apparition de l'encéphalopathie et une forte teneur en aluminium de l'eau de dialyse est confirmée par PLATTS et coll. (1977).

C'est le gradient de concentration entre le liquide de dialyse contaminé et le compartiment plasmatique qui est à l'origine de la diffusion et du stockage de l'aluminium chez le patient dialysé (KAEHNY et coll., 1977 b). CARTIER et coll. (1978) montrent précisément qu'il existe une corrélation entre la teneur aluminique du bain de dialyse et le taux d'aluminium présent dans le sang en fin de séance.

WINNEY et coll. (1984) démontrent également que l'aluminémie dépend directement de la teneur en aluminium du bain de dialyse suivant que l'on utilise de l'eau non traitée, de l'eau traitée par osmose inverse ou de l'eau distillée.

Toutefois, de telles corrélations ne sont pas toujours observées car l'aluminémie évaluée à un moment donné dépend des expositions antérieures, mais aussi des différentes contaminations. Ainsi, selon PICCOLI et coll. (1989), une faible teneur aluminique du bain de dialyse n'exclut pas une élévation de l'aluminémie en fin de dialyse. Ce phénomène est particulièrement vérifiable en dialyse péritonéale (SMITH et coll., 1980).

L'aluminémie chez un individu indemne de toute pathologie spécifique est inférieure à $20 \mu\text{g d'Al.l}^{-1}$. Du fait de liaison protéique, 20% de l'aluminium sérique reste dialysable (environ $4 \mu\text{g d'Al.l}^{-1}$ de sérum). Le transfert du métal du bain de dialyse vers le sang est donc théoriquement nul lorsque la teneur en aluminium du bain de dialyse est inférieure à $4 \mu\text{g d'Al.l}^{-1}$ (PETIOT et coll., 1983). Une teneur inférieure à $5 \mu\text{g d'Al.l}^{-1}$ de liquide de dialyse peut être estimée acceptable pour éviter la contamination du patient lors des séances de dialyse (DE WOLFF, 1985).

A l'heure actuelle, les techniques de traitement de l'eau par osmose inverse permettent d'obtenir des teneurs inférieures à $2 \mu\text{g d'Al.l}^{-1}$.

GILLI et coll. (1980) confirment que les aluminémies sont plus importantes chez les patients dialysés que chez les sujets sains, mais l'aluminémie ne reflète en rien le degré d'intoxication chez ces malades. Les patients traités par dialyse péritonéale présentent généralement des teneurs aluminiques supérieures à celles des patients traités par hémodialyse. L'acidité des dialysats utilisés lors des dialyses péritonéales ($\text{pH} < 5,5$) faciliteraient le passage du métal dans l'organisme.

De plus, l'hémodialyse utilise d'avantage d'eau que la dialyse péritonéale (MILLINER et coll., 1987).

En résumé, les efforts réalisés quant à la qualité des eaux de dialyse et la surveillance des teneurs aluminiques chez le patient devraient conduire à une diminution des pathologies induites par ce métal.

6.2. Transport de l'aluminium dans l'organisme.

Chez les Mammifères, la toxicité de l'aluminium va dépendre de la biodisponibilité ainsi que de la forme chimique de cet élément. C'est pourquoi la spéciation chimique de l'aluminium dans le sérum est un critère essentiel dans la compréhension des mécanismes de (neuro-)toxicité de ce métal.

Le cation aluminique est classé comme un acide de Lewis fort et présente une forte attirance pour les bases fortes comme les hydroxydes (HARRIS, 1992). Parmi les agents complexants présents normalement dans le sérum, les principaux candidats à la complexation de l'aluminium seront les hydroxydes, les phosphates, la transferrine et les citrates (MARTIN, 1986a et b, 1988).

L'étude des formes de transport plasmatique de l'aluminium a fait l'objet de nombreux travaux mettant en oeuvre différentes techniques comme l'ultracentrifugation, la dialyse et la chromatographie sur gel.

Au cours de ces vingt dernières années, l'amélioration des techniques analytiques utilisées, ainsi que les précautions prises pour éviter toute contamination ont entraîné une diminution progressive des valeurs usuelles des éléments trace. C'est le cas notamment pour l'aluminium. Ainsi, BERLYNE et coll. en 1970 et CLARKSON et coll. en 1972 estimeraient les valeurs normales de l'aluminium sanguin respectivement à $300 \mu\text{g.l}^{-1}$ et à $72 \mu\text{g.l}^{-1}$ alors qu'actuellement les auteurs admettent comme valeurs usuelles 5 à $10 \mu\text{g.l}^{-1}$ (BERTHOLF et coll., 1983; HASSANALY et coll., 1987; GITELMAN et ALDERMAN, 1989).

Chez des patients hémodialysés et traités par des gels d'alumine, cette concentration peut dépasser largement les $200 \mu\text{g.l}^{-1}$ (ROBERTS et WILLIAMS, 1988).

Selon DELONCLE et coll. (1990), 90% de l'aluminium présent dans le sang se trouverait dans le plasma, mais d'après d'autres études, plus anciennes, il serait en quantité équivalente dans le plasma et les érythrocytes (MAYOR et coll., 1977; VAN DER VOET et DE WOLFF, 1985).

Pour une aluminémie normale, 80% de l'aluminium sanguin serait lié à des protéines sériques et 20% se trouverait sous forme de sels en

suspension colloïdale et ultrafiltrable (SAVORY et WILLS, 1984; HARRIS, 1992).

Il est maintenant établi que la majeure partie (80-90%) de l'aluminium plasmatique est liée à des protéines. Cette fraction est largement fixée à la transferrine (TRAPP, 1983; COCHRAN et coll., 1984, 1985, 1987; VAN GINKEL et coll., 1990; OHMAN et MARTIN, 1994) même si la contribution de l'albumine ne peut être totalement exclue (KING et coll., 1979; TRAPP, 1983; BERTHOLF et coll., 1984). En 1991, FATEMI et coll. estimaient que 60% de l'aluminium présent dans le plasma humain (à pH = 7,40 et une concentration de 5 μM d'aluminium correspondante à 135 $\mu\text{g.l}^{-1}$) était lié à la transferrine, 34 % à l'albumine et le reste aux citrates.

La transferrine sérique humaine est une glycoprotéine se présentant sous la forme d'une chaîne polypeptidique simple d'un poids moléculaire de 77000 daltons (MARTIN, 1986a; MARQUES, 1991). Cette protéine, de concentration plasmatique 3 g.l^{-1} , est responsable du transport de deux ions ferriques (Fe^{3+}) par molécule, à partir du site d'absorption du fer jusqu'aux tissus (AISEN et coll., 1978; MARTIN et coll., 1987). En effet, cette molécule possède deux sites de fixation qui présentent une affinité différente pour le fer (MARQUES, 1991).

Cependant dans les conditions normales, les sites de fixation n'étant occupés qu'à 30% par le fer, il reste 50 μmol de sites libres par litre pour l'aluminium (MARTIN et coll., 1987).

Compte-tenu de sa concentration et de sa constante de stabilité, les citrates représentent les principales molécules de faible poids moléculaire complexant l'aluminium dans le plasma: 11%±5% de l'aluminium contenu dans le serum (OHMAN et MARTIN, 1994). Le complexe sérique Al/citrate semble même jouer un rôle important dans l'accumulation intracellulaire et la toxicité du métal (VAN GINKEL et coll., 1990).

6.3. Fixation tissulaire et Localisation intracellulaire.

L'aluminium est présent dans la plupart des organes. L'organisme d'un homme de 70 kg contiendrait 0,10 g d'aluminium.

ALFREY (1983) évalue les taux d'aluminium dans différents tissus (foie, rate, coeur, poumons, muscle et cerveau) de personnes décédées de mort violente, non intoxiquées à l'aluminium. Seules les poumons ont des taux d'aluminium relativement élevés (43 mg.kg⁻¹ de poids sec). Ce métal proviendrait de dépôts formés à partir de l'air inhalé. En effet, la teneur aluminique pulmonaire est corrélée à l'âge de l'individu. Pour Mc DERMOTT et coll. (1977), ce même phénomène se produit dans le cerveau avec une augmentation du rapport Al/ADN (CRAPPER et coll., 1980).

En cas d'intoxication, comme chez les patients insuffisants rénaux, il existe une accumulation privilégiée de l'aluminium dans certains tissus. Il s'agit principalement:

- . Du foie: il fixe l'aluminium comme tous les métaux toxiques. Au niveau des hépatocytes, d'importantes accumulations d'aluminium peuvent s'observer en l'absence d'autres anomalies associées, et la cellule hépatique semble assez bien tolérer cette surcharge (JAUDON, 1991).

- . De la rate: tout comme le foie, elle représente le point de départ de l'accumulation d'aluminium dans l'organisme.

- . De l'os: l'os est le second tissu qui fixe préférentiellement l'aluminium. En cas d'ostéomalacie, ce métal se dépose le long du front de minéralisation, à la limite du tissu ostéoïde et du tissu calcifié. Il est également présent au niveau des lignes cimentantes (COURNOT-WITMER et coll., 1981). Cette localisation est extra-cellulaire. L'étude ultra structurale a montré que l'aluminium est concentré ponctuellement sous forme de microcristaux contenant également du phosphore.

Du cerveau: l'aluminium franchit la barrière hémato-céphalique mais sa concentration dans le liquide céphalo-rachidien ne s'élève que faiblement au cours des intoxications.

Toutefois, l'aluminium se fixe sur l'encéphale, notamment au niveau des cellules de la matière grise (CRAPPER et coll., 1973).

Si les cellules cérébrales ne sont pas celles qui concentrent le plus activement et le plus rapidement l'aluminium, par contre, elles ne sont pas dans une situation permettant l'élimination aisée des précipités insolubles et de très fortes accumulations intracellulaires peuvent progressivement se former après une intoxication prolongée (GALLE et coll., 1979).

. Des parathyroïdes: cette glande est, avec le foie, l'organe dans lequel les dépôts intracellulaires sont les plus importants. Le tissu parathyroïdien peut concentrer l'aluminium dans les polyphagosomes et les mitochondries (JAUDON, 1991).

. Du rein: il concentrera l'aluminium au niveau du tube contourné proximal et du tube distal (GALLE, 1981).

Au niveau intracellulaire, la localisation de l'aluminium a été étudiée par de nombreux auteurs grâce à la microanalyse par sonde électronique (microsonde de Castaing), à la microscopie ionique (GALLE et coll., 1979) et plus récemment, grâce à la technique du LAMMA (VERBUEKEN et coll., 1988).

De nombreux travaux montrent que l'aluminium s'accumule principalement dans les lysosomes de différents tissus (foie, rate, rein, parathyroïde, cerveau), sous forme de microcristaux, associé au phosphore (GALLE et coll., 1979, 1983; GALLE, 1981; GALLE et GIUDICELLI, 1982; BOMMER et coll., 1983), et aussi sur la chromatine du noyau cellulaire (DE BONI et coll., 1974; TRUCHET, 1976; BONHOMME et coll., 1989).

6.4. Elimination.

L'aluminium s'élimine lentement des tissus, avec une demi-vie estimée à 42 jours ou plus, dans le sérum, les poumons, le foie, la rate et les reins de lapins intoxiqués (YOKEL et Mc NAMARA, 1989).

. Fécale.

La majeure partie de l'aluminium ingérée n'est pas absorbée; elle forme des sels insolubles dans le tractus digestif, avant d'être éliminée par les fèces. Selon ONDREICKA et coll. (1966), plus de 70% de l'aluminium entré par la voie orale se retrouve dans les fèces. C'est donc la principale voie d'élimination.

. Urinaire.

L'élimination de l'aluminium présent dans l'organisme est, par contre, essentiellement rénale.

L'excrétion urinaire chez une personne en bonne santé serait en moyenne de $15 \mu\text{g.jour}^{-1}$ (KAEHNY et coll., 1977 b). L'aluminurie reflète le degré de contamination de l'organisme quand l'exposition au métal reste faible (MUSSI et coll., 1984). L'augmentation de l'exposition à l'aluminium entraîne l'élévation de l'excrétion urinaire du métal (SZCZEKOCCI et CHMIELEWSKI, 1978).

Le mécanisme d'élimination rénale peut se résumer ainsi. Après filtration glomérulaire de la fraction non liée aux protéines, l'aluminium est réabsorbé au niveau des cellules du tube contourné proximal.

Dans ces cellules a lieu le processus de concentration et d'insolubilisation au sein des lysosomes sous l'influence des phosphatases acides. L'aluminium, une fois insolubilisé sous forme de phosphates, est excrété dans la lumière urinaire (GALLE, 1981; BURNATOWSKA-HLEDIN et coll., 1985).

Ce mécanisme de concentration intracellulaire ne faisant pas appel à un transport actif transmembranaire, a également été mis en évidence pour d'autres éléments (comme l'uranium, le gallium et l'indium) qui, comme l'aluminium, forment des phosphates insolubles.

L'aluminium sanguin étant lié aux protéines, la clairance de l'aluminium est basse, elle n'est que de 5% de la filtration glomérulaire. Lorsque des sujets reçoivent de fortes doses d'aluminium par voie parentérale, la capacité d'élimination du rein est dépassée et de l'aluminium est retenu dans l'organisme.

En effet, l'utilisation expérimentale de rein isolé de Rat montre que l'augmentation de la concentration en aluminium du perfusât induit une diminution de la clairance urinaire (HÖHR et coll., 1989).

. Biliaire.

A la suite de l'apparition d'ostéomalacie, après traitement oral par des gels d'aluminium, chez deux malades non insuffisants rénaux atteints d'une hépatopathie sévère, WILLIAMS et coll. (1986) ont étudié l'excrétion biliaire de l'aluminium chez des patients porteurs d'un drainage biliaire post chirurgical. Ces auteurs constatent une augmentation nette des concentrations biliaires en aluminium après administration orale des gels d'aluminium et en concluent que l'excrétion biliaire joue un rôle non négligeable dans l'élimination d'une surcharge aluminique.

De plus, des études réalisées chez le Chien montrent que l'aluminium peut être excrété par la bile (KOVALCHIK et coll., 1978). L'injection i.v. de chlorure d'aluminium à des rats entraîne une augmentation de l'excrétion biliaire (KLEIN et coll., 1988).

. Autres voies d'élimination.

L'élimination de l'aluminium par la sueur et les phanères est très peu connue. Cependant, l'aluminium peut être retrouvé dans les phanères sans qu'il y ait une corrélation significative avec l'âge ou la prise alimentaire (NAYLOR et coll., 1990). De plus, CHAPPUIS et coll. (1988) montrent que la teneur aluminique dans les cheveux est supérieure chez les hémodialysés.

6.5. Mode d'action.

Si l'aluminium est reconnu comme le facteur neurotoxique responsable de l'encéphalopathie des dialysés, le mécanisme de son action est encore mal défini. Cependant, la présence endocellulaire et les sites de fixation de l'aluminium ont permis de préciser les conditions de son passage transmembranaire et ses relations avec les protéines.

Les mécanismes qui permettent le passage de l'aluminium au travers de la membrane biologique dépendent du type cellulaire et des conditions physico-chimiques extracellulaires. DELONCLE et coll. (1990) signalent que l'aluminium peut traverser la membrane de l'érythrocyte et la barrière hémato-encéphalique en formant un complexe avec le glutamate sanguin. Ce transfert membranaire se ferait par diffusion passive du complexe.

L'adsorption de l'aluminium sur la phosphatidylcholine membranaire favoriserait la pénétration du métal par endocytose (AKESON et coll., 1989).

Des concentrations importantes d'aluminium dans différents tissus (os, foie...) chez le Rat, se traduisent par une chute de l'incorporation du phosphore dans les phospholipides et les acides nucléiques (ADN, ARN). De plus, l'aluminium provoque une élévation du taux d'adénosine mono et diphosphate (AMP, ADP) ainsi qu'une chute du taux d'adénosine triphosphate (ATP) indispensable aux processus de phosphorylation (ONDREICCKA et coll., 1966).

Expérimentalement, sur l'animal et *in vitro*, la toxicité de l'aluminium a pu être démontrée par son action sur différentes enzymes (TRAPP, 1986).

. *Inhibition de la calmoduline.* La calmoduline est une calcuprotéine cytosolique dont le rôle est d'activer ou d'inhiber de nombreux systèmes enzymatiques intracellulaires. L'intervention de l'aluminium sur les fonctions de régulation de la calmoduline a été démontrée *in vitro* en utilisant différentes méthodes analytiques.

En quantité importante, l'aluminium entre en compétition avec le calcium pour les sites de fixation de la calmoduline et entraîne des modifications de conformation spatiale de la protéine (SIEGEL et coll., 1982, 1983; SIEGEL et HAUG, 1983; FARNELL et coll., 1985). L'importance biologique de cette protéine pourrait expliquer en partie les effets toxiques de l'aluminium (MUNDY et coll., 1994). De plus, MUNDY et coll. (1994) montrent que l'aluminium agit au niveau de différents sites cellulaires déplaçant Mg^{2+} et Ca^{2+} et interrompant ainsi le transport du calcium.

. *Inhibition de la libération de la parathormone (PTH)*. La fixation élevée de l'aluminium sur les parathyroïdes a conduit à l'étude de l'effet de l'aluminium sur les cellules parathyroïdiennes bovines (MORRISSEY et coll., 1983). *In vitro*, le métal entraîne des modifications ultrastructurales des cellules parathyroïdiennes et inhibe la libération hormonale de PTH (BOURDEAU et coll., 1987; CURNOT-WITMER et PLACHOT, 1990).

. *Inhibition de la L-glutamine et de l'acide γ aminobutyrique (GABA)*. Comme le manganèse (Mn^{2+}) et le cadmium (Cd^{2+}), l'aluminium inhibe le transport des amines neurotransmettrices des synaptosomes ainsi que le transfert du GABA et du L-glutamate (WONG et coll., 1981).

. *Inhibition des enzymes de réplication nucléaire*. La présence d'aluminium au niveau des noyaux cellulaires et plus précisément au niveau de la chromatine, a permis d'étudier l'action de ce métal sur les acides nucléiques. La liaison préférentielle de l'aluminium aux atomes d'oxygène des groupements phosphates et aux bases puriques et pyrimidiques de l'ADN a été démontrée (KARLIK et coll., 1980; KARLIK et EICHHORN, 1989). Cette fixation sur certaines séquences de l'ADN entraînerait une inhibition de la transcription de l'ADN en ARN et donc de la synthèse protéique (DE BONI et coll., 1974; WALKER et coll., 1989).

. *Inhibition de l'acétylcholine ésterase (CAE) et de l'acétylcholine transférase (CAT)*. En milieu tamponné dilué, l'aluminium inhiberait l'activité de la CAE d'*Electrophorus electricus* de façon non compétitive (MARQUIS, 1982; MARQUIS et LERRICK, 1982). YATES et coll. (1980) montrent chez le Lapin que l'injection intracisternale de chlorure d'aluminium entraîne une diminution de l'activité de la CAT et de la CAE. L'administration chronique par voie i.p. de gluconate ou de chlorure d'aluminium chez le Rat entraîne une diminution de l'activité de la CAT (CHERRORET et coll., 1992) alors que celle de la CAE n'est pas modifiée (GULYA et coll., 1990). Plus récemment, MORAES et LEITE (1994) ont mis en évidence, *in vitro*, l'effet inhibiteur de l'aluminium sur l'activité de la CAE de cerveau de boeuf. Cependant, ZATTA et coll. (1994) rapportent que l'aluminium peut activer la CAE érythrocytaire bovine *in vitro*. Ces résultats très controversés obtenus dans l'étude de l'action de l'aluminium sur la CAE dériveraient du manque de rigueur dans la spéciation du métal au pH physiologique (ZATTA et coll., 1994). Ainsi, en fonction de la

concentration en aluminium, on pourrait obtenir soit une inhibition (concentration élevée) soit une activation (concentration faible) de l'activité de la CAE (PATOCKA et BAJGAR, 1987 cités par ZATTA et coll., 1994). CHERRORET et coll. (1992) montre que l'activité de la CAT est soit inhibée (concentration faible), soit activée (concentration forte).

. *Inhibition de l'hexokinase.* Dans la réaction de l'hexokinase, l'ATP mis en jeu n'est actif que sous forme de complexe avec le magnésium. En présence d'aluminium, la vitesse de cette réaction diminue par suite de la combinaison du métal avec l'ATP (TRAPP, 1980).

Expérimentalement, l'aluminium inhiberait l'activité cytosolique et mitochondriale de l'hexokinase du cerveau de Rat et, ainsi, diminuerait l'utilisation du glucose.

L'aluminium pourrait former un complexe inhibiteur avec l'ATP et ce complexe Al-ATP serait en compétition avec le complexe Mg-ATP au niveau du site actif de l'hexokinase (TRAPP, 1986; YOSHINO et coll., 1990; EXLEY et coll., 1994).

. *Inhibition de la dihydroptéridine réductase (DHPR).* L'inhibition de la DHPR entraînerait une chute de la concentration en tétrahydrobioptérine et par voie de conséquence de la tyrosine et des neurotransmetteurs au niveau du cerveau. Lorsqu'un extrait de cerveau de Rat est mis en présence d'aluminium à des concentrations identiques à celles retrouvées dans des cerveaux de patients décédés d'encéphalopathie, l'activité de la DHPR est diminuée de 40%. ALTMAN et coll. (1988) rapportent une corrélation négative entre le taux d'aluminium sérique et l'activité de la DHPR érythrocytaire. Ces auteurs suggèrent que la réduction de l'activité dans les érythrocytes pourrait être le reflet d'une diminution identique au niveau du cerveau et émettent l'hypothèse que les troubles neurologiques observés dans l'intoxication par l'aluminium pourraient être dus à une perturbation du métabolisme des neurotransmetteurs. Mais LEEMING et GREEN (1989) et SMITH et HYLAND (1989) mettent en doute cette hypothèse.

. *Autres actions.*

Des concentrations faibles d'aluminium peuvent inhiber l'activité des protéines kinases (COCHRAN et coll., 1990 b) mais peuvent également activer l'adénylcyclase (EBSTEIN et coll., 1986).

L'aluminium inhibe l'activité de la guanosine triphosphatase entraînant l'élévation des teneurs intracellulaires de guanosine triphosphate (GTP) (MILLER et coll., 1989).

L'aluminium peut augmenter la production d'AMP_{cyclique} qui entraînerait une altération de la phosphorylation protéique qui expliquerait la neurotoxicité du métal (JOHNSON et JOPE, 1986, 1987).

L'aluminium peut activer l'enzyme succino-deshydrogénase cytochrome oxydase (HORECKER et coll., 1989).

L'aluminium inhibe l'activité de la superoxyde dismutase et cette inhibition est directement proportionnelle à la teneur en métal (SHAINKIN-KESTENBAUM et coll., 1989).

L'aluminium peut inhiber la synthèse des catécholamines (noradrénaline et dopamine) (WENK et STEMMER, 1981).

7. TOXICITE DE L'ALUMINIUM.

7.1. Toxicité aiguë.

L'aluminium étant très largement répandu dans la nature, l'exposition de l'Homme est inévitable et des taux modérés de cet élément pénètrent chaque jour dans l'organisme.

Cependant, le métal se trouve généralement à l'état insoluble, non biodisponible. Or, la toxicité aiguë de l'aluminium est liée au degré de solubilité de son composé; la DL₅₀ du chlorure d'aluminium par voie orale en dose unique chez la souris est de $0,77 \pm 0,12$ g Al.kg⁻¹ alors que celle du sulfate d'aluminium dans les mêmes conditions est de $0,98 \pm 0,09$ g Al.kg⁻¹ (ONDREICCKA et coll., 1966). C'est pourquoi, l'aluminium n'avait, jusqu'en 1972, que peu retenu l'attention des scientifiques. En effet, la toxicité du métal apparaît quand le degré de contamination de l'organisme est élevé.

7.2. Toxicité chronique.

S'il se révèle toxique essentiellement en cas d'insuffisance rénale chronique, l'aluminium peut être la cause d'intoxication dans d'autres circonstances. En effet, certaines pathologies sont dues à l'intoxication aluminique alors que pour d'autres, d'origine inconnue, l'aluminium pourrait être une cause ou, tout au moins, un facteur favorisant.

7.2.1. *Pathologies provoquées par une intoxication aluminique.*

Il a été établi que l'accumulation d'aluminium dans les tissus est associée à diverses pathologies qui apparaissent généralement chez des patients adultes urémiques dialysés depuis plusieurs années et généralement traités par des gels d'alumine (ALFREY et coll., 1976, 1980; FLENDRIG et coll., 1976; PARKINSON et coll., 1981)

. Encéphalopathie progressive des dialysés.

L'encéphalopathie des dialysés est une entité clinique spécifique signalée pour la première fois chez des dialysés à DENVER (U.S.A.) en 1971 et décrite par ALFREY en 1972. Ces patients dialysés depuis quatre ans recevaient un traitement thérapeutique, à base de gels d'alumine, destiné à combattre l'hyperphosphatémie consécutive à l'insuffisance rénale. Depuis, de nombreux cas ont été rapportés (ALFREY et coll., 1976; BURKS et coll., 1976; LEDERMAN et HENRY, 1978; GALLE et coll., 1979; ALFREY, 1984) et cette encéphalopathie fut une des principales causes de décès dans des centres où le liquide de dialyse contenait des taux élevés d'aluminium (CARTIER et coll., 1978).

Dans la majorité des cas, les sujets développant une encéphalopathie étaient dialysés depuis plus de deux ans. Aucune corrélation n'a pu être établie avec l'âge, le sexe ou la cause de l'insuffisance rénale chronique.

Les troubles neurologiques, d'abord inconstants, sont caractérisés par des troubles de la parole, des myoclonies diffuses, des épisodes confusionnels, des troubles du comportement avec modification de la personnalité, des troubles intellectuels discrets et variables (ROVELLI et coll., 1988).

Ensuite, ces troubles deviennent permanents. La détérioration intellectuelle devient de plus en plus grave pour aboutir à un syndrome appelé "démence des dialysés". Les myoclonies sont présentes dans 80% des cas et les crises comitiales peuvent apparaître dans 50% des cas.

Deux examens complémentaires permettent de confirmer le diagnostic: le dosage sanguin de l'aluminium et l'électroencéphalogramme (EEG). L'aluminémie est habituellement élevée, supérieure à 200 $\mu\text{g.l}^{-1}$, mais il n'existe pas de parallélisme entre l'aluminémie et l'importance des signes cliniques et électriques de l'encéphalopathie.

Les modifications électroencéphalographiques sont constantes et peuvent précéder de plusieurs semaines les signes cliniques (BUGE et coll., 1978; SABOURAUD et coll., 1978). Le rythme de base, initialement préservé, se ralentit jusqu'à être remplacé par des ondes lentes.

Il existerait une corrélation positive entre la teneur sérique en aluminium et le taux de mortalité chez les patients hémodialysés chroniques (CHAZAN et coll., 1988, 1991).

Même si cette pathologie est typique des patients dialysés, il faut soulever le problème de patients déficients rénaux non dialysés (surtout de jeunes enfants) et traités oralement par d'importantes quantités de gels d'aluminium. En effet, de nombreuses observations relatent des cas d'encéphalopathies chez ces sujets (GEARY et coll., 1980; GRISWOLD et coll., 1983; RANDALL, 1983; ANDREOLI et coll., 1984).

Les altérations neuropathologiques retrouvées chez les patients urémiques décédés d'encéphalopathie sont assez limitées et non spécifiques; elles contrastent avec l'intensité des signes cliniques et la gravité de l'évolution. Les examens histologiques révèlent souvent une prolifération astrocytaire et une surcharge neuronale en lipofuschines dans la substance grise du cortex, dans l'hippocampe (structures riches en neurones cholinergiques) ainsi que dans le cervelet et le tronc cérébral (SABOURAUD et coll., 1978; BUGE et coll., 1979; YATES et coll., 1980). Il n'y a pas de dégénérescence neurofibrillaire. Celle-ci, décrite par SABOURAUD et coll. (1978), était liée à l'âge des patients et non à leur maladie. L'aluminium se concentre essentiellement dans les lysosomes des neurones du cortex frontal et temporal, de l'olive et du noyau rouge, des noyaux gris (Mc DERMOTT et coll., 1978).

Les examens biochimiques montrent une diminution des teneurs en acide γ aminobutyrique (GABA) dans certaines régions cérébrales (cortex frontal, occipital et cérébelleux, noyau caudal, thalamus dorsomédian) et une baisse de l'activité de la cholineacétyl transférase (CAT) (PERRY et coll., 1977; SWEENEY et coll., 1985).

. Ostéomalacies.

Ce type d'affection osseuse est souvent observé avant l'apparition des troubles neurologiques, surtout chez les insuffisants rénaux dialysés. En effet, ils ont souvent un hyperparathyroïdisme qui entraîne une élévation des taux plasmatiques du phosphore impliquant souvent des calcifications des tissus mous. Pour prévenir ces phénomènes et réduire l'hyperphosphatémie, ces patients reçoivent des composés aluminiques.

Comme l'aluminium ne s'élimine que pendant les séances de dialyse, certains patients vont développer une hyperaluminémie qui va entraîner, entre autre, une ostéomalacie (ELLIS et coll., 1979; WILLS et SAVORY, 1983).

L'ostéomalacie est d'évolution insidieuse et progressive. Elle s'exprime le plus souvent par des douleurs osseuses et des arthralgies, puis surviennent des fractures osseuses spontanées, des déformations osseuses sévères et une myopathie des muscles proximaux qui peut devenir invalidante (ANDRESS et coll., 1986, 1987; DRUEKE, 1986; OPPENHEIM et coll., 1989).

Les examens radiologiques sont le plus souvent normaux. Une étude histomorphométrique sur un fragment de biopsie osseuse révèle une réduction de la vitesse de calcification et une augmentation de l'épaisseur des travées ostéoïdes. Cette ostéomalacie particulière est caractérisée par des dépôts aluminiques le long du front de minéralisation. L'aluminium sanguin est le plus souvent élevé mais l'aluminémie seule n'est pas suffisante pour avoir une valeur prédictive de la présence dans l'os de dépôts d'aluminium (MILLINER et coll., 1984a et b). Le dosage par polarographie impulsionnelle de l'aluminium osseux permet de mesurer avec une grande précision l'imprégnation osseuse en aluminium (BURNEL

et coll., 1982b). Cette ostéomalacie résiste au traitement par la vitamine D ou ses métabolites (VERBEELEN et coll., 1988).

. Arthropathies.

NETTER et coll. (1984) ont montré que l'aluminium pouvait s'accumuler dans les articulations de patients hémodialysés chroniques traités par des gels d'alumine.

Chez les hémodialysés, les teneurs aluminiques dans le cartilage et la cavité synoviale augmentent significativement (NETTER et coll., 1991).

L'aluminium associé à des dépôts d'amylose $\beta 2$ microglobuline pourrait être impliqué dans l'arthropathie observée chez les hémodialysés (NETTER et coll., 1990). En 1991, toujours NETTER et coll. ont montré que chez les patients urémiques dialysés, le silicium présent dans le liquide synovial favorisait la formation de dépôts d'aluminosilicates.

Dans les tissus surchargés en aluminium, la production de radicaux libres d'oxygène est augmentée.

Ces radicaux libres léseraient les chondrocytes et dépolymériseraient les macromolécules de la substance fondamentale du cartilage (MITROVIC et coll., 1987).

En 1994, CHARY-VALCKENAERE et coll. ont montré que des composés aluminiques (Hydroxyde et Lactate d'Aluminium) pouvaient induire des dommages aux structures articulaires, soit directement soit en stimulant la sécrétion d'eicosanoides par les cellules synoviales.

. Anémies.

Une anémie microcytaire et hypochrome a été observée chez les hémodialysés intoxiqués par l'aluminium, alors qu'ils étaient correctement supplémentés en fer (WILLS et SAVORY, 1983; BIA et coll., 1989). Cette anémie vient se surajouter et aggraver l'anémie préexistante de l'insuffisant rénal chronique. L'aluminium administré par voie orale peut également entraîner des anémies chez des patients urémiques (Mc CARTHY et coll., 1986). De même, CHMIELNICKA et coll. (1994) ont mis en évidence que l'exposition orale de rats à l'aluminium entraînait une anémie.

L'aluminium peut donc inhiber indirectement l'érythropoïèse chez des patients hémodialysés, et provoquer des anémies (Mc CARTHY et coll., 1986). De même, les composés aluminiques (chlorure et citrate), même à de faibles concentrations ($0.37 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ou $10 \mu\text{g.l}^{-1}$ d'aluminium), inhibent l'érythropoïèse *in vitro* grâce à un mécanisme dépendant de la capacité de la transferrine à fixer l'aluminium. L'élévation du taux d'érythropoïétine n'inverse pas le phénomène. Cette inhibition ne peut avoir lieu en présence d'érythropoïétine qu'aux premiers stades, quand l'hormone interagit sur sa cible cellulaire (GARBOSSA et coll., 1994).

Cependant, le niveau de l'action toxique de l'aluminium reste mal défini. TRAPP (1983) suggère une compétition entre l'aluminium et le fer, vis-à-vis de sites sériques de fixation à la transferrine. Selon ALTMAN et coll. (1988), l'aluminium inhiberait la synthèse de l'hémoglobine. En effet, c'est le complexe Al-transferrine qui interfère sur l'incorporation du fer dans la structure hémique (ABREO et coll., 1990; ROSENLOF et coll., 1990).

D'après ALLAIN et coll. (1988), la surcharge aluminique observée chez des patients hémodialysés pourrait induire une élimination excessive du fer via la bile et expliquerait ainsi en partie l'apparition d'une anémie mycrocytaire comme ils l'ont démontré chez le Rat.

L'anémie liée à l'intoxication aluminique se développe sur le mode chronique. Elle est donc, en général, bien supportée. Mais elle peut s'aggraver si les apports excessifs d'aluminium persistent.

Il est intéressant de signaler qu'une supplémentation correcte en fer, sans réduction des apports d'aluminium, ne corrige pas l'anémie.

. Autres pathologies liées à une intoxication aluminique.

. Dans l'industrie, l'exposition à l'aluminium finement pulvérisé peut provoquer des troubles pulmonaires.

En effet, un cas d'encéphalopathie a été décrit chez un homme de 50 ans atteint d'une fibrose ayant pour origine l'inhalation d'aluminium sur son lieu de travail (Mc LAUGHLIN et coll., 1962). L'aluminium peut être à l'origine de deux maladies professionnelles des voies respiratoires:

. L'aluminose se caractérise par une atteinte des voies respiratoires supérieures au niveau de l'espace alvéolaire. L'effet aigu est une toux d'essoufflement qui peut de manière chronique conduire à une fibrose intersticielle.

. La maladie de Shaver se distingue par un site d'action alvéolaire. L'oedème pulmonaire peut être à l'origine d'une pathologie chronique caractérisée par un épaississement fibreux des parois alvéolaires, une fibrose intersticielle, un emphysème et une bronchite chronique.

L'effet toxique du métal a son origine dans la rupture de la membrane des lysosomes dans les macrophages. Les enzymes lysosomaux libérés digèrent le macrophage, le métal est libéré et peut être réitéré. Cette libération de l'aluminium peut expliquer les teneurs élevées d'aluminium retrouvées dans le sérum d'ouvriers exposés aux poussières aluminiques. Le macrophage lésé libérerait des facteurs stimulant les fibroblastes et la formation de collagène. La poussière d'aluminium pourrait donc être une substance fibrinogène et une exposition intense à l'aluminium peut induire des emphysèmes. De plus, DESJARDINS et coll. (1994) décrivent le cas d'un ouvrier de 35 ans travaillant dans une fonderie d'aluminium et qui a présenté des réactions asthmatiques suite à l'exposition de fumées.

Comme nous l'avons déjà signalé, la contamination des laits infantiles peut entraîner des intoxications mortelles chez de très jeunes infants (FREUNDLICH et coll., 1985; HEWITT et coll., 1987).

Ces enfants pourront être atteints par certaines pathologies, en particulier des dysplasies broncho-pulmonaires (STOCKHAUSEN et coll., 1990).

7.2.2. Pathologies d'origine inconnue et dans lesquelles l'aluminium pourrait être un facteur favorisant.

. La maladie d'Alzheimer.

En 1907, Alois Alzheimer définissait une entité anatomoclinique: la maladie d'Alzheimer. Elle se caractérisait par une démence spécifiquement présénile apparaissant vers l'âge de 40 à 50 ans. Tant sur un plan clinique que sur un plan histopathologique, il existe peu de différences entre la maladie d'Alzheimer et la démence sénile dite de type Alzheimer, la distinction reposant essentiellement sur l'âge de l'apparition de la maladie, avec une barrière arbitrairement fixée à 65 ans. Actuellement, ces pathologies sont regroupées sous le terme "Démence de Type Alzheimer" (DTA).

Le rôle de l'aluminium dans la démence de type Alzheimer a été suggéré par les travaux anatomopathologiques de CANDY et coll. (1986) qui ont mis en évidence des dépôts de silicate d'aluminium au niveau des neurones où siège la dégénérescence neurofibrillaire et au niveau des plaques séniles caractéristiques de cette maladie. Les patients décédés de telles pathologies ont une concentration en aluminium dans le cortex frontal supérieure à celle des témoins (CRAPPER et coll., 1973). Cependant, le rôle actif de l'aluminium dans ces pathologies n'a pas encore été mis en évidence.

La démence de type Alzheimer est de loin la démence sénile la plus fréquente parmi les démences artériopathiques et les démences dégénératives primitives (comme les DTA) ou secondaires (comme la maladie de Parkinson ou la sclérose amyotrophique latérale). Elle représenterait en effet 60% de l'ensemble des démences (KATZMAN, 1986).

La DTA débute, cliniquement, par des troubles de la mémoire, de l'orientation temporo-spatiale, du comportement.

Ensuite, apparaît un affaiblissement progressif des capacités intellectuelles, souvent accompagné de troubles aphaso-apraxo-agnosiques. L'évolution est irréversible.

Les malades atteints deviennent totalement dépendants de leur entourage et décèdent, en moyenne, dans un délai de cinq ans.

L'examen *post mortem* est le seul élément permettant de poser un diagnostic rétrospectif de certitude de la maladie.

Les examens histopathologiques montrent une perte de poids du cerveau et une dilatation ventriculaire avec atrophie du cortex. La DTA se caractérise par deux lésions argentophiles: les neurones en dégénérescence neurofibrillaire et les plaques séniles (ou neuritiques) (DE BONI et coll., 1980). Ces anomalies sont surtout retrouvées dans le cortex cérébral et l'hippocampe qui sont les structures les plus sévèrement affectées. Ces lésions peuvent ainsi s'accompagner d'une altération morphologique des dendrites, d'une dégénérescence granulovasculaire des cellules pyramidales de l'hippocampe et une altération de la conformation de la chromatine. Cependant, les anomalies dendritiques, les pertes neuronales sont probablement des phénomènes qui apparaissent secondairement. En effet, ces mêmes phénomènes sont retrouvés dans les processus naturels de vieillissement.

Les examens biochimiques révèlent des déficits des systèmes cholinergiques. L'activité de la cholineacétyl transférase (CAT) est toujours diminuée quel que soit l'âge au début de la maladie ou la durée de l'évolution (PERRY et coll., 1982, 1983; ROSSOR et coll., 1982; YATES et coll., 1983, 1989). Les patients atteints de DTA présentent également une diminution du nombre de neurones cholinergiques dans le noyau basal de Meynert (Mc GEER, 1984).

CANDY et coll. (1983) montrent également que l'activité de la cholineacétyl estérase (CAE) est diminuée dans les noyaux des neurones du noyau basal de Meynert alors qu'elle est réduite à néant dans le néocortex. Des anomalies d'autres neurotransmetteurs ont également été montrées mais souvent de manière moins évidente (GAMA, système noradrénergique, somatostatine) (BERGER et coll., 1980, 1984; ROSSOR et coll., 1980; MANN et YATES, 1983; CONSTANTINIDIS, 1984; MOHR et coll., 1986).

Enfin, des perturbations du métabolisme du glucose ont été révélées par différentes études (FRIEDLAND et coll., 1985, 1989; HOYER et coll., 1988; MARCUS et coll., 1989), même si récemment, CLAUBERG et coll. (1994) ont montré qu'une administration chronique de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) n'avait qu'une légère influence sur l'utilisation cérébrale du glucose..

Depuis que la DTA a été définie, un grand nombre d'hypothèses ont été avancées pour expliquer son déclenchement.

. Hypothèse virale (TERRY, 1982).

. Hypothèse alimentaire (ABALAN, 1984).

Ces deux premières hypothèses paraissent actuellement peu probables.

. Hypothèse génétique.

Suite à des études généalogiques réalisées sur des familles comportant de nombreuses personnes atteintes de DTA, certains auteurs ont montré un parallélisme entre syndrome de Down (Trisomie 21) et DTA supposant ainsi que la DTA était gouvernée par un gène allèle situé sur le chromosome 21.

Cependant, d'autres auteurs ne parviennent pas à localiser ce gène (DAVID et coll., 1987).

. Hypothèse métabolique.

La réduction du métabolisme du glucose pourrait avoir un rôle déterminant dans la dégénérescence des neurones cholinergiques donc dans la genèse de la maladie (FRIEDLAND et coll., 1985; HOYER et coll., 1988; MUFSON et coll., 1989).

. Hypothèse radicalaire.

L'augmentation de la production de radicaux libres provoquerait une accélération du vieillissement cérébral.

. Hypothèse aluminique.

Au cours de nombreuses études, plusieurs arguments ont été mis en évidence favorisant ainsi cette hypothèse.

Tout d'abord, de nombreux auteurs ont montré la présence d'aluminium dans le cerveau de patients atteints de DTA (CRAPPER et coll., 1973, 1976; TRAPP et coll., 1978; YOSHIMASU et coll., 1985).

Cependant, d'autres auteurs révèlent que l'élévation de la teneur aluminique cérébrale est liée à l'âge des individus et que ces teneurs ne sont pas significativement différentes des valeurs

retrouvées chez des témoins (Mc DERMOTT et coll., 1978; MARKESBERRY et coll., 1981).

De plus, comparées aux teneurs retrouvées chez des patients dialysés, décédés d'encéphalopathies, les concentrations retrouvées chez les patients atteints de DTA sont au moins cinq fois inférieures (YATES et coll., 1980).

Au niveau des lésions histologiques de la DTA, l'aluminium a également été détecté (PERL et BODY, 1980; CANDY et coll., 1986).

Expérimentalement, des intoxications aluminiques peuvent induire des lésions histopathologiques et des troubles comportementaux analogues à ceux de la DTA.

Ainsi, des intoxications aluminiques par les sels d'aluminium chez l'animal (Chat et Lapin) provoquent des lésions neuronales comparables en microscopie optique à la dégénérescence neurofibrillaire d'Alzheimer (CRAPPER et DALTON, 1973 a et b; KING et coll., 1975; BUGIANI et GHETTI, 1982; WISNIEWSKI et coll., 1982). De même, chez le Rat, une injection intracérébroventriculaire unique de tartrate d'aluminium provoque une encéphalopathie progressive (LIPMAN et coll., 1988).

Cependant, toujours chez le Rat, aucune dégénérescence neurofibrillaire n'a pu être observée après injection intracrânienne de chlorure d'aluminium (KING et coll., 1975). De plus, l'administration d'aluminium à des cultures de cellules cérébrales humaines induit des dégénérescences neurofibrillaires dont l'organisation morphologique est différente de celles observées dans les cas de DTA (DE BONI et coll., 1980).

Pourtant, récemment, BRENNER et YOON (1994) ont montré *in vitro* qu'une brève exposition (60 minutes) à du chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) était toxique pour les neurones de l'hippocampe de rat, même si il semblerait, qu'à forte concentration, l'aluminium aurait un effet protecteur. Toujours chez le Rat, PLATT et coll. (1994) montrent qu'à faible concentration l'aluminium a une action réversible sur les neurones de l'hippocampe alors qu'à concentration élevée l'aluminium aurait une action irréversible entraînant de sévères

mécanismes neurotoxiques impliqués dans la dégénérescence neuronale. De même, PIA MULLER et BRUININK (1994) ont montré que l'aluminium possédait des propriétés neurotoxiques vis à vis des cellules embryonnaires de cerveau entraînant des altérations cytosquelettiques similaires à celles observées dans des cas de DTA. Dans un modèle expérimental d'intoxication chronique à l'aluminium chez le Rat, DELONCLE et coll. (1995) démontrent l'accumulation d'aluminium dans différentes parties du cerveau mettant en évidence une modification de la barrière héméo-encéphalique et surtout, l'apparition de perturbations neurologiques (tremblements, pertes d'équilibre, convulsions, ...) comparables à celles rencontrées dans des cas de DTA.

Les études épidémiologiques concernant l'identification des facteurs à l'origine des démences viennent de débiter. Une étude réalisée sur des mineurs ayant reçu de l'aluminium entre 1944 et 1979 pour lutter contre la silicose conclue qu'il n'existe pas de différences entre mineurs exposés ou non exposés à l'aluminium (RIFAT et coll., 1990). Par contre, une étude épidémiologique anglaise a montré que l'incidence de la maladie d'Alzheimer est multipliée par un coefficient de 1,5 dans les régions où la teneur moyenne en aluminium de l'eau de boisson est supérieure à $110 \mu\text{g.l}^{-1}$ par rapport aux districts où la concentration est inférieure à $10 \mu\text{g.l}^{-1}$ (MARTYN, 1989).

De plus, récemment, plusieurs études tendent à démontrer la participation de l'aluminium dans le développement de DTA chez des patients soumis à une exposition prolongée à l'aluminium (CANDY et coll., 1992; HARRINGTON et coll., 1994). JOSHI et coll. (1994) suggèrent que la dérégulation de l'homéostasie du fer et de l'aluminium permettrait leur colocalisation au niveau cérébral et contribuerait ainsi à une accumulation d'erreurs métaboliques (altérations des fonctions de l'héxokinase, du G6P deshydrogénase, production de radicaux libres...) conduisant à la formation des plaques séniles. De plus, l'aluminium favoriserait la peroxydation lipidique (OTEIZA, 1994).

Chez 365 patients sains, ZAPATERO et coll. (1995) montrent que l'élévation de la concentration aluminique dans le serum est corrélée à l'âge des individus et que ce phénomène est à mettre en

relation avec la perméabilité gastrique accrue des sujets âgés. De plus, ces mêmes auteurs montrent que des patients atteints de DTA ont des taux d'aluminium sériques significativement plus élevés que des patients atteints d'autres démences séniles (alcoolique, vasculaire, ...) et que des patients sains.

En conclusion, la concentration aluminique intraneuronale est augmentée chez les malades porteurs d'une DTA. Les neurones les plus atteints comportent souvent une dégénérescence neurofibrillaire. Cette dégénérescence se retrouve dans les études expérimentales (exceptées celles sur le Rat) mais son organisation est totalement différente. Les plaques séniles observées chez un patient atteint de DTA ne sont pas retrouvées chez l'animal. De plus, la dégénérescence neurofibrillaire n'est pas spécifique d'une DTA.

Les plaques amyloïdes, spécifiques à la DTA, contiendraient de l'aluminium, associé à du silicium sous forme d'aluminosilicates (MASTERS et coll., 1985; CANDY et coll., 1986; FASMAN et coll., 1995). En effet, TOKUTAKE et coll. (1995) mettent en évidence la présence d'aluminium et de silicium (probablement sous forme d'aluminosilicates) dans les plaques séniles, accumulés dans des granules de lipofuscine. Cependant, les travaux de LANDSBERG et coll. (1992) tentent à démontrer que, l'existence de silicates d'alumine dans les plaques amyloïdes, relatée dans des études antérieures, serait liée à des phénomènes de contamination. Ces travaux ont ensuite été largement discrédités (GOOD et PERL, 1992 et 1993; KRUCK, 1993). Enfin, les concentrations en aluminium retrouvées dans la substance grise des patients atteints d'encéphalopathies des dialysés sont environ dix fois plus importantes que celles trouvées chez les patients atteints de DTA.

Selon TZOURIO et coll. (1991), la DTA pourrait avoir à la fois une origine génétique et/ou environnementale. Ainsi, la DTA pourrait être due à la fois à des facteurs exogènes et endogènes.

En conclusion, il semblerait peu probable que l'aluminium soit le facteur étiologique toxique de la maladie d'Alzheimer. Cependant, on ne peut affirmer son absence de responsabilité car:

. L'accumulation cérébrale pourrait être due à une diminution de la liaison à la transferrine (FARRAR et coll., 1990).

. L'aluminium pourrait franchir la barrière hémato-encéphalique à l'état de complexe avec l'acide glutamique et se déposerait dans le cortex cérébral et l'hippocampe riches en terminaisons glutaminergiques (HUGUET et coll., 1991).

. L'aluminium serait fixé sur les paires hélicoïdales de filaments qui s'accumulent dans les neurones au cours de la DTA (SHERRARD, 1991).

Enfin, le dosage de l'aluminium dans le sang, le liquide céphalo-rachidien et les urines ainsi que les paramètres des statuts phosphocalcique et lipidique explorés en raison de la liposolubilité de l'aluminium et de son interférence avec le fonctionnement parathyroïdien ne montrent aucune différence entre une population atteinte de DTA et une population témoin (PAILLER et coll., 1995).

. La sclérose amyotrophique latérale (SAL) et la maladie de Parkinson.

La sclérose amyotrophique latérale (SAL) est une démence dégénérative qui était particulièrement fréquente dans les années soixante dans trois régions du monde: l'île de Guam (îles Mariannes), l'ouest de la Nouvelle-Guinée et la péninsule de Kii au Japon.

La maladie apparaît vers l'âge de 35 ans, se développe en 3 à 5 ans, et les malades décèdent le plus souvent aux environs de 50 ans.

Histologiquement, les motoneurones du cerveau et les neurones de la corne antérieure de la moelle épinière sont affectés et présentent une dégénérescence neurofibrillaire. Les plaques séniles sont rares. L'autopsie de patients atteints de SAL révèlent des concentrations en aluminium inhabituellement élevées dans le cerveau et la moelle épinière (YOSHIMASU et coll., 1980, cités par GANROT, 1986; GARRUTO et coll., 1990). Du point de vue cytotologique, l'aluminium s'accumule dans le noyau et le péricaryon des neurones (PERL et coll., 1982).

L'environnement pourrait jouer un rôle déterminant dans l'apparition de la SAL. En effet, ces trois régions présentent une caractéristique géologique commune définie par un sol riche en manganèse et en

aluminium, mais pauvre en calcium. L'analyse des eaux de l'île de Guam révèle des teneurs aluminiques de 100 à 400 $\mu\text{g.l}^{-1}$.

Plusieurs études ont été menées afin de déterminer si l'origine du déclenchement de la SAL était la contamination aluminique. Pour cela, des ânes sont nourris pendant un an avec un régime carencé en calcium et en magnésium, mais riche en aluminium. Au terme du régime, les animaux sont sacrifiés. L'autopsie révèle une dégénérescence neurofibrillaire des neurones de la moelle épinière et un gonflement des axones; les teneurs aluminiques dans le tissu nerveux ne sont pas significativement augmentées (YOSHIDA et coll., 1990). GARRUTO et coll. (1989) avaient obtenu des résultats similaires chez le Singe. De plus, des études sur la neurotoxicité aigüe ou chronique de l'aluminium chez le Lapin montrent que l'aluminium peut induire une phosphorylation des protéines des neurofilaments; ce processus conduit à une dégradation et à une accumulation des neurofilaments similaires à celles rencontrées dans des cas de SAL (STRONG, 1994).

YASE (1980) signale que le taux sérique de parathormone (PTH) est environ trois fois plus élevé chez les patients atteints de SAL que chez les témoins et que la PTH stimule l'absorption de l'aluminium.

Comme l'incidence de la maladie a fortement diminué ces dernières années, l'intervention de plusieurs facteurs environnementaux a été suggérée. Cependant, à l'heure actuelle, l'étiologie de la SAL reste encore inconnue.

En ce qui concerne la maladie de Parkinson, plusieurs études révèlent également la présence d'aluminium et de fer en grandes concentrations au niveau des corps de Luys de cerveaux de patients atteints de cette maladie (DEXTER et coll., 1989; RIEDERER et coll., 1989; HIRSCH et coll., 1991). En 1992, YASUI et coll. mettent en évidence une baisse de la concentration en magnésium dans le cerveau de patients atteints par la maladie, une stabilité de la concentration en calcium et une élévation des concentrations en aluminium au niveau du locus nigra, du noyau caudé, du pallidum et de la substance grise du cerveau de ces mêmes patients. Cependant, l'implication des métaux dans la genèse de la maladie de Parkinson demande encore à être démontrée.

7.3. Tératogénicité, Mutagénicité et Carcinogénicité.

Mc CORMACK et coll. (1979) montrent que, le traitement par voie orale au chlorure d'aluminium (1000 mg.kg^{-1}) associé à la parathormone (PTH) de rates, du 6^{ème} au 19^{ème} jour de la gestation, entraîne une augmentation de l'embryolétalité chez les jeunes issus de mères traitées. De même, des études réalisées sur des rates gestantes intoxiquées au lactate et/ou au chlorure d'aluminium à différentes périodes de la gestation, mettent en évidence un retard dans le développement neuro-moteur des jeunes rats issus des femelles traitées (BERNUZZI et coll., 1989; MULLER et coll., 1990). FIRLING et coll. (1994) montrent que le traitement d'embryons de poulet par du citrate d'aluminium du 8^{ème} au 16^{ème} jour d'incubation entraîne une diminution de la longueur du tibia et une malformation persistante du tibia et du fémur.

De plus, l'injection intrapéritonéale de chlorure d'aluminium (75 à 200 mg.kg^{-1} , doses parfois létales pour les mères) à des souris à différentes périodes de la gestation, entraîne, chez les jeunes qui survivent, un retard pondéral important et un retard de la croissance osseuse (BENETT et coll., 1975). Cependant, COLOMINA et coll. (1994) ne constatent aucun signe de toxicité chez des souris gestantes ni chez leur foetus après un traitement à l'hydroxyde d'aluminium ou après un traitement à l'hydroxyde d'aluminium plus de l'acide ascorbique.

L'effet mutagène de l'aluminium a été montré sur des souches de *Rhizobium* qui développent une résistance à la rifampicine (OCTIVE et coll., 1991).

De plus, l'aluminium peut induire une élévation de la synthèse protéique et une diminution des teneurs en ARN, et se lier à la chromatine nucléaire (MILLER et LEVINE, 1974).

KRUEGER et coll. (1984) ont montré expérimentalement que l'implantation de disques aluminiques dans l'organisme pouvaient entraîner des effets carcinogènes.

8. TRAITEMENT DE L'INTOXICATION ALUMINIQUE.

8.1. Traitement des complications cliniques et Evaluation de la contamination.

Même si, les quantités de gels d'alumine prescrites et les concentrations en aluminium des liquides de dialyse ont été considérablement diminuées, des phénomènes de toxicité de l'aluminium continuent à se manifester chez des patients insuffisants rénaux dialysés (ACKRILL et DAY, 1985). De plus, même s'il a été montré que de petites quantités d'aluminium (jusqu'à $100 \mu\text{g.heure}^{-1}$) pouvaient être mobilisées sans chélation pendant la séance de dialyse (HODGE et coll., 1981), il est évident que ces quantités ne seraient pas suffisantes pour inverser les différents syndromes associés à une importante surcharge aluminique consécutive à plusieurs années d'intoxication (ACKRILL et coll., 1986).

Ainsi, il s'avère nécessaire d'utiliser un complexant de l'aluminium capable de diffuser dans tous les compartiments de l'organisme.

En fait, les traitements de l'intoxication aluminique n'ont débuté que vers les années 70 parce qu'avant cette époque, l'aluminium n'était pas reconnu comme toxique. Les essais cliniques de D-penicillamine et de 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) dans le traitement d'encéphalopathies chez des patients hémodialysés sont restés inefficaces (BURKS et coll., 1976). De même, l'acide 2,3-dimercaptosuccinique (DMSA) ne protège pas la souris de la toxicité aigüe du chlorure d'aluminium (TING et coll., 1965). L'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) s'est révélé inefficace dans le traitement d'encéphalopathies des dialysés (DELAVELLE et coll., 1977; ADHEMAR et coll., 1980). En revanche, toujours DELAVELLE et coll. (1977) montrent l'efficacité *in vivo* de l'EDTA en tant que chélateur de l'aluminium, ainsi que l'élimination satisfaisante du complexe EDTA-aluminium au cours d'une séance de dialyse. Ils expliquent le manque d'amélioration clinique des patients par l'existence de lésions irréversibles du système nerveux central. D'autres auteurs supposent que l'inefficacité de ce chélateur provient de la mauvaise distribution intracellulaire du produit (MAY et BULMAN, 1983).

En 1980, ACKRILL et coll. testent un chélateur, la desferrioxamine B (DFO ou Desferal) dans le traitement d'une encéphalopathie aluminique. La desferrioxamine est un acide trihydroxamique obtenu à partir d'une souche d'actinomycètes, *Streptomyces pilosus* (PETERS et coll., 1966).

Le DFO était couramment utilisé dans le traitement des surcharges ferriques, et avait permis une mobilisation efficace du fer chez un patient dialysé (BAKER et coll., 1976). En effet, le DFO complexe les ions trivalents comme le fer .

Le DFO se présente sous la forme d'une chaîne linéaire d'un poids moléculaire de 656 daltons qui en présence d'ion ferrique chelate cet ion par ses trois groupements acide trihydroxamique et forme ainsi un complexe hexadenté très stable, la ferrioxamine, avec une constante de formation $K=10^{31}$ (KEBERLE, 1964). Par conséquent, il a largement été utilisé pour faciliter l'excrétion du fer via les reins chez des patients présentant une importante surcharge ferrique (D'HAESE et coll., 1989). Il a été montré par la suite que le DFO pouvait parfois former des complexes avec l'aluminium (SNOW, 1969). L'aluminium trivalent se substitue à l'ion ferrique et forme alors le complexe aluminoxamine qui possède une constante de formation $K=10^{22}$.

Cette étude portait sur un patient hémodialysé à domicile depuis 8 ans qui était exposé, par intermittence, à de fortes teneurs en aluminium, contenues dans le bain de dialyse (plus de $700 \mu\text{g.l}^{-1}$). Malgré l'installation d'un système de traitement de l'eau de dialyse et l'interruption de la prise de gels d'alumine, ce patient a développé une encéphalopathie myoclonique.

Les auteurs ont alors décidé de lui administrer, par la voie artérielle, de la desferrioxamine ("Desferal") à raison de 6 grammes dans 500 ml de liquide physiologique pendant les deux premières heures de la séance de dialyse, qui avait lieu trois fois par semaine (durée de 4 heures) (ACKRILL et coll., 1980).

Pendant les quatre premières semaines de traitement au DFO, la condition du malade semblait se détériorer, en particulier pendant les premières heures suivant la dialyse au cours de laquelle le DFO était administré. Par la suite, une lente mais significative amélioration est apparue. Après dix mois de traitement, le patient retrouvait son indépendance et pouvait retourner chez lui (ACKRILL et coll., 1986).

Par la suite, le DFO a été largement utilisé dans différents domaines thérapeutiques:

.Application à la dialyse.

Les études en laboratoire ainsi que les études cliniques concernant la dialyse pour éliminer l'aluminium par ultrafiltration ont montré que l'aluminoxamine était un complexe formé par une mole de DFO pour une mole d'aluminium qui était dialysable (ACKRILL et DAY, 1993).

Suite à une administration par voie intraveineuse de DFO après dialyse chez un patient présentant une surcharge aluminique et en absence d'exposition aluminique, le taux d'aluminium sérique augmente lentement jusqu'à atteindre un pic au bout de 12 à 24 heures qui indique une translocation de l'aluminium des tissus vers le système circulatoire (MILLINER et coll., 1984a). Ensuite, en absence de fonction rénale, la concentration aluminique reste constante jusqu'à la prochaine dialyse où l'élimination sera fonction des caractéristiques de la technique de dialyse. En absence de DFO, l'aluminium est largement fixé à la transferrine (de poids moléculaire 77000 daltons) (TRAPP, 1983) et, par conséquent, une faible fraction de l'aluminium reste dialysable. Après administration de DFO, une significative mais variable fraction de l'aluminium sérique se présente sous forme d'aluminoxamine et devient ultrafiltrable, le restant est en majorité complexé à la transferrine. Des études chromatographiques ont cependant montré que l'aluminium présent dans le sang sous forme d'aluminoxamine provenait essentiellement des tissus alors que l'on ne notait qu'une faible diminution de l'aluminium lié à la transferrine (ACKRILL et DAY, 1993). Après injection de DFO, on observe donc un profil caractéristique (dents de scie) du taux d'aluminium sérique correspondant à l'élévation et à la chute successive de la concentration d'aluminoxamine avant et pendant la dialyse, laquelle n'a aucune influence sur le contenu aluminique des hématies qui reste d'ailleurs relativement constant.

A l'inverse de la ferrioxamine et de l'aluminoxamine, le DFO est capable de pénétrer dans les cellules hépatiques pour complexer le fer et l'aluminium avant d'être éliminé dans la bile (ARAKELIAN et coll., 1990).

. Encéphalopathie des dialysés.

Depuis la première utilisation du DFO par ACKRILL et coll. (1980), de nombreuses études ont confirmé l'efficacité de ce chélateur dans le traitement de l'encéphalopathie aluminique (ARZE et coll., 1981; MILNE et coll., 1983) même si certains cas d'amélioration de patients atteints d'encéphalopathie des dialysés sans utilisation de DFO mais faisant suite à l'arrêt de la prise orale d'aluminium (MASSELOT et coll., 1978; POISSON et coll., 1978) ou à l'installation de système de traitement de l'eau de dialyse (PIERIDES, 1980) ont été démontrés.

Cependant, la seule comparaison directe de l'efficacité du traitement au DFO a été effectuée par MILNE et coll. (1983) chez 11 patients dialysés avec de l'eau traitée. Dans cette étude, 4 des 6 patients dialysés traités au DFO ont connu une amélioration considérable de leur état alors que les 5 patients non traités au DFO sont décédés. Néanmoins, certains patients, adulte ou enfant, traités au DFO n'ont pas vu leur état s'améliorer. Une étude rapporte même qu'une encéphalopathie du dialysé s'est développée chez un patient suite à un traitement d'une ostéomalacie aluminique par le DFO (SHERRARD et coll., 1988).

L'aggravation des symptômes arrivent parfois pendant les premières phases du traitement et nécessite l'utilisation d'agents antiépileptiques et la réduction du temps de dialyse. Ceci entraîne une élévation importante du taux d'aluminium sérique ($>1500 \mu\text{g.l}^{-1}$) pendant le traitement qui doit permettre une desintoxication aluminique par dialyse produisant une amélioration de l'état général. Cependant, si le traitement est temporairement stoppé lorsque la concentration sérique en aluminium diminue puis réinstauré à des doses de DFO plus faibles, des détériorations de l'état des patients peuvent être observées (Mc CAULEY et SORKIN, 1989).

Fort heureusement, depuis l'installation des systèmes de purification de l'eau, très peu de nouveaux cas d'encéphalopathies sévères ont été déclarées.

L'effet d'une exposition à long terme à des faibles doses d'aluminium sur les fonctions intellectuelles a également été reconnu et certains auteurs ont suggéré l'utilisation du DFO comme traitement (ALTMAN et coll., 1987).

Il est important de noter que la réponse à un traitement au DFO est d'autant plus efficace et moins hasardeuse que ce traitement est instauré précocement (Mc CARTHY et coll., 1990).

. Ostéomalacies.

Les premières études relatives à l'utilisation du DFO dans le traitement de l'ostéodystrophie aluminique ont été effectuées chez des patients atteints d'une sévère encéphalopathie. Ces études soulignent la formidable amélioration clinique, avec un allègement des douleurs musculaires, une guérison des fractures et une inversion de la faiblesse musculaire permettant le retour à une totale indépendance des patients (ACKRILL et coll., 1982; BROWN et coll., 1982; IHLE et coll., 1982).

Après un traitement à long terme, on constate une importante réduction de la concentration aluminique dans l'os, démontrée aussi bien par analyse chimique (ACKRILL et coll., 1982; CHARHON et coll., 1988) que par coloration histochimique (CHARHON et coll., 1986).

En fait, les douleurs et l'impotence fonctionnelles des malades disparaissent dès les premières semaines du traitement. L'utilisation de fortes doses (6 grammes) de DFO ou la répétition des injections de DFO à chaque séance de dialyse ne sont pas indispensables (CHARHON et coll., 1986). La guérison totale des signes histologiques d'ostéomalacie est plus tardive et ne s'observe qu'après plusieurs mois de traitement.

L'étendue des dépôts d'aluminium osseux diminue considérablement après traitement. Chez certains malades, il persiste des liserés d'aluminium situés dans l'os calcifié, ce qui suggère également qu'un processus de minéralisation actif a pu reprendre malgré la persistance de dépôts d'aluminium (RAPOPORT et coll., 1987). Une telle observation a également été faite après transplantation rénale (PODENPHANT et coll., 1984).

L'analyse des biopsies osseuses après traitement montre une augmentation considérable du remodelage osseux avec augmentation du nombre d'ostéoclastes et d'ostéoblastes telle qu'on l'observe dans les états d'hyperparathyroïdisme. La vitesse de formation osseuse déterminée par l'extension des surfaces marquées par de la tétracycline et la vitesse de progression du front de calcification augmente de ce fait fortement (CHARHON et coll., 1986). Cela explique vraisemblablement l'augmentation des phosphatases alcalines sériques. Il faut cependant noter que la parathormone (PTH) augmente également, parfois de façon importante, ce qui suggère une élévation de la sécrétion de PTH. On ignore s'il s'agit d'un effet direct du DFO ou de la soustraction d'aluminium au niveau des glandes parathyroïdiennes (MALLUCHE et coll., 1984; RAPOPORT et coll., 1987) levant ainsi leur inhibition (MORRISSEY et coll.,

1983). Mais l'augmentation de la demande calcique osseuse secondaire à la reprise du processus de minéralisation osseuse authentifiée par l'augmentation de la formation osseuse au niveau tissulaire pourrait également contribuer à augmenter la sécrétion de PTH (CHARHON et coll., 1986).

. Anémies.

La première amélioration d'une anémie d'un dialysé a été découverte chez des patients présentant une importante surcharge aluminique sous traitement au DFO pour lutter contre l'encéphalopathie et l'ostéomalacie (ACKRILL et coll., 1982; TIELEMANS et coll., 1985). Par la suite, ALTMAN et coll. (1987) ont démontré l'efficacité du DFO, chez des patients présentant une surcharge aluminique modérée, dans le traitement d'une anémie normocytaire normochrome à l'inverse d'une anémie microcytaire hypochrome généralement considérée comme un indicateur de toxicité aluminique (SHORT et coll., 1980).

Récemment, l'aluminium a été mis en cause dans la faiblesse de la réponse au traitement de l'anémie des dialysés par l'érythropoïétine (CASATI et coll., 1990). Par conséquent, les auteurs préconisent l'utilisation des tests au DFO ou des prétraitements au DFO avant le début de la thérapie à l'érythropoïétine afin de potentialiser son action et ainsi de limiter les doses de chélateur utilisé.

. Diagnostic de surcharge aluminique: test au DFO.

L'utilisation du DFO pour déterminer le degré d'imprégnation aluminique de l'organisme a débuté avec les études de SIMON et coll. (1982).

Le test consiste à perfuser 2 grammes de desferrioxamine au cours d'une séance de dialyse et à mesurer l'aluminium plasmatique 48 heures après. Un pic d'hyper-aluminémie indique l'existence d'une contamination chez le patient, l'aluminium étant stocké au niveau des différents tissus.

Cependant, certaines études montrent la non significativité du test dans le diagnostic d'une surcharge osseuse en aluminium (MALLUCHE et coll., 1984). En effet, chez des patients ingérant régulièrement des gels

d'aluminium pour réguler leur métabolisme phosphocalcique, le taux d'aluminium plasmatique peut être aussi élevé que lors d'une injection de DFO (ACKRILL et DAY, 1993). A l'opposé, chez des patients non soumis à une exposition orale régulière à l'aluminium, la réponse à l'injection de DFO peut être nettement marquée et, dans ce cas, révéler une surcharge aluminique.

Malgré toutes ces difficultés de standardisation, le test au DFO continue à être largement utilisé.

Malheureusement, toutes ces utilisations du DFO peuvent donner naissance à des complications et à des effets secondaires. Aujourd'hui, les effets secondaires dus à une thérapie au DFO sont bien connus et on distingue:

- . chocs anaphylactiques qui restent rares et la désensibilisation est possible (MILLER et coll., 1981).
- . douleurs abdominales (ACKRILL et DAY, 1993).
- . neurotoxicité auditive et visuelle (FREEDMAN et coll., 1988; CASES et coll., 1990)
- . thrombocytopénies (WALKER et coll., 1985).

Tous ces effets secondaires ont donné naissance à un certain nombre d'études réalisées *in vitro*. Ainsi, ESTROV et coll. (1988) suggèrent que le DFO causerait une myélosuppression s'il est administré à des patients dont la concentration plasmatique en fer est normale ou faible. En effet, le DFO aurait un effet inhibiteur sur les cellules souches de la moelle épinière. De plus, les travaux de KLEBANOFF et coll. (1989) ainsi que ceux de POOT et coll. (1989) indiquent que le DFO agit comme un système générateur de radicaux libres, ce qui expliquerait ces effets biologiques *in vitro* et *in vivo*. De même, HILETI et coll. (1995) mettent en évidence une apoptose accélérée des lymphocytes T activés ainsi que des cellules de la série granulocytaire (HL 60).

Plus encore, la desferrioxamine peut, chez des malades surchargés en fer, favoriser la survenue d'infections à germes particuliers. En effet, HOEN et coll. (1988) rapportent le cas d'un hémodialysé chronique surchargé en fer ayant eu une septicémie à *Yersinia enterocolitica* dans les suites immédiates d'une administration unique de DFO destinée à étayer le diagnostic d'ostéopathie aluminique. D'autres équipes, ont souligné ce risque accru d'infections à *Yersinia enterocolitica* chez les hémodialysés surchargés en fer et traités au DFO (WATERLOT et VANHERWEGHEM, 1985). Les travaux de ROBINS-BROWNE et PRPIC (1985) ont très bien précisé le rôle

physiopathologique de la surcharge en fer et surtout du DFO dans l'apparition des infections à *Yersinia*.

De même, des cas de mucormycoses ont été rapportés chez des hémodialysés surchargés en fer ou en aluminium traités par DFO (GOODILL et ABUELO, 1987; BOELAERT et coll., 1988). Le principal champignon responsable de la mucormycose est *Rhizopus*.

Rhizopus et les *Yersinia* sont des microorganismes dépourvus de sidérophores, les empêchant de capter le fer nécessaire au développement de leur pouvoir pathogène. Or le DFO est un sidérophore d'origine bactérienne qui va permettre ce développement (HOEN et KESSLER, 1991).

L'augmentation du nombre de cas de mucormycose chez des patients dialysés et traités au DFO a d'ailleurs conduit à l'ouverture d'un registre international. Le dernier rapport de ce registre fait état de 59 patients dialysés dont 46 (78%) étaient traités au DFO alors qu'un tiers seulement souffrait d'une surcharge en fer (BOELAERT et coll., 1991). Par conséquent, le rôle du DFO dans la genèse de ces infections semble être de plus en plus prépondérant.

L'élévation du nombre de cas à issue fatale et le récent développement de techniques sensibles pour l'analyse de la ferrioxamine et de l'aluminoxamine dans le serum (ALLAIN et coll., 1987; D'HAESE et coll., 1989) ont attiré l'attention générale sur la nécessité de déterminer une dose satisfaisante dans le traitement au DFO.

Par conséquent, avec les connaissances de plus en plus étendues des dangers liés à une thérapie au DFO, il faut espérer que son utilisation dans le traitement de la surcharge aluminique va diminuer. Cependant, à l'heure actuelle, l'exposition à l'aluminium ne peut être complètement éliminée et la toxicité potentielle d'une faible exposition prolongée et de ses effets sur l'organisme doivent être clarifiées. Même si la récente utilisation d'un isotope aluminique, ^{26}Al (DAY et coll., 1991), donne une nouvelle impulsion aux recherches futures, l'utilisation du DFO dans la détermination de l'accumulation d'aluminium dans l'organisme devra continuer.

8.2. Etudes expérimentales-Recherche d'une alternative à la desferrioxamine.

Les nouvelles réserves émises quant à l'utilisation thérapeutique du DFO dans le traitement de la surcharge aluminique, ont relancé la recherche de nouveaux composés susceptibles de supplanter la desferrioxamine.

Ainsi différents auteurs ont mis au point certaines méthodes d'évaluation de la capacité de chélation des différents composés.

CLEVETTE et ORVIG (1990) utilisent un modèle informatique basé sur les valeurs des constantes de stabilité (logK) publiées et permettant de déterminer: . les constantes de formation à pH=7.40.

. la concentration de chélateur nécessaire pour complexer 20, 50 et 90% de l'aluminium présent dans un modèle simplifié de plasma humain.

YOKEL et KOSTENBAUDER (1987) développent un système octanol/eau similaire à celui utilisé pour déterminer les coefficients de partage. Cette méthode permet de mettre en évidence d'une manière préliminaire le potentiel chélateur du composé vis à vis de l'aluminium. Il permet notamment de déterminer la capacité du chélateur et celle du complexe chélateur-aluminium à diffuser au travers des membranes.

Cependant, malgré l'apparition de ces méthodes de "pré-évaluation" du pouvoir chélateur des nouvelles molécules, le passage aux essais sur animaux préalablement intoxiqués à l'aluminium demeurent indispensables pour vérifier, *in vivo*, l'efficacité de ces nouvelles substances.

Ainsi, YOKEL et KOSTENBAUDER (1987) testent 11 substances dont l'efficacité chélatrice a été vérifiée par le système octanol/eau sur des lapins préalablement intoxiqués à l'aluminium. Ils comparent directement l'efficacité des différentes molécules administrées par diverses voies (iv, sc, po) par rapport à celle du DFO.

Différentes techniques comparatives ont été utilisées pour mettre en évidence le pouvoir complexant de nouvelles substances.

Utilisant une approche expérimentale différente, les travaux menés dans le laboratoire du Docteur DOMINGO tentent à démontrer la capacité de divers

acides carboxyliques à protéger des souris de la létalité induite par l'aluminium, à limiter l'accumulation tissulaire et à augmenter l'élimination de l'aluminium. Les composés testés (en une seule dose au quart et au tiers de leurs DL₅₀ respectives) sont administrés par voie ip à des souris 0 ou 20 minutes après une seule injection ip de nitrate d'aluminium (DOMINGO et coll., 1986, 1988; LLOBET et coll., 1987).

Par la suite, un certain nombre de molécules a été testé pour déterminer leur potentiel chélateur vis à vis de l'aluminium. Ces différentes substances peuvent être classées en plusieurs familles chimiques.

.Les fluorures.

Les fluorures forment un certain nombre de complexes avec l'aluminium: AlF_3 , $\text{Al}(\text{OH})\text{F}^+$, AlF_4^- , AlF_6^{3-} , etc...

Le complexe Al-F agit grâce à une grande affinité structurale, analogue à celle du phosphate inorganique, et affecte de nombreux processus biochimiques (YOKEL, 1994).

Les effets secondaires dus à l'utilisation de fluorures incluent l'activation de la protéine G, l'inhibition de l'inactivation des récepteurs à glucocorticoïdes, la production de contractions des muscles lisses via la stimulation de la phospholipase C (STERNWEIS et GILMAN, 1982; BIGAY et coll., 1987; CARLIER et coll., 1988; HOUSELY, 1990; RATZ et BLACKMORE, 1990; NELSON et MARTIN, 1991; SONG et coll., 1991).

L'addition de fluor (20 ou 40 mg) à l'eau de rats urémiques débutée 2 semaines après l'injection ip de lactate d'aluminium (3.2 mg Al.kg⁻¹) augmente le nombre d'ostéoblastes et diminue le taux d'aluminium osseux. Cependant, les modifications de certaines mesures suggèrent que le fluor entraîne une dégradation des lésions ostéomalaciques aluminiques (ITTEL et coll., 1992).

Dans une étude épidémiologique, FORBES et coll. (1991) associe la haute teneur en fluor de l'eau de distribution et la diminution de l'incidence des démences mentales associées à l'aluminium. Cependant, il n'a pas été démontré que l'absorption orale de fluor contribue à une réduction de l'accumulation aluminique et de la toxicité de l'aluminium.

.Les acides carboxyliques.

L'aluminium forme des complexes avec les acides carboxyliques. Il forme notamment des complexes avec les acides monocarboxyliques, acétique et propionique, entre pH=3 et pH=5 (MARKLUND et coll., 1989). L'acide lactique forme un complexe neutre avec l'aluminium dans les conditions physiologiques, mais ne chélaterait que 3% de l'aluminium plasmatique en l'absence de citrate (MARKLUND et OHMAN, 1990).

L'addition de lactate de sodium à une absorption orale d' AlCl_3 augmente l'excrétion urinaire d'aluminium; le lactate augmenterait donc l'absorption orale d'aluminium (ITTEL et coll., 1991).

Les acides dicarboxyliques, oxalique et malonique, forment des complexes 1:3 avec l'aluminium (1 Al pour 3 acides) à pH acide (JACKSON et COSGROVE, 1982).

L'aluminium peut se complexer avec l'acide salicylique grâce au déplacement des groupements hydroxylés des groupements carboxyliques et phénoliques. Cependant, RAJAN et coll. (1981) montrent que le complexe s'hydrolyse aux environs de pH=5.2 et précipite autour de pH = 6.

De nombreuses études montrent que le citrate complexe l'aluminium par ses groupements hydroxyles et carboxyliques terminaux. Les acides gluconique et tartrique complexent également l'aluminium (MOTOKAITIS et MARTELL, 1984).

De nombreux complexes Al-citrate ont été mis en évidence (MOTOKAITIS et MARTELL, 1984). Certains auteurs montraient même que l'efficacité de l'acide citrique était équivalente à celle du DFO dans la complexation de l'aluminium (DOMINGO et coll., 1986, 1988).

Cependant, l'addition orale de citrate à $\text{Al}(\text{OH})_3$ augmente la concentration aluminique dans le sang, le cerveau et l'os chez le rat (SLANINA et coll., 1984, 1985 et 1986; GREGER et POWERS, 1992) et la concentration plasmatique et/ou urinaire chez des patients dont la fonction rénale est intacte et chez des patients urémiques (SLANINA et coll., 1984; KIRSCHBAUM et SCHOOLWERTH, 1989 a et b; MOLITORIS et coll., 1989; MAIN et WARD, 1992). De plus, des encéphalopathies et la mort de patients ont été attribuées à l'addition orale de citrate pendant une exposition à l'aluminium (KIRSCHBAUM et SCHOOLWERTH, 1989a).

De plus, le pH à partir duquel le chlorure d'aluminium précipite est augmenté en présence des acides ascorbique, citrique, gluconique, lactique,

malique et oxalique élevant ainsi la solubilité potentielle *in vivo* de l'aluminium (PARTRIDGE et coll., 1989).

Chacun de ces acides organiques peut, s'il est incorporé à l'eau de boisson, potentialiser l'accumulation tissulaire de l'aluminium administré par voie intragastrique (DOMINGO et coll., 1991a), certainement grâce à leur capacité à former des complexes électriquement neutres avec l'aluminium (BERTHON et DAYDE, 1992).

La prise concomitante d'aluminium et de citrate pendant la gestation fait diminuer le poids des foetus et modifie l'ossification chez le rat (GOMEZ et coll., 1991). Les études sur modèle animal suggère que les citrates faciliteraient l'absorption d'aluminium dans la partie supérieure du tractus gastro-intestinal (FROMENT et coll., 1989) peut-être grâce à la chélation du calcium par les citrates qui est nécessaire à l'intégrité des tight junction (ECELBARGER et GREGER, 1991).

A l'opposé de l'acide citrique, l'addition d'acide ascorbique à l'eau de boisson prévient l'accumulation d'aluminium dans l'os chez le lapin (FULTON et JEFFERY, 1990). Cependant, l'addition d'acide ascorbique à de l'hydroxyde d'aluminium augmente significativement l'excrétion urinaire d'aluminium suggérant ainsi que cet acide augmente l'absorption orale d'aluminium (DOMINGO et coll., 1991b). L'acétate de calcium n'augmente pas l'absorption orale de l'aluminium chez l'homme (NOLAN et coll., 1990).

La toxicité liée à la prise orale concomitante d'aluminium et d'acide carboxylique contraste avec certaines études indiquant la protection apportée contre la létalité d'injection i.p. d'aluminium par certains acides carboxyliques.

Par conséquent, compte-tenu de la capacité des citrates à augmenter l'absorption et la distribution tissulaire de l'aluminium ainsi qu'à potentialiser la toxicité aluminique, son utilisation comme chélateur de l'aluminium ne semble pas envisageable. Cependant, l'acide citrique pourrait jouer un rôle comme adjuvant (effet synergique sur le vrai chélateur) lors d'une thérapie basée sur la chélation (VOLF, 1974). Il pourrait faciliter la mobilisation de l'aluminium et ensuite relarguer le métal vers un autre chélateur incapable de diffuser vers les organes.

L'acide nitrilotriacétique (NTA) s'est révélé efficace dans le système octanol/eau mais il reste inefficace chez le lapin intoxiqué à l'aluminium (YOKEL et KOSTENBAUDER, 1987). Cette inefficacité s'explique certainement par la biodégradation du complexe NTA-aluminium (SHANNON et coll., 1978). De plus, quand on injecte ce complexe par voie

i.p. à des rats, la toxicité et la létalité sont plus importantes qu'avec les formes inorganiques de l'aluminium (EBINA et coll., 1984) et l'accumulation osseuse est également plus élevée (EBINA et coll., 1991).

L'acide picolinique forme un complexe avec l'aluminium à pH = 7 (JONS et JOHANSEN, 1988). Mais le seul effet significatif d'injections i.p. répétées à des rats surchargés en aluminium est une réduction de la concentration aluminique dans les reins (GOMEZ ET COLL., 1990).

. Les aminoacides.

Les premières études ne mentionnaient pas la possibilité de complexation de l'aluminium avec les aminoacides (JACKSON et COSGROVE, 1982). Cependant, DELONCLE et coll. (1990) montrent l'augmentation de la capacité de l'aluminium à pénétrer dans les érythrocytes et dans le cerveau de rat en présence de L-glutamate. Pour expliquer leurs résultats, ils supposent que c'est grâce à la formation d'un complexe aluminium-L-glutamate que le métal peut franchir les membranes cellulaires mais ils n'expliquent pas comment ce complexe pourrait faciliter l'élimination de l'aluminium.

. Les dérivés dihydroxyphényliques (Catécholates).

La L-DOPA, un des composés possédant un des plus forts log K vis à vis de l'aluminium (19.6 alors que pour le fer log K = 18.4 ; RAJAN et coll., 1978) ne solubilise pas l'aluminium dans le système octanol/eau (YOKEL et KOSTENBAUDER, 1987). De plus, les valeurs des constantes de stabilité (log K) dans les conditions physiologiques laissent supposer que la L-DOPA, la dopamine, la norépinéphrine, l'acide gallique et le Tiron (log K de 8 à 10.4) ne pourront pas entrer efficacement en compétition avec les citrates (log K = 11.7) pour la chélation de l'aluminium (KISS et coll., 1989). En effet, les catécholates ne sont des complexants aluminiques efficaces qu'à des pH élevés (MARTELL et coll., 1990).

. Les acides polyaminocarboxyliques.

Le complexe Al-EDTA se forme entre pH = 2 et pH = 4 et s'hydrolyse autour de pH = 5 (RAJAN et coll., 1981; MARTELL et coll., 1990). Dans le système octanol/eau, l'EDTA possède une capacité de chélation faible à pH = 7 alors

que le CDTA et le DTPA sont efficaces (YOKEL et KOSTENBAUDER, 1987). Après injections i.p. des complexes aluminiques de DTPA, EDTA ou CDTA à des cobayes, 25 à 95 % de l'aluminium est excrété dans les urines (SUTTON et MARASAS, 1959). L'élimination de ces complexes devrait donc être rénale. L'addition d'EDTA à l'eau d'un bassin contenant des carpes réduit l'accumulation de l'aluminium ainsi que sa toxicité chez ces animaux (MURAMOTO, 1981).

. Les acides phénylcarboxyliques.

Les dérivés phénoliques de l'EDTA que sont HBED et EDDHA forment des complexes stables avec l'aluminium grâce à leurs groupements —N, —OH et —COOH (YOKEL et coll., 1991b). Ces complexes ne s'hydrolysent pas et ne se polymérisent pas entre pH 3 et 7 (RAJAN et coll., 1981). Cependant, l'EDDHA ne modifie pas la charge tissulaire en aluminium après des injections i.p. répétées (BURNATOWSKA-HLEDIN et coll., 1985; GOMEZ et coll., 1990). De plus, les études de toxicité sur des chiens et des rats non intoxiqués à l'aluminium, révèlent que l'EDDHA induit une toxicité rénale et une déficience possible du système immunitaire (ROSENKRANTZ et coll., 1986; GRAFF et coll., 1995).

L'HBED se révèle efficace dans les essais *in vitro* mais est létal chez les lapins traités (YOKEL et KOSTENBAUDER, 1987).

. Le Maltol et les hydroxypyridinones.

Le 2-méthyl-3-hydroxypyr-4-one (pyrone maltol) forme un complexe stable et soluble dans l'eau avec l'aluminium (FINNEGAN et coll., 1986). La toxicité produite par le complexe Al-maltol est généralement identique aux autres formes aluminiques quand il est injecté par voie i.v. ou par voie intracérébroventriculaire à des lapins (BERTHOLF et coll., 1989; KATSETOS et coll., 1990; FONTANA et coll., 1991) ou quand on l'additionne à des cultures cellulaires de neurones de rat (LANGUI et coll., 1990). Ce complexe est en fait capable de pénétrer dans les cellules grâce à sa lipophilicité.

Les hydroxypyridinones sont des dérivés du maltol. Ils ne sont pas chargés au pH physiologique et sont ainsi capables de pénétrer les membranes cellulaires (YOKEL, 1994). Les autres propriétés de ces composés qui leur permettent d'être absorbés de manière intacte à partir du tractus gastro-

intestinal est de résister aux acides, à l'oxydation et aux enzymes protéolytiques (HEWITT et coll., 1989).

La mobilisation du fer par les hydroxypyridinones à partir d'hépatocytes surchargés en fer ou chez des rats, des souris ou des lapins intoxiqués au fer est identique par voie parentérale que par voie orale (PORTER et coll., 1989). Comme le maltol, ce sont des ligands qui forment un complexe 1:3 avec l'aluminium (3 HP pour 1 Al), stable et qui s'hydrolyse aux environs de pH = 4 (NELSON et coll., 1989 a et b; YOKEL et coll., 1991 b).

Comparé au DFO, les hydroxypyridinones présentent les avantages d'une plus grande lipophilicité, une plus grande constante de stabilité (log K) avec l'aluminium, d'être efficaces par voie orale et de pouvoir être synthétisées à un moindre coût.

Cependant, les résultats obtenus par YOKEL (1992) suggèrent que les hydroxypyridinones peuvent pénétrer la barrière hémato-encéphalique. Par conséquent, cette capacité des hydroxypyridinones à pénétrer les cellules devrait augmenter le potentiel de chélation intracellulaire de l'aluminium par rapport au DFO. Malheureusement, ces propriétés devraient augmenter la toxicité de ces composés (BERDOUKAS et coll., 1993)

. Les acides hydroxamiques.

Les acides monohydroxamiques aliphatiques, aromatiques et hétérocycliques possèdent une faible efficacité lors d'essais *in vitro*, même si leurs constantes de stabilité vis à vis de l'aluminium (log K) sont grandes (YOKEL, 1994). Des études sur la spéciation confirment d'ailleurs ces résultats (HARRIS et SHELDON, 1990). Le logK de l'acide trihydroxamique, DFO, est plus grand que celui des acides dihydroxamiques (EVERS et coll., 1989).

L'acide rhodotorulique, un acide dihydroxamique, est capable de solubiliser l'aluminium avec une grande efficacité. Le complexe hydrophile formé avec l'aluminium devrait être facilement éliminé *in vivo* (YOKEL et KOSTENBAUDER, 1987). Par conséquent, les acides di et trihydroxamiques devraient être des chélateurs efficaces de l'aluminium par voie parentérale. Cependant, leur coût de fabrication est très élevé. Néanmoins, la capacité des di et trihydroxamates à chélater l'aluminium permet d'orienter certaines recherches vers cette famille de composés.

En résumé, comme un acide fort, l'aluminium est fortement électropositif et ne se polarise pas facilement (JONES, 1984). Il forme généralement des liaisons ioniques ou électrostatiques. L'aluminium préfère se combiner avec des molécules possédant certains groupements comme : OH^- , F^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , ROH , RO^- et RNH_2 . D'autres groupements comme R_2S , RSH , SCN^- ou $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ne se complexent pas bien avec ce métal (JONES, 1984).

Par conséquent, un chélateur efficace de l'aluminium devrait posséder les propriétés suivantes :

- former avec le métal un complexe très stable avec une constante de stabilité ($\log K$) vis à vis de l'aluminium supérieure à celle des ligands endogènes (citrates, transferrine, ...), soluble dans l'eau, ne s'hydrolysant pas au pH physiologique.
- être suffisamment lipophile pour pénétrer dans les membranes et parvenir au niveau des sites intracellulaires de stockage de l'aluminium.
- posséder une DL_{50} suffisamment élevée, une sélectivité vis à vis des différents métaux, une résistance aux dégradations métaboliques.

9. ALTERNATIVE AUX COMPOSES ALUMINIQUES

Même si la mise en place de systèmes de traitement de l'eau par déminéralisation ou par osmose inverse ainsi que des contrôles de qualité sur les solutés destinés à une administration par voie parentérale a permis de diminuer d'une manière notable le risque d'une intoxication aluminique, celui-ci reste présent, notamment chez les dialysés chroniques.

En effet, l'hyperphosphatémie, l'hypocalcémie et les acidoses métaboliques sont des complications fréquemment rencontrées dans les déficiences rénales. Il a été établi que l'hyperphosphatémie avait un lien direct avec la genèse d'atteintes osseuses (BRICKER, 1972). Ainsi, différentes thérapies, y compris les régimes alimentaires, ont été utilisées pour permettre le contrôle du taux sérique en phosphore. Cependant, le meilleur traitement proposé à ce jour reste celui constitué par l'ingestion orale de gels d'aluminium. Malheureusement, l'aluminium ne peut être complètement éliminé chez les patients déficients rénaux et constitue alors la principale source de l'accumulation du métal dans l'organisme (ALFREY

et coll., 1976; KAEHNY et coll., 1977a). Celle-ci se manifeste le plus généralement sous la forme d'encéphalopathies (ALFREY et coll., 1976), d'ostéomalacies (PARKINSON et coll., 1981), etc... Les patients déficients rénaux sont les plus exposés à la toxicité aluminique parce qu'en raison de l'absence de mécanismes d'élimination rénale, l'aluminium ne peut être excrété dans les urines et son absorption dans la partie supérieure du tractus gastro-intestinal permet la fixation tissulaire (KAEHNY et coll., 1977b).

Ainsi, la gestion thérapeutique des patients atteints d'accumulation aluminique inclut la détoxification à la desferrioxamine (ACKRILL et coll., 1982) et aussi l'interruption des traitements à base d'aluminium visant à diminuer leur hyperphosphatémie.

C'est pourquoi, certains auteurs ont développé la recherche de nouveaux composés susceptibles de complexer le phosphore. Par exemple, le carbonate et le citrate de calcium ont été testés dans le traitement de l'hyperphosphatémie chez des patients dialysés (MORINIERE et coll., 1982; CUSHNER et coll., 1986,1988). Cependant, l'efficacité de ces deux composés est conditionnée par l'utilisation de larges doses pouvant engendrées des phénomènes d'hypercalcémie (SHEIKH et coll., 1989). SCHNEIDER et coll. (1984,1985) ont testé des polymères naturels; ce sont des particules constituées d'acide hétéropolyuronique de 1 à 2 mm chargés avec du calcium ou avec une combinaison de calcium et de fer (Fe^{2+} et Fe^{3+}). Ces composés ont l'avantage d'être non toxiques et de ne pas causer de constipation, même s'ils sont absorbés en quantité conséquente. Lors des essais *in vitro*, ces polymères présentaient des capacités de chélation vis à vis du phosphore supérieures à celles d'un gel aluminique couramment employé dans le traitement de l'hyperphosphatémie des dialysés. Malheureusement, l'efficacité de ces substances s'est avérée nettement amoindri lors des essais cliniques, ne parvenant même pas à ramener le taux sérique du phosphore des patients testés à des valeurs acceptables.

CONCLUSION

Malgré la mise en place de systèmes de traitement de l'eau (déméralisation, osmose inverse) dans les centres de dialyses ainsi que les contrôles de qualité sur les solutés destinés à une administration par voie parentérale permettant de diminuer de manière conséquente les risques de pathologies liés à la contamination aluminique, l'exposition à l'aluminium ne peut être complètement éliminée et par conséquent, la toxicité potentielle et les effets d'une faible exposition prolongée demandent à être clarifiés. Cette prévalence existe notamment chez les patients dialysés à domicile.

De plus, en l'absence d'une alternative thérapeutique aux composés aluminiques dans le contrôle de l'hyperphosphatémie des insuffisants rénaux, le risque de surcharge aluminique est toujours présent. C'est pourquoi de nombreux auteurs insistent sur la nécessité de trouver une méthode alternative à ces composés aluminiques. Certaines molécules ont été proposées (polymères chargés en calcium, citrate de calcium) mais les résultats préliminaires obtenus ne laissent pas entrevoir de solutions possibles (SCHNEIDER et coll., 1984 et 1985; CUSHNER et coll., 1988).

Longtemps, l'aluminémie et l'aluminurie ont été utilisées pour évaluer le degré d'imprégnation d'un organisme alors qu'elle ne reflète pas le réel niveau d'accumulation.

Mais, selon YOKEL (1994), grâce au récent développement de techniques sensibles pour déterminer les complexes aluminiques et ferriques avec le DFO dans le sérum (ALLAIN et coll., 1987; D'HAESE et coll., 1989), la surcharge aluminique pourra être évaluée avec certitude ainsi que la quantité d'aluminium mobilisée par le chélateur. Ainsi, l'aluminémie sera particulièrement surveillée chez les dialysés " au long cours " absorbant de conséquentes quantités de gels d'alumine ainsi que chez les insuffisants rénaux récemment greffés et possèdera une signification précise quant au degré de contamination de l'organisme considéré (YOKEL, 1994). Cependant, il convient de nuancer ces propos car malgré ces améliorations, la détermination du degré de contamination des patients ne pourra pas être effectuée de façon absolue (incertitude liée à la distribution aléatoire au sein des tissus du chélateur administré, etc).

Il est bien évident que la toxicité liée à l'accumulation ne concerne qu'une faible part de la population. Ainsi les groupes à risque concernés par cette toxicité seront constitués par les patients insuffisants rénaux hémodialysés,

les enfants prématurés avec un tractus gastro-intestinal et une activité rénale immature et les individus possédant des altérations de la barrière hémato-encéphalique.

La chélation-thérapie est utile dans le traitement de l'accumulation et de la toxicité de l'aluminium chez les patients insuffisants rénaux. Elle devrait être utile dans le traitement des DTA (YOKEL, 1994). En effet, la chélation de l'aluminium devrait jouer un rôle important dans la compréhension des pathologies neurologiques liées à l'aluminium.

Même si le DFO est un chélateur efficace de l'aluminium, ses effets secondaires importants encouragent la recherche d'un chélateur efficace par voie orale et moins toxique.

Cependant, à l'heure actuelle, aucune alternative concrète au DFO n'a pu être déterminer.

OBJECTIF DE L'ETUDE.

Compte-tenu de l'omniprésence de l'aluminium dans l'environnement humain, l'organisme est constamment soumis à une exposition faible et prolongée à l'aluminium. Toutefois, certaines personnes subissent des expositions relativement importantes pouvant déclencher certaines pathologies.

Même si la mise en place de systèmes de surveillance des conditions d'environnement et des patients exposés a permis de faire régresser les probabilités d'apparition de ces pathologies, la découverte d'une thérapie basée sur la complexation du métal dans l'organisme demeure une des principales priorités dans les recherches futures. En effet, la chélation de l'aluminium permettrait non seulement de faire disparaître complètement ces pathologies directement liées à l'accumulation du métal mais aussi devrait permettre l'amélioration de la condition des patients atteints de maladies indirectement liées à l'aluminium (DTA, SAL, ...).

Par conséquent, notre étude expérimentale portera sur la recherche de nouveaux chélateurs de l'aluminium et du phosphore, ces derniers pourraient ainsi supplanter l'aluminium dans le traitement de l'hyperphosphatémie.

La première partie de ce travail est consacrée à la recherche et à l'étude de nouveaux composés susceptibles de complexer l'aluminium, tout d'abord en milieu aqueux tamponné grâce à la polarographie impulsionnelle, puis sur des protéines sériques grâce à une technique d'ultrafiltration et enfin sur des animaux (rats) préalablement intoxiqués.

La seconde partie s'inscrit logiquement dans le programme de recherche développé par le Laboratoire de Chimie Générale Appliquée à la Médecine. Il s'agira en effet de mettre en évidence un ou des composés capables de supplanter l'aluminium dans le traitement de l'hyperphosphatémie chez les dialysés. Pour cela, des animaux seront traités oralement par les différentes molécules. L'action du traitement sera recherchée dans différents tissus et liquides biologiques ainsi que dans les fecès.

Etude expérimentale

II. Etude expérimentale.

PROTOCOLE GENERAL

1. Origine des animaux et conditions d'hébergement.

Les expériences ont été réalisées sur des rats albinos mâles, non consanguins (*Rattus norvegicus*) de souche Wistar, provenant du centre d'élevage Iffa-Credo (L'Abresle, France).

Les animaux ont été placés dans l'animalerie de la Faculté de Médecine de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1, dont la température est maintenue à $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Cette salle est soumise à un cycle de lumière constant (obscurité de 19h à 7h).

Avant le début de toute expérimentation, les animaux ont été acclimatés au minimum 5 jours.

2. Déterminations analytiques.

Les déterminations analytiques sont réalisées par:

. Polarographie impulsionnelle différentielle grâce à un polarographe impulsionnel PGR 5 TACUSSEL relié à un enregistreur potentiométrique EPL 2 B avec une cellule polarographique comprenant (figure 1):

- une électrode de référence à calomel saturé en chlorure de potassium (ECS).

- une électrode de travail constituée par un capillaire distributeur de gouttes de mercure.

- une contre-électrode ou électrode auxiliaire constituée par un fil de platine trempant dans la solution à doser.

. Spectrophotométrie d'Emission Atomique à plasma d'argon (SEA-DCP), sur un Spectra Span V BECKMAN.

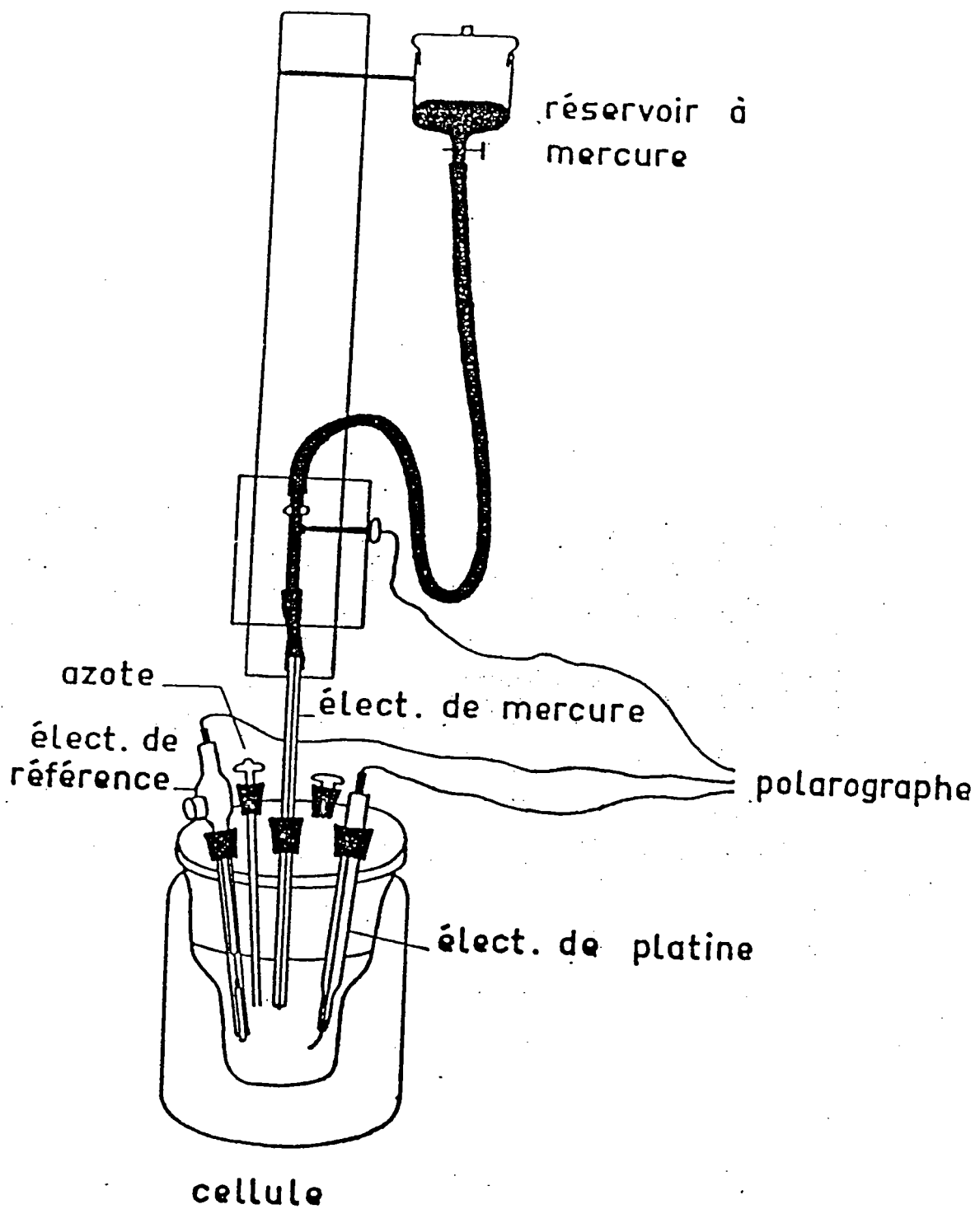


Figure 1: Schéma de l'appareillage utilisé.

2.1. Polarographie impulsionnelle différentielle.

. Rappels théoriques.

La polarographie mise au point par J. HEYROVSKY en 1922 est une technique basée sur une microélectrolyse; elle permet le dosage de substances oxydables ou réductibles: composés organiques ou métaux.

L'appareil mesure les variations de l'intensité du courant électrique qui circule dans l'électrode de travail. La valeur du courant limite de diffusion est proportionnelle à la concentration du composé à doser.

On réduit le cation métallique à l'électrode de travail (souvent électrode à goutte de mercure tombante); à l'anode, il se produit l'oxydation du solvant. La quantité d'espèce réagissante est infime et laisse la solution pratiquement inaltérée.

L'écoulement régulier des gouttes de mercure assure un renouvellement constant de l'électrode; la surface du mercure n'est jamais altérée par les produits de l'électrolyse. Le courant mesuré ne dépend donc que de la tension appliquée et de la composition de la solution; il est indépendant du temps et les résultats obtenus sont parfaitement reproductibles. Cette méthode classique ne permet pas d'obtenir une très grande sensibilité (limite de détection de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-4} M) ni une très grande sélectivité. Afin d'améliorer ces deux paramètres, BARKER et GARNER ont mis au point la polarographie impulsionnelle en 1958.

. Principe.

Cette technique est basée sur la surimposition à la tension continue d'un signal de forme rectangulaire constitué par des impulsions synchronisées positives ou négatives par rapport à la variation de tension continue. L'amplitude de ces impulsions peut varier de quelques millivolts à quelques centaines de millivolts. La fréquence de ces impulsions qui est la même que la fréquence de chute des gouttes de mercure, peut aller de quelques impulsions par seconde à un dixième voir à un vingtième d'impulsion par seconde. Cette synchronisation est assurée par la frappe d'un marteau qui fait tomber la goutte de mercure, au bout d'un temps déterminé et constant. La durée des impulsions peut varier d'un centième à un dixième de seconde. Le courant qui traverse l'électrode de travail est

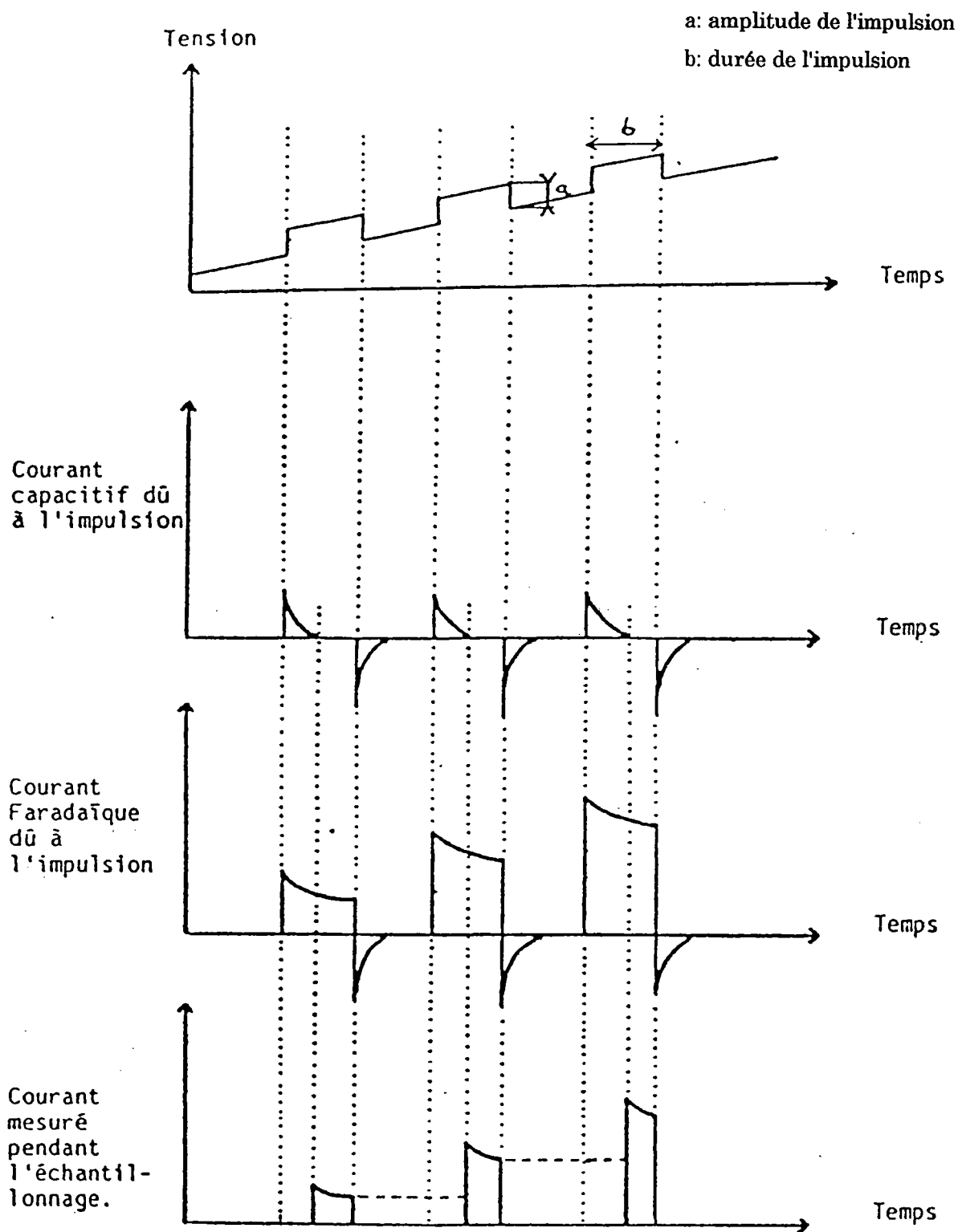


Figure 2: Variation de la tension imposée et des composantes principales du courant traversant la cellule en fonction du temps dans le cas de la polarographie impulsionnelle.

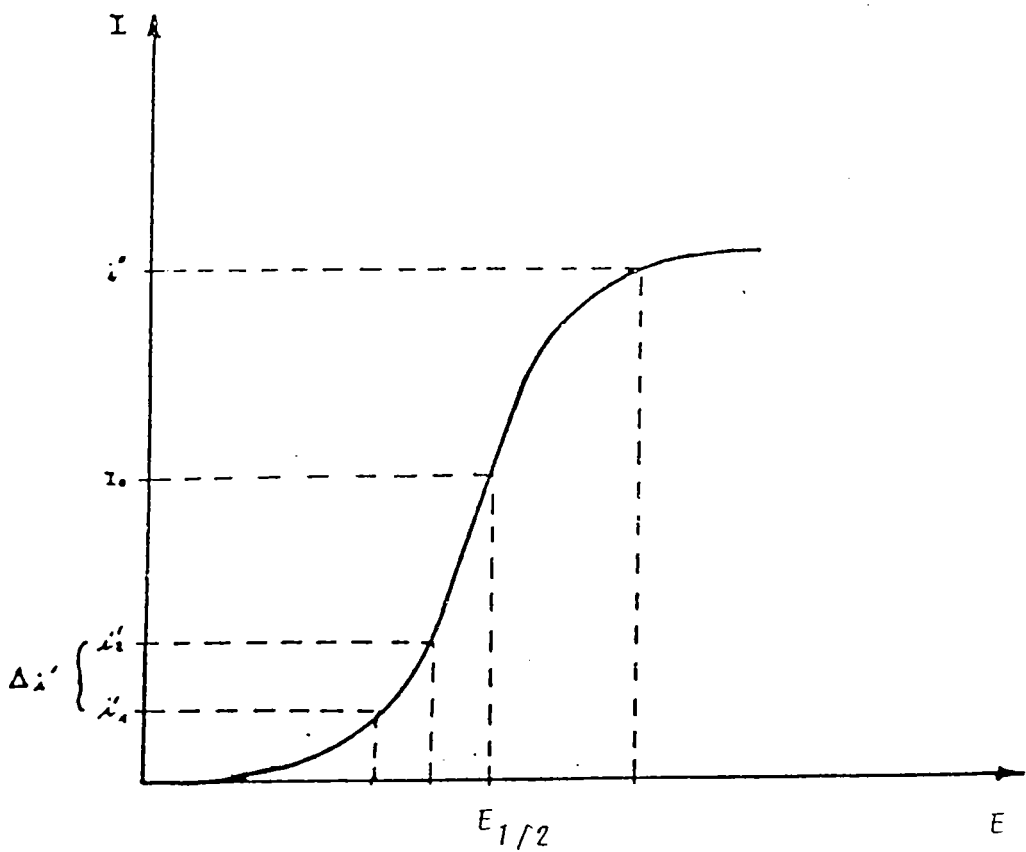


Figure 3: Type de polarogramme obtenu par polarographie classique.

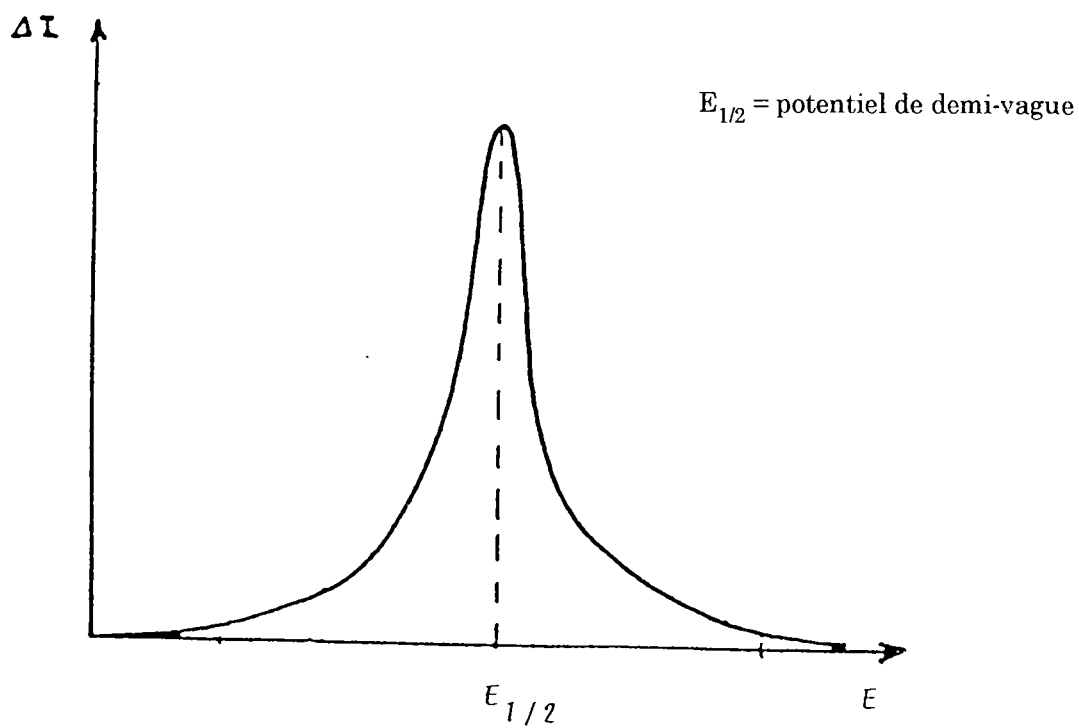


Figure 4: Type de polarogramme obtenu par polarographie impulsionnelle différentielle.

constitué par des composantes continues et par des composantes impulsionnelles; on distingue:

- . composantes liées à l'application d'une tension continue.
- . composante capacitive qui provient de la charge et de la décharge de la double couche lors de l'impulsion et qui s'atténue extrêmement rapidement.
- . composante faradaïque impulsionnelle qui se maintient pendant toute la durée de l'impulsion.

En polarographie impulsionnelle différentielle, on ne retient que la composante faradaïque, éliminant au maximum la composante continue ainsi que la composante capacitive. Pour cela, on met en mémoire le courant qui traverse l'électrode juste avant l'impulsion, et on échantillonne le courant à la fin de celle-ci; c'est à dire au moment où le courant capacitif impulsionnelle est pratiquement nul. La différence correspond donc à la composante faradaïque impulsionnelle (figure 2).

On obtient donc des courbes se présentant sous forme de pics dont le maximum se situe aux environs du potentiel $E_{1/2}$ de demi-vague des courbes intensité-potentiel. La hauteur du pic est proportionnelle à la concentration de la substance électroactive (figures 3 et 4).

. *Qualité de la méthode.*

Du point de vue sensibilité, il est aisé d'atteindre des concentrations de 10^{-7} à 10^{-8} M (gain de 10000 par rapport à la polarographie d'HEYROVSKY).

NB: Il est nécessaire d'effectuer un barbotage d'azote avant les mesures et de maintenir une atmosphère d'azote au-dessus de la solution pendant celles-ci afin d'éliminer le pic dû à la réduction de l'oxygène en eau oxygénée, situé aux environs de -0.2 V, qui masquerait les pics de réduction.

. *Appareillage.* (figure 1)

2.2. Spectrophotométrie d'émission atomique à plasma d'argon (SEA-DCP).

L'intérêt de la méthode de dosage de l'aluminium par SEA-DCP est lié à une très bonne reproductibilité des résultats et à une très grande sensibilité.

. Principe.

Un atome, soumis à un apport extérieur d'énergie (chaleur), passe d'un état dit fondamental à un état dit excité. Quand il revient à l'état fondamental, cet atome va restituer l'énergie sous forme de rayonnement, de longueur d'onde spécifique de l'élément. L'intensité de ce rayonnement émis va dépendre de la température de la source d'excitation et de la richesse en atomes excitables. Elle est donc proportionnelle à la concentration de la substance à doser, pour une température donnée.

Pour des atomes facilement excitables, correspondant à des éléments comme Li, Na, Cs, Ca, Cu, etc, une excitation à basse énergie suffit (Spectrophotométrie d'émission à flamme par exemple). Pour les autres éléments comme Al, Zn, Fe, etc, une excitation à haute énergie sera nécessaire (Spectrophotométrie d'émission à plasma d'argon par exemple).

Dans notre technique, la source d'excitation est une torche à plasma d'argon. Entre trois électrodes (deux en graphite, une en tungstène), on produit un arc électrique qui permet d'atteindre des températures de 7000 à 10000°C. Cette température très élevée permettra la rupture de toute liaison chimique. Ainsi, tout l'élément à doser, contenu dans l'échantillon, sera présent sous forme atomique; le dosage ainsi réalisé permettra la détermination de l'élément dans sa totalité.

. Préparations des échantillons biologiques en vue des dosages et étalonnage de l'appareil.

Le dosage des éléments sanguins s'effectuera sur le plasma. Pour cela, on centrifuge le sang à 3000 g pendant 3 minutes environ. On prélève alors le plasma sur lequel on effectuera nos essais.

L'étalonnage de l'appareil sera effectué à l'aide de plasma de bovin fraîchement prélevé aux abattoirs de Metz.

Pour réaliser les dosages urinaires, il est nécessaire, au moment de la collecte, d'ajouter de l'acide nitrique supra pur (10 µl pour 5 ml d'urine) afin d'éviter la précipitation de divers éléments (aluminium, calcium, ...). L'étalonnage s'effectuera à partir d'urine humaine ou de liquide physiologique.

Le dosage des éléments dans les tissus biologiques et les fèces nécessite une solubilisation préalable. Pour cela, on placera les tissus ou les fèces dans des fioles en quartz (afin d'éviter tout phénomène de contamination dû à la composition du verre) et on ajoutera de l'acide nitrique à 65% supra pur (Merck) à raison de 2 à 3 ml d'acide par gramme de tissu et de 15 ml d'acide pour les fèces. On met ensuite à chauffer sur bain de sable de Fontainebleau (environ 70°C) jusqu'à solubilisation. On réajuste enfin à volume constant à l'aide d'eau supra pure.

L'étalonnage s'effectue à l'aide de solutions à base d'eau supra pure acidifiée.

Les étalonnages sont réalisés à l'aide de deux solutions correspondantes aux points haut (de concentration en élément à doser définie) et bas (concentration en élément à doser nulle). La linéarité de la réponse est vérifiée à l'aide d'une solution de concentration intermédiaire (entre points haut et bas) de l'élément à doser.

. Qualité de la méthode.

La SEA est particulièrement efficace pour le dosage de l'aluminium. Alors qu'à 2400°C (Spectrophotométrie d'Absorption Atomique, SAA, à four graphite) tous les oxydes réfractaires de l'aluminium ne sont pas décomposés, à 7000°C c'est la totalité de l'élément sous forme atomique qui est dosée. En conséquence, il n'est pas possible, sans séparation préalable, de différencier aluminium libre et aluminium complexé.

La limite de détection, les déviations standards des résultats, sont de l'ordre de quelques $\mu\text{g.l}^{-1}$.

3. Traitement des résultats.

3.1. Expression des données.

Les valeurs sont exprimées sous la forme moyenne $\pm$ écart type ($m \pm s$). Dans les figures (histogrammes et courbes) et dans les tableaux, les résultats pourront être exprimés en:

moyenne $\pm$ écart type

moyenne $\pm$ s.e.m.

- . s.e.m. (standard error of the mean) correspond à l'écart type de la moyenne, $s/\sqrt{n}$.
- . $m \pm \text{s.e.m.}$ présenté dans les tableaux ou figures représente l'intervalle qui comprend 95% des données.
- . n indique le nombre de données de l'échantillon et s l'écart type de l'échantillon.

3.2. Analyses statistiques.

Le traitement statistique des données ($n < 30$) est réalisé par l'utilisation de méthodes paramétriques sous l'hypothèse de la normalité de la distribution des paramètres étudiés. Les échantillons sont indépendants. Les données sont étudiées par l'utilisation du test t de Student ($n < 30$) ou du test de Dunnett après avoir effectué une analyse de variance significative. L'hypothèse nulle est rejetée à la valeur de 5% ($P < 0.05$).

Le traitement informatique des données a été effectué sur micro-ordinateur P.C. équipé des logiciels STAT-ITCF et LABSTAT.

Les résultats pourront être exprimés en moyenne $\pm$ écart type ou en moyenne $\pm$ s.e.m.

CHAPITRE I

PREMIERE PARTIE

Cinétique de fixation de l'aluminium sur les divers chélateurs en milieu aqueux tamponné à température ambiante et à 37°C- Action des divers chélateurs sur l'aluminium complexé aux protéines sériques.

INTRODUCTION

La toxicité de l'aluminium n'a pas été véritablement prise en considération avant 1975, quand la première encéphalopathie humaine, associée à une concentration aluminique élevée dans le cerveau, a été décrite (LAPRESLE et coll., 1975).

Depuis les travaux d'ALFREY et coll. (1976), de nombreux auteurs ont mis en évidence le rôle toxique joué par l'aluminium dans l'encéphalopathie progressive des dialysés ainsi que dans l'étiologie d'autres pathologies: ostéomalacie (ELLIS et coll., 1979), anémie microcytaire (WILLS et SAVORY, 1983), arthropathie (NETTER et coll., 1981).

Pour exercer une toxicité au niveau du cerveau chez des sujets sains, GANROT (1986) a suggéré qu'il faudrait 100 à 150 ans d'une lente et normale accumulation de l'aluminium. On aurait pu penser que l'accumulation de l'aluminium et sa toxicité puissent être évitées en identifiant les sources et en prévenant l'exposition.

Pourtant, chez les dialysés, le problème reste entier car, à ce jour, on ne possède pas de meilleur complexant des phosphates que l'aluminium. Il se forme alors des phosphates d'aluminium insolubles, éliminés par les fèces, ce qui contribue à diminuer l'absorption du phosphore et ainsi à lutter contre l'hyperphosphatémie des dialysés. L'aluminium administré sous forme de composés, par voie orale, franchit très partiellement la barrière gastro-intestinale, passe dans le sang et s'accumule ensuite dans les tissus.

Son élimination discontinue est incomplète lors des séances de dialyse. Il y a alors accumulation progressive de l'aluminium dans l'organisme. Il est donc indispensable de déterminer le degré d'imprégnation chez le patient afin d'éviter des encéphalopathies ou autres pathologies. En cas d'accumulation trop importante, il faut traiter le malade afin de diminuer la fixation tissulaire.

Il est donc nécessaire, dans les deux cas, d'avoir recours à un chélateur de l'aluminium avant de trouver une alternative à celui-ci dans le traitement de l'hyperphosphatémie.

Depuis les travaux d'ACKRILL et coll. (1980), le chélateur du fer, le DFO (desferrioxamine) a été utilisé dans le traitement des différentes pathologies dues à l'accumulation d'aluminium dans l'organisme (BROWN et coll., 1982; CHARHON et coll., 1986; FELSENFELD et coll., 1989).

Cependant, le DFO peut être responsable de sérieux effets secondaires; neurotoxicité auditive et visuelle, infections, ... (ACKRILL et DAY, 1984; ESTROV et coll., 1988). De plus, son administration orale ne possède aucune efficacité et son coût de production reste très élevé.

Par conséquent, il serait souhaitable de découvrir un ou des chélateurs moins toxiques et si possible, administrable par voie orale.

C'est pourquoi, dans cette étude, nous avons cherché à mesurer la capacité de différents composés à chélater l'aluminium, tout d'abord en milieu tamponné maléique-maléate, eau, (calcium) de pH = 7.40 à température ambiante et à 37°C grâce à la polarographie impulsionnelle puis sur l'aluminium préalablement fixé à des protéines sériques bovines grâce à une technique d'ultrafiltration.

Les différents paramètres étudiés sont:

. l'efficacité de chélation des divers composés à 20°C (température ambiante) puis à 37°C en absence et en présence de calcium.

. l'efficacité des différents chélateurs à mobiliser l'aluminium préalablement fixé aux protéines sériques et ce à diverses concentrations.

1. MATERIEL ET METHODES.

1.1. Critères de sélection des chélateurs.

En 1990, MARTELL et coll. étudie la chimie de la complexation de l'aluminium. HIDER et HALL (1991) s'intéressent à la chimie de la complexation des éléments tripositifs.

In vivo, l'aluminium n'existe que sous forme trivalente (YOKEL, 1994). Les réactions avec l'aluminium sont caractérisées par des cinétiques lentes, des polymérisations et une importante hydrolyse. Le nombre préféré de coordination de l'aluminium est six, produisant ainsi des complexes octaédriques. De plus, l'aluminium est fortement électropositif et ne se polarise pas facilement.

Par conséquent, l'aluminium préfère se combiner avec des molécules possédant dans leur formule des groupements comme: OH^- , F^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , ROH , RO^- et RNH_2 (JONES, 1984). En plus de la valeur de la constante de stabilité formée entre l'aluminium et son ligand ($\log K$), la chélation *in vivo* sera influencée par la biodisponibilité, la distribution, la biostabilité du chélateur et la cinétique de chélation.

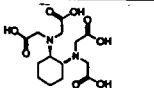
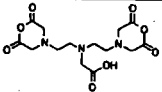
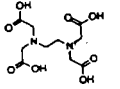
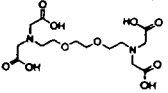
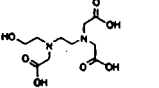
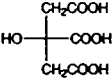
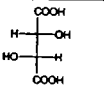
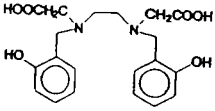
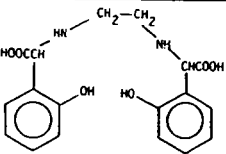
De plus, l'aluminium et le fer se complexent aux mêmes protéines et sont distribués dans le milieu intracellulaire. Les chélateurs du fer devraient donc complexer également l'aluminium et réciproquement, tous les complexants de l'aluminium chélatent le fer. Généralement, les complexes ferriques sont plus stables que les complexes aluminiques (HARRIS, 1992).

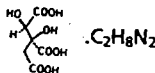
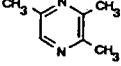
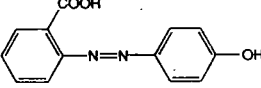
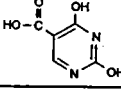
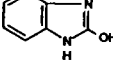
D'un point de vue structural, aucune configuration idéale n'a pu encore être déterminée.

Par conséquent, les chélateurs potentiels que nous avons sélectionnés, l'ont été soit pour leur pouvoir complexant vis à vis du fer, soit pour la présence dans leur formule d'un ou plusieurs groupements chimiques ayant une affinité pour l'aluminium.

1.2. Chélateurs sélectionnés et autres réactifs utilisés.

Les chélateurs utilisés ainsi que leurs formules chimiques, le nom du fournisseur et leur solubilité sont répertoriés dans le tableau ci-dessous.

Chélateurs	Formule chimique	Solubilité	Fournisseurs
Acides polyaminocarboxyliques			
CDTA: acide cyclohexane-1-2-diaminotétraacétique		H ₂ O	PROLABO
DTPA: acide diéthylènetriaminépentaacétique		H ₂ O	PROLABO
EDTA: acide éthylènediaminetétraacétique		H ₂ O	MERCK
EGTA: acide éthylèneglycol-O,O'-bis(2-aminoéthyl-N,N,N',N'-tétraacétique)		H ₂ O	PROLABO
HEDTA: acide N-(2-hydroxyéthyl)éthylènediamine triacétique		H ₂ O	FLUCKA
Acides carboxyliques			
Acide Citrique		H ₂ O	ALDRICH
Acide Tartrique		H ₂ O	ALDRICH
NTA: acide nitrilotriacétique		H ₂ O	PROLABO
Acides phénylcarboxyliques			
HBED: acide N,N'-bis(2-hydroxybenzyl)éthylènediamine-N,N'-diacétique		H ₂ O + 1 ml NaOH	STREM
EDDHA: acide éthylènediamine-N,N'-di(2-hydroxy phénylacétique)		H ₂ O	SIGMA

Chélateurs	Formule chimique	Solubilité	Fournisseurs
Autres			
HAES: acide thréo(-)hydroxycitrique. sel d'éthylènediamine	 $\cdot C_2H_8N_2$	H ₂ O	FLUCKA
1,4,10-trioxa-7,13-diaza-cyclopentadécane		H ₂ O	ALDRICH
2,3,5-triméthylpyrazine		H ₂ O	ALDRICH
2,4,5-trihydroxypyrimidine		NaOH	ALDRICH
Acide pipecolinique		NaOH	ALDRICH
Guanosine		H ₂ O + 1 ml NaOH	ALDRICH
Hypoxanthine		H ₂ O + 1 ml NaOH	ALDRICH
HABA: acide 2'-(4-hydroxyphénylazo)benzoïque		NaOH	ALDRICH
Acide 2,4-dihydroxypyrimidine-5-carboxylique		NaOH	ALDRICH
2-hydroxybenzimidazole		NaOH	ALDRICH
DFO: Desferal [®]	$NH_2-(CH_2)_5-NH-C(=O)-(CH_2)_2-CHN(CH_2)_5-NH-C(=O)-(CH_2)_2-CHN(CH_2)_5-NH-C(=O)-CH_3$	H ₂ O	CIBA-GEIGY

. *Autres réactifs utilisés.*

. Acide maléique (PROLABO)

. Hydroxyde de sodium en solution (NaOH), Suprapur (MERCK)

. Solutions étalons de: - cadmium

- cuivre

- calcium

- aluminium

toutes à 1 g.l⁻¹ (MERCK)

. Eau purifiée par système de purification type Millipore Milli-Q

1.3. Matériel

. Spectrophomètre d'émission à plasma d'argon DCP type spectra-span V BECKMAN.

. Polarographe impulsif PGR 5 TACUSSEL relié à un enregistreur potentiométrique EPL 2 B avec une cellule polarographique CPR 3 B.

. Electrode de référence au calomel saturé en chlorure de potassium, TACUSSEL TR 100.

. Electrode de verre TACUSSEL TCB.10/HS.

. Erlen-meyer de 100 ml en quartz.

. Tubes Centrisart I SM 13239 E, SARTORIUS.

. Centrifugeuse HERAEUS CHRIST, type Medifuge.

. pH mètre TACUSSEL, type Minisis 5000.

. Bain-marie JOUAN.

. Agitateur magnétique AM 2 TACUSSEL.

. Balance SARTORIUS, type 2442.

. Trébuchet SARTORIUS, type 2550.

. Micropipettes EPPENDORF et NICHIRYO avec embouts en polyéthylène.

. Tubes et récipients en polypropylène.

2. PROTOCOLES EXPERIMENTAUX.

2.1. Complexation de l'aluminium dans l'eau.

La réduction électrochimique d'Al³⁺ s'effectuant à des potentiels très négatifs (d'environ -1.7 V par rapport à l'ECS), il est très difficile d'effectuer

directement un dosage polarographique de l'aluminium. En effet, à un tel potentiel, même pour un pH de 7.40, il se produit une réduction des ions H_3O^+ en hydrogène. Cette réduction, avec formation d'un gaz qui peut s'adsorber à la surface de la goutte de mercure, perturbe donc considérablement la réduction de l'aluminium. Nous avons donc opté pour un dosage de l'aluminium par polarographie impulsionnelle selon la technique du dosage en retour sauf pour les molécules complexantes possédant leur propre pic polarographique.

L'aluminium, comme le cadmium ou le cuivre, réagit mole à mole avec l'EDTA ou tout autre complexant équivalent. Le cadmium et le cuivre présentent par contre l'avantage d'être électroactifs et de donner une réponse polarographique nette dans le domaine de potentiel utilisable. Le cadmium (Cd^{2+}) et le cuivre (Cu^{2+}) ont été choisis en fonction de l'affinité du chélateur pour le cation considéré.

Pour le dosage, on se place au potentiel polarographique qui correspond au pic du cadmium (ou du cuivre). Donc tant qu'il n'y aura pas de cadmium libre (ou de cuivre), on n'obtiendra pas de pic.

On versera alors progressivement la solution de cadmium (ou de cuivre) libre dans la cellule polarographique qui contient déjà le complexant et l'aluminium dans un milieu tamponné maléique-maléate, (calcium), eau de pH=7.40.

L'apparition du pic du cadmium (à environ -0.7 V par rapport à l'ECS) ou du cuivre (à environ -0.2 V par rapport à l'ECS) nous permettra de déterminer la concentration du complexant libre, non lié à l'aluminium. Connaissant cette concentration et la concentration du complexant au départ, on en déduira la concentration de chélateur lié à l'aluminium. On opérera de la même façon à 37°C en plaçant les cellules polarographiques contenant l'aluminium, le complexant, (le calcium) et la solution tamponnée maléique-maléate au bain-marie pendant 30 minutes environ.

Dans le cas de composés possédant leur propre pic polarographique, la méthodologie sera différente. Il s'agit alors d'un dosage direct car ces molécules sont électroactives. Le chélateur sera alors placé dans la cellule polarographique avec l'eau, le tampon (et le calcium). On fait alors défiler les potentiels jusqu'à apparition du pic du composé. On ajoute alors

progressivement la solution d'aluminium jusqu'à disparition du pic du chélateur. Le point d'équivalence correspondra alors à la quantité d' Al^{3+} nécessaire à la disparition complète du pic du chélateur.

NB: Parfois, la disparition du pic du chélateur est concomitante à l'apparition d'un pic du complexe chélateur-aluminium légèrement décalé sur l'échelle des potentiels.

. *Mode opératoire (excepté pour le dosage direct).*

On travaille sur des échantillons de 40 ml afin que la cellule polarographique soit suffisamment remplie pour permettre un bon contact entre solution et électrodes.

Ces 40 ml se répartiront comme suit:

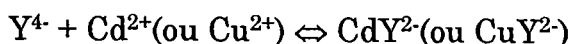
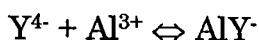
. 38 ml d'eau supra pure (ou 38 ml d'une solution aqueuse contenant du calcium à 100 mg.l^{-1}).

. 2 ml de tampon maléique-maléate (1 M) de $\text{pH}=7.40$.

. 20 μl de complexant (M/27) soit une concentration finale dans la solution de $2.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$.

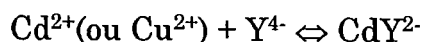
On ajoute alors progressivement la solution de cadmium ou de cuivre (1 g.l^{-1}) de 10 μl en 10 μl jusqu'à obtention du pic caractéristique, d'une hauteur d'une dizaine de centimètres (figure 5) afin de déterminer le point d'équivalence (figure 6).

En résumé, si Y^{4-} est le complexant, on aura:



or les concentrations $[\text{Y}^{4-}]_{\text{départ}}$ et $[\text{Al}^{3+}]_{\text{départ}}$ sont connues.

Y^{4-} se complexe plus ou moins avec Al^{3+} selon une certaine cinétique. Il reste donc du Y^{4-} libre que l'on dose par Cd^{2+} ou Cu^{2+} selon la réaction instantanée:



Or les constantes de stabilité de AlY^- et de CdY^{2-} (ou CuY^{2-}) étant du même ordre de grandeur, Cd^{2+} (ou Cu^{2+}) ne déplacera pas Al^{3+} de son complexe (LOURIE, 1975).

La partie complexée à l'aluminium sera: $[\text{Y}^{4-}]_{\text{départ}} - [\text{Y}^{4-}]_{\text{libre}}$.

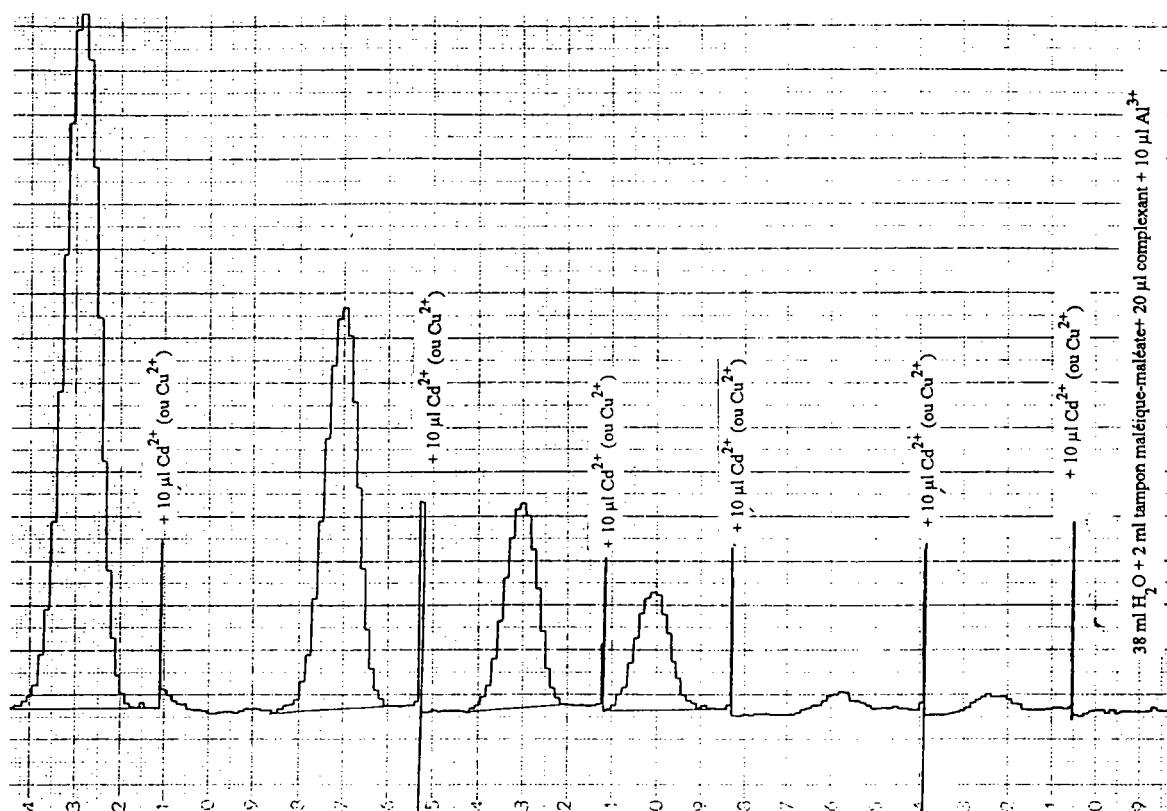


Figure 5: Exemple de polarogramme.

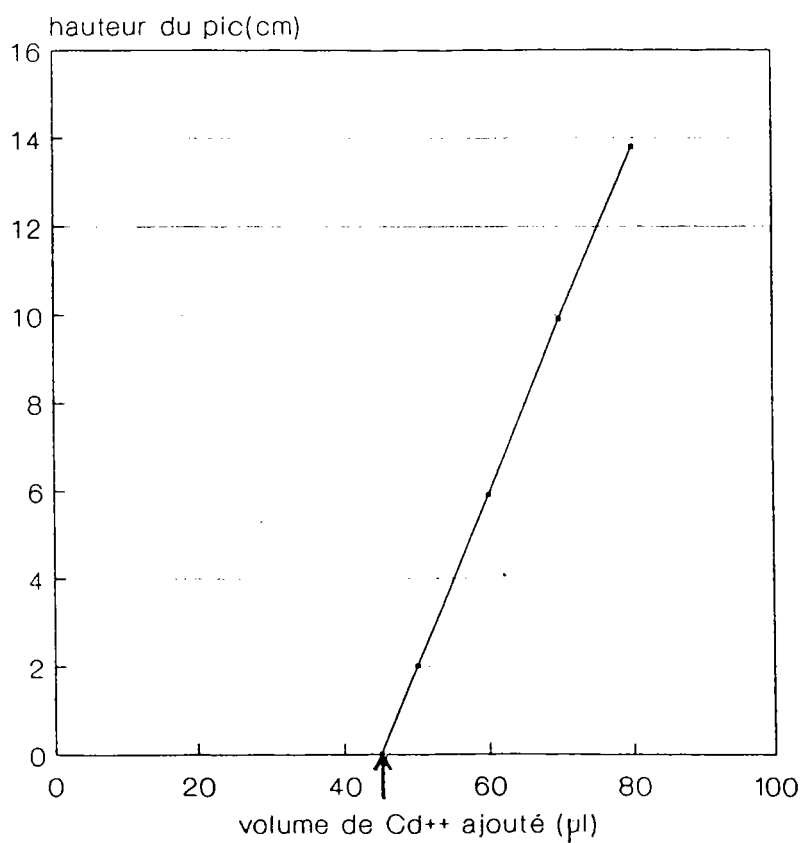


Figure 6: Exemple de détermination du point d'équivalence.

Connaissant la concentration $[Al^{3+}]_{\text{départ}}$, on déduira le pourcentage d' Al^{3+} complexé:

$$\% \text{ d'aluminium complexé} = \left(([Y^{4-}]_{\text{départ}} - [Y^{4-}]_{\text{libre}}) / [Al^{3+}]_{\text{départ}} \right) \times 100$$

NB : . On utilise le tampon maléique-maléate car il complexe l'aluminium de manière négligeable à l'opposé d'autres tampons (phosphate, ...).

. La concentration en calcium de la solution est équivalente à celle rencontrée dans le plasma, à savoir 100 mg.l^{-1} . Ce calcium est susceptible d'être très partiellement complexé par les chélateurs utilisés, au détriment de l'aluminium.

2.2. Action des chélateurs sur l'aluminium complexé aux protéines sériques.

Tous nos travaux ont été effectués avec du sang de bovin, fraîchement prélevé aux abattoirs de Metz, recueilli dans des flacons en polypropylène. Ce sang peut être récupéré sans aucune adjonction, contrairement au sang humain que nous proposait gracieusement le CRTS de Nancy (Centre Régional de Transfusion Sanguine) dans lequel est placé, au moment du prélèvement, un anticoagulant (type EDTA ou citrate) qui gênerait la fixation de l'aluminium sur les protéines plasmatiques.

Après le prélèvement, on laisse coaguler le sang pendant 6 à 10 heures à température ambiante. On récupère le surnageant que l'on centrifuge à 3000 g pendant 5 minutes. On recueille ainsi le sérum, qui contient de l'aluminium naturellement ($22 \pm 4 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$; GRAFF, 1992), sur lequel s'effectuera nos essais.

Tout d'abord, il s'agit de surcharger le sérum en aluminium. Pour cela, on prend un volume déterminé de sérum que l'on va surcharger en aluminium à raison de $200 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ (concentration rencontrée couramment dans le plasma de patient dialysé). On ajoute le volume adéquat de solution aluminique (100 mg.l^{-1}) au sérum et on place au bain-marie 37°C pendant 30 minutes afin de permettre la fixation de l'aluminium aux protéines sériques (GRAFF, 1992). Ensuite, pour chaque chélateur, on prépare des tubes Centrisart contenant chacun du sérum surchargé en aluminium (2.5 ml) et de complexant à diverses concentrations. Dans le sérum contenant l'aluminium fixé aux protéines, on introduit le complexant que l'on laisse agir pendant 45 minutes au bain-marie 37°C . Après passage au congélateur

pour ralentir au maximum la réaction de complexation, on centrifugera chaque tube à 3000g pendant 1 heure 30. Dans les tubes Centrisart (masse de rupture 10000 daltons, donc ne laissant pas passer les principales protéines sériques complexantes), sous l'effet de la force centrifuge, le petit tube supérieur a tendance à s'enfoncer, obligeant le liquide à passer au travers d'une membrane sélective (sélective des masses). On récupère ainsi dans le tube supérieur du liquide contenant l'aluminium complexé aux chélateurs (figure 7).

On dose alors l'aluminium dans l'ultrafiltrat par SEA. La concentration retrouvée est comparée à celle d'un tube témoin contenant uniquement du sérum surchargé (sans chélateur) et ainsi, par différence, on peut déterminer la concentration d'aluminium mobilisée par les chélateurs.

La quantité de départ pour tous les complexants sera équivalente à celle utilisée dans la posologie du tétracémate calcique dissodique ($\text{Na}_2\text{Ca EDTA}$) et extraite du dictionnaire VIDAL, c'est à dire $4.88 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$. Compte-tenu de la concentration élevée de DFO utilisée dans les médicaments des intoxications aluminiques (jusqu'à $18.2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$), on augmentera progressivement la concentration du chélateur testé:

- . $4.88 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$
- . $9.76 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$
- . $14.64 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ (GRAFF, 1992)
- . $19.52 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$
- . $4.88 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$
- . $9.76 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$

Compte-tenu du coût de cette expérimentation, seuls les composés possédant un intérêt (nouveau ou fort pouvoir chélateur) lors des essais polarographiques seront testés par cette méthode.

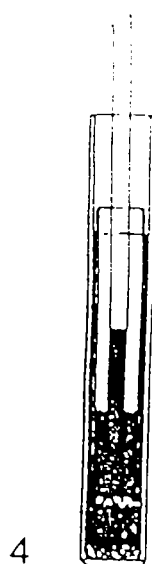
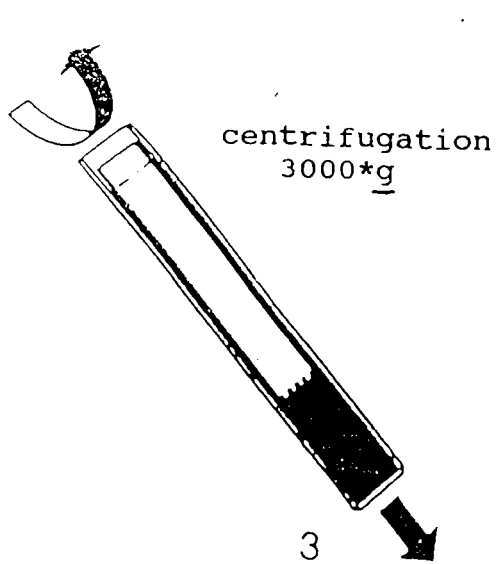
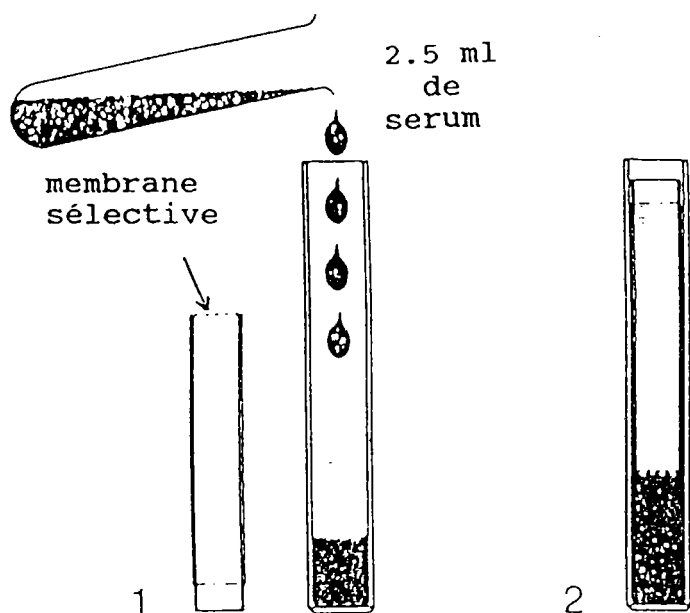


Figure 7: Principe de l'ultrafiltration sur tube Centrisart.

3. RESULTATS.

3.1. Complexation de l'aluminium dans l'eau.

Plusieurs composés ont permis un dosage polarographique direct; il s'agit:

. EDDHA: pic à -0.35 V par rapport à l'ECS et pic du complexe EDDHA-aluminium à -0.46 V/ECS.

. HBED: pic à -0.26 V/ECS et pic du complexe à -0.28 V/ECS.

. 1,4,10-trioxa-7,13-diazacyclopentadecane: pic à -0.45 V/ECS.

. 2,3,5-triméthylpyrazine: pic à -0.36 V/ECS.

. 2,4,5-trihydroxypyrimidine: pic à -0.61 V/ECS.

. HABA: deux pics à -0.30 et -0.70 V/ECS.

. Hypoxanthine: pic à -0.70 V/ECS.

. 2-hydroxybenzimidazole: pic à -0.6 V/ECS.

La capacité du NTA, de l'acide citrique et de l'HAES à complexer l'aluminium a été déterminée par dosage en retour par le cuivre alors que pour les autres composés, on a utilisé le dosage en retour par le cadmium.

A. A température ambiante

. *Sans calcium.*

Plusieurs composés présentent aucun pouvoir chélateur vis à vis de l'aluminium:

. 1,4,10-trioxa-7,13-diazacyclopentadecane.

. 2,3,5-triméthylpyrazine.

. acide pipecolinique.

. guanosine.

. HABA.

. hypoxanthine.

. acide 2,4-dihydroxypyrimidine-5-carboxylique.

. 2-hydroxybenzimidazole.

. 2,4,5-trihydroxypyrimidine.

De plus, comme le DFO et l'acide tartrique ne donnent pas, ni avec le cadmium, ni avec le cuivre, de complexes électroactifs dans le domaine de potentiels utilisables (dans les conditions de l'expérience; concentrations insuffisantes), l'évaluation de leur pouvoir chélateur dans l'eau n'a pu être effectuée.

Les autres résultats concernant les chélateurs sont présentés dans la figure 8.

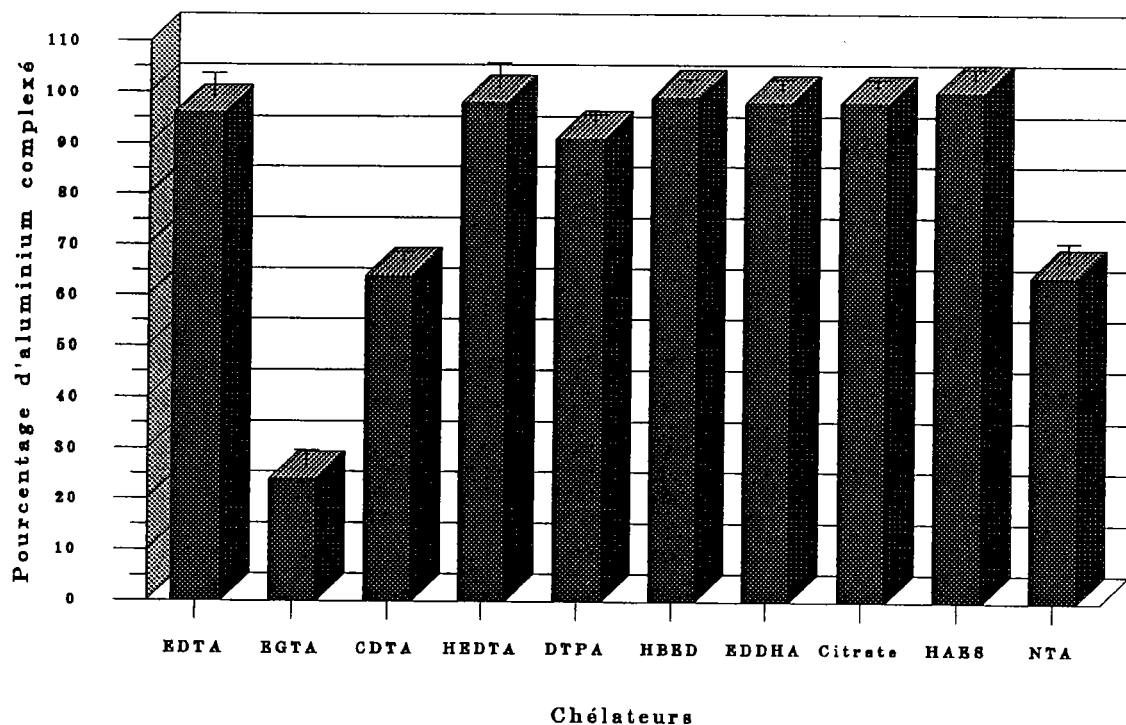


Figure 8: Complexation de l'aluminium dans l'eau à 20°C (n=6).

On observe que la majorité des chélateurs testés ont un pouvoir complexant vis à vis de l'aluminium quasiment maximum (environ 100%). Seuls l'EGTA, le CDTA et le NTA ne démontre pas un pouvoir chélateur maximal.

. En présence de calcium.

Les résultats obtenus après ajout du calcium sont représentés sur la figure 9. On constate qu'un certain nombre de complexants voient leur efficacité fortement diminuée par l'apport de calcium; il s'agit de l'EDTA, du CDTA, de l'HEDTA, du DTPA et de l'HAES ($P < 0.01$). L'efficacité des autres chélateurs n'est pas affectée par le calcium.

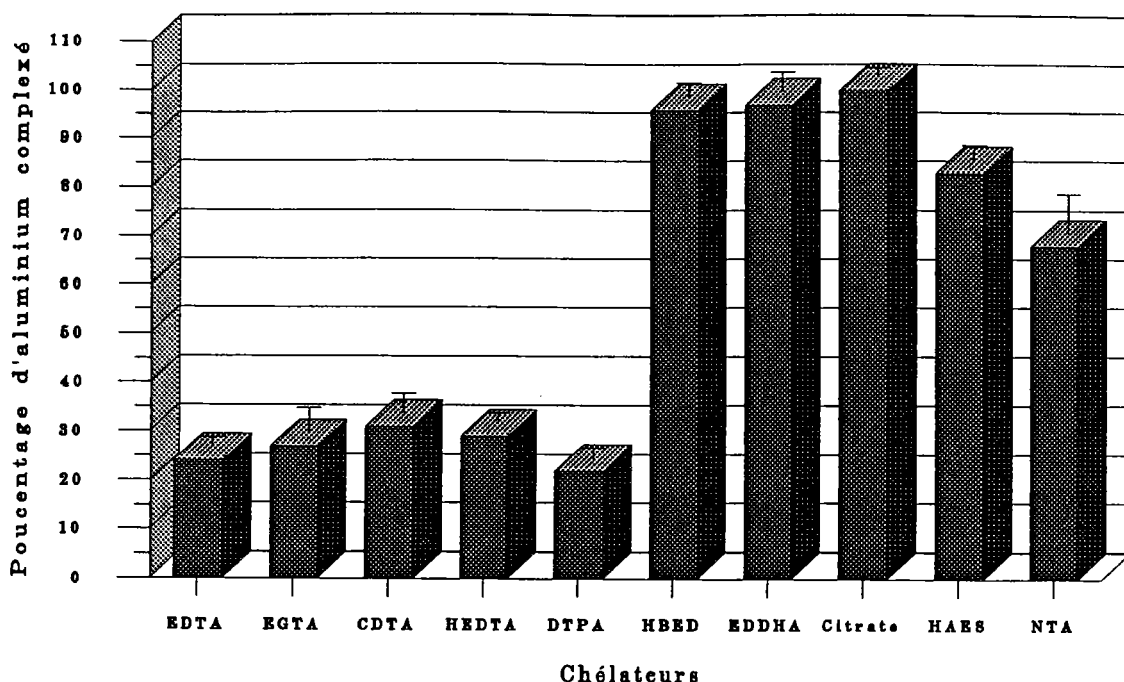


Figure 9: Complexation de l'aluminium dans l'eau à 20°C et en présence de calcium (n=6).

B. A 37°C.

. *Sans calcium.*

La figure 10 fait apparaitre que le pouvoir chélateur de la majorité des composés restent inchangé par une élévation de température. En effet, le pourcentage d'aluminium complexé reste invariable après le passage de 20 à 37°C. Seuls le NTA et l'EGTA voient leur efficacité légèrement augmentée mais pas de manière significative ($P>0.05$) alors que le pourcentage d'aluminium complexé par le CDTA passe d'environ 65% à environ 100% d'aluminium complexé ($P<0.01$).

. *En présence de calcium.*

Sur la figure 11, on observe les mêmes variations que sur la figure 9, c'est à dire qu'un certain nombre de chélateurs voient leur efficacité fortement diminuée par l'apport du calcium. En effet, l'EDTA passe d'environ 100% d'aluminium complexé à environ 35% ($P<0.01$). On observe le même phénomène avec le CDTA. L'efficacité de l'HEDTA et du DTPA qui était fortement diminuée en présence de calcium à 20°C, n'est plus influencée par le calcium à 37°C (environ 100%; $P<0.01$).

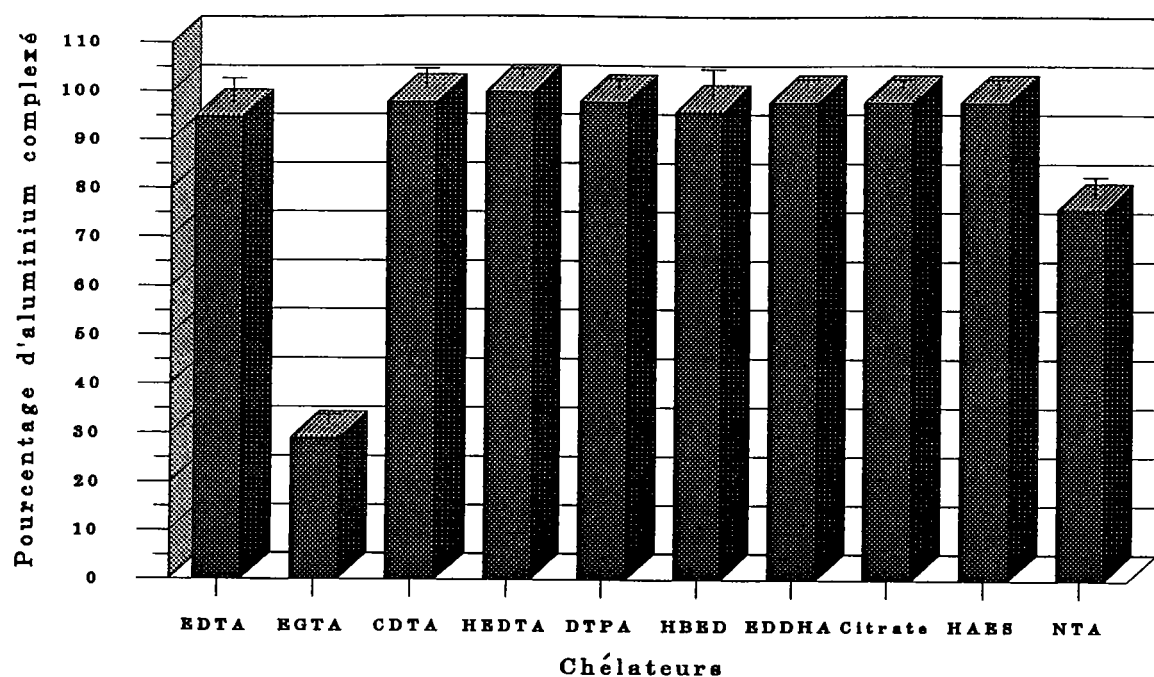


Figure 10: Complexation de l'aluminium dans l'eau à 37°C (n=6).

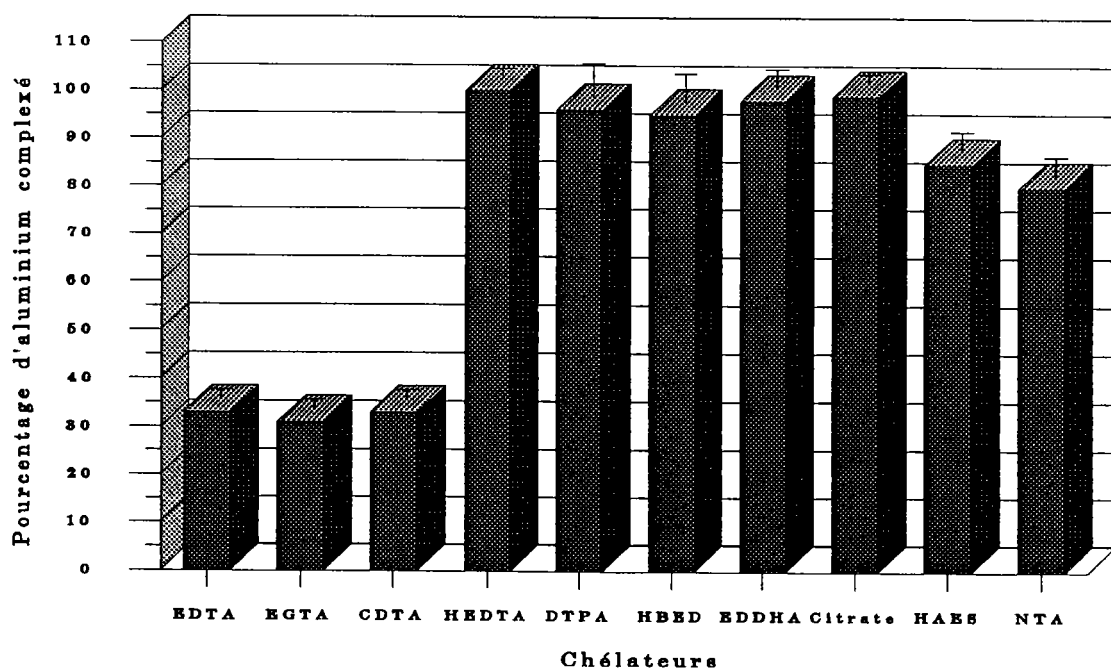


Figure 11: Complexation de l'aluminium dans l'eau à 37°C et en présence de calcium (n=6).

3.2. Capacité des différents chélateurs à mobiliser l'aluminium fixé aux protéines sériques.

Les molécules qui ne possédaient pas de pouvoir chélateur vis à vis de l'aluminium en milieu aqueux tamponné n'ont pas été retenues dans cette étude. Ainsi, les composés qui ont été testés sont:

. le CDTA	. l'EDDHA
. le DTPA	. l'HBED
. l'EDTA	. l'HAES
. l'EGTA	. l'acide citrique
. l'HEDTA	. l'acide tartrique
. le NTA	. le DFO

Les résultats obtenus pour les différentes concentrations apparaissent dans les figures (12,13 et 14).

Ces figures expriment le pourcentage d'aluminium mobilisé par les différents chélateurs utilisés. La capacité à mobiliser l'aluminium fixé aux protéines sériques est maximale pour plusieurs composés: DFO, HEDTA, DTPA, EDDHA, HBED. Suivant les molécules, l'efficacité maximale a été obtenue pour différentes concentrations; $3 \cdot 10^{-3}$ M pour le DFO et l'EDDHA, $7 \cdot 10^{-3}$ M pour l'HEDTA, 10^{-2} M pour le DTPA et l'HBED.

Pour l'EDTA, le CDTA et l'acide tartrique, le pourcentage d'aluminium mobilisé est corrélé linéairement à la concentration en chélateur mais à la concentration de 10^{-2} M celui-ci n'excède pas 70-80%. Le NTA et l'EGTA apparaissent comme les chélateurs les moins efficaces; à la concentration de 10^{-2} M, ils ne mobilisent respectivement que 35 et 30% de l'aluminium fixé aux protéines. L'acide citrique et l'HAES présentent une capacité maximale de chélation respectivement de 80 et 60% à la concentration de 10^{-2} M; de plus, à partir d'une concentration équivalente à $3 \cdot 10^{-3}$ M, l'efficacité de ces deux composés est déjà maximale et l'élévation de la concentration n'entraîne plus d'augmentation de la mobilisation de l'aluminium.

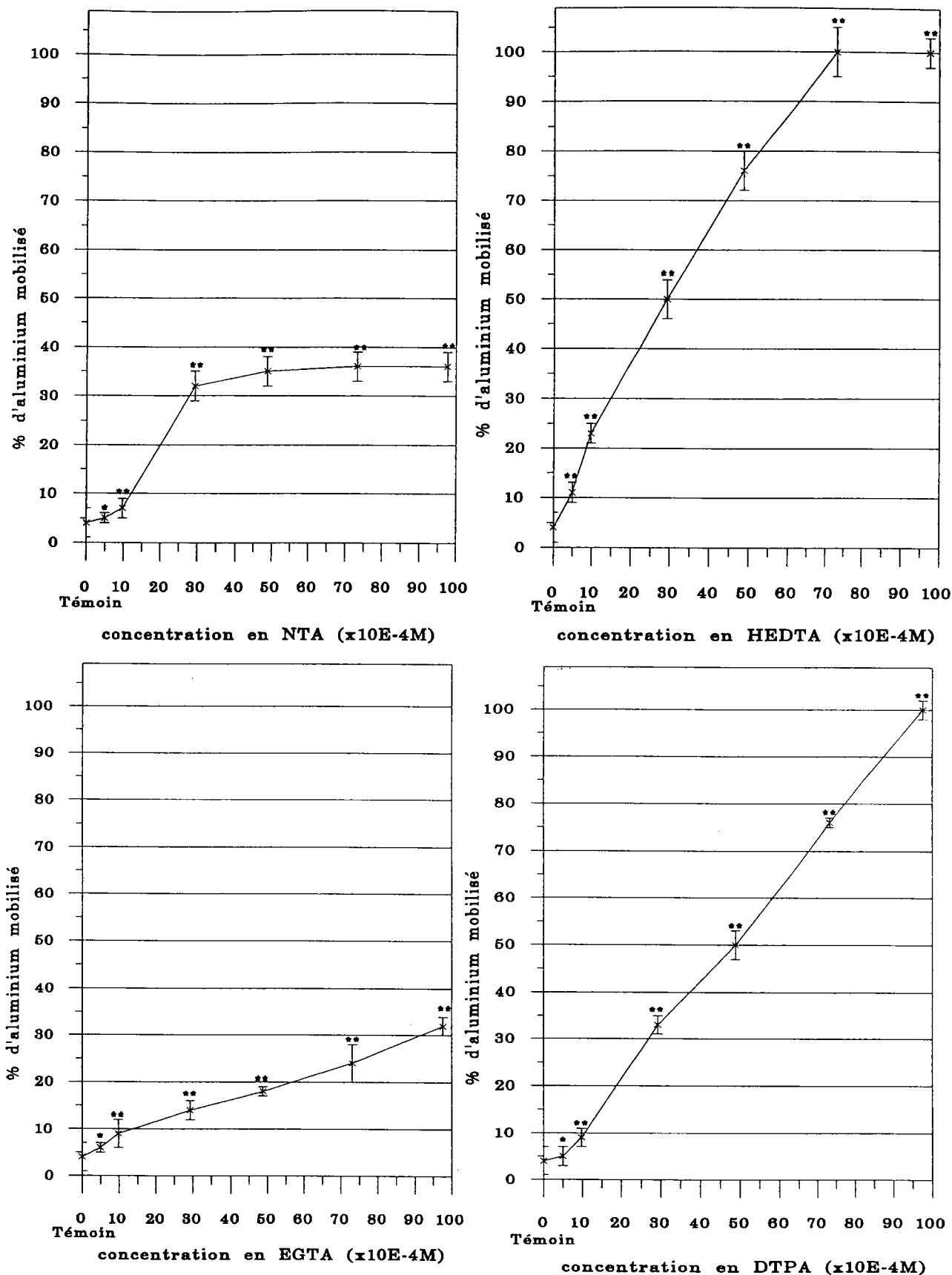


Figure 12: Action du NTA, de l'HEDTA, de l'EGTA et du DTPA sur l'aluminium fixé aux protéines sériques (n=6).

* significativement différent du témoin: $P < 0.05$.

** significativement différent du témoin: $P < 0.01$.

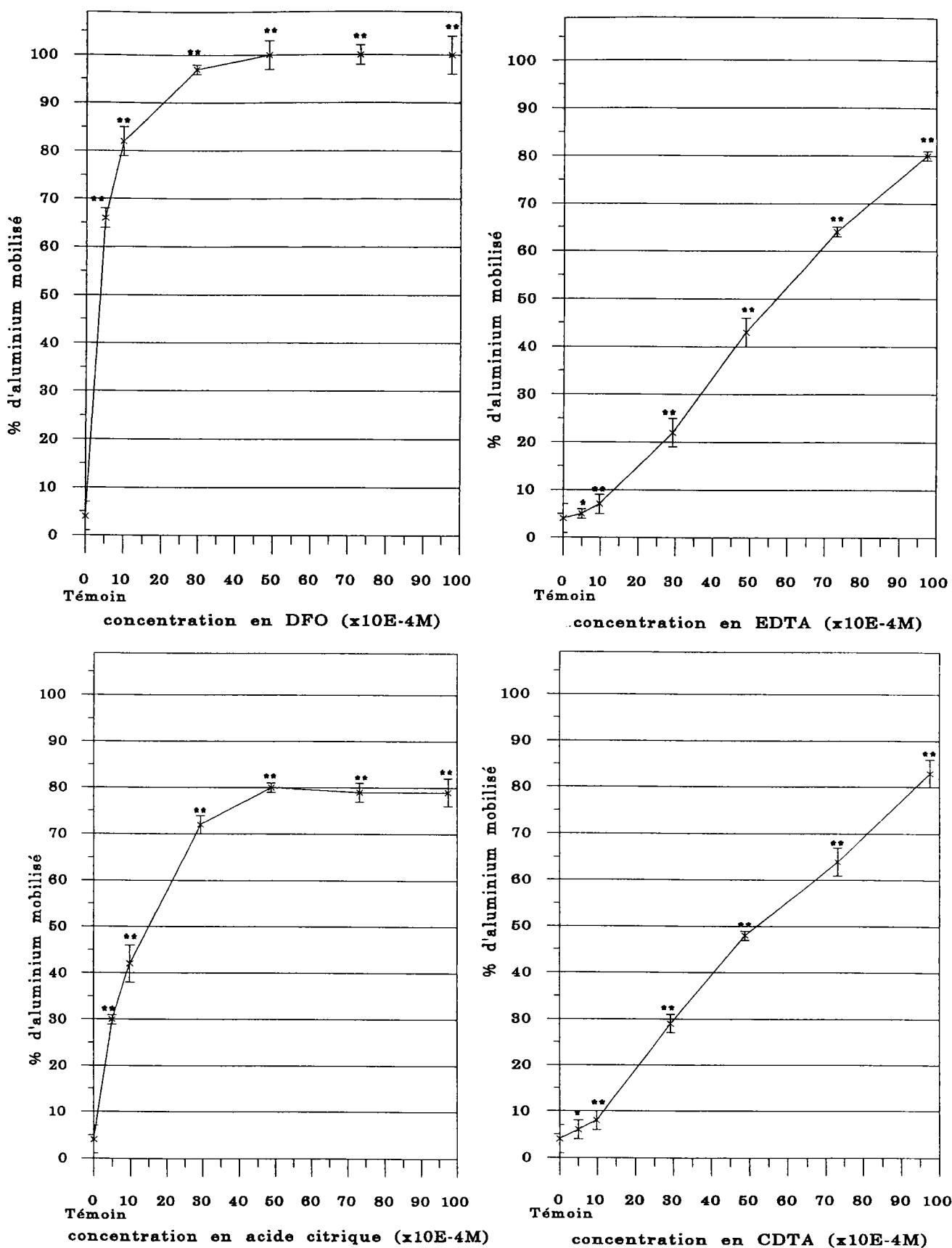


Figure 13: Action du DFO, de l'EDTA, de l'acide citrique et du CTPA sur l'aluminium fixé aux protéines sériques (n=6).

* significativement différent du témoin: $P < 0.05$.

** significativement différent du témoin: $P < 0.01$.

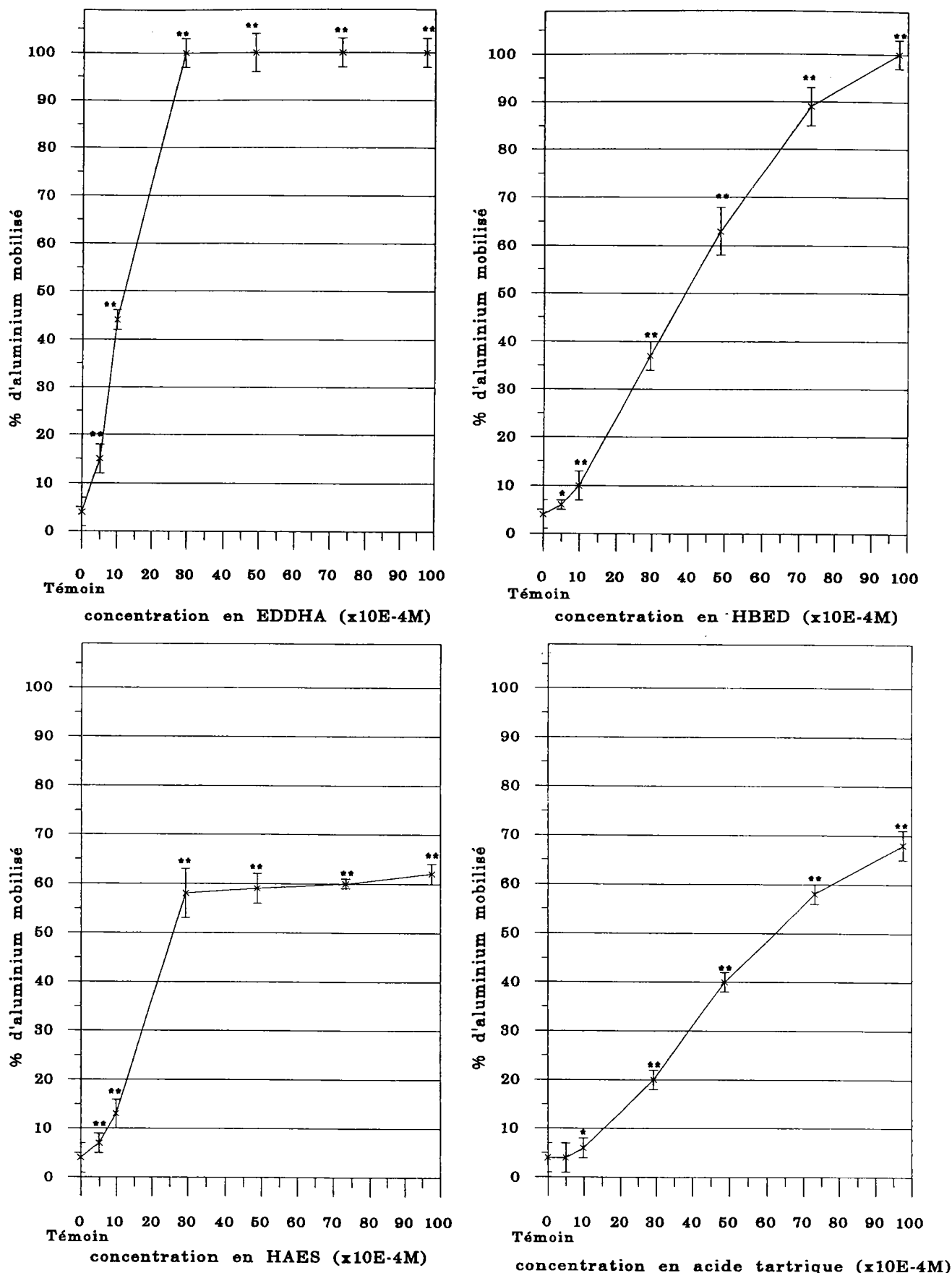


Figure 14: Action de l'EDDHA, de l'HBED, de l'HAES et de l'acide tartrique sur l'aluminium fixé aux protéines sériques (n=6).

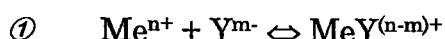
* significativement différent du témoin: P<0.05.

** significativement différent du témoin: P<0.01.

4. CONCLUSION-DISCUSSION.

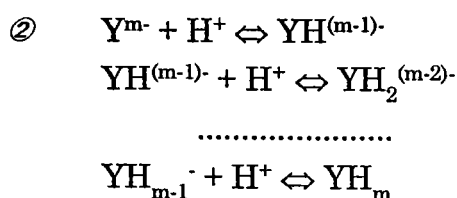
Cette étude permet l'évaluation du potentiel complexant de certaines molécules vis à vis de l'aluminium par des techniques *in vitro*.

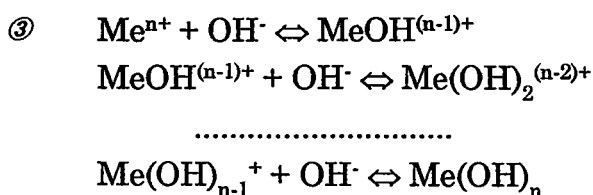
La méthode polarographique permet l'étude de la chélation de l'aluminium (ou d'autres métaux) par différents composés de manière relativement rapide et à un moindre coût. De plus, l'étude des constantes de stabilité des différents chélateurs (quand elles sont connues) ne permet pas à elle seule de justifier de manière suffisamment fiable le choix des différentes molécules. En effet, les constantes de stabilité ($\log K$) sont largement utilisées en chimie analytique pour déterminer les meilleurs composés utilisables en complexométrie. Les agents complexants sont utilisés depuis longtemps en analyse (Cyanimétrie). Les constantes de stabilité ont ainsi pu être déterminées pour de nombreux chélateurs. Malheureusement, certains facteurs influencent grandement les phénomènes de complexation. En effet, considérons la réaction de chélation entre le cation Me^{n+} et le chélateur symbolisé par Y^{m-} :



en admettant que le chélate correspond à un rapport métal/Y = 1, ce qui représente un cas assez répandu (EDTA, HEDTA, etc ...). Cet équilibre est défini par une constante d'équilibre qui peut être la constante de stabilité ou au contraire la constante d'instabilité. Dans notre étude, nous nous sommes basés sur les constantes de stabilité.

Dans le cas de l'EDTA, $\log K = 16.1$ pour Al^{3+} et 10.7 pour Ca^{2+} et pour l'HEDTA, $\log K = 14.0$ pour Al^{3+} et 8.0 pour Ca^{2+} . Ces constantes de stabilité sont des constantes absolues car elles ne tiennent pas compte des possibilités de complexation secondaire des anions Y^{m-} avec les ions H^+ et des cations Me^{n+} avec les ions OH^- . Ces réactions secondaires, qui sont en compétition avec la réaction principale $\textcircled{1}$, sont défavorables à cette réaction. Elles ont donc tendance à affaiblir la constante de stabilité du chélate $MeY^{(n-m)+}$. Elles correspondent aux réactions suivantes:



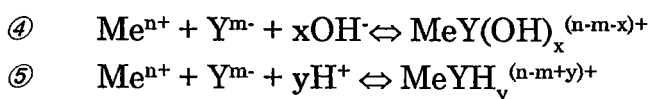


Selon les propriétés chimiques du cation Me^{n+} , de sa concentration et du pH de la solution, il pourra se former plusieurs complexes hydroxydés mononucléaires. De plus, suivant le pH et la concentration de Me^{n+} , il peut se former parfois des complexes hydroxydés polynucléaires du type $\text{Me}_x(\text{OH})_y^{(nx-y)+}$ (RINGBOM, 1967).

L'aluminium est capable de former des complexes mononucléaires et polynucléaires lorsqu'il est en concentration forte (par exemple 10^{-2} M). A concentration très faible (de l'ordre de 10^{-5} M comme dans notre cas), l'aluminium ne forme plus que des complexes mononucléaires.

Le calcium, dans le domaine de pH qui nous concerne, ne forme pas de complexes hydroxydés (RINGBOM, 1967).

Mais à la réaction de chélation $\textcircled{1}$, peuvent venir s'ajouter des réactions de formation de complexes mixtes (contenant Me^{n+} , Y^{m-} et $x\text{OH}^-$ ou Me^{n+} , Y^{m-} et $y\text{H}^+$) selon les équations:



Ces réactions $\textcircled{4}$ et $\textcircled{5}$ stabilisent au contraire la réaction de chélation $\textcircled{1}$. Elles ont donc tendance à conforter la constante de stabilité.

La constante de stabilité K' , appelée constante effective, conditionnelle ou apparente, qui tient compte de l'influence des différentes réactions $\textcircled{2}$, $\textcircled{3}$, $\textcircled{4}$, $\textcircled{5}$ prend donc une certaine valeur qui pourra nous renseigner sur l'importance de la chélation dans des conditions expérimentales précises. Ainsi, il existe plusieurs facteurs pouvant influencer les constantes de stabilité.

. Influence des réactions ② sur la constante de stabilité du complexe dans le cas de l'EDTA et de l'HEDTA, à pH = 7.40.

Le logK va perdre 3.0 unités pour l'EDTA et 2.4 unités pour l'HEDTA (RINGBOM, 1967).

. Influence des réactions ③ sur la constante de stabilité du complexe dans le cas d' Al^{3+} et de Ca^{2+} .

A pH = 7.40 et à concentration forte en Al^{3+} , par suite de la formation de complexes polynucléaires, le logK perd 7.0 unités. Pour le même pH mais si la concentration en Al^{3+} est très faible, il ne se formera que des complexes hydroxydés mononucléaires, aussi l'abaissement du logK sera bien inférieur à 7.0.

Néanmoins, il est très difficile de calculer cette variation, compte-tenu de l'incertitude concernant la nature exacte des complexes hydroxydés mononucléaires à cette très faible concentration.

Si on admettait la formation unique de $AlOH^{2+}$, l'abaissement serait de 2.4 unités. On peut donc penser que l'abaissement se situera entre 2.4 et 7.0.

Concernant l'ion calcium, il n'y a pas d'influence à pH = 7.40 puisqu'à ce pH, il ne se forme pas de complexes hydroxydés.

. Influence de la formation de complexes mixtes selon les réactions ④ et ⑤ sur la constante de stabilité.

A pH = 7.40, avec l'EDTA comme chélateur, l'augmentation du logK est de l'ordre de 1.5, si la concentration est forte (par exemple 10^{-2} M). Dans le cas de l'HEDTA, nous ne possédons pas suffisamment de données nous permettant de la calculer.

En résumé, à pH = 7.40:

. Pour le complexe Al-EDTA:

. Si la concentration est forte (10^{-2} M), le $\log K = 7.6$.

. Si la concentration est très faible (de l'ordre de 10^{-5} M),

$$\begin{array}{ccc} 6.1 + \text{influence de} & & 10.7 + \text{influence de} \\ \text{la formation des} & < \log K' < & \text{la formation des} \\ \text{complexes mixtes} & & \text{complexes mixtes} \end{array}$$

. Pour le complexe Al-HEDTA:

. Si la concentration est forte (10^{-2} M);

$\log K' = 4.6 + \text{influence de la formation des complexes mixtes}$.

. Si la concentration est très faible (de l'ordre de 10^{-5} M);

$$\begin{array}{ccc} 4.6 + \text{influence de} & & 9.2 + \text{influence de} \\ \text{la formation des} & < \log K' < & \text{la formation des} \\ \text{complexes mixtes} & & \text{complexes mixtes} \end{array}$$

. Pour le complexe Ca-EDTA:

. $\log K' = 7.7$

. Pour le complexe Ca-HEDTA:

. $\log K' = 5.6$

A pH = 7.40, si les concentrations des réactifs sont fortes (de l'ordre de 10^{-2} M), les constantes de stabilité effectives K' de l'EDTA avec l'aluminium et de l'EDTA avec le calcium sont très voisines. En milieu très dilué, la constante de stabilité K' du complexe aluminium-EDTA devient très supérieure à celle du complexe calcium-EDTA. Néanmoins, comme la concentration en calcium est plus de cent fois supérieure à celle de l'aluminium, on constate, à 20°C comme à 37°C, que la chélation de l'aluminium par l'EDTA est très limitée (rendement < 40%). En ce qui concerne le complexe Al-HEDTA, nous devons obtenir des résultats tout à fait comparables à ceux obtenus pour le complexe Al-EDTA. Or s'il en est ainsi à 20°C, à 37°C, nous obtenons des résultats tout à fait surprenants puisque la réaction de complexation de l'aluminium par l'HEDTA est pratiquement totale.

Ce résultat ne peut s'expliquer que par la formation de complexes mixtes Al-HEDTA-OH très stables qui augmente considérablement la constante de stabilité K' .

Pour ce qui est de la cinétique de la complexation de l'EDTA avec Al^{3+} , cette réaction n'est rapide qu'aux fortes concentrations (10^{-2} M) et à $3.5 < pH < 4$. Au de là de $pH=4$, à cause de la formation de complexes hydroxydés polynucléaires, la réaction devient lente et il est nécessaire de chauffer énergiquement pour obtenir une réaction complète (RINGBOM, 1967). A $pH=7.40$, logiquement, l'obtention d'une réaction rapide aurait du nécessiter un chauffage. Or, dans ces conditions expérimentales, on constate que la réaction est également rapide. Ceci s'explique par le fait que l'on travaille en milieu très dilué et que dans de telles conditions, il ne se forme pas de complexes hydroxydés polynucléaires qui ralentissent la réaction.

La technique par ultrafiltration associée à l'analyse par SEA-DCP peut mettre en évidence la capacité des différentes molécules à mobiliser l'aluminium préalablement fixé aux protéines sériques. En effet, 50 à 90% de l'aluminium sanguin serait lié aux protéines (SKALSKY et CARCHMAN, 1983; BURNATOWSKA-HLEDIN et coll., 1985) et seulement 20% du métal resterait sous forme ultrafiltrable (STUMMVOLL et coll., 1984; HARRIS, 1992). Ainsi, la capacité des différents chélateurs à mobiliser l'aluminium *in vitro* devrait refléter le potentiel complexant *in vivo*. C'est pour cette raison que nous avons mené l'étude sur le sérum. Les principales protéines impliquées dans la complexation de l'aluminium sont la transferrine et l'albumine (TRAPP, 1983; BERTHOLF et coll., 1984; VAN GINKEL et coll., 1990).

L'étude polarographique a permis de mettre en évidence que:

. la capacité de chélation de certains composés (HBED, EDDHA et acide citrique) est forte et ne dépend pas de certaines conditions expérimentales (calcium, température).

. La présence du calcium peut réduire l'efficacité d'autres molécules (EDTA et HAES) .

. La température de 37°C peut favoriser le potentiel complexant ou accélérer la cinétique de chélation même en présence de calcium (HEDTA et DTPA) ou en son absence (CDTA).

Les études menées par ultrafiltration ont permis les conclusions suivantes:

.Parmi les acides polyaminocarboxyliques (CDTA, DTPA, EDTA, EGTA et HEDTA), l'EGTA semble être dénuer de tout intérêt. Ainsi, ce composé ne parvient pas à mobiliser des quantités appréciables d'aluminium malgré une constante de stabilité ($\log K$) de 13.9 (BHAT et coll., 1967).

Malgré des constantes de stabilité relativement élevées (respectivement 16.1 et 17.6; RINGBOM, 1967), l'efficacité de l'EDTA et du CDTA augmente lentement d'une manière quasi linéaire pour atteindre environ 80% à la concentration de 10^{-2} M.

Le DTPA ($\log K=18.7$; YOKEL, 1994) se comporte comme l'EDTA et le CDTA, mais il parvient à mobiliser la totalité de l'aluminium à une concentration de 10^{-2} M. De plus, l'efficacité du DTPA diminue en fonction du temps de contact (ANDERSEN, 1989; résultats vérifiés par nous-même). Cette diminution de l'efficacité du DTPA est à relier avec la dégradation de la molécule en fonction du temps passé à 37°C ou à des complexations compétitives (en fonction du temps) avec d'autres métaux présents dans le sérum. De plus, sa forte affinité pour le zinc diminue son intérêt thérapeutique (PORTER et coll., 1989).

L'HEDTA présente des perspectives intéressantes, malgré une constante de stabilité de valeur moyenne, $\log K=14$ (BHAT et coll., 1967). En effet, il est capable de mobiliser des quantités non négligeables d'aluminium sérique même à des concentrations relativement faibles.

. Les acides carboxyliques, citrique et tartrique, semblent posséder une efficacité modérée (70 à 80% d'aluminium mobilisé à la plus forte concentration testée). Pourtant, DOMINGO et coll. (1986 et 1988) suggèrent que l'acide citrique pourrait être utilisé comme chélateur de l'aluminium. Le citrate présente cependant un inconvénient majeur; son administration orale entraîne une élévation de l'absorption intestinale de l'aluminium et

ainsi peut favoriser sa distribution au sein des différents tissus (MOLITORIS et coll., 1989). Par conséquent, son utilisation thérapeutique devrait être limitée.

La faible capacité du NTA à chélater l'aluminium peut s'expliquer par sa médiocre affinité pour le cation aluminique (Al^{3+}) ($\log K = 11.1$; BHAT et coll., 1967) comparée à l'affinité de la transferrine pour ce même cation Al^{3+} ($\log K_1 = 12.9$ et $\log K_2 = 12.3$; MARTIN et coll., 1987).

. L'HAES, un dérivé de l'acide citrique, semble posséder les mêmes caractéristiques.

. Les acides phénylcarboxyliques (HBED et EDDHA) présentent des capacités de chélation vis à vis de l'aluminium intéressantes. L'HBED se comporte comme le DTPA malgré une constante de stabilité nettement supérieure ($\log K = 24.8$; RAJAN et coll., 1981). Malheureusement, la présence des deux fonctions carboxyliques dans la molécule d'HBED lui confère une forte affinité pour le zinc, calcium et magnésium (L'EPLATTENIER et coll., 1967). Par conséquent, l'HBED devrait posséder les mêmes effets secondaires que le DTPA, c'est à dire réduction des réserves de zinc (PORTER et coll., 1989).

L'EDDHA présente une efficacité similaire à celle du DFO, qui pourrait s'expliquer par la valeur importante de leur constante de stabilité (respectivement 24.5 et 22; RAJAN et coll., 1981).

Il faut encore noter qu'aux faibles concentrations en chélateur, le calcium peut influencer les réactions de complexation. Cependant, à une concentration de 10^{-2} M, l'influence du calcium ($2.5 \cdot 10^{-3}$ M) devient négligeable. De plus, les faibles différences rencontrées entre les constantes de stabilité (toutes relativement élevées) ne peuvent expliquer à elles seules les variations d'efficacité observées entre les différents composés. Ces variations proviennent certainement des différences de mécanismes réactionnels relatifs aux cinétiques de transfert de l'aluminium entre transferrine et chélateur.

Compte-tenu des résultats obtenus dans cette étude *in vitro*, il semble intéressant de poursuivre la recherche *in vivo* avec certains composés afin de vérifier que l'efficacité à complexer l'aluminium reste identique dans les conditions physiologiques.

Ainsi, l'EGTA, le NTA, le CDTA ne seront pas retenus à cause de leur trop faible efficacité. Le DTPA, malgré sa bonne capacité de chélation vis à vis de l'aluminium *in vitro*, ne présente pas d'intérêt parce qu'il est mal distribué au sein des tissus et reste extracellulaire (HERSHKO et coll., 1978). De plus, il produit des réactions toxiques (PIPPARD et coll., 1986) et possède une trop forte affinité pour le zinc (PORTER et coll., 1989) pour qu'une application thérapeutique soit envisageable. Nous ne retiendrons ni l'HBED car il est toxique (PORTER et coll., 1989) ni l'acide citrique car il a été étudié par DOMINGO et coll. (1986 et 1988).

Par conséquent, nous retiendrons l'EDDHA, l'HAES, l'HEDTA et l'acide tartrique pour leur efficacité lors de l'étude *in vitro* ainsi que par la nouveauté qu'ils apportent. Compte-tenu des connaissances acquises à leur sujet, l'EDTA et le DFO serviront de référence.

DEUXIEME PARTIE

Etude de nouveaux chélateurs de l'aluminium chez le Rat préalablement intoxiqué au chlorure d'aluminium.

INTRODUCTION

Pour vérifier objectivement la capacité de chélation de nouveaux composés, il est indispensable de mettre en place un modèle animal capable de mettre en évidence d'une part, l'accumulation et la toxicité de l'aluminium, l'efficacité des nouvelles molécules à complexer l'aluminium au sein d'un organisme vivant d'autre part.

Il existe très peu de travaux concernant cette approche expérimentale. En effet, le traitement de l'intoxication aluminique n'ont débuté que dans les années 70 parce qu'avant cette époque, l'aluminium n'était pas directement reconnu comme toxique. Ainsi, des essais cliniques avec la D-penicillamine et le 2,3-dimercapto-1-propanol n'ont donné aucun résultat (BURKS et coll., 1976). De même, l'acide faible 2,3-DMSA (acide dimercaptosuccinique) ne protège pas la souris de la toxicité aigüe du chlorure d'aluminium (TING et coll., 1965).

C'est pourquoi, en 1983, MELOGRANA et YOKEL développent un modèle expérimentale chez le Lapin. Les animaux sont intoxiqués par du lactate d'aluminium à raison de 20 injections sous-cutanées de 0.6 mmole Al.kg⁻¹. Six à sept semaines après l'intoxication aluminique, des injections sous-cutanées de DFO (0.15 mmole.kg⁻¹) entraînent une élévation de la concentration aluminique sérique et de l'excrétion urinaire d'aluminium, démontrant ainsi l'efficacité du DFO à chélater l'aluminium chez l'animal. Des études similaires ont été effectuées chez le Rat par différents auteurs (VERBEELEN et coll., 1988; GIORDANO et coll., 1989; GREGER et POWERS, 1992) mettant en évidence l'efficacité du DFO à diminuer la surcharge aluminique osseuse, hépatique, ...

Utilisant le modèle de MELOGRANA et YOKEL (1983), YOKEL et KOSTENBAUDER (1987) ont testé plusieurs molécules chez le Lapin intoxiqué à l'aluminium. De même, DOMINGO et coll. (1986 et 1988) et LLOBET et coll. (1987) ont mis en place une étude de nouveaux chélateurs de l'aluminium chez la Souris et chez le Rat.

Il apparaît donc indispensable de tester *in vivo* les molécules que nous avons sélectionné. C'est pourquoi, nous avons mis en place un modèle animal permettant de vérifier le pouvoir complexant des différents composés. Nous avons effectué cette étude sur le Rat préalablement intoxiqué au chlorure d'aluminium. Les paramètres que nous avons étudiés sont:

. Evolution de la concentration aluminique dans le plasma et les organes cibles, et de l'excrétion urinaire d'aluminium après traitement par les différents chélateurs.

. Evolution des teneurs en éléments minéraux chez les animaux intoxiqués et traités.

1. MATERIEL ET METHODE.

1.1. Choix de la voie d'administration.

Nous avons choisi la voie intrapéritonéale. Cette voie de pénétration de l'aluminium dans l'organisme correspond à celle des patients dialysés par voie intrapéritonéale. Il faut noter que des administrations intraveineuses réitérées quotidiennement ne sont que très difficilement réalisables chez le Rat. De plus, l'administration orale par l'intermédiaire de la nourriture ou par gavage ne présente pas d'intérêt particulier pour cette étude; elle demande un protocole expérimentale très lourd qui ne s'imposait dans notre étude. En effet, une administration orale demande un contrôle journalier de la quantité de nourriture absorbée par les animaux. De plus, un tel mode d'intoxication ne permet en aucune manière de contrôler la quantité d'aluminium assimilée par les animaux. Par conséquent, il est très difficile de faire une comparaison entre les différents groupes car chaque animal n'aura pas fixé la même quantité d'aluminium.

Le choix s'est donc orienté vers des administrations du sel d'aluminium par voie intrapéritonéale qui permet le meilleur contrôle de la dose administrée aux animaux et absorbée par ces animaux. L'injection se fait directement dans l'organisme de l'animal et par conséquent, les pertes potentielles dues à différents problèmes de mal-absorption, de précipitation de l'aluminium dans la ration journalière, etc, sont ainsi minimisés.

1.2. Protocoles expérimentaux.

A. Protocole d'intoxication aluminique des animaux.

L'étude est réalisée sur des rats mâles de 200 ± 30 g. Le choix de rats mâles est basé sur l'inexistence de cycle oestral pouvant interférer sur les teneurs plasmatiques de différents éléments. Dans un premier temps, les animaux sont répartis en deux lots: un lot traité par du chlorure d'aluminium ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, PM = 241.43; ALDRICH) et un lot témoin. Ils seront placés individuellement dans des cages plastiques (43 x 28 x 15 cm). Le sel d'aluminium est dissous dans une solution de chlorure de sodium à 0.9%. Les animaux reçoivent une injection ip quotidienne d'un volume de

solution qui varie de 1 à 3 ml selon le poids. En effet, tout au long de l'intoxication, le poids des animaux va augmenter pour atteindre 300 à 400g à la fin de l'expérimentation. Par conséquent, il sera nécessaire de faire varier les volumes de solution (dans un rapport de 1 à 3 ml) à injecter de manière à garder une intoxication de $2 \text{ mg Al.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$. Tout au long du traitement, il faudra même modifier la concentration de la solution en aluminium afin de ne pas dépasser un volume de 3 ml car il serait inapproprié d'injecter des volumes trop conséquents aux animaux.

Les injections intrapéritonéales sont réalisées entre l'ombilic et l'aine, sur le côté gauche ou droit de l'animal à l'aide de seringues de 5 ml (TERUMO) munies d'aiguilles 0.5 x 16 mm (TERUMO) après désinfection de la zone cutanée par de l'alcool éthylique à 90°.

Les animaux du groupe traité reçoivent une injection intrapéritonéale quotidienne de 2 mg Al.kg^{-1} , cinq jours par semaine, pendant quatre semaines (solution de chlorure d'aluminium de $\text{pH} = 3.80 \pm 0.1$). La solution de chlorure d'aluminium est préparée à l'aide d'une solution de NaCl à 0.9%, à laquelle on ajoutera l'aluminium sous forme de chlorure. Les animaux du groupe témoin reçoivent un volume équivalent (1 à 3 ml selon leur poids) de solution physiologique (NaCl à 0.9% ajusté au $\text{pH}=3.80 \pm 0.1$). Les animaux des deux lots reçoivent l'eau et la nourriture standard (croquettes EXTRA LABO, Provins, France) *ad libitum*.

Les solutions destinées aux injections sont préparées extemporanément. Les variations de concentration de la solution aluminique ont permis d'administrer des volumes relativement constants de solution.

Il faut noter que le choix de cette dose est basé sur l'apparition de réponses inflammatoires (signes de péritonite) dans le cas de traitement à des doses plus élevées (MULLER, 1993).

B. Protocole de traitement des animaux par les différents chélateurs.

Après l'arrêt de l'intoxication aluminique, les animaux sont laissés au repos pendant 8 jours pour permettre l'évacuation de l'aluminium non fixé aux tissus. Après cette période de repos, les animaux sont divisés en 8 groupes (6 animaux par groupe): 1 groupe témoin (T), 1 groupe intoxiqué au chlorure d'aluminium mais non traité par un chélateur (Al) et 6 groupes traités avec les différents chélateurs (DFO, EDTA, HEDTA, HAES, EDDHA

et acide tartrique). Tous les animaux reçoivent quotidiennement une injection intrapéritonéale, 5 jours par semaine pendant 2 semaines. Le volume de cette injection ip (seringue de 3 ml, TERUMO, munie d'aiguille 0.5 x 16 mm, TERUMO) varie de 1 à 3 ml selon le poids de l'animal.

Chaque solution de chélateur est préparée dans du NaCl à 0.9% juste avant son administration. Les groupes traités reçoivent les solutions de chélateurs respectives alors que le groupe témoin et le groupe Al reçoivent un volume équivalent de liquide physiologique (NaCl à 0.9%).

La dose administrée a été arbitrairement fixée au quart de la DL₅₀ du produit le plus toxique, c'est à dire l'EDDHA (DL₅₀ = 175 mg.kg⁻¹ par voie ip chez le Rat); elle représente environ 40 mg.kg⁻¹. De plus, cette dose correspond à celle du DFO, utilisée fréquemment dans le traitement de l'accumulation aluminique chez les patients dialysés.

C. Collecte des urines.

La collecte des urines a été effectuée grâce à la mise en cage à diurèse de chaque animal. Avant le traitement chélateur ainsi qu'après la première, la troisième et la neuvième injections (J0, J1, J3 et J9), les urines de chaque animal ont été collectées de la manière suivante.

Après injection (ou non pour J0), les animaux sont placés dans les cages à diurèse (23 x 20 x 16 cm) pendant 24 heures et sans nourriture, afin d'éviter toute contamination des urines. L'eau de boisson est par contre distribuée *ad libitum*. Après collection, les urines sont centrifugées à 3000 g pendant 3 minutes (pour éliminer les impuretés: poils) puis on ajoute de l'acide nitrique (Supra pur, MERCK), à raison de 50 µl d'acide pour 5 ml d'urine, pour conserver en solution tous les éléments présents dans ces urines.

D. Sacrifice des animaux, prélèvements de sang, des organes et du fémur.

A la fin du traitement, 48 heures après la dernière injection de chélateur, les rats sont anesthésiés au pentobarbital sodique (50 mg.kg⁻¹).

Le prélèvement de sang est réalisé chez les rats par ponction intracardiaque à l'aide de seringue de 10 ml héparinée (TERUMO) munie d'aiguille héparinée (0.7 x 30, TERUMO). Le plasma est obtenu après avoir recueilli le sang dans des tubes héparinés qui sont centrifugés à 3000 g pendant 3 minutes.

Le foie, la rate, les reins et le cerveau des rats sont prélevés, pesés et solubilisés avant le dosage par SEA-DCP.

Le fémur droit est prélevé, en éliminant les muscles qui y adhèrent en prenant soin de ne pas entamer le périoste. L'os est alors placé dans un tube et séché pendant 24 heures à 70°C, avant d'être pesé.

E. Déterminations analytiques.

Toutes les déterminations analytiques ont été effectuées par spectrophotométrie d'émission atomique à plasma d'argon. Pour les organes et le fémur, une solubilisation préalable à l'acide nitrique a été nécessaire.

2. RESULTATS.

Les résultats concernant les concentrations des différents éléments (Al, Cu, Zn et Ca) dans le plasma sont regroupés dans le tableau 1.

Tableau 1
Concentrations des différents éléments (Al, Cu, Zn et Ca) dans le plasma (en $\mu\text{g.l}^{-1}$, excepté Ca: en mg.l^{-1}).

Groupes	Al	Cu	Zn	Ca
T	23.24 $\pm$ 3.73	903.22 $\pm$ 24.82	1401.33 $\pm$ 90.73	126.23 $\pm$ 1.87
Al (a)	137.54 $\pm$ 9.40 ^{*cd}	996.33 $\pm$ 48.45	1501.78 $\pm$ 59.94	123.94 $\pm$ 1.02
DFO (b)	129.19 $\pm$ 16.01 ^{*cd}	938.17 $\pm$ 56.26	1747.33 $\pm$ 180.24	121.10 $\pm$ 4.14
EDTA (c)	162.70 $\pm$ 12.11 ^{*abefg}	1043.83 $\pm$ 109.52	1112.67 $\pm$ 48.17	123.86 $\pm$ 1.67
HEDTA (d)	159.95 $\pm$ 23.11 ^{*abefg}	931.00 $\pm$ 24.28	1707.67 $\pm$ 180.21	122.08 $\pm$ 1.66
EDDHA (e)	141.52 $\pm$ 14.39 ^{*cd}	947.83 $\pm$ 46.72	1461.24 $\pm$ 55.05	127.33 $\pm$ 1.64
HAES (f)	131.52 $\pm$ 6.18 ^{*cd}	999.50 $\pm$ 49.06	1488.25 $\pm$ 41.53	130.07 $\pm$ 4.64
Acide tartrique (g)	133.52 $\pm$ 6.29 ^{*cd}	954.83 $\pm$ 59.95	1552.13 $\pm$ 18.04	129.98 $\pm$ 2.59

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart-type. (n=6).

*Significativement différent du groupe T (témoin) : $P < 0.001$.

a,b,c,d,e,f,g significativement différent du groupe a, b, c, d, e, f ou/et g : $P < 0.01$.

Le traitement au chlorure d'aluminium augmente significativement la concentration plasmatique en aluminium ($P < 0.001$). En effet, les concentrations rencontrées sont environ sept fois plus élevées. Seuls les groupes traités avec l'EDTA et l'HEDTA présentent une élévation de leur concentration plasmatique en aluminium par rapport au groupe Al ($P < 0.01$). Par contre, les concentrations en cuivre, zinc et calcium ne présentent aucune différence significative entre les divers groupes.

Le tableau 2 montre l'effet du traitement chélateur sur la teneur en aluminium des différents tissus. L'intoxication au chlorure d'aluminium provoque une augmentation des concentrations aluminiques dans le foie, la rate, les reins et le fémur. Ces résultats sont en accord avec les travaux de MULLER et coll. (1992). Les plus grandes variations sont observées dans le foie et la rate (des concentrations respectivement 112 et 94 fois plus élevées dans le groupe Al que dans le groupe témoin). La concentration aluminique dans le cerveau ne varie pas entre les différents groupes.

Le DFO et l'HEDTA diminue significativement la concentration en aluminium dans le foie (diminution respective de 14 et 26.4%) et les reins (respectivement 36 et 41.9%) par rapport au groupe Al. L'EDTA et l'HAES réduisent significativement la concentration aluminique des reins (respectivement 28.4 et 38.8% par rapport au groupe Al). L'HEDTA réduit également le contenu aluminique de la rate (baisse de 20.2% par rapport au groupe Al).

Par contre, on n'observe aucune variation significative de la teneur en aluminium du fémur et du cerveau dans aucun groupe traité.

Tableau 2

Concentrations en aluminium dans les différents tissus ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de poids frais, excepté pour le Fémur: $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de poids sec).

Groupes	Foie	Rate	Reins	Fémur	Cerveau
T	0.24±0.08	0.63±0.06	0.44±0.10	1.46±0.36	0.30±0.02
Al	26.89±0.82	59.52±5.72	2.89±0.33	13.76±0.78	0.40±0.03
DFO (a)	23.15±0.58 ^{*bdef}	57.05±3.64 ^c	1.85±0.13 ^{*df}	12.47±1.25	0.39±0.04
EDTA (b)	27.67±2.06 ^{ac}	66.41±4.81 ^c	2.07±0.27 ^{*df}	14.18±1.34	0.40±0.02
HEDTA (c)	19.79±0.19 ^{**abdef}	47.47±1.06 ^{*abdef}	1.68±0.14 ^{*df}	12.61±1.31	0.35±0.02
EDDHA (d)	27.93±0.23 ^{ac}	63.01±4.71 ^c	2.81±0.30 ^{abce}	13.34±0.95	0.37±0.06
HAES (e)	25.13±0.45 ^{ac}	61.89±6.70 ^c	1.77±0.15 ^{*df}	13.93±0.47	0.41±0.07
Acide tartrique (f)	26.30±0.40 ^{ac}	56.56±4.88 ^c	2.66±0.35 ^{abce}	13.49±1.94	0.39±0.09

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type. (n=6).

*Significativement différent du groupe Al : P<0.05.

**Significativement différent du groupe Al : P<0.001.

a,b,c,d,e,f significativement différent des groupes a, b, c, d, e ou/et f: P<0.05.

Les figures 15 et 16, et le tableau 3 présentent les résultats obtenus quant à l'excrétion urinaire ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot 24 \text{ heures}^{-1}$) de différents éléments (Al, Ca, Cu, Fe et Zn) tout au long de la période de traitement aux chélateurs. Les déterminations de la concentration en différents métaux ont été effectuées aux jours 0, 1, 3 et 9 du traitement (J0, J1, J3 et J9).

L'excrétion urinaire d'aluminium (Al), de calcium (Ca) et de cuivre (Cu) ne présente aucune différence significative entre les différents groupes intoxiqués au chlorure d'aluminium tout au long du traitement chélateur excepté pour le groupe EDDHA. Le groupe témoin (T) présente bien évidemment des teneurs significativement plus faibles que tous les autres groupes (P<0.01).

Il faut cependant noter qu'au neuvième jour du traitement (J9), l'excrétion urinaire d'aluminium des animaux traités à l'HEDTA est augmentée de manière presque significative (P<0.06), alors qu'aux jours 3 et 9, l'EDDHA augmente significativement l'excrétion urinaire d'aluminium (respectivement de 19.7 et 51.9% par rapport au groupe Al) (Figure 15).

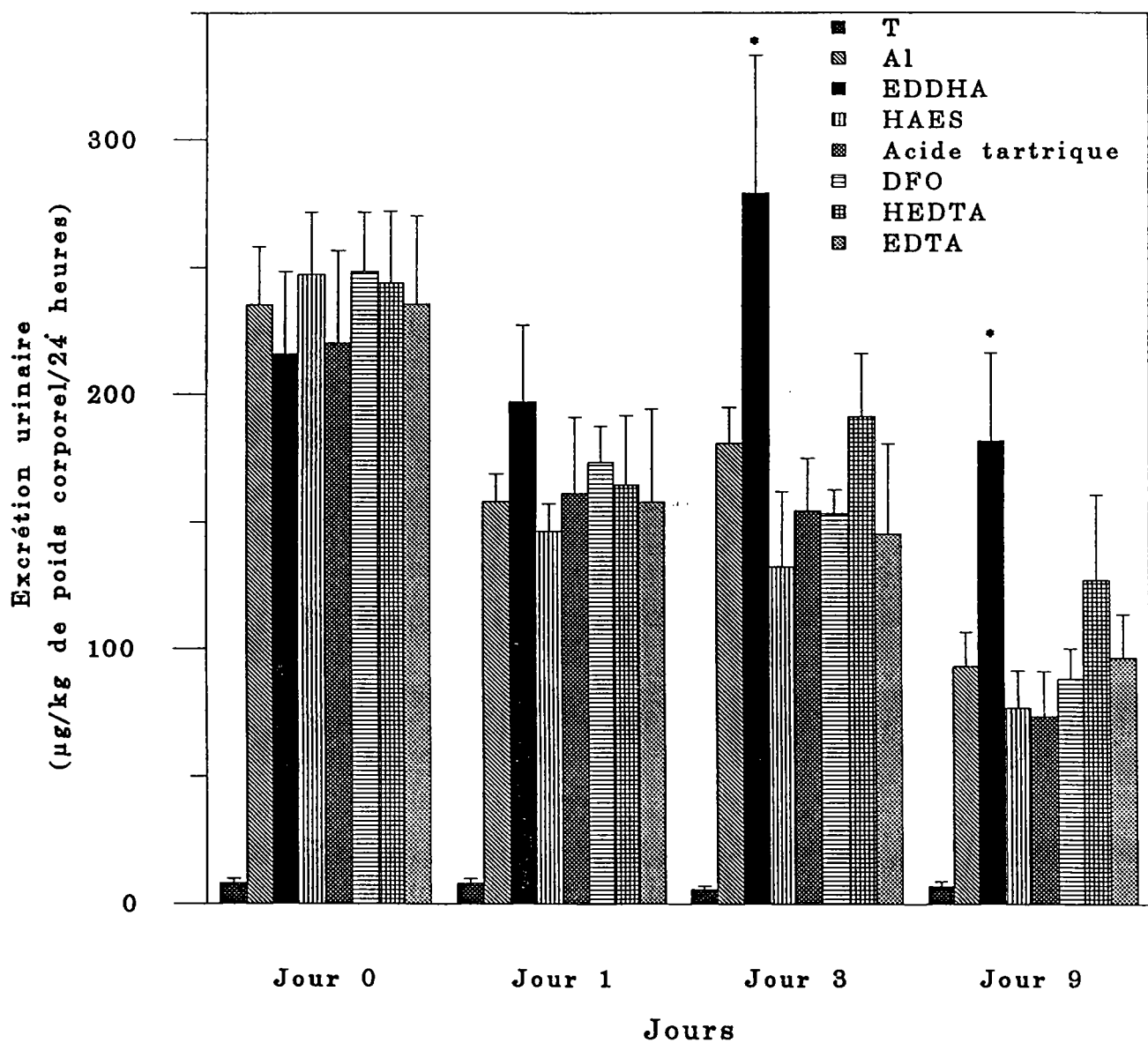


Figure 15: Excrétion urinaire de l'aluminium (Al) tout au long du traitement chélateur.

* Significativement différent des autres groupes: $P < 0.05$.

La figure 16 présente les variations d'excrétion urinaire en fer (Fe) et zinc (Zn). L'excrétion urinaire de zinc est significativement augmentée aux jours 1, 3 et 9 dans les groupes HEDTA ($P < 0.05$), EDTA ($P < 0.01$) et EDDHA ($P < 0.01$). Entre ces deux derniers groupes, il n'existe pas de différence significative. Par contre, il favorise l'excrétion du zinc d'une manière beaucoup plus importante que l'HEDTA.

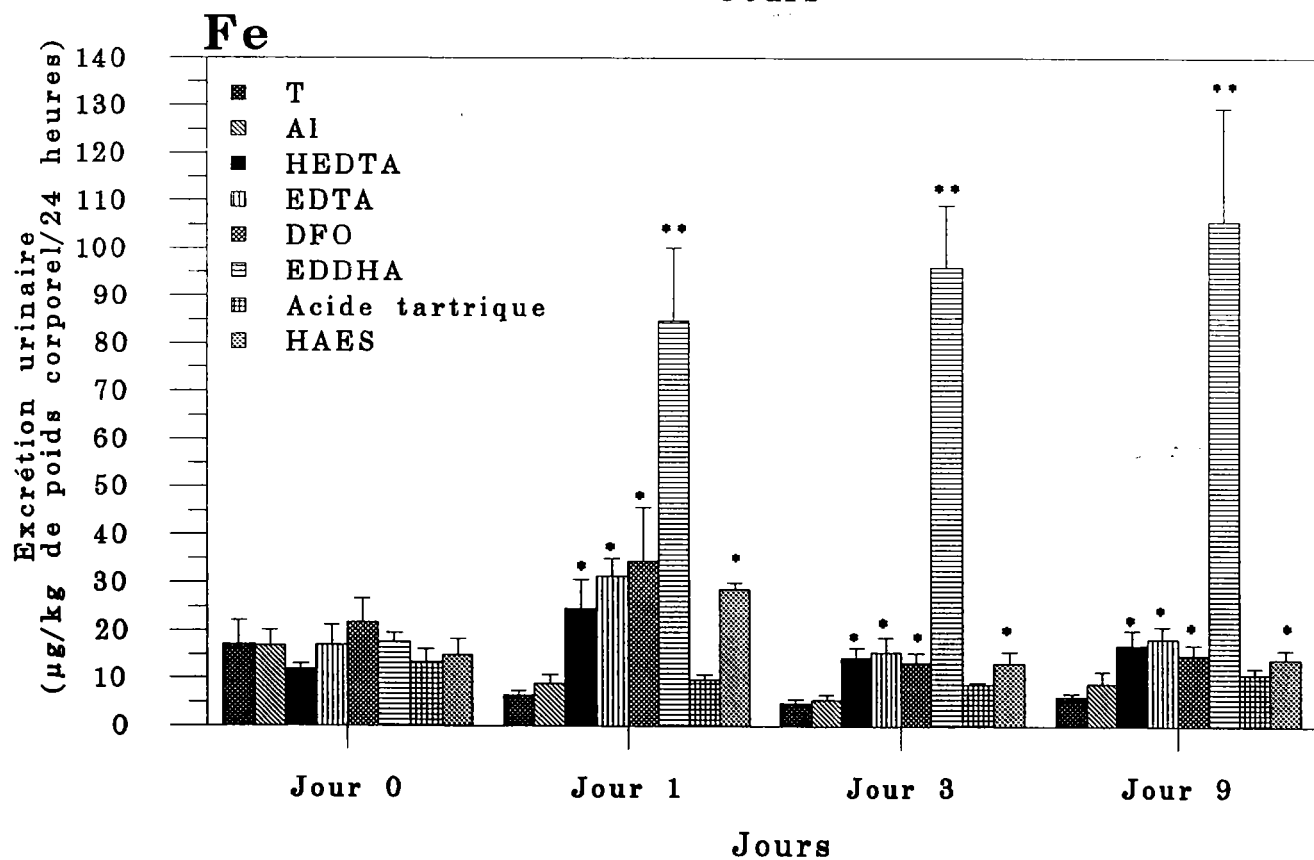
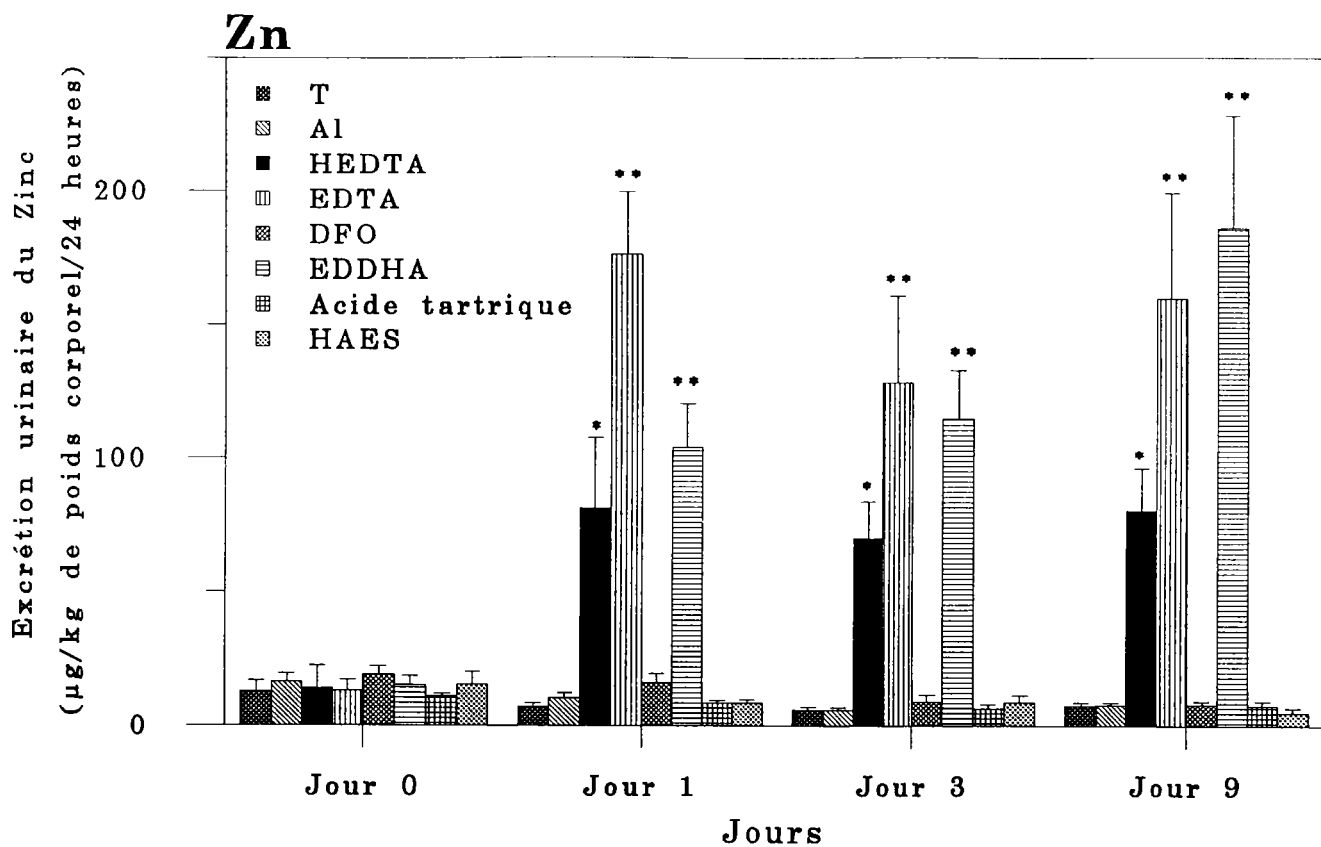


Figure 16: Excrétion urinaire du zinc (Zn) et du Fer (Fe) aux différentes périodes du traitement ($\mu\text{g Zn ou Fe.kg de poids corporel}^{-1} \cdot 24 \text{ heures}^{-1}$).

* Significativement différent des autres groupes: $P < 0.05$.

** Significativement différent des autres groupes: $P < 0.01$.

De même, l'excrétion urinaire du fer (Fe) est significativement augmentée aux jours 1, 3 et 9 du traitement pour les chélateurs suivants: HEDTA, EDTA, DFO, HAES (P<0.05) et EDDHA (P<0.01). Dans les autres groupes, il n'existe pas de différence significative. Les résultats concernant l'excrétion urinaire du calcium et du cuivre sont regroupés dans le tableau 3.

Tableau 3

Excrétion urinaire du calcium (Ca) et du cuivre (Cu) aux différentes périodes du traitement (µg.kg⁻¹ de poids corporel.24 heures⁻¹).

Ca

Groupes	J0	J1	J3	J9
T	6452±1947	3575±545	1935±309	4605±822
Al	8233±2457	8550±2107	3189±680	3851±879
DFO	6356±1967	9500±1754	3934±686	5826±904
EDTA	8106±2394	9198±1186	4829±933	5535±902
HEDTA	6093±511	6700±2216	4947±747	4797±934
EDDHA	6603±806	7500±983	16982±5232*	49699±7706**
HAES	6118±899	6891±965	6985±1089	5043±1096
Acide tartrique	6435±694	7891±965	4985±1089	5332±593

Cu

Groupes	J0	J1	J3	J9
T	11.33±2.74	5.86±0.64	6.44±0.72	6.18±0.79
Al	17.84±4.22	8.20±0.92	7.72±0.74	8.76±1.02
DFO	19.49±5.77	7.77±1.07	5.40±0.36	7.87±1.12
EDTA	8.87±1.45	9.97±1.24	8.81±2.13	7.72±1.04
HEDTA	16.68±3.02	9.42±1.63	7.55±0.51	9.32±1.37
EDDHA	14.03±1.28	52.00±13.71**	61.29±15.64**	63.21±12.93**
HAES	11.79±3.80	11.99±1.15	12.18±0.65	10.84±1.59
Acide tartrique	10.08±1.67	11.65±1.85	9.03±1.59	11.09±1.61

Les résultats sont exprimés en moyenne ± s.e.m. (n=6).

* Significativement différent des autres groupes: P<0.05.

** Significativement différent des autres groupes: P<0.01.

Il faut noter que l'EDDHA favorise l'excrétion urinaire de tous les éléments étudiés dans ce chapitre. De plus, l'examen *post mortem* des animaux traités à l'EDDHA nous a fait suspecter une altération des reins. En effet, ces organes présentent une baisse de la coloration accompagnée d'une élévation de leur poids comparativement aux reins de tous les autres animaux (3.04 ± 0.62 vs 2.29 ± 0.24 ; $P < 0.01$). De plus, lors de l'ajout d'acide nitrique après collecte des urines, nous avons observé une précipitation dans les urines des animaux traités à l'EDDHA. A la suite de ces observations, nous avons suspecté une protéinurie. C'est pourquoi nous avons demandé une analyse des urines au Laboratoire de Biochimie des Protéines du Professeur J.L. GUEANT. Cette analyse de la protéinurie a été complétée par une électrophorèse et a révélé une atteinte tubulaire du rein de ces animaux confirmée par l'élévation de la concentration urinaire en protéine durant le traitement à l'EDDHA (plus de 5 g.l^{-1} , équivalent à $250 \text{ mg.kg de poids corporel}^{-1} \cdot 24 \text{ heures}^{-1}$: concentration 5 fois supérieure à celle des animaux témoins).

3. CONCLUSION-DISCUSSION.

Comme les autres études le relatent (MULLER et coll., 1992), les animaux traités au chlorure d'aluminium ont une évolution pondérale significativement ralentie par rapport aux animaux témoins (voir figure de l'évolution pondérale en annexe).

L'aluminium s'est accumulé dans tous les tissus analysés, excepté le cerveau, des animaux intoxiqués comparativement au groupe témoin. Comme d'autres études le relatent (MULLER et coll., 1992), le foie et la rate sont les sites de fixation privilégiés de l'aluminium quand il est administré par voie intrapéritonéale. Effectivement, les concentrations aluminiques sont élevées dans le foie et la rate, et beaucoup plus faibles dans le fémur et les reins.

En général, l'injection de chélateurs efficaces entraînent une diminution significative de la teneur en aluminium dans ces organes. Ainsi, le traitement à l'HEDTA réduit de manière significative la concentration en aluminium dans différents tissus (foie, rate et reins). Par conséquent, ce composé se présente comme le chélateur de l'aluminium le plus efficace parmi ceux testés dans cette étude. En effet, même le DFO ne réussit à diminuer la teneur en aluminium que dans le foie et les reins, alors que l'HAES et l'EDTA ne réduisent la teneur aluminique que dans les reins.

Excepté l'EDTA et l'HEDTA, aucun chélateur n'augmente la concentration aluminique dans le plasma. Or certains de ces chélateurs (au moins le DFO) devraient être capables de mobiliser l'aluminium et ainsi de faire augmenter la concentration plasmatique en aluminium. Il faut certainement corrélér ce phénomène à la cinétique de complexation des différents composés. Par exemple, lors de l'utilisation du DFO dans le traitement de l'accumulation aluminique, SIMON et coll. (1982) ont observé l'apparition du pic aluminique dans le plasma environ 48 heures après l'injection de DFO. Or, dans notre étude, le sacrifice des animaux intervient environ 72 heures après la dernière injection du chélateur. Donc si les autres chélateurs possèdent une cinétique de complexation similaire au DFO, le pic aluminique dans le plasma ne peut pas apparaître. A l'inverse, pour des composés dont la cinétique serait plus lente (vraisemblablement le

cas de l'EDTA et de l'HEDTA), le pic aluminique plasmatique peut être observé.

De plus, aucun chélateur n'entraîne de modification dans la concentration plasmatique des autres éléments analysés (Ca, Cu et Zn).

Mise à part l'EDDHA, aucun chélateur n'est capable, dans les conditions de notre expérimentation, d'augmenter l'excrétion urinaire de l'aluminium d'animaux intoxiqués au chlorure d'aluminium. YOKEL et KOSTENBAUDER (1987) ainsi que YOKEL et coll. (1991b) avaient obtenu des résultats similaires. Cependant, le traitement à l'EDDHA augmente non seulement l'excrétion urinaire de l'aluminium mais également l'excrétion urinaire de tous les autres éléments (Ca, Cu, Fe et Zn) étudiés dans ce chapitre. Cette constatation a d'ailleurs également motivé notre investigation quant à la protéinurie soupçonnée chez les animaux traités par ce composé. L'EDDHA entraîne certainement une altération tubulaire qui expliquerait le transfert rénal des différents complexes métal-protéine. De plus, malgré l'élévation de l'excrétion urinaire, aucune diminution de la concentration de ces éléments dans les différents organes et dans le plasma n'a été constatée. Par conséquent, les résultats obtenus laissent supposer que l'EDDHA est probablement mal distribué au sein des tissus et reste extracellulaire. Ainsi, ce composé complexerait de manière privilégiée l'aluminium présent dans le plasma.

YOKEL et KOSTENBAUDER (1987) avaient suggéré que l'EDDHA serait un candidat potentiel pour le remplacement du DFO dans le traitement de l'accumulation aluminique chez les patients dialysés.

Cependant, compte-tenu des résultats obtenus et même s'il est bien évident que d'autres études seraient nécessaires pour déterminer de manière plus précise les conditions de cette altération tubulaire (declin, accélération ou persistance de cette dégradation rénale après arrêt du traitement à l'EDDHA), il est plus prudent, dans un premier temps, de s'orienter vers un autre composé dont les propriétés complexantes vis à vis de l'aluminium seraient plus évidentes et dont la toxicité serait moins marquée.

Concernant l'excrétion urinaire de l'aluminium, il faut relever la capacité presque significative de l'HEDTA à augmenter cette élimination au neuvième jour du traitement. Or malgré une diminution des teneurs aluminiques dans les différents organes, cette élimination n'est pas significativement démontrée. On peut alors supposer que du fait de la lente accumulation du métal (Al) dans les tissus et du fait de la très importante

concentration aluminique dans les urines des animaux intoxiqués, cette diminution de l'aluminium tissulaire devienne trop faible (en concentration) pour être observée dans les urines. En effet, chez les animaux intoxiqués, la concentration en aluminium dans les urines avoisinent fréquemment les 10 mg Al.l⁻¹. Par conséquent, si un chélateur diminue la concentration en aluminium dans les tissus (quelques µg.g⁻¹), cette diminution devrait certainement être insuffisante pour produire une élévation supplémentaire de la concentration urinaire en aluminium. En fait, cette augmentation additionnelle devrait approcher les variations rencontrées entre les différents animaux. Cette hypothèse devrait également expliquer l'absence de variation rencontrée dans l'élimination urinaire de l'aluminium dans le traitement avec d'autres chélateurs que l'HEDTA (DFO, EDTA, ...).

D'autres chélateurs, DFO, HAES, HEDTA et EDTA, augmentent l'excrétion urinaire du fer (Fe). Avant son utilisation dans le traitement de l'accumulation aluminique, le DFO était fréquemment utilisé dans le traitement de la surcharge ferrique des patients dialysés chroniques (FOSBURG et coll., 1984). De plus, tous ces chélateurs devraient être des complexants des ions trivalents, même si leur constante de stabilité est plus importante pour l'aluminium que pour les autres éléments. Par conséquent, si l'utilisation de l'un de ces composés était envisageable dans le domaine clinique, il serait important de surveiller les teneurs plasmatiques en fer (voir d'autres éléments).

De même, une surveillance des teneurs en zinc serait nécessaire. Cependant, dans notre étude, malgré l'élévation de la teneur urinaire en zinc, on n'observe pas de variation significative dans le plasma. Par conséquent, malgré cette élimination urinaire accrue, le taux plasmatique ne variant, la perte de zinc constatée dans ce traitement n'entraîne pas de déficience majeure. De plus, comme pour le fer, il est toujours possible d'apporter une supplémentation en zinc lors de traitement à long terme.

CONCLUSION DU CHAPITRE I

Les résultats obtenus dans l'étude *in vivo* (deuxième partie) corroborent ceux obtenus dans notre étude préliminaire concernant la comparaison *in vitro* (première partie) de l'efficacité du pouvoir complexant de l'HEDTA. Ainsi, ce chélateur se présente comme un prétendant potentiel à la succession du DFO.

Cependant, l'extrapolation de nos résultats à l'accumulation chronique de l'aluminium chez l'être humain semble encore difficile. En effet, le nombre d'informations concernant la toxicité et les potentialités thérapeutiques de l'HEDTA est encore beaucoup trop restreint. Par conséquent, des études supplémentaires sont nécessaires afin de mettre en évidence l'utilisation possible de ce composé comme agent thérapeutique.

De plus, les techniques expérimentales utilisées dans ce chapitre ont montré leur utilité et surtout leur efficacité. Ainsi, elles pourront être réutilisées pour découvrir le pouvoir complexant d'autres substances (ou des mêmes) vis à vis de l'aluminium ou d'autres métaux.

Enfin, il ne faut pas oublier que la meilleure alternative à l'accumulation aluminique dans l'organisme reste la découverte d'un produit de remplacement de l'aluminium dans le traitement de l'hyperphosphatémie des dialysés chroniques.

C'est d'ailleurs ce point de vue que nous allons développer dans le deuxième chapitre de ce travail.

CHAPITRE II

Recherche et étude de nouveaux composés susceptibles de réduire l'absorption du phosphore alimentaire et administrables par voie orale.

INTRODUCTION

Chez les déficients rénaux chroniques, la rétention du phosphore joue un rôle majeur dans la genèse de l'hyperparathyroïdisme secondaire et de l'ostéodystrophie (BRICKER et coll., 1969; RUTHERFORD et coll., 1977).

Pour prévenir cette rétention, de nombreux antiacides contenant de l'aluminium ont été utilisés pour fixer le phosphore dans le tractus gastro-intestinal et ainsi pour prévenir son absorption. Malheureusement, l'utilisation à long terme de composés aluminiques chez des patients déficients rénaux est associée au risque lié à la toxicité de l'aluminium (encéphalopathie, ostéomalacie, arthropathie et anémie microcytaire). C'est pourquoi la gestion thérapeutique des patients atteints d'accumulation aluminique inclue la détoxification par la desferrioxamine (DFO) (ACKRILL et coll., 1982). Cependant, l'utilisation du DFO entraîne l'apparition d'effets secondaires qui nécessitent souvent l'interruption du traitement.

Par conséquent, la solution idéale serait d'interrompre le traitement par les composés aluminiques et de les remplacer par de nouvelles molécules administrables par voie orale et dépourvues de toxicité. C'est pourquoi certains auteurs ont relancé la recherche de tels composés. Cependant, il existe très peu d'études concernant ce domaine. La difficulté à mettre en place une étude expérimentale sur animaux et la faible possibilité de débouchés expliquent certainement le manque de dynamisme observé dans ce domaine.

Malgré cela, des sels de calcium (carbonate et citrate) ont été testés dans le domaine clinique par certains auteurs (MORINIERE et coll., 1982; CUSHNER et coll., 1986 et 1988). Malheureusement, les doses nécessaires à l'efficacité de tels composés chez des patients dialysés étaient souvent très élevées et leur utilisation à court terme pouvait engendrer des phénomènes d'hypercalcémie (SHEIKH et coll., 1989). Leur utilité dans le domaine thérapeutique devenait alors dérisoire compte-tenu des complications possibles pouvant faire suite à leur utilisation dans le traitement à long terme de l'hyperphosphatémie.

En 1984 puis en 1985, SCHNEIDER et coll. testent un nouveau composé capable de complexer les phosphates. Il s'agit en fait d'un polymère naturel constitué d'acide hétéropolyuronique. Cette molécule présente l'avantage d'être non toxique, de ne pas causer de constipation et de pouvoir être ingérée en quantité conséquente. Elle peut être produite en particules de 1 à 3 mm ou en poudre et peut être chargée avec différents cations (calcium, fer, etc...). Les deux études de SCHNEIDER et coll. (1984, 1985) débutent par une approche *in vitro* de la capacité de chélation des composés vis à vis des phosphates à différents pH. Dans les conditions expérimentales, les polymères présentent une capacité chélatrice 2 à 3 fois supérieure (SCHNEIDER et coll., 1984) à celle de composés généralement utilisés dans la complexation du phosphore alimentaire (Aludrox®, Phosphonorm®). Malheureusement, lors d'essais cliniques chez des patients urémiques, l'efficacité de ces substances s'est avérée nettement amoindrie, ne parvenant même pas à ramener le taux sérique du phosphore des patients testés à des valeurs acceptables (SCHNEIDER et coll., 1985).

Compte-tenu du manque de bibliographie concernant ce domaine de recherche, il nous a été très difficile de réunir plus de données concernant la complexation des phosphates alimentaires. Cependant, la chimie nous a permis de découvrir des composés susceptibles de chélater le phosphore d'une manière beaucoup plus efficace que l'aluminium, tout au moins en milieu aqueux.

Ainsi, le zirconium (Zr) complexe le phosphate beaucoup plus fortement que l'aluminium: le produit de solubilité du phosphate de zirconium $Zr_3(PO_4)_4$ est de 10^{-132} (LOURIE, 1975), celui du phosphate d'aluminium de 10^{-18} (CHARLOT, 1963). Pour cette raison, l'utilisation du

zirconium pourrait être envisagée comme substitut de l'aluminium à condition que sa toxicité soit acceptable. En effet, la chimie de ce composé ne laisse pas entrevoir la possibilité d'absorption gastro-intestinale; dans le tractus gastro-intestinal, en raison du pH, le zirconium ne peut se trouver que sous forme de phosphates insolubles ou encore sous forme de précipités d'oxydes de zirconium (CHARLOT, 1963). C'est pourquoi, dans la deuxième partie de notre travail, nous allons essayer de mettre en évidence l'efficacité de l'oxychlorure de zirconium octahydraté ($\text{ZrOCl}_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$) tout en vérifiant son degré de toxicité chez le Rat.

De même, le lanthane (La) forme avec les phosphates des précipités aux alentours de $\text{pH} = 7-8$ (BOURION, 1933). De plus, le chlorure de lanthane hydraté ($\text{LaCl}_3 \cdot \sim 7 \text{H}_2\text{O}$) présente une solubilité et une stabilité suffisante pour permettre une étude sur la complexation des phosphates alimentaires chez le Rat. En plus de l'étude de l'efficacité du chlorure de lanthane dans la complexation du phosphore alimentaire, nous effectuerons une étude à long terme (100 jours) avec des animaux traités avec ce composé pour mettre en évidence le possible transfert du lanthane au sein de l'organisme chez le Rat.

Par conséquent, les différents paramètres que nous étudierons sont les suivants:

. Concentration en phosphore des différents tissus chez des animaux témoins et chez des animaux traités par les différents chélateurs à différentes concentrations.

. Concentrations des différents complexants dans les différents tissus.

. Evolution de l'excrétion urinaire et fécale du phosphore, de divers éléments minéraux et des différents chélateurs au cours du traitement.

1. MATERIEL ET METHODE

1.1. Critères de choix des complexants utilisés.

Tout d'abord, il faut signaler que l'investigation du pouvoir complexant par des techniques *in vitro* possédait aucun intérêt. En effet, comme nous l'expliquons ci-dessous, la chimie certifie depuis bien longtemps le pouvoir complexant des différents composés sélectionnés. Par conséquent, compte-tenu de la toxicité moyenne de ces substances, le passage à un modèle animal ne posait pas de problème d'éthique.

Dans un premier temps, nous avons sélectionné l'aluminium comme complexant du phosphore alimentaire car son utilisation est très largement répandue dans le milieu médicale, et surtout dans les services de dialyse où il est administré par voie orale sous forme de gels pour diminuer le taux de phosphore plasmatique et éviter ainsi des précipitations anarchiques de phosphates tricalciques. Par conséquent, l'aluminium nous servira de référence quant à l'efficacité des autres complexants testés. Nous utiliserons le chlorure d'aluminium hexahydraté ($\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, ALDRICH), car sa solubilité en milieu aqueux est très élevée et la quantification de la dose administrée est beaucoup plus aisée.

Le zirconium forme avec les phosphates un précipité dès $\text{pH} = 2$ (PIED et CAMESCASSE, 1932). Par conséquent, son aptitude à former des précipités avec les phosphates le place en tête de liste des candidats potentiels de notre étude. Parmi les différents composés du zirconium seuls deux produits présentent une solubilité suffisante pour être administré par voie orale. Il s'agit du chlorure de zirconium et de l'oxychlorure de zirconium. Malheureusement, le chlorure de zirconium (ZrCl_4 , PROLABO) présente une fois en solution un pH beaucoup trop acide (<1) pour permettre une étude *in vivo*. Par conséquent, seul l'oxychlorure de zirconium ($\text{ZrOCl}_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$, MERCK) présente des qualités de solubilité, de stabilité et de pH suffisamment grandes pour envisager une telle étude. La stabilité du produit est un critère essentiel dans le choix du composé car il devra subir une absorption orale.

Comme le zirconium, les sels de lanthane forment des précipités avec les phosphates mais aux alentours de $\text{pH} = 7-8$ (BOURION, 1933) et seul le chlorure de lanthane hydraté ($\text{LaCl}_3 \cdot \sim 7 \text{ H}_2\text{O}$, FLUCKA) présente les conditions de stabilité nécessaires à une absorption orale.

C'est pourquoi notre chapitre portera sur ces trois composés afin de permettre une étude comparative entre une molécule de référence (Al) qui a fait ses preuves et deux nouveaux composés (Zr et La) susceptibles de posséder un intérêt thérapeutique supérieur.

1.2. Protocoles expérimentaux.

A. Voie et mode d'administration.

Nous nous sommes orienté vers la voie orale car cette voie d'administration est celle utilisée dans le domaine thérapeutique pour lutter contre l'hyperphosphatémie chez les patients déficients rénaux. Ainsi, le choix d'une autre voie d'administration que celle-ci n'aurait présentée que peu d'intérêt.

Les chélateurs ont donc été mélangés à la nourriture. Nous avons choisi ce mode d'administration car les molécules sélectionnées possédaient en majorité un poids moléculaire trop élevé pour permettre un autre mode d'administration (gavage, intubation gastrique, etc...). En effet, pour obtenir la concentration nécessaire de complexant dans un volume administrable par gavage (1 à 3 ml maximum), nous dépassions le produit de solubilité des deux nouveaux chélateurs envisageables. C'est pourquoi nous avons décidé de mélanger les composés à la nourriture.

B. Protocole de traitement des animaux par les différents complexants.

L'étude est réalisée sur des rats mâles de $250 \pm 15 \text{ g}$. Le choix de rats mâles a été orienté par l'inexistence de cycle oestral pouvant interférer sur les teneurs des différents éléments recherchés.

Les différents animaux sont répartis individuellement dans des cages standards en plastique (43 x 28 x 15 cm).

Avant le traitement, l'eau et la nourriture (croquettes M25 Extra Labo, Provins, France) sont distribuées *ad libitum*.

Pendant le traitement, les différents complexants seront mélangés à la nourriture standard suivant la composition suivante:

- . 50 g de farine de blé.
- . 100 g d'eau ultra pure.
- . 250 g de nourriture standard pour animaux de laboratoire en poudre (M25, Extra Labo, Provins, France).

Après homogénéisation, les croquettes sont reconstituées et séchées pendant plusieurs jours avant d'être distribuées.

La farine de blé sert de liant et l'eau permet la reconstitution des croquettes grâce à la formation d'une pâte avec la farine de blé et la poudre de croquette.

Avant expérimentation, les animaux sont divisés en 8 groupes (6 animaux par groupe):

- . Un groupe témoin (T): les animaux reçoivent des croquettes reconstituées sans adjonction de chélateur.

- . Deux groupes traités à l'aluminium (Al_1 et Al_2): les animaux reçoivent des croquettes reconstituées, respectivement supplémentées de 60 ou de 30 g de chlorure d'aluminium hexahydraté par kg de poudre de croquettes.

- . Deux groupes traités au lanthane (La_1 et La_2): les animaux reçoivent des croquettes reconstituées, respectivement supplémentées de 90 ou de 45 g de chlorure de lanthane hydraté par kg de poudre de croquettes.

- . Trois groupes traités au zirconium (Zr_1 , Zr_2 et Zr_3): les animaux reçoivent des croquettes reconstituées, respectivement supplémentées de 80, 40 ou 20 g d'oxychlorure de zirconium par kg de poudre de croquettes.

L'eau est distribuée *ad libitum*.

La dose la plus élevée de chaque chélateur correspond à la quantité journalière nécessaire à complexer l'ensemble des phosphates apportés par le bol alimentaire, c'est à dire, la quantité contenue dans la poudre de croquette dont la composition est donnée par le fabricant. En effet, l'apport

de phosphore apporté par la farine de blé peut être considéré comme négligeable, l'essentiel du phosphore étant lié aux phytates non-assimilables par l'organisme (ALAIS et LINDEN, 1991). Ainsi, la concentration en complexant est calculée de la manière suivante:

1 g de nourriture M25 Extra Labo apporte 7.5 g de phosphore par kg de nourriture soit 0.242 mole de phosphore par kg de nourriture. Or pour observer une variation significative de l'absorption du phosphore, il faut administrer un nombre équivalent de mole de complexant, la part absorbée du phosphore ingéré étant de 60-70% (ALAIS et LINDEN, 1991). La nourriture devra donc être supplémentée par 0.242 mole de complexant par kg de nourriture soit en zirconium (PM=91), 22.02 g.kg⁻¹ ou en aluminium (PM=27), 6.53 g.kg⁻¹ ou en lanthane (PM=139), 33.64 g.kg⁻¹.

De plus, pour éviter tout phénomène de sous-nutrition, les animaux reçoivent tous les jours une quantité déterminée de nourriture, fixée dans les jours précédents le début de l'expérimentation avec des croquettes reconstituées (sans adjonction) pour permettre aux animaux de s'acclimater à la légère variation de composition de la nourriture. L'évolution de la consommation pourra ainsi être suivie tout au long du traitement. De plus, l'augmentation de la ration journalière est calculée de la manière suivante; si le rat mange toute la nourriture qu'on lui a donné durant les premières 24 heures, le lendemain, il reçoit 110% de la ration de la veille. On suivra l'évolution pondérale des différents animaux tout au long du traitement.

C. Collecte des urines et des fèces.

La collecte des urines et des fèces a été possible grâce à l'utilisation de cages à métabolisme (23 x 20 x 16 cm) dans lesquelles on place les animaux. On récupère ainsi urine et fèces sans que l'un ou l'autre ne soit contaminé par leur contact.

Après le début du traitement (J1), les animaux seront placés dans ces cages pendant 24 heures tous les trois jours, c'est à dire à J3, J6, J9, J12, J15, J18 et J21 (3^{ème}, 6^{ème}, ... et 21^{ème} jour après le début du traitement). Afin d'éviter toute contamination des urines et des fèces, les animaux seront placés dans les cages à métabolisme sans nourriture mais avec de l'eau de boisson à volonté. C'est pourquoi il nous a été impossible de laisser les animaux dans

ces cages continuellement. La rotation tous les 3 jours permet de maintenir les rats dans une condition de nutrition satisfaisante.

Après collecte, les urines sont centrifugées à 3000 g pendant 3 minutes afin d'éliminer toutes les impuretés (poils). On prélève le surnageant auquel on ajoute 50 µl d'acide nitrique à 65% Supra pur (MERCK) pour 5 ml d'urine pour permettre la conservation en solution de tous les éléments présents dans ces urines.

Les fèces sont pesées puis placées dans des erlen-meyers en quartz. On ajoute alors 15 ml d'acide nitrique à 65% Supra pur (MERCK) puis on chauffe sur bain de sable de Fontainebleau (environ 70°C) jusqu'à solubilisation complète de tous les particules solides. On ajuste à volume constant tous les flacons avec de l'eau supra pure. Cette solution pourra alors être dosée par SEA-DCP.

D. Protocole d'intoxication à long terme au chlorure de lanthane (100 jours).

Il s'agit ici de vérifier si le lanthane, comme l'aluminium, est capable de franchir la barrière intestinale et de s'accumuler dans les tissus. Pour cela, on traitera des animaux à l'aide de croquettes reconstituées, supplémentées en chlorure de lanthane hydraté identiques à celles utilisées lors du traitement au lanthane résumé dans le B. Nous utiliserons la dose la plus élevée de chlorure de lanthane pour nous permettre d'observer des différences plus significatives, c'est à dire des croquettes supplémentées avec une dose de 90 g de chlorure de lanthane par kg de poudre de croquettes (identique à celle utilisée pour le groupe La₁).

On divisera les animaux en deux groupes (5 animaux par groupe):

- . un groupe témoin (T) recevant des croquettes reconstituées sans adjonction.

- . un groupe traité au chlorure de lanthane (La) recevant des croquettes reconstituées, supplémentées en lanthane comme indiqué ci-dessus.

Les animaux sont placés individuellement dans des cages standards en plastique (43 x 28 x 15 cm). Ils reçoivent leur nourriture respective et l'eau de boisson *ad libitum*. En effet, il ne s'agit plus ici de constater un effet complexant du lanthane mais uniquement de vérifier l'absorption ou la non-absorption du composé. Par conséquent, il est plus aisé de distribuer la nourriture à volonté tout en vérifiant la létalité chez les animaux traités.

La durée du traitement a été fixée à 100 jours pour permettre une imprégnation des animaux suffisamment longue.

A la fin du traitement, les animaux sont anesthésiés au pentobarbital sodique (50mg.kg⁻¹) et le sang et différents tissus (foie, rate, reins, cerveau, poumons et fémur) sont prélevés comme indiqués ci-dessous.

E. Sacrifice des animaux, prélèvements de sang, des organes et du fémur.

A la fin du traitement, les animaux sont anesthésiés au pentobarbital sodique (50 mg.kg⁻¹).

Après anesthésie, le prélèvement du sang est effectué chez les rats par ponction intracardiaque à l'aide de seringue de 10 ml héparinée (TERUMO) munie d'aiguille héparinée (0.7 x 30, TERUMO). Le plasma est obtenu après avoir recueilli le sang dans des tubes héparinés qui sont centrifugés à 3000 g pendant 3 minutes.

Le foie, la rate, les reins, les poumons et le cerveau des rats sont prélevés. Chez les animaux du groupe traité à l'oxychlorure de zirconium, les prélèvements permettront de vérifier les hypothèses émises par DELONGEAS et coll. (1983); le zirconium se fixerait de manière élective au niveau du poumon, ainsi que dans divers organes ou tissus.

Le fémur droit est également prélevé en éliminant les muscles qui y adhèrent et en prenant soin de ne pas entamer le périoste. L'os est alors placé dans un tube et séché pendant 24 heures à 70°C avant d'être pesé.

F. Déterminations analytiques.

Toutes les déterminations analytiques sont effectuées par spectrophotométrie d'émission atomique à plasma d'argon (SEA-DCP). Comme indiqué ci-dessus, le dosage des différents tissus et des fèces a nécessité une solubilisation préalable à l'acide nitrique.

2. RESULTATS

2.1. Evolution pondérale des animaux traités par les différents complexants.

Les quantités d'eau et de nourriture ingérées par les différents animaux ne sont pas affectées par le traitement chélateur.

Les animaux témoins et traités (Al, Zr et La) sont pesés tous les trois jours juste avant la mise en cage à métabolisme. L'évolution pondérale pendant la durée du traitement est présentée sur la figure 17.

On constate que tous les animaux traités, aussi bien par l'aluminium que le zirconium ou le lanthane, présentent une évolution pondérale nettement moins rapide que les animaux témoins (T) dès le troisième jour du traitement pour les rats des groupes Al₁, La₁ et Zr₁ ($P < 0.01$) et pour les animaux des groupes Al₂, La₂ et Zr₂ ($P < 0.05$).

Seuls les animaux du groupe Zr₃ présentent une croissance pondérale identique à celle des animaux du groupe témoin.

Il faut également noter qu'il existe une différence significative ($P < 0.01$) entre les groupes traités à la dose d'une mole de complexant pour une mole de phosphore (Al, La et Zr indicé 1) et les groupes traités à la moitié de cette même dose, c'est à dire une mole de complexant pour deux moles de phosphore (Al, La et Zr indicé 2).

Chez les animaux traités au chlorure de lanthane hydraté, on observe que cette différence n'apparaît qu'au neuvième jour du traitement ($P < 0.01$) alors que pour les animaux traités au chlorure d'aluminium hexahydraté ou à l'oxychlorure de zirconium, cette différence significative apparaît déjà au sixième jour du traitement chélateur.

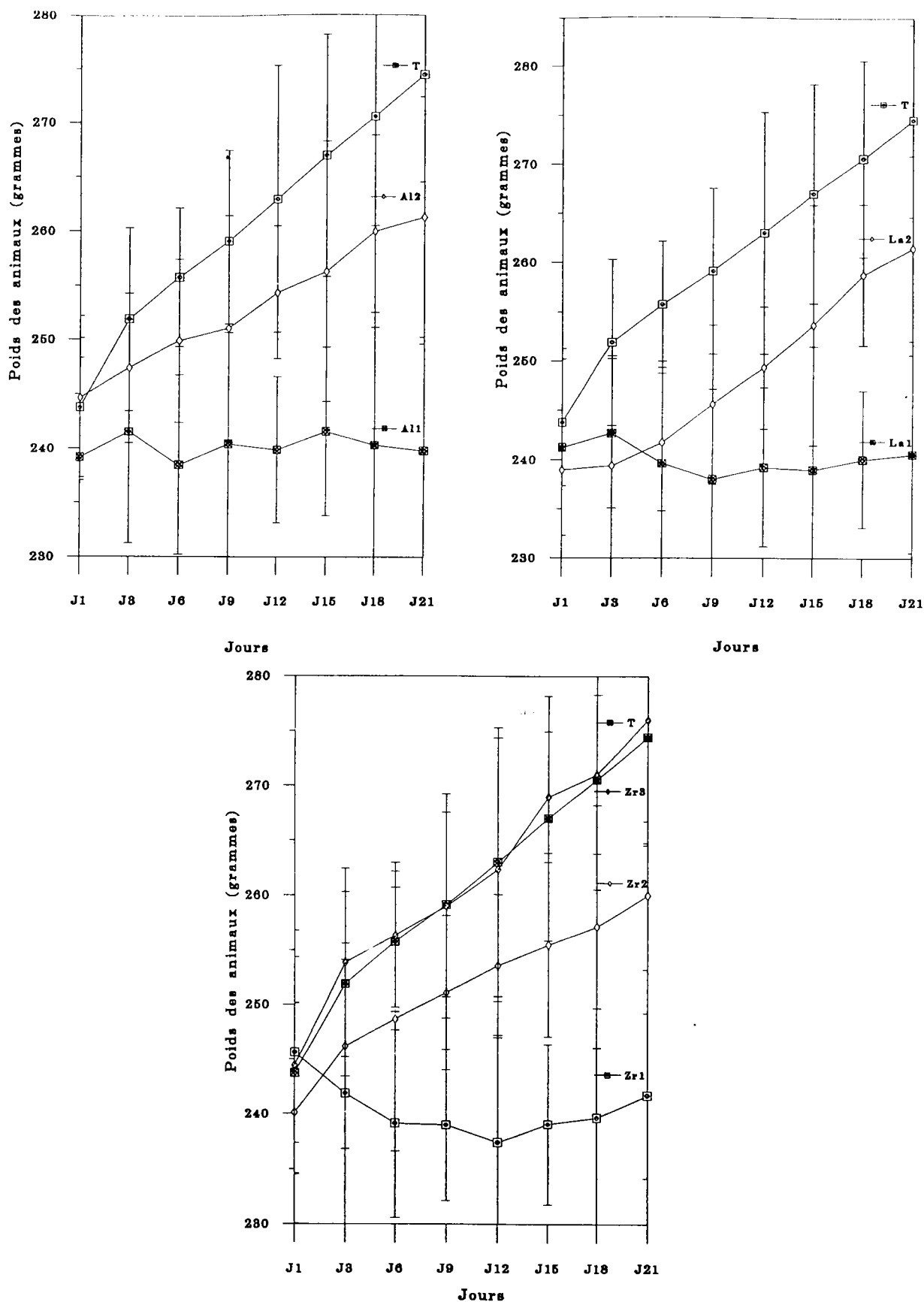


Figure 17: Evolution pondérale des différents animaux tout au long du traitement.

T: témoin.

Al1 et 2: traitement au chlorure d'aluminium hexahydraté.

La1 et 2: traitement au chlorure de lanthane hydraté.

Zr1,2 et 3: traitement à l'oxychlorure de zirconium.

2.2. Evolution des teneurs en phosphore et en différents éléments minéraux dans le plasma.

Les variations enregistrées au niveau des concentrations plasmatiques en phosphore (P), calcium (Ca), zinc (Zn), magnésium (Mg) et cuivre (Cu) sont regroupées dans le tableau 4.

Tableau 4

Concentrations des différent éléments (P, Ca, Zn, Mg et Cu) dans le plasma (en mg.l⁻¹, excepté Zn et Cu: en µg.l⁻¹).

Groupes	P	Ca	Zn	Mg	Cu
T	87.67±4.86	126.3±9.7	1762±462	29.88±0.41	996±46
Al ₁ (a)	70.43±6.24**g	152.3±13.5**g	1837±622	27.73±1.33	935±64
Al ₂ (b)	68.92±3.98**g	168.67±9.5**g	1758±498	29.07±0.86	921±55
La ₁ (c)	64.18±5.61**g	152.3±15.7**g	1901±546	28.62±1.23	897±67
La ₂ (d)	64.18±7.17**g	158.4±10.6**g	1896±701	28.98±0.47	958±49
Zr ₁ (e)	63.18±5.61**g	151.3±15.7**g	1932±623	28.66±0.37	973±58
Zr ₂ (f)	67.55±7.17**g	156.4±10.6**g	1799±564	29.31±1.21	908±66
Zr ₃ (g)	83.39±2.76 ^{a,b,c,d,e,f}	133.2±9.3 ^{a,b,c,d,e,f}	1832±574	27.76±1.02	987±51

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type (n=6).

**Significativement différent du groupe T (témoin) : P<0.01.

a,b,c,d,e,f,g significativement différent du groupe a, b, c, d, e, f ou/et g : P<0.01.

Les traitements avec le chlorure d'aluminium hexahydraté, le chlorure de lanthane hydraté et l'oxychlorure de zirconium réduisent significativement (P<0.01) le taux de phosphore plasmatique sauf chez les animaux du groupe Zr₃ chez lequel le taux reste normal. Consécutivement, compte-tenu de la balance phospho-calcique, les variations logiques sont observées pour les concentrations en calcium chez les mêmes groupes (P<0.01); en effet, quand le phosphore diminue, le calcium augmente.

Par contre, aucune modification des teneurs en zinc, magnésium et cuivre n'a pu être mise en évidence dans aucun des groupes traités,

comparativement au groupe témoin. De même, aucune trace de zirconium n'a été mise en évidence ($0.08 \pm 0.02 \mu\text{g Zr.l}^{-1}$ pour les témoins *vs* $0.09 \pm 0.01 \mu\text{g Zr.l}^{-1}$ pour les animaux du groupe Zr_1) dans le plasma des animaux traités à l'oxychlorure de zirconium. A l'inverse, les animaux traités au chlorure d'aluminium hexahydraté, Al_1 , présentent une élévation significative de la concentration plasmatique en aluminium comparativement aux animaux témoins (respectivement $62 \pm 9 \mu\text{g Al.l}^{-1}$ *vs* $22 \pm 7 \mu\text{g Al.l}^{-1}$; $P < 0.01$).

Le cas du lanthane étant abordé dans un autre sous-chapitre de ce travail, la recherche de celui-ci n'a pas été effectuée sur le plasma des animaux utilisés pour la recherche sur l'efficacité chélatrice du lanthane vis à vis du phoshore. Il est bien entendu que la recherche du lanthane dans le plasma sera effectuée lors de l'étude à long terme concernant l'exposition chronique au chlorure de lanthane hydraté.

2.3. Effet des différents traitements complexants sur les teneurs en phosphore, en calcium, en zirconium, en lanthane et en aluminium dans les différents tissus.

Le tableau 5 met en évidence l'effet des différents traitements sur les concentrations en phosphore (P) et en calcium (Ca) dans les différents tissus sélectionnés, fémur, foie, rate, reins et cerveau.

Tous les traitements réduisent significativement la teneur en phosphore et en calcium du fémur (diminution d'environ 11% de la concentration en phosphore dans les groupes Al_1 et 2 , La_1 et 2 et Zr_1 et 2). Cependant, il faut noter que pour le groupe Zr_3 , la diminution du taux de phosphore au niveau du fémur est significativement différente (baisse d'environ 6% par rapport aux témoins; $P < 0.05$) de celle des autres groupes traités (zirconium, aluminium ou lanthane).

Dans les autres organes (foie, rate, reins, poumons et cerveau), aucune modification des teneurs en phosphore ou en calcium n'a été observée.

Le résultat des dosages du zirconium dans les différents organes ou tissus est présenté dans le tableau 6. Comme dans le plasma, aucune

différence significative n'a pu être mise en évidence entre le groupe témoin (T) et les trois groupes traités à l'oxychlorure de zirconium (Zr_{1,2} et ₃). Même dans les poumons, organe particulièrement sensible à l'accumulation du zirconium selon DELONGEAS et coll. (1983), aucune trace de zirconium n'a été retrouvée.

Tableau 5

Concentrations en phosphore total (P_{total}) et en calcium (Ca) dans différents tissus.

P total (mg P.g⁻¹ de poids frais, excepté pour le Fémur: mg P.g⁻¹ de poids sec)

Groupes	Fémur	Foie	Rate	Reins	Cerveau	Poumons
T	67.28±2.72	3.25±0.13	2.95±0.26	2.86±0.15	2.58±0.26	1.56±0.19
Al ₁	60.15±3.82 **	3.20±0.28	3.03±0.16	3.10±0.08	2.73±0.09	1.60±0.14
Al ₂	60.67±3.36 **	3.16±0.16	3.10±0.13	3.05±0.18	2.55±0.05	1.65±0.13
La ₁	59.93±4.29 **	3.18±0.39	2.97±0.40	2.85±0.36	2.51±0.25	1.57±0.21
La ₂	58.63±3.28 **	3.21±0.27	3.01±0.33	2.91±0.22	2.68±0.26	1.61±0.17
Zr ₁	60.09±3.20 **	3.21±0.39	2.92±0.40	2.72±0.36	2.61±0.25	1.58±0.13
Zr ₂	60.12±3.47 **	3.09±0.45	2.96±0.24	2.99±0.27	2.59±0.13	1.62±0.18
Zr ₃	63.75±1.72 *a	3.31±0.27	3.06±0.33	2.81±0.22	2.72±0.26	1.63±0.15

Ca (µg Ca.g⁻¹ de poids frais, excepté pour le Fémur: mg Ca.g⁻¹ de poids sec)

Groupes	Fémur	Foie	Rate	Reins	Cerveau	Poumons
T	155.30±11.24	83.32±9.36	102.57±18.55	183.71±21.94	186.83±51.69	168.96±14.31
Al ₁	133.56±13.32 **	84.46±19.18	104.12±10.41	180.95±17.27	184.67±65.45	174.47±15.12
Al ₂	131.65±13.16 **	86.51±13.51	111.05±20.81	187.97±27.40	196.83±53.83	178.15±14.61
La ₁	132.75±11.92 **	85.78±13.86	108.58±10.94	185.12±24.77	189.96±61.84	170.05±12.36
La ₂	133.76±10.69 **	87.61±14.99	106.26±20.33	183.72±17.76	188.15±64.61	177.95±13.51
Zr ₁	125.78±12.22 **	87.88±13.86	109.58±10.94	182.12±24.77	188.96±61.84	176.38±14.27
Zr ₂	127.23±10.25 **	85.33±14.88	111.44±18.17	173.30±20.15	180.97±50.97	169.18±17.11
Zr ₃	163.76±10.69 ^b	84.31±14.99	103.26±20.33	176.72±17.76	178.15±64.61	173.04±10.94

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type (n=6).

* Significativement différent du groupe T: P<0.05.

** Significativement différent du groupe T: P<0.01.

^a Significativement différent de tous les autres groupes: P<0.05.

^b Significativement différent de tous les groupes traités: P<0.05.

Tableau 6

Concentrations en zirconium retrouvées dans les différents tissus ($\mu\text{g Zr.g}^{-1}$ de poids frais, excepté pour le Fémur: $\mu\text{g Zr.g}^{-1}$ de poids sec).

Groupes	Fémur	Foie	Rate	Reins	Cerveau	Poumons
T	0.06±0.02	0.07±0.03	0.05±0.03	0.06±0.03	0.08±0.02	0.08±0.02
Zr ₁	0.05±0.04	0.05±0.02	0.06±0.04	0.06±0.04	0.06±0.03	0.07±0.03
Zr ₂	0.06±0.01	0.08±0.04	0.07±0.04	0.05±0.02	0.09±0.03	0.09±0.04
Zr ₃	0.05±0.03	0.06±0.02	0.06±0.03	0.04±0.02	0.07±0.06	0.06±0.05

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart-type (n=6).

Les concentrations en zirconium retrouvées dans ces tissus n'ont pas d'intérêt quantitatif. En effet, la teneur en zirconium des différents tissus est tellement faible que nous approchons de la limite de détection du spectrophotomètre à émission à plasma d'argon. Par conséquent, seul l'absence de différence significative entre tissus des animaux témoins et tissus des animaux traités à l'oxychlorure de zirconium présente un intérêt.

Comme dans le plasma, les animaux traités au chlorure d'aluminium voient, dans certains des tissus analysés, leur concentration aluminique augmentée. Les valeurs obtenues pour les différents organes et tissus sont présentées dans le tableau 7. On observe que pour les animaux du groupe Al₁, les teneurs en aluminium sont significativement augmentées dans le foie, la rate (principaux organes de détoxification) mais aussi les reins. A l'inverse, la concentration aluminique du fémur, du cerveau et des poumons ne subit aucune modification.

Pour les animaux du groupe Al₂ (dose de chlorure d'aluminium hexahydraté divisé par deux), les mêmes organes voient leurs teneurs aluminiques augmentées par rapport à celle des animaux témoins. Mais, dans ces organes, l'accumulation aluminique est significativement plus faible que celle observée chez les animaux du groupe Al₁.

Tableau 7

Concentrations en aluminium retrouvées dans les différents tissus des animaux traités au chlorure d'aluminium hexahydraté ($\mu\text{g Al.g}^{-1}$ de poids frais, excepté pour le Fémur: $\mu\text{g Al.g}^{-1}$ de poids sec).

Groupes	Fémur	Foie	Rate	Reins	Cerveau	Poumons
T	0.12±0.02	0.55±0.03	0.99±0.33	0.49±0.05	0.35±0.02	0.28±0.02
Al ₁	0.15±0.02	0.91±0.04**	3.14±0.71**	0.95±0.14**	0.38±0.04	0.29±0.04
Al ₂	0.17±0.06	0.66±0.06 ^a	2.06±0.13 ^a	0.57±0.06 ^a	0.37±0.06	0.26±0.05

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart-type (n=6).

* Significativement différent du groupe T: $P<0.05$.

** Significativement différent du groupe T: $P<0.01$.

^a Significativement différent de tous les autres groupes: $P<0.05$.

Tableau 8

Concentrations en lanthane retrouvées dans les différents tissus des animaux traités au chlorure de lanthane hydraté ($\mu\text{g La.g}^{-1}$ de poids frais, excepté pour le Fémur: $\mu\text{g La.g}^{-1}$ de poids sec).

Groupes	Fémur	Foie	Rate	Reins	Cerveau	Poumons
T	0.16±0.06	0.11±0.01	0.26±0.17	0.10±0.03	0.07±0.02	0.17±0.02
La ₁	0.18±0.04	1.62±0.22**	0.27±0.14	0.13±0.06	0.09±0.05	0.18±0.04
La ₂	0.13±0.08	1.21±0.27**	0.21±0.13	0.11±0.02	0.08±0.06	0.17±0.05

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart-type (n=6).

** Significativement différent du groupe T: $P<0.01$.

Le tableau 8 présente les concentrations de lanthane retrouvées dans les organes des animaux traités au chlorure de lanthane hydraté. On observe que seul le foie révèle la présence de lanthane parmi l'ensemble des organes analysés ($P < 0.01$). A l'inverse des animaux traités à l'aluminium, aucune différence significative n'apparaît entre les deux groupes traités au lanthane. Des observations plus fines concernant l'accumulation possible du lanthane dans l'organisme pourront certainement être observées lors de l'étude à long terme (100 jours). Néanmoins, cette première observation laisse supposer un passage possible du lanthane au travers de la barrière gastro-intestinale.

2.4. Evolution de l'excrétion urinaire et fécale du phosphore et du calcium tout au long du traitement chélateur.

Les résultats concernant l'excrétion urinaire du phosphore et du calcium sont résumés dans le tableau 9. Ces résultats sont exprimés en mg de P ou de Ca par 24 heures. les traitements au chlorure d'aluminium hexahydraté, au chlorure de lanthane hydraté ou à l'oxychlorure de zirconium ont tous un effet significatif sur l'excrétion urinaire du phosphore ($P < 0.01$ ou $P < 0.05$). En effet, dès le troisième jour du traitement, la concentration en phosphore des urines de tous les animaux traités (Al_1 et $_2$, La_1 et $_2$ et $Zr_{1,2}$ et $_3$) sont significativement diminuées. Ce phénomène est observé tout au long du traitement jusqu'à J21.

Aucune différence entre les différents groupes traités (Al vs La ou La vs Zr ou encore Al vs Zr) n'a pu être mise en évidence.

D'un autre côté, les taux urinaires en calcium sont beaucoup moins influencés par les différents traitements. A nouveau, les différences observées ne représentent pas des phénomènes cohérents, compte-tenu de l'importance des écart-types, même si les résultats des tests statistiques indiquent une différence significative. Par conséquent, on peut affirmer qu'aucune différence existe entre les divers groupes d'animaux traités.

Comme pour le plasma, aucune trace de zirconium n'a pu être mise en évidence dans les urines des animaux traités à l'oxychlorure de zirconium, même chez les sujets traités à la dose la plus importante (Tableau 10).

Tableau 9

Excrétion urinaire du phosphore et du calcium tout au long du traitement chélateur (mg P or mg Ca.24 heures⁻¹).

P_{total}

Groupes	J3	J6	J9	J12	J15	J18	J21
T	11.23 ± 5.11	8.54 ± 5.77	8.32 ± 5.62	10.86 ± 6.48	7.87 ± 3.81	7.55 ± 4.14	8.29 ± 3.62
Al ₁	3.45 ± 2.64**	0.28 ± 0.25**	0.09 ± 0.07**	0.31 ± 0.27**	0.29 ± 0.23**	0.05 ± 0.03**	0.05 ± 0.04**
Al ₂	3.21 ± 0.91**	0.18 ± 0.15**	0.45 ± 0.35**	0.25 ± 0.16**	0.05 ± 0.05**	0.08 ± 0.07**	0.19 ± 0.14**
La ₁	3.19 ± 3.01**	0.32 ± 0.14**	0.04 ± 0.03**	0.16 ± 0.11**	0.03 ± 0.01**	0.02 ± 0.01**	0.05 ± 0.03**
La ₂	2.39 ± 1.94**	0.19 ± 0.14**	0.26 ± 0.22**	0.04 ± 0.02**	0.05 ± 0.04**	0.12 ± 0.06**	0.19 ± 0.17**
Zr ₁	3.25 ± 2.99**	0.32 ± 0.20**	0.28 ± 0.26**	0.12 ± 0.09**	0.81 ± 0.41**	0.16 ± 0.13**	0.11 ± 0.10**
Zr ₂	3.23 ± 2.19**	0.20 ± 0.19**	0.09 ± 0.05**	0.04 ± 0.03**	0.04 ± 0.01**	0.05 ± 0.04**	0.06 ± 0.04**
Zr ₃	2.56 ± 1.50**	0.27 ± 0.25**	0.22 ± 0.19**	0.05 ± 0.02**	0.09 ± 0.04**	0.10 ± 0.07**	0.45 ± 0.41**

Ca

Groupes	J3	J6	J9	J12	J15	J18	J21
T	1.17 ± 0.59	0.94 ± 0.74	1.08 ± 1.00	1.62 ± 1.54	0.85 ± 0.72	1.47 ± 1.13	0.92 ± 0.75
Al ₁	5.32 ± 3.75**	9.86 ± 5.63**	8.53 ± 5.04**	5.38 ± 5.31*	4.29 ± 4.15*	3.46 ± 3.07*	2.16 ± 1.29*
Al ₂	4.09 ± 2.05*	4.30 ± 2.42*	3.26 ± 2.70*	6.59 ± 5.18*	8.81 ± 5.43**	8.48 ± 5.21**	6.76 ± 3.28**
La ₁	6.28 ± 5.21**	17.73 ± 7.21*	6.68 ± 5.27**	3.09 ± 2.27*	6.27 ± 5.59**	8.54 ± 5.76**	4.85 ± 3.38**
La ₂	4.15 ± 2.44*	3.87 ± 0.51**	5.43 ± 5.39*	4.30 ± 1.74*	3.80 ± 2.45*	3.97 ± 1.91*	2.98 ± 1.43*
Zr ₁	2.74 ± 1.44*	11.41 ± 5.51**	4.72 ± 3.45*	4.62 ± 2.57*	6.63 ± 4.14*	9.56 ± 6.82**	7.01 ± 5.95*
Zr ₂	6.28 ± 5.21**	5.25 ± 3.24**	2.78 ± 1.92*	2.16 ± 1.08*	2.63 ± 0.45*	2.71 ± 0.82*	2.40 ± 1.05*
Zr ₃	3.85 ± 2.44*	2.99 ± 1.50*	2.81 ± 0.99*	4.03 ± 2.74*	2.60 ± 1.45*	3.90 ± 1.95*	2.76 ± 1.43*

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type (n=6).

* Significativement différent du groupe T: P<0.05.

** Significativement différent du groupe T: P<0.01.

Tableau 10

Excrétion urinaire du zirconium tout au long du traitement chélateur à l'oxychlorure de zirconium ($\mu\text{g Zr.24 heures}^{-1}$)

Groupes	J3	J6	J9	J12	J15	J18	J21
T	0.12±0.03	0.13±0.08	0.15±0.05	0.16±0.03	0.18±0.07	0.18±0.06	0.18±0.02
Zr ₁	0.10±0.04	0.12±0.04	0.16±0.08	0.16±0.04	0.16±0.03	0.17±0.03	0.17±0.04
Zr ₂	0.11±0.01	0.13±0.04	0.17±0.04	0.15±0.06	0.19±0.08	0.19±0.07	0.19±0.04
Zr ₃	0.12±0.03	0.11±0.06	0.16±0.03	0.14±0.05	0.17±0.06	0.16±0.05	0.16±0.05

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart-type (n=6).

Tableau 11

Excrétion urinaire de l'aluminium tout au long du traitement chélateur au chlorure d'aluminium hexahydraté ($\mu\text{g Al.24 heures}^{-1}$)

Groupes	J3	J6	J9	J12	J15	J18	J21
T	0.21±0.13	0.27±0.14	0.19±0.11	0.26±0.12	0.28±0.17	0.23±0.12	0.28±0.16
Al ₁	1.61±0.53 ^{**}	2.75±0.82 ^{**}	2.16±0.64 ^{**}	1.96±0.44 ^{**}	2.01±0.55 ^{**}	2.17±0.73 ^{**}	2.07±0.23 ^{**}
Al ₂	0.51±0.21 ^{*a}	0.68±0.34 ^{*a}	0.67±0.44 ^{*a}	0.65±0.32 ^{*a}	0.59±0.23 ^{*a}	0.69±0.47 ^{*a}	0.71±0.24 ^{**}

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart-type (n=6).

* Significativement différent du groupe T: $P<0.05$.

** Significativement différent du groupe T: $P<0.01$.

^a Significativement différent de tous les autres groupes: $P<0.05$.

Tableau 12

Excrétion urinaire du lanthane tout au long du traitement chélateur au chlorure de lanthane hydraté ($\mu\text{g La.24 heures}^{-1}$)

Groupes	J3	J6	J9	J12	J15	J18	J21
T	0.25±0.13	0.22±0.12	0.16±0.08	0.28±0.14	0.17±0.10	0.21±0.12	0.26±0.11
La ₁	0.64±0.26**	0.73±0.19**	0.75±0.24**	0.79±0.33**	0.84±0.13**	0.99±0.53**	0.87±0.36**
La ₂	0.21±0.11	0.28±0.14	0.23±0.14	0.25±0.12	0.16±0.13	0.19±0.14	0.19±0.11

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart-type (n=6).

** Significativement différent des deux autres groupes: $P<0.01$.

Les tableaux 11 et 12 représentent l'excrétion urinaire respective de l'aluminium et du lanthane pendant la période de traitement. Tous les animaux traités, aussi bien avec le lanthane qu'avec l'aluminium, présentent dans leurs urines des quantités significatives de complexant. La présence de l'aluminium dans les urines des rats traités au chlorure d'aluminium hexahydraté n'est pas étonnante car l'aluminium est absorbé au niveau de l'intestin et par conséquent se retrouve au niveau plasmatique puis urinaire. Par contre, le passage du lanthane à travers la barrière gastro-intestinale semble ici se confirmer par sa présence dans les urines.

Les résultats concernant l'excrétion fécale du phosphore et du calcium tout au long du traitement chélateur sont regroupés dans le tableau 13. Il faut signaler ici que les déterminations analytiques du phosphore et du calcium chez les animaux traités à l'oxychlorure de zirconium (groupes Zr_{1,2} et 3) n'apparaissent pas dans ce tableau. En effet, la précipitation du zirconium sous forme de phosphates de zirconium rend quasi impossible la totale remise en solution du complexe. Ainsi, la détermination analytique du phosphore et du zirconium par SEA-DCP n'est plus quantitativement possible. Nous aborderons plus en détail ce phénomène dans la discussion concernant ce chapitre.

Tableau 13
Excrétion fécale du phosphore et du calcium tout au long du traitement chélateur
(mg P or mg Ca.24 heures⁻¹).

P_{total}

Groupes	J3	J6	J9	J12	J15	J18	J21
T	15.87±1.55	17.05±1.80	15.40±0.99	16.65±1.43	15.65±2.44	14.21±1.41	15.03±3.64
Al ₁	23.11±3.29**	26.63±3.84**	27.19±4.10**	30.26±9.75**	27.27±3.66**	25.36±4.43**	25.36±3.73**
Al ₂	23.10±1.31**	23.19±2.50**	22.65±3.01**	22.28±1.76**	22.34±2.04**	23.53±4.01**	21.23±2.29**
La ₁	23.74±2.22**	25.29±3.56**	27.94±4.54**	27.13±5.79**	24.60±4.57**	24.62±3.18**	24.01±4.75**
La ₂	23.82±2.49**	26.48±5.38**	24.27±3.16**	24.31±2.16**	22.97±1.76**	22.90±1.41**	22.97±2.11**

Ca

Groupes	J3	J6	J9	J12	J15	J18	J21
T	43.82±7.18	43.14±5.94	38.45±3.44	39.92±5.91	42.39±11.92	37.50±5.02	41.04±11.48
Al ₁	37.74±5.29	42.73±14.07	37.44±8.84	39.50±7.20	36.69±4.36	39.01±5.29	37.25±6.00
Al ₂	39.56±4.14	38.00±7.34	33.81±6.91	35.92±3.63	39.61±5.72	40.88±8.17	36.03±5.35
La ₁	35.31±4.34	35.57±4.26	34.75±2.98	34.96±5.02	38.09±8.10	37.16±3.06	37.01±7.87
La ₂	40.88±2.02	41.08±6.24	40.80±5.44	40.82±4.38	40.76±3.06	38.37±2.69	36.94±2.30

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type (n=6).

* Significativement différent du groupe T: P<0.05.

** Significativement différent du groupe T: P<0.01.

L'excrétion fécale du phosphore chez les animaux des groupes traités au chlorure d'aluminium hexahydraté et au chlorure de lanthane hydraté est significativement plus élevée que celle du groupe témoin (excrétion du

phosphore augmentée d'environ 60%; $P<0.01$). A l'inverse, aucune différence significative n'a été mise en évidence pour l'excrétion fécale du calcium. De même, on ne constate aucune différence significative entre les différents groupes traités.

2.5. Etude de l'accumulation du lanthane dans l'organisme du rat après traitement à long terme (100 jours) au chlorure de lanthane hydraté.

L'étude de la complexation du phosphore alimentaire par le lanthane a mis en évidence le transfert possible du lanthane au travers de la barrière gastro-intestinale. C'est pourquoi nous avons mené cette étude qui doit nous permettre d'affirmer cette hypothèse.

Le tableau 14 présente les teneurs plasmatiques en lanthane (La) et en divers éléments (P, Ca, et Mg). Aucune trace significative de lanthane n'a pu être mise en évidence. Par contre, comme dans l'étude concernant la complexation du phosphore par le lanthane, le taux plasmatique en phosphore est significativement diminué (environ 50%, $P<0.01$) alors que la concentration en calcium est augmentée (environ 30%, $P<0.05$).

Tableau 14
Concentrations en lanthane (La) et de divers éléments (P, Ca, et Mg) dans le plasma (en mg.l^{-1} , excepté La: en $\mu\text{g.l}^{-1}$).

Groupes	La	P	Ca	Mg
T	5.34±1.78	90.30±12.82	128.38±15.27	30.68±9.40
La	5.31±1.98	46.32±10.84**	212.42±32.14*	29.30±6.91

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart-type (n=6).

*Significativement différent du groupe T (témoin) : $P<0.05$.

**Significativement différent du groupe T (témoin) : $P<0.01$.

Les résultats concernant les teneurs de lanthane retrouvées dans les différents tissus prélevés au bout du traitement à long terme au chlorure de lanthane hydraté apparaissent dans la figure 18. L'analyse des différents échantillons révèlent la présence significative de quantités non négligeables de lanthane dans la majorité des tissus prélevés. Ainsi, le fémur, la rate, les reins et surtout le foie et les poumons présentent une accumulation significative du lanthane ($P < 0.01$). Seul le cerveau ne présente pas de signe d'accumulation de lanthane.

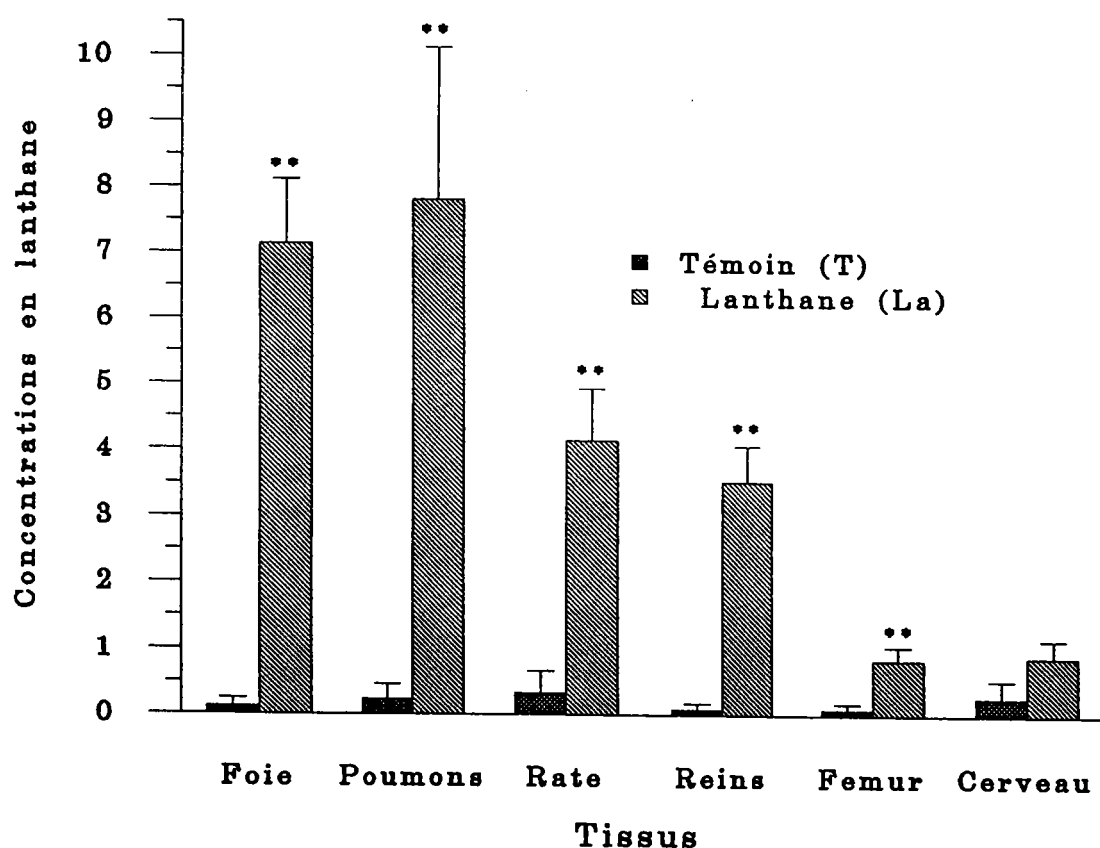


Figure 18: Concentrations en lanthane retrouvées dans les différents tissus après traitement au long terme au chlorure de lanthane hydraté ($\mu\text{g La.g}^{-1}$ de poids frais, excepté pour le fémur, $\mu\text{g La.g}$ de poids sec).

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart-type ($n=6$).

**Significativement différent du groupe témoin (T): $P < 0.01$.

Le tableau 15 présente les variations des teneurs en phosphore et en calcium dans les tissus des animaux traités à long terme au chlorure de lanthane. Ces résultats corroborent ceux observés lors de l'étude sur la complexation du phosphore. En effet, les teneurs en phosphore et en calcium du fémur sont significativement diminuées ($P<0.01$). En plus, on observe une diminution de la concentration du phosphore dans le foie ($P<0.01$) alors que celle du calcium reste invariable.

Tableau 15

Concentrations en phosphore total (P_{total}) et en calcium (Ca) dans les différents tissus.

P total (mg P.g⁻¹ de poids frais, excepté pour le Fémur: mg P.g⁻¹ de poids sec)

Groupes	Fémur	Foie	Rate	Reins	Cerveau	Poumons
T	69.85±2.57	3.27±0.27	2.98±0.22	2.82±0.15	2.69±0.29	1.59±0.15
La	18.60±6.78**	2.05±0.14**	3.01±0.32	2.86±0.13	2.79±0.32	1.56±0.19

Ca (µg Ca.g⁻¹ de poids frais, excepté pour le Fémur: mg Ca.g⁻¹ de poids sec)

Groupes	Fémur	Foie	Rate	Reins	Cerveau	Poumons
T	155.30±11.24	83.32±9.36	102.57±18.55	183.71±21.94	186.83±51.69	168.96±14.31
La	99.85±12.54**	84.01±6.09	100.35±16.24	184.57±12.13	189.53±29.05	163.39±15.06

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type (n=6).

** Significativement différent du groupe T ($P<0.01$).

On peut observer que lors de cette étude à long terme les teneurs en phosphore sont nettement plus diminuées que lors de l'étude sur la complexation du phosphore alimentaire. Par conséquent, on peut donc supposer que le lanthane possède un potentiel chélateur vis à vis des phosphates.

3. CONCLUSION-DISCUSSION

L'accumulation aluminique est impliquée dans la genèse d'un certain nombre de pathologies chez des sujets déficients rénaux, comprenant l'ostéomalacie et d'autres ostéodystrophies moins sévères, l'encéphalopathie des dialysés, l'anémie microcytaire, l'arthropathie... (ALFREY et coll., 1976; OTT et coll., 1982; DRUEKE, 1986; NETTER et coll., 1991). Les principales sources d'exposition à l'aluminium sont les liquides de dialyse comprenant des quantités non négligeables de métal ainsi que les traitements destinés à lutter contre l'hyperphosphatémie constitués par des gels d'aluminium (PARKINSON et coll., 1979; DEWBERRY et coll., 1980; OTT et coll., 1982). Depuis la mise en évidence des pathologies associées à l'accumulation aluminique, la mise en place de traitements de l'eau de dialyse (osmose inverse,...) a permis de réduire de façon notable l'incidence de ces syndromes (PARKINSON et coll., 1979; PIERIDES et coll., 1980). Cependant, l'utilisation des gels d'aluminium pour lutter contre l'hyperphosphatémie continue et demeure une source non négligeable d'apport d'aluminium pour l'organisme (DEWBERRY et coll., 1980; OTT et coll., 1982). Le rôle de l'aluminium dans la genèse des atteintes osseuses chez les patients urémiques a été bien défini (CUSHNER et ADAMS, 1986; NEBEKER et COBURN, 1986) et il semble prudent de réduire l'exposition aluminique en limitant les administrations des produits incriminés et en relançant la recherche de nouveaux composés de remplacement.

Au cours de cette étude, nous avons tenté de mettre en évidence l'efficacité à complexer le phosphore alimentaire et l'innocuité de deux composés (zirconium et lanthane) chez le Rat. Les résultats obtenus semblent indiquer qu'aussi bien le lanthane que le zirconium sont des

candidats potentiels pour supplanter l'aluminium dans le traitement de l'hyperphosphatémie des patients dialysés chroniques.

Les variations de poids observés lors du traitement complexant avec les divers composés (figure 17) peuvent s'expliquer aisément. En effet, compte-tenu de l'efficacité des différentes molécules à chélater le phosphore alimentaire, les animaux présentent tout au long du traitement une carence en phosphore. Cette hypothèse est d'ailleurs confirmée par les différences observées dans les prises pondérales entre les diverses doses de chélateur administrées. Par exemple, pour le zirconium, le retard pondéral est d'autant moins marqué que la dose de complexant est faible. En effet, pour le groupe Zr_3 , la différence devient nulle entre animaux traités et animaux témoins. Par conséquent, le retard observé dans les autres groupes provient de la carence en phosphore engendrée par les phénomènes de complexation. Il faut noter en plus que la dose la plus élevée utilisée dans cette étude correspond à l'apport journalier en phosphore contenu dans l'alimentation. Par conséquent, si le complexant est efficace à 100%, les animaux traités avec ce composé n'auraient plus aucun apport alimentaire en phosphore.

De plus, même les animaux traités avec l'aluminium, molécule couramment utilisée dans le domaine thérapeutique, connaissent un retard équivalent dans leur croissance pondérale. Par conséquent, ce retard ne représente pas d'inquiétude particulière quant à la toxicité des différents produits.

Au cours de cette étude, différentes doses de chélateurs ont été testés. Les concentrations en phosphore et en calcium retrouvées dans le plasma (tableau 4) indiquent, qu'aussi bien le lanthane que le zirconium sont capables de réduire les teneurs plasmatiques en phosphore et en calcium de manière aussi significative que l'aluminium. Seul le groupe Zr_3 (traité avec une dose d'oxychlorure de zirconium correspondant au quart de la dose du groupe Zr_1 , c'est à dire une mole de zirconium pour quatre moles de phosphore alimentaire) ne présente pas de diminution du taux de phosphore plasmatique. Cette dose de chélateur est certainement trop faible pour engendrer un quelconque effet sur la concentration plasmatique en phosphore, car à cette concentration la fonction rénale est capable, grâce à des phénomènes de réabsorption, de compenser la carence en phosphore. En

fait, si la quantité de complexant est trop faible, la fonction rénale est susceptible de réabsorber le phosphore contenu dans les urines et par conséquent, de maintenir la concentration plasmatique du phosphore à un niveau constant (WALTON et GRAY, 1979). Ainsi, la concentration plasmatique en phosphore reste inchangée et les apports vers les différents tissus restent constants.

Mis à part le groupe Zr_3 , aucune différence significative n'a été trouvée entre les différents groupes traités.

Les résultats obtenus concernant les concentrations en calcium dans le plasma confirment ceux obtenus pour le phosphore. En effet, lorsque le taux plasmatique en phosphore diminue celui du calcium augmente. Ce phénomène s'explique aisément par le fait que le phosphore dans l'organisme se trouve essentiellement sous forme de phosphate tricalcique (notamment au niveau osseux). Or seul l'apport journalier en phosphore a été diminué, ainsi le calcium se retrouve en quantité excédentaire. Ainsi, l'équilibre phosphore-calcium est respecté grâce à la balance phospho-calcique. Ce phénomène est d'ailleurs à mettre en parallèle avec celui observé pour le calcium et le phosphore au niveau du fémur que nous détaillerons plus loin.

Les autres éléments minéraux analysés dans le plasma ne présentent aucune variation entre les différents groupes traités et/ou témoin. Il était important de vérifier les teneurs de ces différents éléments pour vérifier leur non complexation par les différents chélateurs utilisés, même si la chimie pouvait nous laisser deviner ce résultat.

Au niveau des tissus analysés, seul les teneurs en calcium et en phosphore du fémur sont influencées de manière significative (tableau 5). En effet, les concentrations de ces deux éléments sont significativement diminuées dans tous les groupes traités excepté pour le calcium dans le groupe Zr_3 . Pour argumenter encore la diminution de la prise pondérale des animaux traités (sauf Zr_3), il faut relever que consécutivement à la diminution des concentrations en phosphore et en calcium du fémur, il apparaît une diminution du poids du fémur (0.641 ± 0.02 g pour les témoins vs 0.558 ± 0.04 g chez les traités; $P < 0.01$, $n=6$) entre animaux traités (sauf Zr_3) et animaux témoins. Aucune différence entre les différents groupes d'animaux traités n'a pu être mise en évidence (sauf Zr_3). Donc déjà au niveau osseux, et si on étend ce phénomène à tout le squelette, la différence

pondérale est conséquente et pourrait à elle seule expliquer le retard de croissance de ces animaux. En fait, il se produit une déminéralisation du tissu osseux; l'organisme essaie ainsi de compenser le manque de phosphore.

La concentration en calcium diminue de la même manière que celle du phosphore car, au niveau osseux, le phosphore est incorporé sous forme de phosphate tricalcique. Or le phosphore est indisponible du fait de sa complexation par les divers chélateurs et sa concentration osseuse diminue du fait des phénomènes de déminéralisation. Ainsi, le calcium ne peut pas être incorporé au niveau osseux et sa concentration osseuse diminue alors son taux plasmatique augmente. En effet, si le taux plasmatique du phosphore est trop bas, l'organisme va utiliser le phosphore osseux pour maintenir son équilibre biochimique (ATP, ADP, etc...). Par conséquent, la minéralisation osseuse sera incomplète et la croissance osseuse ralentira. Le calcium ne pouvant être incorporé dans l'os sous forme de phosphate tricalcique, sa concentration plasmatique va augmenter alors que celle de l'os va décroître.

Les résultats concernant les autres tissus démontrent que la principale réserve de phosphore de l'organisme est le tissu osseux. Les teneurs en phosphore des autres organes ne sont donc pas influencées par le traitement complexant, sauf dans le cas de traitement à très long terme et à très forte dose en complexant (voir étude à long terme au chlorure de lanthane hydraté) dans laquelle la carence en phosphore devient tellement importante que l'organisme n'a plus d'autre alternative que d'utiliser le phosphore présent dans d'autres tissus que le tissu osseux.

L'étude de l'excrétion urinaire du phosphore et du calcium (tableau 9) met en évidence le rôle important joué par les reins. En effet, quand l'organisme se trouve carencé en phosphore, les reins permettent la réabsorption du phosphore urinaire afin de maintenir la concentration plasmatique inchangée et ainsi de garantir un apport suffisant de phosphore aux différents tissus (notamment le tissu osseux). C'est pourquoi, il était très important de suivre l'excrétion urinaire au long du traitement complexant. En effet, chez des sujets "sains" (sans déficience rénale) avec une alimentation normale, l'excès de phosphore qu'apporte la nourriture est excrété dans les urines par l'intermédiaire de la fonction rénale. Ainsi, la

concentration urinaire normale en phosphore est toujours relativement élevée compte-tenu de la richesse en phosphore d'une alimentation équilibrée. Par conséquent, la baisse de la concentration urinaire de phosphore est un excellent signal d'alarme pour prévenir une déplétion phosphorée de l'organisme. Or au cours de notre étude, le taux urinaire de phosphore diminue chez les animaux des groupes traités comparativement au groupe des animaux témoins dès le troisième jour du traitement. Ce résultat indique clairement que dès le troisième jour de traitement chélateur, les animaux traités subissent une déplétion phosphorée que leurs organismes essaient de soulager par une importante réabsorption du phosphore urinaire. Par la suite, l'organisme ne parvenant pas à rétablir un équilibre phosphoré suffisant du fait de l'efficacité de la complexation, les animaux subissent un retard dans leur croissance pondérale (excepté Zr_3), l'organisme étant obligé de puiser dans les réserves de phosphore que constitue le tissu osseux. Ces phénomènes montrent bien l'efficacité des différents traitements utilisés à complexer le phosphore alimentaire. Par conséquent, aussi bien le lanthane que le zirconium sont capables de réduire de façon significative l'apport alimentaire journalier de phosphore.

L'étude de l'excrétion fécale du phosphore et du calcium (tableau 13) permet la confirmation des observations effectuées lors de l'étude de l'excrétion urinaire. En effet, compte-tenu de notre mode opératoire (les animaux étant placés un jour sur trois en cage à métabolisme), il est impossible d'effectuer un suivi quantitatif de l'excrétion fécale du phosphore et du calcium. C'est pour cette raison que nous n'avons pas effectué de dosage d'aluminium ou de lanthane dans les fèces même si nous avons vérifié par quelques mesures la présence d'importantes quantités de ces deux molécules dans les fèces. Malheureusement, comme il est impossible de distinguer l'aluminium ou le lanthane libre de leurs complexes avec le phosphore, l'extension de ces mesures sur toute la durée de l'expérimentation n'aurait présenté que peu d'intérêt.

En fait, cette étude permet uniquement de mettre en évidence l'élévation de l'excrétion fécale de phosphore. Celle-ci s'explique par la complexation du phosphore alimentaire par les composés utilisés. Ainsi, il se forme dans le tractus gastro-intestinal des phosphates d'aluminium de lanthane ou de zirconium qui précipitent et qui seront éliminés dans les fèces. C'est pourquoi, on observe une augmentation des teneurs en

phosphore dans les fèces des animaux traités (excepté les animaux traités à l'oxychlorure de zirconium pour lesquels l'analyse des fèces s'est révélée inexploitable; voir ci-après). L'analyse du calcium contenu dans les fèces montre la non-variabilité des résultats. Le calcium ne présentant pas d'affinité avec les complexants utilisés, reste dans le tractus gastro-intestinal et est réabsorbé normalement au niveau intestinal. Comme il ne peut former de phosphates tricalciques du fait de la carence en phosphore, sa concentration augmente au niveau plasmatique en même temps que sa concentration urinaire, seule voie d'élimination possible.

Concernant le zirconium, une étude antérieure (DELONGEAS et coll., 1983) révélait qu'une faible fraction du zirconium administrée par gavage pouvait être absorbée et se fixée de manière élective au niveau des ovaires et dans un degré moindre au niveau des poumons et de l'os. De plus, ce travail rapportait que le zirconium absorbé était éliminé par voie urinaire. Cependant, au cours de notre étude, nous n'avons jamais réussi à mettre en évidence la moindre fixation de zirconium au niveau des tissus (poumons, os, etc...) et même la moindre présence de trace de zirconium dans les urines ou le plasma. On peut donc supposer que les résultats obtenus par DELONGEAS et coll. (1983) proviennent de problèmes liés à leur technique analytique. En effet, les déterminations de zirconium ont été effectuées à l'aide d'une technique spectrophotométrique (CHARLOT, 1974). Or la limite de détection de cette méthode et le domaine d'application des concentrations étudiées interdisent toute dilution du plasma, des urines ou des solutions de tissus minéralisés. Par conséquent, ces échantillons ne peuvent produire des résultats suffisamment précis et sûrs pour permettre des conclusions significatives. De plus, cette technique est très sensible aux interférences que peuvent produire les autres éléments.

En plus, nous nous permettons d'émettre de telles hypothèses car nous avons testé les possibilités de transfert du zirconium par une technique d'ultrafiltration (similaire à celle utilisée dans le chapitre I sur la chélation de l'aluminium) sur du sérum de bovin. Or, aucune trace de zirconium soluble ou de masse inférieure à 10000 daltons n'a pu être retrouvée. Par conséquent, il paraît plus qu'improbable que le zirconium puisse être absorbé au niveau intestinal, véhiculé par le sang et fixé par les divers tissus. Ces observations sont d'ailleurs en parfaite adéquation avec les données fournies par la chimie du zirconium, c'est à dire que celui-ci

précipite en présence de phosphate dès $\text{pH} \approx 2$ (PIED et CAMESCASSE, 1932).

Nous avons vérifié en plus, l'absence de zirconium dans les tissus des animaux traités à l'oxychlorure de zirconium. Ni les poumons ni aucun autre tissu analysé ne présente le moindre trace de zirconium (tableau 6). Le plasma comme les urines sont également exempts de toute trace de zirconium (Tableau 10).

L'hypothèse du passage du zirconium au travers de la barrière gastro-intestinale paraît d'autant moins probable quand on s'attache à notre tentative de solubilisation des fèces des animaux traités à l'oxychlorure de zirconium. En effet, il nous a été quasiment impossible de remettre en solution la totalité des phosphates de zirconium précipités dans les fèces. Par conséquent, il nous est permis de penser qu'après précipitation du phosphore par le zirconium, ce dernier ne peut plus franchir les différentes barrières qui lui permettrait d'atteindre les tissus pour s'y fixer. Ce phénomène est d'autant plus improbable qu'aux pH rencontrés au sein de l'organisme, le zirconium, s'il n'est précipité sous forme de phosphates, se trouvera sous forme de précipités d'oxydes de zirconium (ZrO_2) insolubles. Pour en revenir à cette mise en solution des fèces des animaux traités à l'oxychlorure de zirconium, la seule minéralisation qui a réussi est celle basée sur une attaque à l'acide fluorhydrique à chaud sur bain de sable de Fontainebleau (HF ; MERCK). Malheureusement, une telle mise en solution ne permet plus le dosage du zirconium ou du phosphore, compte-tenu du danger et de l'agressivité de la solution obtenue. C'est pourquoi, nous avons décidé de ne pas doser le phosphore dans les fèces de ces animaux étant donné que l'efficacité du composé était déjà largement mise en évidence par la très grande diminution de la concentration du phosphore dans les urines et dans le fémur.

Les résultats obtenus avec le chlorure d'aluminium étaient prévisibles aussi bien pour son efficacité à complexer le phosphore alimentaire que pour son passage au travers de la barrière gastro-intestinale et de sa fixation au niveau des différents tissus. En effet, l'aptitude de l'aluminium à chélater le phosphore est actuellement largement utilisée dans le domaine thérapeutique pour lutter contre l'hyperphosphatémie des patients déficients rénaux dialysés chroniques. C'est d'ailleurs pour cette raison que nous l'avons utilisé comme point de

repère. Malheureusement, sa facilité à être absorbée au niveau intestinale en limite l'utilisation.

Tous ces phénomènes ont donc été vérifiés tout au long de notre expérimentation. D'une part, son efficacité non négligeable a été mise en évidence par la diminution des concentrations en phosphore dans la plasma, le fémur, les urines et les fèces et son accumulation dans différents tissus a été vérifiée par les nombreux dosages effectués dans ce chapitre.

Le cas du lanthane est beaucoup plus original. En effet, l'intérêt lié à son importante capacité à complexer le phosphore alimentaire est partiellement diminué par la possibilité de transfert au travers de la barrière gastro-intestinale et de la fixation au sein de différents tissus (figure 18). On peut ainsi penser que le lanthane se comporte comme l'aluminium; il franchit la barrière intestinale, est véhiculé par le sang et peut s'accumuler dans les organes. Cependant, quand on exprime les résultats obtenus lors du traitement à long terme au chlorure de lanthane hydraté en concentration molaire, on s'aperçoit que l'accumulation du lanthane est beaucoup moins importante que les premiers résultats pouvaient le laisser penser (en fait des concentrations $<0.07 \mu\text{mol La.g}^{-1}$; PM de La = 139). Ainsi, cette accumulation devenait plus faible que celle obtenue lors du traitement avec la même concentration molaire en aluminium. Par exemple, lors du traitement complexant, le lanthane s'accumule uniquement dans le foie pour les deux groupes traités au chlorure de lanthane hydraté (La_1 et La_2) alors que l'aluminium s'accumule dans tous les tissus exceptés les poumons, le fémur et le cerveau pour Al_1 et Al_2 (tableaux 7 et 8). De plus, l'aluminium est présent dans les urines des deux groupes traités (Al_1 et Al_2) alors que dans les urines du groupe La_2 aucune trace significative de lanthane n'a pu être mise en évidence.

Par conséquent, on peut certifier que l'accumulation molaire du lanthane est plus faible que celle de l'aluminium.

En conclusion, l'utilisation de l'oxychlorure de zirconium et du chlorure de lanthane hydraté pourrait être une alternative intéressante au traitement incluant des composés aluminiques pour lutter contre l'hyperphosphatémie et réguler ainsi le métabolisme phospho-calcique. En

effet, ces substances sont capables de complexer le phosphore alimentaire et de la précipiter afin d'être éliminé via les fèces. Par conséquent, l'absorption intestinale du phosphore est significativement diminuée. Malheureusement, le lanthane est susceptible d'être absorbé et de s'accumuler au sein de l'organisme. Cependant, les concentrations utilisées dans cette étude, sur une période relativement brève (pour l'étude sur la complexation), sont certainement supérieures à celles nécessaires au traitement de patients dialysés à long terme. Le risque de transfert du lanthane au travers de la barrière gastro-intestinale serait alors certainement diminué et l'accumulation serait également réduite, même si les propriétés chimiques du lanthane le prédisposait à une possible absorption intestinale (le lanthane reste facilement en solution à pH=7 à 8; BOURION, 1933). Par conséquent, de plus amples études sur les différents composés du lanthane seront nécessaires pour déterminer l'intérêt thérapeutique de ces composés.

Pour le zirconium, malgré l'utilisation de larges doses de complexants, aucun phénomène d'accumulation n'a pu être mis en évidence. Comme le lanthane, les propriétés chimiques du zirconium pouvaient laisser sous-entendre un tel résultat; au dessus de pH=3 à 4, le zirconium se maintient difficilement en solution, sauf en présence d'une large quantité de fluorure, le principal chélateur du zirconium (PIED et CAMESCASSE, 1932). Cette absence d'absorption intestinale du zirconium est très intéressante car elle interdit pratiquement tout phénomène d'effets secondaires. De plus, compte-tenu de son efficacité largement équivalente à celle de l'aluminium puisqu'au quart de notre dose on constate encore un effet au niveau du fémur et des urines, le zirconium se présente quasiment comme le candidat idéal au remplacement de l'aluminium dans le traitement de l'hyperphosphatémie.

Bien-entendu, des études supplémentaires seront nécessaires pour vérifier la complète innocuité de cette molécule.

Conclusion

III. Conclusion Générale.

L'étude des potentialités de chélation de l'aluminium par de nouvelles molécules a été abordée par une approche *in vitro* suivie d'une approche *in vivo*.

L'approche *in vitro* a permis la mise en évidence de la capacité chélatrice de plusieurs composés. En effet, la polarographie impulsionnelle permet de vérifier rapidement et à moindre coût le potentiel complexant de nouvelles molécules vis à vis de l'aluminium ou de tout autre métal ou métalloïdes. Ainsi, parmi les composés testés par polarographie, le CDTA, l'EGTA, le DTPA, le NTA, l'HEDTA, les acides tartrique et citrique, l'HAES, l'HBED et l'EDDHA présentaient les meilleures prédispositions pour une étude plus poussée. La comparaison avec deux chélateurs confirmés de l'aluminium achèverait l'évaluation des nouvelles molécules. C'est pourquoi, avant de passer à l'étude sur un modèle animal, pour limiter l'utilisation excessive d'animaux, l'utilisation de la technique d'ultrafiltration combinée à l'analyse par DCP-SEA s'est révélée très intéressante. Il en ressort que l'HEDTA se présente comme l'acide polyaminocarboxylique le plus efficace dans la chélation de l'aluminium préalablement fixé aux protéines sériques et ce malgré une constante de stabilité ($\log K$) avec l'aluminium relativement moyenne ($\log K=14$; BHAT et coll., 1967) comparée à celle de l'EDTA ou même du CDTA (respectivement 16.1 et 17.6; RINGBOM, 1967). Cependant, nous avons mis en évidence dans le chapitre I combien la valeur de cette constante pouvait être relative. Il est intéressant de relever que la technique utilisée peut refléter parfaitement le potentiel chélateur *in vivo* des différents chélateurs envisagés.

Dans la technique utilisant l'ultrafiltration, l'EDDHA possède également une capacité de chélation vis à vis de l'aluminium importante, quasi équivalente à celle du DFO testé en tant que référence. Il fallait donc vérifier si l'efficacité de l'HEDTA et de l'EDDHA restait intacte lors d'un traitement chélateur sur des animaux préalablement intoxiqués au chlorure d'aluminium. Même si certains autres composés présentaient une efficacité non négligeable (HBED, DTPA, etc...), leur toxicité interdisait toute expérimentation animale. Par contre, d'autres molécules ont été retenues malgré un potentiel chélateur moyen mais néanmoins non négligeable, à

cause de leur absolue nouveauté et après consultation des données toxicologiques données par les fournisseurs.

L'étude *in vivo* a été effectuée sur des rats Wistar intoxiqués au chlorure d'aluminium hexahydraté à la dose de 2 mg Al.kg^{-1} pour limiter les phénomènes de péritonite liés à l'injection intrapéritonéale de trop fortes doses de composés aluminiques. Après un traitement chélateur de deux semaines et après avoir suivi l'excrétion urinaire de l'aluminium durant ce traitement, les animaux ont été sacrifiés et différents tissus ont été prélevés. L'analyse des tissus a révélée que seul l'HEDTA (DFO mis à part) était capable de diminuer d'une manière significative (équivalente voir supérieure à celle du Desferal®) les concentrations aluminiques présentes dans différents tissus. Le résultat obtenu dans l'approche *in vivo* confirme bien les premières observations effectuées à partir de l'étude polarographique et de l'étude effectuée sur le sérum de bovin. A l'inverse, l'EDDHA qui présentait des potentialités chélatrices très intéressantes vis à vis de l'aluminium lors des études *in vitro*, se révèle comme un complexant médiocre de l'aluminium accumulé dans l'organisme. De plus, cette molécule possède des propriétés toxiques très marquées qui se traduisent notamment par une atteinte rénale expliquant les résultats positifs enregistrés par d'autres auteurs (YOKEL et coll., 1991) qui ne suivaient que l'excrétion urinaire de l'aluminium après un traitement à l'EDDHA. Les autres complexants n'ont présenté au cours de notre étude qu'une efficacité très médiocre (même l'EDTA, chélateur déjà utilisé dans l'accumulation aluminique).

Par conséquent, l'HEDTA se présente à priori comme un candidat très sérieux pour le traitement de l'accumulation aluminique (en remplacement du DFO, générateur d'effets secondaires importants) chez les sujets déficients rénaux soumis à une administration importante d'aluminium par le biais des composés aluminiques destinés à régulariser leur métabolisme phospho-calcique. Il est bien entendu que l'HEDTA devra subir des études beaucoup plus approfondies avant d'être testé lors d'essais cliniques chez des êtres humains. Néanmoins, les premiers résultats obtenus ici semblent très encourageants.

Comme nous l'avons déjà signalé, les techniques utilisées ici présentent des perspectives intéressantes pour la recherche de nouvelles molécules complexantes de l'aluminium et des métaux en général. En effet, elles

permettent une évaluation rapide et peu onéreuse de la capacité complexante des nouveaux composés et de l'intérêt qu'il faut leur porter ou non.

Concernant la chélation de l'aluminium, l'intérêt premier serait de limiter les sources d'exposition des patients dits "à risque". Cependant, malgré la mise en place de systèmes de traitement de l'eau et des solutés destinés à la dialyse, le corps médical ne peut pas ramener cette exposition à un degré nulle du fait de l'utilisation indispensable des gels d'alumine dans la régulation du métabolisme phospho-calcique des sujets dialysés. Par conséquent, l'utilisation d'un complexant du phosphore alimentaire ne contenant pas d'aluminium serait recommandé. C'est pourquoi, la deuxième partie de ce travail concerne la recherche de nouveaux complexants du phosphore alimentaire.

L'étude des potentialités chélatrices de deux composés a ainsi été recherchée chez des rats Wistar subissant un régime alimentaire standard supplémenté en chélateur.

A l'inverse du premier chapitre de ce travail, il n'était pas nécessaire de passer par une approche *in vitro* pour étudier la capacité complexante de plusieurs molécules vis à vis du phosphore alimentaire. En effet, les données de la chimie nous apportait suffisamment de garanties quant à l'efficacité de ces molécules à former des complexes avec le phosphore en milieu aqueux. De plus, le mode d'administration des composés étant beaucoup moins coercitif pour les animaux, il était beaucoup plus aisé et judicieux d'entamer cette étude directement sur des animaux.

Ainsi, le chlorure de lanthane hydraté et l'oxychlorure de zirconium se sont révélés comme de très bons complexants du phosphore alimentaire. En effet, après un traitement de trois semaines, les teneurs en phosphore sont significativement diminuées dans le fémur, les urines et le plasma dans la quasi totalité des groupes traités avec ces deux composés. Cette efficacité est corroborée par la comparaison avec un traitement au chlorure d'aluminium hexahydraté.

Malheureusement, le traitement au chlorure de lanthane entraîne un phénomène d'accumulation de celui-ci dans l'organisme des animaux traités. Cependant, en comparaison avec l'aluminium, cette accumulation est nettement moins importante. Ainsi, les conséquences de cette accumulation pourraient l'être également et ne pas interdire l'utilisation possible du lanthane dans le traitement de l'hyperphosphatémie. Bien-entendu de plus amples informations concernant le lanthane seront nécessaires avant de pouvoir conclure.

Avec le zirconium, aucun phénomène d'accumulation ni même de passage au travers de la barrière gastro-intestinale n'a pu être mis en évidence tout au long du traitement, malgré une étude antérieure révélant l'existence de teneurs significatives de zirconium chez des souris traités à l'oxychlorure de zirconium (DELONGEAS et coll., 1983). Par conséquent, le zirconium se présente comme un candidat idéal pour la complexation du phosphore alimentaire. Des études supplémentaires seront nécessaires avant d'envisager des essais cliniques mais les premiers résultats obtenus ici présentent un intérêt non négligeable pour des perspectives thérapeutiques futures.

En conclusion, nous pensons qu'il serait intéressant de poursuivre les investigations concernant l'innocuité de l'utilisation de l'HEDTA dans le traitement de la surcharge aluminique. De même, la possibilité d'utiliser l'oxychlorure de zirconium et même le chlorure de lanthane hydraté dans le traitement de l'hyperphosphatémie des dialysés nécessite d'être plus approfondie afin de vérifier leur degré de toxicité car leur efficacité a été dans ce chapitre largement démontrée.

Enfin, les techniques relatées tout au long de ce mémoire présentent des perspectives d'avenir pour la recherche de nouveaux complexants de divers métaux ou métalloïdes.

Références bibliographiques

VI. Références bibliographiques.

Les abréviations des revues utilisées dans ce chapitre sont celles relatives aux CURRENT CONTENTS, Institute for Scientific Information.

- ABRAMSON M.J., WLODARCZYK J.H., SAUNDERS N.A. & HENSLEY M.J. (1989).** Does aluminum smelting cause lung disease ? *Amer. Rev. Resp. Dis.* 139: 1042-1057.
- ABREO K., GLASS J. & SELLA M.L. (1990).** Aluminum inhibits hemoglobin synthesis but enhances iron uptake in friend erythroleukemia cells. *Kidney Int.* 37: 677-681.
- ACKRILL P., RALSTON A.J., DAY J.P. & HODGE K.C. (1980).** Successful removal of aluminium from patient with dialysis encephalopathy. *Lancet II*: 692-693.
- ACKRILL P., DAY J.P., GARSTANG F.M., HODGE K.C., METCALFE P.J., BENZO Z., HILL K., RALSTON A.J. & DENTON J. (1982).** Treatment of fracturing renal ostedistrophy by desferrioxamine. *Proc. Eur. Dial. Transplant. Assoc.* 19: 203-207.
- ACKRILL P. & DAY J.P. (1984).** Therapy of aluminium overload (II). *Contr. Nephrol.* 38: 78-80.
- ACKRILL P. & DAY J.P. (1985).** Desferrioxamine in the treatment of aluminum overload. *Clin. Nephrol.* 24: 594-597.
- ACKRILL P., RALSTON A.J. & DAY J.P. (1986).** Role of desferrioxamine in the treatment of dialysis encephalopathy. *Kidney Int.* 29: S.104-S.107.
- ACKRILL P. & DAY J.P. (1993).** The use of desferrioxamine in dialysis-associated aluminium disease. In BourkeE., Mallick N.P., Pollak V.E. (eds): *Moving points in nephrology.* Contrib. Nephrol. Basel, Karger, 102: 125-134.
- ADHEMAR J.P., LAEDERICH J., JAUDON M.C., MASSELOT J.P., GALLI A. & KLEINKNECHT D. (1980).** Removal of aluminum from patients with dialysis encephalopathy. *Lancet II*: 1311.
- ADLER A.J. & BERLYNE G.M. (1985).** Duodenal aluminum absorption in the rat: effect of vitamin D. *Amer. J. Physiol.* 12: 209-213.
- ADLER A.J., LEE J. & BERLYNE G.M. (1986).** Aluminum binding activity in canine duodenal mucosal extracts. *Biomed. Pharmacotherapy.* 40: 269-271.
- ADLER A.J., ZARA C. & BERLYNE G.M. (1989).** Effect of aluminum on bidirectional calcium flux in rat everted intestinal sacs. *Amer. J. Physiol.* 257: 433-437.

- AISEN P., LEIBMAN A. & ZWEIER J. (1978).** Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *J. Biol. Chem.* **253**: 1930-1937.
- AKESON M.A., MUNNS D.N. & BURAU R.G. (1989).** Adsorption of Al^{3+} to phosphatidylcholine vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* **986**: 33-40.
- ALAIS C. & LINDEN G. (1991).** Les aliments dans le tube digestif. Dans *Abrégés de Biochimie Alimentaire*, MASSON Eds, Paris: 160.
- ALDERMAN F.R. & GIDELMAN H.J. (1980).** Improved electrothermal determination of aluminium in serum by atomic absorption spectroscopy. *Clin. Chim. Acta.* **26**: 258-260.
- ALFASSI Z.B. & RIETZ B. (1994).** Determination of aluminium by instrumental neutron activation analysis in biological samples with special reference to NBS SRM 1577 bovine liver. *Analyst.* **119**: 2407-2410.
- ALFREY A.C., MISHELL J.M., BURKS J., CONTIGUGLIA S.R., RUDOLPH H., LEWIN E. & HOLMES J.H. (1972).** Syndrome of dyspraxia and multifocal seizures associated with chronic hemodialysis. *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs.* **18**: 257-261.
- ALFREY A.C., LEGENDRE G.R. & KAEHNY W.D. (1976).** The dialysis encephalopathy syndrome: possible aluminum intoxication. *N. Engl. J. Med.* **294**: 184-188.
- ALFREY A.C., HEGG A. & CRASWELL P. (1980).** Metabolism and toxicity of aluminum in renal failure. *Amer. J. Clin. Nutr.* **33**: 1509-1516.
- ALFREY A.C. (1983).** Aluminum. *Adv. Clin. Chem.* **23**: 69-91.
- ALFREY A.C. (1984).** Aluminum intoxication. *N. Engl. J. Med.* **310**: 1113-1115.
- ALLAIN P., CHALEIL D. & MAURAS Y. (1987).** Pharmacokinetics of desferrioxamine and its iron and aluminium chelates in patients on haemodialysis. *Clin. Chim. Acta.* **170**: 331-338.
- ALLAIN P., LEBLONDEL G. & MAURAS Y. (1988).** Effect of aluminum and deferoxamine on biliary iron elimination in the rat. *P. Soc. Exp. Biol. Med.* **188**: 471-473.
- ALLAIN P., MAURAS Y., KRARI N., DUCHIER J., COURNOT A. & LARCHEVEQUE J. (1990).** Plasma and urine concentrations in healthy subjects after administration of sucalfate. *Brit. J. Clin. Pharmacol.* **29**: 391-395.

- ALTMAN P., AL-SALIHI F., BUTTER K., CUTLER P., BLAIR J., LEEMING R., CUMMINGHAM J. & MARSH F. (1987).** Serum aluminium levels and erythrocyte dihydropteridine reductase activity in patients on haemodialysis. *N. Engl. J. Med.* *317*: 80-84.
- ALTMAN P., PLOWMAN D., MARSH F. & CUNNINGHAM J. (1988).** Aluminium chelation therapy in dialysis patients: evidence for inhibition of haemoglobin synthesis by low levels of aluminium. *Lancet I*: 1012-1015.
- ALVAREZ-HERNANDEZ X., MADIGOSKY S.R., STEWART B. & GLASS J. (1994).** Iron status affects aluminum uptake and transport by Caco-2 cells. *J. Nutr.* *124*: 1574-1580.
- ALZHEIMER A. (1907).** Ueber eine eigenartige erkrankung hirnrinde. *Allgemeine Z. Psychiatr.* *64*: 146-148.
- ANDERSEN J.R. (1988).** Aluminum in peritoneal dialysis fluid as determined by stabilised temperature platform furnace atomic absorption spectrometry. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* *6*: 29-33.
- ANDERSEN O. (1989).** Oral cadmium exposure in mice: toxicokinetics and efficiency of chelating agents. *Crit. Rev. Toxicol.* *20*: 83-112.
- ANDREOLI S.P., BERGSTEIN J.M. & SHERRARD D.J. (1984).** Aluminum intoxication from aluminum containing phosphate binders in children with azotemia not undergoing dialysis. *N. Engl. J. Med.* *310*: 1079-1084.
- ANDRESS D.L., MALONEY N.A., ENDRESS D.B. & SHERRARD D.J. (1986).** Aluminum-associated bone disease in chronic renal failure: high prevalence in a long-term dialysis population. *J. Bone Miner. Res.* *1*: 391-398.
- ANDRESS D.L., KOPP J.B., MALONEY N.A., COBURN J.W. & SHERRARD D.J. (1987).** Early deposition of aluminum in bone in diabetic patients of hemodialysis. *N. Engl. J. Med.* *316*: 292-296.
- ARAKELIAN S., D'HAESE P.C., VANEERDEWEG W., VERPOOTEN G.A. & DE BROE M.E. (1990).** Biliary and renal kinetics of aluminexamine and ferrioxamine in the dog. *J. Am. Soc. Nephrol.* *1*: 322-A.
- ARZE R.S., PARKINSON I.S., CARTLIDGE N.E.F., BRITTON F. & WAR M.K. (1981).** Reversal of aluminium dialysis encephalopathy after desferrioxamine treatment. *Lancet II*: 1116-1119.
- BAES C.E. & MESMER R.E. (1976).** The hydrolysis of cations. Eds John Wiley and sons, New York, 112.

- BAKER L.R.I., BARNETT M.D., BROZOVIC B., CATTEL W.R., ACKRILL P., McALISTER J. & NIMMON C. (1976).** Haemosiderosis in a patient on regular haemodialysis: treatment by desferrioxamine. *Clin. Nephrol.* 6: 326-328.
- BAKIR A.A., HRYHORCZUK D.O., BERMANE E. & DUNEA G. (1986).** Acute fatal hyperaluminemic encephalopathy in undialysed and recently dialysed uremic patients. *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs.* 32: 71-176.
- BAUDART G.A. (1975).** Réflexions sur une mutation. *Revue de l'Aluminium.* 117-120.
- BELATON C., ROCHE C., REMY C. & PANSU D. (1992).** Absorption du calcium: données physiologiques récentes. Conséquences diététiques. *Gastroenterol. Clin. biol.* 16: 239-247.
- BENNET R.W., PERSAUD T.V.N. & MOORE K.L. (1975).** Experimental studies on the effects of aluminum on pregnancy and fetal development. *Anat. Anzeiger.* 138: 365-378.
- BENNET R.J. & BREEN C.M. (1989).** Towards understanding root growth responses to environmental signals: the effect of aluminium on maize. *S. Afr. J. Sci.* 85: 9-12.
- BERDOUKAS V., BENTLEY P., FROST H. & SCHNEBLI H.P. (1993).** Toxicity of oral iron chelator L1. *Lancet* 341: 1088.
- BERGER B., TASSIN J.P., RANCUREL G. & BLANC G. (1980).** Catecholaminergic innervation of the human cerebral cortex in presenile and senile dementia. Histochemical and biochemical studies. In *Enzymes and neurotransmitters in mental disease*, Usdin E., Sourkes T.L. and Youdim M.B.H. John Wiley & sons Eds, 317-328.
- BERGER B. (1984).** Anomalies des neurotransmetteurs dans la maladie d'Alzheimer. *Rev. Neurol.* 140: 539-552.
- BERLYNE G.M., PEST D., BEN-ARI J., WEINBERGER G., STERN M., GILMORE G.R. & LEVINE R. (1970).** Hyperaluminaemia from aluminum resins in renal failure. *Lancet.* 2: 494-496.
- BERLYNE G.M., YAGIL R., BEN-ARI J., WEINBERGER G., KNOPF E. & DANOVITCH G.M. (1972).** Aluminum toxicity in rats. *Lancet I:* 564-567.
- BERNUZZI V., DESOR D. & LEHR P.R. (1989).** Developmental alterations in offspring of female rats orally intoxicated by aluminum chloride or lactate during gestation. *Teratology.* 40: 21-27.
- BERRY J.P., HENOC P. & GALLE P. (1978).** Phagocytosis by cells of pulmonary alveoli: transformation of crystalline particles. *Am. J. Pathol.* 93: 27-44.

- BERTHOLF R.L., BROWN S., RENOE B.W., WILLS M.R. & SAVORY J. (1983).** Improved determination of aluminium in serum by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Clin. Chem.* 29: 1087-1089.
- BERTHOLF R.L., WILLS M.R. & SAVORY J. (1984).** Quantitative study of aluminum binding to human serum albumin and transferrin by a chelate competitive binding assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125: 1020-1024.
- BERTHOLF R.L., HERMAN M.M., SAVORY J., CARPENTER R.M., STURGILL B.C., KATSETOS C.D., VANDENBERG S.R. & WILLS M.R. (1989).** A long term intravenous model of aluminum maltol toxicity in rabbits: tissue distribution, hepatic, renal and neuronal cytoskeletal changes associated with systemic exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 98: 58-74.
- BERTHON G. & DAYDE S. (1992).** Why aluminum phosphate is less toxic than aluminum hydroxide. *J. Am. Coll. Nutr.* 11: 340-348.
- BHAT T.R., RADHA R. DAS & SHANKAR J. (1967).** Complexes of aluminium with some polyaminocarboxylic acids. *Indian J. Chem.* 5: 324-327.
- BIA M.J., COOPER K., SCHNALL S., DUFFY T., HENDLER E., MALLUCHE H. & SALOMON L. (1989).** Aluminum induced anemia: pathogenesis and treatment in patients on chronic hemodialysis. *Kidney Int.* 36: 852-858.
- BIGAY J., DETERRE P., PFISTER C. & CHABRE M. (1987).** Fluoride complexes of aluminium and beryllium act on G-proteins as reversibly bound analogues of the γ phosphate of GTP. *EMBO J.* 6: 2907-2913.
- BIRCHALL J.D. & CHAPPEL J.S. (1987).** The solution chemistry of aluminium and silicon and its biological significance. Proceedings of the second international symposium on geochemistry and health (Editor: I. Thornton). Monograph series: geochemistry and health, science reviews ltd, 40, the Fairways, Northwood, Middlesex, HA63DY, U.K.
- BIRCHALL J.D. & CHAPPEL J.S. (1988).** The chemistry of aluminum and silicon in relation to Alzheimer's disease. *Clin. Chem.* 34: 265-267.
- BIRCHALL J.D., EXLEY C., CHAPPEL J.S. & PHILLIPS M.J. (1989).** Acute toxicity of aluminum to fish eliminated in silicon-rich acid waters. *Nature.* 338: 146-148.
- BISHOP N.J., ROBINSON M.J., LENDON M., HEWITT C.D. & O'HARA M. (1989).** Increased concentration of aluminium in the brain of a parenterally fed preterm infant. *Arch. Dis. Child.* 64: 1316-1317.
- BLOTCKY A.J., HOBSON D., LEFFLER J.A., RACK E.P. & RECKER R.R. (1976).** Determination of trace aluminium in urine by neutron activation analysis. *Anal. Chem.* 48: 1084-1088.

- BOELAERT J.R., VAN ROOST G.F., VERGAUWE P.L., VERBANCK J.J., DE VROEY C. & SEGAERT M.F. (1988).** The role of desferrioxamine in dialysis-associated mucormycosis: report of three cases and review of the literature. *Clin. Nephrol.* 29: 261-266.
- BOELAERT J.R., FENVES A.Z. & COBURN J.W. (1991).** Deferoxamine therapy and mucormycosis in dialysis patient: report of an international registry. *Am. J. Kidney Dis.* 18: 660-666.
- BOMMER J., WALDHERR R., WIESER P.H. & RITZ E. (1983).** Concomitant lysosomal storage of iron and aluminium dialysis patients. *Lancet I*: 1930.
- BONHOMME L., LOMBARD M.N., HALPERN S. & FRAGU P. (1989).** Augmentation de la concentration d'aluminium nucléaire pendant la régénération hépatique: étude par microscopie ionique analytique. *C. R. Acad. Sci. Ser III-Vie.* 308: 293-297.
- BOUKARI M., ROTTEMBOURG J., JAUDON M.C., CLAVEL J.P., LEGRAIN M. & GALLI A. (1978).** Influence de la prise prolongée de gels d'alumine sur les taux sériques d'aluminium chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique. *Nouv. Presse Méd.* 7: 85-88.
- BOURDEAU A.M., PLACHOT J.J., COURNOT-WITMER G., POINTILLART A., BALSAN S. & SACHS C. (1987).** Parathyroid response to aluminum in vitro: ultrastructural changes and PTH release. *Kidney Int.* 31: 15-24.
- BOURION F. (1933).** Eléments des terres rares- Lanthane. Dans *Traité de Chimie Minérale*, P. Pascal, tome VIII, Masson et Cie Eds., Paris; 1-137.
- BRAHM M. (1986).** Serum-aluminium in nondialysed chronic uremic patients before and during treatment with aluminium-containing phosphate-binding gels. *Clin. Nephrol.* 25: 231-235.
- BRENNER S.R. & YOON K.W. (1994).** Aluminum toxicity in rat hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* 178: 260-262.
- BRICKER N.S., SLATOPOLSKY E., REISS E. & AVIOLI L.V. (1969).** Calcium, phosphorus and bone in renal disease and transplantation. *Arch. Intern. Med.* 123: 543-553.
- BRICKER N.S. (1972).** On the pathogenesis of the uremic state. An exposition of the "trade-off hypothesis". *N. Engl. J. Med.* 286: 1092.
- BROWN D.J.A. (1983).** Effects of calcium and aluminum concentrations on the survival of Brown Trout (*Salmo trutta*) at low pH. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 30: 582-587.

- BROWN D.J., DAWBORN J.K., HAM K.N. & XIPPEL J.M. (1982).** Treatment of dialysis osteomalacia with desferrioxamine. *Lancet II*: 343-345.
- BROWN G.M., DONALDSON K. & BROWN D.M. (1989).** Bronchoalveolar leukocyte response in experimental silicosis: modulation by a soluble aluminum compound. *Toxicol. Appl. Pharmacol. 101*: 95-105.
- BUGE A., POISSON M., MASSON S., BLEIBEL J.M., LAFFORGUE B., RAYMOND P. & JAUDON M.C. (1978).** Encéphalopathie prolongée et réversible chez un dialysé chronique: responsabilité probable des sels d'aluminium. *Nouv. Presse Méd. 7*: 2053-2059.
- BUGE A., ESCOUROLLE R., POISSON M., GRAY F., BLEIBEL J.M. & JAUDON M.C. (1979).** Encéphalopathie progressive des dialysés: rôle de l'aluminium et étude neuropathologique. *Nouv. Presse Méd. 8*: 1071-1074.
- BUGIANI O. & GHETTI B. (1982).** Progressing encephalomyelopathy with muscular atrophy, induced by aluminum powder. *Neurobiol. Aging. 3*: 209-222.
- BURGESS E., MURUVE D. & AUDETTE R. (1992).** Aluminum absorption and excretion following sucralate therapy in chronic renal insufficiency. *Amer. J. Med. 92*: 471-475.
- BURKS J.S., ALFREY A.C., HUDDLESTONE J., NORENBURG M.D. & LEWIN E. (1976).** A fatal encephalopathy in chronic haemodialysis patient. *Lancet I*: 764-768.
- BURNATOWSKA-HLEDIN M.A., SCHWARTZ K., KOVAN J. & MAYOR G. (1985).** Effect of desferrioxamine (DFO) and ethylenediamine N,N'-bis(2-hydroxyphenylacetic) acid (EDBHPA) in aluminum (Al) loaded rats. *Kidney Int. 27*: 158.
- BURNEL D., HUTIN M.F., MASSON A. & NETTER P. (1982a).** Dosage de l'aluminium par polarographie impulsionnelle. *Ann. Fals. Exp. Chim. 75*: 177-183.
- BURNEL D., HUTIN M.F., NETTER P., KESSLER M., HURIET C. & GAUCHER A. (1982b).** Intérêt du dosage de l'aluminium osseux par polarographie impulsionnelle. *Pathol. Biol. 30*: 27-32.
- CAMPBELL I.R., CASS J.S., CHOLAK J. & KEHOE R.A. (1957).** Aluminum in the environment of man. A review of his hygienic status. *Arch. Industr. Health. 15*: 359-448.
- CAMPISTOL J.M., CASES A., BOTEY A. & REVERT A. (1989).** Acute aluminum encephalopathy in an uremic patient. *Nephron. 51*: 103-106.
- CANDY J.M., PERRY R.H., PERRY E.K., IRVING D., BLESSED G., FAIRBAIRN A.F. & TOMLINSON B.E. (1983).** Pathological changes in the nucleus of Meynert in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J. Neurol. Sci. 54*: 277-289.

- CANDY J.M., KLINOWSKI J., PERRY R.H., PERRY E.K., FAIRBAIRN A., OAKLEY A.E., CARPENTER T.A., ATTACK J.R., BLESSED G. & EDWARDSON J.A. (1986).** Aluminosilicates and seniles plaque formation in Alzheimer's disease. *Lancet I*: 354-357.
- CANDY J.M., Mc ARTHUR F.K. & OAKLEY A.E. (1992).** Aluminium accumulation in relation to senile plaques and neurofibrillary tangle formation in the brains of patients with renal failure. *J. Neurol. Sci.* 107: 210-218.
- CARLIER M.F., DIDRY D., MELKI R., CHABRE M. & PANTALONI D. (1988).** Stabilization of microtubules by inorganic phosphate and its structural analogues, the fluoride complexes of aluminium and beryllium. *Biochemistry.* 27: 3555-3559.
- CARTIER F., ALLAIN P., GARY J., CHATEL M., MENAULT F. & PECKER S. (1978).** Encéphalopathie myoclonique progressive des dialysés. Rôle de l'eau utilisée pour hémodialyse. *Nouv. Presse Méd.* 7: 97-103.
- CASATI S., CASTELNOVO C., CAMPISE M. & PONTICELLI C. (1990).** Aluminium interference in the treatment of haemodialysis patients with recombinant human erythropoietin. *Nephrol. Dial. Transplant.* 5: 441-443.
- CASES A., KELLY J., SABATER F., TORRAS A., CINTA GRINO M., LOPEZ-PEDRET J. & REVERT L. (1990).** Ocular and auditory toxicity in hemodialyzed patients receiving desferrioxamine. *Nephron.* 56: 19-23.
- CHAPPUIS P., DUHAUX L., PAOLAGGI F., DE VERNEJOL M.C. & ROUSSELET F. (1988).** Analytical problems encountered in determining aluminum status from hair in controls and hemodialyzed patients. *Clin. Chem.* 34: 2253-2255.
- CHARHON S.A., CHAVASSIEUX P., CHAPUY M.C., ACCOMINOTTI M., TRAEGER J. & MEUNIER P.J. (1986).** Traitement par la desferrioxamine de l'ostéomalacie par intoxication à l'aluminium. *Presse Méd.* 15: 55-59;
- CHARHON S.A., EL YAFI S., GAILLARD M., BERUARD M., JANIN G., ACCOMINOTTI M., TRAEGER J. & MEUNIER P.J. (1988).** Deferoxamine for the diagnosis and treatment of aluminum-associated osteodystrophy. *Contr. Nephrol.* 64: 160-169.
- CHARLOT G. (1963).** L'analyse quantitative et les réactions en solutions. Ed Masson, Paris.
- CHARLOT G. (1974).** Chimie analytique quantitative. Ed. Masson, Tome II, Paris.
- CHARY-VALCKENAERE I., FENER P., JOUZEAU J.Y., NETTER P., PAYAN E., FLOQUET J., BURNEL D., KESSLER M., POUREL J. & GAUCHER A. (1994).** Experimental articular toxicity of aluminum compounds in vivo. *J. Rheumatol.* 21: 1542-1547.

- CHASSARD-BOUCHAUD C. & GALLE P. (1986).** Bioaccumulation d'aluminium par les organismes marins. Mise en évidence par microscopie corpusculaire analytique. C. R. Acad. Sci. Ser III-Vie. 302: 55-61.
- CHAZAN J.A., BLONSKY S.L., ABUELO J.G. & PEZZULLO J.C. (1988).** Increased body aluminum. An independent risk factor patients undergoing long-term hemodialysis. Arch. Intern. Med. 148: 1817-1820.
- CHAZAN J.A., LEW N.L. & LOWRIE E.G. (1991).** Increased serum aluminum. An independent risk factor for mortality in patients undergoing long term hemodialysis. Arch. Intern. Med. 151: 319-322.
- CHERRORET G., BERNUZZI V., DESOR D., HUTIN M.F., BURNEL D. & LEHR P.R. (1992).** Effects of postnatal aluminum exposure on choline acetyltransferase activity and learning abilities in the rat. Neurotoxicol. Teratol. 14: 259-264.
- CHEVALIER G., GAUTHIER L. & MOREAU G. (1985).** Histopathological and electron microscopic studies of gills of brook trout, *Salvelinus fontinalis*, from acidified lakes. Can. J. Zool. 63: 2062-2070.
- CHMIELNICKA J., NASIADEK M., PINKOWSKI R. & PARADOWSKI M. (1994).** Disturbances of morphological parameters in blood of rats orally exposed to aluminum chloride. Biol. Trace Elem. Res. 42: 191-199.
- CHOLAK J., HUBBARD D.M. & STORY R.V. (1943).** Determination of aluminium in biological materials. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 15: 57-60.
- CLARKSON E.M., LUCK V.A., HYNSON W.V., BAILEY R.R., EASTWOOD J.B., WOODHEAD J.S., CLEMENTS V.R., O'RIORDAN J.L.H. & DE WARDENER H.E. (1972).** The effects of aluminium hydroxide on calcium, phosphorus and aluminium balances, the serum parathyroid hormone concentration and the aluminium content of bone in patients with chronic renal failure. Clin. Sci. 43: 519-531.
- CLAUBERG M., BEEBE SMITH C., DANG T., SOKOLOFF L. & JOSHI J.G. (1994).** Effects of chronic dietary aluminum on local cerebral glucose utilization in rats. Neurobiol. Aging. 15: 657-661.
- CLAVEL J.P., LAVIROTTE P. & GALLI A. (1983).** Contamination par le cuivre, le zinc ou l'aluminium des prélèvements sanguins destinés au dosage de ces métaux. Pathol. Biol. 31: 851-854.
- CLEVETTE D.J. & ORVIG C. (1990).** Comparison of ligands of differing denticity and basicity for the "in vivo" chelation of aluminium and gallium. Polyhedron. 9: 151-161.
- COCHRAN M., NEOH S. & STEPHENS E. (1983).** Aluminium interaction with ⁶⁷Ga uptake by human plasma and transferrin. Clin. Chim. Acta. 132: 199-203.

- COCHRAN M., COATES J. & NEOH S. (1984).** The competitive equilibrium between aluminum and ferric ions for the binding sites of transferrin. *Febs Letters*. 176: 129-132.
- COCHRAN M., PATTERSON D., NEOH S., STEVENS B. & MAZZACHI R. (1985).** Binding of Al by protein in plasma of patients on maintenance haemodialysis. *Clin. Chem*. 31: 1314-1316.
- COCHRAN M., COCHRAN M., COATES J.H. & KURUCSEV T. (1987).** Direct spectrophotometric determination of the two site binding of aluminum to transferrin. *Life Sci*. 40: 2337-2341.
- COCHRAN M., GODDARD G. & LUDWIGSON N. (1990a).** Aluminum absorption by rat duodenum: further evidence of energy-dependent uptake. *Toxicol. Lett*. 23: 287-294.
- COCHRAN M., ELLIOTT D.C., BRENNAN P. & CHAWTUR V. (1990b).** Inhibition of protein kinase C activation by low concentrations of aluminium. *Clin. Chim. Acta*. 194: 167-172.
- COLOMINA M.T., GOMEZ M., DOMINGO J.L. & CORBELLA J. (1994).** Lack of maternal and developmental toxicity in mice given high doses of aluminium hydroxyde and ascorbic acid during gestation. *Pharmacol. Toxicol*. 74: 236-239.
- CONSTANTINIDIS J. (1984).** Acetylcholine, glutamate, gaba and neuropeptides in senile dementia of Alzheimer type. *Dans Senile Dementia: Outlook for the future*. Alan R. Liss Inc., New-York. 55-68.
- CORNELIS R. & SCHUTYSER J. (1984).** Analytical problems related to Al-determination in body fluids, water and dialysate. *Contr. Nephrol*. 38: 1-11.
- COURNOT-WITMER G., ZINGRAFF J., PLACHOT J.J., ESCAIG F., LEFEVRE R., BOUMATI P., BOURDEAU A., GARABEDIAN M., GALLE P. & BOURDON R. (1981).** Aluminium localization in bone from haemodialyzed patients: relationship to matrix mineralization. *Kidney Int*. 20: 539-546.
- COURNOT-WITMER G. & PLACHOT J.J. (1990).** Parathyroid glands in chronic aluminum intoxication. *Ultrasrtuct. Pathol*. 14: 211-219.
- CRAPPER D.R. & DALTON A.J. (1973a).** Alterations in short-term retention, conditioned avoidance response acquisition and motivation following aluminum induced neurofibrillary degeneration. *Physiol. Behav*. 10: 925-933.
- CRAPPER D.R. & DALTON A.J. (1973b).** Aluminum induced neurofibrillary degeneration, brain electrical activity and alterations in acquisition and retention. *Physiol. Behav*. 10: 935-945.

- CRAPPER D.R., KISHNAN S.S. & DALTON A.J. (1973).** Brain aluminium distribution in Alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration. *Science*. **180**: 511-513.
- CRAPPER D.R., KRISHNAN S.S. & QUITTKAT S. (1976).** Aluminium, neurofibrillary degeneration and Alzheimer's disease. *Brain*. **99**: 67-80.
- CRAPPER D.R., QUITTBAT S., KRISHNAN S.S., DALTON A.J. & DE BONI U. (1980).** Intranuclear aluminum content in Alzheimer's disease, dialysis encephalopathy and experimental aluminum encephalopathy. *Acta Neuropathol*. **50**: 19-24.
- CUSHNER H.M. & ADAMS N.D. (1986).** Review: renal osteodystrophy-pathogenesis and treatment. *Am. J. Med. Sci.* **291**: 264-275.
- CUSHNER H.M., COPLEY J.B. & FOULKS C.J. (1986).** Calcium citrate, a new phosphate-binding and alkalinizing agent for patients with renal failure. *Curr. Ther. Res.* **40**: 998-1004.
- CUSHNER H.M., COPLEY J.B., LINDBERG J.S. & FOULKS C.J. (1988).** Calcium citrate, a non-aluminum-containing phosphate-binding agent for treatment of CRF. *Kidney Int.* **33**: 95-99.
- DATTA A.K., WEDLUND P.J. & YOKEL R.A. (1990).** Investigating aluminium citrate speciation by high-performance liquid chromatography. *J. Trace Elem. Electr. Hlth. Dis.* **4**: 107-114.
- DAVE G. (1985).** The influence of pH on the toxicity of aluminum, cadmium and iron to eggs and larvae of the Zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Ecotoxicol. Environ. Safety*. **10**: 253-267.
- DAY J.P., BARKER J., EVANS L.J.A., PERKS J., SEABRIGHT P.J., ACKRILL P., LILLEY J.S., DOWN P.V. & NEWTON G.W.A. (1991).** Aluminium absorption studied by Al-26 tracer. *Lancet*. **337**: 1345.
- DAYDE S. & BERTHON G. (1990).** Chemical speciation studies in relation to aluminium toxicity. Dans *Metal Ions in Biology and Medicine*, Eds Ph. Collery, L.A. Poirier, M. Manfait, J.C. Etienne. John Libbey Eurotext, Paris, 217-219.
- DE BONI U., SCOTT J. & CRAPPER D.R. (1974).** Intracellular aluminium binding on histochemical study. *Histochemie*. **40**: 31-37.
- DE BONI U., CRAPPER M.C. & LACHLAN D.A. (1980).** Senile dementia and Alzheimer's disease: a current view. *Life Sci*. **27**: 1-14.
- DELAVALLE F., RICHALET B., MALVY F. & FRIES D. (1977).** Le traitement par l'EDTA des encéphalopathies "pseudo-démentielles" chez les hémodialisés. *Nouv. Presse Méd.* **6**: 941-942.

- DELHAIZE E. & RYAN P.R. (1995).** Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol.* 107: 315-321.
- DELONCLE R., GUILLARD O., CLANET F., COURTOIS P. & PIRIOU A. (1990).** Aluminum transfer as glutamate complex through blood-brain barrier. *Biol. Trace Elem. Res.* 25: 39-45.
- DELONCLE R., GUILLARD O., HUGUET F. & CLANET F. (1995).** Modification of the blood-brain barrier through chronic intoxication by aluminum glutamate. *Biol. Trace Elem. Res.* 47: 227-233.
- DELONGEAS J.L, BURNEL D., NETTER P., GRIGNON M., MUR J.M., ROYER R.J. & GRIGNON G. (1983).** Toxicité et pharmacocinétique de l'oxychlorure de zirconium chez la souris et chez le rat. *J. Pharmacol.* 14: 437-447.
- DEMONTIS R., LEFLON A., FOURNIER A., TAHIRI Y., HERVE M., MORINIERE P., ABDULL-MASSIH Z., ATIK H., BELBRIK S., RENAUD H. & PLAQUET R. (1986).** 1 α (OH) vitamin D₃ increases plasma aluminum hemodialyzed patients taking Al(OH)₃. *Clin. Nephrol.* 26: 146-149.
- DEMONTIS R., REISSI D., NOEL C., BOUDAILLIEZ B., WESTEEL P.F., LEFLON P., BRASSEUR J., COEVOET B. & FOURNIER A. (1989).** Indirect clinical evidence that 1 α (OH) vitamin D₃ increases the intestinal absorption of aluminum. *Clin. Nephrol.* 31: 123-127.
- DESJARDINS A., BERGERON J.P., GUEZZO H., CARTIER A. & MALO J.L. (1994).** Aluminium potroom asthma confirmed by monitoring of forced expiratory volume in one second. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150: 1714-1717.
- DEWBERRY F.L., Mc KINNEY T.D. & STONE W.J. (1980).** The dialysis dementia syndrome: report of 14 cases and review of the literature. *Am. Soc. Artif. Intern. Organs J.* 3: 102-108.
- DE WOLFF F.A. (1985).** Toxicological aspects of aluminum poisoning in clinical nephrology. *Clin. Nephrol.* 24: 9-14.
- DEXTER D.T., WELLS F.R., LEES A.J., AGID F., AGID Y., JENNER P. & MARSDEN C.D. (1989).** Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 52: 1830-1836.
- D'HAESE P.C., LAMBERTS L.V. & DE BROE M.E. (1989).** Indirect measurement of desferrioxamine and its chelate compounds aluminioxamine and ferrioxamine by Zeeman atomic absorption spectrometry. *Clin. Chem.* 35: 884-887.
- DIAMANT W.H. & GAMBERTOGLIO J.G. (1976).** Aluminium intoxication. *N. Engl. J. Med.* 294: 1129.

- DI JOSEPH J.F., BORELLA L.E., WELLS C.L. & NABIR MIR G. (1990).** Mucosal protective activity of activated aluminum complex. *Digestion*. 45: 19-25.
- DOMINGO J.L., LLOBET J.M., GOMEZ M. & CORBELLA J. (1986).** Acute aluminium intoxication: A study of the efficacy of several antidotal treatments in mice. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 53: 93-104.
- DOMINGO J.L., GOMEZ M., LLOBET J.M. & CORBELLA J. (1988).** Comparative effects of several chelating agents on the toxicity, distribution and excretion of aluminium. *Human Toxicol.* 7: 259-262.
- DOMINGO J.L., GOMEZ M., LLOBET J.M. & CORBELLA J. (1991a).** Influence of some dietary constituents on aluminum absorption and retention in rats. *Kidney Int.* 39: 598-601.
- DOMINGO J.L., GOMEZ M., LLOBET J.M. & RICHART C. (1991b).** Effect of ascorbic acid on gastrointestinal aluminium absorption. *Lancet* 338: 1467.
- DRISCOLL C.T. (1985).** Aluminum in acidic surface waters: chemistry, transport and effects. *Environ. Health Perspect.* 63: 93-104.
- DRUEKE T. (1986).** L'exposition normale et l'intoxication aluminique. Dans *Cahiers de toxicologie clinique et expérimentale*, R. Bourdon, T. Drueke, L. Petit, 1: 16-24.
- DUBOIS F., BEGIN R., CANTIN A., MARTEL M., BILODEAU G., DUFRESNE A., PERREAULT G. & SEBASTIEN P. (1988).** Aluminum inhalation reduces silicosis in a sheep model. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 137: 1172-1179.
- DUGGAN J.M., DICKENSON J.E., TYNAN P.F., HOUGHTON A. & FLYNN J.E. (1992).** Aluminum beverage cans a dietary source of aluminum. *Med. J. Australia.* 156: 604-605.
- EBINA Y., OKADA S., HAMAZAKI S. & MIDORIKAWA O. (1984).** Liver, kidney, and central nervous system toxicity of aluminum given intraperitoneally to rats: a multiple-dose subchronic study using aluminum nitrilotriacetate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 75: 211-218.
- EBINA Y., OKADA S., HAMAZAKI S., OGINO F., LI J. & MIDORIKAWA O. (1986).** Nephrotoxicity and renal cell carcinoma after use of iron and aluminum-nitrilotriacetate complexes in rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 76: 107-113.
- EBINA Y., OKADA S., HAMAZAKI S., TODA Y. & MIDORIKAWA O. (1991).** Impairment of bone formation with aluminum and ferric nitrilotriacetate complexes. *Calcif. Tissue Int.* 48: 28-36.

- EBSTEIN R.P., OPPENHEIM G., EBSTEIN B.S., AMIRI Z. & STESSMAN J. (1986).** The cyclic AMP second messenger system in man: the effects of heredity, hormones, drugs, aluminum, age and disease on signal amplification. *Prog. Neuro-Psych. Biol. Psych.* 10: 323-353.
- ECELBARGER C.A. & GREGER J.L. (1991).** Dietary citrate and kidney function affect aluminum, zinc and iron utilization in rats. *J. Nutr.* 121: 1755-1762.
- ELLIS H.A., Mc CARTHY J.H. & HERRINGTON J. (1979).** Bone aluminium in haemodialysed patients and rats injected with aluminium chloride: relationship to impaired bone mineralization. *J. Clin. Pathol.* 32: 832-844.
- ESTROV Z., COHEN A., GEFAND E.W. & FREEDMAN M.H. (1988).** In vitro cytotoxicity of deferoxamine on humans marrow haematopoietic progenitors. *Toxicol. Vitro.* 2: 131-134.
- EVERS A., HANCOCK R.D., MARTELL A.E. & MOTEKAITIS R.J. (1989).** Metal ion recognition in ligands with negatively oxygen donor groups. Complexation of Fe(III), Ga(III), In(III), Al(III) and other highly charged metal ions. *Inorg. Chem.* 28: 2189-2195.
- EXLEY C. & BIRCHALL J.D. (1992).** The cellular toxicity of aluminium. *J. Theor. Biol.* 159: 83-98.
- EXLEY C., PRICE N.C. & BIRCHALL J.D. (1994).** Aluminum inhibition of hexokinase activity in vitro: a study in biological availability. *J. Inorg. Biochem.* 54: 297-304.
- FAIRWEATHER-TAIT S.J., PIPER Z., FATEMI S.J. & MOORE G.R. (1991).** The effect of tea on iron and aluminium metabolism in the rat. *Brit. J. Nutr.* 65: 61-68.
- FARNELL B.J., CRAPPER D.R., Mc LACHLAN J., BAIMBRIDGE K., DE BONI U., WONG L. & WOOD P.L. (1985).** Calcium metabolism in aluminium encephalopathy. *Exp. Neurol.* 88: 68-83.
- FARRAR G., ALTMANN P. & WELCH S. (1990).** Accumulation cérébrale d'aluminium dans la maladie d'Alzheimer et le syndrome de Down. *Lancet.* 335: 747-750.
- FASMAN G.D., PERCZEL A. & MOORE C.D. (1995).** Solubilization of β -amyloid-(1-42)-peptide: reversing the β -sheet conformation induced by aluminum with silicates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 369-371.
- FATEMI S.J.A., KADIR F.H.A. & MOORE J.R. (1991).** Aluminum transport in blood serum. *Biochem. J.* 280: 527-532.
- F.D.A. (1955).** Aluminium cooking utensils. Food and Drug Officials U.S. Quart. Bull. 19: 113-116.

- FEINROTH M., FEINROTH M.V. & BERLYNE G.M. (1982).** Aluminum absorption in the rat everted gut sac. *Miner. Electrolyte Metab.* **8**: 29-35.
- FELSENFELD A.J., RODRIGUEZ M., COLEMAN M., ROSS D. & LLACH F. (1989).** Desferrioxamine therapy in hemodialysis patients with aluminium-associated bone disease. *Kidney Int.* **35**: 1371-1378.
- FINNEGAN M.M., RETTIG S.J. & ORVIG C. (1986).** A neutral water-soluble aluminum complex of neurological interest. *J. Am. Chem. Soc.* **108**: 5033-5035.
- FIRLING C.E., SEVERSON A.R. & HILL T.A. (1994).** Aluminum effects on blood chemistry and bone development in the chick embryo. *Arch. Toxicol.* **68**: 541-547.
- FLATEN T.P. & ODEGARD M. (1988).** Tea, aluminium and Alzheimer's disease. *Fol. Chem. Toxic.* **26**: 959-960.
- FLENDRIG J.A., KRUIS H. DAS H.A. (1976).** Aluminium intoxication: the cause of dialysis dementia ? *Proc. Eur. Dial. Transpl. Assoc.* **13**: 355-361.
- FONTANA L., PERAZZOLO M., STELLA M.P., TAPPARO A., CORAIN B., FAVARATO M. & ZATTA P. (1991).** A long-term toxicological investigation of the effect of tris(maltolate)aluminum (III) in rabbits. *Biol. Trace Elem. Res.* **31**: 183-191.
- FORBES W.F., HAYWARD L.M. & AGWANI N. (1991).** Dementia, aluminium and fluoride. *Lancet.* **338**: 1592-1593.
- FOSBURG M., HAKIM R.M., SCHULMAN G., PROPER R., LAZARUS J.M., WOLFE L. & GORIN R. (1984).** Pharmacokinetics (K) of desferrioxamine (D) during treatment of transfusional iron overload (IO) in chronic hemodialysis (HD) patients. *Kidney Int.* **25**: 183.
- FRANCE R.L. & STOKES P.M. (1987).** Influence of manganese, calcium and aluminum on hydrogen ion toxicity to the amphipod *Hyaella azteca*. *Can. J. Zool.* **65**: 3071-3078.
- FREEDMAN M.H., BOYDEN M., TAYLOR M. & SKARF B. (1988).** Neurotoxicity associated with deferoxamine therapy. *Toxicology.* **49**: 283-290.
- FREUNDLICH M., ABITBOL C., ZILLERUELO G. & STRAUSS J. (1985).** Infant formula as a cause of aluminum toxicity in neonatal uraemia. *Lancet II*: 527-5298.
- FRIEDLAND R.P., BUDINGER T.F., KOSS E. & OBER B.A. (1985).** Alzheimer's disease: anterior-posterior and lateral hemispheric alterations in cortical glucose utilisation. *Neurosci. Lett.* **53**: 235-240.

- FRIEDLAND R.P., JAGUST W.J., HUESMAN R.H., KOSS E., KNITTEL B., MATHIS C.A., OBER B.A., MAZOYER B.M. & BUDINGER T.F. (1989).** Regional cerebral glucose transport and utilization in Alzheimer's disease. *Neurology*. 39: 1427-1434.
- FROMENT D., MOLITORIS B.A., BUDDINGTON B., MILLER N & ALFREY A.C. (1989).** Site and mechanism of enhanced gastrointestinal absorption of aluminum by citrate. *Kidney Int.* 36: 978-984.
- FROST A.E., FREEDMAN H.H., WESTERBACK S.J. & MARTELL A.E. (1958).** Chelating tendencies of N,N'-ethylenebis-[2-(0-hydroxyphenyl)]-glycine. *J. Am. Chem. Soc.* 80: 530-536.
- FULTON B. & JEFFERY E.H. (1990).** Absorption and retention of aluminum from drinking water. 1. Effect of citric and ascorbic acids on aluminum tissue levels in rabbits. *Fundam. Appl. Toxicol.* 14: 788-796.
- GALLE P., CHATEL M., BERRY J.P. & MENAULT F. (1979).** Encéphalopathie myoclonique progressive des dialysés: présence d'aluminium en forte concentration dans les lysosomes des cellules cérébrales. *Nouv. Presse Méd.* 8: 4091-4094.
- GALLE P. (1981).** Mécanisme d'élimination rénale de deux éléments du groupe III A de la classification périodique: l'aluminium et l'indium. *C. R. Acad. Sci. Ser III-Vie.* 292: 91-96.
- GALLE P. & GIUDICELLI C. (1982).** Toxicité de l'aluminium pour l'hépatocyte. Localisation ultrastructurale et micro-analyse des dépôts. *Nouv. Presse Méd.* 11: 1123-1125.
- GALLE P., CAMPOS H. & GIUDICELLI C. (1983).** Localisation ultrastructurale de l'aluminium dans les cellules parathyroïdiennes de malades en dialyse chronique. *C.R. Acad. Sci. Ser III-Vie.* 296: 545-550.
- GAMMELGAARD B. & SANDBERG E. (1989).** Aluminum and nickel in human albumin solutions. *J. Trace Elem. Electr. Hlth. Dis.* 3: 39-42.
- GANROT P.O. (1986).** Metabolism and possible health effects of aluminum. *Environ. Health Perspect.* 65: 363-441.
- GARBOSSA G., GUTNISKY A. & NESSE A. (1994).** The inhibitory action of aluminum on mouse bone marrow cell growth: evidence for an erythropoietin and transferrin-mediated mechanism. *Miner. Electrolyte Metab.* 20: 141-146.
- GARRUTO R.M., SHANKAR S.K., YANAGIHARA R., SALAZAR A.M., AMYX H.L. & GAJDUSEK D.C. (1989).** Low-calcium, high-aluminum diet-induced motor neuron pathology in cynomolgus monkeys. *Acta Neuropathol.* 78: 210-219.

- GARRUTO R.M., YAMAGIHARA R. & GAJDUSEK D.C. (1990).** Models of environmentally induced neurological disease: epidemiology and etiology of amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia in the western pacific. *Environ. Geochem. Health.* **12**: 137-151.
- GEARY D.F., FENNELL R.S., ANDRIOLA M., GUDAT J., RODGERS B.M. & RICHARD G.A. (1980).** Encephalopathy in children with chronic renal failure. *J. Pediatr.* **96**: 41-44.
- GILLI P., DE BASTIANI P., FAGIOLI F., BUONCRISTIANI U., CAROBI C., STABELLINI N., SQUERZANTI R., ROSATI G. & FARINELLI A. (1980).** Positive aluminium balance in patients on regular peritoneal treatment: an effect of low dialysate pH? *Proc. Eur. Dial. Transpl. Assoc.* **17**: 219-225.
- GIORDANO R., IOPPOLO L., CIARRALI L., RUBBIANI M., VERNILLO I. & COSTANTINI S. (1989).** Aluminum removal after chronic intoxication in rats. *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharm.* **63**: 119-127.
- GITELMAN H.J. & ALDERMAN F.R. (1989).** Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of aluminium: elimination of serum matrix effects. *Clin. Chem.* **35**: 1517-1519.
- GODBOLD D.L., FRITZ E. & HUTTERMAN A. (1988).** Aluminum toxicity and forest decline (root elongation/ Ca uptake/ X-ray microanalysis). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 3888-3892.
- GOMEZ M., DOMINGO J.M., LLOBET J.M. & CORBELLA J. (1990).** The use of desferrioxamine and other chelating agents in the treatment of aluminium overload in rats. In *Metal ions in Biology and Medicine*, eds P. Collery, L.A. Poirier, M. Manfait and J.C. Etienne, John Libbey Eurotext, pp. 348-350.
- GOMEZ M., DOMINGO J.L. & LLOBET J.M. (1991).** Developmental toxicity evaluation of oral aluminum in rats: influence of citrate. *Neurotoxicol. Teratol.* **13**: 323-328.
- GOMEZ M., DOMINGO J.M., LLOBET J.M., RICHART C. & CORBELLA J. (1994).** Effect of frequent dietary organic constituents on the gastrointestinal absorption of aluminum. In *Metal ions in biology and medicine*. Eds Ph. Collery, L.A. Poirier, N.A. Littlefield, J.C. Etienne. John Libbey Eurotext, Paris. 377-381.
- GOOD P.F., PERL D.P., BIERER L.M. & SCHMEIDLER J. (1992).** Selective accumulation of aluminum and iron in the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: a laser microprobe (LAMMA) study. *Ann. Neurol.* **31**: 286-292.
- GOOD P.F. & PERL D.P. (1993).** Aluminium in Alzheimer's disease? *Nature, Lond.* **362**: 418.

- GOODIL J.J. & ABUELO J.G. (1987).** Mucormycosis-a new risk of deferoxamine therapy in dialysis patients with aluminium or iron overload. *N. Engl. J. Med.* 315: 54.
- GORSKY J.E., DIETZ A.A., SPENCER H. & OSIS D. (1979).** Metabolic balance of aluminum studied in six men. *Clin. Chem.* 25: 1739-1743.
- GOTO N. & AKAMA K. (1982).** Histopathological studies of reactions in mice injected with aluminum-adsorbed tetanus toxoid. *Microbiol. Immunol.* 26: 1121-1132.
- GRAFF L. (1992).** Etude de nouveaux chélateurs de l'aluminium utilisables en toxicologie. DEA de l'Université de Metz.
- GRAFF L., MULLER G. & BURNEL D. (1995).** In vitro and in vivo evaluation of potential aluminum chelators. *Vet. Human Toxicol.* 37: 455-461.
- GREEN M.A., WELCH M.J., MATHIAS C.J., TAYLOR P. & MARTELL A.E. (1985).** Evaluation of PLED as a chelating ligand for the preparation of gallium and indium radiopharmaceuticals. *Int. J. Nucl. Med. Biol.* 12: 381-386.
- GREGER J.L. (1985).** Effect of dietary aluminum on mineral metabolism of adult males. *Amer. J. Clin. Nutr.* 38: 411-419.
- GREGER J.L. & POWERS C.F. (1992).** Assessment of exposure to parenteral and oral aluminum with and without citrate using a desferrioxamine test in rats. *Toxicology.* 76: 119-132.
- GRISWOLD W.R., REZNICK V., MENDOZA S.A., TRAUNER D. & ALFREY A.C. (1983).** Accumulation of aluminum in a nondialyzed uremic child receiving aluminum hydroxide. *Pediatrics.* 71: 56-58.
- GULYA K., RAKONCZAY Z. & KASA P. (1990).** Cholinotoxic effects of aluminum in rat brain. *J. Neurochem.* 54: 1020-1026.
- GYPARAKI M., PORTER J.B., HIRANI S., STREATER M., HIDER R.C. & HUEHNS E.R. (1987).** In vivo evaluation of hydroxypyridone iron chelators in a mouse model. *Acta Haemat.* 78: 217-221.
- HARRINGTON C.R., WISCHIK C.M., Mc ARTHUR F.K., TAYLOR G.A., EDWARDSON J.A. & CANDY J.M. (1994).** Alzheimer's-disease-like changes in tau protein processing: association with aluminium accumulation in brains of renal dialysis patients. *Lancet.* 343: 993-997.
- HARRIS W.R. & PECORARO V.L. (1983).** Thermodynamic binding constants for gallium transferrin. *Biochemistry.* 22: 292-299.

- HARRIS W.R. & SHELDON J. (1990).** Equilibrium constants for the binding of aluminum to human serum transferrin. *Inorg. Chem.* 29: 119-124.
- HARRIS W.R. (1992).** Equilibrium model for speciation of aluminum in serum. *Clin. Chem.* 38: 1809-1818.
- HASSANALY F., LARROQUE M., DESCH G. & LILLAMAND G. (1987).** Dosage semi-automatique de l'aluminium sérique par spectrophotométrie d'absorption atomique sans flamme. *Clin. Chem. News-letters.* 44-48.
- HAWKINS N.M., COFFEY S., LAWSON M.S. & TREVOR DELVES H. (1994).** Potential aluminium toxicity in infants fed special infant formula. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 19: 377-381.
- HENRY D.A., GOODMAN W.G. & NUDELMAN R.K. (1984).** Parenteral aluminium administration in the dog. I. Plasma kinetics, tissue levels, calcium metabolism and parathyroid hormone. *Kidney Int.* 25: 362-369.
- HERSHKO C., GRADY R.W. & CERAMI A. (1978).** Mechanism of iron chelation in the hyper-transfused rat: definition of two alternative pathways of iron mobilization. *J. Lab. Clin. Med.* 92: 144-151.
- HERSHKO C., AVRAMOVICI-GRISARU S., LINK G., GELFAND L. & SAREL S. (1981).** Mechanism of in vivo iron chelation by isonicotinoyl hydrazone and other imino derivatives of pyridoxal. *J. Lab. Clin. Med.* 98: 99-108.
- HERSHKO C., GRADY R.W. & LINK G. (1984).** Phenolic ethylenediamine derivatives: a study of orally effective iron chelators. *J. Lab. Clin. Med.* 103: 337-346.
- HERSHKO C. (1988).** Oral iron chelating drugs: coming but not yet ready for clinical use. *Br. Med. J.* 296: 1081-1082.
- HEWITT C.D., O'HARA M., DAY J.P. & BISHOP N. (1987).** Exposure of infants to aluminium from milk formulae and intravenous fluids. *Trace Element. Analytical Chemistry in Medicine and Biology*, Eds Brätter P. & Schramelz P., Walter de Gruyter & Co., Berlin, vol. 4: 481-488.
- HEWITT S.D., HIDER R.C., SARPONG P., MORRIS C.J. & BLAKE D.R. (1989).** Investigation of the anti-inflammatory properties of hydroxypyridinones. *Ann. Rheum. Dis.* 48: 382-388.
- HIDER R.C. & HALL A.D. (1991).** Clinically useful chelators of tripositive elements. *Prog. Medicinal Chem.* 28: 41-173.

- HILETI D., PANAYOTIDIS P. & HOFFBRAND A.V. (1995).** Iron chelators induce apoptosis in proliferating cells. *Brit. J. Haematol.* 89: 181-187.
- HIRSCH E.C., BRANDEL J.P., GALLE P., JAVOY-AGID F. & AGID Y. (1991).** Iron and aluminum increase in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 56: 446-451.
- HODGE K.C., DAY J.P., O'HARA M., ACKRILL P. & RALSTON A.J. (1981).** Critical concentration of aluminium in water used for dialysis. *Lancet II*: 802-803.
- HOEN B., RENOULT E., JONON B. & KESSLER M. (1988).** Septicemia due to *Yersinia enterocolitica* in a long-term hemodialysis patient after a single desferrioxamine administration. *Nephron.* 50: 378-379.
- HOEN B. & KESSLER M. (1991).** Risque infectieux chez les insuffisants rénaux dialysés. Importance de la surcharge en fer et de la déféroxamine. *Presse Méd.* 20: 681-682.
- HÖHR D., ABEL J. & WILHELM (1989).** Renal clearance of aluminium: studies in the isolated perfused rat kidney. *Toxicol. Lett.* 45: 165-174.
- HORECKER B.R., STOTZ E. & HOGNESS T.R. (1989).** The promoting effect of aluminum, chromium and the rare earths in the succinic deshydrogenase-cytochrome system. *J. Biol. Chem.* 128: 251-256.
- HOUSELY P.R. (1990).** Aluminum fluoride inhibition of glucocorticoid receptor inactivation and transformation. *Biochemistry.* 29: 35-78.
- HOYER S., OESTERREICH K. & WAGNER O.(1988).** Glucose metabolism as the site of the primary abnormality in early-onset dementia of Alzheimer type. *J. Neurol.* 235: 143-148.
- HUNN J., CLEVELAND B. & LITTLE E.E. (1987).** Influence of pH and aluminum developing brook trout in a low calcium water. *Environ. Pollut.* 43: 63-73.
- HUGUET F., DELONCLE C., GUILLARD O. & PIRIOU A. (1991).** Maladie d'Alzheimer: neurotoxicité de l'aluminium et système dopaminergique. *Soc. Fr. Toxicol.* 11: 366-367.
- HURWITZ A., ROBINSON R.G., VATS T.S., WHITTIER F.C. & HERIN W.F. (1976).** Effects of antacids on gastric emptying. *Gastroenterology.* 71: 268-273.
- IHLE B.U., BUCHANAN M.R.C., STEVENS B., BECHER G.J. & KINCAID-SMITH P. (1982).** The efficacy of various treatment modalities on aluminium-associated bone disease. *Proc. Eur. Dial. Transplant. Assoc.* 19: 195-201.

- INOUE T., ISHIWATA H. & YOSHIHARA K. (1988).** Aluminum levels in food-simulating solvents and various foods cooked in aluminum pans. *J. Ag. Food Chem.* **36**: 599-601.
- IRWIN D.A. (1955).** Histochemical reaction for the demonstration of Al in tissues. *Arch. Indus. Health.* **12**: 218.
- ITTEL T.H., GRIESSNER A. & SIEBERT H.G. (1991).** Effect of lactate on the absorption and retention of aluminum in thhe remnant kidney rat model. *Nephron.* **57**: 332-339.
- ITTEL T.H., GRUBER E., HEINRICHS A., HANDT S., HOFSTADTER F. & SIEBERT H.G. (1992).** Effect of fluoride on aluminum-induced bone disease in rats with renal failure. *Kidney Int.* **41**: 1340-1348.
- JACKSON G.E. & COSGROVE A. (1982).** Studies on the chelation of aluminium for biological application. Part 2. Oxalic, malonic and succinic acids. *S. Afr. J. Chem.* **35**: 93-95.
- JAUDON M.C. (1991).** L'aluminium. Dans *Les Oligoéléments en Médecine et Biologie*, P. Chappuis, Eds Médicales Internationales. 625-643.
- JAULMES P. & HAMELLE G. (1971).** Présence et taux des oligoéléments dans les aliments et les boissons de l'homme. *Ann. Nutr. Aliment.* **25B**: 133-202.
- JEDERLENIC P.J., ABRAHAM J.L., CHURG A., HIMMELSTEIN J.S., EPLER G.R. & GAENSLER E.A. (1990).** Pulmonary fibrosis in aluminum oxide workers. *Amer. Rev. Resp. Dis.* **142**: 1179-1184.
- JENSEN P., PETTERSSON S., DRAKENBERG T. & ASP H. (1989).** Aluminum effects on vacuolar phosphorus in roots of beech (*Fagus sylvatica*). *J. Plant. Physiol.* **134**: 37-42.
- JOHNSON G.W. & JOPE R.S. (1986).** Aluminum increases cyclic AMP in rat cerebral cortex *in vivo*. *Life Sci.* **39**: 1301-1305.
- JOHNSON G.W. & JOPE R.S. (1987).** Aluminum alters cyclic AMP and cyclic GMP levels but not presynaptic cholinergic markers in rat brain *in vivo*. *Brain Res.* **403**: 1-6.
- JONES M.M. (1984).** Antagonists for toxic heavy metals. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **27**: 163-167.
- JONS O. & JOHANSEN E.S. (1988).** Formation of aluminium and zinc complexes with picolinic acid. A potentiometric investigation. *Inorg. Chim. Acta.* **151**: 129-132.
- JOSHI J.G., DHAR M., CLAUBERG M. & CHAUTHAIWALE V. (1994).** Iron and aluminum homeostasis in neural disorders. *Environ. Health Perspect.* **102**: 207-213.

- KAENHY W.D., HEGG A.P. & ALFREY A.C. (1977a).** Gastrointestinal absorption of aluminum from aluminum-containing antacids. *N. Engl. J. Med.* **296**: 1389-1390.
- KAENHY W.D., ALFREY A.C., HOLMAN A.F. & SHORR W.J. (1977b).** Aluminum transfer during hemodialysis. *Kidney Int.* **12**: 361-365.
- KANDIAH J. & KIES C. (1994).** Aluminum concentrations in tissues of rats: effect of soft drink packaging. *Bio Metals.* **7**: 57-60.
- KARLIK S.J., EICHHORN G.L., LEWIS P.N. & CRAPPER D.R. (1980).** Interaction of aluminum species with deoxyribonucleic acid. *Biochemistry.* **19**: 5991-5998.
- KARLIK S.J. & EICHHORN G.L. (1989).** Polynucleotide cross-linking by aluminum. *J. Inorg. Biochem.* **37**: 259-269.
- KATSETOS C.D., SAVORY J., HERMAN M.M., CARPENTER R.M., FRANKFURTER A., HEWITT C.D. & WILLS M.R. (1990).** Neuronal cytoskeletal lesions induced in the CNS by intraventricular and intravenous aluminium maltol in rabbits. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **16**: 511-528.
- KATZMAN R. (1986).** Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **313**: 964-973.
- KEBERLE H. (1964).** Biochemistry of desferrioxamine and its relation to iron metabolism. *Ann. NY Acad. Sci.* **119**: 758-768.
- KING G.A., DE BONI U. & CRAPPER P.R. (1975).** Effect of aluminum upon conditioned avoidance response acquisition in the absence of neurofibrillary degeneration. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **3**: 1003-1009.
- KING S.W., WILLS M.R. & SAVORY J. (1979).** Serum binding of aluminium. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharm.* **26**: 161-169.
- KIRSCHBAUM B.B. & SCHOOLWERTH A.C. (1989a).** Acute aluminum toxicity associated with oral citrate and aluminum-containing antacids. *Am. J. Med. Sci.* **297**: 9-11.
- KIRSCHBAUM B.B. & SCHOOLWERTH A.C. (1989b).** Hyperalumaemia associated with oral citrate and aluminium hydroxyde. *Hum. Toxicol.* **8**: 45-47.
- KISS T., SOVAGO I. & MARTIN R.B. (1989).** Complexes of 3,4-dihydroxyphenyl derivatives. 9. Al^{3+} binding to catecholamines and tiron. *J. Am. Chem. Soc.* **111**: 3611-3614.
- KLEBANOFF S.J., WALTERSDORPH A.M., MICHEL B.R. & ROSEN H. (1989).** Oxygen-based free radical generation by ferrous ions and deferroxamine. *J. Biol. Chem.* **264**: 19765-19771.

- KLEIN G.L., ALFREY A.C., MILLER N.L., SHERRARD D.J., HAZLET T.K., AMET M.E. & COBURN J.W. (1982).** Aluminum loading during total parenteral nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 35: 1425-1429.
- KLEIN G.L., HEYMAN M.B., LEE T.C., MILLER N.L., MARATHE G., GOURLEY W.K. & ALFREY A.C. (1988).** Aluminum-associated hepatobiliary dysfunction in rats: relationships to dosage and duration of exposure. *Pediat. Res.* 23: 275-278.
- KNOLL O., KELLINGHAUS H., BERTRAM H.P., ZUMKLEY H. & GRAEFE U. (1984).** Gastrointestinal absorption of aluminum in chronic renal insufficiency. *Contr. Nephrol.* 38: 24-31.
- KOCH K.R., POUINET M.A. & DE VILLIERS D. (1989).** Determination of aluminium levels in tea and coffee by inductively coupled plasma optical emission spectrometry and graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Analyst.* 114: 911-913.
- KOCH K.R. (1990).** Quantitative determination of aluminum in tea by means of aluminum-27 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analyst.* 115: 823-825.
- KONTOGHIORGHES G.J. & SHEPPARD L. (1987).** Simple synthesis of the potent iron chelators 1-alkyl-3-hydroxy-2 methylpyrid-4-ones. *Inorg. Chim. Acta.* 136: L11-L12.
- KOO W.W.K., KAPLAN L.A., BENDON R., SUCCOP P., TSANG R.C., HORN J. & STEICHEN J.J. (1986).** Response to aluminum in parenteral nutrition during infancy. *J. Pediatr.* 109: 877-883.
- KOVALCHIK M.T., KAEHNY W.D., HEGG A.P., JACKSON J.T. & ALFREY A.C. (1978).** Aluminium kinetics during hemodialysis. *J. Lab. Clin. Med.* 92: 712-720.
- KRISHNAN S.S., GILLESPIE K.A. & CRAPPER D.R. (1972).** Determination of aluminum in biological material by atomic absorption spectrophotometry. *Anal. Chem.* 8: 1469-1470.
- KRUCK T.P.A. (1993).** Aluminium-Alzheimer's link? *Nature, Lond.* 363: 119.
- KRUEGER G.L., MORRIS T.K., SUSKIND R.R. & WIDNER E.M. (1984).** The health effects of aluminum compounds in mammals. *Crit. Rev. Toxicol.* 13: 1-24.
- LANDSBERG J.P., Mc DONALD B. & WATT F. (1992).** Absence of aluminium in neuritic plaque cores in Alzheimer's disease. *Nature.* 360: 65-68.
- LANGUI D., PROBST A., ANDERTON B., BRION J.P. & ULRICH J. (1990).** Aluminium-induced tangles in cultured rat neurones. Enhanced effect of aluminium by addition of maltol. *Acta Neuropathol.* 80: 649-655.

- LAPRESLE J., DUCKETT S. & GALLE P. (1975).** Documents cliniques, anatomiques et biophysiques dans une encéphalopathie avec présence de dépôts d'aluminium. *C. R. Soc. Biol.* **282**: 282-285.
- LARSON E.A., ASH S.R., WHITE J.L. & HEM S.L. (1986).** Phosphate binding gels: balancing phosphate adsorption and aluminum toxicity. *Kidney Int.* **29**: 1131-1135.
- LAU E.H., CERNY E.A., WRIGHT B.J. & RAHMAN Y.E. (1983).** Improvement of iron removal from the reticuloendothelial system by liposome encapsulation of N,N'-bis(2-hydroxybenzyl)-ethylenediamine-N,N'-diacetic acid (HBED). *J. Lab. Clin. Med.* **101**: 806-816.
- LEDERMAN R.J. & HENRY C.E. (1978).** Progressive dialysis encephalopathy. *Ann. Neurol.* **4**: 199-204.
- LEE P.N. (1989).** Epidemiological research on Alzheimer's disease: past, present and future. *Environ. Technol. Lett.* **10**: 327-333.
- LEEMING R.J. & GREEN A. (1989).** Disturbances of cerebral function by aluminium in haemodialysis patients. *Lancet II*: 502.
- L'EPLATENIER F., MURASE I. & MARTELL A.E. (1967).** New multidentate ligands. VI. Chelating tendencies of N,N'-di(2-hydroxybenzyl)ethylenediamine-N,N'-diacetic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **89**: 837-843.
- LIONE A. (1983).** The prophylactic reduction of aluminium intake. *Food Chem. Toxicol.* **21**: 103-109.
- LIONE A., ALLEN P.V. & SMITH J.C. (1984).** Aluminium coffee percolators as a source of dietary aluminium. *Food Chem. Toxicol.* **22**: 265-268.
- LIPMAN J.J., COLOWICK S.P., LAWRENCE P.L. & ABUMRAD N.N. (1988).** Aluminum induced encephalopathy in the rat. *Life Sci.* **42**: 863-875.
- LJUNGGREN K.G., LIDUMS V. & SJOGREN B. (1991).** Blood and urine concentrations of aluminum among workers exposed to aluminum flake powders. *Brit. J. Ind. Med.* **48**: 106-109.
- LLOBET J.M., DOMINGO J.L., GOMEZ M., TOMAS J.M. & CORBELLÀ J. (1987).** Acute toxicity studies of aluminium compounds; antidotal efficacy of several chelating agents. *Pharmacol. Toxicol.* **60**: 280-283.
- LLOBET J.M., COLOMINA M.T., DOMINGO J.L. & CORBELLÀ J. (1989).** Comparison of the antidotal efficacy of polyaminocarboxylic acids (CDTA and DTPA) with time after acute zinc poisoning. *Vet. Hum. Toxicol.* **31**: 25-28.

LOURIE Y. (1975). Aide-mémoire de chimie analytique, Ed. Mir, Moscou.

MAIN J. & WARD M.K. (1992). Potentiation of aluminium absorption by effervescent analgesic tablets in haemodialysis patient. *Br. Med. J.* **304**: 1686.

MALLUCHE H.H., SMITH A.J., ABREO K. & FAUGERE M.C. (1984). The use of deferoxamine in the management of aluminum accumulation in bone in patients with renal failure. *N. Engl. J. Med.* **311**: 140-144.

MANN D.M.A. & YATES P.O. (1983). Possible role of neuromelanin in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Mech. Aging Dev.* **21**: 193-203.

MARCUS D.L., DE LEON M.J., GOLDMAN J., LOGAN J., CHRISTMAN D.R., WOLF A.P., FOWLER J.S., HUNTER K., TSAI J., PEARSON J. & FREEDMAN M.L. (1988). Altered glucose metabolism in microvessels from patients with Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **26**: 91-94.

MARKESBERY W.R., EHMANN W.D., HOSSAIN T.I.M., ALAUDDIN M. & GOODIN D.T. (1981). Instrumental neutron activation analysis of brain aluminium in Alzheimer disease and aging. *Ann. Neurol.* **10**: 511-516.

MARKLUND E., OHMAN L.O. & SJOBERG S. (1989). Equilibrium and structural studies of silicon (IV) and aluminium (III) in aqueous solution. 2010. Composition and stability of aluminium complexes with propionic acid and acetic acid. *Acta Chem. Scand.* **43**: 228-234.

MARKLUND E. & OHMAN L.O. (1990). Equilibrium and structural studies of silicon (IV) and aluminium (III) in aqueous solution. 24. A potentiometric and ²⁷Al NMR study of polynuclear aluminium (III) hydroxo complexes with lactic acid. *Acta Chem. Scand.* **44**: 228-234.

MARQUES H.M. (1991). Kinetics of the release of aluminum from human serum dialuminum transferrin to citrate. *J. Inorg. Biochem.* **41**: 187-193.

MARQUIS J.K. (1982). Aluminum neurotoxicity: an experimental perspective. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **29**: 43-49.

MARQUIS J.K. & LERRICK A.J. (1982). Noncompetitive inhibition by aluminum, scandium and yttrium of acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus*. *Biochem. Pharmacol.* **31**: 1437-1440.

MARTELL A.E. & MOTEKAITIS R.J. (1983). PLED- A new chelating ligand for the treatment of β -thalassemia. *Inorg. Chim. Acta.* **79**: 295.

- MARTELL A.E., MOTEKAITIS R.J., MURASE I., SALA L.F., STOLDT R., CHIU Y.N., ROSENKRANTZ H. & METTERVILLE J.J. (1987). Development of iron chelators for Cooley's anemia. *Inorg. Chim. Acta.* 138: 215-230.
- MARTELL A.E., MOTEKAITIS R.J. & SMITH R.M. (1990). Aluminium complexes of hydroxyaliphatic and hydroxyaromatic ligands in aqueous systems-some problems and solutions. *Polyhedron.* 9: 171-187.
- MARTIN C.N., BARKER D.J.P., OSMOND C., HARRIS E.C., EDWARDSON J.A. & LACEY R.F. (1989). Geographical relation between Alzheimer's disease and aluminium in drinking water. *Lancet I*: 59-62.
- MARTIN R.B. (1986a). Citrate binding of Al^{3+} and Fe^{3+} . *J. Inorg. Biochem.* 28: 181-187.
- MARTIN R.B. (1986b). The chemistry of aluminum as related to biology and medicine. *Clin. Chem.* 32: 1797-1806.
- MARTIN R.B., SAVORY J., BROWN S., BERTHOLF R.L. & WILLS M.R. (1987). Transferrin binding of Al^{3+} and Fe^{3+} . *Clin. Chem.* 33: 405-407.
- MARTIN R.B. (1988). Bioinorganic chemistry of aluminum. *Metal Ions Biol. Syst.* 24: 1-57.
- MARTYN C.N. (1989). Geographical relation between Alzheimer's disease and aluminum in drinking water. *Lancet I*: 710.
- MAS J.L., ALPEROVITCH A. & DEROUESNE C. (1987). Epidémiologie de la démence de type Alzheimer. *Rev. Neurol.* 143: 161-171.
- MASSELOT J.P., ADHEMAR J.P., JAUDEN M.C., KLEINKHECHT D. & GALLI A. (1978). Reversible dialysis encephalopathy: role of aluminium-containing gels. *Lancet II*: 1386-1387.
- MAURAS Y., ALLAIN P. & RIBERI P. (1982). Etude de l'absorption digestive de l'hydrocarbonate d'aluminium chez l'individu sain. *Thérapie.* 37: 598-600.
- MAY P.M. & BULMAN R.A. (1983). The present status of chelating agents in medicine. *Prog. Medicinal Chem.* 20: 225-336.
- MAYOR G.H., KEISER J.A., MAKDANI D. & KU P.K. (1977). Aluminum absorption and distribution: effects of parathyroid hormone. *Science.* 197: 1187-1189.
- MAYOR G.H., SPRAGUE S.M., HOURANI M.R. & SANCHEZ T.V. (1980). Parathyroid hormone-mediated aluminum deposition and egress in the rat. *Kidney Int.* 17: 40-44.

- Mc CARTHY J.T., MILLINER D.S., KURTZ S.B., JOHNSON W.J. & MOYER T.P. (1986).** Interpretation of serum aluminum values in dialysis patients. *Amer. J. Clin. Pathol.* 86: 629-636.
- Mc CARTHY J.T., MILLINER D.S. & JOHNSON W.J. (1990).** Clinical experience with desferrioxamine in dialysis patients with aluminium toxicity. *Q. J. Med.* 74: 257-276.
- Mc CAULEY J. & SORKIN M.I. (1989).** Exacerbation of aluminium encephalopathy after treatment with desferrioxamine. *Nephrol. Dial. Transplant.* 4: 110-114.
- Mc CORMACK K.M., OTTOSEN L.D., SANGER V.L., SPRAGUE S., MAYOR G.H. & HOOK J.B. (1979).** Effect of prenatal administration of aluminum and parathyroid hormone on fetal development in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 161: 74-79.
- Mc DERMOTT J.R., SMITH A.I., IQBAL K. & WISNIEWSKI H.M. (1977).** Aluminum and Alzheimer's disease. *Lancet II*: 710.
- Mc DERMOTT J.R., SMITH A.I., WARD H.K., PARKINSON L.J. & KERR D.N. (1978).** Brain aluminium concentration in dialysis encephalopathy. *Lancet I*: 901-904.
- Mc GEER P.L. (1984).** Aging, Alzheimer's disease and the cholinergic system. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 62: 741-754.
- Mc LAUGHLIN A.I., KAZANTZIS G., KING E., TEARE D., PORTER R.J. & OWEN R. (1962).** Pulmonary fibrosis and encephalopathy associated with the inhalation of aluminium dust. *Brit. J. Ind. Med.* 19: 253-262.
- MELOGRANA J.M. & YOKEL R.A. (1983).** Effect of the chelator desferrioxamine on aluminum elimination in rabbits. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 40: 497-509.
- MESSING B., PFEIFFER A., GINESTON J.L., CHAPPUIS P., LEFLON P., BUISINE A. & TERRIER J.L. (1986).** Quels sont, en nutrition parentérale chez l'adulte, les solutés responsables de l'apport aluminique excessif? *Presse Méd.* 15: 1425.
- MILLER C.A. & LEVINE E.M. (1974).** Effects of aluminium salts on cultured neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* 22: 751-758.
- MILLER J.L., HUBBARD C.M., LITMAN B.J. & Mc DONALD T.L. (1989).** Inhibition of transducin activation and guanosine triphosphatase activity by aluminum ion. *J. Biol. Chem.* 264: 243-250.
- MILLER K.B., ROSENWASSER L.J. & BESSETTE J.M. (1981).** I. Rapid desensitization for deferoxamine anaphylactic reaction. *Lancet I*: 1059.

- MILLINER D.S., NEBEKER H.G., OTT S.M., ANDRESS D.L., SHERRARD D.J., ALFREY A.C., SLATOPOLSKY E.A. & COBURN J.W. (1984a).** Use of deferoxamine infusion test in the diagnosis of aluminium-related osteodystrophy. *Ann. Int. Med.* **101**: 775-790.
- MILLINER D.S., NEBEKER H.G., OTT S.M., SHERRARD D.J., ANDRESS D.L., ALFREY A.C. & COBURN J.W. (1984b).** Desferrioxamine infusion test for diagnosis of aluminium. *Kidney Int.* **25**: 149.
- MILLINER D.S., SHINABERGER J.H., SHUMAN P. & COBURN J.W. (1985).** Inadvertent aluminum administration during plasma exchange due to aluminum contamination of albumin-replacement solutions. *N. Engl. J. Med.* **312**: 165-167.
- MILLINER D.S., MALEKZADEH M., LIEBERMAN E. & COBURN J.W. (1987).** Plasma aluminum levels in pediatric dialysis patients: comparison of hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Mayo. Clin. Proc.* **62**: 269-274.
- MILNE F.J., SHARFE B., BELL P. & MEYERS A.M. (1983).** The effect of low aluminium water and desferrioxamine on the outcome of dialysis encephalopathy. *Clin. Nephrol.* **20**: 202-207.
- MITROVIC D.R., STANKOVIC A., FRONT P. & KUNTZ D. (1987).** La toxicité de l'aluminium sur les tissus est-elle due à la production de radicaux libres d'oxygène ? *Presse Méd.* **16**: 1702.
- MOHR E., BRUNO G., FOSTER N., GILLESPIE M., COX C., HARE T.A., TAMMINGA C., FEDIO P. & CHASE T.N. (1986).** GABA-agonist therapy for Alzheimer's disease. *Clin. Neuropharmacol.* **9**: 257-263.
- MOLITORIS B.A., FROMENT D.H., MACKENZIE T.A., HUFFER W.H. & ALFREY A.C. (1989).** Citrate: a major factor in the toxicity of orally administered aluminum compounds. *Kidney Int.* **36**: 949-953.
- MORAES M.S. & LEITE S.R.A. (1994).** Inhibition of bovine brain acetylcholinesterase by aluminum. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **27**: 2635-2638.
- MORENO A., DOMINGUEZ C. & BALLABRIGA A. (1994).** Aluminium in the neonate related to parenteral nutrition. *Acta Paediatr.* **83**: 26-29.
- MORINIERE P., ROUSSEL A., TAHIRI Y., FREMONT F., MAUREL G., JAUDON M.C., GUERIST J. & FOURNIER A. (1982).** Substitution of aluminum hydroxide by high doses of calcium carbonate in patients on chronic hemodialysis: disappearance of hyperaluminemia and equal control of hyperparathyroidism. *Proc. Eur. Dial. Transplant Assoc.* **19**: 784-787.

- MORRISSEY J., ROTHSTEIN M., MAYOR G. & SALTPOLOSKY E. (1983).** Suppression of parathyroid hormone secretion by aluminum. *Kidney Int.* 23: 699-704.
- MOTEKAITIS R.J. & MARTELL A.E. (1984).** Complexes of aluminum (III) with hydroxy carboxylic acids. *Inorg. Chem.* 23: 18-23.
- MUFSON E.J., BOTHWELL M. & KORDOWER J.H. (1989).** Loss of nerve growth factor receptor-containing neurons in Alzheimer's disease: a quantitative analysis across subregions of the basal forebrain. *Exp. Neurol.* 105: 221-232.
- MULLER G., BERNUZZI V., DESOR D., HUTIN M.F., BURNEL D. & LEHR P.R. (1990).** Developmental alterations in offspring of female rats orally intoxicated by aluminum lactate at different gestation periods. *Teratology.* 42: 253-261.
- MULLER G., HUTIN M.F., BURNEL D. & LEHR P. (1992).** Aluminum transfer through milk in female rats intoxicated by aluminum chloride. *Biol. Trace Elem. Res.* 34: 79-87.
- MULLER G. (1993).** Contribution à l'étude expérimentale des effets de sels aluminiques chez le Rat en développement. Thèse de l'Université de Metz.
- MULLER J.F., GELOT M.A., NETTER P. & KAUFMANN R. (1982).** Detection of aluminium by LAMMA spectrometry in plasma and in synovial liquids of patients on chronic dialysis. *Biomedicine.* 36: 380-383.
- MUNDY W.R., KODAVANTI P.R.S., DULCHINOS V.F. & TILSON H.A. (1994).** Aluminum alters calcium transport in plasma membrane and endoplasmic reticulum from rat brain. *J. Biochem. Toxicology.* 9: 17-23.
- MURAMOTO S. (1981).** Influence of complexans (NTA, EDTA) on the toxicity of aluminum chloride and sulfate to fish at high concentrations. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 27: 221-225.
- MUSK A.W., BECK B.D., GREVILLE H.W., BRAIN J.D. & BOHANNON D.E. (1988).** Pulmonary disease from exposure to an artificial aluminum silicate: further observations. *Brit. J. Ind. Med.* 45: 246-250.
- MUSSI I., GALZAFERRI G., BURATTI M. & ALESSIO L. (1984).** Behavior of plasma aluminium levels in occupationally exposed subjects. *Int. Arch. Environ. Health.* 54: 155-161.
- NAGATA T., HAYATSU M. & KOSUGE N. (1992).** Identification of aluminum forms in tea leaves by ²⁷Al NMR. *Phytochemistry.* 31: 1215-1218.

- NAGEL J., SVEC D., WATERS T. & PIREMAN P. (1977).** IgE synthesis in man. I-Development of specific IgE. Antibodies after immunization with tetanus diphtheria (Td) toxoids. *J. Immunol.* 118: 334-341.
- NAGY E. & JOBST K. (1994).** Aluminium dissolved from kitchen utensils. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 52: 396-399.
- NATHAN E. & PEDERSEN S.E. (1980).** Dialysis encephalopathy in a non-dialysed uraemic boy treated with aluminum hydroxide orally. *Acta Paediat. Scand.* 69: 793-796.
- NAYLOR G.J., SHEPERD B., TRELIVING L., Mc HARG A., SMITH A., WARD N. & HARPER M. (1990).** Tissue aluminum concentration stability over time, relationship to age and dietary intake. *Biol. Psychiatry.* 27: 884-890.
- NEBEKER H.G. & COBURN J.W. (1986).** Aluminum and renal osteodystrophy. *Ann. Rev. Med.* 37: 79-95.
- NELSON W.O., LUTZ T.G. & ORVIG C. (1989a).** The chemistry of neurologically active, neutral and water soluble aluminum complexes. *Environmental Chemistry and Toxicology of Aluminum*, ed. T.E. Lewis, Chelsea, Michigan, pp. 271-287.
- NELSON W.O., RETTIG S.J. & ORVIG C. (1989b).** Aluminum and gallium complexes of 1-ethyl-3-hydroxy-2-methyl-4-pyridinone: a new exochelate matrix. *Inorg. Chem.* 28: 3153-3157.
- NELSON D.J. & MARTIN R.B. (1991).** Speciation in systems containing aluminum, nucleoside diphosphates and fluoride. *J. Inorganic. Biochem.* 43: 37-43.
- NETTER P., BURNEL D., HUTIN M.F., KESSLER M.F. & FAURE G. (1981).** Aluminium in joint tissues of patient taking aluminium hydroxide. *Lancet.* 1056-1057.
- NETTER P., KESSLER M., BURNEL D., HUTIN M.F., DELONS S., BENOIT J. & GAUCHER A. (1984).** Aluminium in the joint tissues of chronic renal failure patients treated with regular hemodialysis and aluminium compounds. *J. Rheumatol.* 11: 66-70.
- NETTER P., KESSLER M., GAUCHER A. & BANNWARTH B. (1990).** Does aluminum have a pathogenic role in dialysis associated arthropathy ? *Ann. Rheum. Dis.* 49: 573-575.
- NETTER P., KESSLER M., GAUCHER A., BURNEL D. & FENER P. (1991).** Aluminum and dialysis associated arthropathy. *Nephron.* 59: 669.
- NOLAN C.R., CALIFANO J.R. & BUTZIN C.A. (1990).** Influence of calcium acetate or calcium citrate on intestinal aluminum absorption. *Kidney Int.* 38: 937-941.

- NOLL C.A. & STEFANELLI L.J. (1963).** Fluorimetric and spectrophotometric determination of aluminium in industrial water. *Anal. Chem.* 35: 1914-1916.
- OCTIVE J.C., WOOD M. & JOHNSON A.C. (1991).** Mutagenic effects of aluminium. *Mutat. Res.* 264: 135-137.
- OHMAN L.O. & MARTIN R.B. (1994).** Citrate as the main small molecule binding Al^{3+} in serum. *Clin. Chem.* 40: 598-601.
- OLIVIERI N.F., KOREN G., MATSUI D., LIU P.P., BLENDIS L., CAMERON R., McCLELLAND R.A. & TEMPLETON D.M. (1992).** Reduction of tissue iron stores and normalization of serum ferritin during treatment with the oral iron chelator L1 in thalassemia intermedia. *Blood.* 79: 2741-2748.
- ONDREICKA R., GINTER E. & KORTUS J. (1966).** Chronic toxicity of aluminum in rats and mice and its effects on phosphorus metabolism. *Brit. J. Ind. Med.* 23: 305-312.
- OPPENHEIM W.L., NAMBA R., GOODMAN W.G. & SALUSKY I.B. (1989).** Aluminum toxicity complicating renal osteodystrophy. *J. Bone. Joint Surg.* 71: 446-452.
- OTEIZA P.I. (1994).** A mechanism for the stimulatory effect of aluminum on iron-induced lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 308: 374-379.
- OTT S.M., MALONEY N.A., COBURN J.W., ALFREY A.C. & SHERRARD D.J. (1982).** The prevalence of bone aluminum deposition in renal osteodystrophy and its relation to the response to calcitriol therapy. *N. Engl. J. Med.* 307: 709-713.
- OWEN L.M.W., CREWS H.M., BISHOP. N.J. & MASSEY R.C. (1994).** Aluminum uptake from some foods by guinea pigs and the characterization of aluminium in "in vivo" intestinal digesta by SEC-ICP-MS. *Fd. Chem. Toxic.* 32: 697-705.
- PAILLER F.M., BEQUET D., CORBE H. & GIUDICELLI C.P. (1995).** L'aluminium, cause hypothétique de la maladie d'Alzheimer. *Presse Méd.* 24: 489-490.
- PARKINSON I.S., WARD M.K., FEEST T.G., FAWCETT R.W.P., KERR D.N.S. (1979).** Fracturing dialysis osteodystrophy and dialysis encephalopathy: an epidemiological survey. *Lancet I:* 406-409.
- PARKINSON I.S., WARD M.K. & KERR D.N. (1981).** Dialysis encephalopathy, bone disease and anaemia: the aluminium intoxication syndrome during regular haemodialysis. *J. Clin. Pathol.* 34: 1285-1294.
- PARTRIDGE N.A., REGNIER F.E., WHITE J.L. & HEM S. (1989).** Influence of dietary constituents on intestinal absorption of aluminum. *Kidney Int.* 39: 598-601.

- PERL D.P. & BRODY A.R. (1980).** Alzheimer's disease: X-ray spectrometric evidence of aluminum accumulation in neurofibrillary tangle-bearing neurons. *Science*. 208: 297-299.
- PERL D.P., GAJDUSEK D.C. & GARRUTO R.M. (1982).** Intraneuronal aluminum accumulation in amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism dementia of Guam. *Science*. 217: 1053-1054.
- PERRY E.K., GIBSON P.H., BLESSED G., PERRY E.K. & TOMLINSON B.E. (1977).** Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia-choline-acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue. *J. Neurol. Sci.* 34: 247-265.
- PERRY S.T., KULKARNI S.B., LEE K.L. & KENNEY F.T. (1982).** Selective effect of the metallocarcinogen beryllium on hormonal regulation of gene expression in cultures cells. *Cancer Res.* 42: 473-476.
- PERRY T.L., YONG V.W., KISH S.J., ITO M., FOULKS J.G., GODOLPHIN W.J. & SWEENEY V.P. (1983).** Neurochemical abnormalities in brains of renal failure patients treated by repeated hemodialysis. *J. Neurochem.* 45: 1043-1048.
- PETERS G., KEBERLE H., SCHMID K. & BRUNNER H. (1966).** Distribution and renal excretion of desferrioxamine and ferrioxamine in the dog and in the rat. *Biochem. Pharmacol.* 15: 93-109.
- PETIOT J., POSTAIRE E., PROGNON P. & HAMON M. (1983).** Dosage par spectrométrie d'absorption atomique des traces d'aluminium contenues dans les solutés pour hémodialyse ou hémofiltration. *Ann. Pharm. Fr.* 41: 229-237.
- PHANUPHAK P., KHAOPLOD P., SRIWANTHANA B., PHANPANICH T., WONGURAI S. & ROUMIUNTZEFF M. (1989).** Immunoenhancement with combined rabies and aluminum-adsorbed tetanus vaccines. *Vaccine*. 7: 249-252.
- PIA MULLER J. & BRUININK A. (1994).** Neurotoxic effects of aluminium on embryonic chick brain cells. *Acta Neuropathol.* 88: 359-366.
- PICCOLI A., ANDRIANI M., MATTIELO G., NORDIO M., MODENA F. & DALLA ROSA C. (1989).** Serum aluminum level in the veneto chronic haemodialysis population: cross-sectional study on 1,026 patients. *Nephron*. 51: 482-490.
- PIED H. & CAMESCASSE P. (1932).** Zirconium. Dans *Traité de Chimie Minérale*, P. Pascal, tome V, Masson et Cie Eds, Paris; 649-756.
- PIERIDES A.M., EDWARD W.G., CULLUM U.X., Mc CALL J.T. & ELLIS H.A. (1980).** Haemodialysis encephalopathy with osteomalacic fractures and muscle weakness. *Kidney Int.* 18: 115-124.

- PIPPARD M.J., JACKSON M.J., HOFFMAN K., PETROU M. & MODELL C.B. (1986).** Iron chelation using subcutaneous infusions of diethyl triaminepenta-acetic acid (DTPA). *Scand. J. Haem.* 36: 466-472.
- PLATT B., HAAS H. & BUSSELBERG D. (1994).** Aluminium reduces glutamate-activated currents of rat hippocampal neurones. *Neuro. Report.* 5: 2329-2332.
- PLATTS H.M., GOODE G.C. & HISLOPE J.S. (1977).** Composition of the domestic water supply and the incidence of fractures and encephalopathy in patients on home dialysis. *Brit. Med. J.* 2: 657-660.
- PLAYLE R.C., GOSS G.G. & WOOD C.M. (1989).** Physiological disturbances in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during acid and aluminum exposures in soft water of two calcium concentrations. *Can. J. Zool.* 67: 314-324.
- PODENPHANT J., SALEM M., SYPITKOWSKI C., FRAME B. & PARFITT A.M. (1984).** Reversal of aluminium related dialysis osteomalacia after transplantation. IVth International Workshop on bone histomorphometry, Aarhus, 10-13 juin 1984 (Abstract).
- POISSON M., MASHALLY R. & LEBKIRI B. (1978).** Dialysis encephalopathy, recovery after interruption of aluminium intake. *Br. Med. J.* IV: 1610-1611.
- POOT M., RABINOVITCH P.S. & HOEHN H. (1989).** Free radical mediated cytotoxicity of desferrioxamine. *Free Rad. Res. Comms.* 6: 323-328.
- PORTER J.B., HUEHNS E.R. & HIDER R.C. (1989).** The development of iron chelating drugs. *Bailliere's Clin. Haematol.* 2: 257-292.
- POULSEN L.K. & WEEKE B. (1985).** Aluminum hydroxide absorbed allergens used in modified RAST. *Allergy.* 40: 405-416.
- POYNARD T., KLEPPING C., AUDIGIER J.C., BARTHELEMY C., BEL A., DELMONT J., FOURNET J., GAUCHER P. & RACHAIL M. (1990).** Randomized double-blind clinical trial of aluminum phosphate versus ranitidine in the acute treatment of duodenal ulcer. *Digestion.* 47: 105-110.
- PROVAN S.D. & YOKEL R.A. (1988a).** Influence of calcium on aluminum accumulation by the rat jejunal slice. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharm.* 59: 79-92.
- PROVAN S.D. & YOKEL R.A. (1988b).** Aluminum uptake by the in situ rat gut preparation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 245: 928-931.
- PROVAN S.D. & YOKEL R.A. (1990).** Reduced intestinal calcium and dietary calcium intake, increased aluminum absorption and tissue concentration in the rat. *Biol. Trace Elem. Res.* 23: 119-132.

- PURVES L.R., PURVES M., LINTON N., BRANDT W., JOHNSON G. & JACOBS P. (1988).** Properties of the transferrin associated with rat intestinal mucosa. *Biochim. Biophys. Acta.* 966: 318-327.
- RAJAN K.S., MAINER S. & DAVIS J.M. (1978).** Studies on chelation of L-DOPA with metal ions and metal-ATP systems. *Bioinorg. Chem.* 9: 187-203.
- RAJAN K.S., MAINER S., RAJAN N.L. & DAVIS J.M. (1981).** Studies on the chelation of aluminum for neurobiological application. *J. Inorg. Biochem.* 14: 339-350.
- RANDALL L.C., CARDON J.J., SPRAGUE S., KEISER J., MAYOR G.H. & RECH R.H. (1982).** Behavioral changes in rats after chronic aluminium and parathyroid hormone administration. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 4: 403-410.
- RANDALL M.E. (1983).** Aluminum toxicity in an infant not on dialysis. *Lancet I:* 1327-1328.
- RAPOPORT J., CHAIMOVITZ C., ABULFIL A., MOSTOVLASKY M, GAZIT D. & BAB I. (1987).** Aluminum-related osteomalacia: clinical and histological improvement following treatment with desferrioxamine (DFO). *Isr. J. Med. Sci.* 23: 1242-1246.
- RATZ P.H. & BLACKMORE P.F. (1990).** Differential activation of rabbit femoral arteries by aluminum fluoride and radium fluoride. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 254: 514-520.
- RECKER R.R., BLOTCKY A.J., LEFFLER J.A. & RACK E.P. (1977).** Evidence for aluminum absorption from the gastrointestinal tract and bone deposition by aluminum carbonate ingestion with normal renal function. *J. Lab. Clin. Med.* 90: 810-815.
- REDHEAD K., QUINLAN G.J., DAS R.G. & GUTTERIDGE J.M.C. (1992).** Aluminium- adjuvanted vaccines transiently increase aluminium levels in murine brain tissue. *Pharmacol. Toxicol.* 70: 278-280.
- RIEDERER P., SOFIC E., RAUSCH W.D., SCHMIDT B., REYNOLDS G.P., JELLINGER K. & YODIM M.B.H. (1989).** Transitions metals, ferritin, glutathione and ascorbic acid in Parkinsonian brains. *J. Neurochem.* 52: 515-520.
- RIFAT S.L., EASTWOOD M.R. & CRAPPER D.R. (1990).** Effect of exposure of miners to aluminum powder. *Lancet.* 336: 1162-1165.
- RINGBOM A. (1967).** Les complexes en chimie analytique. Dunod Eds, Paris.
- ROBERTS E. (1986).** Alzheimer's disease may begin in the nose and may be caused by aluminosilicates. *Neurobiol. Aging.* 7: 561-567.

- ROBERTS N.B. & WILLIAMS P. (1988).** Serum aluminium measurements by DC plasma emission spectrometry. *Ann. Clin. Biochem.* 25: 169-175.
- ROBINS-BROWNE R.M. & PRPIC J.C. (1985).** Effects of iron and desferrioxamine on infections with *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 47: 774-779.
- RODGER R.S.C., MURALIKRISHNA G.S., HALLS D.J., HENDERSON J.B., FORREST J.A., Mc DOUGALL A.I. & FELL G.S. (1991).** Ranitidine suppresses aluminium absorption in man. *Clin. Sci.* 80: 505-508.
- RÖLLIN H.B., THEODOROU P. & KILROE-SMITH T.A. (1991).** The effect of exposure to aluminium on concentrations of essential metals in serum of foundry workers. *Brit. J. Ind. Med.* 48: 243-246.
- ROSENKRANTZ H., METTERVILLE J.J. & FLEISCHMAN R.W. (1986).** Preliminary toxicity findings in dogs and rodents given the iron chelator ethylenediamine-N,N'-bis(2-hydroxyphenylacetic) acid (EDHPA). *Fundam. Appl. Toxicol.* 6: 292-298.
- ROSENLÖF K., FYHRQUIST F. & TENHUNEN R. (1990).** Erythropoietin, aluminum and anaemia in patients on haemodialysis. *Lancet.* 335: 247-249.
- ROSSOR M.N., EMSON P.C., MOUNTJOY C.Q., ROTH M. & IVERSEN L.L. (1980).** Reduced amounts of immunoreactive somatostatin in the temporal cortex in senile dementia of Alzheimer type. *Neurosci. Lett.* 20: 373-377.
- ROSSOR M.N., GARRETT N.J., JOHNSON A.L., MOUNTJOY C.Q., ROTH M. & IVERSEN L.L. (1982).** A post mortem study of the cholinergic and GABA systems in senile dementia. *Brain.* 105: 313-330.
- ROVELLI E., LUCIANI L., PAGANI C., ALBONICO C., COLLEONI N. & D'AMICO G. (1988).** Correlation between serum aluminum concentration and signs of encephalopathy in a large population of patients dialyzed with aluminum-free fluids. *Clin. Nephrol.* 29: 294-298.
- RUTHERFORD W.E., BORDIER P., MARIE P., HRUSKA K., HARTER H., GREENWALT A., BLONDIN J., HADDAD J., BRICKER N. & SLATOPOLSKY E. (1977).** Phosphate control and 25-hydroxycholecalciferol administration in preventing experimental renal osteodystrophy in the dog. *J. Clin. Invest.* 60: 332-341.
- SABOURAUD D., CHATEL M., MENAULT F., DIEN PERON J., CARTIER F., GARRE M., GARY J. & PECKER S. (1978).** L'encéphalopathie myoclonique progressive des dialysés. *Rev. Neurol.* 134: 574-602.
- SALUSKY I.B., COBURN J.W., PAUNIER L., SHERRARD D.J. & FINE R.N. (1984).** Role of aluminum hydroxide in raising serum aluminum levels in children undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J. Pediat.* 105: 717-720.

- SALUSKY I.B., FOLEY J., NELSON P. & GOODMAN W.G. (1991).** Aluminum accumulation during treatment with aluminum hydroxide and dialysis in children and young adults with chronic renal disease. *N. Engl. J. Med.* 324: 527-531.
- SAVORY J. & WILLS M.R. (1984).** Dialysis fluids as a source of aluminum accumulation. *Contr. Nephrol.* 38: 12-23.
- SAYER M.D., READER J.P., DALZIEL T.R. & MORRIS R. (1991).** Mineral content and blood parameters of dying brown trout (*Salmo trutta L.*) exposed to acid and aluminium in soft water. *Comp. Biochem. Physiol.* 99C: 345-348.
- SCHAMSCHULA R.G., SUGAR E., DUPPENTHALER J.L., TOTH K. & BARMES D.E. (1988).** Aluminum, calcium and magnesium content of hungarian foods and dietary intakes by children age 3, 9 and 14 years. *Acta Physiol. Hung.* 72: 237-251.
- SCHNEIDER H., KULBE K.D., WEBER H. & STREICHER E. (1984).** Aluminum-free intestinal phosphate binding. *Contr. Nephrol.* 38: 32-36.
- SCHNEIDER H., KULBE K.D., WEBER H. & STREICHER E. (1985).** Aluminum-free oral phosphate binder. *Clin. Nephrol.* 24: S98-S102.
- SEDMAN A.B., KLEIN G.L., MERITT R.J., MILLER N.L., WEBBER K.O., GILL W.L., ARNAND H. & ALFREY A.C. (1985).** Evidence of aluminum loading in infants receiving intravenous therapy. *N. Engl. J. Med.* 312: 1337-1343.
- SHAINKIN-KESTENBAUM R., ADLER A.J., BERLYNE G.M. & CARUSO C. (1989).** Effect of aluminum on superoxide dismutase. *Clin. Sci.* 77: 463-466.
- SHANNON E.E., SCHMIDTKE N.W. & MONAGHAN B.A. (1978).** Activated sludge degradation of nitrilotriacetic acid (NTA)-metal complexes. *Technol. Dev. Rep., EPS 4* (Canad. Environ. Prot. Serv.) EPS 4-WP-78-5.
- SHEIKH M.S., MAQUIRE J.A., EMMETT M., SANTA ANA C.A., NICAR M.J., SCHILER L.R. & FORDTRAN J.S. (1989).** Reduction of dietary phosphorus absorption by phosphorus binder's: a theoretical, in vitro and in vivo study. *J. Clin. Invest.* 83: 66-73.
- SHEILLEY W.B. & HURLEY H.J. (1980).** Anhydrous formulation of aluminum chloride for chronic folliculitis. *JAMA-J. Am. Med. Assn.* 244: 1956-1957.
- SHERARD D.J., WALKER J.V. & BOYKIN J.L. (1988).** Precipitation of dialysis dementia by deferoxamine treatment of aluminium-related bone disease. *Am. J. Kidney Dis.* 12: 126-130.
- SHERARD D. (1991).** Aluminium: much a do about something. *N. Engl. J. Med.* 324: 558-559.

- SHIRODKAR S., HUTCHINSON R.L., PERRY D.L., WHITE J.L. & HEM S.L. (1990).** Aluminum compounds used as adjuvants in vaccines. *Pharmaceut. Res.* 7: 1282-1288.
- SHORT A.I.K., WINNEY R.J. & ROBSON J.S. (1980).** Reversible microcytic hypochromic anaemia in dialysis patients due to aluminium intoxication. *Proc. Eur. Dial. Transplant. Assoc.* 17: 226-233.
- SIEGEL N., SUHAYDA C. & HAUG A. (1982).** Aluminium changes the conformation of calmodulin. *Physiol. Chem. Physics.* 14: 210-212.
- SIEGEL N., COUGHLIN R. & HAUG A. (1983).** A thermodynamic and electron paramagnetic resonance study of structural changes in calmodulin induced by aluminium binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115: 512-517.
- SIEGEL N. & HAUG A. (1983).** Aluminum interaction with calmodulin. Evidence for altered structure and function from optical and enzymatic studies. *Biochim. Biophys. Acta.* 744: 36-45.
- SIMON P., ANG K.S., TANQUEREL T., ALLAIN P. & MAURAS Y. (1982).** Surcharge tissulaire en aluminium chez les hémodialysés. Test à la desferrioxamine. *Nouv. Presse Méd.* 11: 209.
- SIMPSON A.M., HATTON W. & BROCKBANK M. (1988).** Aluminum, its use and control in potable water. *Environ. Technol. Lett.* 9: 907-916.
- SJOGREN B., LUNDBERG I. & LIDUMS V. (1983).** Aluminum in the blood and urine of industrially exposed workers. *Brit. J. Ind. Med.* 40: 301-304.
- SJOGREN B., LIDUMS V., HAKANSSON M. & HEDSTROM L. (1985).** Exposure and urinary excretion of aluminum during welding. *Scand. J. Work Envir. Health.* 11: 39-43.
- SJOGREN B., ELINDER C.G., LIDUMS V. & CHANG G. (1988).** Uptake and urinary excretion of aluminum among welders. *Int. Arch. Occup. Envir. Health.* 60: 77-79.
- SKALSKY H.L. & CARCHMAN R.A. (1983).** Aluminum homeostasis in man. *J. Amer. Coll. Toxicol.* 2: 405-423.
- SLANINA P., FALKEBORN Y., FRECH W. & CEDERGREN A. (1984).** Aluminium concentrations in the brain and the bone of rats fed citric acid, aluminium citrate or aluminium hydroxyde. *Food Chem. Toxicol.* 22: 391-397.
- SLANINA P., FRECH W., BERNHARSON A. & CEDERGREN A. (1985).** Influence of dietary factors on aluminium absorption and retention in the brain and bone of rats. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 56: 331-336.

- SLANINA P., FRECH W., EKSTROM L.G., LOOF L., SLORACH S. & CEDERGREN A. (1986).** Dietary citric acid enhances absorption of aluminum in antacids. *Clin. Chem.* 32: 539-541.
- SMITH D.B., JAMES A.L., BURKS J.S. & ALFREY A.C. (1980).** Dialysis encephalopathy in peritoneal dialysis. *J. Amer. Med. Assoc.* 244: 365-366.
- SMITH I. & HYLAND K. (1989).** Disturbances of cerebral function by aluminium in haemodialysis patients. *Lancet II*: 501-502.
- SNOW G.A. (1969).** Metal complexes of mycobactin P and of desferrisideramines. *Biochem. J.* 115: 199-205.
- SONG Y.H., HEINS S., MANDELKOW E. & MANDELKOW E.M. (1991).** Aluminum fluoride, microtubule stability and kinesin rigor. *J. Cell. Sci. Suppl.* 14: 147-150.
- SORENSEN J.R.J., CAMPBELL I.R., TEPPER L.B. & LINGG R.D. (1974).** Aluminum in the environment and human health. *Environ. Health Perspect.* 8: 3-95.
- SPENCER H. & LENDER M. (1979).** Adverse effects of aluminium containing antacids on mineral metabolism. *Gastroenterology.* 76: 603-606.
- SPENCER H., KRAMER L., NORRIS C. & WIATROWSKI E. (1980).** Effect of aluminum hydroxide on fluoride metabolism. *Clin. Pharmacol. Ther.* 28: 529-535.
- STERWEIS P.C. & GILMAN A.G. (1982).** Aluminum: A requirement for activation of the regulatory component of adenylate cyclase by fluoride. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 4888-4891.
- STOCKHAUSEN H.B., SCHROD L., BRATTER P. & ROSICK U. (1990).** Aluminium loading in premature infants during intensive care as related to clinical aspects. *J. Tr. Elem. Electr. Health Dis.* 4: 209-213.
- STOKES P.M., BAILEY R.C. & ROULX G.R. (1985).** Effects of acidification on metal availability to aquatic biota, with special reference to filamentous algae. *Environ. Health Perspect.* 63: 79-87.
- STRONG M.J. (1994).** Aluminum neurotoxicity: an experimental approach to the induction of neurofilamentous inclusions. *J. Neurol. Sci.* 124: 20-26.
- STUMMVOLL H.K., GRAF H. & MEISINGER V. (1984).** Effect of desferrioxamine on aluminum kinetics during hemodialysis. *Miner. Electrolyte Metab.* 10: 263-266.

- SUTTON D.A. & MARASAS L.W. (1959).** Urinary excretion of aluminium after administration in chelated forms. *Experientia*. *15*: 476-477.
- SWEENEY V.P., PERRY T.L., PRICE J.D., REEVE C.E., GODOLPHIN W.J. & KISH S.J. (1985).** Brain δ -aminobutyric acid deficiency in dialysis encephalopathy. *Neurology*. *35*: 180-184.
- SZCZEKOcki W. & CHMIELEWSKI J. (1978).** Indices of the occupational exposure to aluminum oxide dusts. *Bull. Inst. Marit. Trop. Med. Gdynia*. *29*: 37-42.
- TALIAFERO C.H., MOTEKAITIS R.J. & MARTELL A.E. (1984).** New multidentate ligands. 22. N,N'-dipyridoxylethylenediamine-N,N'-diacetic acid: a new chelating ligand for trivalent metal ions. *Inorg. Chem.* *23*: 1188-1192.
- TALIAFERO C.H. & MARTELL A.E. (1985).** NMR investigation of protonation sites of N,N'-dipyridoxylethylenediamine-N,N'-diacetic acid and coordinate in its metal chelates. *Inorg. Chem.* *24*: 2408-2413.
- TAM S.C. & Mc COLL J.G. (1990).** Aluminum and calcium binding affinities of some organic ligands in acidic conditions. *J. Environ. Qual.* *19*: 514-520.
- TARTRAI E., ADAMS Z., TIMAR M. & UNGVARY G. (1983).** Comparative histopathological and biochemical analysis of early stages of exposure to non-silicogenic aluminium silicate and strongly silicogenic quartz-dust in rats. *Exp. Pathol.* *23*: 163-171.
- TAYLOR A. & WALKER A.W. (1992).** Measurement of aluminium in clinical samples. *Ann. Clin. Biochem.* *29*: 377-389.
- TERRY R.D. (1982).** Brain disease in aging, especially senile dementia. Dans *Aging and the Brain*, Ed. Terry R.D., Raven Press, New-York, *18*: 47-59.
- TIELEMANS C., COLLART F., WENS R., SMEYERS-VERBECKE J., VAN HOOFF I., DRATURA M. & VERBEELEN D. (1985).** Improvement of anaemia with deferoxamine in haemodialysis patients with aluminum-induced bone disease. *Clin. Nephrol.* *24*: 237-241.
- TING K.S., LIANG Y.L., SHI J.M., CHEN W.Z., GU Z.P. & JIN Y.F. (1965).** Detoxification of heavy metal poisonings by sodium dimercaptosuccinate. *Chin. Med. J.* *51*: 304-307.
- TIPTON I.H., STEWART P.L. & MARTIN P.G. (1966).** Trace elements in diets and excreta. *Health Phys.* *12*: 1683-1689.
- TOKUTAKE S., NAGASE H., MORISAKI S. & OYANAGI S. (1995).** Aluminium detected in senile plaques and neurofibrillary tangles is contained in lipofuscin granules with silicon, probably as aluminosilicate. *Neurosci. Lett.* *185*: 99-102.

- TRAPP G.A., MINER G.D., ZIMMERMAN R.L., MASTRI A.R. & HESTON L.L. (1978).** Aluminum levels in brain in Alzheimer's disease. *Biol. Psychiat.* 13: 709-718.
- TRAPP G.A. (1980).** Studies of aluminium interactions with enzymes and proteins. The inhibition of hexokinase. *Neurotoxicology.* 1: 89.
- TRAPP G.A. (1983).** Plasma aluminium is bound to transferrin. *Life Sci.* 33: 311-316.
- TRAPP G.A. (1986).** Interactions of aluminium with cofactors, enzymes and other proteins. *Kidney Int.* 29: 12-16.
- TRUCHET M. (1976).** Mise en évidence, par microsonde électronique et par microanalyse ionique, de localisations naturelles d'aluminium dans les noyaux de divers types cellulaires. *C. R. Acad. Sci. Ser III-Vie.* 282: 1785-1788.
- TSOU V.M., YOUNG R.M., HART M.H. & VANDERHOOF J.A. (1991).** Elevated plasma aluminum levels in normal infants receiving antacids containing aluminum. *Pediatrics.* 87: 148-151.
- TZOURIO C., ALPEROVITCH A., MACCARIO J. & DARTIGUES J. (1991).** Is dementia of the Alzheimer type a purely genetic illness ? A modelling approach. *Neuroepidemiology.* 10: 288-296.
- UNGVARY G., TIMAR M., TATRAL E., BACSY E. & GAAL G. (1983).** Analysis of aluminium-silicate storage foci in the lungs. *Exp. Pathol.* 23: 203-214.
- VANDEPUTTE D., VAN GRIEKEN R.E., JACOB W.A., SAVORY J., BERTHOLF R.L. & WILLS M.R. (1989).** Ultrastructural localization of aluminum maltol-treated rabbits by laser microprobe mass analysis. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry.* 18: 598-602.
- VAN DER VOET G.B. & DE WOLFF F.A. (1984).** A method of studying the intestinal absorption of aluminum in the rat. *Arch. Toxicol.* 55: 168-172.
- VAN DER VOET G.B. & DE WOLFF F.A. (1985).** Monitoring of aluminium in whole blood, plasma, serum and water by a single procedure using flameless atomic absorption spectrophotometry. *J. Anal. Toxicol.* 9: 97-100.
- VAN DER VOET G.B. & DE WOLFF F.A. (1986).** Intestinal absorption of aluminum in rats: effects of intraluminal pH and aluminum concentration. *J. Appl. Toxicol.* 6: 37-41.
- VAN DER VOET G.B. & DE WOLFF F.A. (1987a).** Intestinal absorption of aluminium in rats: effect of sodium. *Arch. Toxicol. Suppl.* 11: 231-235.

- VAN DER VOET G.B. & DE WOLFF F.A. (1987b).** Intestinal absorption of aluminum from antacids: a comparison between hydrotalcite and algedrate. *Clin. Toxicol.* 24: 545-553.
- VAN DER VOET G.B. & DE WOLFF F.A. (1987c).** The effect of di and trivalent iron on the intestinal absorption of aluminum in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 90: 190-197.
- VAN DER VOET G.B., VAN GINKEL M.F. & DE WOLFF F.A. (1989).** Intestinal absorption of aluminum in rats: stimulation by citric acid and inhibition by dinitrophenol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 99: 90-97.
- VAN GINKEL M.F., VAN DER VOET G.B., VAN EIJK H.G. & DE WOLFF F.A. (1990).** Aluminium binding to serum constituents: a role for transferrin and for citrate. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 28: 459-463.
- VASSILEV T.L. (1978).** Aluminum phosphate but not calcium phosphate stimulates the specific IgE response in guinea pigs to tetanus toxoid. *Allergy.* 33: 155-159.
- VERBEELEN D., SMEYERS-VERBEKE J., VAN HOOFF I. & DE ROY G. (1988).** The effect of desferrioxamine on tissue aluminum concentration and bone histology in aluminum-loaded rats with renal failure. *J. Trace Elem. Electr. Health Dis.* 2: 67-72.
- VERBUEKEN A.H., VAN DE VYVER F.L., NOUWEN E.J., VAN GRIEKEN R.E. & DE BROE M.E. (1988).** Localization of aluminum in tissues. *Contr. Nephrol.* 64: 124-133.
- VOLF V. (1974).** Combined effect of DTPA and citrate on an intramuscular ²³⁹Pu deposit in rats. *Health Phys.* 27: 152-153.
- WALDRON EDWARD D., CHAN P. & SKORYNA S.C. (1971).** Increased prothrombin time and metabolic changes with high serum aluminium levels following long-term exposure to Bayer-process alumine. *Can. Med. Assn. J.* 105: 1297-1299.
- WALKER J.A., SHERMAN R.A. & EISINGER R.P. (1985).** Thrombocytopenia associated with intravenous desferrioxamine. *Amer. J. Kidney Dis.* 6: 254-256.
- WALKER J.A., SHERMAN R.A. & CODY R.P. (1990).** The effect of oral bases on enteral aluminum absorption. *Arch. Intern. Med.* 150: 2037-2039.
- WALKER P.R., LEBLANC J. & SIKORSKA M. (1989).** Effects of aluminum and other cations on the structure of brain and liver chromatin. *Biochemistry.* 28: 3911-3915.
- WALTON J. & GRAY T.K. (1979).** Absorption of inorganic phosphate in the human small intestine. *Clin. Sci.* 56: 407-412.

- WANG Y., LU C., XIAO Z. & WANG G. (1991). Determination aluminum in foods by stabilized temperature platform graphite furnace atomic absorption spectrometry. *J. Agr. Food Chem.* 39: 724-726.; 277-286.
- WATERLOT Y. & VANHERWEGHEIM J.L. (1985). Desferrioxamine en hémodialyse à l'origine d'une sépticémie à *Yersinia enterocolitica*. *Presse Méd.* 14: 699.
- WEATHERLEY N.S., ROGERS A.P., GOENAGA X. & ORMEROD S.J. (1990). The survival of early life stages of brown trout (*Salmo trutta L.*) in relation to aluminum speciation in upland Welsh streams. *Aquatic Toxicol.* 17: 213-230.
- WEBER R. & BERGSTAD A. (1986). Gastrointestinal absorption of aluminum from single doses of aluminum containing antacids in man. *Eur. J. Clin. Invest.* 16: 428-432.
- WENK G.L. & STEMMER K.L. (1981). The influence of ingested aluminum upon norepinephrine and dopamine levels in the rat brain. *Neurotoxicology.* 2: 347-353.
- WENK G.L. & STEMMER K.L. (1983). Suboptimal dietary zinc intake increases aluminum accumulation into the rat brain. *Brain Res.* 288: 393-395.
- WHITE L.R., STEINEGGER A.F. & SCHLATTER C. (1987). Pulmonary response following intratracheal instillation of potroom dust from an aluminum reduction plant into rat lung. *Environ. Res.* 42: 534-545.
- WILHELM M. & OHNESORGE F.K. (1990). Influence of storage conditions on aluminum concentrations in serum, dialysis fluid, urine and tap water. *J. Anal. Toxicol.* 14: 206-210.
- WILL F. (1961). III Fluorimetric determination of aluminium in the part-per billion range. *Anal. Chem.* 33: 1360-1363.
- WILLIAMS J.W., VERA S.R., PETERS T.G., LUTHER R.W., BHATTACHARYA S., SPEARS H., GRAHAM A., PITCOCK J.A. & CRAWFORD A.J. (1986). Biliary excretion of aluminum osteodystrophy with liver disease. *Ann. Intern. Med.* 104: 782-783.
- WILLS M.R. & SAVORY J. (1983). Aluminum poisoning: dialysis encephalopathy, osteomalacia and anemia. *Lancet II*: 29-33.
- WINNEY R.J., COWLE J.F., CUMMING A.D., SHORT A.I., SMITH G.D. & ROBSON J.S. (1984). Epidemiology of aluminum toxicity in a "low incidence" area. *Contr. Nephrol.* 38: 47-58.
- WINNEY R.J., COWLE J.F. & ROBSON J.S. (1986). Role of plasma aluminum in the detection and prevention of aluminum toxicity. *Kidney Int.* 18: 91-95.

- WISNIEWSKI H.M., SURTMAN J.A. & SHEK J.W. (1982).** Chronic model of neurofibrillary changes induced in mature rabbits by metallic aluminum. *Neurobiol. Aging.* 3: 11-22.
- WONG P.C.L., LAI J.C.K., LIM L. & DAVISON A.N. (1981).** Selective inhibition of L-glutamate and gammaaminobutyrate transport in nerve ending particles by aluminum, manganese and cadmium chloride. *J. Inorg. Biochem.* 14: 253-260.
- YASE Y. (1980).** The role of aluminum in CNS degeneration with interaction of calcium. *Neurotoxicology.* 1: 101-109.
- YASUI M., KIHARA T. & OTA K. (1992).** Calcium, magnesium and aluminum concentrations in Parkinson's disease. *Neurotoxicology.* 13: 593-600.
- YATES C.M., SIMPSON J., RUSSELL D. & GORDON A. (1980).** Cholinergic enzymes in neurofibrillary degeneration produced by aluminum. *Brain Res.* 197: 269-274.
- YATES C.M., SIMPSON J., GORDON A., MALONEY A.J.F., ALLISON Y., RITCHIE I.M. & URQUHART A. (1983).** Catecholamines and cholinergic enzymes in pre-senile and senile Alzheimer type dementia and Down's syndrome. *Brain Res.* 280: 119-126.
- YATES C.M., SIMPSON J., GORDON A. & CHRISTIE J.E. (1989).** Cholinergic enzymes in the spinal cord in Alzheimer type dementia. *J. Neural. Transm.* 1: 311-315.
- YOKEL R.A. (1983).** Persistent aluminum accumulation after prolonged systemic aluminum exposure. *Biol. Trace Elem. Res.* 5: 467-474.
- YOKEL R.A. & Mc NAMARA P.J. (1985).** Aluminum bioavailability and disposition in adult and immature rabbits. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 77: 344-352.
- YOKEL R.A. & KOSTENBAUDER H.B. (1987).** Assessment of potential aluminum chelators in an octanol/aqueous system and in the aluminum-loaded rabbit. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 91: 281-294.
- YOKEL R.A. & Mc NAMARA P.J. (1988).** Influence of renal impairment, chemical form and serum protein binding on intravenous and oral aluminum kinetics in the rabbit. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 95: 32-43.
- YOKEL R.A. & Mc NAMARA P.J. (1989).** Elevated aluminum persists in serum and tissues of rabbits after a six-hour infusion. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 99: 133-138.
- YOKEL R.A. & Mc NAMARA P.J. (1990).** The influence of dietary calcium reduction on aluminum absorption and kinetics in the rabbit. *Biol. Trace Elem. Res.* 23: 109-117.

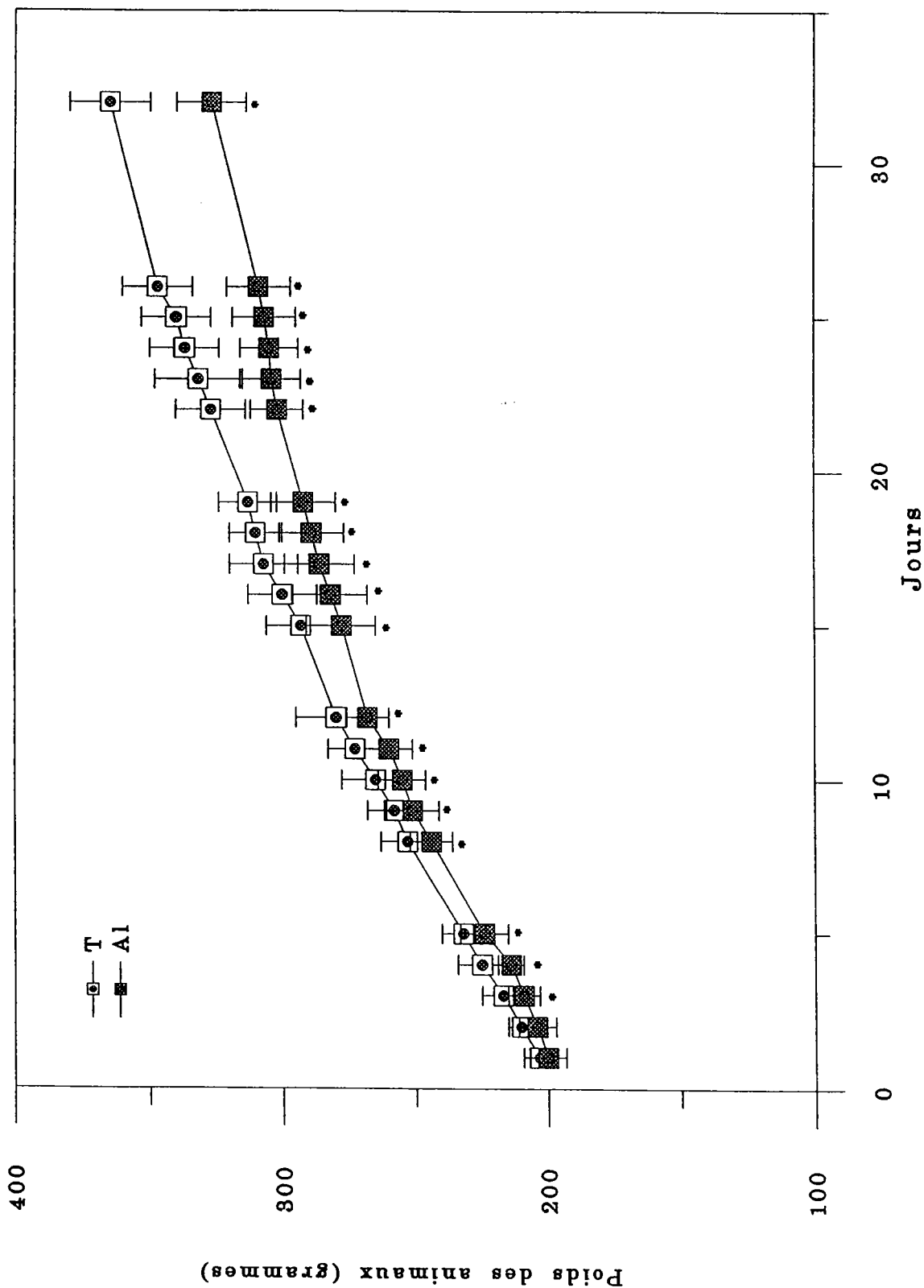
- YOKEL R.A. (1989).** Benefit v.s. risk of oral aluminum forms: antacid and phosphate binding v.s. absorption. *Drug Chem. Toxicol.* **12**
- YOKEL R.A., LIDUMS V., Mc NAMARA P.J. & UNGERSTEDT U. (1991a).** Aluminum distribution into the brain and liver of rats and rabbits following intravenous aluminum lactate or citrate: a microdialysis study. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **107**: 153-163.
- YOKEL R.A., DATTA A.K. & JACKSON E.G. (1991b).** Evaluation of potential aluminum chelators in vitro by aluminum solubilization ability, aluminum mobilization from transferrin and the octanol/aqueous distribution of the chelators and their complexes with aluminum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **257**: 100-106.
- YOKEL R.A. (1992).** Assessment of aluminum (Al) mobilization by 3-hydroxypyridin-4-one chelators in the Al-loaded rat: a microdialysis study. *Toxicologist.* **12**: 210.
- YOKEL R.A. (1994).** Aluminum chelation: chemistry, clinical and experimental studies and the search for alternatives to desferrioxamine. *J. Toxicol. Environ. Health.* **41**: 131-174.
- YOSHIDA S., YANO I., WAKAYAMA I., MITANI K. & YASE Y. (1990).** Morphometric analysis of neurodegenerative changes induced by low calcium-magnesium and excessive aluminum intake. *Biomed. Res.* **11**: 11-18.
- YOSHIMASU F., YASUI M., YASE Y. & CHEN K.M. (1980).** Studies on amyotrophic lateral sclerosis by neutron activation analysis. *Folia Psychiatr. Neurol. Jpn.* **34**: 75-82.
- YOSHINO M., MURAKAMI K. & YAMADA Y. (1990).** Reversal by polyamine of the aluminum-induced inhibition of hexokinase from human brain. *Biomed. Res.* **11**: 215-218.
- ZAPATERO M.D., GARCIA DE JALON A., PASCUAL F., CALVO M.L., ESCANERO J. & MARRO A. (1995).** Serum aluminium levels in Alzheimer's disease and other senil dementias. *Biol. Tr. Elem. Res.* **47**: 235-240.
- ZATTA P., ZAMBENEDETTI P., BRUNA V. & FILIPPI B. (1994).** Activation of acetylcholinesterase by aluminium (III): the relevance of the metal species. *Neuro. Report.* **5**: 1777-1780.

Annexes

Annexe: Evolution pondérale des animaux durant la période d'intoxication au chlorure d'aluminium.

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart-type (n=6).

* significativement différent du groupe témoin (T): $P < 0.01$.



**IN VITRO AND IN VIVO COMPARATIVE STUDIES ON CHELATION OF
ALUMINUM BY SOME POLYAMINOCARBOXYLIC ACIDS**

Lionel Graff, Guy Muller and Daniel Burnel

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

Abstract

Since desferrioxamine exhibits toxic effects, the possible use of several other therapeutic agents in acute aluminum intoxication has been investigated in this study. The potential for the chelation of aluminum (Al) by different compounds has been first determined using two *in vitro* techniques. The formation of stable complexes with Al in an aqueous solution has been evaluated by using pulse polarography. This technique allows the influence of temperature and of calcium (Ca) to be studied for each compound. Certain compounds (HEDTA, DTPA) showed extensive chelation in the presence of Ca^{2+} at a temperature of $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

An ultrafiltration technique combined with Al determination by atomic emission spectroscopy (A.E.S.) has allowed the ability of different substances to complex Al that was previously bound to serum proteins, to be estimated. The kinetics of chelation and the minimum efficient concentration have been determined for all of the products studied.

Send reprint requests to: Professor Daniel Burnel, Laboratoire de Chimie Générale Appliquée à la Médecine, Faculté de Médecine, Université Henri Poincaré, Nancy I, 9 avenue de la Forêt de Haye, BP 184, 54505 Vandoeuvre les Nancy Cedex, France.

Abbreviations: A.E.S., atomic emission spectroscopy; CDTA, cyclohexane-1-2-diaminotetraacetic acid; D.C.P., direct current plasma; DFO, desferrioxamine, desferal; DTPA, diethylenetriaminepentaacetic acid; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EGTA, ethylene glycol-O,O'-bis (2-aminoethyl-N,N,N',N'-tetraacetic acid; HEDTA, N-(2-hydroxyethyl) ethylenediaminetriacetic acid; NTA, nitrilotriacetic acid; logK, stability constants for metal-ion binding; S.C.E., saturated calomel electrode; g, gravitation.

The real efficacies of the compounds were studied by *in vivo* investigations to compare the effectiveness of the best chelating agents (DFO, HEDTA and EDTA) on the distribution and excretion of Al, after repeated i.p. administration to rats. HEDTA shows a chelation potential as widely active as the DFO potential.

Introduction

The toxicity of Al was not really taken into consideration until 1975 when the first human encephalopathy associated with an elevated concentration of Al in the brain (Lapresle *et al.*, 1975) was described. Since the work by Alfrey *et al.* (1976), numerous authors have highlighted the toxic role played by Al in the progressive dialysis encephalopathy syndrome and also in the etiology of osteomalacia (Ellis *et al.*, 1979), microcytic anemia (Wills and Savory, 1983) and arthropathy (Netter *et al.*, 1981). People undergoing chronic renal dialysis who ingest aluminum compounds in order to normalize their serum phosphorous level are those most exposed to contamination by Al. On the other hand, in the absence of renal impairment, the neurotoxicity of Al is not well known. Its responsibility in provoking certain senile dementias, especially Alzheimer's disease, is still very debatable (Ganrot, 1986; Sturman and Wisniewski, 1988; Landsberg *et al.*, 1992).

Since the work of Ackrill *et al.* (1980), the iron chelator DFO (desferrioxamine) has been used to treat different pathologic states due to the accumulation of Al in the organism (Brown *et al.*, 1982; Charhon *et al.*, 1986; Felsenfeld *et al.*, 1989). Further, DFO can be the cause of serious secondary effects: auditory and visual neurotoxicity, infections, cardiac problems, allergy (Ackrill and Day, 1984; Freedman *et al.*, 1988; Estrov *et al.*, 1988). Furthermore, it is unsuitable to administer DFO orally and its production costs are relatively high. Consequently, it is desirable to use the less toxic chelators which can be administered orally in the treatment of patients intoxicated by this metal.

Very little is known of the chelating agents to be employed as antidotes in acute aluminum accumulation. d-Penicillamine and 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) are inefficient in the treatment of encephalopathies in chronic hemodialysis patients (Burks *et al.*, 1976). This is certainly because these are weak acid chelators and Al compounds

can behave like strong acids (Jones, 1984). The experimental work carried out in mice (Domingo *et al.*, 1986, 1988; Llobet *et al.*, 1987) showed that malic, succinic and citric acids could replace DFO in the treatment of aluminum toxicity. When evaluating the chelating capacity of several compounds for Al, Yokel and Kostenbauder (1987) observed that some molecules are capable of chelating Al. However, none of the compounds tested showed a chelating activity when administered *per os*.

The aim of this study was to measure the chelating capacity of different molecules chosen according to their structure and activity in chelating metals (Alfrey, 1984; Anderson, 1989; Domingo *et al.*, 1986, 1988; Jones, 1984; Jones and Cherian, 1990; Llobet *et al.*, 1988, 1990; Oosterlinck *et al.*, 1992; Yokel and Kostenbauder, 1987; Yokel *et al.*, 1991). The chelating ability of each compound for Al was first evaluated in an aqueous buffered solution (pH = 7.40), using a technique based on pulse polarography (Burnel *et al.*, 1982). This technique allowed a relatively fast and inexpensive determination of the chelating abilities of various compounds. The compounds demonstrating complexation power were then further studied by means of an ultra filtration technique coupled to argon plasma atomic emission spectrometry (A.E.S.) to verify their chelation activity for Al bound to serum proteins; particularly transferrin, the principal protein which binds Al (Martin *et al.*, 1987). This approach permitted a fast evaluation of the capacity of each compound to chelate Al under close to physiological conditions. Finally, the compounds were used to treat aluminum-loaded rats and their abilities were evaluated on the basis of the concentrations of aluminum in plasma, urine and different tissues.

Methods

Materials

The reagent grade chemicals came from Prolabo (Paris), with the exception of the following products: DFO (Ciba-Geigy, Rueil-Malmaison); HEDTA (Flucka S.a.r.l., Mulhouse). The solutions used in polarography contained respectively 1 g/L of AlCl₃, CdCl₂, CuCl₂, CaCl₂. All solutions were standard solutions coming from Merck (Nogent-sur-Marne). Ultra pure water (Milli Q, Millipore) was used for the preparation of all solutions.

The chelating abilities of the different compounds for Al was determined by pulse polarography. These measures were taken by using a Tacussel PGR5 pulse polarograph connected to an EPL 2B potentiometric recorder with a CPR 3B polarographic cell comprising:

- a saturated calomel reference electrode (S.C.E.).
- a working electrode made of a mercury drop capillary distributor
- an auxiliary platinum electrode

All preparations were done in quartz Erlenmeyers in order to avoid contamination from alumina in glass containers.

Complexation of Aluminum in Water

When there is an excess of chelator, the Al will be more or less complexed following its affinity to the compound under consideration. In order to define the percentage of complexed Al, it is essential to determine either the concentration of free Al or that of excess chelator. Since the electrochemical reduction of Al (III) occurs at a very negative potential (-1.7 V vs S.C.E.), it is very difficult to carry out a polarographic determination of Al. Indeed, at such a potential, even at a pH of 7.40, a reduction of H_3O^+ ions in hydrogen is produced which conceals that of Al^{3+} in Al. Consequently, the determination of Al carried out by pulse polarography utilized an indirect technique using Cd^{2+} or Cu^{2+} . Like Cd or Cu, Al reacts on an equimolar ratio with EDTA or any other equivalent chelator. However, these two metals (Cd and Cu) have the advantage of being electroactive and of giving a polarographic response. Cd^{2+} or Cu^{2+} was used according to the affinity of the chelator for the cation under consideration. The chelating activity of NTA was determined by indirect determination by Cu while Cd was used for all other chelators. The absence of peaks indicated the non-existence of free cations (Cd^{2+} or Cu^{2+}).

Solutions containing Cd^{2+} or Cu^{2+} were added to a maleic acid buffered solution (pH = 7.40) at 20°C inside the polarographic cell containing the complexer and the Al^{3+} cation (group G20). The maleic acid buffer was chosen for its weak complexation capacity for Al. The appearance of a Cd^{2+} peak (at -0.7 V vs S.C.E.) or of a Cu^{2+} peak (at -0.2 V vs S.C.E.) allows the concentration of the free complexer to be determined. Knowing this concentration and that of the complexer before the addition of Al, the

concentration of the chelator linked to Al can be calculated. We proceeded in the same way by adding Ca^{2+} to the initial solution (concentration of 100 mg/L, equivalent to that encountered in plasma) which by virtue of its significant serum concentration and its possible complexation could affect the chelation of Al by the different compounds.

The various experiments were carried out at $20 \pm 1^\circ\text{C}$ with and without calcium and then at $37 \pm 1^\circ\text{C}$. The polarographic cell was filled with 40 mL of a solution containing:

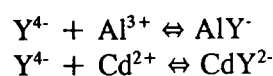
- 38 mL of ultra pure water (or 38 mL of an aqueous Ca^{2+} solution at 100 mg/L).
- 2 mL of maleic acid buffer (1M) to $\text{pH}=7.40$.

The following was added to this solution:

- $20\mu\text{L}$ of the solution (M/27 equivalent to an Al concentration of 1 g/L) of the compound studied, i.e. a concentration of $1.85 \times 10^{-5}\text{M}$.
- $10\mu\text{L}$ of an Al solution (1 g/L), i.e. a concentration of $0.93 \times 10^{-5}\text{M}$.

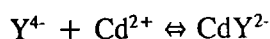
Solutions of Cd^{2+} or of Cu^{2+} were successively added in $10\mu\text{L}$ aliquots until a characteristic peak was obtained in order to define the equivalence point.

To summarize, if Y^{4-} is the chelator (type EDTA), we will have:



where $[\text{Y}^{4-}]_{\text{start}}$ and $[\text{Al}^{3+}]_{\text{start}}$ are known.

If the complexation with Al is incomplete, the Y^{4-} ions remain free and are complexed by Cd^{2+} (or Cu^{2+}) according to the instantaneous reaction:



then the part complexed to Al will be: $[\text{Y}^{4-}]_{\text{start}} - [\text{Y}^{4-}]_{\text{free}}$

Since the concentration of the initial Al^{3+} is known, the percentage of complexed Al can be calculated.

$$\% \text{ of complexed Al} = ([\text{Y}^{4-}]_{\text{start}} - [\text{Y}^{4-}]_{\text{free}}) (100) / [\text{Al}^{3+}]_{\text{start}}$$

The determination of an equivalence point was based on the appearance of a free Cd^{2+} (or Cu^{2+}) peak.

Complexation of Al Previously Bound to Serum Protein

Bovine serum was obtained from freshly collected blood in polypropylene containers from the Metz slaughterhouse. After collection, the blood was left at room

temperature for 4 to 6 hours to allow it to coagulate. The surface blood was then collected and centrifuged at 3000 g for five minutes to collect the serum to be used for different studies. The ultrafiltration technique was carried out by using 13,239 E Centrisart 1 tubes (rupture mass of 10,000 Daltons, Sartorius). After centrifugal processing, the ultrafiltrate was preserved at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ in polypropylene tubes. A solution of Al (solution of aluminum chloride, 1 g Al/L) was added to the serum in order to obtain a concentration of 200 μg elemental Al/L (a concentration frequently encountered in long-term dialysis patients).

First, it was necessary to determine the duration required for the binding of Al to proteins. Then the molecule being studied was added to the serum to yield a final concentration of $4.88 \times 10^{-4}\text{M}$. The overloaded serum and the chelating agent were returned to a water bath at 37°C for varying periods of time (30 min, 1 hr, 3 hr, 24 hr) in order to study the complexation kinetics of the different chelators. Upon removal from the water-bath, the mixture was placed in ultrafiltration tubes (2.5 mL per tube) then centrifuged at about 3000 g for 1.5 hr. Under the effect of the centrifugal force, the small upper tube tends to sink requiring the liquid to pass through a selective mass membrane. This operation, thus, allows the liquid containing free Al or Al complexed by small molecules with a mass of less than 10,000 to be collected in the upper tube.

The second objective of this initial study was to determine the efficacy of different chelators in relation to their serum concentrations. Ultrafiltration tubes containing serum protein, to which Al was previously bound, and different concentrations of chelator solution (varying from $4.88 \times 10^{-4}\text{M}$ to $9.8 \times 10^{-3}\text{M}$) were prepared for each substance. When the Al had been fixed onto the serum proteins, the complexer was introduced and left to take effect for time t (defined later) in a water bath at 37°C . The temperature was reduced to 20°C over 10 min., in order to slow down the complexation and to bring the sample back to the room temperature, and then after centrifugation at 3000 g (1.5 hr), the Al contained in the ultrafiltrate was determined by E.A.S. In this study, DFO, a chelator, recognized for its efficacy in the treatment of aluminum accumulation was used as a reference.

Assessment of Potential Compounds in the Aluminum Loaded Rats

Animals

Outbred albino male rats of the Wistar strain (Iffa Credo, L'Arbresle, France) weighing 200 ± 30 g were individually housed in plastic cages (43 x 28 x 15 cm) in an air-conditioned room maintained at a relatively constant temperature (22-23°C) and a 12 hr light-dark cycle (lights off at 7 PM). Water and standard diet (food pellets, Extra Labo, Provins, France) were available *ad libitum*.

Treatments

Animals were randomly divided into five experimental groups. Rats in the four treated groups were given daily (5 days/week, for 4 weeks) i.p. injections of 2 mg elemental Al/kg/day (solution of aluminum chloride, pH 3.8 ± 0.1 , prepared with a solution of NaCl, 0.9 %), and rats of the control group received an equivalent volume of vehicle (0.9 % NaCl adjusted to pH 3.8 ± 0.1). This treatment was chosen because an upper dose would produce an inflammatory response (peritonitis) (Muller, 1993). Furthermore, a 4 week period was chosen to produce a significant accumulation of Al in rats (Muller, 1993). The intraperitoneal route was chosen because it was the method which permitted the best control of the quantity of Al ingested by the animals.

Chelator testing began one week after the end of Al intoxication. Each chelator was dissolved in NaCl (0.9 %) immediately prior to administration. All animals were given daily i.p. injections of the chelators (5 days/week, for 2 weeks). The dose administered was arbitrarily fixed to approximately 40 mg/kg of each compound (dose usually encountered in Al accumulation treatment with DFO). Rats of the control group and the Al group were injected with an equivalent volume of vehicle (NaCl, 0.9 %). The rats were weighed during the experimental study. Each group (C, Al, HEDTA, EDTA and DFO) contained 6 animals.

Urine Collection

Urine was collected by housing the rats of each group in individual metabolic cages. Before treatment and after the first, third and ninth injection (D0, D1, D3 and D9), urine of each animal was collected. After injection, animals were housed in diuresis

cages (23 x 20 x 16 cm) for 24 hr without food (to avoid contamination of urine) but with water *ad libitum*. After collection, urine was centrifuged at 3000 g for 3 min and saved by adding nitric acid (Supra pur, Merck) (50 μ L for 5 mL of urine) for future use.

At the end of the treatment, the rats were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg body weight) 48 hr after the last i.p. injection. Blood was collected in heparinized plastic tubes by cardiac puncture and centrifuged at 3000 g for 3 min to collect the plasma. Liver, spleen, kidneys, brain and femur were collected and weighed.

Metal Determination

Tissues were treated with nitric acid (Supra pur, Merck) in order to dissolve all minerals. The aluminum concentrations in water, ultrafiltrate, plasma, urine and the various tissues, and the zinc, copper, iron and calcium levels in urine and plasma (except iron because Fe concentrations in red blood cells were so important that a slight hemolysis could produce notable variations) were determined using an atomic emission spectrometer (Spectra Span V, Beckman).

Data Analysis

Results are expressed as the mean $\pm$ SD. Comparisons between groups were made by using analysis of variance (ANOVA). The Dunnett's test was used when ANOVAs produced significant effects. The null hypothesis was rejected at the 5% significance level ($p < 0.05$).

Results

The results obtained by polarography concerning the complexation of Al in water are shown in Figure 1. The results obtained with DFO are not indicated in this figure. This compound did not complex either the Cd^{2+} or the Cu^{2+} , at least not under the specific experimental conditions of this study. The effect of Ca^{2+} was significant for EDTA; the chelation capacity was reduced by about 60% (at 20°C or 37°C). Although the presence of Ca^{2+} had no influence on the chelating ability of HEDTA and DTPA at 37°C (100%), this was not the case at 20°C when a strong reduction in chelating capacity was found. The analysis of the results concerning CDTA shows that the percentage of complexed Al is 63% and 98% at 20°C and 37°C, respectively. The

weakest chelation potential was determined for NTA ($\approx 80\%$) and EGTA ($< 30\%$). The results obtained do not vary significantly with temperature and the presence of Ca^{2+} .

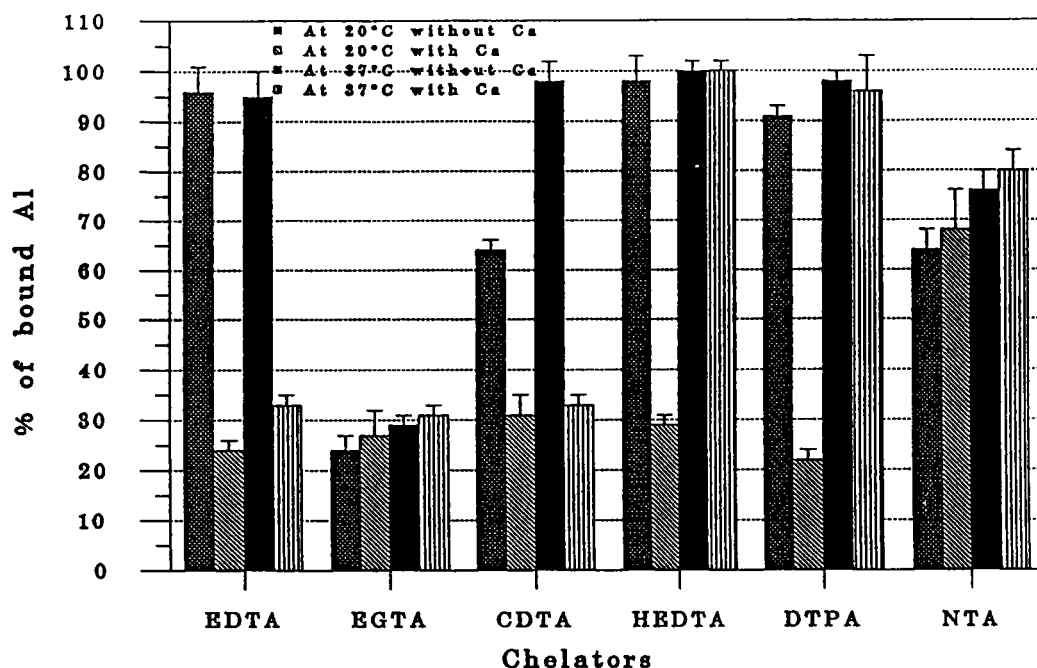


Figure 1.: Evaluation of potential aluminum chelators in water (polarographic method, $n=5$).

The total aluminum concentration of the bovine serum was $22 \pm 6 \mu\text{g/L}$ ($n = 10$). The concentration of ultrafiltrable serum Al is $4 \pm 3 \mu\text{g of Al/L}$ ($n = 10$). These results confirm recent measurements (Harris, 1992) indicating that serum Al is 80% bound by proteins and 20% in an ultrafiltrable form. The present studies indicate that the fixation kinetics of Al on serum proteins are very fast ($< 15 \text{ min}$ at 37°C , and 1.5 hr of the centrifugal process at 20°C).

The ultrafiltration technique allowed the mobilization kinetics of Al from serum proteins to be studied. It would seem that the chelation efficacy of the molecules tested at a concentration of $4.88 \times 10^{-4}\text{M}$ was very weak ($< 5\%$) and not at all influenced by the duration of the contact with the serum at 37°C . Only DFO and DTPA demonstrated significant variations in the percentage of Al mobilized between 30 min and 24 hr (results

unpublished). The percentage varied from 65 to 80% for DFO between 3 and 24 hr. The efficiency of DTPA fell from 4 to 1 % for periods of time of more than 1 hr. Consequently, the contact time t was be fixed at 45 min assuming that chelation was achieved during one hour for the majority of compounds.

The results showing the percentages of serum Al mobilized by the tested compounds at the different concentrations are shown in Figure 2. The mobilization capacity of Al from serum proteins was maximum for several compounds (DFO, HEDTA, and DTPA). Maximum efficacy was obtained for a concentration of $3 \times 10^{-3}M$, DFO; $7 \times 10^{-3}M$, HEDTA or $10^{-2}M$, DTPA. At a maximum concentration of $10^{-2}M$, the other substances showed chelation of less than 80%. The percentage of mobilized Al linearly correlated to test compound concentrations for EDTA and CDTA. The maximum percentage of mobilized Al was about 80, 80 and 70%, respectively, for EDTA and CDTA at a concentration of $10^{-2}M$. NTA and EGTA appeared to be the least efficient chelators. Indeed, the maximum percentages of mobilized Al were about 35 and 30%, respectively, for NTA and EGTA at the highest concentration ($\approx 10^{-2}M$). The element contents of blood plasma in rats are shown in Table I.

TABLE I

Mineral Concentrations of Different Elements (Al, Cu, Zn and Ca) in Plasma
($\mu g/L$, Except Ca: mg/L)

Groups	Al	Cu	Zn	Ca
C	23.24 ± 3.73	903.22 ± 24.82	1401.33 ± 90.73	126.23 ± 1.87
Al (a)	$137.54 \pm 9.40^*$	996.33 ± 48.45	1501.78 ± 59.94	123.94 ± 1.02
DFO (b)	$129.19 \pm 16.01^*$	938.17 ± 56.26	1747.33 ± 180.24	121.10 ± 4.14
EDTA (c)	$162.70 \pm 12.11^{*ab}$	1043.83 ± 109.52	1112.67 ± 48.17	123.86 ± 1.67
HEDTA (d)	$159.95 \pm 23.11^{*ab}$	931.00 ± 24.28	1707.67 ± 180.21	122.08 ± 1.66

Results are expressed as mean $\pm$ SE. *Significantly different from group C ($p < 0.001$)

^{a,b,c,d} significantly different from group a, b, c or/and d ($p < 0.01$)

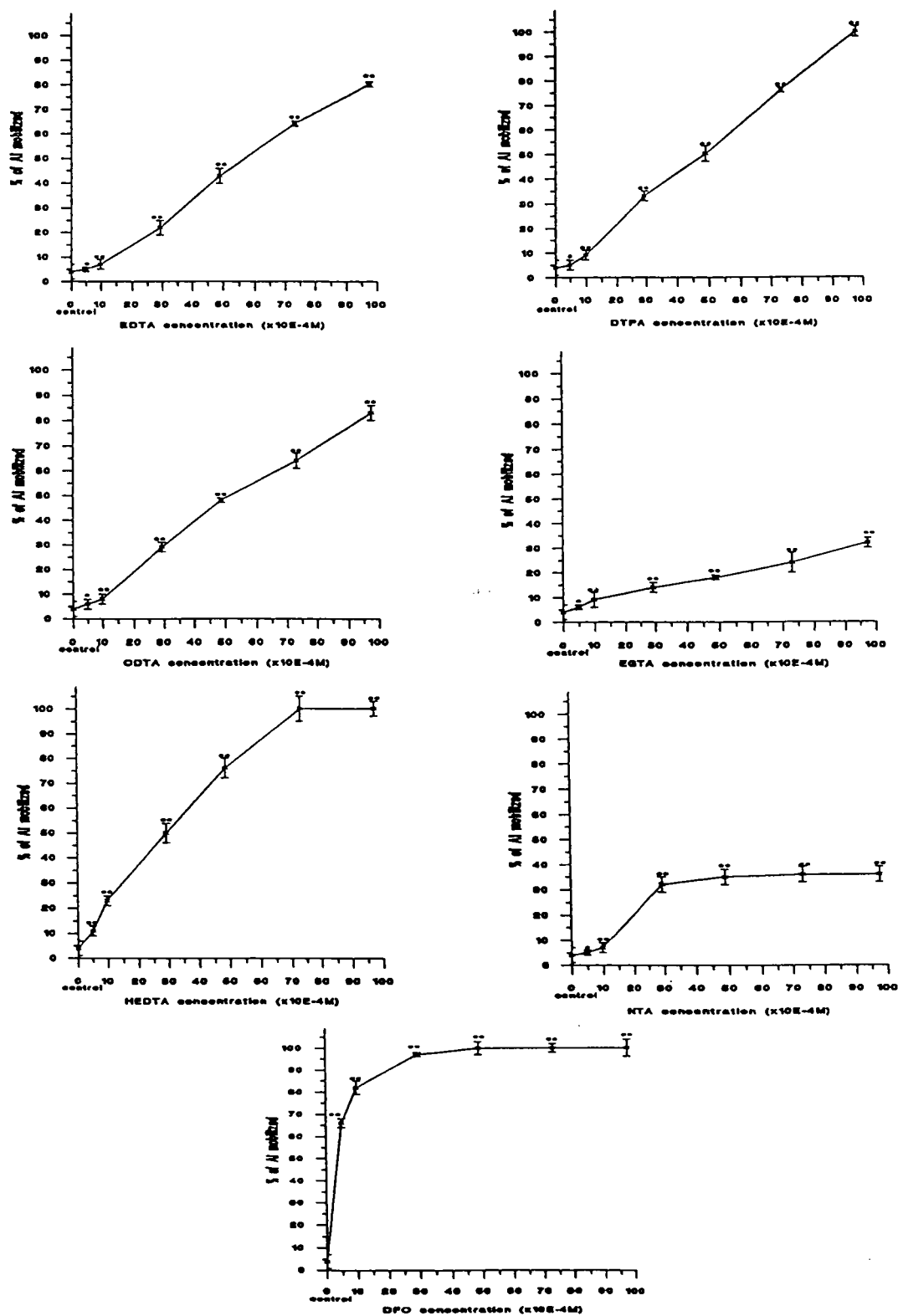


Figure 2.: Ability of CDTA, DTPA, EDTA, EGTA, HEDTA, NTA and DFO to mobilize Al from serum. * significantly different from control: $p < 0.05$. ** significantly different from control: $p < 0.01$

Treatment with aluminum chloride significantly increased ($p < 0.001$) aluminum levels in plasma: the values were 7-fold higher. The concentrations of copper, zinc and calcium did not significantly differ among the three treated (HEDTA, EDTA and DFO) and control groups. Table II shows the effect of the compounds on the tissue distribution of aluminum.

TABLE II
Aluminum Concentrations in Various Tissues
($\mu\text{g/g}$ Wet Weight, Except Femur: $\mu\text{g/g}$ dry weight).

Groups	Liver	Spleen	Kidneys	Femur	Brain
C	0.24 ± 0.08	0.63 ± 0.06	0.44 ± 0.10	1.46 ± 0.36	0.30 ± 0.02
Al	26.89 ± 0.82	59.52 ± 5.72	2.89 ± 0.33	13.76 ± 0.78	0.40 ± 0.03
DFO (a)	$23.15 \pm 0.58^{*c}$	57.05 ± 3.64^c	$1.85 \pm 0.13^*$	12.47 ± 1.25	0.39 ± 0.04
EDTA (b)	27.67 ± 2.06^c	66.41 ± 4.81^c	$2.07 \pm 0.27^*$	14.18 ± 1.34	0.40 ± 0.02
HEDTA (c)	$19.79 \pm 0.19^{**ab}$	$47.47 \pm 1.06^{*ab}$	$1.68 \pm 0.14^*$	12.61 ± 1.31	0.35 ± 0.02

Results are expressed as mean $\pm$ SE. *Significantly different from Al group ($p < 0.05$)

**Significantly different from Al group ($p < 0.001$). ^{a,b,c}Significantly different from group a,b or/and c ($p < 0.05$)

Treatment with aluminum chloride markedly increased aluminum concentrations in liver, spleen, kidneys and femur, in comparison with the control group. These results agree with our previous studies (Muller *et al.*, 1992). The highest Al variations were found in the liver and the spleen (112-fold and 94-fold, respectively, in the Al group). Brain Al levels did not vary among the different groups.

DFO and HEDTA significantly reduced the aluminum concentrations in the liver (mean reduction values: 14% and 26.4%, respectively) and in the kidneys (36% and 41.9%, respectively) vs the Al group. HEDTA and EDTA shows a significant decrease, respectively, in spleen (20.2%) and in kidneys (41.9%). Nevertheless, no significant decreases in femur aluminum concentrations were noted after treatment with the different compounds.

Table III and Figure 3 show the urinary metal excretion (μg metal/kg body weight/24 hr) by rats that received one of the various chelators or saline solution. The amounts of the different metals (Al, Ca, Cu, Zn and Fe) were determined on days 0, 1, 3 and 9 of treatment (D0, D1, D3 and D9). Urinary excretion of Al, Ca and Cu measured on days 0, 1, 3 and 9 during the different treatments were not significantly different from the Al group (Table III). Analysis of Al data of the Al group showed significant differences ($p < 0.01$) vs the control group on days 0, 1, 3 and 9; there was no significant difference between the three last groups. However, at the ninth day of treatment with HEDTA, Al urinary excretion increased so that it became nearly significant ($p < 0.06$).

Excretion of Zn (Figure 3) increased significantly on days 1, 3 and 9 in the two treated groups HEDTA ($p < 0.05$) and EDTA ($p < 0.01$) vs the Al group (day 1: 4.9 and 10.7-fold; day 2: 11.8 and 21.7-fold; day 3: 10.5 and 20.7-fold, in group HEDTA and EDTA, respectively). Furthermore, EDTA increased urinary Zn excretion $\approx$ 2-fold more than HEDTA. On these days in the same groups, the Fe excretion increased as significantly from the Zn group vs the Al group (day 1: 2.8 and 3.5-fold; day 3: 2.6 and 2.8-fold; 1.9 and 2.0-fold, the in HEDTA and EDTA groups, respectively). Treatment with DFO significantly increased Fe excretion on days 1, 3 and 9 (3.9; 2.4 and 1.7-fold respectively, vs the Al group). No significant differences were observed between DFO, HEDTA and EDTA.

Discussion

Desferrioxamine has been the most commonly used chelator for the treatment of aluminum accumulation (Ackrill *et al.*, 1980). This study has allowed the chelation potential of certain molecules for Al to be tested by *in vitro* and *in vivo* techniques. The polarographic technique allows the Al (or another metal) complexing molecules to be studied rapidly and at a low cost. The ultrafiltration technique associated with E.A.S. analysis enables the mobilization potential of the compounds to be studied in comparison with Al which is bound to serum proteins. Indeed, as far as the serum is concerned, 50 to 90 % of blood Al would be linked to proteins (Skalsky and Carchman, 1983; Burnatowska-Hledin *et al.*, 1985) and only 20% of the metal would be in an ultrafiltrable form (Stummvoll *et al.*, 1984; Harris, 1992).

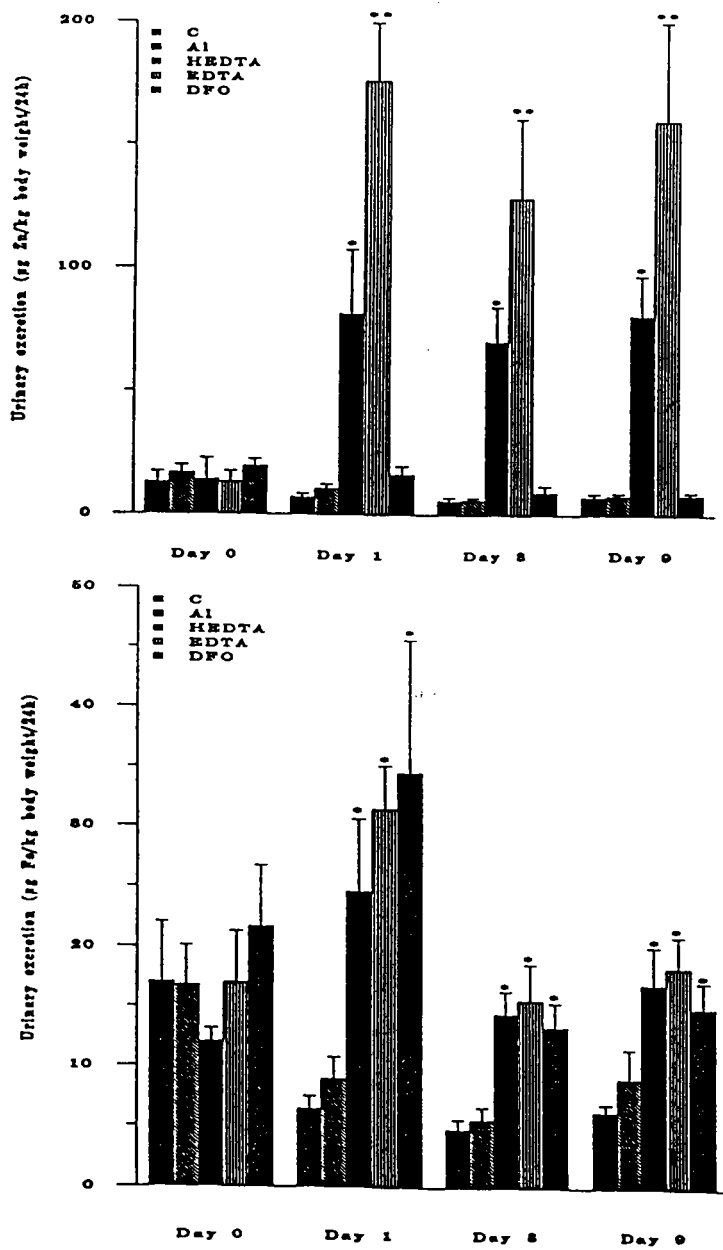


Figure 3.: Urinary excretion of zinc and iron at different periods of treatment ($\mu\text{g Zn}$ or $\text{Fe/kg body weight/24hr}$). *significantly different from control: $p < 0.05$
**significantly different from control: $p < 0.01$

TABLE III

Urinary Excretion of Aluminum, Calcium and Copper at Different Periods
(Days 0, 1, 3 and 9) of Treatment ($\mu\text{g Al/kg Body Weight/24hr}$)

Al

Groups	D0	D1	D3	D9
C	3.04 $\pm$ 1.12*	1.16 $\pm$ 0.47*	1.96 $\pm$ 0.79*	0.72 $\pm$ 0.31*
Al	271.11 $\pm$ 27.76	146.67 $\pm$ 15.18	128.89 $\pm$ 13.38	71.11 $\pm$ 8.57
DFO	270.00 $\pm$ 28.87	180.00 $\pm$ 16.73	143.33 $\pm$ 9.19	88.33 $\pm$ 10.78
EDTA	258.33 $\pm$ 36.28	196.67 $\pm$ 14.98	156.67 $\pm$ 14.98	83.33 $\pm$ 21.08
HEDTA	216.67 $\pm$ 16.06	163.33 $\pm$ 20.60	140.00 $\pm$ 15.71	96.67 $\pm$ 9.19

Ca

Groups	D0	D1	D3	D9
C	6452 $\pm$ 1947	3575 $\pm$ 545	1935 $\pm$ 309	4605 $\pm$ 822
Al	8233 $\pm$ 2457	8550 $\pm$ 2107	3189 $\pm$ 680	3851 $\pm$ 879
DFO	6356 $\pm$ 1967	9500 $\pm$ 1754	3934 $\pm$ 686	5826 $\pm$ 904
EDTA	8106 $\pm$ 2394	9198 $\pm$ 1186	4829 $\pm$ 933	5535 $\pm$ 902
HEDTA	6093 $\pm$ 511	6700 $\pm$ 2216	4947 $\pm$ 747	4797 $\pm$ 934

Cu

Groups	D0	D1	D3	D9
C	11.33 $\pm$ 2.74	5.86 $\pm$ 0.64	6.44 $\pm$ 0.72	6.18 $\pm$ 0.79
Al	17.84 $\pm$ 4.22	8.20 $\pm$ 0.92	7.72 $\pm$ 0.74	8.76 $\pm$ 1.02
DFO	19.49 $\pm$ 5.77	7.77 $\pm$ 1.07	5.40 $\pm$ 0.36	7.87 $\pm$ 1.12
EDTA	8.87 $\pm$ 1.45	9.97 $\pm$ 1.24	8.81 $\pm$ 2.13	7.72 $\pm$ 1.04
HEDTA	16.68 $\pm$ 3.02	9.42 $\pm$ 1.63	7.55 $\pm$ 0.51	9.32 $\pm$ 1.37

Results are expressed as mean $\pm$ SE. * significantly different from all other groups ($p < 0.001$).

The *in vitro* capacity of the different chelators to mobilize Al from serum proteins should reflect *in vivo* chelation potentials. It is for these reasons that experimental studies have also been carried out on bovine serum. The main serum proteins involved in Al

complexation would be transferrin and albumin (Trapp, 1983; Van Ginkel *et al.*, 1990; Bertholf *et al.*, 1984).

The studies carried out by polarography in an aqueous solution reveal the following:

- the presence of Ca^{2+} can reduce the efficacy of EDTA as it competes for sites to react with EDTA.
- a temperature of 37° can favor the potential or increase chelation kinetics in spite of the presence of Ca (HEDTA and DTPA) or the absence of Ca (CDTA and NTA).
- it must be noted that in this study the pH conditions are not optimal. Indeed, at a pH of 7.40, Al is strongly hydrolyzed which hinders its complexation.

The studies carried out by ultrafiltration on bovine serum give rise to the following conclusions:

Of the polyaminocarboxylic acids (EGTA, DTPA, CDTA, EDTA, HEDTA and NTA), EGTA seems to be devoid of any interest. Indeed, this molecule does not succeed in mobilizing appreciable quantities of Al in spite of a $\log K = 13.9$ (Bhat *et al.*, 1967).

Despite their relatively high $\log K$ with Al (16.1 and 17.6, respectively; Ringbom, 1967), the efficacy of EDTA and CDTA slowly increased and in a quasi linear manner, reaching about 80% at 10^{-2}M . The weak NTA chelation capacity could be explained by a mediocre affinity for the Al^{3+} cation ($\log K = 11.1$; Bhat *et al.*, 1967), in relation to the affinity of transferrin for Al ($\log K_1 = 12.9$ and $\log K_2 = 12.3$; Martin *et al.*, 1987). DTPA behaved like EDTA and CDTA, but it mobilized the majority of the Al at a concentration of $\approx 10^{-2}\text{M}$. In terms of modifying the DTPA behavior according to contact time with Al (results unpublished), Andersen (1989) had already observed such a phenomenon. It is possible that this reduction in efficacy was linked to the degradation of DTPA during the time it was at a temperature of 37°C , or to competitive complexations (over time) with other metals present in the serum. HEDTA showed interesting perspectives for continued research on new Al chelators, in spite of a $\log K$ of 14 (Bhat *et al.*, 1967). Indeed, it was capable of mobilizing non-negligible quantities of serum aluminum, even at low concentrations.

It should be noted that at very weak chelator concentrations, Ca^{2+} can have an influence on complexation reactions. However, at a chelator concentration of 10^{-2}M , the influence of Ca^{2+} ($2.5 \times 10^{-3}\text{M}$) becomes negligible. Similarly, the weak $\log K$ differences (all relatively high except for NTA) cannot alone explain the differences in efficacy observed for the different compounds. These variations certainly come from reactional mechanism differences related to the transfer kinetics of Al between transferrin and the chelator.

Taking into account the results obtained during the *in vitro* study and the results of later studies, it would seem interesting to pursue the research with certain compounds. This could be done within the framework of an *in vivo* model in order to verify if the compounds retained preserve the same efficacy in physiological conditions. Consequently, EGTA, NTA and CDTA did not require further investigations regarding their low effectiveness to chelate aluminum. DTPA, in spite a good chelation capacity versus Al, did not present any interest because it is not well distributed to the tissues and remains extracellular (Hershko *et al.*, 1978). Moreover, DTPA produced toxic reactions (Pippard *et al.*, 1986). EDTA, despite a moderate chelating capacity, may present some interest because it was used in the treatment of dialysis encephalopathy (Delavelle *et al.*, 1977) and could represent a reference in DFO studies. Obviously, HEDTA was conserved because its chelation capacity is almost as effective as that of DFO.

To compare the real efficacy of the chelating compounds, rats were pretreated with aluminum chloride, and then received different chelating agents. The different chelators did not increase the urinary excretion of aluminum. Treatment with HEDTA and EDTA increased the excretion of Zn and Fe. Nevertheless, in spite of an increase of urinary Zn excretion, a variation in blood Zn concentration was not observed. Except for aluminum, other elements bind strongly to DFO including iron, zinc, copper, chromium and vanadium (Ackrill and Day, 1984). DFO increases iron elimination effectively. This chelator has previously been used in chronic dialysis patients with iron overload (Fosburg *et al.*, 1984).

Aluminum was found to accumulate in all tissues analyzed, except in brain in treated rats (Group Al) as compared with Group C. As previously reported, the liver and spleen are the main storage sites of intraperitoneally administered aluminum. The

concentrations of aluminum were high in liver and spleen and less noticeable in femur and kidneys. These results are in agreement with our previous study (Muller *et al.*, 1992). In general, the injection of chelating agents significantly decreased the concentration of aluminum in these organs. Treatment with HEDTA significantly reduced the concentration of aluminum found in various tissues (liver, spleen and kidneys), was suggested to be the most effective agent of those tested in the prevention of acute aluminum intoxication, and can be used as a possible alternative to DFO. Our results showed that, in spite of a decrease of aluminum concentrations in different organs (liver, spleen and kidneys), the urinary aluminum excretion of the treated rats was not significantly increased. That observation could be attributed to a low accumulation of the metal in the tissues and to an important urinary concentration of aluminum. In fact, the normal urinary Al excretion rose to ≈ 10 mg Al/L. Then, if a chelator decreased tissue Al concentration (a few μ g), this decrease would probably be insufficient to produce an additional rise in urinary Al excretion. This additional increase should approach the variations encountered between different animals. However, at the ninth day of treatment with HEDTA, Al urinary excretion increased so that it became nearly significant ($p < 0.06$) (Table III).

The results of the *in vivo* experiments are in agreement with our previous experiment on the comparison of *in vitro* Al chelation by HEDTA. However, the extrapolation of our results to chronic aluminum accumulation in humans is difficult. No information on the toxicity and the therapeutic efficacy of HEDTA in metal intoxication has been available. Therefore, more investigations are required before the possible use of this compound as a therapeutic agent.

The experimental techniques used here could also allow the complexation potential to be estimated for these same substances (or others) and for other metals (Fe, Cd, Zn, Pb). However, the most appropriate solution to the accumulation of Al in the organism is to find an alternative to the aluminum compounds presently used in the treatment of hyperphosphatemia.

Acknowledgments

The authors thank the English Study Center (Nancy): A. Boyd and C. Francey for translation.

References

- Ackrill, P. and Day, J.P. (1984).: Therapy of aluminum overload (II). *Contr. Nephrol.* 38: 78-80.
- Ackrill, P., Ralston, A.J., Day, J.P. and Hodge, K.C. (1980).: Successful removal of aluminum from patient with dialysis encephalopathy. *Lancet II*: 692-693.
- Alfrey, A.C. (1984).: Aluminum intoxication. *N. Engl. J. Med.* 310: 1113-111.
- Alfrey, A.C., Legendre, G.R. and Kaehny, W.D. (1976).: The dialysis encephalopathy syn-drome: possible aluminum intoxication. *N. Engl. J. Med.* 294: 184-188.
- Andersen, O. (1989).: Oral cadmium exposure in mice: toxicokinetics and efficiency of chelating agents. *Crit. Rev. Toxicol.* 20: 83-112.
- Bertholf, R.L., Wills, M.R. and Savory, J. (1984).: Quantitative study of aluminum binding to human serum albumin and transferrin by a chelator competitive binding assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125: 1020-1024.
- Bhat, T.R., Radha, R.D. and Shankar, J. (1967).: Complexes of aluminum with some poly-aminocarboxylic acids. *Indian J. Chem.* 5: 325-327.
- Brown, D.J., Ham, K.N., Dawborn, J.K. and Xippel, J.M. (1982).: Treatment of dialysis osteomalacia with desferrioxamine. *Lancet II*: 343-345.
- Burks, J.S., Alfrey, A.C., Huddleston, J., Norenberg, M.D. and Lewin, E. (1976).: A fatal encephalopathy in chronic haemodialysis patients. *Lancet I*: 764-768.
- Burnatowska-Hledin, M.A., Mayor, G.H. and Lau, K. (1985).: Renal handling of aluminum in the rat: clearance and micropuncture studies. *Am. J. Physiol.* 249: 192-197.
- Burnel, D., Hutin, M.F., Masson, A. and Netter, P. (1982).: Dosage de l'aluminium par polarographie impulsionnelle. *Ann. Fals. Exp. Chim.* 75: 177-183.
- Charhon, S.A., Chavassieux, P., Chapuy, M.C., Accominoti, M., Traeger, J. and Meunier, P.J. (1986).: Traitement par la desferrioxamine de l'ostéomalacie par intoxication à l'aluminium. *Presse Med.* 15: 55-59.
- Delavelle, F., Richalet, B., Malvy, F. and Fries, D. (1977).: Le traitement par l'EDTA des encéphalopathies "pseudo-démentielles" chez les hémodialysés. *Nouv. Pres. Med.* 6: 941-942.

- Domingo, J.L., Gomez, M., Llobet, J.M. and Corbella, J. (1988).: Comparative effects of several chelating agents on the toxicity, distribution and excretion of aluminum. *Hum. Toxicol.* 7: 259-262.
- Domingo, J.L., Llobet, J.M., Gomez, M. and Corbella, J. (1986).: Acute aluminum intoxication: A study of the efficacy of several antidotal treatments in mice. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 53: 93-104.
- Ellis, H.A., McCarthy, J.H. and Herrington, J. (1979).: Bone aluminum in haemodialysed patients and in rats injected with aluminum chloride: relationship to impaired bone mineralization. *J. Clin. Pathol.* 32: 832-844.
- Estrov, Z., Cohen, A., Gelfand, E.W. and Freedman, M.H. (1988).: *In vitro* cytotoxicity of deferoxamine on human marrow haematopoietic progenitors. *Toxicol. In vitro* 2: 131-134.
- Felsenfeld, A.J., Rodriguez, M., Coleman, M., Ross, D. and Llach, F. (1989).: Desferrioxamine therapy in hemodialysis patients with aluminum-associated bone disease. *Kidney Int.* 35: 1371-1378.
- Fosburg, M., Hakim, R.M., Schulman, G., Proper, R., Lazarus, J.M., Wolfe, L., and Gorin, R. (1984).: Pharmacokinetics (K) of desferrioxamine (D) during treatment of transfusional iron overload (IO) in chronic hemodialysis (HD) patients. *Kidney Int.* 25: 183.
- Freedman, M.H., Boyden, M., Taylor, M. and Skarf, B. (1988).: Neurotoxicity associated with deferoxamine therapy. *Toxicology* 49: 283-290.
- Ganrot, P.O. (1986).: Metabolism and possible health effects of aluminum. *Environ. Health Perspect.* 65: 363-441.
- Harris, W.R. (1992).: Equilibrium model for speciation of aluminum in serum. *Clin. Chem.* 38: 1809-1818.
- Hershko, C., Grady, R.W. and Cerami, A. (1978).: Mechanism of iron chelation in the hyper-transfused rat: definition of two alternative pathways of iron mobilization. *J. Lab. Clin. Med.* 92: 144-151.
- Jones, M.M. (1984).: Antagonists for toxic heavy metals. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 27: 163-167.

- Jones, M.M. and Cherian, M.G. (1990).: The search for chelate antagonists for chronic cadmium intoxication. *Toxicology* 62: 1-25.
- Landsberg, J.P., McDonald, B. and Watt, F. (1992).: Absence of aluminum in neuritic plaque cores in Alzheimer's disease. *Nature* 360: 65-68.
- Lapresle, J., Duckett, S. and Galle, P. (1975).: Documents cliniques, anatomiques et biophysiques dans une encéphalopathie avec présence de dépôts d'aluminium. *C. R. Soc. Biol.* 282: 282-285.
- Llobet, J.M., Domingo, J.L. and Corbella, J. (1988).: Antidotes for zinc intoxication in mice. *Arch. Toxicol.* 61: 321-323.
- Llobet, J.M., Domingo, J.L., Gomez, M., Tomas, J.M. and Corbella, J. (1987).: Acute toxicity studies of aluminum compounds: Antidotal efficacy of several chelating agents. *Pharmacol. Toxicol.* 60: 280-283.
- Llobet, J.M., Domingo, J.L., Paternain, J.L. and Corbella, J. (1990).: Treatment of acute lead intoxication: A quantitative comparison of number of chelating agents. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19: 185-189.
- Martin, R.B., Savory, J., Brown, S., Bertholf, R.L. and Wills, M.R. (1987).: Transferrin binding of Al^{3+} and Fe^{3+} . *Clin. Chem.* 33: 405-407.
- Muller, G. (1993).: Contribution à l'étude expérimentale des effets de sels aluminiqueschez le Rat en développement. Thèse de l'Université de Metz.
- Muller, G., Hutin, M.F., Burnel, D., and Lehr, P.R. (1992).: Aluminum transfer through milk in female rats intoxicated by aluminum chloride. *Biol. Tr. Elem. Res.* 34: 79-87.
- Netter, P., Burnel, D., Hutin, M.F., Kessler, M. and Faure, G. (1981).: Aluminum in joint tissues of patient taking aluminum hydroxyde. *Lancet* 1: 1056-1057.
- Oosterlinck, W., Verbeek, R., Cuvelier, C. and Vergauwe, D. (1992).: Rationale for local toxicity of calcium chelators. *Urol. Res.* 20: 19-21.
- Pippard, M.J., Jackson, M.J., Hoffman, K., Petrou, M. and Modell, C.B. (1986).: Iron chelation using subcutaneous infusions of diethyl triaminepenta-acetic acid (DTPA). *Scand. J. Haem.* 36: 466-472.
- Ringbom, A. (1967).: *Les complexes en chimie analytique*. Ed. Dunod, Paris.

- Skalsky, H.L. and Carchman, R.A. (1983).: Aluminum homeostasis in man. *J. Am. Col. Toxicol.* 2: 405-423.
- Stummvoll, H.-K., Graf, H. and Meisinger, V. (1984).: Effect of desferrioxamine on aluminum kinetics during hemodialysis. *Miner. Electrolyte Metab.* 10: 263-266.
- Sturman, J.A. and Wisniewski, H.M. (1988).: Aluminum. In: *Metal Neurotoxicity*. Edited by S.C. Bondy and K.N. Prasad. CRC Press. Boca Raton, FL. pp. 61-85.
- Trapp, G.A. (1983).: Plasma aluminum is bound to transferrin. *Life Sci.* 33: 311-316.
- Van Ginkel, M.F., Van Der Voet, G.B., Van Eijk, H.G. and De Wolff, F.A. (1990).: Aluminum binding to serum constituents: A role for transferrin and for citrate. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 28: 459-463.
- Wills, M.R. and Savory, J. (1983).: Aluminum poisoning: dialysis encephalopathy, osteomalacia, anaemia. *Lancet II*: 19-34.
- Yokel, R.A. and Kostenbauder, H.B. (1987).: Assesment of potential aluminum chelators in an octanol/aqueous system and in the aluminum-loaded rabbit. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 91: 281-284.
- Yokel, R.A., Datta, A.K. and Jackson, E.G. (1991).: Evaluation of potential aluminum chelators *in vitro* by aluminum solubilization ability, aluminum mobilization from transferrin and the octanol/aqueous distribution of the chelators and their complexes with aluminum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257: 100-106.

COPYRIGHT © 1995 BY
PJD PUBLICATIONS LIMITED, P. O. BOX 966, WESTBURY, NY 11590



IN VITRO AND IN VIVO EVALUATION OF POTENTIAL ALUMINUM CHELATORS

L GRAFF, G MULLER, D BURNEL

In Vitro and in Vivo Evaluation of Potential Aluminum Chelators

Lionel Graff, Guy Muller, Daniel Burnel
Laboratoire de Chimie Generale Appliquee a la Medecine, Faculte de Medecine,
Universite Henri Poincare, Nancy I, 9 Av de la Foret de Haye,
BP 184, 54505 Vandoeuvre les Nancy cedex, France

ABSTRACT. The potential for aluminium (Al) chelation by different compounds was determined using 2 in vitro techniques. The formation of stable complexes with Al in an aqueous solution was evaluated using pulse polarography. This technique allowed the influence of temperature and calcium (Ca) to be studied for each compound. Certain compounds (EDDHA, HAES, citric acid and HBED) showed great chelation in the absence of Ca²⁺ at a temperature of 37±1 C. An ultrafiltration technique combined with Al determination by atomic emission spectroscopy allowed the efficiency of different substances to complex Al that were previously bound to serum proteins to be estimated. The kinetics of chelation and minimum efficient concentration have been determined for all products studied. EDDHA had chelation potential similar to DFO. The real efficiencies of the compounds were studied in vivo to compare the effectiveness of repeated administrations of the best chelating agents (EDDHA, DFO, HAES and tartaric acid) on the distribution and excretion of Al after repeated ip administrations to rats. Intraperitoneal EDDHA significantly increased urinary metal (Al, Ca, Cu, Fe and Zn) excretion. These excretions may be correlated to a renal toxic potential property.

Aluminium (Al) is a non-essential element known to have the potential to cause toxicity to the central nervous system, skeletal and to hematopoietic systems and to muscle and joints (9,22,33,36,38). The toxicity of Al was not really taken into consideration until 1975 when the first human encephalopathy associated with an elevated concentration of Al in the brain (27) was described. Since the work by Alfrey et al (4) numerous authors have highlighted the toxic role played by Al. Persons undergoing chronic renal dialysis who ingest Al compounds in order to normalize their serum phosphorous level are those most exposed to contamination by Al. On the other hand, in the absence of renal impairment, the neurotoxicity of Al is not well known and its responsibility in provoking certain senile dementia, especially Alzheimer's disease, is still very debatable (21,26,44).

Since the work of Ackrill et al (2), the iron chelator desferrioxamine (DFO) has been used to treat different pathologies due to the accumulation of Al in the organism (10,14,18). However, DFO can be the cause of serious secondary effects--audio and visual neurotoxicity, infections, cardiac problems, allergy (1,17,20). Furthermore, it is inefficient to administer DFO po and its production cost is relatively high. Consequently, it would be desirable to use less toxic chelators which can be administered po in the treatment of patients intoxicated by this metal.

Few comparative studies on potential Al chelators exist. d-Penicillamine and 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) are inefficient in the treatment of encephalopathies in chronic hemodialysis patients (11). This is because they are soft acid chelators and Al compounds be-

***Abbreviations:** Al=aluminium; DFO=desferrioxamine, desferal; EDDHA=ethylenediamine-N,N'-di(2-hydroxyphenyl)-acetic acid; HAES=(-)-threo-hydroxycitric acid ethylenediamine salt; HBED=N,N'-bis(2-hydroxybenzyl)ethylenediamine-N,N'-diacetic acid; AES=atomic emission spectroscopy; DCP=direct current plasma; logK=stability constants for metal-ion binding; SCE=saturated calomel electrode.

have like hard acids (24). The experimental work carried out on mice (15,16,30) showed that malic, succinic and citric acids could replace DFO in the treatment of Al intoxication. When evaluating the chelation capacity of several compounds for Al, Yokel and Kostenbauder (48) observed that some molecules are capable of chelating Al. After ip injection, ethylenediamine-N,N'-di(2-hydroxyphenylacetic acid) (EDDHA) was found to increase urinary excretion of Al as efficiently as redundant with DFO in rabbits previously intoxicated with Al. However, none of the tested compounds showed a chelating activity when administered po.

The aim of this study was to measure the chelating capacity of different molecules chosen according to their structure and because they are supposed to be favorable to metal complexation (3,6,15,16,24,25,29,31,37,47,48). The chelating efficiency of each compound for Al was first evaluated in an aqueous buffered solution (pH=7.40) using a technique based on pulse polarography (13). The compounds demonstrating complexation power were then further studied to verify their chelation potential for Al bound to serum proteins--particularly transferrin, the principal protein which binds Al^{3+} by means of an ultrafiltration technique coupled to argon plasma atomic emission spectrometry (AES). We explored the consequence of ip administration of the best compounds tested in vitro to rats treated with Al chloride on the concentrations of Al, Cu, Zn, Ca and Fe in plasma, urine and body organs.

METHODS

The reactive chemicals came from Prolabo (Paris), with the exception of the following products: DFO (Ciba-Geigy, Rueil-Malmaison), HAES (Flucka Sarl, Mulhouse); Citric acid (French Pharmaceutical Corporation); EDDHA (Sigma Chimie Sarl, St Quentin Fallavier); Tartaric acid, Aluminium chloride hexahydrate 99%, Sodium chloride 99% (Aldrich Chimie Sarl, St Quentin-Fallavier), and HBED (Strem Chemicals Inc, Bischeim). The solutions of

Al, Cd, Cu and Ca used in polarography were all standard solutions coming from Merck (Nogent-sur-Marne) containing respectively 1 g/L of AlCl_3 , CdCl_2 , CuCl_2 and CaCl_2 .

Aluminium Complexation in Water

The chelation efficiency of different products for Al was determined by pulse polarography. These measures were taken by using a Tacussel PGR5 pulse polarograph connected to an EPL 2B potentiometric recorder with a CPR 3B polarographic cell comprising a saturated calomel reference electrode (SCE), a working electrode made up of mercury drop capillary distributor, and an auxiliary platinum electrode.

All preparations were done in quartz Erlenmeyer in order to avoid contamination from Al in glass containers. When there was excess chelator, the Al was more or less complexed following its affinity to the compound under consideration. In order to define the percentage of complexed Al, it was essential to determine either the concentration of free Al or that of excess chelator. As the electrochemical reduction of Al (III) occurs at a very negative potential (-1.7 V vs SCE), it was difficult to carry out a polarographic dosage of Al. Indeed, at such a potential, even for a pH of 7.40, a reduction of H_3O^+ ions in hydrogen is produced which conceals that of Al^{3+} in Al. Consequently, the determination of Al was carried out by pulse polarography using 2 different techniques.

Indirect determination of Al^{3+} by Cd^{2+} or by Cu^{2+} . Like Cd or Cu, Al reacts mole to mole with EDTA or any other equivalent chelator. However, these 2 metals have the advantage of being electroactive and of giving a polarographic response. Cd^{2+} or Cu^{2+} was used according to the affinity of the chelator for the cation under consideration. The chelation capacities of HAES and citric acid were determined by indirect determination by Cu while Cd was used for all other chelators (with the exception of HBED and EDDHA). The absence of peaks indicated the absence of free Cd^{2+} or Cu^{2+} .

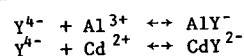
The solution containing Cd^{2+} or Cu^{2+} was added to a maleic acid buffered solution (pH=7.40) at 20 C inside the polarographic cell containing the complexer and the Al^{3+} cation (group G20). The maleic acid buffer was chosen for its weak complexation capacity for Al. The appearance of a Cd^{2+} peak (at -0.7 V vs SCE) or of a Cu^{2+} peak (at -0.2 V vs SCE) allows the concentration of the free complexer to be determined. With knowledge of this concentration and that of the chelator before addition of Al, the concentration of the chelator linked to Al can be deduced.

We proceeded in the same way by adding Ca^{2+} to the initial solution (concentration of 100 mg/L, equivalent to that encountered in plasma) (group GCa20, at 20 C in presence of Ca) which by virtue of its significant serum concentration and its possible complexation could disturb the complexation of Al. The different experiments were carried out a 20±1

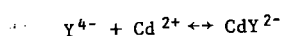
C with and without Ca (group GCa20 and group G20), then at 37±1 C (group GCa37 and group G37).

The polarographic cell was filled with 40 ml of a solution containing 38 ml of deionized water (or 38 ml of an aqueous Ca^{2+} solution at 100 mg/L for the GCa20 and GCa37 groups) and 2 ml of maleic acid buffer (1M) to pH=7.40. Added to this solution was 20 μL of the solution (M/27) of the compound studied, ie a concentration of 1.85×10^{-5} M, and 10 μL of an Al solution (1 g/L, ie a concentration of 0.93×10^{-5} M). Solutions of Cd^{2+} or of Cu^{2+} were successively added in 10 μL measures until a characteristic peak was obtained in order to define the equivalence point.

To summarize, if Y^{4-} is the chelator (type EDTA), we will have:



where $[\text{Y}^{4-}]_{\text{start}}$ and $[\text{Al}^{3+}]_{\text{start}}$ are known. If the chelation with Al is incomplete, the Y^{4-} ions remain free and are complexed by Cd^{2+} (or Cu^{2+}) according to the instantaneous reaction:



then the part complexed to Al will be: $[\text{Y}^{4-}]_{\text{start}} - [\text{Y}^{4-}]_{\text{free}}$. As the concentration of the initial Al^{3+} is known, the percentage of complexed Al can be deduced:

$$\% \text{ of complexed Al} = ([\text{Y}^{4-}]_{\text{start}} - [\text{Y}^{4-}]_{\text{free}}) / [\text{Al}^{3+}]_{\text{start}}$$

The determination of an equivalence point was based on the appearance of a free Cd^{2+} (or Cu^{2+}) peak.

Direct determination. This technique concerns the electroactive chelators only, HBED and EDDHA (potentials are -0.25 and -0.35 V vs SCE respectively). In this case, the chelator was placed in the polarographic cell (with the buffer, water and Ca according to the conditions) and the decrease of the free complexer peak following the addition of Al^{3+} was studied. The chelating capacity of the molecule for Al^{3+} could then be determined. The equivalence point corresponded to the volume of Al^{3+} added sufficient to make the chelator peak disappear.

Complexation of Al Previously Bound to Serum Protein

Serum was obtained from cow's blood freshly collected in polypropylene jars from the Metz slaughterhouse. After collection, the blood was left at ambient temperature for 4 to 6 h to allow it to coagulate. The supernate was then collected and centrifuged at 3000 g for 5 min to separate the serum to be used for the different trials.

Ultrafiltration was carried out using 13 239 E Centrisart 1 tubes (rupture mass of 10,000 Daltons, Sartorius). After centrifugal processing the ultrafiltrate was preserved at 4±1 C in polypropylene tubes before determination with an atomic emission spectrometer (AES, Spectra Span V, Beckman).

A solution of Al (1 g/L) was added to the

serum to obtain a 200 µg concentration of Al/L (a concentration frequently encountered in long-term dialyses patients). Firstly, it was necessary to determine the necessary duration for the binding of Al onto proteins. Then the molecule being studied was added to the serum to a final concentration of 4.88×10^{-4} M. The overloaded serum and the complexer were returned to a water-bath at 37 °C for varying periods of time (30 min, 1 h, 3 h, 24 h) to study the complexation kinetics of the different chelators. On removal from the water-bath, the mixture was placed in ultrafiltration tubes (2.5 ml/tube), then centrifuged at about 3000 g for 90 min. Under the effect of the centrifugal force, the small upper tube tended to sink requiring the liquid to pass through a selective mass membrane. This operation allowed the liquid containing free Al or Al complexed by small molecules with a mass of less than 10,000 to be collected in the upper tube. The Al concentration in the ultrafiltrate was then determined by EAS.

The second objective of this study was to highlight the efficiency of different products in relation to their concentration in the serum. For this reason, ultrafiltration tubes containing serum protein, onto which Al was previously bound, and different concentrations of chelator solution (varying from 4.88×10^{-4} M to 9.8×10^{-3} M) were prepared for each substance. When the Al had been fixed onto the serum proteins, the chelator was introduced and left to take effect for time *t* (defined later) in a water bath at 37 °C. The temperature was reduced to 20 °C over 10 min to slow the complexation and to bring the sample back to an ambient temperature. Then, after centrifugation at 3000 g (90 min) the Al in the ultrafiltrate was determined by EAS.

DFO, a chelator presently recognized for its efficiency in the treatment of Al accumulation, was used as a reference.

Assessment of Potential Compounds in the Aluminium Loaded Rats

Outbred albino male rats of the Wistar strain (Iffa Credo, L'Arbresle, France) weighing 200 ± 30 g were individually housed in plastic cages (43x28x15 cm) in an air-conditioned room maintained at a relatively constant temperature (22-23 °C) and a 12-h light-dark cycle (lights off at 7 pm). Water and standard diet (food pellets, Extra Labo, Provins, France) were available ad libitum. The rats were weighed periodically during the experiment.

Animals were randomly divided into 5 experimental groups. Rats in the 4 treated groups were given daily (5 d/w for 4 w) ip injections of 2 mg elemental Al/kg/d (solution of Al chloride, pH 3.8 ± 0.1 prepared with 0.9% NaCl), and control rats received an equivalent volume of vehicle (0.9% NaCl adjusted to pH 3.8 ± 0.1).

Chelator testing began 1 w after the end of toxic dosing. Each compound was dissolved in a solution of 0.9% NaCl immediately prior to administration. All animals were given daily ip injections of the chelators (5 d/w for 2 w). The doses administered were arbi-

trarily fixed to $\frac{1}{4}$ of the LD₅₀ of the more toxic compound (175 mg EDDHA/kg ip), which corresponded to approximately 40 mg/kg. Rats of the control group were injected with an equivalent volume of 0.9% NaCl.

After the first, third and ninth injections, the urine of each animal was collected. Animals were housed in diuresis cages (23x20x16) for 24 h without food (to thus avoid contamination of urine), but with water ad libitum. After collection, the urine was centrifuged at 3000 g for 3 min before acidification with nitric acid (Supra pur, Merck; 50 µL/5 ml of urine).

At the end of the treatment, the rats were anesthetized with 50 mg sodium pentobarbital/kg body weight 72 h after the last ip injections. Blood was collected by cardiac puncture in heparinized plastic tubes and centrifuged at 3000 g for 3 min. Liver, spleen, kidneys, brain and femur were collected also and weighed.

Metal Determinations

Tissues were treated with nitric acid (Supra pur, Merck) to dissolve all minerals. The Al concentrations in plasma, urine and the various tissues and the zinc, copper, iron and calcium levels in urine and plasma (except iron) were determined using an atomic emission spectrometer (Spectra Span V, Beckman).

Statistical Analysis

Results were expressed as the mean $\pm$ SD. Comparisons between groups were made using analysis of variance, the Dunnett's test. The null hypothesis was rejected at the 5% significance level ($P < 0.05$).

RESULTS

The results obtained by polarography concerning the complexation of Al in water are shown in Fig 1. The results obtained with DFO and tartaric acid are not indicated in this figure. These 2 compounds did not complex either the Cd²⁺ or the Cu²⁺, at least not under the specific conditions of this study. The chelation capacity of Al³⁺ was maximum (100%) and independent of the temperature and the presence of Ca²⁺ in the solutions for sev-

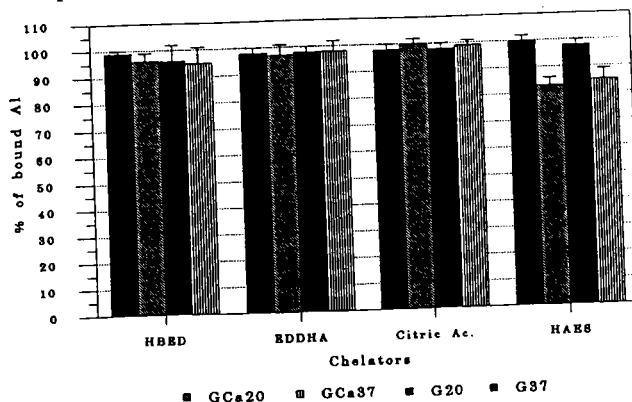


Figure 1. Evaluation of potential aluminium chelators in water (polarographic method, n=5).

eral compounds (HBED, EDDHA, citric acid). The maximum complexation percentage of HAES (100%) at 20 and 37 C fell by 15% ($P<0.01$) in the presence of Ca^{2+} at these same temperatures.

The total Al concentration of bovine serum was $22\pm6\text{ }\mu\text{g/L}$ ($n=10$). The concentration of ultrafiltrable Al serum is $4\pm3\text{ }\mu\text{g Al/L}$ ($n=10$). These results confirm recent measurements (23) indicating that serum Al is 80% bound by proteins and 20% in an ultrafiltrable form. The trials carried out indicated that the fixation kinetics of Al on serum proteins was very fast ($<15\text{ min}$ at 37 C and 90 min of centrifugation at 20 C).

Ultrafiltration allowed the mobilization kinetics of Al from serum proteins to be studied. The chelation efficiency of the molecules tested at a concentration of $4.88\times10^{-4}\text{ M}$ was very weak ($<5\%$) and not influenced by the duration of contact with serum at 37 C. Only DFO demonstrated significant variations in the percentage of Al mobilized between 30 min and 24 h. The percentage varied from 65 to 80% for DFO between 3 and 24 h. Consequently, the contact time (t) was fixed at 45 min assuming that chelation was achieved during 1 h for the majority of compounds.

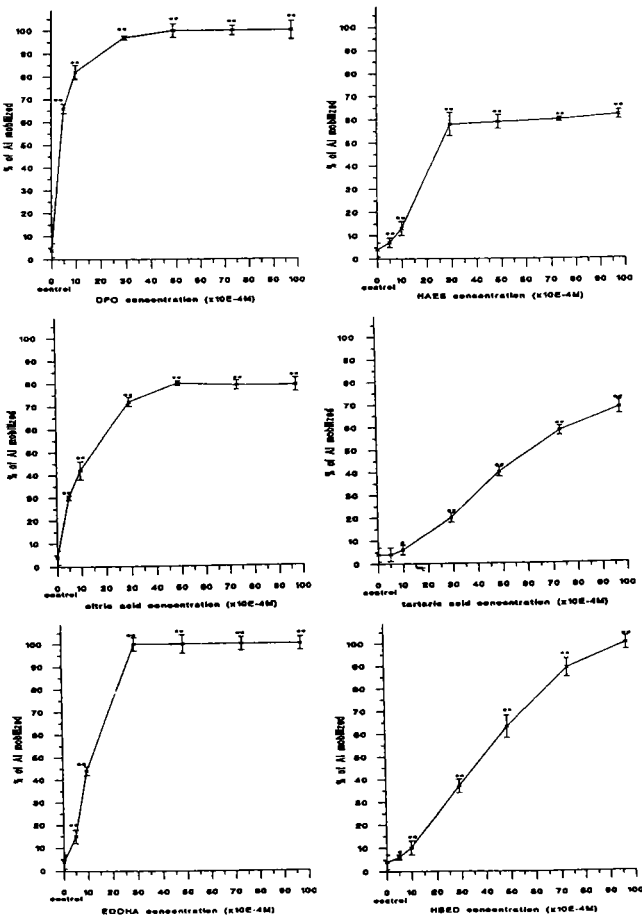


Figure 2. Efficiency of DFO, HAES, Citric acid, Tartaric acid, EDDHA and HBED to mobilize Al from serum. * significantly different from control @ $P<0.05$; ** significantly different from control @ $P<0.01$.

Table 1. Mineral concentrations of different elements (Al, Cu, Zn and Ca) in plasma ($\mu\text{g/l}$, except Ca: mg/l).

Groups	Al	Cu	Zn	Ca
C	20.86 $\pm$ 3.07	897.36 $\pm$ 21.13	1206.00 $\pm$ 118.94	136.20 $\pm$ 2.80
Al	172.26 $\pm$ 10.20*	952.78 $\pm$ 39.71	1274.33 $\pm$ 94.23	135.71 $\pm$ 3.17
EDDHA	171.52 $\pm$ 44.39*	947.83 $\pm$ 46.72	1261.24 $\pm$ 55.05	137.33 $\pm$ 1.64
HAES	140.25 $\pm$ 6.18*	999.50 $\pm$ 49.06	1288.25 $\pm$ 41.53	140.07 $\pm$ 4.64
DFO	140.86 $\pm$ 12.55*	954.83 $\pm$ 59.95	1314.72 $\pm$ 70.01	126.10 $\pm$ 3.34
Tartaric acid	133.61 $\pm$ 6.29*	954.83 $\pm$ 59.95	1052.13 $\pm$ 18.04	129.98 $\pm$ 2.59

Results are expressed as mean $\pm$ SE
*Significantly different from group C ($P<0.001$)

The percentages of serum Al mobilized by the tested compounds at the different concentrations are shown in Fig 2. The mobilization capacity of Al from serum proteins was maximum for several compounds (DFO, EDDHA, HBED). Maximum efficiency was obtained for a concentration of $3\times10^{-3}\text{ M}$ (DFO, EDDHA). At the maximum tested concentration ($\approx 10^{-2}\text{ M}$), the other substances showed Al chelation of less than 80%.

The percentage of mobilized Al linearly correlated to test compound concentration for tartaric acid. The maximum percentage of mobilized Al was about 70% for tartaric acid at a concentration of 10^{-2} M . Citric acid and HAES demonstrated maximum complexation capacity (80 and 60% respectively) for a concentration of about 10^{-2} M . Concentrations of more than $3\times10^{-3}\text{ M}$ were not correlated to an increase in Al mobilization.

The data on elements of blood plasma are shown in Table 1. Treatment with Al chloride increased significantly ($P<0.001$) Al levels in plasma; the values were 9-fold higher. The concentrations of copper, zinc and calcium did not significantly differ between the 4 treated (EDDHA, HAES, DFO, tartaric acid) groups and the control group.

Table 2 shows the effects of the compounds on the tissue distribution of Al. Treatment with Al chloride markedly increased Al concentrations in liver, spleen, kidneys and femur. These results agree with our previous studies (35). The highest Al variations were found in liver and spleen (360-fold and 245-fold). The brain Al level did not vary among the different groups.

DFO reduced significantly the Al concentrations in liver (54% reduction), in spleen and in kidneys (33% and 56%, respectively). HAES had a significant decrease in kidneys (35%). No significant decreases in femur Al

Table 2. Aluminium concentrations in various tissues ($\mu\text{g/g}$ wet weight, except Femur: $\mu\text{g/g}$ dry weight).

Groups	Liver	Spleen	Kidneys	Femur	Brain
C	0.14 $\pm$ 0.01	0.31 $\pm$ 0.07	0.86 $\pm$ 0.19	1.02 $\pm$ 0.21	0.30 $\pm$ 0.04
Al	50.31 $\pm$ 5.40	76.00 $\pm$ 5.70	4.23 $\pm$ 0.35	15.02 $\pm$ 0.93	0.51 $\pm$ 0.08
EDDHA	57.93 $\pm$ 7.23	83.01 $\pm$ 8.71	3.81 $\pm$ 0.30	15.34 $\pm$ 0.95	0.47 $\pm$ 0.06
HAES	54.13 $\pm$ 5.45	81.89 $\pm$ 12.70	2.77 $\pm$ 0.15*	13.93 $\pm$ 0.47	0.42 $\pm$ 0.07
DFO	23.15 $\pm$ 0.58**	57.05 $\pm$ 3.64*	1.85 $\pm$ 0.13**	12.47 $\pm$ 1.25	0.39 $\pm$ 0.04
Tartaric acid	56.30 $\pm$ 5.40	66.56 $\pm$ 4.88	3.66 $\pm$ 0.35	13.49 $\pm$ 1.94	0.59 $\pm$ 0.09

Results are expressed as mean $\pm$ SE
*Significantly different from group Al ($P<0.05$)
**Significantly different from group Al ($P<0.001$)

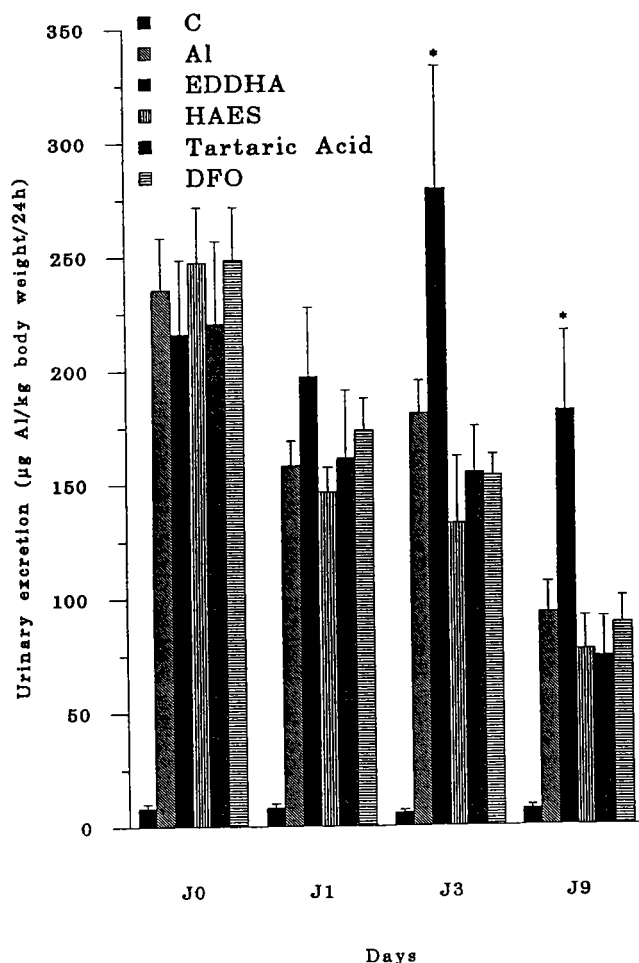


Figure 3. Urinary excretion of Al. * significantly different from control @ $P < 0.05$.

concentrations were noted after treatment with the different compounds.

Fig 3 and 4 show the urinary metal excretion ($\mu\text{g metal/kg bw/24 h}$) in rats that received the various chelators or saline. The amounts of the different metals (Al, Ca, Cu, Zn and Fe) were determined on days 0, 1, 3 and 9 of treatment. Treatment with Al chloride increased urinary Al excretion of the group Al vs the control group on days 0, 1, 3 and 9. There was no significant difference between the 3 other groups. Urinary excretion of Al measured on days 3 and 9 during treatment with EDDHA was significantly different from group Al (19.7% and 51.9%, respectively) (Fig 3).

Other urinary metal excretion (Zn, Fe, Cu and Ca) is reported in Fig 4. The Zn excretion increased significantly on days 1, 3 and 9 in the EDDHA treated group vs group Al (day 1=6.5-fold, day 3=13.2-fold, day 9=18.2-fold). On those days in the same group, the Fe excretion increased significantly vs group Al (day 1=6.4-fold, day 3=9.4-fold, day 9=8.22-fold), and the Cu excretion increased significantly vs group Al (day 1=4.5-fold, day 3=5.1-fold, day 9=5.61-fold). Ca excretion

increased significantly vs group Al on days 3 and 9 (12.3-fold and 17.3-fold, respectively).

Treatment with DFO significantly increased Fe excretion on days 1, 3 and 9 (2.6, 2.5 and 2.1-fold respectively). Treatment with HAES significantly increased Fe excretion on days 1 and 3 (1.4 and 1.3-fold, respectively). No significant differences were observed in the other groups.

DISCUSSION

This study allowed the chelation potential of certain molecules for Al to be tested by in vitro techniques. The polarographic technique allows Al-, or another metal-, complexing molecules to be studied rapidly and at low cost. The ultrafiltration technique associated EAS analysis enables the mobilization potential of the compounds to be studied in comparison to Al, which is bound to serum proteins. Indeed, as far as the serum is concerned, 50 to 90% of blood Al would be linked to proteins (12,42) and only 20% of the metal would be in an ultrafiltrable form (23,43). The in vitro capacity of the different chelators to mobilize Al from serum proteins should reflect in vivo chelation potential. It is for these reasons that studies have also been carried out using bovine serum. The main serum proteins involved in Al com-

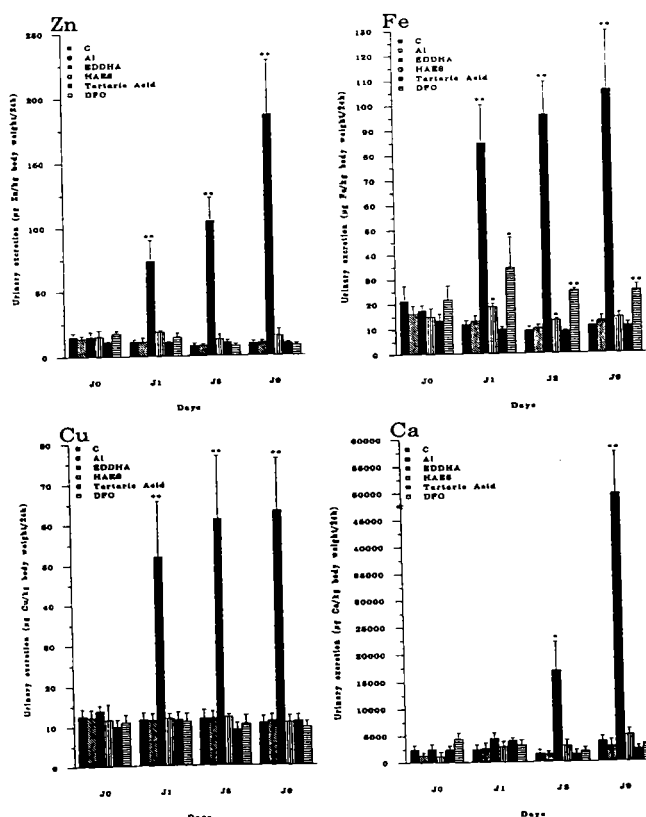


Figure 4. Urinary excretion of zinc (Zn), iron (Fe), copper (Cu) and calcium (Ca). * significantly different from control @ $P < 0.05$; ** significantly different from control @ $P < 0.01$.

plexation would be transferrin and albumin (7,45,46).

The studies carried out by polarography in aqueous solutions reveal the following: The chelation capacity is maximum and does not depend on experimental conditions (temperature, Ca) for several compounds (HBED, EDDHA, citric acid); the presence of Ca^{2+} can reduce the efficiency of HAES as it competes for sites to fix this molecule; and it must be noted that in this study the pH conditions were not optimal. Indeed, for a pH of 7.40, Al is strongly hydrolyzed which hinders its complexation.

The studies carried out by ultrafiltration on bovine serum give rise to additional conclusions. The carboxylic acids (citric, tartaric acid) seem to have moderate efficiency (70 to 80% at the strongest concentration). However, Domingo et al (15,16) suggested that citric acid could be used to chelate Al. The disadvantage of citrate is that oral administration could provoke intestinal absorption of Al and thus its distribution into different tissues (34). Therefore the means of therapeutic administration is limited. HAES, a derivative of citric acid, appears to possess the same characteristics.

The phenylcarboxylic acids (HBED and EDDHA) show interesting chelation capacity for Al. Unfortunately, the presence of 2 carboxylic functions in the HBED molecule gives it a strong affinity with zinc, calcium and magnesium (28). Due to this, HBED should possess the same secondary effects as DTPA, ie reduction of zinc reserves (39). EDDHA shows a similar efficiency to that of DFO, which can be explained by the very close and very high logK (24.5 and 22, respectively) (40). However, the efficiency of EDDHA does not vary with contact time. On the other hand, DFO possesses a complexation capacity which increases with contact, as Allain et al also observed (5).

At very weak chelator concentrations, Ca^{2+} can have an influence on complexation reactions. However, at a chelator concentration of 10^{-2}M , the influence of Ca^{2+} ($2.5 \times 10^{-3}\text{M}$) becomes negligible. Similarly, the weak logK differences (all relatively high) cannot alone explain the differences in efficiency observed for the different compounds. These variations certainly come from reactional mechanism differences related to the transfer kinetics of Al between transferrin and the chelator.

Taking into account the results obtained during the in vitro study, it would seem interesting to pursue research with certain compounds. This could be done within the framework of an in vivo model to verify if the compounds retained preserve the same efficiency in physiological conditions. Little has been published on the in vivo effect of different compounds on Al chelation in rats. Consequently, HBED wasn't retained because it produced toxicity (39) and citric acid was studied earlier by Domingo et al (15,16). We

studied EDDHA, HAES and tartaric acid for their efficacy or new applications, and DFO was used as a reference.

To compare the true efficiency of the chelating compounds, rats were preliminarily treated with Al chloride and then received the different chelating agents. The different chelators didn't increase the plasma concentrations of Al. Certainly, this phenomenon is correlated with the kinetics of the different substances. For example, with DFO, the peak of Al concentration in the plasma appeared approximately 48 h after injection (41). We sacrificed our animals 72 h after the last injection.

Except for EDDHA, the chelators didn't increase urinary Al excretion. Yokel and Kostenbauder (48) had the same results. Meanwhile, EDDHA increased the urinary excretion of the other elements (Ca, Cu, Fe, Zn). DFO and HAES increased iron excretion; DFO has previously been used in chronic dialysis patients with iron overload (19).

Aluminium accumulated in all tissues analyzed except for brain. Liver and spleen were the main storage sites of ip administered Al. The concentrations of Al were highest in liver and spleen and less noticeable in femur and kidneys; these results are in agreement with our previous study (35). Treatment with DFO significantly decreased Al in liver, spleen and kidneys. In spite of a decrease in Al concentrations in these organs, the urinary Al excretion of the treated rats was not significantly increased. This could probably be attributed to the low accumulation of Al in the tissues and to the normal significant urinary passage of Al (about 10 mg Al/L). Therefore, the small quantity of Al extracted from tissues wasn't sufficient to increase significantly the urinary Al content.

In contrast, the administration of EDDHA was accompanied by a large increase in urinary excretion of Al, but concentrations of Al didn't decrease in the different tissues. It appears from the in vivo experiments that EDDHA is probably not well distributed to the tissues and remains extracellular, so EDDHA chelated primarily plasma Al. Therefore, the tissues levels didn't differ from group Al and the plasma level didn't decrease because the collection of plasma occurred 72 h after the EDDHA was last given. Yokel and Kostenbauder (48) suggested that DFO and EDDHA might be effective Al chelators. Our present studies indicate markedly increased urinary excretion of Al and the other examined metals (Fe, Cu, Zn and Ca) from animals treated with EDDHA.

Postmortem studies showed kidney function alterations in the rats treated with EDDHA. The kidneys were colorless and the weight of these organs was increased (data not shown). The analytical method required the use of nitric acid to dissolve the minerals in urine; urine from rats treated with EDDHA showed a precipitate which could have been due to increased proteins in the urine. We then determined total proteins in the urine from

the other rats treated with EDDHA and found that EDDHA administration to adult rats resulted in increased urine protein concentrations during treatment (5-fold increase, up to 5 g/L equivalent at 250 mg/kg bw/24 h). The renal alterations in the rats treated with EDDHA could explain the increased renal transfer of the different metal-protein complexes. Further investigations will be necessary to determine if this renal alteration declines, persists or increases with EDDHA treatment and if the urinary protein concentration correlates with metal excretion.

The experimental techniques used here could allow the complexation potential of these same substances and others for a variety of metals to be studied. However, the most appropriate solution to the biological accumulation of Al would be to find alternatives to the Al compounds presently being used to treat hyperphosphataemia.

REFERENCES

- Ackrill P, Day JP: Therapy of aluminium overload(II). *Contr Nephrol* 38: 78-80, 1984.
- Ackrill P, Ralston AJ, Day JP et al: Successful removal of aluminium from patient with dialysis encephalopathy. *Lancet* 11: 692-693, 1980.
- Alfrey AC: Aluminum intoxication. *N Engl J Med* 310: 1113-1141, 1984.
- Alfrey AC, Legendre CR, Kaehny WD: The dialysis encephalopathy syndrome: possible aluminum intoxication. *N Engl J Med* 294: 184-188, 1976.
- Allain P, Chaleil D, Mauras Y et al: Pharmacokinetics of desferrioxamine and of its iron and aluminum chelates in patients on haemodialysis. *Cli Chim Acta* 170: 331-338, 1987.
- Andersen O: Oral cadmium exposure in mice: Toxicokinetics and efficiency of chelating agents. *Crit Rev Toxicol* 20: 83-112, 1989.
- Bertholf RL, Willis MR, Savory J: Quantitative study of aluminum binding to human serum albumin and transferrin by a chelex competitive binding assay. *Biochem Biophys Res Commun* 125: 1020-1024, 1984.
- Bhat TR, Radha R Das, Shankar J: Complexes of aluminium with some polyaminocarboxylic acids. *Indian J Chem* 5: 325-327, 1967.
- Boegman RJ, Bates LA: Neurotoxicity of aluminum. *Can J Physiol Pharmacol* 62: 1010-1014, 1984.
- Brown DJ, Ham KN, Dawborn JK et al: Treatment of dialysis osteomalacia with desferrioxamine. *Lancet* 11: 343-345, 1982.
- Burks JS, Alfrey AC, Huddleston J et al: A fatal encephalopathy in chronic haemodialysis patients. *Lancet* 1: 764-768, 1976.
- Burnatowska-Hledin MA, Mayor GH, Lau K: Renal handling of aluminum in the rat: Clearance and micropuncture studies. *Am J Physiol* 249: 192-197, 1985.
- Burnel D, Hutin MF, Masson A et al: Dosage de l'aluminium par polarographie impulsionnelle. *Ann Fals Exp Chim* 75: 177-183, 1982.
- Charhon SA, Chavassieux P, Chapuy MC et al: Traitement par la desferrioxamine de l'osteomalacie par intoxication a l'aluminium. *Presse Med* 15: 55-59, 1986.
- Domingo JL, Gomez M, Llobet JM et al: Comparative effects of several chelating agents on the toxicity, distribution and excretion of aluminum. *Human Toxicol* 7: 259-262, 1988.
- Domingo JL, Llobet JM, Gomez M et al: Acute aluminum intoxication: A study of the efficacy of several antidotal treatments in mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 53: 93-104, 1986.
- Estrav Z, Cohen A, Gelfand EW et al: In vitro cytotoxicity of desferrioxamine on human marrow haematopoietic progenitors. *Toxic in vitro* 2: 131-134, 1988.
- Felsenfeld AJ, Rodriguez M, Coleman M et al: Desferrioxamine therapy in hemodialysis patients with aluminum-associated bone disease. *Kidney Int* 35: 1371-1378, 1989.
- Fosburg M, Hakim RM, Schulman G et al: Pharmacokinetics (K) of desferrioxamine (D) during treatment of transfusional iron overload (IO) in chronic hemodialysis (HD) patients. *Kidney Int* 25: 183, 1984.
- Freedman MH, Boyden M, Taylor M et al: Neurotoxicity associated with desferrioxamine therapy. *Toxicology* 49: 283-290, 1988.
- Genrot PO: Metabolism and possible health effects of aluminum. *Environ Health Perspect* 65: 363-441, 1986.
- Gitelman HJ: Aluminum and health: A critical review. Marcel Dekker Inc, New York, 1989.
- Harris WR: Equilibrium model for speciation of aluminum in serum. *Clin Chem* 38: 1809-1818, 1992.
- Jones MM: Antagonists for toxic heavy metals. *Proc West Pharmacol Soc* 27: 163-167, 1984.
- Jones MM, Cherian MG: The search for chelate antagonists for chronic cadmium intoxication. *Toxicology* 62: 1-25, 1990.
- Landsberg JP, McDonald B, Watt F: Absence of aluminum in neuritic plaque cores in Alzheimer's disease. *Nature* 360: 65-68, 1992.
- Lapresle J, Duckett S, Calle P: Documents cliniques, anatomiques et biophysiques dans une encephalopathie avec presence de depots d'aluminium. *CR Soc Biol* 282: 282-285, 1975.
- L'epatenier F, Murase I, Martell AE: New multidentate ligands. VI. Chelating tendencies of N,N'-di(2-hydroxybenzyl) ethylenediamine-N,N'-diacetic acid. *J Am Chem Soc* 89: 837-843, 1967.
- Llobet JM, Domingo JL, Corbella J: Antidotes for zinc intoxication in mice. *Arch Toxic* 61: 321-323, 1988.
- Llobet JM, Domingo JL, Gomez M et al: Acute toxicity studies of aluminum compounds: Antidotal efficacy of several chelating agents. *Pharmacol Toxicol* 60: 280-283, 1987.
- Llobet JM, Domingo JL, Paternain JL et al: Treatment of acute lead intoxication: A quantitative comparison of number of chelating agents. *Arch Environ Contam Toxicol* 19: 185-189, 1990.
- Martin RB, Savory J, Brown S et al: Transferrin binding of Al³⁺ and Fe³⁺. *Clin Chem* 33: 405-407, 1987.
- McGonigle RJS, Parsons V: Aluminum-induced anaemia in haemodialysis patients. *Nephron* 39: 1-9, 1985.
- Molitoris BA, Froment DH, Mackenzie TA et al: Citrate: A major factor in the toxicity of orally administered aluminum compounds. *Kidney Int* 36: 949-953, 1989.
- Muller C, Hutin MF, Burnel D et al: Aluminum transfer through milk in female rats intoxicated by aluminum chloride. *Biol Tr Elem Res* 34: 79-87, 1992.
- Netter P, Kessler M, Gaucher A et al: Aluminum and dialysis arthropathy. *Lancet* 1: 886-887, 1988.
- Oosterlinck W, Verbeek R, Cuvelier C et al: Rationale for local toxicity of calcium chelators. *Urol Res* 20: 19-21, 1992.
- Ott SM, Maloney NA, Coburn JW et al: The prevalence of bone aluminum deposition in renal osteodystrophy and its relation to calcitriol therapy. *N Engl J Med* 307: 709-713, 1982.
- Porter JB, Huehns ER, Hider RC: The development of iron chelating drugs. *Clin Haematol* 2: 257-292, 1989.
- Rajan KS, Mainer S, Rajan N et al: Studies on the chelation of aluminum for neurobiological. *J Inorg Biochem* 14: 339-350, 1981.
- Simon KS, Tanquerel T, Allain P et al: Surcharge tissulaire en aluminium chez les hemodialyses. *Nouv Presse Med* 11: 209, 1982.
- Skalsky HL, Carchman RA: Aluminum homeostasis in man. *J Am Col Toxicol* 2: 405-423, 1983.
- Stummvoll HK, Graf H, Meisinger V: Effect of desferrioxamine on aluminum kinetics during hemodialysis. *Mineral Electrolyte Metab* 10: 263-266, 1984.
- Sturman JA, Wisniewski HM: Aluminum. In Bondy SC, Prasad KN eds: *Metal Neurotoxicity*. CRC Press, Boca Raton, FL: 61-85, 1988.
- Trapp GA: Plasma aluminum is bound to transferrin. *Life Sci* 33: 311-316, 1983.
- Van Cinkel MF, Van Der Voet GB, Van Eijk HG et al: Aluminium binding to serum constituents: A role for transferrin and for citrate. *J Clin Chem Clin Biochem* 28: 459-463, 1990.
- Yokel RA, Datta AK, Jackson EG: Evaluation of potential aluminum chelators in vitro by aluminum solubilization ability, aluminum mobilization from transferrin and the octanol/aqueous distribution of the chelators and their complexes with aluminum. *J Pharmacol Exp Ther* 257: 100-106, 1991.
- Yokel RA, Kostenbauder HB: Assessment of potential aluminum chelators in an octanol/aqueous system and in the aluminum-loaded rabbit. *Toxicol Appl Pharmacol* 91: 281-284, 1987.

Every time you buy a melon, you are performing an act of faith.

Just be glad you're not getting all the government you're paying for.

Recherche et étude de nouveaux chélateurs de l'aluminium et du phosphore utilisables en Médecine

Résumé

Dans la première partie de cette étude, la capacité de différents composés à complexer l'aluminium en milieu aqueux tamponné (tampon maléique-maléate de pH=7.40), en absence ou en présence de calcium, à différentes températures a été mise en évidence grâce à l'utilisation de deux techniques *in vitro* (polarographie impulsométrique et, ultrafiltration combinée à l'analyse par spectrométrie d'émission atomique). Les composés qui présentent une efficacité de chélation suffisante comparée à celle du médicament actuellement utilisé dans le traitement de l'accumulation aluminique, le DFO (Desferrioxamine ou Desferal®), sont alors testés chez des rats préalablement intoxiqués au chlorure d'aluminium (voie ip) pendant une période de quatre semaines. Les composés sont administrés par voie intrapéritonéale pendant dix jours. A la fin du traitement, les animaux sont sacrifiés et différents organes et tissus seront prélevés afin d'analyser leurs teneurs en aluminium et en divers éléments (Ca, Cu, Fe, Zn). Les résultats seront alors comparés à ceux obtenus pour des animaux témoins et pour des animaux intoxiqués à l'aluminium mais non traités.

La second chapitre est consacré à la recherche et à l'étude de nouveaux chélateurs du phosphore alimentaire susceptibles de remplacer les composés aluminiques actuellement utilisés dans le traitement de l'hyperphosphatémie. Les différentes molécules sont administrées à des rats, incorporées dans les croquettes utilisées comme nourriture. Les animaux sont soumis à ce régime alimentaire pendant trois semaines. A la fin du traitement, les animaux sont sacrifiés et les teneurs des différents organes et tissus en phosphore et calcium sont analysées. Pour les composés retenus, la possibilité d'un transfert vers certains organes cibles, au travers de la barrière gastro-intestinale a été vérifiée.

MOTS-CLES : Aluminium - Chélateur - Chélation - Complexation - Phosphore - Toxicologie.

Research and study of new aluminum and phosphorus chelators usable in Medicine

Abstract

In the first part of this study, the potential for the chelation of aluminum by different compounds has been first determined using two *in vitro* technics. The formation of stable complexes with aluminum in aqueous solution has been evaluated by using pulse polarography. This technique allows the influence of temperature and of calcium to be studied for each compound. An ultrafiltration technique combined with aluminum determination by atomic emission spectroscopy has allowed the ability of different substances to complex aluminum that was previously bound to serum proteins, to be estimated. The kinetics of chelation and the minimum efficient concentration have been determined for all the products studied.

The real efficacies of the compound were studied by *in vivo* investigations to compare the effectiveness of the best chelating agents on the distribution and excretion of aluminum, after repeated intraperitoneal administrations to rats.

The aim of the second part was to highlight possible new nonaluminum phosphate-binders to limit hyperphosphatemia in patient with renal failure. So, different compounds was evaluated as dietary phosphate binders in rats. Aluminum chloride was evaluated as a reference. Animals were divided in different groups, receiving several doses of the different substances. All along the treatment, urines and stool were collected. At the end of the treatment, animals were sacrificed and plasma and different organs were collected. Concentrations of phosphorus and calcium in all samples were determined. The possible transfer of the substances in rat tissue was verified.