



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 DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE METZ
Spécialité : TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT

par
Pascale MISSY

Soutenue le 31 octobre 2001

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	20010685
Cote	S/MZ 01/23
Loc	magasin

**RECHERCHE DE NOUVEAUX CHELATEURS DU MANGANESE,
EN VUE DE LA DETOXICATION DE L'ORGANISME
ETUDES *IN VIVO* ET *IN VITRO***

Membres du jury :

Professeur P. VASSEUR, Université de Metz (président)

Professeur J. D. ANGEZ, Université de Rennes (rapporteur)

Professeur  (rapporteur)

Docteur  icy

Professeur D. BURNEL, Université de Nancy (directeur de thèse)

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ

022 421649 0

Université de Metz
UFR Sciences Fondamentales et Appliquées

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE METZ
Spécialité : TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT

par
Pascale MISSY

Soutenue le 31 octobre 2001

**RECHERCHE DE NOUVEAUX CHELATEURS DU MANGANESE,
EN VUE DE LA DETOXICATION DE L'ORGANISME
ETUDES *IN VIVO* ET *IN VITRO***

Membres du jury :

Professeur P. VASSEUR, Université de Metz (président)

Professeur J.-P. ANGER, Université de Rennes (rapporteur)

Professeur F. ARSAC, Université de Reims (rapporteur)

Docteur M.-C. LANHERS, Université de Nancy

Professeur D. BURNEL, Université de Nancy (directeur de thèse)

Avant propos

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

Il a fait l'objet de deux publications internationales :

MISSY P., LANHERS M.-C., CUNAT L., JOYEUX M. & BURNEL D., 2000, Effects of subchronic exposure to manganese chloride on tissue distribution of three essential elements in rats, *International Journal of Toxicology*, **19**, 313-321.

MISSY P., LANHERS M.-C., GRIGNON Y. & JOYEUX M. & BURNEL D., 2000, *In vitro* and *in vivo* chelation of manganese, *Human and Experimental Toxicology*, **19**, 1-9.

et de deux posters aux Premières Journées Françaises de Chimie Environnementale (Nancy, Palais des Congrès, 13-15 décembre 2000) :

MISSY P., LANHERS M.-C., CUNAT L. & BURNEL D.
Exposure to manganese and mineral metabolism.

MISSY P., LANHERS M.-C., GRIGNON Y. & BURNEL D.
Studies on chelation of manganese.

Remerciements

Avant d'exposer les résultats de nos recherches, il m'est agréable de remercier tous ceux et celles qui m'ont apporté, à divers titres, leur aide dans la réalisation de ce travail.

J'aimerais tout d'abord exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur Daniel BURNEL, pour son accueil au laboratoire, son encadrement et ses conseils, me donnant l'opportunité de réaliser un travail très intéressant. Les circonstances m'ont également permis d'apprécier ses grandes qualités humaines.

Je remercie le Docteur Marie-Claire LANHERS, pour ses conseils judicieux, sa patience et sa collaboration active à la correction de ce mémoire. Sa rigueur scientifique m'a été d'une aide précieuse tout au long de la réalisation de ce travail.

Je tiens également à remercier :

- Mademoiselle le Professeur Paule VASSEUR qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider ce jury et de juger ce travail.
- Monsieur le Professeur Jean-Pierre ANGER et Monsieur le Professeur François ARSAC qui ont aimablement accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

J'adresse, dans mes remerciements, une mention particulière à :

- Monsieur le Professeur Pierre LEROY qui m'a accueillie au sein de son équipe et m'a initiée à la chromatographie liquide haute performance, dans le cadre du dosage de la dopamine cérébrale.
- Monsieur le Docteur Yves GRIGNON qui a réalisé les travaux de microscopie optique. Qu'il trouve ici le témoignage de ma reconnaissance pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail et pour sa disponibilité.
- Mademoiselle Lisiane CUNAT, Docteur de l'Université de METZ, pour les aides diverses qu'elle m'a apportées. Sa bonne humeur et ses encouragements m'ont été d'un grand réconfort.

Enfin, j'ai une pensée particulière pour Madame Nicole NOEL, technicienne du Département, Monsieur Gérard COLIN, du Laboratoire de Physiologie et Monsieur Jérôme BEYRENT, animalier de la Faculté de Médecine.

Table des matières

AVANT PROPOS	2
REMERCIEMENTS	4
INTRODUCTION.....	14
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	16
PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	17
UTILISATIONS ET SOURCES D'EXPOSITION	18
1. <u>Utilisations</u>	18
2. <u>Sources d'exposition</u>	20
2.1. Sol	20
2.2. Air	20
2.3. Eau	21
2.4. Alimentation solide	22
2.5. Autres sources.....	22
METABOLISME.....	24
1. <u>Pénétration du manganèse dans l'organisme</u>	24
1.1. Absorption pulmonaire.....	24
1.2. Absorption digestive	25
1.2.1. Mécanismes.....	25
1.2.2. Facteurs influençant l'absorption du manganèse	25
• Influence de la forme chimique	26
• Influence de l'âge.....	26
• Influence de certaines pathologies.....	26
• Influence de la quantité de manganèse administrée.....	26
• Influence de différents facteurs alimentaires.....	26
• Influence de différents éléments	27
• Influence de différents composés alimentaires.....	28
1.3. Autres voies de pénétration	29

2. <u>Transport du manganèse</u>	29
2.1. Système porte.....	29
2.2. Foie.....	30
2.3. Circulation générale	30
3. <u>Distribution</u>	30
3.1. Dans les conditions physiologiques normales	30
3.2. En cas de surexposition	31
3.3. Cas du système nerveux central.....	32
4. <u>Elimination du manganèse</u>	33
5. <u>Maintien de l'homéostasie</u>	34
 ROLES BIOLOGIQUES DU MANGANESE	35
1. <u>Modes d'actions biochimiques</u>	35
2. <u>Carences</u>	36
3. <u>Besoins nutritionnels</u>	37
 TOXICITE DU MANGANESE.....	39
1. <u>Toxicité aigüe</u>	39
2. <u>Toxicité chronique</u>	40
2.1. Populations concernées	40
2.1.1. Expositions professionnelles	40
2.1.2. Expositions non professionnelles	40
2.2. Manifestations cliniques.....	42
2.3. Effets sur le système nerveux central	43
2.3.1. Modifications neuropathologiques	43
2.3.2. Actions biochimiques.....	43
• Effets sur le métabolisme énergétique mitochondrial.....	43
• Effets sur différents neurotransmetteurs	44
• Implication dans la production et l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène.....	45
2.4. Autres effets du manganèse.....	46
2.4.1. Effets sur les voies respiratoires	46
2.4.2. Effets hématologiques.....	46
2.4.3. Altérations de la fonction de reproduction.....	47

2.4.4. Altérations de la distribution tissulaire des autres éléments	47
2.4.5. Tératogenèse - Mutagenèse - Cancérogenèse	47
TRAITEMENTS DE L'INTOXICATION AU MANGANESE.....	49
1. <u>Traitement de l'intoxication aiguë</u>	49
2. <u>Traitements de l'intoxication chronique</u>	49
2.1. Traitements symptomatiques	49
2.2. Détoxification par les chélateurs.....	49
2.2.1. Chélateurs utilisés chez l'homme.....	49
2.2.2. Chélateurs testés chez l'animal	50
• acides benzoïques amino et hydroxysubstitués	50
• composés comprenant un ou plusieurs groupements SH (thiols) en tant que donneur d'électrons.....	51
• acides mono et polyaminopolycarboxyliques.....	51
• acides aminés	52
• acides carboxyliques	52
• autres composés	52
PREVENTION ET DIAGNOSTIC	54
1. <u>Prévention</u>	54
1.1. Technique	54
1.2. Médicale	54
1.2.1. Visite médicale avant embauche	54
1.2.2. Suivi médical régulier pendant la période d'activité	55
• Signes précoces de surexposition.....	55
• Signes précoces d'intoxication	55
2. <u>Diagnostic du manganisme</u>	56
DETERMINATION DU MANGANESE	58
1. <u>Méthodes d'analyses utilisées en recherche</u>	58
1.1. Activation neutronique (AN).....	58
1.2. Fluorescence X.....	58
1.3. Spectrométrie d'émission à plasma induit (inductively coupled plasma optical emission spectrometry : ICP).....	59

1.4. Spectrométrie d'émission à plasma induit, couplée à la spectrométrie de masse (inductively coupled plasma - mass spectrometry : ICP/MS)	59
1.5. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)	59
1.6. Résonance paramagnétique électronique (RPE)	59
2. <u>Méthode utilisable en routine :</u>	
Spectrométrie d'absorption atomique électrothermique	60
REGLEMENTATION.....	61
1. <u>Alimentation</u>	61
2. <u>Eau potable</u>	61
3. <u>Air</u>	62
3.1. Population générale	62
3.2. Locaux de travail	62
OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	63
PREMIERE PARTIE EXPERIMENTALE.....	67
MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE D'INTOXICATION AU CHLORURE DE MANGANESE, CHEZ LE RAT	68
1. <u>Matériel et méthodes</u>	68
1.1. Réactifs	68
1.2. Origine des animaux et conditions d'hébergement	68
1.3. Protocole expérimental	69
1.4. Déterminations analytiques	70
1.5. Analyse statistique	71
2. <u>Résultats</u>	71
2.1. Evolution pondérale pendant l'exposition au manganèse et poids des organes au moment du sacrifice	71
2.1.1. Voie i.p.	71
2.1.2. Voie p.o.	71
2.2. Excrétion du manganèse et des autres éléments essentiels étudiés	72
2.2.1. Voie i.p.	72
2.2.2. Voie p.o.	72

2.3. Concentrations sanguine et plasmatique des différents éléments étudiés, au moment du sacrifice.....	75
2.3.1. Voie i.p.....	75
2.3.2. Voie p.o.....	75
2.4. Concentrations tissulaires du manganèse et des autres éléments étudiés, au moment du sacrifice.....	75
2.4.1. Voie i.p.....	75
• Distribution du manganèse.....	75
• Distribution des autres éléments.....	76
2.4.2. Voie p.o.....	77
• Distribution du manganèse.....	77
• Distribution des autres éléments.....	77
3. <u>Discussion</u>	78
4. <u>Conclusion</u>	84

ESTIMATION DU TAUX D'ABSORPTION INTESTINALE DU MANGANESE

(TECHNIQUE DE L'INTESTIN PERFUSE <i>IN SITU</i>)	85
1. <u>Matériel et méthode</u>	85
1.1. Réactifs.....	85
1.2. Préparation des solutions perfusées	85
1.3. Protocole expérimental.....	86
1.4. Expression des résultats.....	87
1.5. Analyse statistique	88
2. <u>Résultats</u>	88
3. <u>Discussion</u>	89

DEUXIEME PARTIE EXPERIMENTALE 91

NEUROTOXICITE DU MANGANESE ADMINISTRE PAR VOIE

INTRAPERITONEALE : ETUDES COMPORTEMENTALE, NEUROCHIMIQUE

ET HISTOLOGIQUE..... 94

1. <u>Protocole général</u>	94
-----------------------------------	----

2. <u>Approche comportementale</u>	95
2.1. Open-field	95
2.2. Labyrinthe en T	96
2.3. Analyse statistique	97
2.4. Résultats	97
2.4.1. Open –field	97
2.4.2. Labyrinthe en T	97
2.5. Discussion	98
3. <u>Dosage de la dopamine cérébrale</u>	99
3.1. Principe	99
3.2. Matériel et méthode	99
3.2.1. Réactifs	99
3.2.2. Préparation du tampon phase mobile et de la gamme d'étalonnage	100
3.2.3. Préparation des échantillons	100
3.2.4. Conditions CLHP	100
3.2.5. Analyse statistique	101
3.3. Résultats	101
3.4. Discussion	102
4. <u>Etude histologique, en microscopie optique</u>	102
4.1. Matériel et méthode	102
4.1.1. Réactifs utilisés	102
4.1.2. Préparation des lames histologiques	103
4.2. Résultats	103
4.3. Discussion	107
5. <u>Conclusion</u>	107

ETUDES *IN VITRO* ET *IN VIVO* DE LA CHÉLATION DU MANGANESE..... 109

1. <u>Etude in vitro</u>	109
1.1. Matériel et méthode	109
1.1.1. Réactifs utilisés	109
1.1.2. Méthode	110
1.1.3. Analyse statistique	111
1.2. Résultats	111
1.3. Discussion	112
1.4. Conclusion	113

2. <u>Etude <i>in vivo</i></u>	114
2.1. Matériel et méthodes.....	114
2.1.1. Réactifs utilisés.....	114
2.1.2. Méthode.....	114
2.1.3. Analyse statistique.....	115
2.2. Résultats.....	116
2.2.1. Variations pondérales.....	116
2.2.2. Effet des chélateurs sur les excrétions urinaire et fécale du manganèse, ainsi que sur l'excrétion des autres éléments étudiés.....	116
2.2.3. Taux sanguin et plasmatique du manganèse et des autres éléments étudiés, au moment du sacrifice.....	121
2.2.4. Concentrations tissulaires du manganèse et des autres éléments étudiés, au moment du sacrifice.....	122
• Concentrations tissulaires en manganèse.....	122
• Concentrations tissulaires en fer.....	123
• Concentrations tissulaires en zinc.....	124
• Concentrations tissulaires en cuivre.....	125
• Concentrations tissulaires en magnésium.....	126
• Concentrations tissulaires en calcium.....	127
• Concentrations tissulaires en phosphore.....	128
2.3. Discussion.....	128
 CONCLUSION GENERALE.....	 131
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	 135
 ANNEXES.....	 156

Introduction

Considéré comme élément essentiel, à taux physiologique, de par son rôle dans de nombreux systèmes enzymatiques, le manganèse n'en est pas moins toxique, en raison de sa large utilisation dans l'industrie, notamment en métallurgie où il est souvent associé au fer.

Les principales manifestations de sa toxicité chronique concernent le système nerveux central et se manifestent par des troubles neurologiques de type parkinsonien (rigidité, bradykinésie, akinésie, tremblements...).

Si la principale voie de pénétration du manganèse reste la voie aérienne, liée à l'inhalation de poussières dans les industries métallurgiques et dans leur environnement proche, des intoxications par voie orale ne sont pas à exclure, du fait de la contamination des sols, de l'eau et des aliments solides.

Alors que, pour de nombreux métaux toxiques (plomb, bismuth, aluminium, mercure...), il existe des chélateurs efficaces de détoxification, il n'en est pas de même pour le manganèse.

Ainsi la toxicité chronique du manganèse reste un problème d'actualité, notamment dans les pays en voie d'industrialisation (Chine, Maroc...), et justifie donc notre étude.

Analyse bibliographique

PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

Le manganèse (symbole Mn ; nombre atomique 25 ; masse atomique 54,94 ; densité 7,47 kg.L⁻¹ à 20°C ; point de fusion 1244°C ; point d'ébullition 2097 °C) est un métal de transition ayant l'aspect du fer, plus dur que celui-ci mais plus friable (Haguenoer & Furon, 1982 ; Lauwerys, 1992).

Il appartient au groupe 7 (autrefois VIIb) de la classification périodique des éléments (Keen *et al.*, 2000).

C'est un élément de transition qui existe à des degrés d'oxydation variant de + 1 à + 7, mais les plus souvent rencontrés sont + 2, + 4 et + 7 (Keen *et al.*, 2000).

Il existe un seul radio-isotope naturel, le ⁵⁴Mn, et plusieurs radio-isotopes artificiels (49 à 53 et 56 à 58).

Le cation Mn²⁺ précipite sous forme de Mn(OH)₂ uniquement pour des pH ≥ 8,5 et pour une concentration de 10⁻² mol.L⁻¹. De plus, à pH acide ou neutre, Mn²⁺ est un très mauvais réducteur et donc ne s'oxyde que très difficilement en Mn³⁺ et Mn⁴⁺.

UTILISATIONS ET SOURCES D'EXPOSITION

1. Utilisations

Bien qu'utilisé dès l'Antiquité dans la fabrication du verre, le minerai de manganèse n'a été réellement exploité qu'à partir du XIX^{ème} siècle. En 1995, la production s'élevait à 22,7 millions de tonnes. Les principaux pays producteurs sont l'ex-URSS (6,2 millions de tonnes), la Chine (4,7 millions de tonnes), l'Afrique du Sud (3,2 millions de tonnes) qui possède 83 % des réserves mondiales et le Brésil (3,2 millions de tonnes) (Encyclopédie Microsoft Encarta98). Parmi les autres pays producteurs, citons l'Australie, le Gabon, l'Inde, le Maroc... La France, quant à elle, ne produit pas cet élément.

Le manganèse pur est obtenu soit par réduction aluminothermique de la pyrolusite (MnO_2) en présence de poudre d'aluminium (procédé Goldschmidt), soit par électrolyse de chlorure ou de sulfate de manganèse conduisant à un métal pur à 99,8% (Encyclopédie Microsoft Encarta98).

Le manganèse est le 4^{ème} métal le plus utilisé (après le fer, l'aluminium et le cuivre). La majorité de la production (94 %) est utilisée dans l'industrie métallurgique, pour la fabrication d'alliages. Le manganèse utilisé sous forme d'alliages ferreux (ferromanganèse, fonte Spiegel) sert principalement à améliorer les qualités mécaniques de l'acier. Parmi les alliages non ferreux, on peut citer le bronze au manganèse (constitué de manganèse, d'étain et de zinc) résistant à la corrosion de l'eau de mer et utilisé dans la fabrication des pales des hélices de bateaux et des torpilles. Autre alliage non ferreux, la manganine (constituée de manganèse, de cuivre et de nickel) présente une conductivité qui varie peu avec la température ; elle est utilisée, sous forme de fil, pour les mesures électriques de précision.

Différents composés minéraux et organiques du manganèse sont utilisés dans divers secteurs de l'industrie (Barceloux, 1999 ; Chu *et al.*, 1995 ; Haguenoer & Furon, 1982 ; Lauwerys, 1992 ; Lynam *et al.*, 1999 ; Zayed *et al.*, 1999) :

- soudure : emploi d'électrodes dont l'enrobage ou l'alliage constitutif contient du manganèse (MnO_2)
- optique industrielle : traitement anti-reflet (MnO_2)
- fabrication des batteries à piles sèches (MnO_2 , MnCl_2)
- fabrication de bombes incendiaires (MnO_2)
- industrie chimique : catalyseurs dans diverses réactions chimiques, précurseurs de composés organiques du manganèse, agent oxydant, réactif de laboratoire (MnCl_2 , KMnO_4 , $(\text{NO}_3)_2\text{Mn}$)
- fabrication de peintures, caoutchouc, conservateur du bois, linoléum, nettoyage des métaux, photographie, agent décolorant (MnO_2 , KMnO_4)
- agents siccatifs de vernis et de peintures (MnSO_4 , $\text{MnB}_4\text{O}_7 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, MnCO_3)
- pigments en teinturerie, verrerie, céramique, poterie, tuilerie, briqueterie (MnCO_3 , MnO_2 , MnSO_4 , MnHPO_4)
- textile : agents de mordantage et de blanchiment (KMnO_4 , $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mn}$, MnCrO_4)
- fertilisants pour la vigne et le tabac (MnSO_4)
- bactéricides et fongicides : désinfection et assèchement de dermatoses suintantes, conservateurs de fleurs et de fruits, désinfection de l'eau (KMnO_4 , MnSO_4). L'éthylène-bis-dithiocarbamate de manganèse (manèbe) et le mancozèbe sont des fongicides utilisés en agriculture.
- compléments alimentaires pour le bétail et l'homme (MnCl_2 , MnSO_4 , MnCO_3)
- le méthylcyclopentadiényle tricarbonyle de manganèse (MMT) est utilisé comme additif antidétonant et anti-fumée de l'essence sans plomb au Canada, aux USA, dans certains pays d'Europe, en Asie et en Amérique du Sud. Il se présente sous la forme d'un liquide peu volatil, très miscible à l'essence et légèrement miscible à l'eau, d'une couleur jaune paille et ayant l'odeur de l'herbe. Il est produit par l'Ethyl Corporation et est vendu sous le nom de AK-33X ou HiTec 3000.

2. Sources d'exposition

2.1. Sol

Le manganèse est largement répandu dans l'environnement puisqu'il constitue 0,085 % de la croûte terrestre, ce qui en fait le 12^{ème} élément par ordre décroissant d'abondance. A l'état naturel, il n'existe pas sous forme libre mais combinée à divers borates, carbonates, phosphates, oxydes, sulfates et silicates (Barceloux, 1999 ; Haguenoer & Furon, 1982).

La pyrolusite (MnO_2) est le principal minéral manganifère. Il existe d'autres minerais moins courants, tels que la manganite ($\text{Mn}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$), la manganosite (MnO), l'haussmanite (Mn_3O_4), la rhodochrosite (MnCO_3) et les silicates de manganèse (rhodonite, braunite) (Barceloux, 1999 ; Haguenoer & Furon, 1982).

Le manganèse est présent dans presque tous les types de sol. Les concentrations varient de 40 à 900 mg Mn.kg^{-1} , avec une moyenne de 330 mg Mn.kg^{-1} ; toutefois, des taux pouvant aller jusqu'à 7 g Mn.kg^{-1} peuvent être rencontrés dans des zones à forte activité minière (Barceloux, 1999). Enfin, des taux exceptionnellement importants (103 g Mn.kg^{-1}) ont été signalés dans les sols cultivés de l'île de Groote Eylandt en Australie (Cawte & Florence, 1987).

2.2. Air

Dans l'atmosphère, la demi-vie des particules dépend de leur taille et se mesure généralement en jours.

L'érosion du sol est la principale source naturelle de manganèse dans l'air ambiant (Barceloux, 1999). Toutefois, les activités humaines émettent également du manganèse, notamment par la combustion des carburants fossiles et par l'industrie ; ainsi aux U.S.A., ces émissions représentent respectivement 20 % et 80 % du manganèse atmosphérique (ATSDR, 1997).

Le taux ambiant de manganèse en zones rurale et urbaine varie de 0,01 à 0,07 $\mu\text{g Mn.m}^{-3}$; par contre, il est beaucoup plus important (0,22 à 0,30 $\mu\text{g Mn.m}^{-3}$) dans les zones où sont implantées des industries émettrices de manganèse (Rodier, 1996).

Selon l'Environmental Protection Agency, l'apport journalier en manganèse serait de 0,46 µg, pour un homme de 70 kg inhalant en moyenne 20 m³ d'air par jour et en admettant une concentration atmosphérique en manganèse de 0,023 µg.m⁻³ (Chu *et al.*, 1995). L'Organisation Mondiale pour la Santé, quant à elle, estime l'absorption pulmonaire journalière inférieure à 2 µg, dans les régions sans industrie (OMS, 1981).

La pollution atmosphérique engendrée par la proximité des industries émettrices de manganèse et des mines est susceptible d'être renforcée par l'utilisation du MMT comme additif dans les carburants, en remplacement du plomb tétraéthyle. Ce composé permettrait d'augmenter la production d'essence, à partir d'un baril de pétrole brut, tout en diminuant les émissions de NO_x, CO, particules de poussières et composés aromatiques.

La combustion du MMT libère dans l'atmosphère du manganèse, essentiellement associé à des particules d'oxydes, de phosphates et de sulfates dont la taille est inférieure à 2,5 µm. Le MMT résiduel (1%) est rapidement décomposé par voie photochimique en MnO, CO et dérivés organiques non identifiés.

La contribution du MMT aux taux environnementaux de manganèse est difficile à évaluer, mais il semblerait qu'elle reste faible (Lynam *et al.*, 1999).

L'importance du risque lié à l'utilisation de ce composé est encore incertaine et reste un sujet d'attention considérable pour la santé publique. En effet, bien que la quantité de manganèse inhalée en zones urbaines, où le MMT est utilisé, reste faible par rapport à l'apport alimentaire en manganèse, une accumulation de manganèse a pu être mise en évidence dans l'avoine à proximité d'un important axe routier et dans le foie des pigeons d'une zone urbanisée (Zayed *et al.*, 1999).

2.3. Eau

Le manganèse présent dans l'eau peut s'y trouver à différents états d'oxydation (+2 et +4), à l'état soluble ou en suspension sous forme de complexes (Rodier, 1996).

La solubilité du manganèse dépend du pH, de l'oxygène dissous et de la présence d'agent complexant (Rodier, 1996). Le chlorure et le sulfate de manganèse présentent une bonne solubilité.

Dans l'eau de mer, les concentrations en manganèse varient de $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ à $6 \mu\text{g.L}^{-1}$ suivant les zones. Les eaux souterraines ont des teneurs de l'ordre de 1 mg.L^{-1} , tandis que les eaux de surface en contiennent généralement moins de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Rodier, 1996). Enfin, l'eau potable contient 5 à $25 \mu\text{g.L}^{-1}$. Toutefois, dans certaines régions d'Allemagne et de Grèce, des concentrations de manganèse nettement supérieures (plus de 2 mg.L^{-1}) ont été signalées (Kondakis *et al.*, 1989 ; Vieregge *et al.*, 1995).

La quantité de manganèse ingérée quotidiennement par l'eau de boisson serait d'environ $8 \mu\text{g}$ pour un homme consommant chaque jour 2 litres d'eau contenant $4 \mu\text{g Mn.L}^{-1}$ (Chu *et al.*, 1995).

2.4. Alimentation solide

L'alimentation est la principale source de manganèse pour la population générale.

La prise quotidienne moyenne varie de 2 à 9 mg, selon les aliments ; toutefois, elle pourrait atteindre 11 mg dans le cas des régimes végétariens, ou de la consommation d'aliments riches en manganèse tels que les céréales complètes ($0,41 - 41 \mu\text{g.g}^{-1}$), les noix ($18 - 47 \mu\text{g.g}^{-1}$), les légumineuses ($2,2 - 6,7 \mu\text{g.g}^{-1}$) et le thé ($0,4 - 1,3 \text{ mg}$ par tasse).

La viande, le poisson et les œufs ont des teneurs en manganèse inférieures ($0,1 - 4 \mu\text{g.g}^{-1}$). Enfin, les produits laitiers sont les aliments les moins riches en manganèse ; ils en contiennent entre $0,02$ et $0,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ (ATSDR, 1997 ; Chu *et al.*, 1995 ; OMS, 1981).

Le lait maternel contient peu de manganèse ($< 0,55 \mu\text{g.L}^{-1}$), mais la rétention de cet élément chez le nourrisson est importante et les cas de carence ne sont pas fréquents (Lönnerdal, 1994).

Cawte et Florence (1987) ont observé des concentrations en manganèse pouvant aller jusqu'à $720 \mu\text{g.g}^{-1}$, dans des légumes ayant poussé sur des sols exceptionnellement riches en manganèse, sur l'île de Groote Eylandt en Australie.

2.5. Autres sources

Les suppléments alimentaires, disponibles dans le commerce, fournissent de 1 à 5 mg par jour, sous forme de chlorure ou de carbonate ; toutefois certains peuvent apporter jusqu'à 25 mg Mn.j^{-1} (Rucker *et al.*, 1994).

Les liquides de perfusion utilisés pour l'alimentation parentérale d'adultes (voie intraveineuse) apporteraient de 0,15 à 0,8 mg Mn par jour (Nagamoto *et al.*, 1999).

Des complexes du manganèse sont utilisés comme agents contrastants en imagerie par résonance magnétique (Misselwitz *et al.*, 1995).

METABOLISME

1. Pénétration du manganèse dans l'organisme

1.1. Absorption pulmonaire

Elle représente l'une des principales voies d'intoxication et est à l'origine de pathologies sévères. Elle a lieu principalement suite à l'inhalation de manganèse via des contacts professionnels avec la poussière du métal.

Comme pour d'autres métaux et composés métalliques, elle dépend du diamètre aérodynamique moyen des particules inhalées. Ainsi, seules celles présentant un diamètre aérodynamique moyen inférieur à 5 μm atteignent les alvéoles pulmonaires. Le manganèse y est alors absorbé sous forme ionique et passe dans la circulation sanguine pour être transporté jusqu'aux différents tissus. La forme Mn^{2+} serait la plus rapidement absorbée (Andersen *et al.*, 1999).

La plupart des particules inhalées regagne le pharynx grâce au mouvement mucociliaire et se retrouve secondairement ingérée et prise en charge par le tractus gastrointestinal. Les particules qui n'atteignent pas les alvéoles sont éliminées des poumons en quelques minutes (Chu *et al.*, 1995).

Des études menées sur le rat ont mis en évidence la diffusion du manganèse à travers l'épithélium olfactif nasal, vers les neurones primaires. La migration dans les bulbes olfactifs et dans les structures cérébrales plus profondes se ferait par transport axonal antérograde (Gianutsos *et al.*, 1997 ; Tjalve & Henriksson, 1996, 1999).

On ne connaît pas l'importance relative de cette voie d'exposition chez l'homme. En effet, si l'épithélium olfactif nasal du rat représente environ 50 % de l'épithélium nasal total, ce pourcentage serait nettement inférieur chez l'homme et donc le transport du manganèse par cette voie devrait être moins important (Andersen *et al.*, 1999).

1.2. Absorption digestive

Elle constitue, avec la voie pulmonaire, la principale voie de pénétration du manganèse dans l'organisme.

1.2.1. Mécanismes

De nombreuses études ont été réalisées sur le rat : des études *in vitro* (fragments d'intestin inversé, vésicules de membrane à bordure en brosse isolée) et *in situ* (anse intestinale isolée). Cependant, les mécanismes d'absorption intestinale du manganèse ne sont pas encore bien explicités.

L'absorption intestinale du manganèse aurait principalement lieu au niveau de l'intestin grêle et plus particulièrement dans la partie proximale du jéjunum (Garcia-Aranda *et al.*, 1983 ; Lutz *et al.*, 1993). A ce niveau, le manganèse emprunterait un système de transport actif (Garcia-Aranda *et al.*, 1983 ; Kabata *et al.*, 1989 ; Testolin *et al.*, 1993 ; Thomson & Valberg, 1972).

Au niveau du colon, seul le processus de diffusion simple interviendrait (Cikrt & Vostal, 1969).

1.2.2. Facteurs influençant l'absorption du manganèse

Les estimations fournies par les différentes études relatives au pourcentage d'absorption intestinale du manganèse alimentaire sont très variables ; toutefois, en général, moins de 10 % du manganèse seraient absorbés chez l'homme et l'animal (Davis *et al.*, 1993 ; Finley *et al.*, 1997 ; Freeland-Graves *et al.*, 1988 ; Johnson *et al.*, 1991 ; Sandström, 1992 ; Sandström *et al.*, 1986).

De plus, l'absorption intestinale du manganèse peut être affectée par différents facteurs, tels que la forme chimique sous laquelle se trouve cet élément, l'âge, certaines pathologies, la concentration de manganèse dans l'alimentation et la présence de certains composés dans la nourriture.

- **Influence de la forme chimique**

De par l'existence de certaines similitudes physico-chimiques entre le fer et le manganèse, on peut penser que la biodisponibilité de Mn^{2+} est supérieure à celle de Mn^{3+} (analogie avec Fe^{2+} et Fe^{3+}). Cette hypothèse semble être confortée par la prédominance de la forme Mn^{2+} dans les tissus, par rapport à la forme Mn^{3+} (Kies, 1994).

- **Influence de l'âge**

Peu de données sont disponibles sur l'absorption intestinale chez l'enfant et la plupart des informations dont nous disposons proviennent d'expérimentations animales.

Comme pour de nombreux autres métaux, les jeunes animaux retiennent mieux le manganèse d'origine alimentaire que les adultes. Ce phénomène s'expliquerait par une absorption intestinale plus importante probablement due à l'immaturité de la barrière gastro-intestinale (Kostial *et al.*, 1978 ; Mena, 1974 ; Rehnberg *et al.*, 1982).

- **Influence de certaines pathologies**

Certaines pathologies (anémie ferriprive, gastrite chronique, alcoolisme, carences nutritionnelles) augmentent l'absorption intestinale du manganèse (Haguenoer & Furon, 1982).

- **Influence de la quantité de manganèse administrée**

L'augmentation de l'apport alimentaire de manganèse induit une diminution du pourcentage d'absorption de cet élément. Ce phénomène constituerait un mécanisme de régulation homéostatique permettant de maintenir les concentrations tissulaires en manganèse stables (Abrams *et al.*, 1976 a et b ; Lee & Johnson, 1988 ; Weigand *et al.*, 1986).

- **Influence de différents facteurs alimentaires**

L'absorption intestinale du manganèse peut être influencée par d'autres éléments (Fe, Co, Zn, Ca, Mg, P) et par différents composés alimentaires (glucides, fibres alimentaires, phytates).

- **Influence de différents éléments**

Le manganèse et le **fer** partagent de nombreuses propriétés chimiques, physiques et physiologiques. Aussi, des interactions entre ces deux éléments sont possibles et peuvent affecter leur biodisponibilité.

Des études *in vitro* (vésicules de membrane à bordure en brosse) et *in vivo* (surcharge alimentaire en fer chez le rat) ont montré notamment que le fer inhibe l'absorption intestinale du manganèse (Davis *et al.*, 1992 ; Grunden, 1977 a et b ; Kabata *et al.*, 1989 ; Kies, 1994).

Il y aurait compétition entre ces deux éléments, le manganèse empruntant le même système de transport que le fer (Thomson & Valberg, 1972).

A noter que, chez le poulet, la présence de fer ne semble pas affecter l'absorption intestinale du manganèse (Halpin *et al.*, 1986).

De façon similaire au fer, on observe une compétition entre le **cobalt** et le manganèse pour leur absorption intestinale, le système de transport étant identique à celui du fer (Kabata *et al.*, 1989 ; Pollack *et al.*, 1965, Thomson & Valberg, 1972).

A noter que chez le poulet, un excès alimentaire de cobalt n'a pas d'influence sur l'absorption du manganèse (Halpin *et al.*, 1986).

Kabata et collaborateurs (1989) ont également mis en évidence *in vitro* (vésicules de membrane à bordure en brosse) une inhibition de l'absorption intestinale du manganèse par le **zinc**.

Le **calcium** modifie l'absorption intestinale du manganèse chez l'homme (Kies, 1994) et chez de nombreuses espèces animales (Johnson & Kies, 1989 ; Van Barneveld & Van den Hamer, 1984). Selon Lutz et collaborateurs (1993), il diminuerait l'absorption du manganèse dans le jéjunum proximal et le colon, par contre il l'augmenterait dans le jéjunum distal.

Concernant les sels de calcium, le carbonate de calcium utilisé comme anti-acide chez l'homme, diminuerait l'absorption intestinale du manganèse en modifiant le pH intestinal. Le lactate de calcium, présent dans le lait, aurait le même type d'action, mais moins prononcée (Kies, 1994).

Certains auteurs proposent un mécanisme commun impliqué dans le transport de Ca^{2+} et Mn^{2+} à travers la paroi intestinale (Dupuis *et al.*, 1992 ; Lutz *et al.*, 1993). Selon Van Barneveld &

Van Den Hamer (1984), l'excès de calcium alimentaire pourrait diminuer l'absorption du manganèse par suite de la coprécipitation de complexes mixtes calcium-manganèse.

A noter que, chez le poulet, l'excès de calcium n'aurait pas d'effet sur l'absorption du manganèse (Halpin *et al.*, 1986 ; Wedekind *et al.*, 1991).

L'influence du **magnésium** sur l'absorption intestinale du manganèse reste controversée. En effet, l'absorption de manganèse administré oralement à des souris est inhibée par la présence d'un supplément de magnésium dans la nourriture ou l'eau de boisson (Van Barneveld & Van den Hamer, 1984) ; par contre, des expériences réalisées *in situ* (anses intestinales isolées) ont montré que le magnésium n'a pas d'influence sur l'absorption du manganèse, au niveau du jéjunum proximal chez le rat (Lutz *et al.*, 1991).

Chez le rat et le poulet, les **phosphates** diminueraient l'absorption intestinale du manganèse. Le mécanisme d'action est encore mal connu, mais il serait probablement lié à une diminution de la solubilité du manganèse dans la lumière intestinale ou à une augmentation de l'adsorption de cet élément (Dupuis *et al.*, 1992 ; Wedekind *et al.*, 1991).

- **Influence de différents composés alimentaires**

Certains **composés glucidiques** influencent l'absorption intestinale du manganèse. Des expériences réalisées *in situ* (anse iléale de rat isolée) ont montré que la présence de sorbitol et de lactose stimule l'absorption intestinale du manganèse au niveau de l'iléon (Dupuis *et al.*, 1992). Par contre, le lactose et le glucose n'auraient pas d'effet sur son absorption au niveau du jéjunum (Lutz *et al.*, 1991).

Il semblerait que les **fibres alimentaires** et les **phytates**, contenus dans les produits alimentaires d'origine végétale, soient responsables d'une diminution de l'absorption du manganèse (Halpin *et al.*, 1986 ; Johnson *et al.*, 1991). Cet effet est d'ailleurs connu pour d'autres éléments, tels que le zinc, le fer, le cuivre, le calcium et le magnésium ; ces composés pourraient agir en réduisant le temps de transit intestinal ou en formant, avec l'élément, des chélates macromoléculaires qui ne passent pas la barrière gastro-intestinale (Greger, 1999 ; Policar, 1994) .

L'**acide ascorbique** (vitamine C) et différents **acides organiques** (acides citrique, malique, fumarique) ont un effet positif sur l'absorption intestinale du manganèse (Garcia-Aranda *et al.*, 1983 ; Kies, 1994 ; Lönnerdal *et al.*, 1987).

L'**histidine** augmenterait considérablement la biodisponibilité du manganèse (Garcia-Aranda *et al.*, 1983).

La présence de **protéines animales** augmenterait l'assimilation du manganèse, expliquant sa remarquable biodisponibilité lorsqu'il est contenu dans la viande (Polícar, 1994).

Enfin, il semblerait que les **lipides**, en particulier le cholestérol alimentaire, aient un effet positif sur la biodisponibilité du manganèse (Kies, 1994).

1.3. Autres voies de pénétration

L'absorption par voie cutanée est faible, mais elle pourrait être l'une des voies de pénétration des dérivés organiques du manganèse, tel que le MMT (Chu *et al.*, 1995 ; Haguenoer & Furon, 1982).

L'alimentation par voie parentérale peut être également une voie d'exposition au manganèse (Ejima *et al.*, 1992 ; Komaki *et al.*, 1999 ; Nagatomo *et al.*, 1999).

2. Transport du manganèse

2.1. Système porte

La contribution des différentes formes chimiques du manganèse (libre ou complexé) dans les conditions *in vivo*, n'est pas encore clairement établie ; cependant, il semblerait que le manganèse absorbé par l'intestin soit transporté jusqu'au foie, principalement sous forme bivalente, libre ou complexé à l'albumine (Davis *et al.*, 1993). Le transport par une α_2 -macroglobuline a également été évoqué (Gibbons *et al.*, 1976).

2.2. Foie

Le passage de Mn^{2+} dans le foie se ferait selon un processus unidirectionnel saturable, probablement actif (Keen *et al.*, 2000).

Seule une faible proportion de manganèse (moins de 10 %) entrerait dans la circulation générale, l'essentiel étant excrété dans la bile (Andersen *et al.*, 1999).

2.3. Circulation générale

Dans la circulation générale, Mn^{2+} serait oxydé en Mn^{3+} par la cerruléoplasmine, puis complexé à la transferrine de manière similaire au fer (Andersen *et al.*, 1999 ; Gibbons *et al.*, 1976). Cette protéine plasmatique assumerait l'essentiel du transport du manganèse dans la circulation générale, quelle que soit la voie d'administration de l'élément (Davidsson *et al.*, 1989) ; seule une faible fraction de manganèse pourrait se fixer à l'albumine (Scheuhammer & Cherian, 1985).

La complexation à la transferrine se fait au niveau des sites de fixation du fer qui, dans les conditions physiologiques normales, ne sont pas saturés et sont disponibles pour la fixation du manganèse. Ce complexe aurait un temps de demi-vie dans l'organisme plus long que celui du manganèse libre ce qui augmente sa probabilité d'être prélevé par les autres tissus (Andersen *et al.*, 1999 ; Gibbons *et al.*, 1976).

3. Distribution

3.1. Dans les conditions physiologiques normales

Le manganèse disparaît rapidement de la circulation générale (Borg & Cotzias, 1958 ; Cotzias *et al.*, 1968). Complexé à la transferrine, il est distribué aux organes par le sang artériel, vraisemblablement via des récepteurs à la transferrine.

Les concentrations restent constantes dans les différents tissus tout au long de la vie et peuvent être considérées comme caractéristiques d'un organe donné. De plus, elles varieraient peu d'une espèce animale à l'autre (Keen *et al.*, 2000).

Dans les tissus, le manganèse se fixe préférentiellement sur la membrane externe des mitochondries et dans les structures nucléaires (Maynard & Cotzias, 1955).

Chez l'homme, la charge corporelle d'un adulte de 70 kg est comprise entre 10 et 20 mg, ce qui est relativement faible par rapport au fer (4 g) et au zinc (3 g). Les concentrations tissulaires en manganèse sont généralement comprises entre 0,06 et 1,68 µg par gramme de tissu (tableau 1), les plus importantes étant trouvées dans les tissus riches en mitochondries, comme le foie, les reins et le pancréas, à l'exception toutefois du cerveau. Le squelette, quant à lui, peut contenir jusqu'à 25 % de la charge corporelle en manganèse, mais ce pool n'est pas facilement mobilisable (Korc, 1988).

La concentration dans le sang total est d'environ 10 µg Mn.L⁻¹, tandis que les concentrations sérique, plasmatique et urinaire sont de l'ordre de 1 µg Mn.L⁻¹ (Kristiansen *et al.*, 1997 ; Minoia *et al.*, 1990 ; Rückgauer *et al.*, 1997 ; White & Sabbioni, 1998).

A noter que le fœtus ne dispose pas de réserve en manganèse. Cet élément est capable de traverser le placenta, mais ce transport reste limité, même en cas de surexposition (Fechter, 1999 ; Onoda *et al.*, 1978).

3.2. En cas de surexposition

Lors d'une entrée supplémentaire de manganèse dans l'organisme, la teneur de cet élément augmente différemment selon les organes. Les augmentations les plus importantes sont constatées dans les os, le pancréas et le sang (Scheuhammer & Cherian, 1983).

La distribution tissulaire du manganèse reflète généralement une exposition chronique et non une exposition ponctuelle (ATSDR, 1997). De plus, cette distribution est influencée par le mode d'administration du manganèse ; effectivement, administré oralement, il est transporté jusqu'au foie où il est efficacement éliminé du sang ; par contre, lorsque le manganèse est administré par voie parentérale ou par inhalation, il accède directement à la circulation générale, à partir de laquelle il peut être prélevé par les autres organes (Aschner, 1999 ; Davis *et al.*, 1993 ; Lee & Johnson, 1988 ; Roels *et al.*, 1997).

3.3. Cas du système nerveux central

Le système nerveux central (SNC) étant un organe cible de la toxicité du manganèse, le passage de cet élément à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) a fait l'objet de nombreuses études.

A des concentrations plasmatiques normales, cet élément pénétrerait dans le SNC principalement par l'endothélium capillaire de la BHE.

Différents mécanismes ont été proposés : diffusion facilitée (Rabin *et al.*, 1993), transport actif (Rabin *et al.*, 1993), mais également un transport par la transferrine qui représenterait le principal mécanisme de transport à travers la BHE (Aschner & Aschner, 1990, 1991). Le complexe stable formé entre la transferrine et Mn^{3+} pénétrerait dans la cellule endothéliale par endocytose via des récepteurs de la transferrine se trouvant à la surface des capillaires cérébraux ; le manganèse libéré dans la cellule endothéliale serait transféré vers la surface abluminale de la cellule endothéliale et libéré dans le milieu extracellulaire où il serait pris en charge par une transferrine cérébrale ; il serait ensuite prélevé par les neurones, les oligodendrocytes et les astrocytes afin d'être utilisé ou stocké (Aschner, 1999). Si l'ion Mn^{2+} libre semble transporté dans le cerveau plus rapidement que le manganèse fixé aux protéines plasmatiques (Rabin *et al.*, 1993), la forme libre ne paraît pas prédominer dans le plasma et les tissus (Cotzias *et al.*, 1995) ; de plus, la fixation de Mn^{2+} à l' α_2 -macroglobuline ou à l'albumine rend impossible la traversée de la BHE, à moins que celle-ci ne soit endommagée.

A fortes concentrations plasmatiques, l'entrée du manganèse dans le SNC se ferait surtout par l'intermédiaire du liquide céphalo-rachidien (LCR), à travers les plexus choroïdes et les organes circumventriculaires dépourvus de barrière hémato-encéphalique (Ashner, 1999 ; Ashner *et al.*, 1999).

L'élément s'accumulerait préférentiellement au niveau des ganglions de la base comprenant, le noyau caudé, le putamen, le *globus pallidus*, la substance noire et les noyaux subthalamiques (Eriksson *et al.*, 1992 ; Komura & Sakamoto, 1994 ; Scheuhammer & Cherian, 1981), les régions les plus affectées étant le *globus pallidus* et la substance noire *pars reticularis* (Larsen *et al.*, 1979 ; Newland *et al.*, 1989 ; Yamada *et al.*, 1986).

Cependant, la distribution des récepteurs à la transferrine ne semble pas correspondre aux sites d'accumulation du manganèse (sites efférents aux régions riches en récepteurs à la transferrine). Selon Slood & Gramsbergen (1994), ce phénomène s'expliquerait par un

transport antérograde du manganèse, le long des axones du striatum, à l'intérieur des mitochondries.

4. Elimination du manganèse

Dans les conditions physiologiques normales, les pertes quotidiennes de manganèse ont été estimées à 392 µg chez l'homme (Freeland-Graves *et al.*, 1988).

Des études, menées sur l'homme et le rat, ont montré que la vitesse d'excrétion augmente significativement avec l'apport alimentaire en manganèse (Mahoney & Small, 1968 ; Malecki *et al.*, 1996). La vitesse d'élimination du manganèse dépendrait également de l'organe dans lequel il se trouve : ainsi, il est éliminé plus rapidement du foie et de la rate et plus lentement du muscle, de l'hypophyse, des organes endocrines et du cerveau (Cotzias *et al.*, 1968 ; Dastur *et al.*, 1971 ; Newland *et al.*, 1987).

La **bile** représente la principale voie d'excrétion du manganèse (Bertinchamps *et al.*, 1966 ; Davis *et al.*, 1993 ; Papavasiliou *et al.*, 1966). En effet, lorsqu'il a pénétré dans le foie, un important pourcentage du manganèse absorbé (environ 90%) entre dans le pool lysosomal, à partir duquel il pénètre dans les canalicules biliaires, pour être excrété dans la lumière intestinale. L'ion Mn^{2+} est excrété dans la bile contre un gradient de concentration, ce qui suggère l'existence d'un mécanisme de transport actif (Klaassen, 1974).

L'élimination du manganèse est biphasique, la première phase étant rapide (temps de demi-vie = 4 jours), la seconde lente (temps de demi-vie = 39 jours) ; 70 % du manganèse seraient éliminés pendant la phase lente (Britton & Cotzias, 1966 ; Dastur *et al.*, 1969, 1971 ; Mahoney & Small, 1968 ; Papavasiliou *et al.*, 1966).

Il semblerait que le mécanisme d'excrétion biliaire du manganèse soit moins efficace pendant la période néonatale (Bell *et al.*, 1989 ; Kostial, *et al.*, 1978 ; Lönnerdal *et al.*, 1987).

Les sécrétions biliaires se retrouvent dans les **fèces** qui contiennent environ 99 % du manganèse excrété (Freeland-Graves *et al.*, 1988).

Le tractus intestinal, ainsi que le pancréas, excrètent également du manganèse dans la lumière intestinale que l'on retrouve dans les fèces (Burnett *et al.*, 1952 ; Papavasiliou *et al.*, 1966 ; Thomson *et al.*, 1971).

L'excrétion urinaire ne représente que 0,08% (Freeland-Graves *et al.*, 1988).

Les pertes par la **transpiration** et les **téguments** représentent 0,7% des pertes totales en manganèse.

A noter qu'en cas de surexposition, les excrétions urinaire et fécale du manganèse augmentent considérablement.

5. Maintien de l'homéostasie

Dans les conditions physiologiques normales, les concentrations tissulaires de manganèse varient très peu. Les mécanismes de contrôle homéostatiques sont mal connus, mais il semblerait que l'équilibre homéostatique du manganèse soit assuré par des variations de son taux d'absorption par le tractus gastro-intestinal et par des modifications de sa vitesse d'excrétion (Abrams *et al.*, 1976 a et b ; Diez-Ewald *et al.*, 1968 ; Lee & Johnson, 1988 ; Papavasiliou *et al.*, 1966).

ROLES BIOLOGIQUES DU MANGANESE

Le caractère primordial du manganèse a été mis en évidence en 1931 par Kemmerer et collaborateurs, ainsi que par Orent et McCollum. C'est un oligo-élément présent chez l'homme et beaucoup d'autres espèces animales et végétales (Freeland-Graves & Llanes, 1994).

1. Modes d'actions biochimiques

Chez l'homme et l'animal, le manganèse est essentiel pour le fonctionnement optimal de nombreux systèmes enzymatiques, où il peut intervenir en tant que partie intégrante d'un métallo-enzyme tel que :

- la superoxyde dismutase mitochondriale (MnSOD) qui joue un rôle essentiel dans le système de défense contre les radicaux libres en catalysant la dismutation de l'ion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et en oxygène (O_2)
- l'arginase, enzyme cytosolique, qui catalyse l'hydrolyse de l'arginine en urée et en ornithine

Mais, le plus souvent, le manganèse intervient dans les systèmes enzymatiques en tant que cofacteur non spécifique en se fixant sur le substrat ou sur l'apoprotéine, entraînant un changement conformationnel de celle-ci. En cas de carence, le manganèse peut être remplacé par le magnésium. Parmi les enzymes concernés, citons l'hexokinase, la calcineurine (phosphatase calmoduline dépendante), la xanthine oxydase et la glutamine synthétase ; ce dernier enzyme, particulièrement présent dans le cytosol des cellules gliales, contient environ 80% du manganèse cérébral et fournit la glutamine pour la synthèse des neurotransmetteurs glutamate et GABA (Prohaska, 1987 ; Wedler, 1994 ; Wedler & Denman, 1984).

Dans certains cas, le manganèse intervient comme cofacteur spécifique ; citons l'exemple de la prolidase humaine, ou glycosyltransférase, impliquée dans le recyclage de la proline lors de la biosynthèse du collagène (Yocum & Pecoraro, 1999).

2. Carences

Chez l'animal, le manganèse est nécessaire à la formation des tissus conjonctifs et osseux, à la croissance, au développement embryonnaire de l'oreille interne, au métabolisme des glucides et des lipides, à la reproduction, au fonctionnement du cerveau, au fonctionnement des systèmes anti-radicalaires (Baly *et al.*, 1994 ; Prohaska, 1987 ; Szirake *et al.*, 1999 ; Wedler, 1994 ; Wolinsky *et al.*, 1994).

Ainsi, des anomalies de la croissance et de la fonction de reproduction ont été observées chez des rats et des souris dont l'alimentation était déficiente en manganèse (Freeland-Graves & Llanes, 1994). Depuis, il a été démontré chez diverses espèces animales (poulet, vache, cochon...) qu'une carence alimentaire en manganèse, induite ou spontanée, pouvait avoir pour conséquence de nombreuses anomalies biochimiques et structurales. Différentes altérations ont ainsi pu être observées et notamment des altérations du métabolisme glucidique (faible production d'insuline), du métabolisme des lipoprotéines, du système de défense oxydatif (MnSOD), du métabolisme du facteur de croissance (Hurley & Keen, 1987 ; Keen *et al.*, 1999, 2000).

En cas de carence périnatale, différentes anomalies ont été observées chez l'animal (Saner, 1994) :

- augmentation de la mortalité à la naissance
- retard de croissance
- anomalies du squelette attribuables à une altération du métabolisme du facteur de croissance et à une réduction de l'activité de la glycosyltransférase qui participerait à la production de protéoglycanes stables
- ataxie congénitale caractérisée par une rétraction de la tête et une altération de l'équilibre, vraisemblablement due à une altération du développement des otolithes de l'oreille interne
- altération du métabolisme des glucides et des lipides

Actuellement, dans la population générale, une carence en manganèse semble peu probable étant donné la faiblesse des besoins facilement couverts par une alimentation normale et l'ubiquité du manganèse dans les denrées alimentaires.

Cependant, l'évolution des régimes alimentaires dans les pays occidentaux pourrait, à plus ou moins long terme, être impliquée dans l'apparition d'une telle carence, par diminution de la biodisponibilité du manganèse (consommation accrue de fibres végétales, repas basses calories, remplacement de produits d'origine animale par des produits d'origine végétale, régime végétarien...) (Policar, 1994).

Parmi les manifestations observées suite à une carence manganique chez l'adulte, citons une hypocholestérolémie, un retard de croissance des ongles et des cheveux, une dermatose, une altération de la pigmentation des cheveux et une perte de poids (Freeland-Graves & Llanes, 1994) ; chez l'enfant, des lésions de la peau et des anomalies du squelette ont pu être observées (Norose & Arai, 1987 ; Lönnerdal, 1994).

Enfin, bien qu'aucun lien de cause à effet n'a été démontré, certains auteurs ont avancé, sur la base de faibles taux sériques, sanguins et/ou tissulaires en manganèse, l'existence d'une relation entre le développement de certaines maladies (l'épilepsie, les diabètes, l'ostéoporose, la phénylcétonurie) et une carence en manganèse (Baly *et al.*, 1994 ; Carl & Gallagher, 1994 ; Carl *et al.*, 1990 ; Davidson & Ward, 1988 ; Freeland-Graves & Llanes, 1994 ; Wolinsky *et al.*, 1994).

3. Besoins nutritionnels

La quantité optimale de manganèse, nécessaire pour couvrir les besoins nutritionnels, est difficilement évaluable. Effectivement, elle dépend notamment d'éventuelles interférences avec d'autres éléments et/ou composés alimentaires (fer, calcium, phosphore, phytates) (Greger, 1999).

En 1980, le Food and Nutritional Board (cité par Policar, 1994) a fixé les besoins en fonction de l'âge :

- pour les nourrissons, la ration quotidienne doit être comprise entre 0,7 et 1 mg
- pour les enfants, elle doit être comprise entre 1 et 1,5 mg (enfants de 1 à 3 ans), entre 1,5 et 2 mg (enfants de 4 à 6 ans) ou entre 2 et 3 mg (enfants 7 à 10 ans)
- pour l'adolescent et l'adulte, les doses journalières sont préconisées à hauteur de 2,5 à 5 mg.

En 1988, Freeland-Graves et collaborateurs ont définis qu'un apport de 3,5 mg de manganèse couvrait les besoins journaliers.

D'une manière générale, l'essentiel des besoins semble être couvert par une alimentation normale, essentiellement par l'alimentation solide ; la contribution de l'eau de boisson serait faible (moins de 1 %) (OMS, 1981).

TOXICITE DU MANGANESE

1. Toxicité aiguë

Comme pour la plupart des métaux, l'**inhalation** de fumée d'oxydes de manganèse, à des concentrations non irritantes, conduit à un syndrome pseudo-grippal (fièvre, frissons, transpiration, nausée, toux) proche de la «fièvre des fondeurs de zinc » (Rothan, 1976).

Par contre, l'exposition massive aux fumées et aux poussières de divers sels de manganèse (probablement plusieurs mg Mn.m⁻³) peut provoquer une pneumonie chimique sévère se caractérisant par de la fièvre, de la toux et une expectoration souvent très visqueuse. Les signes cliniques et radiologiques habituels sont ceux de la pneumonie. Les complications à redouter sont la surinfection, l'hémoptysie (expectoration de sang) et fréquemment une albuminurie (due à l'infection). Cette pneumopathie peut être traitée par l'oxygénothérapie et l'antibiothérapie (Rothan, 1976). Cette pathologie peut être rencontrée chez les travailleurs préposés à l'ensachage des scories des anciens convertisseurs (par exemple procédé Thomas) utilisées comme engrais, mais aussi chez les travailleurs des mines de manganèse, des usines de fabrication du ferro-manganèse et du permanganate de potassium.

La concentration atmosphérique en manganèse représentant un danger immédiat pour la vie et la santé a été estimée à 500 mg Mn.m⁻³ (CSST, 1996 ; NIOSH, 1996).

L'intoxication aiguë par **voie orale** est plus rare et résulte de l'ingestion accidentelle de permanganate de potassium (KMnO₄). La dose létale pour l'homme est d'environ 10 g de KMnO₄ solide (soit environ une cuillerée et demie du produit). Les effets délétères sont avant tout dus à l'effet corrosif du composé qui provoque des brûlures chimiques des voies digestives et aériennes et sont accompagnées de vomissement sanglant. La mort résulte la plupart du temps d'un oedème de l'épiglotte ou d'un collapsus cardio-vasculaire (Barceloux, 1999).

A signaler qu'aucun effet neurotoxique n'a été rapporté dans la littérature en cas d'exposition aiguë au manganèse.

2. Toxicité chronique

2.1. Populations concernées

2.1.1. Expositions professionnelles

Les intoxications d'origine professionnelle sont principalement la conséquence d'une inhalation chronique de fortes concentrations de manganèse contenues dans des particules en suspension dans l'air et ayant un diamètre aérodynamique moyen inférieur à 5µm.

Elles ont été essentiellement observées lors des travaux d'extraction et de traitements des minerais, mais elles apparaissent également lors d'autres travaux tels que la production des alliages, les opérations de soudage (acier doux surtout), la fabrication des piles, la production et l'utilisation des divers oxydes et sels de manganèse et l'ensachage des scories de convertisseurs (Lauwerys, 1982 ; Testud, 1993).

Des cas ont été signalés dans diverses parties du monde telles que le Chili, l'Inde, le Maroc, Cuba, le Japon, l'ex-URSS, les USA, la Chine et Taiwan.

Les symptômes se manifestent progressivement après plusieurs mois ou années d'exposition à des concentrations en manganèse souvent supérieures à 5 mg.m⁻³. Cependant, il semblerait que des signes précoces d'intoxication puissent être mis en évidence à partir de concentrations de l'ordre de 1 mg.m⁻³ (Keen *et al.*, 1999).

La manipulation de dérivés organiques du manganèse donne également lieu à des intoxications ; c'est le cas du manèbe et du mancozèbe utilisés dans les pays en voie de développement, en tant que fongicides dans les plantations de bananes et autres fruits (Meco *et al.*, 1994).

2.1.2. Expositions non professionnelles

Des risques de surexposition au manganèse d'origine environnementale sont également à envisager.

Ainsi, des **effets respiratoires**, identiques à ceux observés chez les personnes exposées professionnellement aux poussières de manganèse, ont pu être observés au sein de populations résidant près des usines de production de ferro-manganèse (OMS, 1981).

L'**ingestion** de manganèse peut également provoquer des effets toxiques. Ainsi, Kawamura et collaborateurs (1941) ont décrit 25 cas d'intoxication due à la consommation d'eau de puits contaminée par la présence d'un site de déchets toxiques (piles sèches abandonnées). Plus récemment, Kondakis et collaborateurs (1989) ont constaté le développement de symptômes neurologiques caractéristiques de la maladie de Parkinson, au sein d'une population consommant à long terme une eau de puits contenant du manganèse (1,8 à 2,3 mg.L⁻¹) ; toutefois, ces résultats n'ont pas été confirmés par l'étude épidémiologique de Vieregge et collaborateurs (1995). Un autre cas de manganisme a été décrit par Bleich et collaborateurs (1999), il s'agit d'un homme ayant ingéré du permanganate de potassium (125 mL d'une solution à 8 % en 4 semaines). Enfin, la consommation abusive de vitamines et de minéraux a pu être incriminée dans l'apparition d'une intoxication au manganèse (Banta & Markesbery, 1977).

Selon certains auteurs, il semblerait que différentes maladies du foie (altération de la fonction biliaire, cirrhose), puissent être un facteur prédisposant à l'intoxication au manganèse d'origine alimentaire, par altération des capacités de régulation de l'équilibre homéostatique du manganèse. Chez ces malades, une encéphalopathie hépatique peut se développer, pouvant aboutir à un coma hépatique et à la mort. En général, une transplantation du foie permet une disparition des symptômes (Butterworth *et al.*, 1995 ; Hazell & Butterworth, 1999 ; Krieger, 1995 ; Layrargues *et al.*, 1998).

Autre risque de surexposition au manganèse, l'**alimentation parentérale** totale prolongée a été impliquée dans l'apparition de cas d'intoxication, en relation avec la présence de manganèse dans le liquide de perfusion (Alves *et al.*, 1997 ; Ejima *et al.*, 1992 ; Komaki *et al.*, 1999 ; Nagamoto *et al.*, 1999).

Enfin, des risques potentiels liés à l'utilisation de dipyridoxyl diphosphate de manganèse (Mn-DPDP ou mangafodipir), **produit de contraste utilisé en IRM**, ont été avancés par Gallez et collaborateurs (1997) qui ont mis en évidence, chez la souris, une instabilité du complexe et une fixation du manganèse libéré au niveau du système nerveux.

Plus généralement, et sans précision sur le type d'exposition au manganèse, Kilburn (1987) a pu observer l'apparition de désordres congénitaux, au sein de la population de l'île de Groote Eylandt (Australie) qui occupe un écosystème riche en cet élément.

2.2. Manifestations cliniques

Les effets majeurs rapportés concernent essentiellement le système nerveux central qui est considéré comme le principal organe cible. Généralement, ce sont les mineurs qui présentent les symptômes neurologiques les plus sévères.

Le stade avancé de la maladie se manifeste par l'apparition de symptômes neuro-comportementaux et de signes neurologiques, indicatif d'un **syndrome extrapyramidal** (Huang *et al.*, 1989 ; Seth & Chandra, 1988). Ce désordre neurologique est très proche de la maladie de Parkinson et est appelé le « Parkinson manganique » (Mena, 1979).

En fait, la détérioration de la santé se fait selon un continuum et serait fonction de la dose d'exposition et de vulnérabilités individuelles. Trois phases sont généralement différenciées dans le développement du manganisme (Chu *et al.*, 1995 ; Pal *et al.*, 1999) :

- ***une phase infraclinique, prodromique ou d'installation*** qui dure pendant quelques mois, et qui est caractérisée par une symptomatologie vague, subjective et non spécifique accompagnée de changements comportementaux (céphalées, fatigue, troubles de l'humeur et de la mémoire, cauchemars, hallucinations, actes compulsifs, myalgie, diminution généralisée de la rapidité des mouvements). Ces symptômes varient grandement d'un patient à l'autre (Mena, 1979).
- ***une phase clinique précoce ou maladie débutante*** qui dure quelques mois, avec une symptomatologie neurologique caractérisée par l'apparition de manifestations extrapyramidales : dystonie sévère du tronc et des extrémités, démarche caractéristique dite du coq, perte de l'équilibre, tremblement au repos s'amplifiant lors des mouvements, faciès figé (masque manganique), troubles psychomoteurs, hyperémotivité, dysarthrie, crampes musculaires très douloureuses...
- ***une phase d'état***, apparaissant 1 à 2 ans après le déclenchement de la maladie et pendant laquelle le dysfonctionnement extrapyramidal devient net (parkinsonisme et psychose maniaco-dépressive).

Les travailleurs atteints de manganisme peuvent vivre plusieurs années, certains patients pouvant développer les déficits moteurs du manganisme, sans avoir connu de manifestations psychiatriques regroupées sous le terme de « *locura manganica* » (Huang *et al.*, 1989).

L'évolution de la maladie, après arrêt de l'exposition au manganèse, reste très variable. Ainsi, les taux tissulaires de manganèse peuvent revenir à des valeurs proches de la normale, sans qu'il y ait amélioration des symptômes, suggérant ainsi d'importantes pertes neuronales, symptômes qui peuvent même progresser (Cotzias *et al.*, 1968 ; Huang *et al.*, 1993). En fait, on ne sait pas à quel moment l'arrêt de l'exposition peut permettre de stopper la progression de la maladie, mais il semble qu'une régression des symptômes ne soit possible qu'au stade précoce de l'intoxication (Mergler & Baldwin, 1997).

De nos jours, avec l'amélioration de l'hygiène industrielle, les cas de manganisme sont de plus en plus rares en milieu professionnel. De plus, les intoxications sont détectées de façon précoce grâce aux méthodes de prévention et de surveillance.

2.3. Effets sur le système nerveux central

2.3.1. Modifications neuropathologiques

Les modifications neuropathologiques associées à la toxicité du manganèse sont généralement caractérisées par une dégénérescence des ganglions de la bases et plus particulièrement du *globus pallidus* (pertes cellulaires au niveau du segment interne du *globus pallidus* et, à un degré moindre, au niveau du putamen et de la substance noire *pars reticularis*) Les autres systèmes moteurs, tels que le cortex et le cervelet, ne sont pas touchés. De plus, une diminution du nombre de fibres myélinisées et une prolifération astrocytaire (gliose) ont également été signalés (Calne *et al.*, 1994 ; Chu *et al.*, 1995 ; Eriksson *et al.*, 1984).

2.3.2. Actions biochimiques

Alors qu'il est clairement établi qu'une exposition excessive au manganèse est neurotoxique, les mécanismes impliqués ne sont pas encore totalement élucidés ; plusieurs processus, plus ou moins liés entre eux, semblent intervenir (Verity, 1999).

- **Effets sur le métabolisme énergétique mitochondrial**

Il semblerait que le manganèse soit principalement un toxique mitochondrial. Il se concentrerait dans les mitochondries en empruntant les systèmes de transport du calcium,

interférant ainsi avec le métabolisme de cet élément (Gavin *et al.*, 1990, 1999). En effet, l'entrée du manganèse dans les mitochondries se ferait par le système de transport uniport du calcium, ces deux éléments favorisant réciproquement leur transfert dans la mitochondrie. A l'intérieur de la mitochondrie, le manganèse inhiberait la sortie du calcium par le système de transport Na^+ -dépendant, qui est le principal mécanisme de sortie du calcium au niveau des mitochondries cérébrales, système qu'il ne peut lui-même emprunter.

Ainsi, les concentrations de manganèse et de calcium augmenteraient dans la mitochondrie.

L'augmentation de la concentration en manganèse aurait un effet direct sur la fonction mitochondriale, en perturbant la phosphorylation oxydative (par fixation du manganèse sur la F_1ATPase , protéine responsable de la synthèse d'ATP) et en interférant avec le transport des électrons (par fixation du manganèse au niveau du complexe I) (Gavin *et al.*, 1992). Le manganèse réduirait également les activités de l'aconitase et de la succinate deshydrogénase, enzymes participant au cycle de Krebs (Seth *et al.*, 1977 ; Zheng & Graziano, 1998).

D'autre part, l'augmentation excessive de la concentration en calcium dans la mitochondrie pourrait altérer la perméabilité de cet organite par l'ouverture d'un mégapore dans la membrane interne, impliqué dans le processus de mort cellulaire. Ce pore permettrait la diffusion libre de solutés de faible poids moléculaire à travers la membrane interne entraînant ainsi un effondrement du potentiel membranaire mitochondrial ; cette dépolarisation excessive inhiberait la synthèse d'ATP. Si le pore ne se referme pas rapidement, la membrane externe se rompt et la mitochondrie peut être détruite (Crompton, 1999).

- **Effets sur différents neurotransmetteurs**

Chez l'homme et l'animal, l'altération neurochimique la plus fréquemment rapportée, suite à une exposition chronique au manganèse, est une déplétion de la **dopamine**, au niveau des ganglions de la base et plus particulièrement au niveau du striatum (Seth & Chandra, 1988). L'action du manganèse sur le métabolisme de la dopamine n'est pas encore clairement établi, mais il semblerait que cet élément agisse notamment en catalysant l'auto-oxydation de la dopamine (Donaldson *et al.*, 1980). Plus récemment, Ranasinghe et collaborateurs (2000) ont suggéré que le manganèse pourrait stimuler des sulfotransférases cérébrales capables d'agir sur la dopamine en la transformant en conjugué sulfaté.

Comme pour le parkinsonisme, la déplétion en dopamine pourrait être responsable de la levée de l'inhibition exercée par le striatum sur le *globus pallidus* et les noyaux sous-thalamiques. Les neurones des noyaux sous-thalamiques désinhibés activeraient de façon excessive les neurones du *globus pallidus*, qui à leur tour inhiberaient de façon permanente les noyaux

moteurs thalamiques. Ce phénomène aurait pour conséquence une diminution de l'activité corticale entraînant la rigidité observée en cas de manganisme (Barbeau, 1984 ; Gavin *et al.*, 1999 ; Verity, 1999).

Outre, cette déplétion en dopamine, le manganèse s'est également montré capable d'inhiber *in vitro* la recapture synaptosomale de ce neurotransmetteur, mais aussi celle du glutamate et du GABA (Lai, 1984).

- **Implication dans la production et l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène**

Différentes hypothèses tendent à impliquer indirectement le manganèse dans la production de telles espèces chimiques. Ainsi, l'accélération de l'auto-oxydation de la dopamine serait accompagnée de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ion superoxyde, peroxyde d'hydrogène et radical hydroxyle) et de quinones cytotoxiques (Stokes *et al.*, 1999). Selon Berman et Hastings (1999), les produits de l'auto-oxydation de la dopamine pourraient perturber le fonctionnement mitochondrial, notamment en altérant certaines protéines mitochondriales. De plus, l'inhibition de la recapture de la dopamine pourrait également conduire à la production de telles espèces réactives, suite à l'accumulation excessive de ce neurotransmetteur dans la fente synaptique et à sa métabolisation par la monoamine oxydase (MAO) (Verity, 1999).

Le manganèse aurait aussi une influence sur les systèmes de protection cellulaire ; c'est ainsi qu'ont pu être observées une réduction du taux de glutathion mitochondrial et une inhibition des activités glutathion peroxydase, catalase et glutathion-S-transférase, en particulier au niveau du striatum (Liccione & Maines, 1988 ; Vescovi *et al.*, 1989). Signalons que, selon Sancesario et collaborateurs (1999), l'accumulation de manganèse dans la mitochondrie serait associée à une diminution de l'activité de la MnSOD.

Certains auteurs ont expliqué l'augmentation de la production des radicaux superoxydes observée suite à une surexposition au manganèse, par l'activation du cytochrome P 450 (Eriksson & Heilbronn, 1983 ; Liccione & Maines, 1989).

Parmi les autres espèces réactives de l'oxygène produites indirectement par le manganèse, citons le monoxyde d'azote (NO), connu pour sa neurotoxicité ; cette production serait liée à l'augmentation de la transcription du gène de la NO synthétase inductible et à l'augmentation du transport de son substrat, la L-arginine, au niveau des astrocytes (Hazell & Norenberg, 1998).

2.4. Autres effets du manganèse

La fréquence de ces désordres n'est pas connue.

2.4.1. Effets sur les voies respiratoires

Les poumons sont considérés, avec le système nerveux central, comme des organes cibles d'une exposition chronique au manganèse ; il peuvent être affectés sans que ne se manifestent les troubles nerveux.

L'intoxication chronique peut prédisposer à des pneumopathies bactériennes et virales pouvant devenir résistantes à l'antibiothérapie ; ces atteintes récidivantes peuvent conduire à des défaillances cardiaques aboutissant à la mort en moins de 2 ans. Des cas d'asthme bronchique ont également pu être observés chez des mineurs exposés pendant plusieurs années à de faibles concentrations en manganèse. Toutefois, le manganèse ne s'accumulant pas dans les poumons de façon significative avec l'âge, l'apparition de pneumoconiose semble peu probable (Haguenoer & Furon, 1982).

2.4.2. Effets hématologiques

Chez l'homme (personnes exposées professionnellement et de façon chronique ; femmes supplémentées en manganèse) aucun effet n'a pu être constaté (Davis & Greger, 1992, Mena *et al.*, 1967 ; Roels *et al.*, 1987 ; Smyth *et al.*, 1973 ; Whitlock *et al.*, 1966).

Par contre, différentes altérations des paramètres hématologiques ont pu être observées expérimentalement chez l'animal. Ainsi, chez la souris, Komura et Sakamoto (1991) ont observé une diminution du nombre de globules rouges et de globules blancs et une diminution du taux d'hématocrite. Chez le rat, des injections quotidiennes de chlorure de manganèse par voie intrapéritonéale et/ou un excès alimentaire de manganèse ont conduit à une anémie microcytaire hypochromique (Carter *et al.*, 1980 ; Gubler *et al.*, 1954). Par contre, Scheuhammer et Cherian (1983) n'ont pas constaté d'effet hématologique chez des rats exposés au manganèse par voie intrapéritonéale pendant 30 jours. Enfin, chez l'agneau, l'exposition à des concentrations excessives de manganèse alimentaire diminuerait la formation de l'hémoglobine (Hartman *et al.*, 1955).

Il semblerait que les différents effets hématologiques rapportés dépendent de l'espèce animale utilisée, de la durée d'exposition, de la voie d'administration et de la forme chimique du manganèse (ATSDR, 1997).

2.4.3. Altérations de la fonction de reproduction

Chez l'homme, si aucun effet direct sur le testicule n'a été signalé, de très fortes concentrations de manganèse ont pu être associées à une impuissance (Pelnaver, 1955). Plus récemment, Jiang et collaborateurs (1996) ont observé chez des travailleurs exposés au bioxyde de manganèse ($0,145 \text{ mg Mn.m}^{-3}$) un dysfonctionnement sexuel, une impuissance et une hyposexualité.

Chez la souris, Elbetieha et collaborateurs (2001) ont montré que l'ingestion chronique de chlorure de manganèse (8 g Mn.L^{-1} d'eau de boisson) entraîne une diminution de la fertilité chez le mâle et une diminution du nombre d'implantations dans l'utérus et de foetus viables chez la femelle. Selon Singh et collaborateurs (1974), à forte concentration, le manganèse pourrait provoquer des dégénérescences au niveau des testicules du rat.

2.4.4. Altérations de la distribution tissulaire des autres éléments

Chez l'animal, et plus particulièrement chez le rat, une exposition excessive au manganèse est souvent associée à une altération de la distribution d'autres éléments essentiels, tels que le cuivre, le zinc, le cobalt, le calcium ou le magnésium ; le fer étant le plus affecté avec notamment une diminution du stock hépatique (Diez-Ewald *et al.*, 1968 ; Gubler *et al.*, 1954 ; Hartman *et al.*, 1955 ; Järvinen & Ahlström, 1975 ; Lai *et al.*, 1999, 2000 ; Murthy *et al.*, 1981 ; Nikolova, 1993 ; Scheuhammer & Cherian, 1981, 1983).

2.4.5. Tératogenèse – Mutagenèse - Cancérogenèse

Des effets tératogènes ont été observés chez l'animal (souris, rat, lapin, hamster) après injection de manganèse à des femelles gestantes ; mais ceux-ci résulteraient d'effets toxiques induits chez les mères, plutôt que d'effets directs sur les foetus. Par contre, de fortes concentrations alimentaires de manganèse ne se sont pas révélées être tératogènes en l'absence de signe de toxicité maternelle (EPA, 1998).

Des **effets mutagènes** ont pu être mis en évidence *in vitro* sur bactéries, levures et cultures de cellules de Mammifères (ATSDR, 1997).

Concernant l'existence d'**effets cancérogènes**, peu de travaux ont été réalisés. Citons l'étude menée par Barceloux (1999), sur des travailleurs exposés aux poussières et aux fumées de manganèse, selon laquelle une telle exposition ne représenterait pas un facteur de risque pour le développement d'un cancer des poumons.

Davinova et collaborateurs (1999), quand à eux, n'ont mis en évidence *in vitro* qu'une activité carcinogène très faible pour Mn(II) et probablement nulle pour Mn(III).

Selon les autorités américaines (EPA, 1998), le manganèse et ses composés ne sont pas considérés comme agents carcinogènes, ni pour l'homme, ni pour l'animal.

Enfin, l'OMS (1981) considère que les données ne sont pas assez nombreuses pour pouvoir se prononcer sur le pouvoir cancérogène du manganèse et de ses dérivés organiques.

TRAITEMENTS DE L'INTOXICATION AU MANGANESE

1. Traitement de l'intoxication aiguë

En cas d'inhalation de vapeurs ou de poussières, le patient doit être amené dans un endroit aéré et être maintenu au chaud et au repos. La respiration artificielle peut s'avérer nécessaire. En cas d'ingestion, le patient doit vomir après avoir bu une grande quantité d'eau. Dans ces deux cas de figure, il est nécessaire de faire appel à un médecin. Enfin, en cas de contact irritant avec les yeux ou la peau, le patient doit se laver à l'eau savonneuse (CSST, 1996 ; NIOSH, 1978).

2. Traitements de l'intoxication chronique

2.1. Traitements symptomatiques

Utilisés chez l'homme, les traitements symptomatiques par la L-dopa (précurseur de la dopamine) ou le 5-hydroxytryptophane (5-HT, précurseur de la sérotonine) visent à compenser les déplétions en neurotransmetteurs dans le cerveau. Cependant, les résultats obtenus restent contradictoires. De plus, très souvent, ces traitements n'agissent pas ou seulement de manière transitoire sur les symptômes extrapyramidaux qui sont les plus invalidants (Calne *et al.*, 1994 ; Cook *et al.*, 1974 ; Huang *et al.*, 1989 ; Ky *et al.*, 1992 ; Lu *et al.*, 1994 ; Mena *et al.*, 1970).

2.2. Détoxification par les chélateurs

2.2.1. Chélateurs utilisés chez l'homme

Les chélateurs actuellement utilisés en clinique sont peu nombreux ; de plus, leurs effets semblent peu encourageants.

Ainsi, l'acide éthylènediamino-N,N,N',N'-tétraacétique (EDTA), le principal chélateur utilisé dans le traitement de l'intoxication au manganèse augmente son excrétion urinaire (Sata *et al.*, 1998), mais n'a que des effets minimes sur les symptômes cliniques, particulièrement dans les cas sérieux ou avancés d'intoxication (Cook *et al.*, 1974 ; Pelnaver, 1955 ; Smyth *et al.*, 1973 ; Tepper, 1961 ; Whitlock *et al.*, 1966 ; Wynter, 1962).

Le 2,3-dimercaptopropanol (BAL), utilisé dans les cas d'intoxications au mercure et à l'arsenic, s'avère inefficace en cas d'intoxication au manganèse (Tepper, 1961 ; Pelnaver, 1955).

Les effets négligeables de l'acide dimercaptosuccinique (DMSA), sur l'excrétion urinaire et le taux sanguin de manganèse chez des travailleurs asymptomatiques exposés à ce métal, n'encouragent pas son utilisation dans ce cas d'intoxication (Rangle, 1995).

Enfin, l'acide *para*-aminosalicylique (PAS) semblerait être efficace pour le traitement des manifestations précoces, mais également dans les cas sérieux d'intoxication (Ky *et al.*, 1992).

2.2.2. Chélateurs testés chez l'animal

Le traitement de l'intoxication par le manganèse, au moyen d'agents chélateurs, a fait l'objet de nombreuses études, notamment au cours des années 70-80. Les auteurs ont testé ces substances *in vitro* et sur l'animal de laboratoire préalablement intoxiqué (chien, lapin, souris et surtout rat).

L'efficacité des agents chélateurs a été estimée au moyen de différents paramètres :

- capacité à réduire la mortalité induite par l'administration d'une dose létale de manganèse
- mobilisation tissulaire de l'élément *in vivo* et *in vitro* (organes étudiés : foie, encéphale, testicule)
- augmentation des excrétions urinaire et fécale de l'élément
- réduction des altérations biochimiques et morphologiques induites par le manganèse

Parmi les différentes substances testées, citons :

- **des acides benzoïques amino et hydroxysubstitués**

Acide 2-hydroxy-4-aminobenzoïque (acide *p*-aminosalicylique = PAS), acide 2-hydroxy-5-aminobenzoïque, acide 2-hydroxybenzoïque (acide salicylique), acide 2-aminobenzoïque, acide 3-aminobenzoïque, acide 4-aminobenzoïque, qui ont montré une certaine efficacité à

mobiliser *in vitro* et *in vivo* le manganèse (Jiang *et al.*, 1992 ; Sanchez *et al.*, 1995 ; Singh *et al.*, 1975 ; Tandon, 1978 ; Tandon & Khandelwal, 1978, 1982 b ; Tandon & Singh, 1975 ; Tandon *et al.*, 1975).

Selon Tandon et Mathur (1976), la présence de groupements fonctionnels contenant deux atomes donneurs d'électrons, identiques ou différents, proches sur le noyau benzénique (comme l'acide salicylique et l'acide 2-aminobenzoïque) serait davantage favorable à la formation de complexes avec le manganèse.

- **des composés comprenant un ou plusieurs groupements SH (thiols) en tant que donneur d'électrons**

2,3-dimercaptopropanol (BAL), acide dimercaptosuccinique (DMSA), acide 2, 3-dimercaptol-1-propanesulfonique (DMPS), DL-pénicillamine, N-acétyl DL-pénicillamine, acide thioglycolique, 2-(hydroxyéthyl)-dithiocarbamate de sodium (DEDTC), isonicopétamidedithiocarbamate (INADTC), diéthylthiocarbamate de sodium (DDC), thioacétamide (Cantilena & Klaassen, 1982 ; Cikrt *et al.*, 1987 ; Khandelwal *et al.*, 1980 ; Singh *et al.*, 1975 ; Tandon & Khandelwal, 1982 a ; Tandon & Singh, 1975 ; Tandon *et al.*, 1975 ; Wieczorek & Oberdörster, 1989 b).

Ces substances possèdent une faible capacité à mobiliser *in vitro* et *in vivo* le manganèse. Cette inefficacité pourrait s'expliquer par leur faible affinité pour le manganèse, entraînant la formation d'un complexe de faible stabilité pouvant se dissocier avant son excrétion. Ce phénomène pourrait modifier la distribution tissulaire du manganèse et éventuellement augmenter sa toxicité (Cantilena & Klaassen, 1982 ; Khandelwal *et al.*, 1980 ; Tandon & Khandelwal, 1982 a et b ; Wieczorek & Oberdörster, 1989). Cette situation est rencontrée dans les cas d'intoxications au mercure et au cadmium, pour lesquelles le traitement au BAL est contre indiqué en raison d'une augmentation des concentrations de ces éléments respectivement dans le cerveau et les reins (Aaseth, 1983).

- **des acides mono et polyaminopolycarboxyliques**

Acide éthylènediamino-N,N,N',N'-tétraacétique (trilon B = complexon III = versène = séquestrène = EDTA), acide diéthylènetriamino-N,N,N',N',N''-pentaacétique (DTPA), acide 1,2-cyclohexylènediaminotétraacétique (CDTA), acide éthylèneglycol-O, O'-bis(2-aminoéthyl-N, N, N', N'-tétraacétique (EGTA), acide N-(2-hydroxyéthyl)-éthylènediaminotriacétique (HEDTA), acide éthylène bis α -imino-O-hydroxyphénylacétique

(EDDHA), acide éthylènediamino-N,N'-diacétique (EDDA), acide triéthylènetétraamino-N,N,N',N',N'',N'''-hexaacétique (TTHA), acide N,N'-di(2-hydroxybenzyl)éthylènediamino-N,N'-diacétique (HBED), acide 3,6-dioxaoctaméthylènediaminotétraacétique (DDTA), acide nitriloacétique (NTA = trilon A = complexon I) (Cantilena & Klaassen, 1982 ; Fried *et al.*, 1959 ; Kaur *et al.*, 1980, 1984 ; Khandelwal *et al.*, 1980 ; Kosai & Boyle, 1956 ; Rodier *et al.*, 1954 ; Sanchez *et al.*, 1995 ; Seth & Husain, 1974 ; Singh *et al.*, 1975 ; Tandon, 1978 ; Tandon & Khandelwal, 1982 a et b ; Tandon & Singh, 1975 ; Tandon *et al.*, 1975 ; Tandon, 1976 ; Wieczorek & Oberdörster, 1989 a et b).

A travers ces différentes études, il apparaît que les acides polyaminopolycarboxyliques, avec leurs groupements fonctionnels aminés (NH₂) et carboxyliques (COOH), possèdent une forte capacité à former, avec le manganèse, des complexes facilement excrétables (Khandelwal *et al.*, 1980 ; Tandon, 1978 ; Tandon & Khandelwal, 1982 a et b ; Wieczorek & Oberdörster, 1989 b).

Parmi les différents acides polyaminopolycarboxyliques testés, l'EDTA présenterait les capacités de mobilisation tissulaire du manganèse les moins intéressantes, tandis que le DTPA semble présenter un bon compromis pour l'ensemble des critères d'efficacité étudiés (Tandon *et al.*, 1975).

- **des acides aminés**

L-cystéine, thréonine, acide aspartique, L-dopa (Sanchez *et al.*, 1995 ; Singh *et al.*, 1975 ; Tandon & Singh, 1975 ; Tandon *et al.*, 1975).

- **des acides carboxyliques**

Acides ascorbique, lactique, citrique, gluconique (Singh *et al.*, 1975 ; Tandon & Khandelwal, 1982 b ; Tandon & Mathur, 1976 ; Tandon & Singh, 1975 ; Tandon *et al.*, 1975).

- **divers autres composés**

Triéthylènetétraamine (TETA), desferrioxamine (DSF), isonicotylhydrazine (INH), 4,5-dihydroxy-1,3-benzène disulfonate de sodium (Tiron), 1,10-phénanthroline (Cikrt *et al.*, 1987 ; Sanchez *et al.*, 1995 ; Tandon & Khandelwal, 1978, 1982 b).

Ces 3 derniers types de composés (acides aminés, carboxyliques et autres composés) seraient capables de chélater le manganèse. Toutefois leur efficacité n'a pas été comparée à celle des autres composés mentionnés, notamment les acides polyaminopolycarboxyliques.

En conclusion, parmi les différentes substances testées, les acides polyaminopolycarboxyliques semblent être les plus efficaces pour chélater le manganèse. L'efficacité d'un agent chélateur semble dépendre de sa structure moléculaire et plus précisément de la nature et de l'arrangement dans la molécule des groupements donneurs d'électrons (carboxyliques, aminés, thiols, hydroxyles) permettant la formation d'une « cage » chimique autour de l'élément.

Parmi les autres facteurs déterminants, citons l'accessibilité du chélateur au site de fixation du manganèse dans l'organisme (influence de la masse moléculaire, de l'encombrement stérique, de la polarité), la complexation du métal avec les différentes biomolécules présentes dans l'organisme, le temps de demi-vie du chélateur dans l'organisme, le délai et la voie d'administration (Aaseth, 1983 ; Tandon, 1978 ; Wieczorek & Oberdörster, 1989 a et b).

L'utilisation thérapeutique des chélateurs reste cependant limitée. Effectivement, comme tout produit actif, ils peuvent être toxiques à partir d'une certaine dose (Tandon & Khandelwal, 1982 b). Cette toxicité peut être due, en partie, à leur action non spécifique qui, à long terme, peut altérer les concentrations et le métabolisme des éléments endogènes, tels que le calcium, le cuivre, le fer, le magnésium et le zinc (Blanusa *et al.*, 1986 ; Cantilena & Klaassen, 1982 ; Ibim *et al.*, 1992 ; Tandon *et al.*, 1984).

PREVENTION ET DIAGNOSTIC

1. Prévention

1.1. Technique

Sur le lieu de travail, des mesures collectives doivent être prises (ventilation, aspiration des poussières, utilisation de procédés à l'humide), lorsque les procédés industriels contribuent à faire augmenter les taux atmosphériques de manganèse (activité minière, concassage des minerais) (INRS, 1997).

Au niveau individuel, différentes dispositions sont nécessaires et notamment le respect d'une hygiène corporelle stricte (douche obligatoire, port de vêtements de travail propres, interdiction de fumer, de boire et de manger sur le lieu de travail), la rotation du personnel au niveau des postes exposés et le port du masque et des gants en cas d'exposition à des concentrations de manganèse dépassant les valeurs réglementaires (Hagenoer & Furon, 1982 ; INRS, 1997).

1.2. Médicale

1.2.1. Visite médicale avant embauche

La neurotoxicité ne se développe pas chez tous les individus exposés au métal, ce qui suggère l'existence de facteurs favorisant le risque manganique. Le but de la visite médicale avant embauche est de les détecter, afin d'évaluer l'aptitude du sujet au travail (Hagenoer & Furon, 1982 ; INRS, 1997).

Parmi les facteurs favorisant le risque manganique et permettant de juger le sujet inapte au travail, citons : l'anémie ferriprive (augmentation de l'absorption du manganèse), l'insuffisance hépatique (diminution de l'élimination du manganèse), les affections

pulmonaires, une fragilité neurologique, l'alcoolisme (potentialisation des effets toxiques du manganèse) (Hagenoer & Furon, 1982).

En raison du passage du manganèse à travers le placenta et dans le lait maternel, les femmes enceintes ou allaitantes doivent occuper un poste peu exposé au manganèse.

1.2.2. Suivi médical régulier pendant la période d'activité

Il est réalisé grâce à la surveillance périodique (au moins une fois par an) des signes précoces de surexposition et d'intoxication (Hagenoer & Furon, 1982 ; INRS, 1997 ; NIOSH, 1978).

• Signes précoces de surexposition

Quatre tests d'exposition sont classiquement utilisés (Haguenoer & Furon, 1982) : dosage du manganèse urinaire (taux normal $< 10 \mu\text{g Mn.L}^{-1}$), dosage du manganèse fécal (taux normal $< 6 \text{ mg Mn pour } 100 \text{ g}$), dosage du manganèse sérique (taux normal $< 3 \mu\text{g Mn.L}^{-1}$), dosage du manganèse dans les cheveux (taux normal $< 4 \text{ mg Mn.kg}^{-1}$ de cheveux).

Malheureusement, le dosage du manganèse dans le sang et les urines n'est pas corrélé de façon satisfaisante avec l'exposition ; s'il permet d'identifier les groupes d'individus exposés professionnellement au manganèse, il ne semble pas être utile pour un suivi individuel, en raison d'une variabilité trop importante (Apostoli *et al.*, 2000 ; Bader *et al.*, 1999).

Concernant la concentration de manganèse dans les cheveux, une augmentation ne reflète pas forcément l'importance de l'exposition, car elle peut être la conséquence d'un dépôt de poussières directement sur les cheveux. De plus, il existe des variations en fonction de l'âge, de la race, de la couleur de cheveux et de la voie d'exposition (Loranger & Zayed, 1995).

• Signes précoces d'intoxication

- recherche des signes cliniques d'un syndrome extrapyramidal à ses débuts, tels que la modification de l'écriture, l'exagération des réflexes ostéo-tendineux, la modification de l'excitabilité neuro-musculaire, les troubles de l'équilibre.
- recherche de modifications sanguines : modification de la lignée rouge (polyglobulie suivie d'une anémie), modification de la lignée blanche (inversion de la formule), diminution de la valeur du rapport sérumalbumine/globuline. Toutefois, selon le National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH, 1978), les modifications sanguines

ne peuvent être considérées comme spécifiques et ne pourront donc pas servir d'élément de diagnostic d'une intoxication au manganèse.

En l'absence de manifestation clinique, il serait également possible de détecter des signes précoces d'intoxication à l'aide de tests neurophysiologiques et neurocomportementaux. Ces signes consisteraient en une diminution des fonctions motrices et de la vitesse de réaction, une augmentation des tremblements et de l'acuité auditive, des déficits de la mémoire, des déficits intellectuels et des troubles de l'humeur (Iregren, 1999 ; Mergler & Baldwin, 1997).

Actuellement, d'autres indicateurs d'effet plus spécifiques au manganèse sont recherchés, en particulier les interférences entre le manganèse et le métabolisme des catécholamines. En raison de l'inaccessibilité du système nerveux, ces signaux biochimiques sont étudiés au niveau de tissus et de matrices biologiques accessibles.

Ainsi, Buchet et collaborateurs (1993) ont observé une tendance à l'augmentation du taux urinaire d'acide homovanillique (HVA, métabolite de la dopamine), chez des travailleurs exposés aux oxydes et aux sels de manganèse. Ai et collaborateurs (1998) ont mis en évidence une augmentation de la concentration urinaire d'acide vanylmandélique (VMA, métabolite de la noradrénaline), chez des travailleurs exposés aux poussières de manganèse. Smargiassi et collaborateurs (1995) ont, quant à eux, observé une tendance à la diminution de l'activité de la monoamine oxydase B (métabolisant la dopamine chez l'homme), dans les plaquettes sanguines de travailleurs d'une usine de fabrication d'alliages.

D'autres auteurs ont eu une approche neuro-endocrinologique et ont pu mettre en évidence une augmentation de la concentration sérique de prolactine, chez des travailleurs exposés aux poussières de manganèse dans une usine de fabrication d'alliages, suggérant une altération de l'inhibition dopaminergique du système tubéro-infundibulaire (Mutti *et al.*, 1996 ; Smargiassi & Mutti, 1999).

2. Diagnostic du manganisme

Le manganisme étant inscrit au tableau n° 39 des maladies professionnelles indemnisables du code de la Sécurité Sociale, il est nécessaire de pouvoir le distinguer du parkinsonisme idiopathique. Heureusement, la ressemblance entre ces deux affections n'est

que superficielle ; d'importantes différences existent, tant au niveau clinique (symptômes), pharmacologique (réponse obtenue avec un traitement à la L-dopa), qu'en imagerie médicale (Calne *et al.*, 1994 ; Kim *et al.*, 1999 a ; Pal *et al.*, 1999).

Différents indices permettent de suspecter un cas de manganisme (Pal *et al.*, 1999) : déclenchement d'un parkinsonisme atypique avec dystonie et tremblement peu fréquents, absence d'amélioration des symptômes après un traitement avec la L-dopa et connaissance d'une exposition (professionnelle ou non) au manganèse.

Le diagnostic est confirmé grâce à l'imagerie médicale (Greger, 1998, 1999). En effet, l'étude de l'imagerie cérébrale en résonance magnétique (IRM) permet de mettre en évidence une intensité de signal importante au niveau du *globus pallidus* correspondant à une accumulation de manganèse chez des patients atteints de manganisme (Nelson *et al.*, 1993 ; Pal *et al.*, 1999). Cette intensité de signal disparaît progressivement, après l'arrêt de l'exposition au manganèse, sans qu'il y ait toutefois amélioration systématique des symptômes (Pal *et al.*, 1999).

DETERMINATION DU MANGANESE

1. Méthodes d'analyses utilisées en recherche

1.1. Activation neutronique (AN)

Cette méthode peut être appliquée à tous les types d'échantillons (solides ou liquides). La méthode est basée sur la détection et la quantification des rayons γ caractéristiques qui sont émis par les isotopes radioactifs, eux-mêmes produits lors du bombardement de l'échantillon par des neutrons dans un réacteur nucléaire. Après bombardement neutronique, le manganèse est activé et forme, par réaction, l'isotope ^{56}Mn quantifiable par comptage radioisotopique. Le dosage de manganèse par cette technique peut être perturbé par l'émission de fer et de magnésium radioactifs (Chiswell & Johnson, 1994 ; Poupon, 1997).

1.2. Fluorescence X

La fluorescence X est une technique d'analyse élémentaire non destructive qui permet l'analyse quantitative et qualitative du manganèse, dans des échantillons solides (Chiswell & Johnson, 1994). Elle permet également le dosage du manganèse en solution à condition de préparer au préalable l'échantillon par lyophilisation (OMS, 1981).

Cette technique est basée sur le fait que les éléments chimiques émettent des radiations caractéristiques, lorsqu'ils sont soumis à des radiations de haute énergie provenant d'un tube à rayons X.

La limite de détection est de 30 ng.L^{-1} dans l'eau (OMS, 1981).

1.3. Spectrométrie d'émission à plasma induit (inductively coupled plasma optical emission spectrometry : ICP)

Cette technique nécessite la minéralisation préalable des échantillons tissulaires. Elle est basée sur la mesure de la lumière émise après excitation des éléments introduits dans un plasma d'argon (passage d'un état fondamental à un état excité). En revenant à leur état initial, les atomes émettent un rayonnement de longueur d'onde spécifique. L'intensité du rayonnement émis est proportionnelle à la concentration de l'élément. Cette technique peut être couplée à la chromatographie (Poupon, 1997).

La limite de détection pour l'eau est de $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Chiswell & Johnson, 1994).

1.4. Spectrométrie d'émission à plasma induit, couplée à la spectrométrie de masse (inductively coupled plasma - mass spectrometry : ICP/MS)

Cette technique est applicable à l'analyse tissulaire, après minéralisation. Elle est basée sur le couplage d'une torche à plasma générant des ions et un spectromètre de masse quadripolaire pour séparer ces ions. Cette séparation est effectuée, pour chaque ion, en fonction du rapport masse atomique/charge (Poupon, 1997).

1.5. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

La CLHP fait intervenir des mécanismes d'échanges soluté/phase mobile/phase stationnaire, basés sur les coefficients de partage ou d'adsorption, selon la nature des phases en présence. L'échantillon doit être totalement soluble dans la phase mobile. La séparation du manganèse est réalisée par échange dynamique d'ions ; elle est suivie d'une détection colorimétrique à 546 nm, après réaction avec le 4-(2-pyridylazo) résorcinol (Poupon, 1997).

1.6. Résonance paramagnétique électronique (RPE)

Cette technique de spectroscopie est fondée sur la résonance de spin des électrons célibataires (corps paramagnétiques). Le principe utilisé consiste à exciter les électrons par une onde émise dans un champ magnétique et à étudier le signal de réponse des électrons. Un certain nombre de métaux de transition sous forme ionique (manganèse) sont

paramagnétiques et la RPE constitue un moyen d'investigation de leurs propriétés électroniques qui dépendent fortement de l'environnement de l'ion au sein de l'édifice moléculaire. Cette technique permet donc une mesure sélective du manganèse lié et du manganèse libre.

La limite de détection se situe entre 20 et 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Chiswell & Johnson, 1994).

2. Méthode utilisable en routine :

Spectrométrie d'absorption atomique électrothermique (SAAE)

Cette méthode de dosage repose sur la loi de Kirchoff, selon laquelle un atome peut absorber les radiations qu'il peut émettre.

Pour une intensité I_0 du rayonnement avant passage et une intensité I après passage de la solution, l'absorbance A , définie par $\log(I_0/I)$, est proportionnelle à la concentration C de l'espèce à doser.

La sensibilité maximale est obtenue avec la raie à 279,5 nm émise par une lampe à cathode creuse.

Cette technique est recommandée pour le dosage du manganèse, dans la plupart des milieux biologiques (Poupon, 1997), dans l'atmosphère (INRS, 1997 ; NIOSH, 1978) et dans l'eau (WHO, 1996).

Signalons que la SAA de flamme possède une limite de détection comprise entre 20 et 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et que celle de la SAA à four graphite est inférieure à 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Chiswell & Johnson, 1994).

REGLEMENTATION

1. Alimentation

Selon l'Organisation Mondiale pour la Santé un apport alimentaire quotidien en manganèse de 8 à 9 mg serait sans danger pour la santé (OMS, 1981).

Aux USA, l'Environmental Protection Agency (EPA) a fixé la dose journalière de référence pour la voie orale (RfD = reference dose) à $0,14 \text{ mg.kg}^{-1}$, soit 10 mg par jour pour un adulte de 70 kg. Cette valeur est une estimation de l'exposition journalière pendant toute la durée d'une vie sans risque pour la santé, incluant les groupes les plus sensibles de la population humaine (EPA, 1998).

2. Eau potable

Au niveau international, l'OMS recommande une valeur guide provisoire de $500 \text{ } \mu\text{g Mn.L}^{-1}$, pour l'eau destinée à la consommation humaine. Toutefois, afin de préserver le goût de l'eau et d'éviter sa coloration, ainsi que les risques de taches sur les appareils, cet organisme préconise une valeur limite de $100 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ (WHO, 1996).

Aux Etats-Unis, l'EPA a établi une valeur de référence (Rf) spécifique au manganèse contenu dans l'eau potable, compte tenu de sa biodisponibilité plus importante par rapport au manganèse contenu dans la nourriture. Cette valeur a été obtenue à partir des résultats d'une étude épidémiologique grecque (Kondakis *et al.*, 1989) et a été fixée à $5 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ par jour (EPA, 1998).

En Europe, le Conseil des Communautés Européennes recommande un niveau guide de $20 \text{ } \mu\text{g Mn.L}^{-1}$, et une concentration maximale admissible de $50 \text{ } \mu\text{g Mn.L}^{-1}$ pour les eaux destinées à la consommation humaine (Directive 80-778 du 15 juillet 1980).

La réglementation française retient cette même valeur limite (Décret 89-3 du 3 janvier 1989).

3. Air

3.1. Population générale

L'Organisation Mondiale de la Santé recommande une valeur guide de $1 \mu\text{g.m}^{-3}$, pour la totalité du manganèse en suspension dans l'air (WHO, 1987).

Aux Etats-Unis, l'EPA a fixé une concentration de référence (R_fC) à $0,05 \mu\text{g.m}^{-3}$, pour la fraction respirable de manganèse (diamètre aérodynamique moyen $< 5 \mu\text{m}$) (EPA, 1998).

3.2. Locaux de travail

Sur le lieu de travail, une limite d'exposition égale à $300 \mu\text{g Mn.m}^{-3}$ (particules respirables) est recommandée par l'OMS (WHO, 1986).

Aux Etats-Unis, l'ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) a fixé, en 1996, à $200 \mu\text{g.m}^{-3}$ la valeur limite de moyenne d'exposition au manganèse et à ses composés inorganiques (INRS, 1997). Ces valeurs correspondent aux concentrations en manganèse auxquelles la plupart des travailleurs peuvent être exposés, pendant une journée de travail de 8 heures ou une semaine de 40 heures, sans effet nocif pour la santé.

En France, le ministère chargé du travail a fixé, de façon indicative, à $1000 \mu\text{g.m}^{-3}$ la valeur limite de moyenne d'exposition pour les fumées de manganèse (INRS, 1993).

Objectifs de l'étude

Sur les bases de cette analyse bibliographique, il apparaît que les risques d'intoxication (essentiellement chronique) par le manganèse s'avèrent être encore d'actualité. Effectivement, si les risques professionnels semblent relativement bien maîtrisés, tout au moins pour les pays développés, en raison d'une très nette amélioration des méthodes de prévention (détection plus fine des symptômes subcliniques avant l'apparition des effets toxiques), les risques environnementaux subsistent très fortement (contamination de l'air, des sols, des eaux et des végétaux à proximité de sites industriels et des sites reconvertis ; développement de l'utilisation de MMT dans l'essence sans plomb...).

Actuellement, il ne semble pas exister de traitement suffisamment efficace de l'intoxication par le manganèse. Ainsi, l'administration de L-dopa ne permet d'agir que sur les symptômes neurologiques liés au manganisme (compensation de la déplétion en dopamine). Quant aux chélateurs, utilisés jusqu'ici pour tenter de détoxiquer l'organisme (EDTA, BAL, DMSA...), ces substances s'avèrent peu efficaces dans les cas sévères d'intoxication (Ky *et al.*, 1992 ; Rangle, 1995). De ce fait, le manganisme reste considéré comme une maladie n'ayant pas de traitement spécifique (Ky *et al.*, 1992).

Notre étude s'inscrit dans la continuité de travaux s'intéressant à la recherche de nouveaux chélateurs du manganèse, potentiellement plus efficaces, testés *in vivo* sur des animaux préalablement intoxiqués (Cikrt *et al.*, 1987 ; Jiang *et al.*, 1992 ; Khandelwal *et al.*, 1980 ; Sánchez *et al.*, 1995 ; Scheuhammer & Cherian, 1982 ; Singh *et al.*, 1975 ; Tandon, 1978 ; Tandon & Khandelwal, 1978 ; Tandon & Mathur, 1976 ; Tandon & Singh, 1975 ; Tandon *et al.*, 1975 ; Wieczorek & Oberdörster, 1989 a et b).

En raison de la grande hétérogénéité au niveau des protocoles d'intoxication précédemment élaborés (durée d'intoxication, voie d'administration, dose de manganèse, organes prélevés...), il nous a paru nécessaire de mettre au point, dans un premier temps, un protocole permettant d'obtenir une bonne rétention tissulaire du manganèse, avant de tester l'efficacité chélatrice des différents composés sélectionnés, dans les mêmes conditions d'intoxication.

Ainsi, une exposition journalière subchronique (5 semaines) au chlorure de manganèse ($MnCl_2$) a été retenue, cette forme chimique devant permettre une rétention tissulaire satisfaisante (Cahill *et al.*, 1980 ; Gianutsos *et al.*, 1985 ; Roels *et al.*, 1997). Sur ce protocole

de base, 2 voies d'administration ont été employées : la voie intrapéritonéale (i.p.) couramment utilisée dans les études de toxicité et la voie orale (p.o.), rencontrée dans les cas de surexpositions accidentelles. La dose i.p. journalière administrée (6 mg Mn.kg^{-1} de poids corporel) a été retenue en fonction de travaux antérieurs entrepris sur des chélateurs du manganèse (Seth & Husain, 1974 ; Singh *et al.*, 1975 ; Singh *et al.*, 1974 ; Tandon, 1973 ; Tandon & Mathur, 1976 ; Tandon & Singh, 1975 ; Tandon *et al.*, 1975). La dose p.o. journalière (75 mg Mn.kg^{-1} de poids corporel) a été déterminée de manière à obtenir une quantité de manganèse absorbée proche de celle obtenue avec la voie i.p. ; le calcul est basé sur les travaux de Davis et collaborateurs (1993) qui ont estimé un pourcentage d'absorption du manganèse d'environ 8 % chez le rat et en admettant un taux d'absorption égal à 100 % lorsque le manganèse est administré par voie i.p.

La distribution du manganèse a été étudiée sur une vingtaine d'organes, ainsi que sur le sang et le plasma. Les distributions du fer, du zinc, du cuivre, du phosphore, du magnésium et du calcium ont également été étudiées, afin de mettre en évidence d'éventuelles interactions entre le manganèse et d'autres éléments endogènes.

Les résultats obtenus au cours de cette mise au point, et notamment l'observation d'une faible rétention tissulaire suite à l'intoxication orale, nous ont conduit à vérifier le taux d'absorption du manganèse, initialement retenu sur les données bibliographiques pour déterminer la dose orale administrée. Cette vérification a été réalisée à l'aide de la technique de perfusion intestinale *in situ*.

Du fait de l'importance de la neurotoxicité du manganèse, rapportée dans la littérature, et de l'observation d'une accumulation de cet élément dans le système nerveux central, au cours de notre première étude, il a été décidé de vérifier si cette accumulation était associée à l'apparition d'atteintes neurologiques (modifications du comportement et du taux de dopamine, lésions anatomiques). L'objectif était de tester ultérieurement les chélateurs potentiels, non seulement pour leur effet mobilisateur, mais aussi pour leur influence vis-à-vis de ces éventuelles atteintes neurologiques.

La recherche proprement dite de nouveaux chélateurs du manganèse a ensuite été entreprise selon deux étapes successives : une préselection *in vitro* (évaluation des capacités à mobiliser le manganèse lié aux protéines sériques) a été réalisée, sur différents composés choisis sur les

bases de la littérature et sur leur structure chimique (présence de groupements fonctionnels favorables à la complexation du manganèse). Les molécules ainsi sélectionnées *in vitro* ont ensuite été testées *in vivo*, sur la base du protocole précédemment établi (administration i.p. de chlorure de manganèse, durant 5 semaines, à raison de 6 mg Mn.kg⁻¹ de poids corporel par jour).

Première partie expérimentale

MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE D'INTOXICATION AU CHLORURE DE MANGANESE, CHEZ LE RAT

1. Matériel et méthodes

1.1. Réactifs

- chlorure de manganèse tétrahydraté, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Fluka, France)
- chlorure de sodium, NaCl (Aldrich, France)
- acide nitrique suprapur, HNO_3 à 65% (Merck, France)
- eau ultra pure (Milli-Q, Millipore)
- pentobarbital sodique (Sanofi Santé Animale, France)
- héparine sodique 5000 UI.mL⁻¹ (Panpharma, France)

1.2. Origine des animaux et conditions d'hébergement

Les expériences sont réalisées sur des rats albinos mâles de souche Wistar provenant du centre d'élevage Iffa-Credo (L'Arbresle, France).

Les animaux sont hébergés à l'animalerie centrale de la Faculté de Médecine, dans des cages individuelles standard en plastique (43 x 28 x 15 cm). La salle qu'ils occupent est maintenue à une température de 22 - 23 °C et est soumise à un cycle de lumière constant (alternance de 12 heures d'obscurité et 12 heures d'éclairement).

A leur arrivée et avant le début de toute expérimentation, les animaux sont acclimatés au minimum pendant 5 jours. Pendant cette période, ils disposent de nourriture (croquettes standard M20, Extra-Labo, Provins, France) et d'eau de boisson *ad libitum*.

1.3. Protocole expérimental

Des rats pesant 345 ± 20 g sont répartis au hasard en 4 groupes égaux ($n = 8$).

Les animaux du groupe traité par voie i.p. reçoivent des injections journalières de chlorure de manganèse dissous dans du chlorure de sodium 0,9 %, à raison de 6 mg Mn.kg^{-1} de poids corporel, 5 jours par semaine pendant 5 semaines. Le volume injecté est de 0,5 mL pour 100 g de poids corporel.

Les animaux du groupe traité par voie orale sont intubés chaque jour (sonde gastrique) avec du chlorure de manganèse dissous dans de l'eau ultra-pure, à raison de 75 mg Mn.kg^{-1} de poids corporel, 5 jours par semaine, pendant 5 semaines. Le volume administré est de 1 mL pour 300 g de poids corporel.

A chaque groupe traité correspond un groupe témoin recevant le solvant (NaCl 0,9 % ou eau ultra pure), dans les mêmes conditions expérimentales.

Les animaux sont pesés chaque jour et les doses à administrer sont ajustées en conséquence.

Les solutions de chlorure de manganèse sont préparées extemporanément.

L'urine et les fèces sont récupérées pendant 24 heures, à dates précises : 2 jours avant le début de l'intoxication (VR), pendant l'intoxication (J1, J6, J14, J22, J30) et pendant la période de repos suivant l'intoxication (PR3, PR5, PR12). Pour se faire, les animaux sont maintenus en cages à métabolisme individuelles (figure 1) pendant 24 h, immédiatement après l'administration des solutions ; ils sont soumis à une diète solide afin d'éviter la contamination de l'urine et des fèces.

Les fèces sont pesées et solubilisées avec de l'acide nitrique. Cette solubilisation est accélérée par chauffage sur un bain de sable de Fontainebleau (environ 70°C).

L'urine est additionnée d'acide nitrique suprapur ($10 \mu\text{L}$ pour 5 mL d'urine), afin d'éviter la précipitation des divers éléments.

Après les différents traitements, une période de repos de 2 semaines est respectée, de manière à permettre l'élimination du manganèse non fixé dans les tissus.

Les rats sont ensuite anesthésiés par injection i.p. de pentobarbital sodique à raison de 60 mg.kg^{-1} de poids corporel.

Le sang est prélevé dans des tubes héparinés par ponction dans la veine abdominale à l'aide d'un dispositif de perfusion à ailettes (Microflex, Vigon, France).

Une partie est immédiatement centrifugée à 3000 g pendant 3 minutes afin de récupérer le plasma. Les échantillons plasmatiques et sanguins sont alors conservés à 4°C dans des tubes en polypropylène.

Les rats anesthésiés sont ensuite sacrifiés par section du muscle cardiaque et différents organes (cerveau, moelle épinière, fémur, moelle osseuse, cœur, poumons, foie, rate, pancréas, reins, glandes surrénales, testicules, œsophage, estomac, duodénum, jéjunum, iléon, colon, quadriceps crural, poils et peau, tissu adipeux) sont rapidement prélevés, pesés et conservés à - 18°C dans des tubes en polypropylène.

Avant le dosage des différents éléments, les tissus sont décongelés et solubilisés avec de l'acide nitrique, à une température proche de 70°C (bain de sable de Fontainebleau).

1.4. Déterminations analytiques

Les concentrations de manganèse, fer, zinc, cuivre, phosphore, magnésium et calcium dans les différents échantillons sont déterminées par spectrophotométrie d'émission atomique à plasma d'argon (SEA – DCP), à l'aide d'un spectrophotomètre Spectra Span V (Spectrametrics). A noter que la concentration plasmatique de fer n'est pas déterminée, en raison d'une possibilité de contamination par hémolyse lors du prélèvement sanguin et de la centrifugation.

La source d'excitation utilisée dans cette méthode de dosage est une torche à plasma d'argon (excitation à haute énergie). Un arc électrique est produit entre trois électrodes (deux anodes en graphite et une cathode en tungstène), ce qui permet d'atteindre une température de 7 000 à 8 000 °C. Cette température permet la rupture de toute liaison chimique. Ainsi, tout l'élément à doser, contenu dans l'échantillon, est présent sous forme atomique ; le dosage ainsi réalisé permet de déterminer l'élément dans sa totalité.

L'étalonnage du spectrophotomètre est réalisé à l'aide de deux solutions correspondant à un "point haut" (à une concentration en élément à doser maximum) et à un "point bas" (à une concentration en élément à doser nulle).

Si nécessaire, les échantillons sont dilués avec de l'eau ultra pure avant dosage. La dilution est fonction de l'élément dosé (richesse dans l'échantillon), de la méthode de dosage (zone de linéarité de la réponse, limite de détection) et de l'échantillon lui-même (éventuelles interactions avec d'autres éléments présents dans l'échantillon).

Les différentes caractéristiques spectrophotométriques des éléments dosés dans notre étude figurent dans le tableau 2.

1.5. Analyse statistique

Après vérification de la normalité des distributions et de l'homogénéité des variances (test de Bartlett), les comparaisons entre les groupes traité et témoin, pour chaque voie d'administration, sont réalisées grâce au test t non apparié de Student. L'hypothèse nulle est rejetée lorsque la probabilité d'occurrence ne dépasse pas 5 % ($p < 0,05$).

2. Résultats

2.1. Evolution pondérale pendant l'exposition au manganèse et poids des organes au moment du sacrifice

2.1.1. Voie i.p.

L'exposition au manganèse entraîne un retard significatif de la prise de poids corporel, à partir du 3^{ème} jour de traitement (J3) ; ce retard n'est pas rattrapé pendant les 2 semaines de repos (figure 2).

Concernant les organes, une diminution du poids des testicules et du fémur (respectivement - 15 % et - 14 %, $p < 0,01$), ainsi qu'une augmentation du poids des surrénales (+ 19 %, $p < 0,05$) est observée chez les rats exposés au manganèse (résultats reportés en annexe 1).

2.1.2. Voie p.o.

L'exposition au manganèse entraîne un retard significatif de la prise de poids corporel à partir le 10^{ème} jour de traitement (J10), mais, à partir du 7^{ème} jour de repos (PR7), ce retard est rattrapé (figure 3).

L'exposition au manganèse n'a pas d'effet significatif sur la masse des organes, au moment du sacrifice (résultats reportés en annexe 2).

2.2. Excrétion du manganèse et des autres éléments essentiels étudiés

2.2.1. Voie i.p.

L'excrétion urinaire du manganèse augmente significativement pendant toute la durée de l'intoxication (augmentation d'un facteur compris entre 4 (J30) et 13 (J14), par rapport au groupe témoin), pour se normaliser pendant la période de repos (figure 4a).

Par contre, les excrétions urinaires des autres éléments étudiés (Fe, Zn, Cu, P, Mg et Ca) ne sont pas significativement modifiées ou seulement de façon ponctuelle et modérée (résultats reportés en annexe 3).

L'excrétion fécale du manganèse augmente significativement à partir du 14^{ème} jour d'intoxication (augmentation d'un facteur voisin de 2 à J14, J22 et J30, par rapport au groupe témoin), pour se normaliser pendant la période de repos (figure 4b)

2.2.2. Voie p.o.

L'excrétion urinaire de manganèse augmente pendant toute la durée de traitement (augmentation d'un facteur compris entre 10 (J1) et 28 (J30), par rapport au groupe témoin); elle se normalise pendant la période de repos (figure 5a).

Dans le cas des autres éléments étudiés (Fe, Zn, Cu, P, Mg et Ca), aucune perturbation notable n'est constatée ou seulement de façon ponctuelle et modérée (résultats reportés en annexe 4).

L'excrétion fécale du manganèse augmente significativement à partir du 6^{ème} jour de traitement (augmentation d'un facteur compris entre 9,5 à J6 et 16 à J22, par rapport au groupe témoin), pour se normaliser pendant la période de repos (figure 5b).

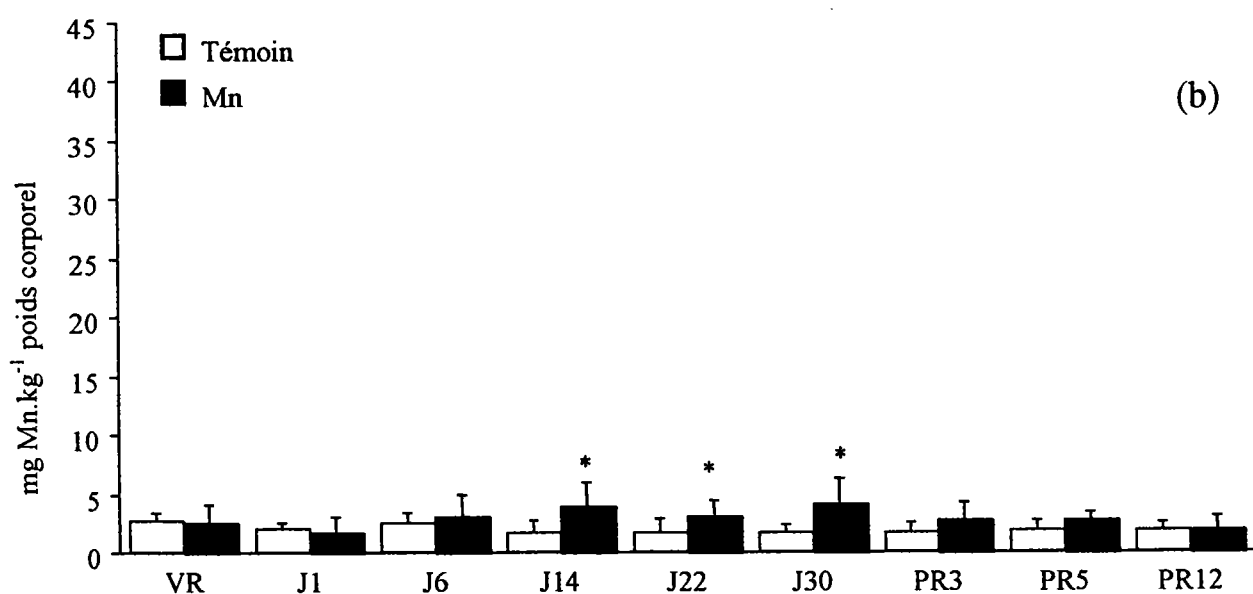
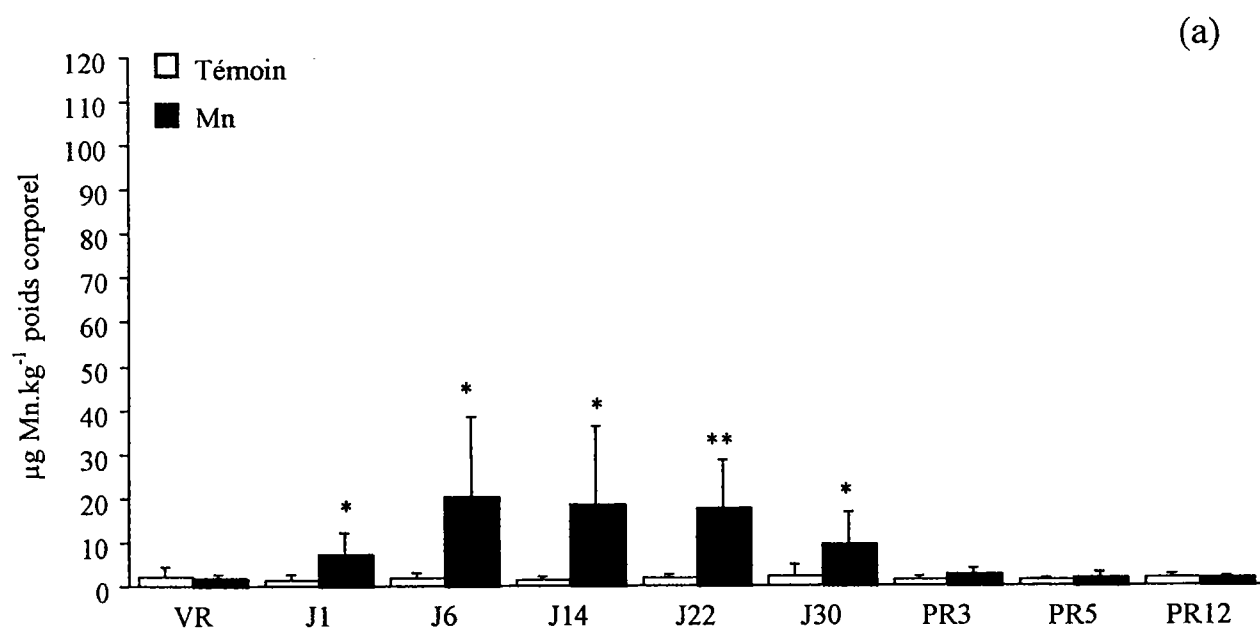


Figure 4 : Excrétions urinaire (a) et fécale (b) du manganèse (moyenne $\pm$ écart-type).

Rats intoxiqués par injections intrapéritonéales

VR : valeur de référence ; J: intoxication par le manganèse ; PR : période de repos

Significativement différent du groupe témoin : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

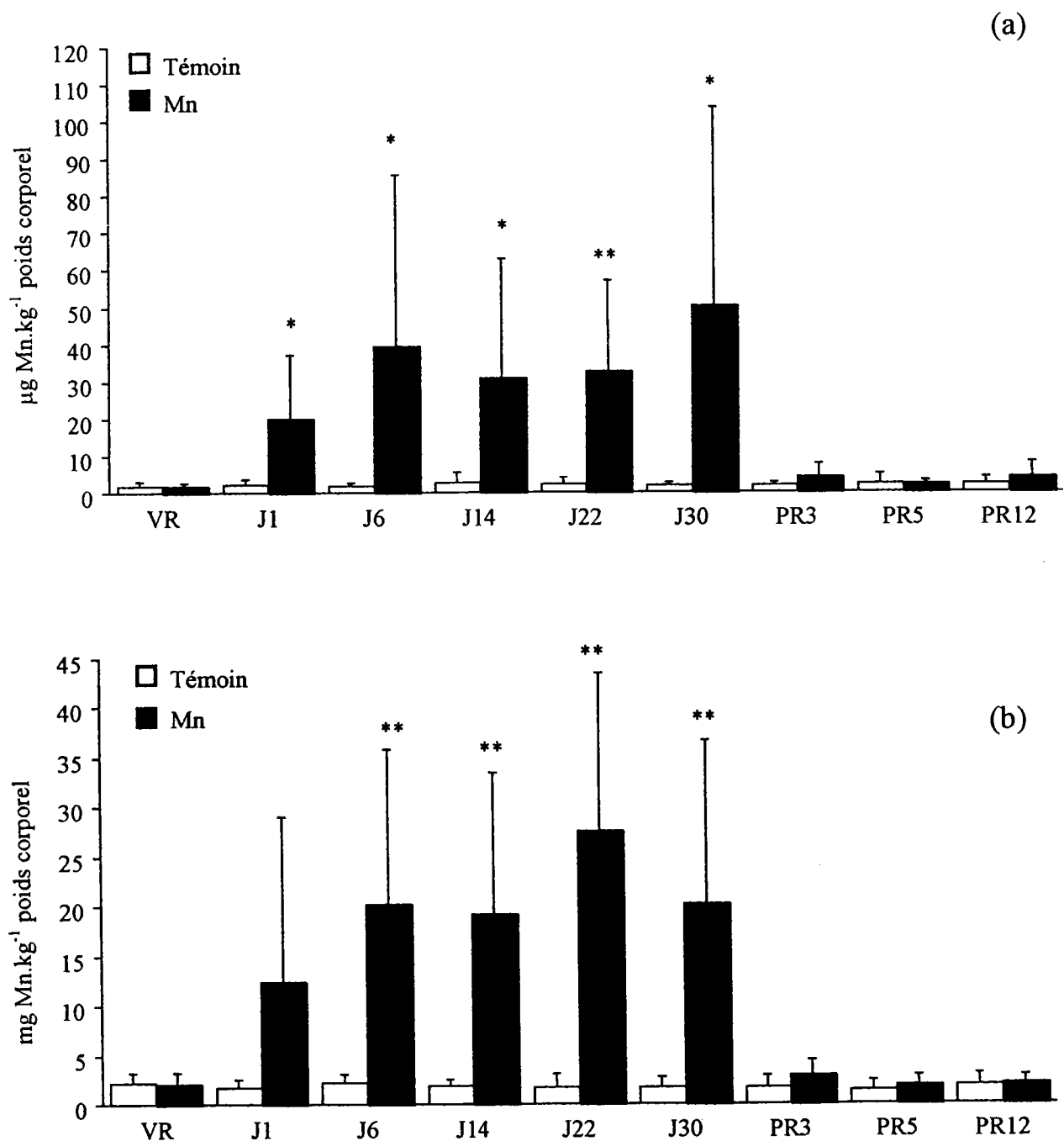


Figure 5 : Excrétions urinaire (a) et fécale (b) du manganèse (moyenne $\pm$ écart-type).

Rats intoxiqués par intubations gastriques.

VR : valeur de référence ; J: intoxication par le manganèse ; PR : période de repos

Significativement différent du groupe témoin : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

2.3. Concentrations sanguine et plasmatique des différents éléments étudiés, au moment du sacrifice

2.3.1. Voie i.p.

L'exposition au manganèse n'entraîne aucune modification des concentrations sanguine et plasmatique de l'ensemble des éléments étudiés, exception faite d'une importante augmentation de la concentration du manganèse sanguin (groupe témoin : $10,3 \pm 2,4 \mu\text{g.L}^{-1}$; groupe Mn : $191 \pm 39 \mu\text{g.L}^{-1}$; $p < 0,0001$) (résultats reportés en annexe 5).

2.3.2. Voie p.o.

L'exposition au manganèse n'entraîne aucune modification des concentrations sanguine et plasmatique de l'ensemble des éléments étudiés, exception faite d'une augmentation de la concentration plasmatique de calcium (+ 14,5 % par rapport au groupe témoin ; $p < 0,001$) (résultats reportés en annexe 6).

2.4. Concentrations tissulaires du manganèse et des autres éléments étudiés, au moment du sacrifice

2.4.1. Voie i.p.

- **Distribution du manganèse**

Après 5 semaines de traitement i.p., la concentration en manganèse est significativement augmentée dans tous les organes, à l'exception du foie, des glandes surrénales et de l'œsophage (tableau 3).

Les modifications statistiquement les plus marquées ($p < 0,0001$) sont obtenues dans le fémur (x 27,6), la rate (x 3,5), la moelle épinière (x 2,3), le cerveau (x 2,1), le muscle squelettique (x 1,7), les reins (x 1,6), les poumons (x 1,5) et le cœur (x 1,4).

- **Distribution des autres éléments**

Les effets statistiquement significatifs sont reportés dans le tableau 4 ; l'ensemble des résultats est reporté en annexe 7.

Tableau 4 : Modifications des concentrations tissulaires des autres éléments étudiés, chez les rats intoxiqués par injections intrapéritonéales ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids frais).

Eléments	Organes	Témoin	Mn	% de variation
Fe	Pancréas	21 $\pm$ 4	55 $\pm$ 17 ^{##}	+ 162 %
	Colon	9,2 $\pm$ 1,2	12,9 $\pm$ 1,7 [#]	+ 40 %
	Duodénum	19,6 $\pm$ 1,6	23,0 $\pm$ 3,1 *	+ 17 %
	Estomac	16,8 $\pm$ 1,6	19,3 $\pm$ 2,2 *	+ 15 %
	Rate	933 $\pm$ 207	601 $\pm$ 114 **	- 36 %
	Reins	74 $\pm$ 6	64 $\pm$ 4 **	- 14 %
	Cœur	67 $\pm$ 4	60 $\pm$ 5 **	- 10 %
Zn	Estomac	19,4 $\pm$ 1,5	21,3 $\pm$ 1,9 *	+ 10 %
Cu	Colon	1,21 $\pm$ 0,13	1,35 $\pm$ 0,10 *	+ 12 %
	Reins	7,4 $\pm$ 1,8	5,6 $\pm$ 0,7 *	- 24 %
	Cœur	5,0 $\pm$ 0,3	4,6 $\pm$ 0,3 **	- 8 %
P	Peau/poils	0,61 $\pm$ 0,05	0,73 $\pm$ 0,08 **	+ 20 %
Mg	Reins	312 $\pm$ 21	338 $\pm$ 23 *	+ 8 %
Ca	Testicules	68 $\pm$ 11	97 $\pm$ 33 *	+ 43 %
	Reins	108 $\pm$ 7	119 $\pm$ 12 *	+ 10 %
	Rate	63 $\pm$ 4	68 $\pm$ 4 *	+ 8 %

Résultats exprimés en moyenne $\pm$ écart-type.

Significativement différent du groupe témoin : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; [#] $p < 0,001$; ^{##} $p < 0,0001$.

De nombreuses modifications de la distribution tissulaire des autres éléments étudiés sont observées, en particulier pour le fer.

Ainsi, la concentration en fer augmente significativement dans le pancréas (+ 162 %), le colon (+ 40 %), le duodénum (+ 17 %) et l'estomac (+ 15 %), tandis qu'elle diminue dans la rate (- 36 %), les reins (- 14 %) et le cœur (- 10 %).

Concernant la concentration en zinc, seule une augmentation est observée dans l'estomac (+ 10 %).

La concentration en cuivre augmente significativement dans le colon (+ 12 %), tandis qu'elle diminue dans les reins (- 24 %) et le cœur (- 8 %).

La concentration en phosphore augmente significativement dans la peau et les poils (+ 20 %).

Dans le cas du magnésium, une augmentation significative est observée dans les reins (+ 8 %).

Enfin, la concentration en calcium augmente significativement dans les testicules (+ 43 %), les reins (+ 10 %) et la rate (+ 8 %).

2.4.2. Voie p.o.

- **Distribution du manganèse**

Après 5 semaines de traitement p.o., la concentration en manganèse est significativement augmentée dans tous les organes, à l'exception du foie, du jéjunum, de l'iléon, et du tissu adipeux (tableau 5).

Les modifications statistiquement les plus marquées ($p < 0,0001$) sont observées dans le fémur (x 4,0), l'estomac (x 2,4), la moelle épinière (x 1,5), le muscle squelettique (x 1,5) et la rate (x 1,3).

A noter une forte augmentation dans les poumons (x 48,3), statistiquement moins marquée ($p < 0,01$) en raison d'une grande variabilité intra-groupe.

- **Distribution des autres éléments**

Les effets statistiquement significatifs sont reportés dans le tableau 6, l'ensemble des résultats est reporté en annexe 8.

Si aucun effet significatif n'est constaté sur la distribution tissulaire du phosphore, quelques modifications sont observées pour les autres éléments étudiés.

Ainsi, une diminution significative de la concentration en fer est obtenue dans les glandes surrénales (- 19 %) et dans le cerveau (- 11 %).

La concentration en zinc augmente significativement dans les glandes surrénales (+ 10 %).

Dans le cas du cuivre, on observe une augmentation significative dans le tissu adipeux (+ 26 %), le foie (+ 18 %) et le pancréas (+ 13 %).

La concentration en magnésium, quant à elle, augmente significativement dans l'œsophage (+ 11 %). Enfin, celle en calcium augmente significativement dans l'estomac (+ 49 %).

Tableau 6 : Modifications des concentrations tissulaires des autres éléments étudiés chez les rats intoxiqués par intubations gastriques ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids frais).

Eléments	Organes	Témoin	Mn	% de variation
Fe	Surrénales	128 $\pm$ 18	104 $\pm$ 5 **	- 19 %
	Encéphale	17,3 $\pm$ 1,4	15,4 $\pm$ 1,9 *	- 11 %
Zn	Surrénales	12,9 $\pm$ 0,6	14,2 $\pm$ 1,1 *	+ 10 %
Cu	Tissu adipeux	0,19 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,06 *	+ 26 %
	Foie	3,8 $\pm$ 0,4	4,5 $\pm$ 0,7 *	+ 18 %
	Pancréas	0,90 $\pm$ 0,13	1,02 $\pm$ 0,09 *	+13 %
Mg	Oesophage	182 $\pm$ 11	203 $\pm$ 6 **	+ 11 %
Ca	Estomac	146 $\pm$ 36	218 $\pm$ 47 **	+ 49 %

Résultats exprimés en moyenne $\pm$ écart-type.

Significativement différent du groupe témoin : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3. Discussion

Ce travail a été entrepris dans le but de mettre au point un protocole d'intoxication, permettant l'observation d'une accumulation tissulaire de manganèse, en vue d'essais ultérieurs de détoxification par des chélateurs appropriés.

L'intoxication subchronique au chlorure de manganèse a été effectuée sur 5 semaines par voie intrapéritonéale (6 mg Mn.kg⁻¹ de poids corporel par jour) et par voie orale (75 mg Mn.kg⁻¹ de poids corporel par jour), ces deux concentrations devant permettre une absorption de manganèse quantitativement similaire.

Dans le cas du traitement i.p. journalier, la comparaison de nos résultats avec les travaux antérieurs reste difficile, en raison de la grande hétérogénéité dans les protocoles expérimentaux utilisés. Ainsi, suite à un traitement journalier pendant 30 jours, à raison de 3 mg Mn/kg de poids corporel, Scheuhammer et Cherian (1982, 1983) observent, tout comme nous, une forte accumulation de manganèse dans le fémur ; par contre, ils mentionnent également une forte accumulation dans le pancréas, considérant cet organe comme une cible spécifique, ce que ne confirment pas nos travaux. De plus, contrairement à nous, ces auteurs constatent une élimination spontanée du manganèse accumulé dans le muscle squelettique, les testicules et les reins, 2 semaines après la fin du traitement.

Enfin, s'ils n'observent pas d'accumulation de manganèse dans le foie, 48 heures après la fin du traitement, une accumulation différée au bout de 2 semaines est constatée. Tandon et Mathur (1976), ainsi que Murthy et collaborateurs (1981 b) observent, quant à eux, une augmentation du manganèse hépatique, 48 heures après la fin du traitement avec une dose comparable à la nôtre, suivie d'une diminution au bout de 8 jours. Enfin, Jiang et collaborateurs (1992) constatent une augmentation du manganèse hépatique, 3 semaines après la fin d'un traitement mené sur 60 et 84 jours, à raison de $4,16 \text{ mg Mn.kg}^{-1}$ de poids corporel par jour.

Concernant l'accumulation de manganèse dans le cerveau, nos résultats confirment ceux précédemment obtenus avec des doses administrées inférieures (3 et $4,16 \text{ mg Mn.kg}^{-1}$ de poids corporel par jour) et des durées de traitement différentes (30, 60 et 84 jours) (Jiang *et al.*, 1992 ; Scheuhammer & Cherian, 1982 ; Scheuhammer & Cherian, 1981).

A noter l'accumulation non négligeable de manganèse au niveau du tractus intestinal qui doit être considérée avec prudence, le système digestif étant au contact direct avec l'élément administré en i.p. Ceci peut également expliquer l'aspect adhérent des intestins constaté à l'autopsie, mais également l'atteinte macroscopique des lobes hépatiques, tout particulièrement du lobe gauche situé juste sous le péritoine (bords gonflés, lobes rétractés, adhésifs, durcis).

Les données bibliographiques, relatives à des intoxications par voie orale sont peu nombreuses et donc les comparaisons avec nos résultats restent limitées. Il est toutefois intéressant de mentionner les travaux de Roels et collaborateurs (1997) qui ont également constaté une accumulation de manganèse dans le cerveau, après 4 semaines de traitement p.o. à raison de $24,3 \text{ mg Mn.kg}^{-1}$ de poids corporel par semaine. De même, Nikolova (1993) a observé une telle accumulation, après 60 jours de traitement, à raison de $150 \text{ mg Mn.kg}^{-1}$ de poids corporel tous les 2 jours ; cette accumulation a persisté plus de 30 jours après la fin de l'exposition.

Ce même auteur mentionne une accumulation hépatique réversible dans les 30 jours suivant la fin du traitement ; l'existence d'une telle réversibilité pourrait expliquer l'absence d'effet sur le foie constatée dans notre étude.

A noter la forte accumulation de manganèse dans les poumons, et dans une moindre mesure au niveau de la peau et des poils, très probablement liée au traitement par gavage (possibles régurgitations) et qui doit donc être considérée avec grande prudence.

La comparaison des deux voies d'administration (i.p. et p.o.) met en évidence que, quelle que soit la voie d'administration du manganèse, le foie ne paraît pas accumuler durablement cet élément. Le fémur, par contre, semble être le principal organe cible.

Cependant, en considérant l'ensemble des organes étudiés, une accumulation de manganèse plus importante est observée avec la voie i.p. Ce résultat paraît logique dans la mesure où la barrière gastro-intestinale est court-circuitée ; la solution de manganèse entre directement en contact avec les différents organes localisés dans la cavité abdominale et passe dans la circulation sanguine. Par contre, administré par voie orale, le manganèse est absorbé par les intestins, puis transporté jusqu'au foie avant de passer en partie dans la circulation générale (Aschner, 1999).

La quantité exacte de manganèse absorbée par la voie orale, dans nos conditions expérimentales, reste difficilement déterminable. En effet, différents auteurs ont montré, qu'après un certain temps de latence, le taux d'absorption intestinale de manganèse diminue en réponse à l'augmentation de l'apport alimentaire en élément (Abrams *et al.*, 1976 a et b ; Roels *et al.*, 1997 ; Weigand *et al.*, 1986). De plus, le jeûne, nécessaire dans notre étude pendant les phases de récupération des urines et des fèces, semblerait également avoir une influence ; ainsi, Lee et Johnson (1988) ont montré que les rats à jeun absorbent 4 fois plus le manganèse à partir d'une solution de chlorure de manganèse que les rats qui ont été nourris préalablement.

Les modifications des excréctions urinaire et fécale du manganèse, constatées au cours des deux traitements (i.p. et p.o.), confortent l'observation d'une fixation tissulaire plus importante à la suite du traitement i.p.

Ainsi, l'excrétion urinaire, reflet de la fraction métallique absorbée mais non retenue par l'organisme est augmentée de manière relativement comparable dans les 2 traitements ; par contre, l'excrétion fécale, reflétant essentiellement la fraction non absorbée, est plus importante dans le cas du traitement oral.

L'exposition au manganèse par voie i.p. semble, par ailleurs, affecter davantage l'état général des animaux. En effet, ces derniers accusent un retard de prise pondérale qui, contrairement aux rats traités par la voie orale, n'est pas rattrapé pendant la période de repos. Ce retard serait

attribuable, au moins en partie, à une diminution de la consommation alimentaire pendant l'exposition au manganèse, phénomène qui est plus marqué chez les rats traités par voie i.p. L'examen du poids des organes, et plus particulièrement du fémur, suggère un ralentissement de la croissance du squelette, après traitement i.p.

La présence de manganèse dans le sang et non dans le plasma (annexe 5), présence significative uniquement après traitement i.p. et ceci après 2 semaines de repos, laisse à penser que cet élément est bloqué au niveau de certains éléments sanguins, tels que le noyau porphyrinique de l'hémoglobine, confirmant ainsi les travaux de Scheuhammer et Cherian (1983) et ceux de Borg et Cotzias (1958). Une compétition entre le fer et le manganèse, mentionnée dans la littérature (Diez-Ewald *et al.*, 1968 ; Rossander-Hultén *et al.*, 1991 ; Thomson *et al.*, 1971) est donc fort probable. La disparition progressive du manganèse sanguin serait alors étroitement liée à la durée de vie et au renouvellement des érythrocytes. Cette hypothèse est bien corrélée avec l'observation, après traitement i.p., d'une diminution de fer et d'une accumulation de manganèse dans la rate, organe où a lieu la destruction des érythrocytes âgés, et d'une accumulation de manganèse dans la moelle osseuse, encore appelée «moelle rouge» en raison de sa richesse en cellules sanguines et qui joue un rôle important dans l'hématopoïèse.

Par contre, à la différence de la rate, aucune modification notable de la concentration en fer n'a pu être observée dans le sang et dans la moelle osseuse, probablement en raison de la grande richesse de ces tissus en fer, comme en témoignent les rapports Fe/Mn calculés à partir des concentrations exprimées en mmol.L⁻¹ pour le sang et en mmol.g⁻¹ pour la moelle osseuse (Fe/Mn témoins sang = 43 000 ; Fe/Mn intoxiqués sang = 2 115 ; Fe/Mn témoins moelle osseuse = 472 ; Fe/Mn intoxiqués moelle osseuse = 92).

En admettant que Mn²⁺ prenne la place de Fe²⁺ dans l'hémoglobine et en supposant que le complexe ainsi formé soit incapable d'assurer le transport d'O₂, la prise en compte des rapports sanguins Fe/Mn nous permet de conclure à l'impossibilité d'observer une quelconque perturbation du transport d'O₂ dans le sang.

Par contre, dans les tissus, où les rapports Fe/Mn sont généralement beaucoup plus faibles, les conséquences pourraient être délétères. En effet, l'ion Mn²⁺ pourrait se substituer à Fe²⁺ dans certains cytochromes de la chaîne respiratoire présentant une structure chimique apparentée à celle de l'hémoglobine et perturber leur fonctionnement.

Cette hypothèse repose sur la comparaison des différents potentiels redox des couples $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, $\text{Mn}^{3+}/\text{Mn}^{2+}$ et des différents cytochromes (figure 6). Ainsi, le potentiel standard E_0 du couple $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ (0,77 V en absence de complexation) varie en fonction de l'environnement du fer, de 0,07 V (cytochrome b) à 0,55 V (cytochrome a_3), ce qui correspond à une diminution de 0,22 V pour le cytochrome a_3 (0,77 V – 0,55 V). Le potentiel du couple $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ étant de 0,82 V à pH 7, le dernier cytochrome de la chaîne respiratoire (a_3) peut donc réduire O_2 en H_2O . Dans le cas du couple $\text{Mn}^{3+}/\text{Mn}^{2+}$ ($E_0 = 1,5$ V en absence de complexation), la formation d'un complexe similaire au couple $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ avec le cytochrome a_3 conduit à un couple de potentiel redox 1,28 V (1,50 – 0,22 = 1,28 V). Dans ces conditions, la réduction de O_2 en H_2O est impossible, le dernier cytochrome de la chaîne respiratoire ayant un potentiel redox supérieur (1,28 V) par rapport au couple $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ (0,82 V).

Une telle réduction incomplète de l'oxygène peut entraîner la formation de radicaux libres oxygénés ($\text{O}_2^{\cdot -}$...) capables d'oxyder la dopamine et/ou son précurseur, la L-dopa, en dérivé orthobenzoquinone expliquant ainsi la manifestation des symptômes caractéristiques de la maladie de Parkinson. De plus, cette réduction incomplète de O_2 limite l'apport énergétique aux cellules, par ralentissement des réactions de phosphorylation.

Parmi les autres perturbations constatées sur la distribution tissulaire du fer, il faut mentionner une forte accumulation dans le pancréas, également observée par Scheuhammer (1983) qui explique un tel effet par une augmentation de la vascularisation et/ou par une hémorragie. Selon cet auteur, administré en i.p., le manganèse exercerait une toxicité sélective sur le pancréas ; corroborant ces hypothèses, des perturbations des fonctions endocrines du pancréas, sous l'effet de manganèse, ont été rapportées (Baly *et al.*, 1985 ; Hurley *et al.*, 1984).

Une irritation, une inflammation locale, suite au traitement i.p., pourraient également expliquer, en partie, les augmentations de la concentration en fer observées au niveau du tractus gastro-intestinal, corroborant ainsi les anomalies macroscopiques constatées au niveau intestinal.

Concernant la distribution tissulaire du zinc et du cuivre (cations bivalents intéressants de par leurs propriétés chimiques voisines de celle du manganèse), les légères perturbations

observées (augmentation ou diminution) ne permettent pas la mise en évidence d'interactions majeures avec le manganèse, tout au moins après les 2 semaines de repos qui ont suivi les traitements i.p. et p.o. ; ce qui n'exclut pas l'existence d'interactions réversibles durant cette période, comme cela a pu être précédemment évoqué (Scheuhammer & Cherian, 1982).

Les données bibliographiques sont d'ailleurs très contradictoires, notamment pour le cuivre ; ainsi, selon les auteurs, on observe des augmentations ou des diminutions de la concentration tissulaire, pour un organe donné et parfois même dans des conditions expérimentales semblables (Gubler *et al.*, 1954 ; Jiang *et al.*, 1992 ; Murthy *et al.*, 1981 b ; Scheuhammer & Cherian, 1981 ; Scheuhammer & Cherian, 1982 ; Scheuhammer & Cherian, 1983 ; Singh *et al.*, 1979).

Comme l'a suggéré Nikolova (1993), on pourrait penser que les perturbations observées, qui consistent, pour la plupart, en augmentations des concentrations tissulaires, sont la manifestation de mécanismes de défense compensatoires, en réponse à l'élévation des concentrations tissulaires de manganèse.

Enfin, il faut préciser que les traitements effectués (i.p. et p.o.) n'ont pas provoqué de perturbation majeure au niveau des distributions tissulaires de phosphore, de calcium et de magnésium, ni au niveau de leurs concentrations sanguines.

Même si nos travaux confirment la forte accumulation de manganèse dans les os mentionnée dans la littérature, les rapports Ca/Mn dans le fémur restent très élevés (témoins = 127 000 ; Mn = 32 000) et la substitution du calcium par le manganèse reste donc très partielle ; de plus, les rayons ioniques de ces 2 éléments sont très voisins ; on peut donc penser qu'il y a peu de risque de fragilisation du tissu osseux, dans nos conditions expérimentales.

Cependant, si on peut conclure à l'absence de perturbation du métabolisme phospho-calcique, un tel phénomène n'est pas à exclure dans les cas d'intoxications à long terme (salariés professionnellement exposés).

A remarquer la très grande variabilité des résultats obtenus pour le dosage du calcium dans le cerveau et la moelle épinière, vraisemblablement due à une contamination à partir des os de la boîte crânienne et de la colonne vertébrale au moment du prélèvement de ces organes.

4. Conclusion

L'intoxication subchronique au chlorure de manganèse a permis l'observation de fortes perturbations (importante accumulation tissulaire de manganèse, notamment dans le sang, le fémur, la rate et le système nerveux ; nombreuses perturbations au niveau de la distribution des autres éléments, particulièrement le fer ; retard de la prise pondérale...), dans le cas du traitement par voie i.p., voie couramment utilisée dans les essais sur animaux de laboratoire, mais peu représentative des conditions réelles d'intoxication.

Par contre, le traitement par voie p.o. est responsable d'effets moindres, malgré la forte dose journalière de manganèse administrée, rarement rencontrée dans la vie de tous les jours (équivalente à 5 g de manganèse pour un homme). Aussi, les risques d'intoxication par voie orale s'avèrent très limités.

A signaler que les risques liés à une intoxication pulmonaire (salariés des mines et de la métallurgie du manganèse fortement exposés aux poussières) ne sont pas négligeables, les atteintes tissulaires observées dans notre étude pouvant tout à fait être retrouvées dans ce troisième type d'intoxication, avec des risques de séquelles (dégénérescences cellulaires), en particulier au niveau du système nerveux.

La voie i.p. permettant une bonne rétention tissulaire du manganèse, dans nos conditions expérimentales d'intoxication, c'est cette voie d'administration qui a été retenue pour l'étude de nouveaux chélateurs.

Les organes cibles sélectionnés sont le système nerveux (encéphale et moelle épinière) le fémur, le muscle squelettique (quadriceps crural) , le cœur, les reins, la rate, les testicules et le pancréas.

Toutefois, avant d'aborder cette recherche, la moindre efficacité de la voie orale nous a amené à nous intéresser de plus près au pourcentage d'absorption intestinale du manganèse, en cas de surexposition. Effectivement, la dose choisie pour l'intoxication par voie orale a été calculée sur la base d'un taux d'absorption estimé à 8 %, en fonction de la littérature ; le traitement oral aurait dû aboutir à une rétention tissulaire de manganèse similaire à celle obtenue par intoxication par voie i.p.

ESTIMATION DU TAUX D'ABSORPTION INTESTINALE DU MANGANESE (TECHNIQUE DE L'INTESTIN PERFUSE *IN SITU*)

1. Matériel et méthode

1.1. Réactifs

- chlorure de sodium (Aldrich, France)
- chlorure de manganèse tétrahydraté (Fluka, France)
- acide nitrique suprapur 65 % (Merck, France)
- pentobarbital sodique (Sanofi Santé Animale, France)
- héparine sodique 5000 UI.mL⁻¹ (Panpharma, France)

1.2. Préparation des solutions perfusées

Deux types de solutions iso-osmotiques sont utilisées au cours de cette expérimentation :

- une solution de rinçage de NaCl à 0,9 %, de pH 6,5 - 6,6 et d'osmolarité 300 mOsm
- une solution de chlorure de manganèse, préparée par dissolution de chlorure de manganèse dans de l'eau ultra-pure, additionnée de NaCl jusqu'à obtention d'une osmolarité voisine de 300 mOsm et dont le pH est ajusté à 6,5 - 6,6.

La concentration en manganèse de cette solution (520 mg Mn.L⁻¹) est calculée de façon à perfuser cet élément en quantité équivalente à celle administrée quotidiennement par gavage au cours du protocole d'intoxication par voie orale (75 mg Mn.kg⁻¹ de poids corporel par jour, soit 18,75 mg Mn pour un rat de 250 g), sachant que 36 mL de cette solution sont perfusés durant l'expérience.

1.3. Protocole expérimental

Les expériences sont réalisées sur des rats pesant 250 ± 15 g et préalablement soumis à une diète solide, 16 heures avant les essais.

Le rat est anesthésié par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (80 mg.kg^{-1} de poids corporel), puis placé sur un coussin chauffant (Vetko), afin de maintenir sa température corporelle constante (37°C).

La veine jugulaire est canulée avec un cathéter hépariné ($0,30 \text{ mm} \times 0,70 \text{ mm}$, Biotrol Pharma). Ce dispositif permet de prolonger l'anesthésie par injection intra-veineuse de l'anesthésiant.

Une incision verticale est pratiquée dans la région médiane de l'abdomen, de façon à exposer l'intestin grêle, sans toutefois endommager les systèmes mésentérique et sanguin. Un premier cathéter en polyéthylène ($0,30 \text{ mm} \times 0,70 \text{ mm}$, Biotrol Pharma) est introduit après incision, au niveau du duodénum juste après la valve pylorique ; celui-ci est connecté à une pompe péristaltique à débit variable (Masterflex), permettant de délivrer les solutions perfusées. Un second cathéter ($0,38 \times 1,09 \text{ mm}$, Biotrol Pharma) est introduit au niveau de l'iléon, juste avant le caecum ; il permet l'évacuation des solutions perfusées.

L'intestin grêle est replacé dans la cavité abdominale et l'abdomen est refermé par quelques points de suture. L'incision est protégée par un morceau de gaze imbibée de NaCl 0,9 %.

L'intestin grêle est tout d'abord rincé avec la solution de NaCl 0,9 %, maintenue à 37°C et délivrée à un débit de 2 mL.min^{-1} pendant 15 minutes. Ceci permet d'éliminer les restes de nourriture et les caillots de sang dus aux petites hémorragies provoquées par les incisions. Le débit est ensuite abaissé à 1 mL.min^{-1} pendant 15 minutes.

Ensuite, l'intestin est perfusé, durant 60 minutes, avec la solution de manganèse maintenue à 37°C ; le débit est de $0,6 \text{ mL.min}^{-1}$ (Groupe Mn). Les animaux témoins sont perfusés, dans les mêmes conditions, avec du NaCl 0,9 %.

A la fin de la perfusion, le sang est prélevé par ponction cardiaque, à l'aide d'une seringue héparinée. Il est conservé à 4°C et dilué juste avant dosage.

L'intestin grêle est prélevé selon 3 fragments : le duodénum (du sphincter pylorique au ligament de Treitz), le jéjunum (du ligament de Treitz jusqu'à 8 cm en amont du caecum) et l'iléon (les 8 cm restant avant la valve iléocaecale). Les fragments intestinaux sont

débarrassés du mésentère, ouverts longitudinalement par une incision et rincés au NaCl 0,9 %. D'autres organes sont également prélevés (foie, reins, rate, pancréas, cerveau, poumons, testicules, cœur, quadriceps crural, fémur) et rincés plusieurs fois avec du NaCl 0,9 %. L'ensemble des échantillons prélevés est conservé au congélateur à - 18°C, jusqu'au moment du dosage.

Le dosage du manganèse est réalisé par spectrométrie d'émission atomique (Spectra Span V, Spectrametrics), sur le sang dilué et sur les différents organes décongelés et solubilisés dans de l'acide nitrique.

1.4. Expression des résultats

La quantité de manganèse contenue dans chacun des organes prélevés est calculée, à partir de la concentration déterminée par dosage ($\mu\text{g Mn.L}^{-1}$) et du poids de l'organe (g).

Concernant la masse musculaire squelettique et la masse osseuse, les concentrations de manganèse obtenues à partir du quadriceps crural et du fémur sont extrapolées à la masse totale de ces organes, en considérant que les muscles squelettiques et les os représentent respectivement 41 % et 5 % de la masse corporelle totale (Davis *et al.*, 1992).

Enfin, la quantité de manganèse contenu dans le sang total est estimée en considérant que le volume de sang total en mL correspond à 7 % du poids corporel en g (Augst *et al.*, 1981 ; Barton & Conrad, 1981).

Pour chaque organe prélevé, la différence entre le groupe Mn et le groupe témoin nous donne la quantité moyenne de manganèse accumulée pendant la perfusion (« quantité de manganèse excédentaire »).

La somme de ces quantités excédentaires dans l'ensemble des organes, exception faite de l'intestin grêle, permet de déterminer la quantité totale de manganèse excédentaire absorbée, après 60 minutes de perfusion, et de calculer un pourcentage d'absorption selon la formule :

$$\% = \frac{\text{Quantité totale de manganèse excédentaire absorbée}}{\text{Quantité de manganèse présente en permanence dans la lumière intestinale}} \times 100$$

La quantité de manganèse présente en permanence dans la lumière intestinale, durant la perfusion, correspond à la concentration utilisée en perfusion (520 mg.L^{-1}) multipliée par le volume de l'intestin grêle ($0,02 \text{ L}$).

1.5. Analyse statistique

Après vérification de la normalité des distributions et de l'homogénéité des variances (test de Bartlett), les comparaisons sont effectuées avec test t non apparié de Student. L'hypothèse nulle est rejetée lorsque $p < 0,05$.

2. Résultats

D'après les résultats reportés dans le tableau 7, la perfusion d'une solution de chlorure de manganèse, de concentration 520 mg Mn.L^{-1} , pendant 60 minutes, provoque une augmentation significative de la quantité de manganèse contenue dans les différents organes prélevés, excepté dans les testicules.

Les augmentations les plus importantes sont observées dans l'intestin grêle, et plus particulièrement dans le jéjunum (augmentation d'un facteur 48). Pour les autres organes, les plus touchés sont le sang et le foie (augmentation respective d'un facteur 5,3 et 4,9) et le moins affecté est le cerveau (augmentation d'un facteur 1,2).

Au total, on constate une augmentation de la quantité de manganèse d'un facteur voisin de 44 pour l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon) et d'un facteur voisin de 3,7 pour l'ensemble des autres organes prélevés.

Le pourcentage d'absorption est estimé à 1,62 % (quantité totale de manganèse excédentaire absorbée = $169 \mu\text{g}$; quantité de manganèse présente en permanence dans la lumière intestinale = $10,4 \text{ mg}$).

3. Discussion

L'objectif de cette étude était de vérifier le pourcentage d'absorption intestinale du manganèse, en cas de surexposition, de manière à tenter d'expliquer la faible rétention tissulaire observée lors de l'intoxication orale subchronique au chlorure de manganèse (première partie expérimentale : mise au point du protocole d'intoxication). Effectivement, la dose orale journalière administrée (75 mg Mn.kg^{-1} de poids corporel) avait été fixée sur la base d'un pourcentage d'absorption estimé à environ 8 %, selon la littérature (Davis *et al.*, 1993). Cette vérification a été entreprise à l'aide de la technique de l'intestin perfusé *in situ*, technique utilisée au laboratoire notamment pour l'étude de l'absorption intestinale de divers sels d'aluminium et du nickel (Arnich *et al.*, 2000 ; Cunat *et al.*, 2000).

Les résultats obtenus nous ont ainsi permis de calculer un pourcentage d'absorption voisin de 1,6 %, et donc très nettement inférieur à celui initialement retenu.

A noter que cette valeur a été estimée en éliminant la quantité de manganèse dosée dans l'intestin grêle, qui reflète plus une accumulation au niveau de la barrière intestinale qu'une absorption par l'organisme.

De plus, ce pourcentage doit rester indicatif. Effectivement, seuls les organes « cibles » ont été pris en compte et, de ce fait, la quantité de manganèse réellement absorbée est probablement sous-estimée. Enfin, certaines quantités de manganèse ont été obtenues par extrapolation, à partir de dosages effectués sur un échantillon d'organe qui ne reflète pas forcément la distribution réelle du manganèse dans l'organe entier (cas des muscles squelettiques et des os).

La comparaison de nos résultats avec ceux de travaux antérieurs reste difficile. Effectivement, les différents auteurs se sont essentiellement intéressés à la vitesse de transfert du manganèse, de la lumière intestinale vers la muqueuse, et aux mécanismes de transport mis en jeu (actif, passif), au travers de techniques de perfusion *in situ* et *in vitro*. Le transfert de la muqueuse vers la circulation sanguine et les autres organes n'a pas été étudié (Cikrt & Vostál, 1969 ; Garcia-Aranda *et al.*, 1983 ; Lutz *et al.*, 1993 ; Testolin *et al.*, 1993). Le pourcentage d'absorption du manganèse a généralement été estimé au moyen d'études métaboliques *in vivo* utilisant du ^{54}Mn , isotope radio-actif (Davis *et al.*, 1993 ; Johnson *et al.*, 1991 ; Lee & Johnson, 1988 ; Weigand *et al.*, 1986).

Ce pourcentage d'absorption semble donc conforter les résultats de notre précédente étude *in vivo*, à savoir une plus faible rétention tissulaire du manganèse dans la cas de l'intoxication subchronique orale, par rapport à la voie intrapéritonéale. Le pourcentage d'absorption, utilisé pour le calcul de la dose orale, ayant été surestimé, les deux voies d'intoxication ne peuvent conduire à des rétentions tissulaires similaires.

Il faut toutefois rester prudents dans l'interprétation de nos résultats, car les deux protocoles utilisés (perfusion *in situ* et traitement subchronique oral) présentent des différences importantes. Ainsi, dans la technique de perfusion, l'intestin grêle est en contact permanent, avec la solution de chlorure de manganèse, pendant 60 minutes, la vitesse de perfusion étant constante ; par contre, dans le cas du traitement oral, la solution de chlorure de manganèse, administrée de façon itérative par gavage, transite progressivement tout le long du tractus gastro-intestinal selon un gradient de vitesse (Kararli, 1995). Les conditions expérimentales telles que le jeûne, la quantité de manganèse administrée et présente dans le régime alimentaire, les conditions d'administration (gavage ou incorporation dans la nourriture) ont également une influence sur l'estimation du taux d'absorption (Abrams *et al.*, 1976 a et b ; Goyer, 1991 ; Johnson *et al.*, 1991 ; Lee & Johnson, 1988 ; Weigand *et al.*, 1986).

A noter que, pour ces deux protocoles (technique de perfusion *in situ* et intoxication chronique par voie orale), les concentrations en manganèse utilisées (520 mg.L⁻¹ en perfusion et 75 mg.kg⁻¹ par jour en gavage) sont largement supérieures à ce qu'on peut trouver dans une alimentation normale ; 2 à 9 mg par jour selon le régime alimentaire (OMS, 1981). Dans ces conditions, il est fort probable que les mécanismes de transport actif du manganèse soient rapidement saturés, comme cela a été précédemment suggéré par Testolin et collaborateurs (1993) qui ont obtenu une saturation pour une concentration voisine de 27,5 mg Mn.L⁻¹ (technique *in vitro* de l'intestin inversé). Aussi, la vitesse d'absorption serait alors limitée par la diffusion passive du manganèse. Ceci pourrait expliquer l'obtention d'un plus faible pourcentage d'absorption, par rapport aux travaux de Davis et collaborateurs (1993) qui ont utilisés une concentration en manganèse nettement inférieure (45 µg Mn.g⁻¹ de nourriture, soit un apport oral journalier d'environ 1,35 mg de manganèse par rat).

Deuxième partie expérimentale

La seconde partie de ce travail est axée sur la recherche de nouveaux chélateurs du manganèse, en vue d'une détoxification de l'organisme. Cette recherche a été menée en 2 étapes successives :

Dans un premier temps, une présélection a été réalisée *in vitro*, par évaluation de la capacité de différents composés à déplacer le manganèse lié aux protéines sériques. Les molécules retenues ont été choisies d'une part sur les bases de la littérature, plus particulièrement d'après les travaux réalisés sur l'animal, les études cliniques restant jusqu'à présent peu concluantes (nombre restreint de molécules testées, ayant peu ou pas d'efficacité). D'autre part, notre choix s'est porté sur des molécules présentant une structure chimique favorable à la complexation du manganèse (présence de groupements fonctionnels intéressants, tels que des groupements carboxyliques, aminés, hydroxyles et thiols).

Dans un second temps, les molécules dont le pouvoir de mobilisation *in vitro* s'avère supérieur ou égal à 50 % ont été testées *in vivo* sur des rats préalablement exposés par voie intrapéritonéale au chlorure de manganèse, selon le protocole d'intoxication choisi et précédemment mis au point (intoxication subchronique au chlorure de manganèse, par voie i.p., pendant 5 semaines, à raison d'une dose quotidienne de 6 mg Mn.kg⁻¹ de poids corporel). Leur capacité à mobiliser le manganèse tissulaire, notamment au niveau des organes cibles, ainsi que leur influence sur l'excrétion de cet élément ont été étudiées. De plus, l'existence d'éventuelles modifications de la distribution tissulaire et l'excrétion d'autres éléments essentiels endogènes (fer, zinc, cuivre, phosphore, magnésium, calcium) ont également été recherchées.

Toutefois, une accumulation non négligeable de manganèse dans le cerveau des rats exposés ayant été constatée au cours de la mise au point du protocole d'intoxication (première partie), il nous a paru intéressant de rechercher l'existence d'éventuelles altérations neurologiques associées à cette accumulation, atteintes qui sont rapportées dans la littérature (voir analyse bibliographique).

L'objectif final de cette recherche étant de vérifier si les chélateurs potentiels du manganèse sont capables *in vivo*, non seulement de mobiliser cet élément au niveau du système nerveux central, mais aussi d'agir sur ces altérations neurologiques.

Cette recherche d'atteintes neurologiques dues à l'exposition subchronique au manganèse est développée suivant trois axes :

Le premier repose sur une étude comportementale visant à détecter des perturbations au niveau de l'activité locomotrice et des capacités d'apprentissage des animaux exposés au manganèse. Effectivement, certains changements comportementaux similaires à ceux observés chez l'homme, ont pu être constatés chez les rongeurs, notamment une hyperactivité mise en évidence grâce au test de l'open-field (Bonilla, 1984 ; Chandra *et al.*, 1979 ; Murthy *et al.*, 1981 a ; Nachtman *et al.*, 1986 ; Pappas *et al.*, 1997). Cette hyperactivité s'apparenterait à la phase précoce d'une intoxication au manganèse chez l'homme. Un déficit dans des tests d'apprentissage a également été mis en évidence chez les rats exposés au manganèse (Derevenco *et al.*, 1988 ; Mc Millan, 1999 ; Murthy *et al.*, 1981 a ; Öner & Sentürk, 1992, 1995).

Le deuxième axe porte sur la recherche de modifications du taux normal de dopamine cérébrale. Effectivement, une altération du métabolisme des catécholamines, en particulier celui de la dopamine au niveau du striatum, est souvent rapportée chez l'animal de laboratoire exposé au manganèse (Autisser *et al.*, 1982 ; Chandra & Shukla, 1981 a et b ; Gianutsos & Murray, 1982 ; Newland, 1999 ; Shukla & Chandra, 1981 ; Subhash & Padmashree, 1991).

Le troisième axe est orienté vers la recherche d'atteintes neurologiques, au niveau de différentes structures du système nerveux central. Ainsi, une exposition prolongée au manganèse peut être corrélée avec l'apparition d'altérations, telles que des dégénérescences et des pertes neuronales (Chandra & Srivastava, 1970 ; Nakashima, 1983 ; Seth & Chandra, 1988).

NEUROTOXICITE DU MANGANESE ADMINISTRE PAR VOIE INTRAPERITONEALE : ETUDES COMPORTEMENTALE, NEUROCHIMIQUE ET HISTOLOGIQUE

1. Protocole général

Les expériences sont réalisées sur des rats pesant $326 \text{ g} \pm 18 \text{ g}$. Le groupe Mn ($n = 10$) est intoxiqué au chlorure de manganèse par voie intrapéritonéale, à raison 6 mg Mn.kg^{-1} de poids corporel et par jour, 5 jours par semaine pendant 5 semaines. Les animaux sont pesés quotidiennement et la dose de manganèse à administrer est ajustée en conséquence. Le groupe témoin ($n = 10$) reçoit des injections intrapéritonéales de NaCl 0,9 %, dans les mêmes conditions expérimentales.

A la fin de l'intoxication, les rats sont laissés au repos pendant 72 heures avant d'être soumis aux tests comportementaux (open-field et labyrinthe en T).

Vingt-quatre heures après la fin de l'étude comportementale, les rats reçoivent une dose infra-hypnotique de pentobarbital sodique (30 mg.kg^{-1} de poids corporel) et sont sacrifiés par décapitation. Une moitié de l'effectif sert au dosage des concentrations de dopamine dans le striatum et dans le reste du cerveau. L'autre moitié de l'effectif est réservée pour une étude histologique de l'encéphale, en vue de détecter d'éventuelles altérations morphologiques au niveau du cortex frontal, du striatum et de la substance noire.

Pendant toute la durée de cette expérimentation, les animaux sont soumis à un cycle jour/nuit (12h/12h) inversé, de façon à pouvoir tester leur comportement pendant leur phase d'activité (phase obscure).

2. Approche comportementale

2.1. Open-field

L'open-field permet de mesurer l'activité locomotrice. Le dispositif expérimental est constitué d'une plate-forme circulaire de bois blanc de 80 cm de diamètre, sur laquelle on a tracé une zone centrale de 40 cm de diamètre divisée en 4 aires égales. La zone périphérique est, quant à elle, divisée en 8 aires égales. La plate-forme est entourée d'une paroi opaque en polypropylène d'une hauteur de 40 cm (figure 6).

Chaque rat est placé 10 minutes dans le dispositif expérimental. Les variables prises en compte sont le nombre d'aires traversées et le nombre de redressements effectués.

On considère qu'un rat a traversé une aire, lorsqu'il y a pénétré avec ses 4 pattes ; le redressement est pris en compte lorsque l'animal prend appui seulement sur ses 2 pattes postérieures.

L'activité totale est donnée par la somme du nombre total d'aires traversées et du nombre total de redressements.

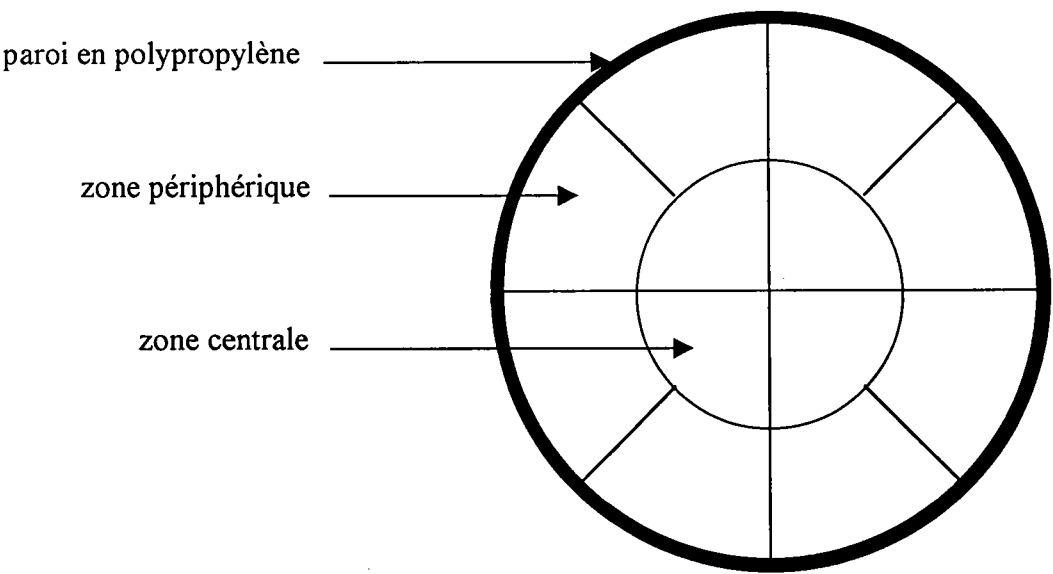


Figure 6: Vue supérieure de l'open-field.

2.2. Labyrinthe en T

Ce test fait appel à la mémoire spatiale du rat (Griffith & Farris, 1951). Le dispositif expérimental est un labyrinthe en T de bois blanc, constitué d'une allée centrale (35 cm x 13 cm x 14 cm) au bout de laquelle se trouvent 2 branches (34 cm x 13 cm x 14 cm). A chaque extrémité du labyrinthe se trouve un compartiment amovible (17 cm x 13 cm x 14 cm) pouvant être fermé par une porte guillotine. La face supérieure est recouverte de plexiglass transparent, afin de permettre l'observation du comportement des rats (figure 7).

Le test se déroule sur 2 jours, selon la procédure décrite par Öner & Sentürk (1992, 1995) : le premier jour, les rats, privés de nourriture pendant 16 heures, sont placés par groupes de 4 individus dans le compartiment de départ à la base du "T" ; ils peuvent visiter le labyrinthe pendant 2 heures, afin de se familiariser avec le dispositif et trouver le compartiment appâté avec des croquettes standards (M20, Extra-Labo, France). Les animaux sont ensuite replacés dans leurs cages respectives où ils ont accès à la nourriture et à l'eau de boisson *ad libitum* pendant 6 heures.

Le jour suivant, les animaux, à jeun depuis 16 heures, sont placés individuellement dans le même labyrinthe, pendant 10 minutes, durant lesquelles les temps de latence pour entrer dans les compartiments appâté et non appâté sont enregistrés. Un temps de 600 secondes est attribué arbitrairement, lorsqu'un des deux compartiments n'est pas visité.

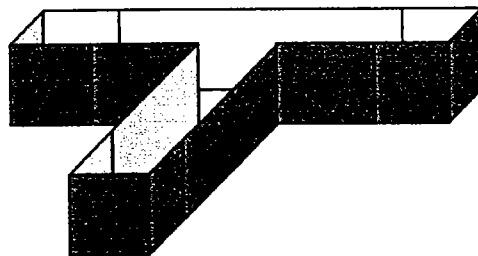


Figure 7 : Dispositif du labyrinthe en T.

2.3. Analyse statistique

L'homogénéité des variances n'étant pas vérifiée (test de Bartlett) et le caractère gaussien des distributions n'étant pas démontré, les comparaisons sont réalisées avec le test U de Mann-Whitney. A noter que pour le test du labyrinthe en T, les comparaisons pour les valeurs appariées sont effectuées à l'aide du test de Wilcoxon. Le seuil de significativité est fixé à 5 % ($p < 0,05$).

2.4. Résultats

2.4.1. Open –field

Aucune différence significative n'est mise en évidence entre les deux groupes en raison d'une grande variabilité intra-groupe (tableau 8).

Tableau 8 : Activité locomotrice enregistrée dans le test de l'open-field.

Paramètres étudiés	Témoin	Mn
Nombre d'aires traversées	85 ± 26	98 ± 37
Nombre de redressements	50 ± 15	48 ± 21
Activité totale	135 ± 40	146 ± 56

Résultats exprimés en moyenne ± écart-type.

2.4.2. Labyrinthe en T

Aucune différence significative n'est mise en évidence entre les deux groupes expérimentaux, quelle que soit la variable étudiée (tableau 9).

Tableau 9 : Performances obtenues au test du labyrinthe en T.

Temps de latence	Témoin	Mn
Bras appâté	44 ± 23	43 ± 17
Bras non appâté	205 ± 120	220 ± 135

Résultats exprimés en moyenne ± écart-type.

D'autre part, pour chacun des deux groupes, le temps de latence qui précède la visite du compartiment non appâté est significativement supérieur à celui relatif à la visite du compartiment appâté (augmentation d'un facteur voisin de 5 pour les deux groupes ; $p < 0,05$). Cette constatation permet d'affirmer qu'il y a bien eu apprentissage de la part des animaux et confirme la validité du test.

2.5. Discussion

Cette étude comportementale n'a pas permis de mettre en évidence des perturbations, tant au niveau de l'activité locomotrice (open-field), qu'au niveau des capacités d'apprentissage (labyrinthe en T) des rats intoxiqués par voie i.p. au chlorure de manganèse pendant 5 semaines (6 mg Mn.kg^{-1} de poids corporel par jour).

Ces résultats s'avèrent être en contradiction avec certaines données de la littérature. Ainsi, des modifications de l'activité locomotrice ont été rapportées, se traduisant, soit par une hyperactivité (Chandra *et al.*, 1979 ; Murthy *et al.*, 1981 a ; Nachtman *et al.*, 1986 ; Pappas *et al.*, 1997), soit par une hypoactivité (Ingersoll *et al.*, 1995 ; Komura & Sakamoto, 1991). A noter que cette apparente divergence serait le reflet de l'effet biphasique dans le temps du manganèse, l'hyperactivité initiale étant transitoire (Bonilla, 1984 ; Mc Millan, 1999).

De même, Ôner et Sentürk (1992, 1995) ont pu constater une diminution des capacités d'apprentissage de rats exposés oralement au manganèse ($357 \text{ } \mu\text{g Mn.kg}^{-1}$ de poids corporel par jour, pendant 30 jours), dans le test du labyrinthe en T. Un tel déficit a également été observé avec d'autres tests d'apprentissage, tel que le test d'évitement de stimulus aversif, (Derevenco *et al.*, 1988 ; Murthy *et al.*, 1981 a), alors que d'autres auteurs n'ont pas observé d'effets dans ce même test (Chandra *et al.*, 1981 ; Morganti *et al.*, 1985), ainsi que dans les labyrinthes de Morris et de Olton (Pappas *et al.*, 1997).

Les comparaisons entre ces différentes études restent toutefois délicates, en raison d'une grande variabilité dans les protocoles d'intoxication utilisés, notamment au niveau des voies d'administration (orale, inhalation, injection intracrâniale) et des durées d'exposition (de quelques jours à plusieurs mois).

3. Dosage de la dopamine cérébrale

Cette étude a été réalisée au Centre du Médicament à la Faculté de Pharmacie (Université de Nancy I), en collaboration avec Monsieur le Professeur Pierre Leroy.

3.1. Principe

Le dosage est réalisé par chromatographie liquide haute performance (CLHP), à polarité de phase inversée avec appariement d'ions, couplée à une détection électrochimique, d'après la méthode de Magnusson et collaborateurs (1980) modifiée.

La dopamine (DA) et les catécholamines en général s'oxydent relativement facilement à l'air. L'oxydation a lieu au niveau du noyau aromatique hydroxylé et conduit à la formation d'un dérivé orthoquinone et à la libération de 2 électrons (figure 8). Cette réaction est mise à profit en détection électrochimique, l'oxydation étant réalisée à la surface d'une électrode à laquelle est appliqué un potentiel positif. Le courant résultant, mesuré après amplification, est directement proportionnel au nombre de molécules oxydées (Marsden & Joseph, 1986).

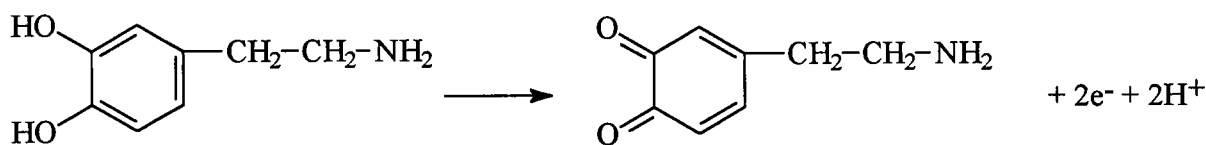


Figure 8 : Oxydation de la dopamine, à la surface de l'électrode de travail.

3.2. Matériel et méthode

3.2.1. Réactifs

Tous les réactifs et solvants sont de qualité « pour analyse » ou pour « CLHP ».

- chlorhydrate d'hydroxytyramine (dopamine, PM = 153 g.mol⁻¹, Sigma, France)
- acide citrique (Sigma, France)
- acide éthylènediaminetétraacétique disodique dihydraté (EDTA, Sigma, France)

- hexylsulfate, sel de sodium (Sigma, France)
- soude en pastille (Merck, France)
- méthanol (Sigma, France)
- acide perchlorique (PCA, Merck, France)
- bisulfite de sodium (Sigma, France)

3.2.2. Préparation du tampon phase mobile et de la gamme d'étalonnage

Le tampon phase mobile (pH 4,25 - force ionique 0,1) est préparé avec de l'eau ultra-pure, de façon à obtenir une solution de concentration 50 mM en acide citrique, 10 mM en EDTA et 2 mM en hexylsulfate. Le pH est ajusté avec NaOH 10 M.

Les solutions standards de la gamme étalon (100, 75, 50, 25, 10 et 5 ng DA.mL⁻¹) sont préparées tous les jours, avec du tampon phase mobile. Elles sont conservées dans de la glace fondante, pendant toute la durée de leur utilisation.

La limite de détection se situe aux environs de 0,765-7,65 ng DA.mL⁻¹ (0,1-1 pmol par injection) ; la zone de linéarité s'étend jusqu'à 4,59 µg DA.mL⁻¹ (600 pmol par injection).

3.2.3. Préparation des échantillons

Les encéphales de rat, congelés à - 80°C dès leur prélèvement, sont disséqués rapidement sur un lit de glace fondante. Le striatum, isolé par section transversale au niveau de l'épiphyse, et le reste de l'encéphale sont ensuite traités séparément.

Chacune des deux parties est homogénéisée mécaniquement (broyeur de type Duall) pendant une minute, en présence de PCA 0,1 M contenant 0,4 mM de bisulfite de sodium.

L'homogénat est centrifugé à 10 000 g pendant 10 minutes, à 4° C. Le surnageant est récupéré et conservé dans de la glace fondante, jusqu'au moment du dosage. La concentration en dopamine dans les échantillons est donnée en ng.mL⁻¹, par rapport à la gamme d'étalonnage.

3.2.4. Conditions CLHP

Le système CLHP est composé d'une pompe isocratique (PU-980 JASCO), d'un injecteur de type vanne à boucle calibrée (Rhéodyne 7125) de volume 20 µL, d'une colonne

Nucleosil C₁₈ (taille des particule : 5 µm ; longueur 125 mm ; diamètre interne : 4 mm) munie d'une pré-colonne, d'un détecteur électrochimique et d'un intégrateur ou tout logiciel d'acquisition et de traitement des données (Nelson ou Borwin).

La phase mobile de travail est constituée d'un mélange tampon phase mobile/méthanol (96 : 4, V/V) filtré et dégazé sur une membrane de nylon (taille des pores : 0,45 µm, Alltech).

Le débit de la phase mobile est de 1 mL.min⁻¹, la température de la colonne est de 35° C et la pression de travail est de 80 bars. La phase mobile est recyclée en continu.

La détection s'effectue à un potentiel de + 0,4 V par rapport à une électrode de référence Pd/H₂ (Antek EC 2000). La cellule est équipée d'une électrode de travail en carbone vitreux.

Dans nos conditions expérimentales, les catécholamines restent chargées positivement et l'élution se fait par ordre d'hydrophobicité croissante. Le temps de rétention de la dopamine est voisin de 4,2 minutes.

3.2.5. Analyse statistique

Après vérification de la normalité des distributions et de l'homogénéité des variances (test de Bartlett), les comparaisons entre les groupes Mn et témoin sont effectuée avec le test *t* de Student. L'hypothèse nulle est rejetée lorsque *p* < 0,05.

3.3. Résultats

D'après les résultats reportés dans le tableau 10, l'exposition au manganèse n'a pas d'effet sur les concentrations en dopamine, dans le striatum et dans le reste du cerveau.

Tableau 10 : Concentrations en dopamine, dans le striatum et le reste de l'encéphale (µg DA.g⁻¹ de tissus frais).

	Témoin	Mn
Striatum	7,4 ± 1,1	8,0 ± 1,9
Reste de l'encéphale	0,14 ± 0,04	0,16 ± 0,04

Résultats exprimés en moyenne ± écart-type.

3.4. Discussion

Le dosage du taux de dopamine, dans le cerveaux des rats intoxiqués par voie i.p. au chlorure de manganèse (6 mg Mn.kg⁻¹ de poids corporel et par jour, pendant 5 semaines), n'a pas permis la mise en évidence de modification, suite à cette intoxication subchronique. Une telle absence de modification est rapportée par Pappas et collaborateurs (1997). Ces résultats sont en contradiction avec différents travaux antérieurs. Ainsi, certains auteurs ont pu constater une augmentation du taux de dopamine, après administration subchronique de manganèse (de 14 à 30 jours) (Chandra *et al.*, 1979, 1981 ; Murthy *et al.*, 1981). Par contre, il semblerait qu'une prolongation de l'intoxication (au delà de 4 mois) ou qu'une administration intracrâniale conduise à une déplétion de la dopamine (Ingersoll *et al.*, 1995 ; Komura & Sakamoto, 1991)

4. Etude histologique, en microscopie optique

Cette étude a été réalisée au Laboratoire d'Anatomie Pathologique, en collaboration avec Monsieur le Docteur Yves Grignon (MCU-PH).

4.1. Matériel et méthode

4.1.1. Réactifs utilisés

- formaldéhyde en solution aqueuse à 36 % (Prolabo, France)
- dihydrogénophosphate de sodium dihydraté (NaH₂PO₄, 2H₂O, Prolabo, France)
- hydrogénophosphate disodique (Na₂HPO₄, Prolabo, France)
- toluène (Carlo Erba, France)
- éthanol (Descharmes, France)
- paraffine (Bayer, France)
- milieu de montage Eukitt (Labonord, France)
- hématoxyline stabilisée active 2 (Shandon, France)
- éosine à 1 % dans l'eau (RAL, France)
- safran du Gatinais 2 % dans l'alcool à 100° (RAL, France)

4.1.2. Préparation des lames histologiques

Les encéphales de rats, fraîchement prélevés, sont fixés par immersion pendant 3 semaines environ dans une solution de formol à 10 %, tamponnée à pH 7,0 à l'aide de sels de phosphate et préparée extemporanément. Chaque encéphale est conservé individuellement dans un flacon en polypropylène de 20 mL.

Après fixation, des prélèvements sont effectués au niveau de trois régions d'intérêt : le striatum (constitué du noyau caudé, du putamen et du globus pallidus), le cortex frontal et la substance noire.

Chaque prélèvement, destiné à une étude histologique standard est inclus en paraffine selon la technique habituelle (déshydratation dans des bains d'éthanol à concentration croissante ; éclaircissement dans des bains de toluène à concentration croissante ; imprégnation par la paraffine). Puis, des coupes de 5 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome (Leica RM 2125TT). Elles sont ensuite colorées par l'H.E.S. (hématoxyline, éosine, safran), puis montées entre lame et lamelle pour pouvoir être observées au microscope (Olympus BX 45), à faibles (x 40 et x 200) et à fort (x 400) grossissements.

4.2. Résultats

L'observation macroscopique des encéphales, des rats du groupe témoin et des rats du groupe Mn, ne permet pas de mettre évidence de différences de taille, de poids et d'aspect.

A faible grossissement (x 40 et x 200), les encéphales des rats témoins et des rats intoxiqués sont morphologiquement identiques ; l'exposition au manganèse n'entraîne pas de modification des structures du striatum (figure 9), ni d'atrophie du ruban cortical (figure 10). On ne constate pas de perte cellulaire, notamment au niveau des neurones. Le neuropile et les vaisseaux apparaissent normaux.

A fort grossissement (x 400), les cellules sont de morphologie normale. Aucune atrophie neuronale n'est observée, notamment au niveau de la substance noire (figure 11).

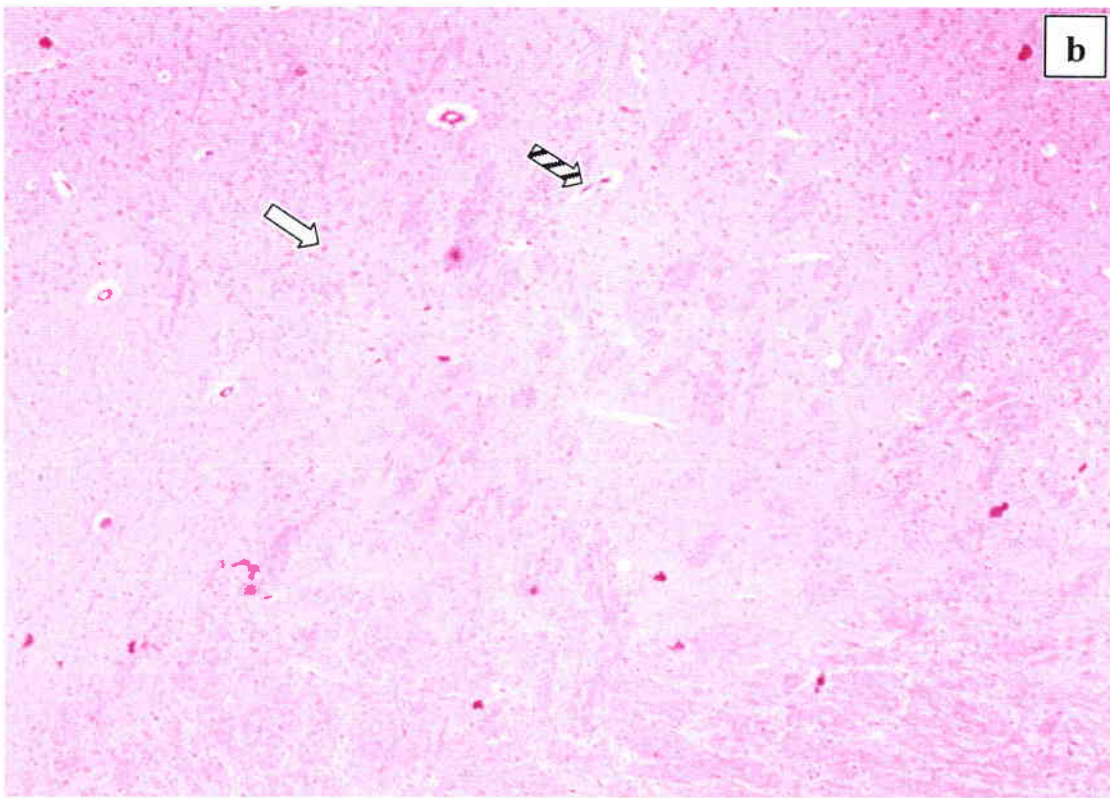
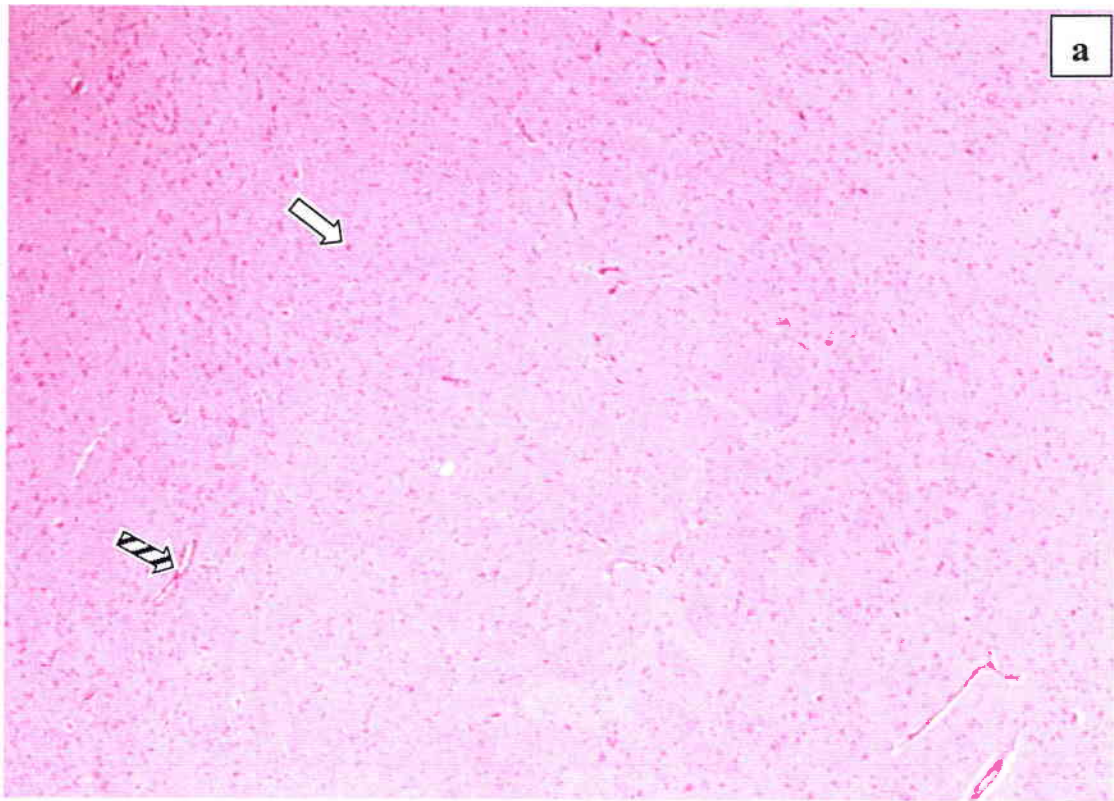


Figure 9 : Micrographies de striata de rat témoin (a) et de rat intoxiqué au manganèse par voie i.p. (b).

Coloration HES, grossissement x 40.

→ neurone

↗ vaisseau sanguin

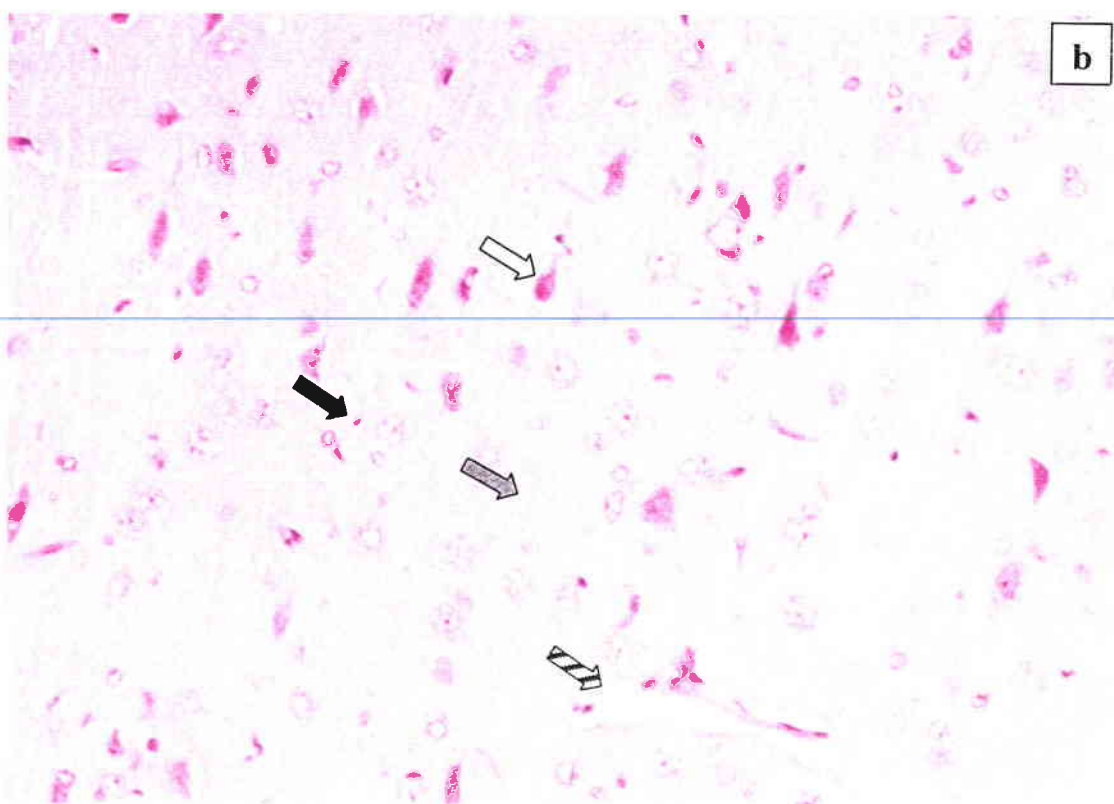
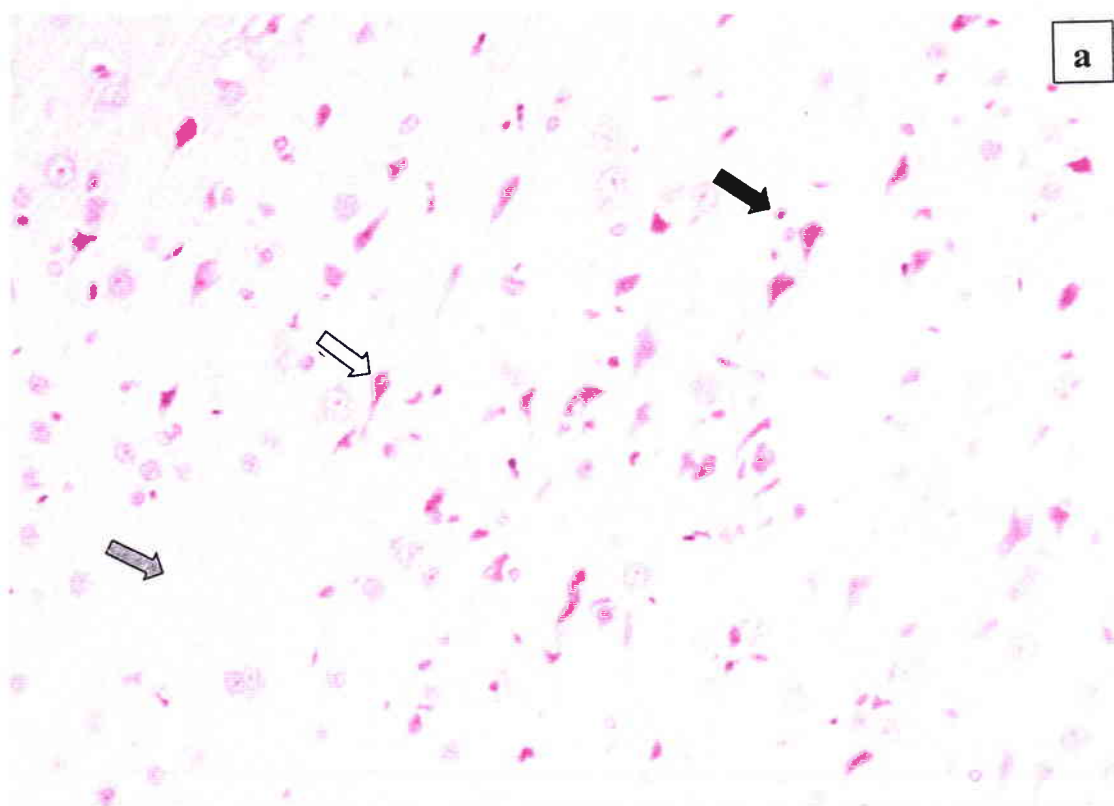


Figure 10 : Micrographies de cortex frontaux de rat témoin (a) et de rat intoxiqué au manganèse par voie i.p. (b).

Coloration HES, grossissement x 200.

- | | |
|-------------|--------------------|
| → neurone | → cellule gliale |
| → neuropile | → vaisseau sanguin |

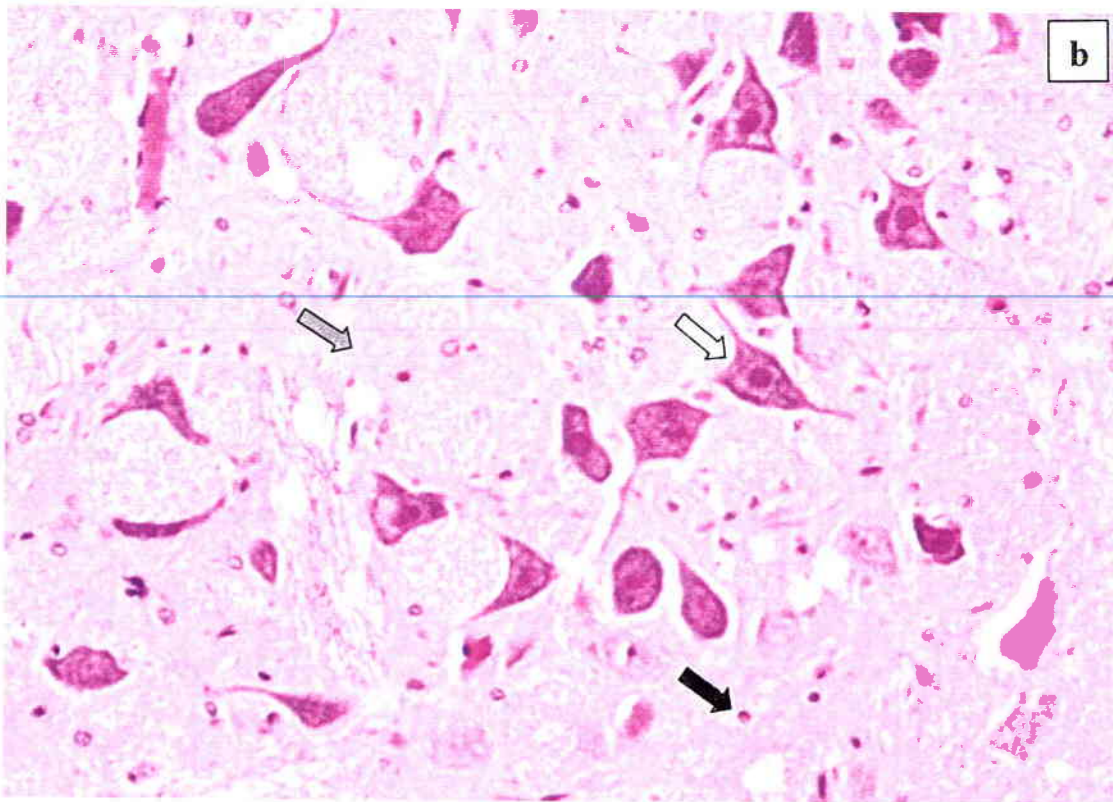
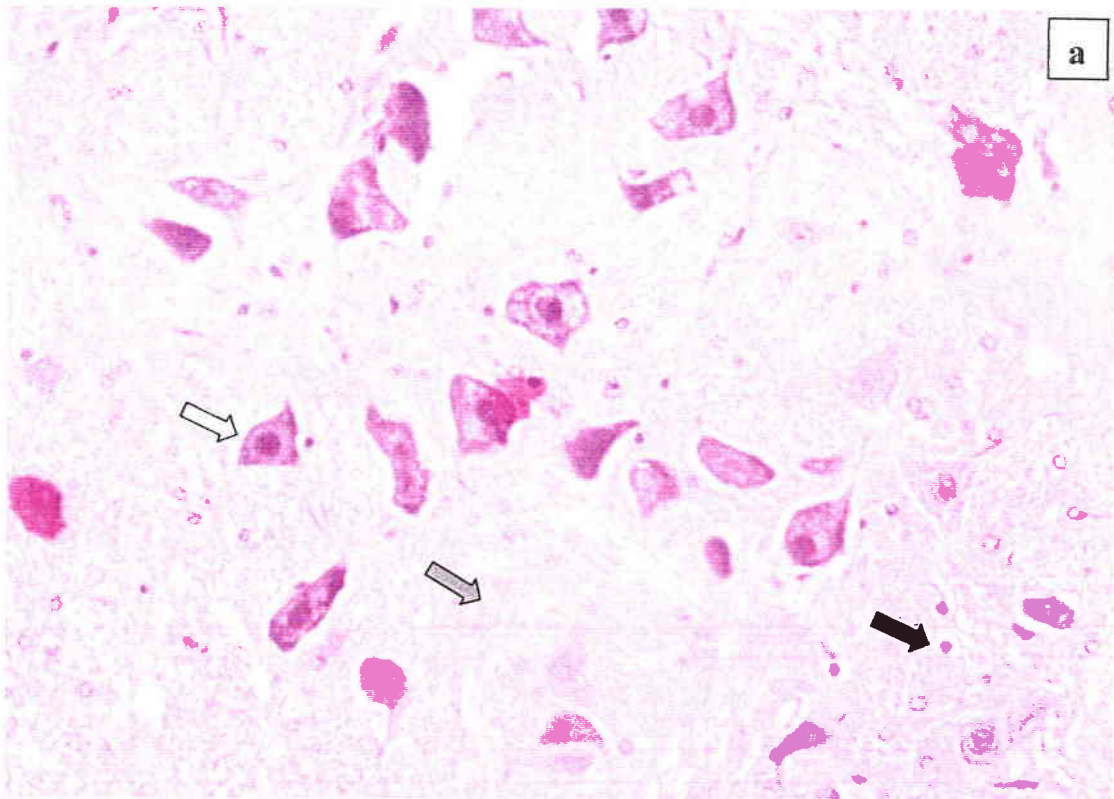


Figure 11 : Micrographies de substances noires de rat témoin (a) et de rat intoxiqué au manganèse par voie i.p. (b).

Coloration HES, grossissement x 400.

➡ neurone ➡ cellule gliale
 ➡ neuropile

4.3. Discussion

Dans nos conditions d'exposition au manganèse, nous n'avons pas observé d'altération morphologique, dans les différentes structures cérébrales étudiées.

Ce résultat est en accord avec les travaux de Singh et collaborateur (1974) réalisés dans les mêmes conditions expérimentales.

Cette absence de manifestations pourrait être liée à la durée d'exposition. Effectivement, plusieurs mois d'exposition au manganèse sont généralement nécessaires pour qu'apparaissent des altérations morphologiques, dans l'encéphale de rat adulte (Chandra & Srivastava, 1970 ; Nakashima, 1983). Ces altérations consistent principalement en des dégénérescences des neurones, au niveau du cortex et de la substance noire. Le striatum est apparemment épargné chez le rat, contrairement à l'homme et aux primates (Prahlad & Chandra, 1988).

A signaler que, dans les cas d'exposition périnatale, des changements peuvent être observés au bout de 30 jours de traitement, les jeunes rats paraissant plus sensibles à la neurotoxicité du manganèse (Chandra & Shukla, 1978 ; Dorman *et al.*, 2000 ; Pappas *et al.*, 1997).

5. Conclusion

Le but de cette étude était de tenter de relier l'accumulation du manganèse, constatée dans le cerveau des rats intoxiqués au chlorure de manganèse (administration i.p., durant 5 semaines, à raison de 6 mg Mn.kg⁻¹ de poids corporel par jour), avec d'éventuelles atteintes neurologiques qui sont souvent mentionnées dans la littérature.

L'objectif final était de tester les chélateurs potentiels, non seulement pour leurs effets mobilisateurs vis-à-vis du manganèse tissulaire, mais aussi pour leurs effets sur ces atteintes neurologiques.

Dans nos conditions expérimentales, il n'a pas été possible de vérifier l'existence de perturbations comportementales (activité locomotrice et capacités d'apprentissage), de modifications neurochimiques (taux de dopamine cérébrale) et de lésions anatomiques (dégénérescences et pertes neuronales).

Considérés dans leur ensemble, ces résultats sont relativement cohérents. Effectivement, les altérations de l'activité locomotrice seraient principalement dues à des perturbations du système dopaminergique ; l'hyperactivité transitoire, observée par différents auteurs en début d'intoxication, serait associée à une augmentation de la concentration en dopamine, notamment dans le striatum ; tandis que l'hypoactivité, constatée lorsque l'exposition au manganèse se prolonge ou suite à une injection intracrâniale, serait associée à une diminution de cette concentration (Chandra *et al.*, 1979 ; Ingersoll *et al.*, 1995 ; Komura & Sakamoto, 1991 ; McMillan, 1999 ; Murthy *et al.*, 1981 a).

De même, selon Bonilla (1984) et Chandra et collaborateurs (1979), l'apparition de lésions neuronales seraient associées à une déplétion de dopamine et à une hypoactivité.

En raison de cette absence d'atteintes neurologiques, dans nos conditions expérimentales d'intoxication, il a été décidé de limiter l'étude de nouveaux chélateurs du manganèse à la recherche de leur capacité mobilisatrice vis-à-vis du manganèse accumulé dans différents organes cibles.

Tableau 11 : Chélateurs sélectionnés pour l'étude *in vitro*.

$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{HOOC-CH}_2 \diagup \text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N} \begin{array}{l} \diagdown \text{CH}_2\text{-COOH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array} \end{array}$ TTHA	$\begin{array}{c} \text{HOOC-CH}_2 \diagup \text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N} \begin{array}{l} \diagdown \text{CH}_2\text{-COOH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array} \\ \text{HOOC-CH}_2 \diagdown \text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_2\text{-COOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{-COOH} \end{array} \end{array}$ DTPA
$\begin{array}{c} \text{HOOC-CH}_2 \diagup \text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N} \begin{array}{l} \diagdown \text{CH}_2\text{-COOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{-COOH} \end{array} \\ \text{HOOC-CH}_2 \diagdown \text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_2\text{-COOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{-COOH} \end{array} \end{array}$ EDTA	$\begin{array}{c} \text{HOOC-CH}_2 \diagup \text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N} \begin{array}{l} \diagdown \text{CH}_2\text{-COOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{-COOH} \end{array} \\ \text{HOOC-CH}_2 \diagdown \text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_2\text{-COOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{-COOH} \end{array} \end{array}$ EGTA
$\begin{array}{c} \text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2 \diagup \text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N} \begin{array}{l} \diagdown \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH} \end{array} \\ \text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2 \diagdown \text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH} \end{array} \end{array}$ EDTP	$\begin{array}{c} \text{HOOC-CH}_2 \diagup \text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N} \begin{array}{l} \diagdown \text{CH}_2\text{-COOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{-COOH} \end{array} \\ \text{HOOC-CH}_2 \diagdown \text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_2\text{-COOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{-COOH} \end{array} \end{array}$ DPTA
$\begin{array}{c} \text{HOOC-CH}_2 \diagup \text{N-CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-N} \begin{array}{l} \diagdown \text{CH}_2\text{-COOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{-COOH} \end{array} \\ \text{HOOC-CH}_2 \diagdown \text{N-CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-N} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_2\text{-COOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{-COOH} \end{array} \end{array}$ DPTA-OH	$\begin{array}{c} \text{HOOC-CH}_2 \diagup \text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N} \begin{array}{l} \diagdown \text{CH}_2\text{-COOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{-COOH} \end{array} \\ \text{HOOC-CH}_2 \diagdown \text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_2\text{-COOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{-COOH} \end{array} \end{array}$ Acide 1,6-diaminohexane-N,N,N',N'-tétraacétique
$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-COOH} \\ \\ \text{N-CH}_2\text{-COOH} \\ \\ \text{HOOC-CH}_2 \diagup \text{N} \begin{array}{c} \diagdown \text{CH}_2\text{-COOH} \\ \\ \text{HOOC-CH}_2 \end{array} \end{array}$ Acide 1,4-phénylènediamine-N,N,N',N'-tétraacétique	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-COOH} \\ \\ \text{N-CH}_2\text{-COOH} \\ \\ \text{HOOC-CH}_2 \diagup \text{N} \begin{array}{c} \diagdown \text{CH}_2\text{-COOH} \\ \\ \text{HOOC-CH}_2 \end{array} \end{array}$ NTA
$\begin{array}{c} \text{HOOC-CH}_2 \diagup \text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N} \begin{array}{l} \diagdown \text{CH}_2\text{-COOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{-COOH} \end{array} \\ \text{HOOC-CH}_2 \diagdown \text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_2\text{-COOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{-COOH} \end{array} \end{array}$ HBED	$\text{HOOC-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-COOH}$ EDDA
$\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$ EDDP	$\begin{array}{c} \text{HOOC-CH(OH)-CH(OH)-CH(OH)-CH(OH)-CH}_2\text{-OH} \end{array}$ Acide gluconique
$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{HOOC} \end{array}$ Acide 2,4-dihydroxypyrimidine-5-carboxylique	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{N=N} \end{array}$ HABA
$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$ Acide salicylique	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$ Acide DL-pipécolinique
$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$ Acide glucosaminique	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{HO} \end{array}$ 2,4,5-trihydroxypyrimidine
$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$ 2-aminophénol	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} \\ \\ \text{OH} \end{array}$ 3-aminophénol
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{HN} \end{array}$ Hypoxanthine	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-N} \begin{array}{c} \diagup \text{C=S}^- \\ \diagdown \text{C=S} \end{array} \text{Na}^+ \end{array}$ DDC

ETUDES *IN VITRO* ET *IN VIVO* DE LA CHELATION DU MANGANESE

1. Etude *in vitro*

Cette présélection *in vitro* a été réalisée sur les 24 composés suivants, certains étant réputés comme agents complexants du manganèse : acide triéthylènetétraamino-N,N,N',N',N'',N'''-hexaacétique (TTHA) ; acide diéthylènetriamino-N,N,N',N',N''-pentaacétique (DTPA) ; acide éthylènediamino-N,N,N',N'-tétraacétique (EDTA) ; acide éthylèneglycol-bis(2-aminoéthyl)-N,N,N',N'-tétraacétique (EGTA) ; acide éthylènediamino-N,N,N',N'-tétrapropionique (EDTP) ; acide 1,3-diaminopropane-N,N,N',N'-tétraacétique (DPTA) ; acide 1,3-diamino-2-propanol-N,N,N',N'-tétraacétique (DPTA-OH) ; acide 1,6-diaminohexane-N,N,N',N'-tétraacétique ; acide 1,4-phénylènediamino-N,N,N',N'-tétraacétique ; acide nitriloacétique (NTA) ; acide N,N'-di(2-hydroxybenzyl)éthylènediamino-N,N'-diacétique (HBED) ; acide éthylènediamino-N,N'-diacétique (EDDA) ; acide éthylènediamino-N,N'-dipropionique (EDDP) ; acide gluconique ; acide 2,4-dihydroxypyrimidine-5-carboxylique ; acide 2'-(4-hydroxyphénylazo)benzoïque (HABA) ; acide salicylique ; acide DL-pipécolinique ; acide glucosaminique ; 2,4,5-trihydroxypyrimidine ; 2-aminophénol ; 3-aminophénol ; hypoxanthine ; diéthylldithiocarbamate de sodium (DDC).

Les formules chimiques de ces molécules figurent dans le tableau 11.

1.1. Matériel et méthode

1.1.1. Réactifs utilisés

- chlorure de manganèse tétrahydraté ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), DPTA, DPTA-OH, EDTP, EDDA, DDC, acide 1,6-diaminohexane-N,N,N',N'-tétraacétique, 2,4,5-trihydroxypyrimidine, 2-aminophénol et 3-aminophénol (Fluka, France)

- EDTA, DTPA, EGTA, NTA et acide salicylique (Prolabo, France)
- HABA, acide pipécolinique, hypoxanthine et acide 2,4-dihydroxypyrimidine-5-carboxylique (Aldrich, France)
- TTHA et acide gluconique (Sigma, France)
- EDDP et acide glucosaminique (ICN, France)
- HBED (Strem Chemicals Inc, France)
- acide 1,4-phénylènediamino-N,N,N',N'-tétraacétique (Lancaster, France).

1.1.2. Méthode

Cette étude est réalisée avec du sérum obtenu à partir de sang de bovin, fraîchement prélevé aux abattoirs de Mirecourt et recueilli dans des flacons en polypropylène. Après coagulation, le surnageant est récupéré et centrifugé à 3 000 g pendant 5 minutes, afin de recueillir le sérum.

Une solution aqueuse de chlorure de manganèse est ajoutée au sérum, de façon à obtenir une concentration finale de 200 $\mu\text{g Mn.L}^{-1}$. Le sérum chargé en manganèse est ensuite placé au bain-marie à + 37°C pendant 30 minutes, afin de permettre la fixation du manganèse sur les protéines sériques. Après ce temps d'incubation, l'agent chélateur étudié est introduit, de façon à obtenir une concentration finale en chélateur 100 fois supérieure à celle du manganèse. Le mélange obtenu est ensuite replacé au bain-marie pendant 45 minutes, puis placé à 4°C pendant 5 minutes afin de ralentir au maximum la réaction de complexation. Le mélange est ensuite placé dans des tubes Centrisart I (masse de rupture = 10 000 daltons, Sartorius AG, Allemagne) et centrifugé à 3 000 g pendant 1 heure et 30 minutes. Les principales protéines sériques complexantes ne traversant pas la membrane, l'ultrafiltrat contient donc du manganèse libre ou complexé à de petites molécules de masse inférieure à 10 000 (comprenant l'agent chélateur testé). Cet ultrafiltrat est conservé à + 4 °C jusqu'au dosage du manganèse par spectrométrie d'émission atomique (Spectra Span V, Spectrametrics). Un échantillon témoin, dépourvu d'agent chélateur, est réalisé dans les mêmes conditions expérimentales (blanc).

Le pourcentage de manganèse mobilisé est calculé avec la formule suivante :

$$\% = \frac{\text{concentration de manganèse dans l'ultrafiltrat } (\mu\text{g.L}^{-1})}{\text{concentration de manganèse dans le sérum chargé } (\mu\text{g.L}^{-1})} \times 100$$

1.1.3. Analyse statistique

Après vérification de la normalité des distributions et de l'homogénéité des variances (test de Bartlett), les comparaisons inter-groupes sont réalisées à l'aide du test PLSD de Fisher, après avoir effectué une analyse de la variance significative. L'hypothèse nulle est rejetée au seuil de 5 % ($p < 0,05$).

1.2. Résultats

Seuls les chélateurs permettant d'obtenir un pourcentage de mobilisation du manganèse supérieur à 50 % figurent dans le tableau 12.

Dans nos conditions expérimentales, très peu de manganèse (1,3 %) est retrouvé dans l'ultrafiltrat des tubes témoins (sérum bovin surchargé en manganèse, sans chélateur). Parmi les 24 composés testés, seuls des acides polyaminopolycarboxyliques permettent un déplacement efficace du manganèse (≥ 50 %) : DPTA, EDTA, DTPA, DPTA-OH, TTHA, HBED.

Tableau 12 : Mobilisation obtenue avec les meilleurs agents chélateurs ($n = 6$).

Chélateurs	Mn dans l'ultrafiltrat ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Mn mobilisé (%)
Témoin	$3,0 \pm 0,8$	1,3 %
DPTA	156 ± 4 ^{###}	78 %
EDTA	138 ± 2 ^{###}	69 %
DTPA	134 ± 7 ^{###}	67 %
DPTA-OH	130 ± 4 ^{###}	65 %
TTHA	126 ± 6 ^{###}	63 %
HBED	104 ± 3 ^{###}	52 %

Résultats exprimés en moyenne $\pm$ écart-type.

Significativement différent du groupe témoin : ^{###} $p < 0,0001$.

1.3. Discussion

Cette présélection *in vitro* a été réalisée sur 24 composés choisis notamment pour leur structure chimique caractérisée par la présence de groupements fonctionnels intéressants pour la complexation du manganèse. En effet, pour complexer le manganèse, le chélateur doit posséder des groupements donneurs d'électrons tels que des groupements carboxyliques, aminés, hydroxyles et/ou thiols (Aaseth, 1983).

La technique *in vitro* utilisée dans notre étude a précédemment été mise au point au laboratoire pour l'étude de la chélation de l'aluminium (Graff *et al.*, 1995 a et b) et repose sur l'évaluation de la capacité des différentes substances testées à déplacer le manganèse lié aux protéines de sérum bovin.

Cette technique a permis d'identifier 6 composés possédant une capacité de mobilisation supérieure ou égale à 50 % ; ce sont tous des acides polyaminopolycarboxyliques, c'est-à-dire possédant des groupements carboxyliques et aminés comme donneurs d'électrons (DTPA, EDTA, DPTA, DPTA-OH, TTHA, HBED).

Les résultats obtenus suggèrent que la présence de groupements carboxyliques et aminés, ainsi que leur nombre et leur position sur les molécules testées, sont déterminants pour la mobilisation du manganèse *in vitro*.

Toutefois, un nombre supérieur à 4, pour les groupements carboxyliques, et à 2, pour les groupements aminés, ne semble pas améliorer cette efficacité (cas de DTPA et TTHA, par rapport à EDTA). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'ion Mn^{2+} (comme l'ion Fe^{2+}) ne peut pas établir plus de 6 liaisons de coordinence, la présence de charges négatives supplémentaires n'apportant pas une meilleure stabilité au complexe formé.

Les composés possédant moins de 3 groupements carboxyliques (EDDA, EDDP, acide gluconique, acide salicylique, acide 2,4-dihydroxypyrimidine-5-carboxylique, HABA, acide pipécolinique) ou aucun groupement carboxylique (acide glucosaminique, 2,4,5-trihydroxypyrimidine, 2- et 3-aminophénol, hypoxanthine, DDC) se sont avérés inefficaces, malgré la présence d'autres groupements fonctionnels aminés, hydroxyles et/ou thiols. Le composé HBED semble faire exception (2 groupements carboxyliques ; 52 % de manganèse mobilisés) ; la présence de 2 groupements phénols pourrait éventuellement exercer une action favorable à la complexation du manganèse.

Il est intéressant de noter l'inefficacité de l'acide salicylique, ce qui est en contradiction avec les résultats d'autres auteurs (Tandon & Mathur, 1976). Cette inefficacité conforte notre hypothèse, quant à la présence de groupements fonctionnels particuliers, ce composé ne présentant qu'un groupement carboxylique et un groupement hydroxyle.

Enfin, la nature de la chaîne carbonée, séparant 2 groupements aminés voisins, mais aussi les différents groupements carboxyliques, paraît avoir une influence non négligeable. Ainsi les composés présentant une chaîne courte (2 à 3 carbones) ont une efficacité relativement proche (EDTA, DPTA, DPTA-OH, TTHA et DTPA). Par contre, l'allongement de la chaîne carbonée semble défavorable à une bonne mobilisation du manganèse (EGTA, acide 1,6-diaminohexane-N,N,N',N'-tétraacétique, EDTP).

La présence d'un cycle aromatique (structure plane) comme chaîne carbonée semble également défavorable, probablement par éloignement des groupements carboxyliques et aminés (cas de l'acide 1,4-phénylènediamino-N,N,N',N'-tétraacétique).

1.4. Conclusion

Une bonne mobilisation *in vitro* du manganèse nécessite la présence d'un nombre suffisant de groupements fonctionnels, en particulier des groupements carboxyliques et aminés, et la présence d'une géométrie particulière permettant la formation d'une « cage » autour du cation métallique, lors de l'établissement des 6 liaisons de coordinence.

Sur les 6 composés efficaces *in vitro*, 5 sont retenus pour l'étude *in vivo* suivante (DTPA, DPTA, DPTA-OH, TTHA et HBED). Ces molécules présentent des structures chimiques suffisamment différentes pour obtenir un large échantillonnage quant à la géométrie, la nature et le nombre de groupements fonctionnels intéressants. A noter que le DTPA (78 % de mobilisation) est choisi comme substance de référence, préférentiellement à l'EDTA (69 % de mobilisation), en raison de sa plus grande efficacité à mobiliser le manganèse *in vivo* (Kaur *et al.*, 1984 ; Tandon & Singh, 1975 ; Tandon *et al.*, 1975) et du fait de l'inefficacité de l'EDTA en traitement clinique (Pelnaver, 1955 ; Tepper, 1961).

2. Etude *in vivo*

2.1. Matériel et méthodes

2.1.1. Réactifs utilisés

- chlorure de manganèse tétrahydraté, DPTA, DPTA-OH, (Fluka, France)
- DTPA (Prolabo, France)
- HBED (Strem Chemicals Inc, France)
- chlorure de sodium (Aldrich, France)
- TTHA (Sigma, France)
- acide nitrique suprapur (Merck, France)
- pentobarbital sodique (Sanofi Santé Animale, France)
- héparine sodique 5000 UI.mL⁻¹ (Panpharma, France)

2.1.2. Méthode

L'origine des animaux et les conditions d'hébergement sont les mêmes que celles décrites dans la première partie expérimentale.

Des rats ($n = 48$) pesant 345 ± 20 g sont intoxiqués par voie i.p. au chlorure de manganèse dissous dans du NaCl 0,9%, à raison de 6 mg Mn.kg^{-1} de poids corporel par jour, 5 jours par semaine, pendant 5 semaines. Après la dernière injection, les animaux sont laissés au repos pendant 72 heures. Puis, ils sont répartis au hasard en 6 groupes ($n = 8$). Un groupe reçoit des injections i.p. quotidiennes de solution de NaCl 0,9 %, pendant 2 semaines (groupe Mn). Chacun des 5 autres groupes est traité avec un des agents chélateurs sélectionnés dans l'étude *in vitro*. Ces substances sont dissoutes dans une solution de NaCl 0,9 % et injectées en quantité équimolaire à celle de manganèse ($0,11 \text{ mmol.kg}^{-1}$ de poids corporel par jour). Les animaux sont pesés chaque jour et les doses à administrer sont ajustées en conséquence. Toutes les solutions sont préparées extemporanément.

L'urine et les fèces sont récupérées pendant 24 heures, à dates précises : 2 jours avant le début de l'intoxication par le manganèse (VR), à la fin de l'intoxication (J30) et pendant les

traitements avec les différents agents chélateurs (T1, T3, T11). Pour se faire, les animaux sont maintenus en cages à métabolisme individuelles pendant 24 heures, immédiatement après l'administration des solutions ; ils sont soumis à une diète solide afin d'éviter la contamination de l'urine et des fèces.

Les fèces sont pesées et solubilisées avec de l'acide nitrique. Cette solubilisation est accélérée par chauffage sur un bain de sable de Fontainebleau (environ 70°C).

L'urine est additionnée d'acide nitrique (10 µL pour 5 mL d'urine), afin d'éviter la précipitation des divers éléments.

Après les différents traitements, une période de repos de 72 heures est respectée. Les rats sont ensuite anesthésiés au pentobarbital sodique (60 mg.kg⁻¹ de poids corporel). Le sang est prélevé dans des tubes héparinés, par ponction dans la veine abdominale à l'aide d'un dispositif de perfusion à ailettes. Une partie est immédiatement centrifugée à 3000 g pendant 3 minutes, afin de récupérer le plasma. Le sang et le plasma sont conservés à 4°C.

Différents organes (cerveau, moelle épinière, fémur, cœur, rate, pancréas, reins, testicules, quadriceps crural) sont rapidement prélevés, pesés et conservés à -18°C.

Avant le dosage des différents éléments, les organes sont décongelés et solubilisés avec de l'acide nitrique, à une température proche de 70°C (bain de sable de Fontainebleau).

La détermination des concentrations en manganèse, fer, zinc, cuivre, phosphore, magnésium et calcium est réalisée par spectrométrie d'émission atomique (Spectrametrics Spectra Span V). A noter que la concentration plasmatique de fer n'est pas déterminée, en raison d'une possibilité de contamination par hémolyse lors du prélèvement sanguin et de la centrifugation.

2.1.3. Analyse statistique

Après vérification de la normalité des distributions et de l'homogénéité des variances (test de Bartlett), les comparaisons inter-groupes sont réalisées à l'aide du test PLSD de Fisher, après avoir effectué une analyse de la variance significative. L'hypothèse nulle est rejetée au seuil de 5 % ($p < 0,05$).

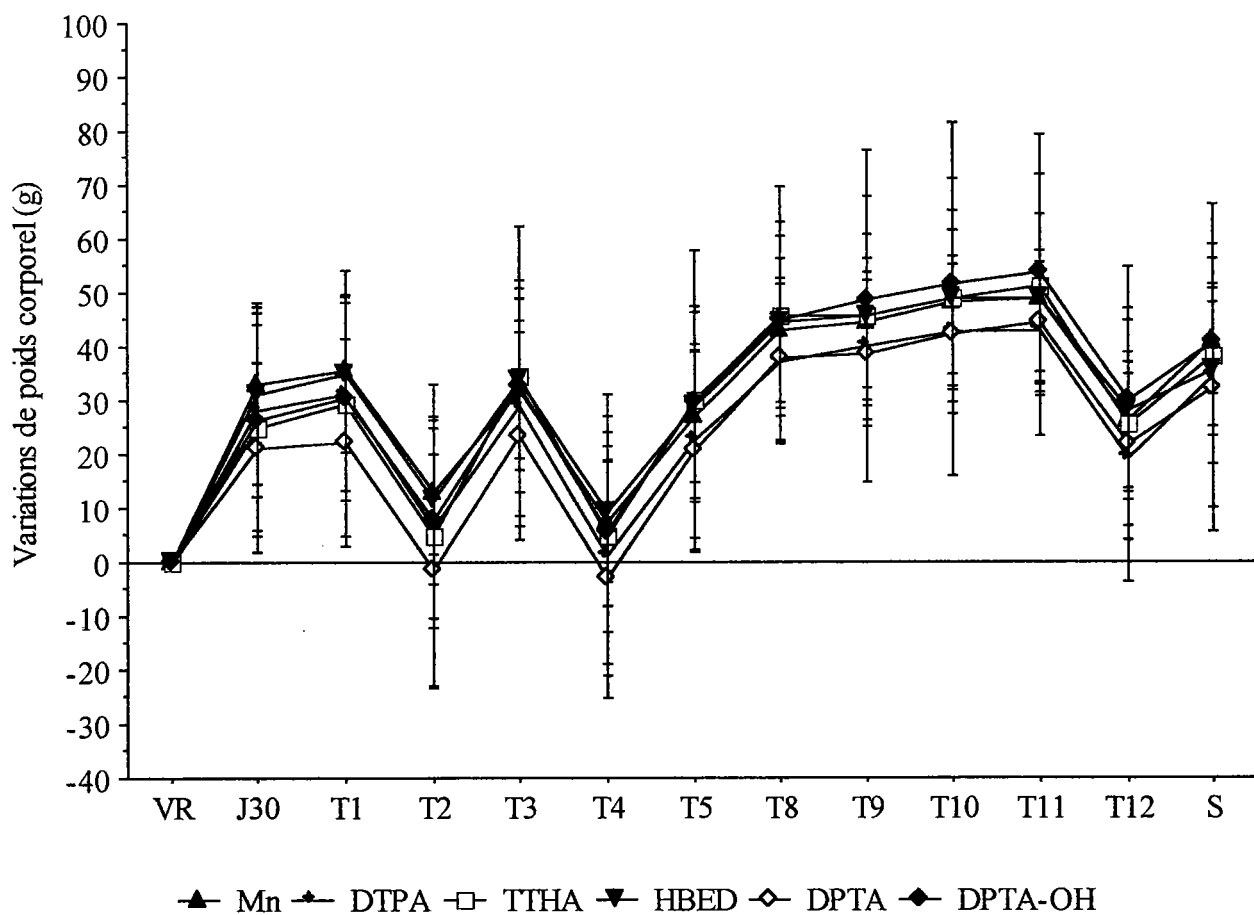


Figure 12 : Variations de poids corporel, par rapport au poids initial (moyenne $\pm$ écart-type).

VR : valeur de référence, première mise en cage à métabolisme

J30 : dernier jour d'intoxication par le manganèse

T1 à T12 : traitement par les chélateurs

S : sacrifice.

2.2. Résultats

2.2.1. Variations pondérales

Les résultats relatifs à l'évolution pondérale sont présentés sur la figure 12 ; ceux concernant le poids des organes au moment du sacrifice sont reportés en annexe 9.

Les résultats obtenus mettent en évidence une homogénéité dans les poids de l'ensemble des animaux avant (VR) et à la fin (J30) de l'exposition au chlorure de manganèse.

Les traitements avec les différents chélateurs potentiels n'ont pas d'influence significative sur la prise de poids corporel, ni sur le poids des organes prélevés.

2.2.2. Effet des chélateurs sur les excrétions urinaire et fécale du manganèse, ainsi que sur l'excrétion urinaire des autres éléments étudiés

Dans tous les cas, aucune différence significative n'est constatée entre les 6 groupes expérimentaux au cours des relevés effectués avant (VR) et à la fin de l'exposition au chlorure de manganèse (J30).

Une augmentation significative de l'**excrétion urinaire du manganèse** est constatée avec DTPA et TTHA (figure 13a). Importante au relevé T1 (respectivement x 102 et x 78, par rapport au groupe Mn), cette augmentation diminue progressivement au cours du traitement (respectivement x 28 et x 19 à T3, puis x 11 et x 8,5 à T11). Les effets du DTPA sont significativement supérieurs à ceux du TTHA tout au long du traitement.

Aucun effet significatif n'est constaté avec les autres traitements (HBED, DPTA et DPTA-OH).

Le traitement avec les différents chélateurs n'a pas d'effet significatif sur l'**excrétion fécale du manganèse**, excepté une diminution avec DTPA, significative seulement à T1 (- 58 % par rapport au groupe Mn) (figure 13b).

Concernant les autres éléments étudiés, l'ensemble des composés testés a provoqué une augmentation significative de l'**excrétion urinaire du fer** (figure 14a).

Les effets les plus constants sont obtenus avec HBED et DTPA (respectivement x 2 et x 1,4 par rapport au groupe Mn).

Concernant TTHA et DPTA, leurs effets sur l'excrétion urinaire du fer ont diminué progressivement au cours du traitement, pour devenir non significatif au cours du dernier relevé pour DPTA (effet maximal à T1, respectivement x 1,8 et x 1,6).

Enfin, pour DPTA-OH, bien qu'il ait tendance à augmenter l'excrétion urinaire du manganèse, l'effet est significatif seulement au relevé T3 (x 1,2 par rapport au groupe Mn).

L'excrétion urinaire du zinc est également augmentée avec l'ensemble des composés testés (figure 14b).

Les effets les plus importants sont obtenus avec DTPA, TTHA, DPTA et DPTA-OH (augmentations d'un facteur 25 à 42 par rapport au groupe Mn, au cours des 3 relevés). Concernant HBED, une tendance à l'augmentation significative seulement au relevé T3 est observée (x 4,2 par rapport au groupe Mn).

L'ensemble des composés testés a provoqué une augmentation significative de l'excrétion urinaire du cuivre, au cours des 3 relevés (de x 1,8 à x 3,5 par rapport au groupe Mn) (figure 14c).

Une augmentation significative de **l'excrétion urinaire du phosphore** est observée avec DTPA et TTHA au cours des 2 derniers relevés (respectivement x 1,4 et x 1,6 à T3 ; x 1,3 et x 1,5 à T11 par rapport au groupe Mn).

Une augmentation de l'excrétion de cet élément est également observée avec DPTA à T3 et HBED à T11 (respectivement x 1,3 et x 1,4 par rapport au groupe Mn) (figure 15a).

Le traitement avec les différents chélateurs a pas d'effet significatif sur **l'excrétion urinaire du magnésium**, excepté une augmentation significative à T1 avec DPTA (x 1,3 par rapport au groupe Mn) (figure 15b).

Une augmentation significative de **l'excrétion urinaire du calcium** est constatée avec DTPA au cours des trois relevés T1 (x 1,7), T3 (x 1,9) et T11 (x 2,1) (figure 15c).

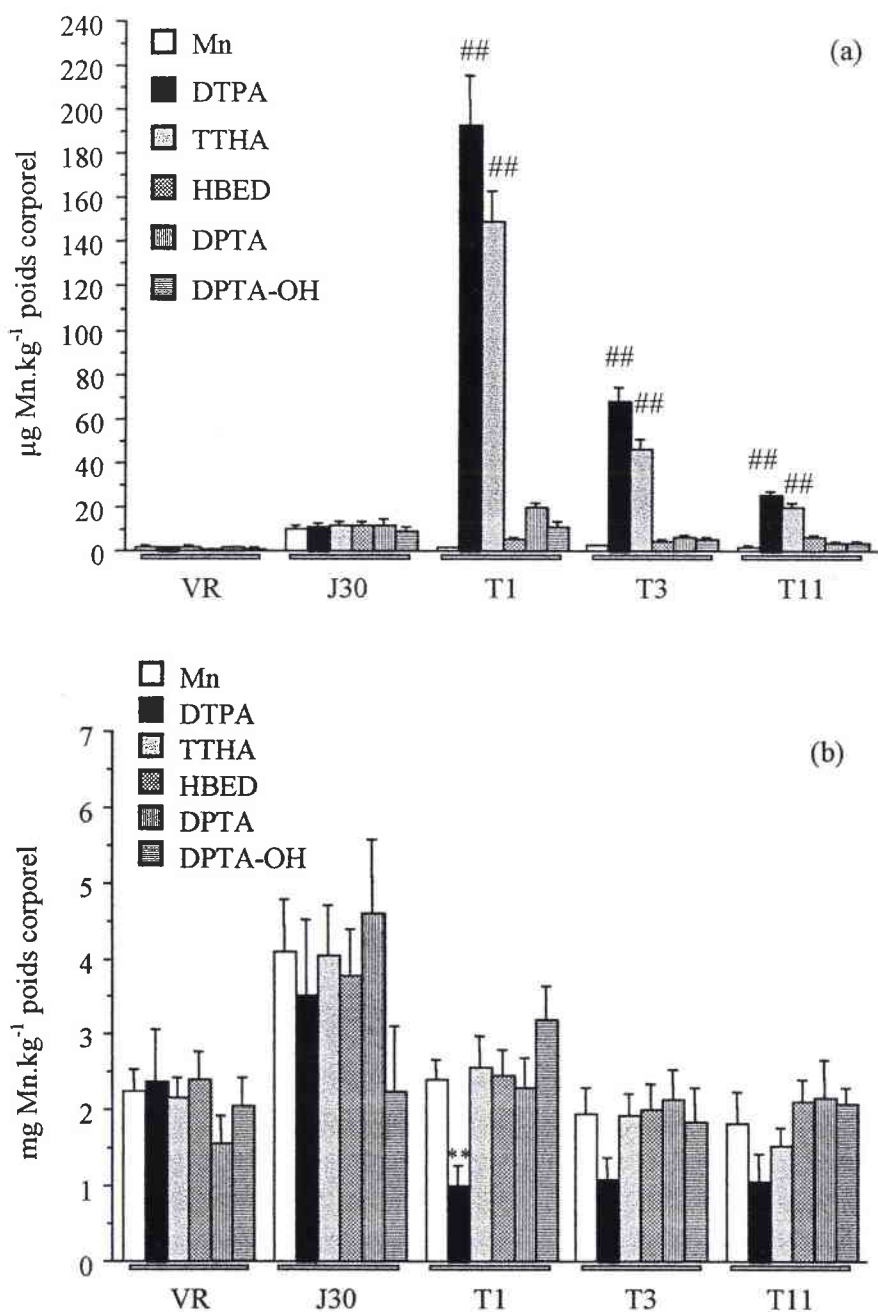


Figure 13 : Excrétions urinaire (a) et fécale (b) du manganèse.

Résultats exprimés en moyennes $\pm$ écarts-types. VR : valeur de référence ; J30 : dernier jour d'intoxication par le manganèse ; T : traitement par les chélateurs.

Significativement différent du groupe Mn : ** $p < 0,01$; ## $p < 0,0001$.

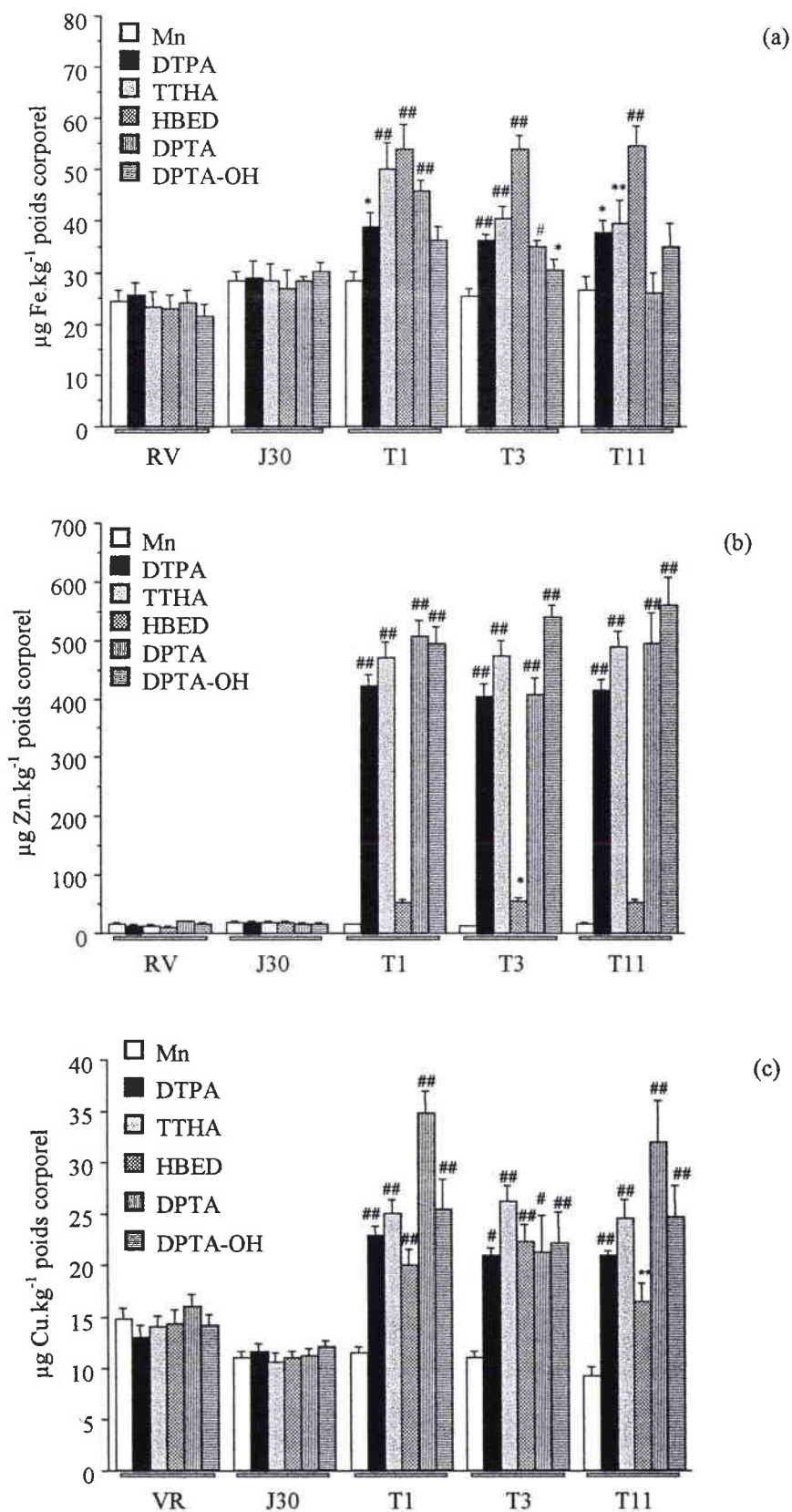


Figure 14 : Excrétions urinaires du fer (a), du zinc (b) et du cuivre (c).

Résultats exprimés en moyenne $\pm$ écart-type. VR : valeur de référence ; J30 : dernier jour d'intoxication par le manganèse ; T : traitement par les chélateurs.

Significativement différent du groupe Mn : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; # $p < 0,001$; ## $p < 0,0001$.

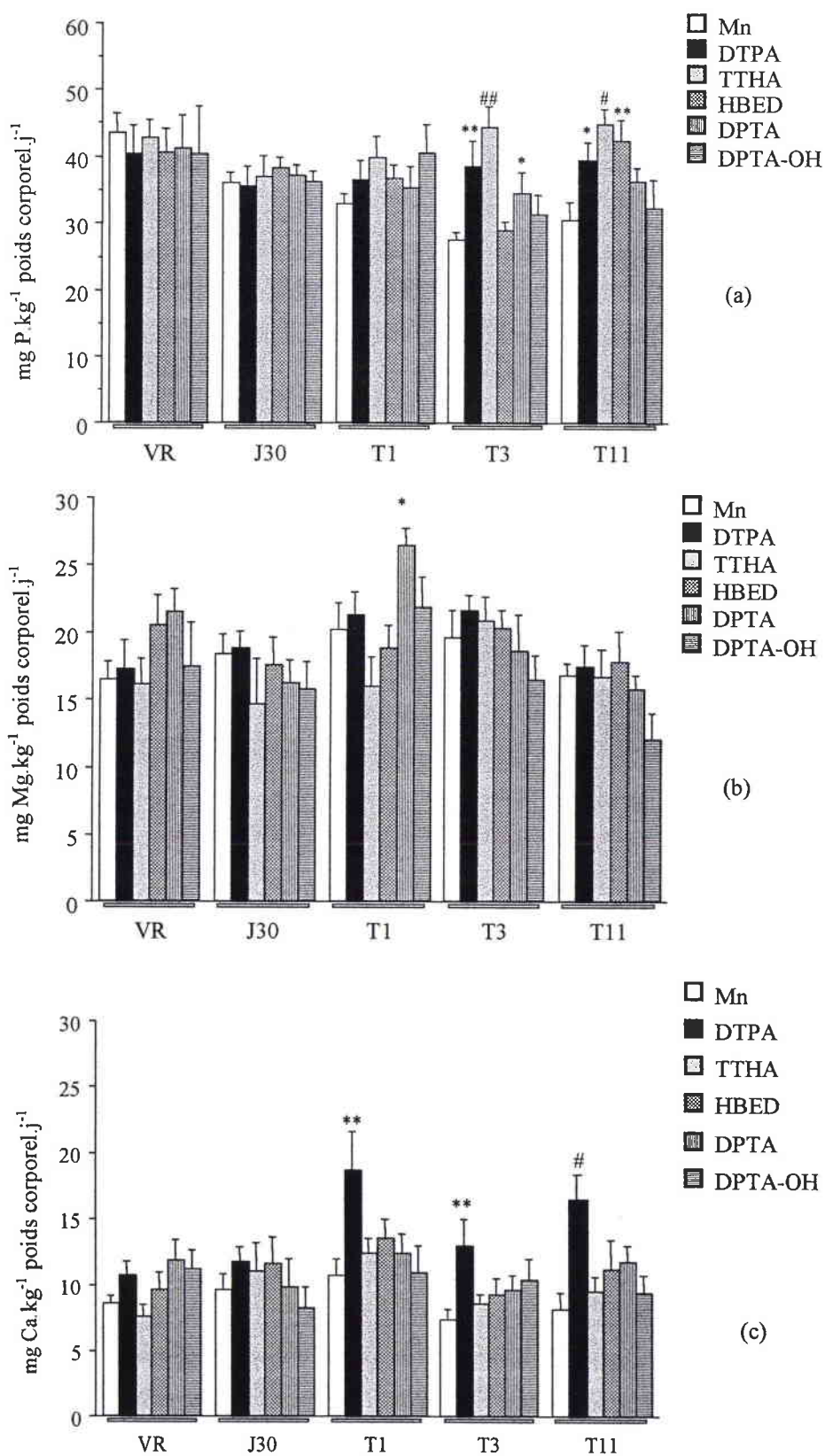


Figure 15 : Excrétions urinaires du phosphore (a), du magnésium (b) et du calcium (c).

Résultats exprimés en moyenne $\pm$ écart-type. VR : valeur de référence ; J30 : dernier jour d'intoxication par le manganèse ; T : traitement par les chélateurs.

Significativement différent du groupe Mn : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; # $p < 0,001$; ## $p < 0,0001$.

2.2.3. Taux sanguin et plasmatique du manganèse et des autres éléments étudiés, au moment du sacrifice

Le traitement avec les différents chélateurs n'a pas d'effet significatif sur les concentrations sanguine et plasmatique de l'ensemble des éléments étudiés, excepté une augmentation significative de la concentration en cuivre dans le sang avec DTPA et TTHA (respectivement + 19 % et + 20 %) ainsi qu'une diminution dans le plasma (respectivement - 15 % et - 10 %) (tableaux 13 et 14).

Tableau 13 : Concentrations sanguines du manganèse et des autres éléments étudiés.

Eléments	Mn	DTPA	TTHA	HBED	DPTA	DPTA-OH
Mn (µg.L ⁻¹)	192 ± 68	230 ± 60	237 ± 87	240 ± 77	200 ± 30	232 ± 76
Fe (mg.L ⁻¹)	448 ± 31	449 ± 89	414 ± 57	444 ± 68	440 ± 52	450 ± 46
Zn (mg.L ⁻¹)	5,0 ± 0,4	5,5 ± 0,4	5,2 ± 0,3	5,2 ± 0,6	5,5 ± 0,4	5,2 ± 0,6
Cu (µg.L ⁻¹)	718 ± 147	856 ± 62**	864 ± 71**	752 ± 86	757 ± 130	720 ± 97
P (mg.L ⁻¹)	379 ± 32	396 ± 24	363 ± 23	383 ± 29	391 ± 37	393 ± 39
Mg (mg.L ⁻¹)	51 ± 4	52 ± 1	51 ± 2	51 ± 2	51 ± 7	49 ± 5
Ca (mg.L ⁻¹)	131 ± 16	128 ± 6	128 ± 6	132 ± 9	134 ± 13	122 ± 14

Résultats exprimés en moyenne ± écart-type.

Significativement différent du groupe Mn : ** p < 0,01.

Tableau 14 : Concentrations plasmatiques du manganèse et des autres éléments étudiés.

Eléments	Mn	DTPA	TTHA	HBED	DPTA	DPTA-OH
Mn (µg.L ⁻¹)	15,6 ± 3,5	16,0 ± 3,8	19,8 ± 5,8	16,3 ± 7,1	16,4 ± 3,9	15,8 ± 3,3
Zn (µg.L ⁻¹)	995 ± 104	914 ± 65	926 ± 148	973 ± 44	1053 ± 68	1019 ± 123
Cu (µg.L ⁻¹)	1154 ± 107	982 ± 74 #	1040 ± 118 *	1103 ± 83	1202 ± 136	1074 ± 106
P (mg.L ⁻¹)	115 ± 11	117 ± 12	106 ± 8	117 ± 11	112 ± 17	121 ± 22
Mg (mg.L ⁻¹)	25 ± 4	24 ± 2	24 ± 2	24 ± 2	28 ± 4	28 ± 5
Ca (mg.L ⁻¹)	142 ± 11	148 ± 8	142 ± 8	149 ± 6	150 ± 8	145 ± 8

Résultats exprimés en moyenne ± écart-type.

Significativement différent du groupe Mn : * p < 0,05 ; # p < 0,001.

2.2.4. Concentrations tissulaires du manganèse et des autres éléments étudiés, au moment du sacrifice

• Concentrations tissulaires en manganèse (tableau 15)

Concernant le traitement au DTPA, une diminution conséquente de la concentration en manganèse est observée dans la rate (- 49 % par rapport au groupe Mn) ; des effets significatifs, mais nettement plus faibles sont constatés pour les autres organes prélevés (de - 6 % pour le cœur, à - 32 % pour le pancréas).

Un effet identique sur la rate (- 49 %) est obtenu avec TTHA. De plus, ce composé réduit significativement la concentration en manganèse dans le cœur, les testicules et le pancréas (respectivement - 8 %, - 19 % et - 26 %).

Une diminution significative de la concentration en manganèse dans la rate est également constatée avec DPTA et DPTA-OH (respectivement - 21 % et - 35 %). Ces 2 composés ont de faibles effets, quoique significatifs, au niveau des reins (respectivement - 7 % et - 8 %) et du cœur (respectivement + 5 % et + 6 %). De plus, une diminution significative est observée dans le muscle squelettique (- 9 %) avec DPTA-OH, ainsi qu'une augmentation significative dans le cerveau (+ 17 %). Concernant HBED, une diminution significative est obtenue au niveau du cœur (- 6 %).

Tableau 15 : Concentrations en manganèse dans les organes ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids frais, excepté le fémur : $\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec).

Organes	Mn	DTPA	TTHA	HBED	DPTA	DPTA-OH
Encéphale	1,02 ± 0,09	0,91 ± 0,10 *	0,99 ± 0,09	1,11 ± 0,12	1,11 ± 0,07	1,19 ± 0,14 **
Moelle ép.	0,98 ± 0,11	0,80 ± 0,09 #	0,97 ± 0,09	1,01 ± 0,13	0,97 ± 0,11	1,06 ± 0,11
Fémur	41 ± 5	35 ± 5 **	38 ± 5	38 ± 6	42 ± 4	43 ± 4
Cœur	0,64 ± 0,04	0,60 ± 0,03 **	0,59 ± 0,04 **	0,60 ± 0,04 **	0,67 ± 0,03 *	0,68 ± 0,03 **
Reins	1,49 ± 0,12	1,31 ± 0,05 **	1,48 ± 0,11	1,48 ± 0,15	1,38 ± 0,09 *	1,37 ± 0,16 *
Testicules	0,64 ± 0,1	0,52 ± 0,14 *	0,52 ± 0,09 *	0,69 ± 0,16	0,58 ± 0,09	0,66 ± 0,13
Rate	1,12 ± 0,37	0,57 ± 0,10 ###	0,57 ± 0,10 ###	1,13 ± 0,44	0,88 ± 0,23 *	0,73 ± 0,08 **
Pancréas	3,4 ± 0,6	2,3 ± 0,4 #	2,5 ± 0,7 #	3,2 ± 0,8	3,0 ± 0,3	3,4 ± 0,4
Muscle squ.	0,22 ± 0,02	0,19 ± 0,01 ###	0,21 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,20 ± 0,01 *

Résultats exprimés en moyenne ± écart-type.

Significativement différent du groupe Mn : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; # $p < 0,001$; ### $p < 0,0001$.

• Concentrations tissulaires en fer (tableau 16)

Dans le cas des groupes traités avec les chélateurs, une diminution significative de la concentration en fer est observée dans la rate, pour les groupes traités avec DTPA, TTHA et HBED (respectivement - 30 %, - 36 % et - 24 % par rapport au groupe Mn). Ce dernier composé réduit également significativement la concentration en fer, dans les reins (- 21 %) et le muscle squelettique (- 15 %).

Aucun effet significatif n'est constaté après traitement avec DPTA et DPTA-OH.

Tableau 16 : Concentrations en fer dans les organes ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids frais, excepté le fémur : $\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec).

Organes	Mn	DTPA	TTHA	HBED	DPTA	DPTA-OH
Encéphale	15,6 ± 1,2	16,6 ± 1,8	15,8 ± 2,5	16,0 ± 2,7	16,8 ± 1,6	15,8 ± 1,04
Moelle ép.	13,6 ± 2,3	13,0 ± 2,5	14,8 ± 2,6	12,7 ± 3,1	13,3 ± 1,5	14,8 ± 2,0
Fémur	98 ± 16	104 ± 13	102 ± 23	84 ± 16	106 ± 15	109 ± 18
Cœur	70 ± 7	69 ± 3	72 ± 8	69 ± 7	71 ± 3	73 ± 4
Reins	77 ± 8	70 ± 7	72 ± 11	61 ± 10 ^{##}	73 ± 3	75 ± 9,3
Testicules	16,7 ± 4,5	20,6 ± 7,9	19,4 ± 6,6	18,9 ± 7,4	17,1 ± 2,5	16,7 ± 3,8
Rate	866 ± 191	604 ± 210 **	550 ± 132 **	659 ± 262 *	757 ± 187	984 ± 307
Pancréas	36 ± 6	42 ± 8	38 ± 4	36 ± 6	36 ± 7	39 ± 3
Muscle squ.	9,7 ± 1,0	9,3 ± 0,6	9,5 ± 1,3	8,2 ± 0,9 [#]	9,8 ± 0,6	8,9 ± 0,5

Résultats exprimés en moyenne ± écart-type.

Significativement différent du groupe Mn : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; [#] $p < 0,001$; ^{##} $p < 0,0001$.

• **Concentrations tissulaires en zinc (tableau 17)**

Après traitement avec DTPA et TTHA, une augmentation significative et conséquente de la concentration en zinc est constatée dans les reins (respectivement + 42 % et + 83 % par rapport au groupe Mn). De faibles diminutions, quoique significatives, sont observées dans le pancréas (- 11 %) et le fémur (- 9 %) avec ces 2 composés, ainsi que dans le muscle squelettique (- 7 %) avec TTHA.

Une diminution significative de la concentration en zinc, dans le muscle squelettique (- 14 %), est également notée avec HBED.

Si aucun effet significatif n'est rapporté pour DPTA, une légère diminution de la concentration en zinc est observée dans le fémur (- 12 %) avec DPTA-OH.

Tableau 17 : Concentrations en zinc dans les organes ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids frais, excepté le fémur : $\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec).

Organes	Mn	DTPA	TTHA	HBED	DPTA	DPTA-OH
Encéphale	11,6 ± 0,7	11,3 ± 1,1	11,3 ± 1,0	11,4 ± 0,8	12,3 ± 0,5	12,1 ± 0,5
Moelle ép.	6,8 ± 0,9	6,2 ± 1,3	7,0 ± 1,0	7,2 ± 0,8	6,5 ± 0,4	6,8 ± 0,1
Fémur	196 ± 16	178 ± 16 **	179 ± 11 *	191 ± 12	184 ± 15	172 ± 17 #
Cœur	16,8 ± 1,1	16,7 ± 1,8	16,7 ± 1,3	16,6 ± 0,9	16,5 ± 1,4	16,2 ± 1,5
Reins	24 ± 1	34 ± 3 ###	44 ± 4 ###	24 ± 2	23 ± 1	24 ± 1
Testicules	26 ± 1	24 ± 3	26 ± 1	26 ± 1	25 ± 1	25 ± 1
Rate	20,1 ± 0,9	20,3 ± 1,4	20,6 ± 0,8	19,8 ± 1,1	20,7 ± 0,9	21,7 ± 2,0
Pancréas	20,8 ± 2,4	18,6 ± 2,9 *	18,6 ± 3,0 *	20,4 ± 2,3	20,5 ± 1,0	22,8 ± 1,7
Muscle squ.	10,9 ± 0,7	10,4 ± 0,6	10,1 ± 0,7 *	9,4 ± 0,8 ###	11,0 ± 0,4	10,6 ± 0,5

Résultats exprimés en moyenne ± écart-type.

Significativement différent du groupe Mn : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; # $p < 0,001$; ### $p < 0,0001$.

• Concentrations tissulaires en cuivre (tableau 18)

Après traitement avec DPTA, une augmentation significative et conséquente de la concentration en cuivre est constatée au niveau des reins (+ 60 % par rapport au groupe Mn), ainsi qu'une diminution significative au niveau du cerveau (- 24 %).

Les mêmes tendances sont notées pour DPTA-OH (+ 24 % dans les reins et - 44 % dans le cerveau). De plus, ce dernier composé réduit significativement la concentration en cuivre, dans le muscle squelettique (- 12 %).

Concernant HBED, seule une légère diminution, quoique significative, est observée au niveau du muscle squelettique (- 7 %).

Aucun effet significatif n'est constaté après traitements avec DTPA et TTHA.

Tableau 18 : Concentrations en cuivre dans les organes ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids frais, excepté le fémur : $\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec).

Organes	Mn	DTPA	TTHA	HBED	DPTA	DPTA-OH
Encéphale	2,43 $\pm$ 0,20	2,40 $\pm$ 0,19	2,31 $\pm$ 0,18	2,45 $\pm$ 0,22	1,84 $\pm$ 0,41 [#]	1,36 $\pm$ 0,44 ^{###}
Moelle ép.	1,31 $\pm$ 0,08	1,26 $\pm$ 0,11	1,31 $\pm$ 0,10	1,27 $\pm$ 0,09	1,31 $\pm$ 0,06	1,30 $\pm$ 0,13
Muscle squ.	1,00 $\pm$ 0,09	0,98 $\pm$ 0,06	0,98 $\pm$ 0,08	0,93 $\pm$ 0,07 *	0,95 $\pm$ 0,06	0,88 $\pm$ 0,07 ^{###}
Cœur	5,1 $\pm$ 0,3	4,8 $\pm$ 0,2	4,8 $\pm$ 0,2	4,8 $\pm$ 0,2	4,9 $\pm$ 0,1	5,0 $\pm$ 0,1
Reins	8,6 $\pm$ 1,8	7,6 $\pm$ 2,1	8,4 $\pm$ 1,2	7,6 $\pm$ 1,2	13,8 $\pm$ 2,6 ^{###}	10,7 $\pm$ 1,2 *
Testicules	2,0 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,1
Rate	1,45 $\pm$ 0,08	1,38 $\pm$ 0,06	1,46 $\pm$ 0,10	1,46 $\pm$ 0,04	1,43 $\pm$ 0,06	1,42 $\pm$ 0,06
Pancréas	1,23 $\pm$ 0,11	1,29 $\pm$ 0,14	1,28 $\pm$ 0,10	1,23 $\pm$ 0,09	1,24 $\pm$ 0,10	1,34 $\pm$ 0,12
Fémur	1,92 $\pm$ 0,11	1,83 $\pm$ 0,10	1,88 $\pm$ 0,11	1,94 $\pm$ 0,10	1,94 $\pm$ 0,14	1,87 $\pm$ 0,18

Résultats exprimés en moyenne $\pm$ écart-type.

Significativement différent du groupe Mn : * $p < 0,05$; # $p < 0,001$; ### $p < 0,0001$.

• Concentrations tissulaires en magnésium (tableau 19)

Après traitement avec DTPA, une diminution significative de la concentration en magnésium est observée au niveau du fémur et des reins (respectivement - 4 % et - 8 % par rapport au groupe Mn).

Une diminution significative dans les reins est également constatée avec HBED (- 7 %).

Concernant le traitement avec DPTA, la concentration en magnésium diminue significativement au niveau du fémur (- 8 %) et augmente au niveau des reins (+ 5 %).

Enfin, avec DPTA-OH, une diminution significative est observée dans le fémur (- 14 %) et dans la rate (- 4 %), ainsi qu'une augmentation significative dans la moelle épinière (+ 7 %).

Aucun effet significatif n'est constaté après traitement avec TTHA.

Tableau 19 : Concentrations en magnésium dans les organes ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids frais, excepté le fémur : mg.g^{-1} de poids sec).

Organes	Mn	DTPA	TTHA	HBED	DPTA	DPTA-OH
Encéphale	176 ± 7	182 ± 11	177 ± 6	179 ± 8	179 ± 6	178 ± 12
Moelle ép.	196 ± 10	190 ± 17	201 ± 6	199 ± 13	203 ± 6	209 ± 6 **
Fémur	5,0 ± 0,2	4,8 ± 0,2 *	4,9 ± 0,2	4,9 ± 0,2	4,6 ± 0,3 #	4,3 ± 0,2 ###
Cœur	278 ± 11	271 ± 13	281 ± 9	280 ± 11	279 ± 5	280 ± 5
Reins	278 ± 13	256 ± 10 ##	278 ± 10	258 ± 6 #	292 ± 11**	269 ± 12
Testicules	187 ± 13	188 ± 14	192 ± 5	192 ± 17	185 ± 5	185 ± 7
Rate	230 ± 8	233 ± 7	233 ± 11	227 ± 8	229 ± 11	221 ± 6 *
Pancréas	267 ± 29	250 ± 27	268 ± 45	284 ± 20	260 ± 42	271 ± 31
Muscle squ.	369 ± 11	383 ± 18	372 ± 16	359 ± 11	365 ± 18	367 ± 17

Résultats exprimés en moyenne ± écart-type.

Significativement différent du groupe Mn : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; # $p < 0,001$; ### $p < 0,0001$.

• Concentrations tissulaires en calcium (tableau 20)

Une diminution significative de la concentration en calcium est observée dans la moelle épinière, après le traitement au DTPA (- 43 % par rapport au groupe Mn). Par contre, pour les groupes traités avec TTHA, HBED et DPTA-OH, une augmentation significative est constatée au niveau de ce même tissu (respectivement, + 47 %, + 54 % et + 46 % par rapport au groupe Mn). Notons que ces résultats sont à considérer avec prudence en raison d'une grande variabilité intra-groupe, probablement due à une contamination de la moelle épinière par du tissu osseux lors de son prélèvement.

Enfin, une diminution significative de la concentration en calcium est observée dans le fémur, avec DPTA et DPTA-OH (respectivement - 5 % et - 14 % par rapport au groupe Mn).

Tableau 20 : Concentrations en calcium dans les organes ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids frais, excepté le fémur : mg.g^{-1} de poids sec).

Organes	Mn	DTPA	TTHA	HBED	DPTA	DPTA-OH
Encéphale	144 ± 83	152 ± 88	138 ± 76	116 ± 47	188 ± 87	164 ± 52
Moelle ép.	621 ± 171	352 ± 92 **	914 ± 199 **	958 ± 257 **	770 ± 209	907 ± 199 **
Fémur	192 ± 8	189 ± 8	190 ± 6	185 ± 9	183 ± 16 *	164 ± 11 ^{##}
Cœur	49 ± 4	50 ± 5	46 ± 4	49 ± 5	49 ± 2	48 ± 3
Reins	81 ± 6	83 ± 8	83 ± 8	80 ± 6	80 ± 5	75 ± 6
Testicules	58 ± 11	48 ± 2	49 ± 3	54 ± 8	56 ± 34	45 ± 20
Rate	50 ± 8	49 ± 4	49 ± 3	53 ± 8	50 ± 9	42 ± 3
Pancréas	85 ± 7	89 ± 12	77 ± 8	86 ± 8	82 ± 6	91 ± 5
Muscle squ.	64 ± 4	64 ± 5	64 ± 2	64 ± 8	61 ± 5	59 ± 5

Résultats exprimés en moyenne ± écart-type.

Significativement différent du groupe Mn : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ^{##} $p < 0,0001$.

• Concentrations tissulaires en phosphore (tableau 21)

Après traitement avec les différents chélateurs, aucune perturbation significative de la distribution tissulaire du phosphore n'est observée.

Tableau 21 : Concentrations en phosphore dans les organes ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids frais, excepté le fémur : mg.g^{-1} de poids sec).

Organes	Mn	DTPA	TTHA	HBED	DPTA	DPTA-OH
Encéphale	$2,6 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,2$
Moelle ép.	$3,9 \pm 0,2$	$4,0 \pm 0,3$	$4,1 \pm 0,2$	$4,0 \pm 0,3$	$3,9 \pm 0,1$	$4,0 \pm 0,2$
Fémur	89 ± 2	90 ± 4	91 ± 2	90 ± 4	90 ± 3	87 ± 3
Cœur	$2,2 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1$
Reins	$2,7 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,1$
Testicules	$1,68 \pm 0,14$	$1,67 \pm 0,16$	$1,75 \pm 0,09$	$1,73 \pm 0,09$	$1,63 \pm 0,06$	$1,65 \pm 0,05$
Pancréas	$3,6 \pm 0,4$	$3,2 \pm 0,3$	$3,5 \pm 0,6$	$3,7 \pm 0,2$	$3,4 \pm 0,5$	$3,6 \pm 0,3$
Rate	$3,0 \pm 0,1$	$3,1 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,1$	$3,1 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,1$
Muscle squ.	$2,0 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$

Résultats exprimés en moyenne $\pm$ écart-type.

Significativement différent du groupe Mn : $^{\#} p < 0,001$.

2.3. Discussion

Dans nos conditions expérimentales (administration i.p. de chlorure de manganèse pendant 5 semaines, à raison de 6 mg Mn.kg^{-1} de poids corporel par jour, suivie de l'administration i.p. des chélateurs pendant 2 semaines, à raison de $0,11 \text{ mmol.kg}^{-1}$ de poids corporel par jour), les 5 substances testées (DTPA, TTHA, HBED, DPTA, DPTA-OH) s'avèrent peu efficaces pour mobiliser le manganèse tissulaire. Ces résultats ne confirment pas les différents travaux antérieurs dans lesquels une mobilisation tissulaire beaucoup plus importante a pu être observée (Tandon & Khandelwal, 1982 ; Tandon & Singh, 1975 ; Tandon *et al.*, 1975).

Concernant DTPA et TTHA, certaines similitudes entre ces deux composés peuvent être constatées, le fait le plus marquant consistant en la mobilisation

proche de 50 % du manganèse splénique. Ces deux composés sont également capables d'augmenter l'excrétion urinaire du manganèse pendant toute la durée du traitement, ce qui laisse envisager une mobilisation de cet élément à partir d'autres organes non prélevés. Parallèlement à la diminution du manganèse splénique, ces deux substances diminuent également la concentration en fer splénique, effet qui a pu être amplifié (- 79 %) après augmentation des doses de manganèse (9 mg Mn.kg^{-1} de poids corporel par jour, pendant 5 semaines) et de chélateurs ($0,32 \text{ mmol.kg}^{-1}$ de poids corporel par jour, pendant 2 semaines) (résultats non reportés). Par contre, ces composés n'ont aucune influence sur le manganèse et le fer présents dans le sang total.

Concernant les traitements avec DPTA et DPTA-OH, si ces 2 composés provoquent une légère augmentation de la concentration en manganèse dans certains organes (notamment dans le cerveau avec DPTA-OH), une diminution est observée dans d'autres (en particulier dans la rate), ce qui pourrait suggérer l'existence d'une redistribution tissulaire du manganèse, probablement par dissociation des complexes formés avant leur excrétion.

Enfin, HBED se révèle être le composé le moins intéressant pour mobiliser le manganèse tissulaire (pas de modification majeure des concentrations tissulaires du manganèse).

A noter que la comparaison entre les résultats obtenus avec DPTA, DPTA-OH et HBED et ceux d'autres auteurs n'est pas possible ; en effet il n'existe aucune étude s'intéressant à la capacité de ces composés à complexer le manganèse.

Le manque d'efficacité des chélateurs testés pourrait s'expliquer par leur métabolisation en composés inactifs ou par leur temps de demi-vie dans l'organisme trop court. Toutefois, une autre explication pourrait être basée sur la fixation de l'ion Mn^{2+} , sous forme de complexes très stables, non seulement dans l'hémoglobine mais aussi dans certains cytochromes de la chaîne respiratoire, en remplacement de l'ion Fe^{2+} de propriétés chimiques voisines. Cette hypothèse a été précédemment émise dans la première partie expérimentale de ce travail, pour expliquer le mécanisme d'action toxique du manganèse (incapacité du cytochrome a_3 complexé au manganèse à réduire l'oxygène entraînant une perturbation du fonctionnement de la chaîne respiratoire).

Aussi, seul le manganèse libre, ou sous forme de complexes de stabilité moyenne, serait mobilisable par les chélateurs.

Or, l'effet majeur observé avec les 5 composés testés consiste en la mobilisation du manganèse splénique. La rate étant dotée de fonctions hématopoïétique, de stockage, et de destruction des érythrocytes chez le rongeur, on peut penser qu'une telle mobilisation du manganèse ne puisse intervenir qu'après destruction des érythrocytes. Toutefois, la durée de vie de ces organites (en moyenne 120 jours), très nettement supérieure à la durée des traitements effectués (7 semaines), nous amène à envisager une possible destruction prématurée sous l'effet de l'intoxication au manganèse.

A la différence de la fraction érythrocytaire, le manganèse plasmatique semble très mobilisable, dans la mesure où cet élément ne s'accumule pas dans le plasma des animaux intoxiqués, alors qu'il est parfaitement capable de se complexer aux protéines sériques, comme nous avons pu le constater dans l'étude *in vitro*. Ce manganèse plasmatique pourrait alors être distribué à d'autres organes ou être éliminé dans les urines, expliquant ainsi l'augmentation de son excrétion urinaire constatée durant l'exposition.

Enfin, certaines observations relatives aux perturbations engendrées par les différents composés testés sur divers éléments essentiels, sont intéressantes.

Ainsi, peu ou pas de modifications notoires sont constatées sur la distribution tissulaire du phosphore, du magnésium et du calcium, par les 5 composés testés. On peut donc penser que le métabolisme phosphocalcique n'est pratiquement pas perturbé par les chélateurs, malgré l'observation d'augmentations plus ou moins ponctuelles des excrétions urinaires du phosphore et du calcium, notamment par le DTPA.

Les composés DTPA et TTHA agiraient surtout sur le fer splénique (diminution) et sur le zinc rénal (augmentation).

Le composé HBED semble essentiellement mobiliser le fer splénique et rénal. Cette substance est d'ailleurs réputée comme étant un bon chélateur du fer et est actuellement testée en vue d'une utilisation chez l'homme (Grady & Hershko, 1990 ; Samuni *et al.*, 2001).

Par contre, DPTA et DPTA-OH paraissent avoir une action plus spécifiquement ciblée sur le cuivre (diminution de la concentration dans le cerveau et augmentation de la concentration dans les reins) ; une telle action pourrait être intéressante dans le traitement de la maladie de Wilson.

A noter que ces composés n'ont pas d'effet spécifique sur les excrétions urinaires du fer, du zinc et du cuivre (augmentation dans tous les cas).

Conclusion générale

Cette étude de nouveaux chélateurs du manganèse a débuté par la mise au point d'un protocole d'intoxication permettant l'observation d'une accumulation tissulaire de cet élément. Par comparaison des résultats obtenus avec deux voies d'administration différentes (intrapéritonéale et orale), il apparaît que le manganèse est très mal absorbé par voie orale, ce qu'a confirmé l'étude de l'absorption intestinale selon la technique de perfusion *in situ*. Ainsi, le pourcentage d'absorption intestinale ayant pu être estimé comme étant inférieur à 2 %, on peut penser que les risques d'intoxication par voie orale restent très limités. A noter que, durant cette intoxication, aucune altération neurologique n'a pu être observée (études comportementale, neurochimique et histologique), malgré une accumulation de manganèse dans le cerveau.

L'étude de différents chélateurs potentiels du manganèse, présélectionnés *in vitro* sur leur capacité à mobiliser l'élément fixé aux protéines sériques, a montré que les composés les plus efficaces (DTPA et TTHA) n'étaient pas capables de mobiliser l'ensemble du manganèse accumulé dans différents organes cibles, ni de toucher à l'élément présent dans le sang total (hémoglobine).

Les résultats obtenus nous conduisent aux hypothèses suivantes :

L'ion Mn^{2+} , aux propriétés chimiques voisines de l'ion Fe^{2+} , serait capable de remplacer ce dernier dans l'hémoglobine et dans certains cytochromes de la chaîne respiratoire cellulaire.

Le fer étant connu pour se complexer fortement avec ces deux types de composés (inefficacité de la desferrioxamine vis-à-vis du fer fixé dans l'hémoglobine et les cytochromes), on peut penser qu'il en sera de même pour les complexes formés avec le manganèse (formation de complexes très stables).

Aussi, incapables de mobiliser le manganèse fixé dans l'hémoglobine et les cytochromes, les chélateurs ne seraient efficaces que vis-à-vis de l'élément présent sous forme libre ou sous forme de complexes peu stables. Cette hypothèse se voit confortée par l'observation d'un taux sanguin en manganèse constant, par la présence de cet élément dans différents organes, malgré une diminution plus ou moins nette selon l'organe, et par une augmentation de son élimination urinaire, même après traitement par les chélateurs potentiels.

Fixé aux cytochromes, le manganèse peut présenter des propriétés toxiques, en bloquant le fonctionnement de la chaîne respiratoire cellulaire (cf discussion de la première partie). Ce phénomène se solderait par une réduction incomplète de l'oxygène, conduisant à la formation de radicaux libres oxygénés. Ceux-ci seraient alors susceptibles de provoquer des dégénérescences cellulaires et l'oxydation de la dopamine et orthobenzoquinone, expliquant ainsi les troubles neurologiques de type parkinsonien.

Une remarque s'impose, quant à ce rôle indirect du manganèse dans la production de radicaux libres. Effectivement, celui-ci peut paraître contradictoire avec la présence de cet élément dans la superoxyde dismutase, enzyme qui intervient dans le système de défense antiradicalaire.

En fait, la réduction incomplète de l'oxygène, précédemment évoquée, limiterait l'apport énergétique aux cellules, par ralentissement des réactions de phosphorylation. Cette diminution d'énergie disponible pourrait provoquer une diminution de l'activité de la superoxyde dismutase qui est synthétisée dans le cytosol, avant d'être transférée vers la matrice mitochondriale par transport actif. De même, le renouvellement de certains cytochromes (c, c₁, b₂, ...) pourrait être affecté, leur transfert du cytosol vers la membrane mitochondriale nécessitant également de l'énergie.

L'ensemble de ces phénomènes (réduction de l'apport énergétique, élimination défectueuse des radicaux libres, perturbation des mécanismes de renouvellement des cytochromes et donc ralentissement de l'élimination du manganèse fixé dans ces derniers) pourrait entraîner une accélération du vieillissement cellulaire, particulièrement néfaste dans le cas de cellules non renouvelées telles que les cellules nerveuses.

Par extrapolation, il est possible d'expliquer la formation de radicaux libres oxygénés, observée lors d'intoxications sévères au cobalt, à partir de nos hypothèses.

Effectivement, de façon similaire aux couples $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ et $\text{Mn}^{3+}/\text{Mn}^{2+}$, on peut penser que le couple $\text{Co}^{3+}/\text{Co}^{2+}$ puisse intervenir dans les cytochromes de la chaîne respiratoire. Ainsi, de par ses 24 électrons présents dans son nuage électronique, l'ion Co^{3+} peut établir six liaisons de coordinence (comme Fe^{3+} , Fe^{2+} , Mn^{3+} et Mn^{2+}), pour obtenir la configuration électronique du krypton (élément 36). Par contre, l'ion Co^{2+} ne peut former que cinq liaisons de coordinence ; aussi, cet ion ne pourra se lier aux cytochromes qu'après modification de leur structure, ce qui paraît très difficilement réalisable.

Le cytochrome-Co³⁺ se trouve ainsi stabilisé et ne peut vraisemblablement pas se réduire en cytochrome-Co²⁺. De ce fait, la fixation du cobalt sur les cytochromes bloque, au moins partiellement, le fonctionnement de la chaîne respiratoire cellulaire, entraînant la réduction incomplète de l'oxygène et la formation de radicaux libres oxygénés.

L'ensemble de notre étude nous amène donc à proposer les points suivants, en vue du traitement des cas de manganisme :

Ce traitement devrait passer par l'utilisation de chélateurs pendant une durée suffisamment longue, de manière à leur permettre de mobiliser le manganèse accumulé dans l'organisme, non seulement sous forme libre ou de complexes peu stables, mais aussi sous forme de complexes stables, cette dernière forme nécessitant la destruction préalable des composés impliqués (hémoglobine, cytochromes).

De plus, il serait souhaitable de leur associer l'administration de L-dopa, de façon à compenser la déplétion en dopamine.

Des anti-oxydants devraient également être fournis, afin de favoriser la destruction des radicaux libres formés au cours de l'intoxication au manganèse.

Enfin, un contrôle des apports alimentaires en éléments essentiels, notamment en fer, cuivre et zinc, devrait être envisagé, afin de prévoir d'éventuelles perturbations au niveau de leur distribution tissulaire, liées au traitement de détoxification prolongé.

Références bibliographiques

1. AASETH J., 1983, Recent advance in the therapy of metal poisoning with chelating agents, *Human Toxicology*, **2**, 257-272.
2. ABRAMS E., LASSITER J.W., MILLER W.J., NEATHERY M.W., GENTRY R.P. & SCARTH R.D., 1976 a, Absorption as a factor in manganese homeostasis, *Journal of Animal Science*, **42** (3), 630-636.
3. ABRAMS E., LASSITER J.W., MILLER W.J., NEATHERY M.W. & GENTRY R.P., 1976 b, Effect of dietary manganese as a factor affecting ^{54}Mn absorption in rats, *Nutrition Reports International*, **14** (5), 561-565.
4. AI L.B., CHUA L.H., NEW A.L., LEE B.L., LIU Y.M., CHIA S.E. & ONG C.N., 1998, Urinary homovanillic acid (HVA) and vanillylmandelic acid (VMA) in workers exposed to manganese dust, *Biological Trace Element Research*, **64** (1-3), 89-99.
5. ALVES G., THIEBOT J., TRACQUI A., DELANGRE T., GUEDON C. & LEREBOURS E., 1997, Neurologic disorders due to brain manganese deposition in a jaundiced patient receiving long-term parenteral nutrition, *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, **21** (1), 41-45.
6. ANDERSEN M.E., GEARHART J.M. & CLEWELL H.J., 1999, Pharmacokinetic data needs to support risk assessments for inhaled and ingested manganese, *Neurotoxicology*, **20** (2-3), 161-172.
7. APOSTOLI P., LUCCHINI R. & ALESSIO L., 2000, Are current biomarkers suitable for assessment of manganese exposure in individual workers? *American Journal of Industrial Medicine*, **37** (3), 283-290.
8. ARNICH N., LANHERS M.-C., CUNAT L., JOYEUX M. & BURNEL D., 2000, Nickel absorption and distribution from rat small intestine *in situ*, *Biological Trace Element Research*, **74**, 141-151.
9. ASCHNER M., 1999, Manganese homeostasis in the CNS, *Environmental Research*, **80**, 105-109.
10. ASCHNER M. & ASCHNER J.L., 1990, Manganese transport across the blood-brain barrier: relationship to iron homeostasis, *Brain Research Bulletin*, **24**, 857-860.
11. ASCHNER M. & ASCHNER J.L., 1991, Manganese neurotoxicity: cellular effects and blood-brain barrier transport, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **15**, 333-340.
12. ASCHNER M., VRANA K.E. & ZHENG W., 1999, Manganese uptake and distribution in the central nervous system (CNS), *Neurotoxicology*, **20** (2-3), 173-180.
13. ATSDR, 1997, Agency for toxic substances and disease registry's toxicological profile for manganese, Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, 210 pages.
14. AUNGST B.J., DOLCE J.A. & FUNG H.L., 1981, The effect of dose on the disposition of lead in rats after intravenous and oral administration, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **61**, 48-57.

15. AUTISSIER N., ROCHETTE L., DUMAS P., BELEY A., LOIREAU A. & BRALET J., 1982, Dopamine and norepinephrine turnover in various regions of the rat brain after chronic manganese chloride administration, *Toxicology*, **24** (2), 175-182.
16. BADER M., DIETZ M.C., IHRIG A. & TRIEBIG G., 1999, Biomonitoring of manganese in blood, urine and axillary hair following low-dose exposure during the manufacture of dry cell batteries., *International Archives of Occupational and Environmental Health*, **72** (8), 521-527.
17. BALY D.L., LÖNNERDAL B. & KEEN C.L., 1985, Effects of high doses of manganese on carbohydrate homeostasis, *Toxicology Letters*, **25**, 95-102.
18. BALY D.L., WALTER R.M. & KEEN C.L., 1994, Manganese metabolism and diabetes, in *Manganese in health and disease*, Klimis-Tavantzis D.J. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, 101-113.
19. BANTA G. & MARKESBERY W.R., 1977, Elevated manganese levels associated with dementia and extrapyramidal signs, *Neurology*, **27**, 213.
20. BARBEAU A., 1984, Manganese and extrapyramidal disorders, *Neurotoxicology*, **5**, 333-340.
21. BARCELOUX D.G., 1999, Manganese, *Clinical Toxicology*, **37** (2), 293-307.
22. BARTON J.C. & CONRAD M.E., 1981, Effect of phosphate on the absorption and retention of lead in the rat, *The American Journal of Clinical Nutrition*, **34**, 2192-2198.
23. BELL J.G., KEENN C.L. & LÖNNERDAL B., 1989, Higher retention of manganese in suckling than in adult rats is not due to maturational differences in manganese uptake by rat small intestine, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **26**, 387-398.
24. BERMAN S.B. & HASTINGS T.G., 1999, Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria: implication for Parkinson's disease, *Journal of Neurochemistry*, **73** (3), 1127-1137.
25. BERTINCHAMPS A.J., MILLER S.T. & COTZIAS G.C., 1966, Interdependence of routes excreting manganese, *American Journal of Physiology*, **211** (1), 217-223.
26. BLANUSA M., KOSTIAL K., KARGACIN B., LANDEKA M., 1986, Age effect of chelating agents on metal elimination, *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, **59** (7), 558-561.
27. BLEICH S., DEGNER D., SPRUNG R., RIEGEL A., POSER W. & RÜTHER E., 1999, Chronic manganism: fourteen years of follow-up, *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, **11** (1), 117.
28. BONILLA E., 1984, Research note: chronic manganese intake induces changes in the motor activity of rats, *Experimental Neurology*, **84** (3), 696-700.

29. BORG D.C. & COTZIAS G.C., 1958, Incorporation of manganese into erythrocytes as evidence for a manganese porphyrin in man, *Nature*, **182**, 1677-1679.
30. BRITTON A.A. & COTZIAS G.C., 1966, Dependence of manganese turnover on intake, *American Journal of Physiology*, **211**, 203-206.
31. BUCHET J.P., MAGOS C., ROELS H., CEULEMANS E. & LAUWERYS R., 1993, Urinary excretion of homovanillic acid in workers exposed to manganese, *International Archives of Occupational and Environmental Health*, **65** (2), 131-133.
32. BURNETT W.T., BIGELOW R.R., KIMBALL A.W. & SHEPPARD C.W., 1952, Radiomanganese studies on the mouse, rat and pancreatic fistula dog, *American Journal of Physiology*, **168**, 620-625.
33. BUTTERWORTH R.F., SPAHR L., FONTAINE S. & LAYRARGUES G.P., 1995, Manganese toxicity, dopaminergic dysfunction and hepatic encephalopathy, *Metabolic Brain Disease*, **10** (4), 259-267.
34. CAHILL D.F., BERCEGEAY M.S., HAGGERTY R.C., GERDING J.E. & GRAY L.E., 1980, Age-related retention and distribution of ingested Mn_3O_4 in the rat, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **53**, 83-91.
35. CALNE D.B., CHU N.S., HUANG C.C., LU C.S. & OLANOW W., 1994, Manganism and idiopathic parkinsonism. Similarities and differences, *Neurology*, **44**, 1583-1586.
36. CANTILENA L.R. & KLAASSEN C.D., 1982, The effect of chelating agents on the excretion of endogenous metals, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **63**, 344-350.
37. CARL G.F. & GALLAGHER B.B., 1994, Manganese and epilepsy, in *Manganese in health and disease*, Klimis-Tavantzis D.J. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, 133-143.
38. CARL G.F., CRITCHFIELD J.W., THOMPSON J.L., HOLMES G.L., GALLAGHER B.B. & KEEN C.L., 1990, Genetically epilepsy-prone rats are characterized by altered tissue trace element concentrations, *Epilepsia*, **31** (3), 247-252.
39. CARTER S.D., HEIN J.F., REHNBERG G.L. & LASKEY J.W., 1980, Chronic manganese oxide ingestion in rats. Hematological effects, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **6**, 207-216.
40. CAWTE J. & FLORENCE M., 1987, Environmental source of manganese on Groote Eylandt, Northern Australia, *The Lancet*, **27**, 1484.
41. CHANDRA S.V. & SHUKLA G.S., 1978, Manganese encephalopathy in growing rats, *Environmental Research*, **15**, 28-37.
42. CHANDRA S.V. & SHUKLA G.S., 1981 a, Concentrations of striatal catecholamines in rats given manganese chloride through drinking water, *Journal of Neurochemistry*, **36** (2), 683-687.

43. CHANDRA S.V. & SHUKLA G.S., 1981 b, Effect of manganese on synthesis of brain catecholamines in growing rats, *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, **48** (4), 349-354.
44. CHANDRA S.V. & SRIVASTAVA S.P., 1970, Experimental production of early brain lesions in rats by parenteral administration of manganese chloride, *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, **28**, 177-183.
45. CHANDRA S.V., ALI M.M., SEXENA D.K. & MURTHY R.C., 1981, Behavioral and neurochemical changes in rats simultaneously exposed to manganese and lead, *Archives of Toxicology*, **49** (7), 49-56.
46. CHANDRA S.V., SHUKLA G.S. & SAXENA., 1979, Manganese-induced behavioral dysfunction and its neurochemical mechanism in growing mice, *Journal of Neurochemistry*, **33**, 1217-1221.
47. CHANG J.Y. & LIU L.Z., 1999, Manganese potentiates nitric oxide production by microglia, *Brain Research. Molecular Brain Research*, **68** (1-2), 22-28.
48. CHISWELL B. & JOHSON D., Manganese, in *Handbook on metals in clinical and analytical chemistry*, Seiler H.G., Sigel A. & Siegel H. (Eds.), 467-478.
49. CHU N.S., HOCHBERG F.H., CALNE D.B. & OLANOW C.W., 1995, Neurotoxicology of manganese, in *Handbook of Neurotoxicology*, Chan L.W., Dyer R.S. & Dekker M. (Eds.), New-York, 91-103.
50. CIKRT M. & VOSTAL J., 1969, Study of manganese resorption *in vitro* through intestinal wall, *International Journal of Clinical Pharmacology*, **2** (3), 280-285.
51. CIKRT M., LEPSI P., LUKAS E., SPERLINGOVA I., HORAKOVA L. & JONES M.M., 1987, The effect of some chelating agents on the biliary and urinary excretion of manganese in rats. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology*, 1987, **31**, 31-37.
52. COOK D.G., FAHN S. & BRAIT K.A., 1974, Chronic manganese intoxication, *Archives of Neurology*, **30**, 59-64.
53. COTZIAS G.C., HORIUCHI K., FUENZALIDA S. & MENA I., 1968, Chronic manganese poisoning. Clearance of tissue manganese concentrations with persistence of the neurological picture, *Neurology*, **18**, 376-382.
54. CROMPTON M., 1999, The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death, *The Biochemical Journal*, **341** (2), 233-249.
55. CSST, 1996, Commission de la santé et de la sécurité du travail, Manganèse, Service du répertoire toxicologique, <http://www.reptox.csst.qc.ca/>
56. CUNAT L., LANHERS M.-C., JOYEUX M. & BURNEL D., 2000, Bioavailability and intestinal absorption of aluminum in rats. Effects of aluminum compounds and some dietary constituents, *Biological Trace Element Research*, **76**, 31-55.

57. DASTUR D.K., MANGHANI D.K. & RAGHAVENDRAN K.V., 1971, Distribution and fate of Mn in the monkey, studies of different parts of the central nervous system and other organs, *Journal of Clinical Investigation*, **50**, 9-20.
58. DASTUR D.K., MANGHANI D.K., RAGHAVENDRAN K.V. & JEEJEEBHOY K.N., 1969, Distribution and fate of Mn⁵⁴ in the rat, with special reference to the C.N.S, *Quarterly Journal of Experimental Physiology*, **54**, 322-331.
59. DAVIDSON D.L. & WARD N.I., 1988, Abnormal aluminium, cobalt, manganese, strontium, and zinc concentrations in untreated epilepsy, *Epilepsy Research*, **2**, 323-330.
60. DAVINOVA I., VACHALKOVA A. & NOVOTNY L., 1999, Potential carcinogenicity of some transition metal ions, *Biological Trace Element Research*, **67**, 63-73.
61. DAVIS C.D. & GREGER J.L., 1992, Longitudinal changes of manganese-dependent superoxide dismutase and other indices of manganese and iron status in women, *The American Journal of Clinical Nutrition*, **55**, 747-752.
62. DAVIS C.D., WOLF T.L. & GREGER J.L., 1992, Varying levels of manganese and iron affect absorption and gut endogenous losses of manganese by rats, *The Journal of Nutrition*, **122**, 1300-1308.
63. DAVIS C.D., ZECH L. & GREGER J.L., 1993, Manganese metabolism in rats: an improved methodology for assessing gut endogenous losses, *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, **202**, 103-108.
64. Décret N° 89-3 du 3 janvier 1989 relatif aux eaux destinées à la consommation humaine à l'exclusion des eaux minérales naturelles (*Journal Officiel du 4 avril 1989*) modifié par le décret N°90-330 du 10 avril 1990 (J.O. du 13 avril 1990), par le décret N° 91-257 du 7 mars 1991 (J.O. du 8 mars 1991) et par le décret N° 95-363 du 5 avril 1995 (J.O. du 7 avril 1995).
65. DEREVENCO P., VAIDA A., STOICA N., GABOR S., IVANOF L., BOTOC M., ALEXA L. & BACH I., 1988, Neurobehavioral and biochemical response to manganese and selenium exposure in rats, *Physiologie*, **25** (3), 111-118.
66. DIEZ-EWALD M., WEINTRAUB L.R. & CROSBY W.H., 1968, Interrelationship of iron and manganese metabolism, *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, **129**, 448-451.
67. Directive du Conseil du 15 juillet 1980 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine, 80/778/CEE, *Journal Officiel des Communauté Européennes*, N° L 229/11.
68. DONALDSON J., LABELLE F.S. & GESSER D., 1980, Enhanced autoxidation of dopamine as a possible basis of manganese neurotoxicity, *Neurotoxicology*, **2**, 53-64.
69. DORMAN D.C., STRUVE M.F., VITARELLA D., BYERLY F.L., GOETZ J. & MILLER R., 2000, Neurotoxicity of manganese chloride in neonatal and adult CD rats following subchronic (21-day) high-dose oral exposure, *Journal of Applied Toxicology*, **20** (3), 179-187.

70. EJIMA A., IMAMURA T., NAKAMURA S., SAITO H., MATSUMOTO K. & MOMONO S., 1992, Manganese intoxication during total parenteral nutrition, *The Lancet*, **339**, 426.
71. ELBETIEHA A., BATAINEH H., DARMANI H. & AL-HAMOOD M.H., 2001, Effects of long-term exposure to manganese chloride on fertility of male and female mice, *Toxicology Letters*, **119**, 193-201.
72. ENCYCLOPÉDIE MICROSOFT ENCARTA98, 1998, Microsoft Corporation.
73. EPA, 1998, Manganese, U.S. Environmental protection agency IRIS Substance file, <http://www.epa.gov/iris/subst/0373.htm>
74. ERIKSSON H. & HEILBRONN E., 1983, Changes in the redox state of neuroblastoma cells after manganese exposure, *Archives of Toxicology*, **54**, 53-59.
75. ERIKSSON H., MORATH C. & HEILBRONN E., 1984, Effects of manganese on the nervous system, *Acta Neurologica Scandinavica*, **70** (100), 89-93.
76. ERIKSSON H., TEDROFF J., THUOMAS K.A., AQUILONIUS S.M., HARTVIG P., FASTH K.J., BJURLING P., LANGSTROM B., HEDSTROM K.G. & HEIBRONN E., 1992, Manganese induced brain lesions in Macaca fascicularis as revealed by positron emission tomography and magnetic resonance imaging, *Archives of Toxicology*, **66**, 403-407.
77. FECHTER L.D., 1999, Distribution of manganese in development, *Neurotoxicology*, **20** (2-3), 197-202.
78. FINLEY J.W., CATON J.S., ZHOU Z. & DAVISON K.L., 1997, A surgical model for determination of true absorption and biliary excretion of manganese in conscious swine fed commercial diets, *The Journal of Nutrition*, **127** (12), 2334-2341.
79. FREELAND-GRAVES & LLANES, 1994, Models to study manganese deficiency? in *Manganese in health and disease*, Klimis-Tavantzis D.J. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, 59-85.
80. FREELAND-GRAVES J.H., BEHMARDI F., BALES C.W., DOUGHERTY V., LIN P.H., CROSBY J.B. & TRICKETT P.C., 1988, Metabolic balance of manganese in young men consuming diets containing five levels of dietary manganese, *The Journal of Nutrition*, **118**, 764-773.
81. FRIED J.F., LINDENBAUM A. & SCHUBERT J., 1959, Comparison of 3 chelating agents in treatment of experimental manganese poisoning, *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, **100**, 570-573.
82. GALLEZ B., BAUDELET C., ADLINE J., GEURTS M. & DELZENNE N., 1997, Accumulation of manganese in the brain of mice after intravenous injection of manganese-based contrast agents, *Chemical Research in Toxicology*, **10**, 360-363.
83. GARCIA-ARANDA J., WAPNIR P.A. & LIFSHITZ F., 1983, *In vivo* intestinal absorption of manganese in the rat, *The Journal of Nutrition*, **113**, 2601-2607.

84. GAVIN C.E., GUNTER K.K. & GUNTER T.E., 1990, Manganese and calcium efflux kinetics in brain mitochondria. Relevance to manganese toxicity, *The Biochemical Journal*, **266**, 329-334.
85. GAVIN C.E., GUNTER K.K. & GUNTER T.E., 1992, Mn²⁺ sequestration by mitochondria and inhibition of oxidative phosphorylation, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **115** (1), 1-5.
86. GAVIN C.E., GUNTER K.K. & GUNTER T.E., 1999, Manganese and calcium transport in mitochondria: implications for manganese toxicity, *Neurotoxicology*, **20** (2-3), 445-454.
87. GIANUTSOS G. & MURRAY M.T., 1982, Alteration of brain dopamine and GABA following inorganic or organic manganese administration, *Neurotoxicology*, **3** (3), 75-81.
88. GIANUTSOS G., MORROW G.R. & MORRIS J.B., 1997, Accumulation of manganese in rat brain following intranasal administration, *Fundamental and Applied Toxicology*, **37**, 102-105
89. GIANUTSOS G., SELTZER M.D., SAYMEH R., WANG WU M.-L. & MICHEL R.G., 1985, Brain manganese accumulation following systemic administration of different forms. *Archives of Toxicology*, **57**, 272-275.
90. GIBBONS R.A., DIXON S.N., HALLIS K., RUSSELL A.M., SANSOM B.F. & SYMONDS H.W., 1976, Manganese metabolism in cows and goats, *Biochimica et Biophysica Acta*, **444**, 1-10.
91. GOYER R.A., 1991, Toxic effects of metals, in *Caasarett and Doull's Toxicology*, Amdur, Doull & Curtis (Eds), Pergamon Press, Oxford, 656-657.
92. GRADY R.W. & HERSHKO C., 1990, An evaluation of the potential of HBED as an orally effective iron-chelating drug, *Seminars in Hematology*, **27** (2), 105-111.
93. GRAFF L., MULLER G. & BURNEL D., 1995 a, *In vitro* and *in vivo* comparative studies on chelation of aluminum by some polyaminocarboxylic acids, *Research Communuciations in Molecular Pathology and Pharmacology*, **88**, 271-292.
94. GRAFF L., MULLER G. & BURNEL D., 1995 b, *In vitro* and *in vivo* evaluation of potential aluminum chelators, *Veterinary and Human Toxicology*, **37**, 455-461.
95. GREGER J.L., 1998, Dietary standards for manganese: overlap between nutritional and toxicological studies, *American Society for Nutritional Sciences*, 368-371.
96. GREGER J.L., 1999, Nutrition versus toxicology of manganese in humans: evaluation of potential biomarkers, *Neurotoxicology*, **20** (2-3), 205-212.
97. GRIFFITH J.Q. & FARRIS E.J., 1951, Techniques for the investigation of physiological phenomena in rat, in *The Rat in Laboratory Investigation*, Kreezer G.L. (Ed.), Lippincott J.B., Philadelphia, 212-227.
98. GRUDEN N., 1977 a, Interrelationship of manganese and iron in rat's duodenum, *Nutrition Reports International*, **15** (5), 577-580.

99. GRUDEN N., 1977 b, Suppression of transduodenal manganese transport by milk diet supplemented with iron, *Nutrition and Metabolism*, **21**, 305-309.
100. GUBLER C.J., TAYLOR D.S., EICHWALD E.J., CARTWRIGHT G.E. & WINTROBE M.M., 1954, Copper metabolism. XII: Influence of manganese on metabolism of copper, *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, **86**, 223-227.
101. HAGUENOER J.M. & FURON D., 1982, Manganèse, in *Toxicologie et Hygiène Industrielle* (tome 2, les dérivés minéraux), Technique & Documentation, Paris, 423-473.
102. HALPIN K.M., CHAUSOW D.G. & BAKER D.H., 1986, Efficiency of manganese absorption in chicks fed corn-soy and casein diets, *The Journal of Nutrition*, **116**, 1747-175.
103. HARTMAN R.H., MATRONE G. & WISE G.H., 1955, Effect of high dietary manganese on hemoglobin formation, *The Journal of Nutrition*, **57**, 429-439.
104. HAZELL A.S. & BUTTERWORTH R.F., 1999, Hepatic encephalopathy: an update of pathophysiology mechanisms, *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, **222** (2), 99-112.
105. HAZELL A.S. & NORENBURG M.D., 1998, Ammonia and manganese increase uptake in cultured astrocytes, *Neurochemical Research*, **23** (6), 869-873.
106. HUANG C.C., CHU N.S., LU C.S., WANG J.D., TSAI J.L., TZENG J.L., WOLTERS E.C. & CALNE D.B., 1989, Chronic manganese intoxication, *Archives of Neurology*, **46** (10), 1104-1106.
107. HUANG C.-C., LU C.-S., CHU N.-S., HOCHBERG F., LILIENTELD D., OLANO W. & CALNE D.B., 1993, Progression after chronic manganese exposure, *Neurology*, **43**, 1479-1483.
108. HURLEY L.S. & KEEN C.L., 1987, manganese, in *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*, (volume 1), Mertz W. (Ed.), Academic Press, New-York, 185.
109. HURLEY L.S., KEEN C.L. & BALY D.L., 1984, Manganese deficiency and toxicity: effects on carbohydrate metabolism in the rat, *Neurotoxicology*, **5** (1), 97-104.
110. IBIM S.E.M., TROTMAN J., MUSEY P.I. & SEMAFUKO W.E.B., 1992, Depletion of essential elements by calcium disodium EDTA treatment in the dog, *Toxicology*, **73**, 229-237.
111. INGERSOLL R.T., MONTGOMERY E.B. & APOSHIAN H.V., 1995, Central nervous system toxicity of manganese. I: Inhibition of spontaneous motor activity in rats after intrathecal administration of manganese chloride, *Fundamental and Applied Toxicology*, **27** (1), 106-113.
112. INRS, 1993, Institut National de Recherche et de Sécurité, Valeurs limites d'exposition professionnelle aux agents chimiques en France, *Cahiers de notes documentaires*, **153**, 557-573.
113. INRS, 1997, Institut National de Recherche et de Sécurité, Dioxyde de manganèse, Fiche Toxicologique n° 52, 6 pages.

114. IREGREN A., 1999, Manganese neurotoxicity in industrial exposures: proof of effects, critical exposure level, and sensitive tests, *Neurotoxicology*, **20** (2-3), 315-324.
115. JÄRVINEN R. & AHLSTRÖM A., 1975, Effect of the dietary manganese level on tissue manganese, iron, copper and zinc concentrations in female rats and their fetuses, *Medical Biology*, **53**, 93-99.
116. JIANG Y., JIPEI L., PEIYI X., 1996, Effects of manganese on the sexual function and reproductive outcome of male exposed workers, *Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases*, **14** (5), 271-273.
117. JIANG Y.-M., GE L.-H., LU J.-P., JI S.-Q. & HU W.-D., 1992, Effect of PAS-Na on the levels of manganese and copper in brain, liver and serum of manganese-poisoned rats, *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*, **6** (3), 185-188.
118. JOHNSON J.M. & KIES C., 1989, Calcium and manganese bioavailability in male, weanling rats as affected by dietary calcium source, *Nutrition Reports International*, **39** (4), 687-696.
119. JOHNSON P.E., LYKKEN G.I. & KORYNTA E.D., 1991, Absorption and biological half-life in humans of intrinsic and extrinsic ⁵⁴Mn tracers from foods of plant origin, *The Journal of Nutrition*, **121**, 711-717.
120. KABATA H., INUI K.I. & ITOKAWA Y., 1989, The binding of manganese to the brush-border membrane vesicles of rat small intestine, *Nutrition Research*, **9**, 791-799.
121. KARARLI T.T., 1995, Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals, *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, **16**, 351-380.
122. KAUR G., HASAN S.K. & SRIVASTAVA R.C., 1980, The distribution of manganese-54 in fetal, young and adult rats, *Toxicology Letters*, **5**, 423-426.
123. KAUR G., SRIVASTAVA U.C., DWIVEDI R.S. & SRIVASTAVA R.C., 1984, Influence of polyaminocarboxylic acids on the removal of manganese-54 from the body organs of sham-operated and partially hepatectomized rats, *Toxicology Letters*, **22**, 1-6.
124. KAWAMURA R., IKULA S. & FUKUZUMI R., 1941, Intoxication by manganese in well water, *The Kitasato Archives of Experimental Medicine*, **18**, 145-169.
125. KEEN C.L., ENSUNSA J.L. & CLEGG M.S., 2000, Manganese metabolism in animals and humans including the toxicity of manganese, *Metal ions in biological systems*, **37**, 89-121.
126. KEEN C.L., ENSUNSA J.L., WATSON M.H., BALY D.L., DONOVAN S.M., MONACO M.H. & CLEGG M.S., 1999, Nutritional aspects of manganese from experimental studies, *Neurotoxicology*, **20** (2-3), 213-224.
127. KEMMERER A.R., ELVEHJEM C.A. & HART E.B., 1931, Studies on the relation of manganese to the nutrition of the mouse, *The Journal of Biological Chemistry*, **92**, 623.

128. KHANDELWAL S., KACHRU D.N. & TANDON S.K., 1980, Chelation in metal intoxication IX. Influence of amino and thiol chelating agents on excretion of manganese in poisoned rabbits, *Toxicology Letters*, 6, 131-135.
129. KIES C., 1994, Bioavailability of manganese, in *Manganese in health and disease*, Klimis-Tavantzis D.J. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, 39-58.
130. KILBURN C.J., 1987, Manganese, malformation and motor disorders: findings in a manganese-exposed population, *Neurotoxicology*, 8 (3), 421-430.
131. KIM Y., KIM J.-W., ITO K., LIM H.-S., CHEONG H.-K., KIM J. Y., SHIN Y. C., KIM K.S. & MOON Y., 1999, Idiopathic parkinsonism with superimposed manganese exposure: utility of position emission tomography, *Neurotoxicology*, 20 (2-3), 249-252.
132. KITAMURA S., SUMINO K., HAYAKAWA K. & SHIBATA T., 1974, Les métaux lourds chez des Japonais normaux (quantités de 15 métaux lourds présent dans 30 sujets), *Environmental Health Reports*, 28, 29-60.
133. KLAASSEN C.D., 1974, Biliary excretion of arsenic in rats, rabbits and dogs, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 29, 447-457.
134. KOMAKI H., MAISAWA S.-I., SUGAI K., KOBAYASHI Y.-I. & HASHIMOTO T., 1999, Tremor and seizures associated with chronic manganese intoxication, *Brain and Development*, 21, 122-124.
135. KOMURA J. & SAKAMOTO M., 1991, Short-term oral administration of several manganese compounds in mice: physiological and behavioral alterations caused by different forms of manganese, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 46, 921-928.
136. KOMURA J. & SAKAMOTO M., 1994, Chronic oral administration of methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl altered brain biogenic amines in the mouse: comparison with inorganic manganese, *Toxicology Letters*, 73, 65-73.
137. KONDAKIS X.G., MAKRIS N., LEOTSINIDIS M., PRINOU M. & PAPAPETROPOULOS T., 1989, Possible health effects of high manganese concentration in drinking water, *Archives of Environmental Health*, 44 (3), 175-178.
138. KORC M., 1988, Manganese homeostasis in human and its role in disease states, in *Essential and toxic trace elements in human health and disease*, Prasad A. S. (Ed.), Liss A.R., New-York, 18.
139. KOSAI M.F. & BOYLE A.J., 1956, Ethylenediaminetetraacetic acid in manganese poisoning of rats. A preliminary study, *Industrial Medicine and Surgery*, 25, 1-3.
140. KOSTIAL K., KELLO D., JUGO S., RABAR I. & MALJKOVIC T., 1978, Influence of age on metal metabolism and toxicity, *Environmental Health Perspectives*, 25, 81-86.
141. KRIEGER D., 1995, Manganese and chronic hepatic encephalopathy, *Lancet*, 346 (8970), 270-274.

142. KRISTIANSEN J., CHRISTENSEN J.M., IVERSEN B.S. & SABBIONI E., 1997, Toxic trace element reference levels in blood and urine: influence of gender and lifestyle factors, *The Science of Total Environment*, **204**, 147-160.
143. KY S., DENG H., XIE P. & WANDA H., 1992, A report of two cases of chronic serious manganese poisoning treated with sodium *para*-aminosalicylic acid, *British Journal of Industrial Medicine*, **49**, 66-69.
144. LAI J.C.K., LEUNG T.K. & LIM L., 1984, Differences in neurotoxic effects of manganese during development and aging: some observations on brain regional neurotransmitter and non-neurotransmitter metabolism in a developmental rat model of chronic manganese encephalopathy, *Neurotoxicology*, **5**, 37-45.
145. LAI J.C.K., MINSKI M.J., CHAN A.W.K. & LIM L., 2000, Interrelation between Mn and other metal ions, *Metal ions in biological systems*, **37**, 125-156.
146. LAI J.C.K., MINSKI M.J., CHAN A.W.K., LEUNG T.C.K. & LIM L., 1999, Manganese mineral interactions in brain, *Neurotoxicology*, **20** (2-3), 433-444.
147. LAUWERYS R., 1982, Le manganèse, in *Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles*, Masson, Paris, 117-120.
148. LAUWERYS R., 1992, Manganèse, in *Encyclopédie médico-chirurgicale. Toxicologie professionnelle*, Editions Techniques, Paris, 1-5.
149. LAYRARGUES G.P., ROSE C., SPAHR L., ZAYED J., NORMANDIN L. & BUTTERWORTH R.F., 1998, Role of manganese in the pathogenesis of portal-systemic encephalopathy, *Metabolic Brain Disease*, **13** (4), 311-317.
150. LEE D.Y. & JOHNSON P.E., 1988, Factors affecting absorption and excretion of ⁵⁴Mn in rats, *The Journal of Nutrition*, **118**, 1509-1516.
151. LICCIONE J.J. & MAINES D.M., 1988, Selective vulnerability of glutathione metabolism and cellular defence mechanisms in rat striatum to manganese, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **247**, 157-161.
152. LICCIONE J.J. & MAINES M.D., 1989, Manganese-mediated increase in the rat brain mitochondrial cytochrome P-450 and drug metabolism activity: susceptibility of the striatum, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **248** (1), 222-228.
153. LÖNNERDAL B., 1994, Manganese nutrition of infants, in *Manganese in health and disease*, Klimis-Tavantzis D.J. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, 175-191.
154. LÖNNERDAL B., KEEN C.L., BELL J.G. & SANDSTRÖM B., 1987, Manganese uptake and retention. Experimental animal and human studies, in *Nutritional bioavailability of manganese*, Kies C. (Ed.), ACS Symposium Series 354, American Chemical Society, Washington.

155. LORANGER S. & ZAYED J., 1995, Environmental and occupational exposure to manganese: a multimedia assessment, *International Archives of Occupational and Environmental Health*, **67**, 101-110.
156. LU C.L., HUANG C.C., CHU N.S. & CALNE D.B., 1994, Levodopa failure in chronic manganism, *Neurology*, **44**, 1600-1602.
157. LUTZ T.A., SCHROFF A. & SCHARRER E., 1993, Effects of calcium and sugars on intestinal manganese absorption, *Biological Trace Elements Research*, **39**, 221-227.
158. LYNAM D.R., ROOS J.W., PFEIFER G.D., FORT B.F. & PULLIN T.G., 1999, Environmental effects and exposure to manganese from use of methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl (MMT) in gasoline, *Neurotoxicology*, **20** (2-3), 145-150.
159. MAGNUSSON O., NILSSON L.B. & WESTERLUND D., 1980, Simultaneous determination of dopamine, DOPAC and homovanillic acid. Direct injection of supernatants from brain tissue homogenates in a liquid chromatography – electrochemical detection system, *Journal of chromatography*, **221**, 237-247.
160. MAHONEY J.P. & SMALL W.J., 1968, The biological half-life of radiomanganese in man and factors which affect this half-life, *The Journal of Clinical Investigation*, **47**, 643-653.
161. MALECKI E.A., RADZANOWSKI G.M., RADZANOWSKI T.J., GALLAHER D.D. & GREGER J.L., 1996, Biliary manganese excretion in conscious rats is affected by acute and chronic manganese intake but not by dietary fat, *Journal of Nutrition*, **126**, 489-498.
162. MARSDEN C.A. & JOSEPH M.H., 1986, Biogenic amines, in *Hplc of small molecules: a practical approach*, Lim C.K. (Ed.), IRL Press Ltd, Oxford, 29-47.
163. MAYNARD L.S. & COTZIAS G.C., 1955, The partition of manganese among organs and intracellular organelles of the rat, *The Journal of Biological Chemistry*, **214**, 489-495.
164. MCMILLAN D.E., 1999, A brief history of the neurobehavioral toxicity of manganese: some unanswered questions, *Neurotoxicology*, **20** (2-3), 499-508.
165. MECO M., BONIFATI V., VANACORE N. & FABRIZIO E., 1994, Parkinsonism after chronic exposure to the fungicide maneb, *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*, **20**, 301-305.
166. MENA I., 1974, The role of manganese in human disease, *Annals of Clinical and Laboratory Science*, **4** (6), 487-491.
167. MENA I., 1979, Manganese poisoning, in *Handbook of Clinical Neurology*, Vinken P.J. & Bruyn W.G. (Eds.), Amsterdam, 217-237.
168. MENA I., 1981, Manganese, in *Disorders of Mineral Metabolism*, Bronner F. & Coburn J.W. (Eds.), Academic Press, New-York, 233.

169. MENA I., COURT J., FUENZALIDA S., PAPAVALIOU P.S. & COTZIAS G.C., 1970, Modification of chronic manganese poisoning. Treatment with L-dopa or 5-OH tryptophane, *The New England Journal of Medicine*, **282**, 5-1.
170. MENA I., MARIN O., FLUENZALIDAS S. & COTZIAS G.C., 1967, Chronic manganese poisoning: clinical picture and manganese turnover, *Neurology*, **17**, 128-136.
171. MERGLER D. & BALDWIN M., 1997, Early manifestations of manganese neurotoxicity in humans: an update, *Environmental Research*, **73**, 92-100.
172. MERGLER D., 1999, Neurotoxic effects of low level exposure to manganese in human populations, *Environmental Research Section A*, **80**, 99-102.
173. MINOIA C., SABBIONI E., APOSTOLI P., PIETRA R., POZZOLI L., GALLORINI M., NICOLAOU G., ALESSIO L. & CAPODAGLIO E., 1990, Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European Community. I. A study of 46 elements in urine, blood and serum of Italian subjects, *The Science of Total Environment*, **95**, 89-105.
174. MISSELWITZ B., MUHLER A. & WEINMANN H.J., 1995, A toxicologic risk for using manganese complexes? A literature survey of existing data through several medical specialties, *Investigative Radiology*, **30** (10), 611-620.
175. MORGANTI J.B., LOWN B.A., STINEMAN C.H., D'ADOSTINO R.B. & MASSARO E.D., 1985, Uptake, distribution and behavioral effects of inhalation exposure to manganese (MnO₂) in the adult mouse, *Neurotoxicology*, **6** (1), 1-5.
176. MURTHY R.C., LAL S., SAXENA D.K., SHUKLA G.S., MOHD M. & CHANDRA S.V., 1981 a, Effect of manganese and copper interaction on behavior and biogenic amines in rats fed a 10/100 casein diet, *Chemico-Biological Interactions*, **37**, 299-308.
177. MURTHY R.C., SRIVASTAVA R.S. & CHANDRA S.V., 1981 b, Serum ceruloplasmin in manganese-treated rats, *Toxicology Letters*, **7**, 217-220.
178. MUTTI A., BERGAMASCHI E., ALINOV I., LUCCHINI R., VETTORI M.V. & FRANCHINI I., 1996, Serum prolactin in subjects occupationally exposed to manganese, *Annals of Clinical and Laboratory Science*, **26** (1), 10-17.
179. NACHTMAN J.P., TUBBEN R.E. & COMMISSARIS R.L., 1986, Behavioral effects of chronic manganese administration in rats: locomotor activity studies, *Neurobehavioral Toxicology and Teratology*, **8** (6), 711-715.
180. NAGAMOTO S., UMEHARA F., HANADA K., NOBUHARA Y., TAKENAGA S., ARIMURA K. & OSAME M., 1999, Manganese intoxication during total parenteral nutrition: report of two cases and review of the literature, *Journal of the Neurological Sciences*, **162**, 102-105.

181. NAKASHIMA S., 1983, Histopathological alteration of the central nervous system in rats, following long-term administration of manganese chloride. Relation to the activity of the brain tyrosine hydroxylase, *No To Shinkei*, **35** (1), 91-99.
182. NELSON K., GOLNICK J., KORN T. & ANGLE C., 1993, Manganese encephalopathy: utility of early magnetic resonance imaging, *British Journal of Industrial Medicine*, **50**, 510-513.
183. NEWLAND M., CECKLER T., KORDOWER J. & WEISS B., 1989, Visualizing manganese in the primate basal ganglia with magnetic resonance imaging, *Experimental Neurology*, **106**, 251-258.
184. NEWLAND M.C., 1999, Animals models of manganese's neurotoxicity, *Neurotoxicology*, **20** (2-3), 415-432.
185. NEWLAND M.C., COX C., HAMADA R., OBERDORSTER G. & WEISS B., 1987, The tolerance of manganese chloride in the primate, *Fundamental and Applied Toxicology*, **9**, 314-328.
186. NIKOLOVA P., 1993, Effect of manganese on essential trace element metabolism. Tissue concentrations and excretion of manganese, iron, copper, cobalt and zinc, *Trace Elements in Medicine*, **10** (3), 141-147.
187. NIOSH, 1978, National Institute for Occupational Safety and Health, Occupational health guidelines for manganese, 5 pages.
188. NIOSH, 1996, National Institute for Occupational Safety and Health Pocket Guide to Chemical Hazards, <http://w.w.w.cdc.gov/niosh/npg/pgdstart.html>
189. NOROSE N. & ARAI K., 1987, Manganese deficiency due to long-term total parenteral nutrition in an infant, *Japanese Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, **9**, 978-981.
190. OMS, 1981, Organisme Mondial pour la Santé, Le manganèse, in *Série des critères d'hygiène de l'environnement*, **17**, Genève, 123 pages.
191. ÖNER G. & SENTÜRK Ü.K., 1992, The mechanism of manganese induced learning disability, *Journal of Islamic Academy of Sciences*, **5**, 48-52.
192. ÖNER G. & SENTÜRK Ü.K., 1995, Reversibility of manganese-induced learning defect in rats, *Food and Chemical Toxicology*, **33** (7), 559-563.
193. ONODA K.I., HASEGAWA A., SUNOUCHI M., TANAKA S., TAKANAKA A., OMORI Y. & URAKUBO., 1978, Studies on the fate of poisonous metals in experimental animal. (VII): Distribution and transplacental passage of manganese in pregnant rat and foetus, *J Food Hyg Soc Japan*, **19** (2), 208-215.
194. ORENT E.R. & MCCOLLUM E.V., 1931, Effects of deprivation of manganese in the rats, *The Journal of Biological Chemistry*, **92**, 651.
195. PAL P.KR., SAMII A. & CALNE D.B., 1999, Manganese neurotoxicity: a review of clinical features, imaging and pathology, *Neurotoxicology*, **20** (2-3), 227-238.

196. PAPAVALIOU P.S., MILLER S.T. & COTZIAS G.C., 1966, Role of liver in regulating distribution and excretion of manganese, *American Journal of Physiology*, **211** (1), 211-216.
197. PAPPAS B.A., ZHANG D., DAVIDSON C.M., CROWDER T., PARK G.A.S. & FORTIN T., 1997, Perinatal manganese exposure: behavioral, neurochemical, and histopathological effects in rat, *Neurotoxicology and Teratology*, **19** (1), 17-25.
198. PELNAVER R., 1955, Manganese poisoning, *Industrial Medicine and Surgery*, **24**, 1-7.
199. POLICARD C., 1994, Les enjeux de la révolution diététique, *La Gazette Médicale*, **101** (8), 31-34.
200. POLLACK S., GEORGE J.N., REBA R.C., KAUFMAN R.M. & CROSEY W.H., 1965, The absorption of non-ferrous metals in iron deficiency, *Journal of Clinical Investigation*, **44** (9), 1470-1473.
201. POUPON J., 1997, Détermination du manganèse, in *Technique d'analyses des oligo-éléments chez l'homme*, Chappuis P. (Ed.), Lavoisier Tec & Doc, Editions Medicales Internationales, Paris, 93-108.
202. PROHASKA J.R., 1987, Functions of trace elements in brain metabolism, *Physiological Reviews*, **67** (3), 858-901.
203. RABIN O., HEGEDUS L., BOURRE J.M. & SMITH Q.R., 1993, Rapid brain uptake of manganese(II) across the blood-brain barrier, *Journal of Neurochemistry*, **61** (2), 509-517.
204. RANASINGHE J.G.S., LIU M.-C., SAKAKIBARA Y. & SUIKO M., 2000, Manganese administration induces the increased production of dopamine sulfate and depletion of dopamine in Sprague-Dawley rats, *Journal of Biochemistry*, **128**, 477-480.
205. RANGLE C., 1995, Dimercaptosuccinic acid (DMSA): negligible effect on manganese in urine and blood, *Occupational and Environmental Medicine*, **52**, 846-847.
206. REHNBERG G.L., HEIN J.F., CARTER S.D., LINKO R.S. & LASKEY J.W., 1982, Chronic ingestion of Mn₃O₄ by young rats: tissue accumulation and distribution of manganese in two generations, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **9**, 175-188.
207. RODIER J., 1996, Manganèse, in *L'analyse de l'eau*, Dunod, Paris, 1004-1006.
208. RODIER J., MALLET R. & RODI L., 1954, Etude de l'action détoxiquante de l'éthylènediaminetétraacétate de calcium dans l'intoxication expérimentale par le manganèse, *Archives des Maladies professionnelles*, **15** (3), 211-223.
209. ROELS H., LAUWERYS R., BUCHET J.P., GENET P., SARHAN M.J., HANOTIAU I., De FAYS M., BERNARD A. & STANESCU D., 1987, Epidemiological survey among workers exposed to manganese: effects on lung, central nervous system, and some biological indices, *American Journal of Industrial Medicine*, **12**, 119-120.

210. ROELS H., MEIERS G., DELOS M., ORTEGA I., LAUWERYS R., BUCHET J.P. & LISON D., 1997, Influence of the route of administration and the chemical form ($MnCl_2$, MnO_2) on the absorption and the cerebral distribution of manganese in rats, *Archives of Toxicology*, **71**, 223-230.
211. ROSSANDER-HULTEN L., BRUNE M., SANDSTRÖM B., LÖNNERDAL B. & HALLBERG L., 1991, Competitive inhibition of iron absorption by manganese and zinc in humans, *American Journal of Clinical Nutrition*, **54**, 152-156.
212. ROTHAN A., 1976, Manganese, Feuille de médecine du travail, Maloine (Ed.), Paris, 3 pages.
213. RUCKER *et al.*, 1994, Intestinal absorption of nutritionally, in *Physiology of the gastrointestinal tract*, Johnson L.R. (Ed.), Raven Press, New-York, 2194-2201.
214. RÜKGAUER M., KLEIN J. & KRUSE-JARRES J.D., 1997, Reference values for the trace elements copper, manganese, selenium and zinc in the serum/plasma of children, adolescents and adults, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **11**, 92-98.
215. SAMUNI A.M., AFEWORKI M., STEIN W., YORDANOW A.T., DEGRAFF W., KRISHNA M.C., MITCHELL J.B. & BRECHBIEL M.W., 2001, Multifunctional antioxidant activity of HBED iron chelator, *Free Radical Biology and Medicine*, **30** (2), 170-177.
216. SANCESARIO G., MORELLO M., CANINI A., GRILLI M.G., MASSA R. & BERNARDI G., 1999, Mn^{2+} sequestration by mitochondria and inhibition of Mn-SOD immunoreactivity in the basal ganglia of rat after chronic manganese exposure, *Clinical Neuropathology*, **18**, 153.
217. SÁNCHEZ D.J., GÓMEZ M., DOMINGO J.L. & LLOBET J.M., 1995, Relative efficacy of chelating agents on excretion and tissue distribution of manganese in mice, *Journal of Applied Toxicology*, **15**, 285-288.
218. SANDSTRÖM B., DAVIDSSON L., CEDERBLAD A., ERIKSSON R. & LÖNNERDAL B., 1986, Manganese absorption and metabolism in man, *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, **59**, 60-62.
219. SANER G., 1994, Role of manganese in congenital malformations, in *Manganese in health and disease*, Klimis-Tavantzis D.J. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, 121-131.
220. SATA F., ARAKI S. & MURATA K., 1998, Behavior of heavy metals in human urine and blood following calcium disodium ethylenediamine tetraacetate injection: observations in metal workers, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **54**, 167-178.
221. SCHEUHAMMER, A.M., 1983, Chronic manganese exposure in rats: histological changes in the pancreas, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **12**, 353-360.
222. SCHEUHAMMER A.M. & CHERIAN M.G., 1981, The influence of manganese on the distribution of essential trace elements. I: Regional distribution of Mn, Na, K, Mg, Zn, Fe, and Cu in rat brain after chronic Mn exposure, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **61**, 227-233.

223. SCHEUHAMMER A.M. & CHERIAN M.G., 1982, Influence of chronic $MnCl_2$ and EDTA treatment on tissue levels and urinary excretion of trace metals in rats, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **11**, 515-520.
224. SCHEUHAMMER A.M. & CHERIAN M.G., 1983, The influence of manganese on the distribution of essential trace elements. II: The tissue distribution of manganese, magnesium, zinc, iron, and copper in rats after chronic manganese exposure, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **12**, 361-370.
225. SCHEUHAMMER A.M. & CHERIAN M.G., 1985, Binding of manganese in human and rat plasma, *Biochem Biophysica Acta*, **840**, 163-169.
226. SETH P.K. & CHANDRA S.V., 1988, Neurotoxic effects of manganese, in *Metal Neurotoxicity*, Bondy S.C. & Prasad K.N. (Eds.), CRC Press, Boca Raton, 19-33.
227. SETH P.K. & HUSAIN R., 1974, *In vitro* inhibition of succinic deshydrogenase by manganese and its reversal by chelating agents, *Environmental Physiology and Biochemistry*, **4**, 176-180.
228. SETH P.K., MUSTAQ M. & CHANDRA S.V., 1977, Effect of manganese on neonatal rat. Manganese concentration and enzymatic alterations in brain, *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, **40**, 553-560.
229. SHUKLA G.S. & CHANDRA S.V., 1981, Striatal dopamine turnover and L-dopa treatment after short-term exposure of rats to manganese, *Archives of Toxicology*, **47** (3), 191-196.
230. SINGH J., CHANDRA S.V. & TANDON S.K., 1975, Chelation in metal intoxication. II: *In vitro* and *in vivo* effect of some compounds on brain, liver and testes of rats treated with manganese sulfate, *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, **14** (4), 497-504.
231. SINGH J., HUSAIN R., TANDON S.K., SETH P.K. & CHANDRA S.V., 1974, Biochemical and histopathological alterations in early manganese toxicity in rats, *Environmental Physiology and Biochemistry*, **4**, 16-23.
232. SINGH S., SHUKLA G.S., SRIVASTAVA R.S. & CHANDRA S.V., 1979, The interaction between ethanol and manganese in rat brain, *Archives of Toxicology*, **41**, 307-316.
233. SLOOT W.N. & GRAMSBERGEN J.B.P., 1994, Axonal transport of manganese and its relevance to selective neurotoxicity in the rat basal ganglia, *Brain Research*, **657**, 124-132.
234. SMARGIASSI A. & MUTTI A., 1999, Peripheral biomarkers and exposure to manganese, *Neurotoxicology*, **20** (2-3), 401-406.
235. SMARGIASSI A., MERGLER D., BERGAMASCHI E., VETTORI M.V., LUCCHINI R. & APOSTOLI P., 1995, Peripheral markers of catecholamine metabolism among workers occupationally exposed to manganese (Mn), *Toxicology Letters*, **77** (1-3), 329-333.

236. SMYTH L.T., RUHF R.C., WHITMAN N.E. & DUGAN T., 1973, Clinical manganism and exposure to manganese in the production and processing of ferromanganese alloy, *Journal of Occupational Medicine*, **15**, 101-109.
237. STOKES A.H., HASTINGS T.G. & VRANA K.E., 1999, Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine, *Journal of Neuroscience Research*, **55**, 659-665.
238. SUBHASH M.N. & PADMASHREE T.S., 1991, Effect of manganese on biogenic amine metabolism in regions of the rat brain, *Food and Chemical Toxicology*, **29** (8), 579-582.
239. SUMINO K., HAYAKAWA K., SHIBATA T. & KITAMURA S., 1975, Heavy metals in normal Japanese tissues: amounts of 15 heavy metals in 30 subjects, *Archives of Environmental Health*, **30**, 487-494.
240. SZIRAKI I., RAUHALA P., KOH K.K., VAN BERGEN P. & CHIUEH C.C., 1999, Implications for atypical antioxidative properties of manganese in iron-induced brain lipid peroxidation and copper-dependent low density lipoprotein conjugation, *Neurotoxicology*, **20** (2-3), 455-466.
241. TANDON S.K., 1973, Relative distribution of manganese in organs of rat, *Industrial Health*, **11**, 121-125.
242. TANDON S.K., 1978, Chelation in metal intoxication VI. Influence of PAS and CDTA on the excretion of manganese in rabbits given MnO₂, *Toxicology*, **9**, 379-385.
243. TANDON S.K. & KHANDELWAL S., 1978, Chelation in metal intoxication VII: influence of p-aminosalicylic acid and isoniazid on urinary excretion of manganese in poisoned rabbit, *Chemosphere*, **10**, 843-847.
244. TANDON S.K. & KHANDELWAL S., 1982 a, Chelation in metal intoxication X: Influence of different polyaminocarboxylic acids and thiol chelating agents in the excretion and tissue distribution of ⁵⁴Mn in rat, *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, **36** (2), 337-340.
245. TANDON S.K. & KHANDELWAL S., 1982 b, Chelation in metal intoxication XII. Antidotal efficacy of chelating agents on acute toxicity of manganese, *Archives of Toxicology*, **50**, 19-25.
246. TANDON S.K. & MATHUR A.K., 1976, Chelation in metal intoxication. V: Lowering of manganese content in poisoned rat organs, *Chemosphere*, **5**, 319-325.
247. TANDON S.K. & SINGH J., 1975, Removal of manganese by chelating agents from brain and liver of manganese treated rats: an *in vitro* and an *in vivo* study, *Toxicology*, **5**, 237-241.
248. TANDON S.K., CHANDRA S.V., SINGH J., HUSAIN R. & SETH P.K., 1975, Chelation in metal intoxication. I: *In vivo* effect of chelating agents on liver and testes of manganese administered rats, *Environmental Research*, **9**, 18-25.
249. TANDON S.K., JAIN V.K. & MATHUR A.K., 1984, Effect of metal chelating agents on excretion and tissue levels of essential trace elements, *Environmental Research*, **35**, 237-245.

250. TEPPER L.B., 1961, Hazards to health. Manganese, *The New England Journal of Medicine*, **264**, 347-348.
251. TESTOLIN G., CIAPPELLANO S., ALBERIO A., PICCININI F., PARACCHINI L. & JOTTI A., 1993, Intestinal absorption of manganese: an *in vitro* study, *Annals of Nutrition and Metabolism*, **37**, 289-294.
252. TESTUD F., 1993, Manganèse, in *Pathologie toxique en milieu de travail*, Lacassagne A. (Ed.), Lyon, 137-140.
253. THIEBOT J., TRACQUI A., DELANGRE T., GUEDON C. & LEREBOURS E., 1997, Neurologic disorders due to brain manganese deposition in a jaundiced patient receiving long-term parenteral nutrition, *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, **21** (1), 41-45.
254. THOMSON A.B.R. & VALBERG L.S., 1972, Intestinal uptake of iron, cobalt, and manganese in the iron-deficient rat, *American Journal of Physiology*, **223** (6), 1327-1329.
255. THOMSON A.B.R., OLATUNBOSUN D. & VALBERG L.S., 1971, Interrelation of intestinal transport system for manganese and iron, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **78** (4), 642-655.
256. TIPTON I.H. & COOK M.J., 1963, Trace elements in human tissues. Part II. Adult subjects from the United States, *Health Physics*, **9**, 103-145.
257. TJÄLVE H. & HENRIKSSON J., 1999, Uptake of metals in the brain via olfactory pathways, *Neurotoxicology*, **20** (2-3), 181-196.
258. TJÄLVE H., HENRIKSSON J., TALLKVIST J., LARSSON B.S. & LINDQUIST N.G., 1996, Uptake of manganese and cadmium from the nasal mucosa into the central nervous system via olfactory pathways in rats, *Pharmacology and Toxicology*, **79**, 347-356.
259. VAN BARNEVELD A.A. & VAN DEN HAMER C.J., 1984, The influence of calcium and magnesium on manganese transport and utilization in mice, *Biological Trace Elements Research*, **6**, 489-505.
260. VERITY M.A., 1999, Manganese toxicity: a mechanistic hypothesis, *Neurotoxicology*, **20** (2-3), 489-498.
261. VESCOVI A., GEBBIA M., CAPPELLETTI G., PARATI E.A. & SANTAGOSTINO A., 1989, Interaction of manganese with human brain glutathione-S-transferase, *Toxicology*, **57** (2), 183-191.
262. VIEREGGE P., HEINZOW B., KORF G., TEICHERT H.-M., SCHLEINFENBAUM P. & MÖSINGER H.-U., 1995, Long term exposure to manganese in rural well water has no neurological effects, *The Canadian Journal of Neurological Sciences*, **22**, 286-289.
263. WEDEKIND K.J., TITGEMEYER E.C., TWARDOCK A.R. & BAKER D.H., 1991, Phosphorus, but not calcium, affects manganese absorption and turnover in chicks, *The Journal of Nutrition*, 1776-1786.
264. WEDLER F.C., 1994, Biochemical and nutritional role of manganese: an overview, in *Manganese in health and disease*, Klimis-Tavantzis D.J. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, 1-37.

265. WEDLER F.C. & DENMAN R.B., 1984, Glutamine synthetase: the major Mn(II) enzyme in mammalian brain, *Current Topics in Cellular Regulation*, **24**, 153-169.
266. WEIGAND E., KIRCHGESSNER M. & HELBIG U., 1986, True absorption and endogenous fecal excretion of manganese in relation to its dietary supply in growing rats, *Biological Trace Element Research*, **10**, 265-279.
267. WHITE M.A. & SABBIONI E., 1998, Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European Union. X. A study of 13 elements in blood and urine of a United Kingdom population, *The Science of Total Environment*, **216**, 253-270.
268. WHITLOCK C.M., AMUSO S.J. & BITTENBENDER J.B., 1966, Chronic neurological disease in two manganese steel workers, *American Industrial Hygiene Association Journal*, **27**, 454-459.
269. WHO, 1986, World Health Organization, Diseases by manganese and its toxic compounds, in *Early detection of occupational diseases*, Geneva, 69-73.
270. WHO, 1987, Manganese, in: *Air Quality Guidelines for Europe*, European Series N°23, Copenhagen, World Health Organization Regional Office for Europe, 262-271.
271. WHO, 1996, World Health Organization, Guidelines for drinking water quality, **2**, Geneva, 276-284.
272. WIECZOREK H., OBERDÖRSTER G., 1989 a, Effects of chelating on organ distribution and excretion of manganese after inhalation exposure to ⁵⁴MnCl₂. II. Inhalation of chelating agents, *Polish Journal of Occupational Medicine*, **2** (4), 389-396.
273. WIECZOREK H., OBERDÖRSTER G., 1989 b, Effects of selected chelating agents on organ distribution and excretion of manganese after inhalation exposure to ⁵⁴MnCl₂. I. Injection of chelating agents, *Polish Journal of Occupational Medicine*, **2** (3), 261-267.
274. WOLINSKY I., KLIMIS-TAVANTZIS D.J. & RICHARDS L.J., 1994, Manganese and bone metabolism, in *Manganese in health and disease*, Klimis-Tavantzis D.J. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, 115-120.
275. WYNTER J.E., 1962, The prevention of manganese poisoning, *Industrial Medicine Surgery*, **31**, 308-310.
276. YAMADA M., OHNO S., OKAYASU I., OKEDA R., HATAKEYANA S., WATANABE H., USHIO K. & TSUKAGOSHI H., 1986, Chronic manganese poisoning: a neuropathological study with determination of manganese distribution in the brain, *Acta Neurologica*, **70**, 273-278.
277. YOCUM C.F. & PECORARO V.L., 1999, Recent advances in the understanding of biological chemistry of manganese, *Current Opinion in Chemical Biology*, **3**, 182-187.
278. ZAYED J., VYSKOCIL A. & KENNEDY G., 1999, Environmental contamination and human exposure to manganese. Contribution of methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl in unleaded gasoline, *International Archives of Occupational and Environmental Health*, **72**, 7-13.
279. ZHENG W. & GRAZIANO J.H., 1998, Manganese inhibits mitochondrial acotinase: a mechanism of manganese neurotoxicity, *Brain Research*, **799** (2), 334-342.

Annexes

ANNEXE 1

Poids des organes au moment du sacrifice, chez les rats intoxiqués par injections intrapéritonéales (en g, excepté les surrénales en mg).

Organes	Témoin	Mn
Encéphale	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1
Moelle épinière	0,80 ± 0,03	0,81 ± 0,03
Fémur	0,84 ± 0,10	0,72 ± 0,05 **
Cœur	0,92 ± 0,06	0,89 ± 0,05
Poumons	1,36 ± 0,11	1,29 ± 0,08
Reins	2,1 ± 0,2	2,2 ± 0,2
Surrénales	67 ± 8	80 ± 14 *
Testicules	3,3 ± 0,2	2,8 ± 0,3 **
Rate	0,78 ± 0,08	0,79 ± 0,11
Foie	10,0 ± 1,0	10,1 ± 0,9
Œsophage	0,24 ± 0,03	0,23 ± 0,03
Estomac	1,68 ± 0,12	1,60 ± 0,12
Duodénum	0,40 ± 0,11	0,43 ± 0,13
Jéjunum	0,44 ± 0,13	0,41 ± 0,04
Iléon	0,27 ± 0,06	0,33 ± 0,11
Colon	1,72 ± 0,19	1,69 ± 0,36

Résultats exprimés en moyenne ± écart-type.

Significativement différent du groupe témoin: * p < 0,05 ; ** p < 0,01.

N.B. : Seuls figurent les organes prélevés dans leur totalité.

ANNEXE 2

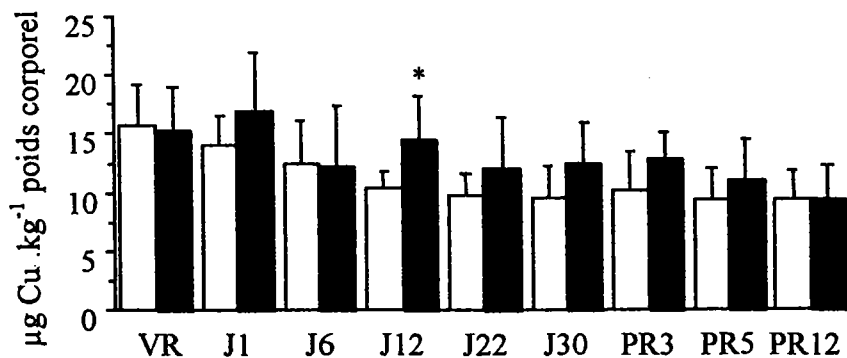
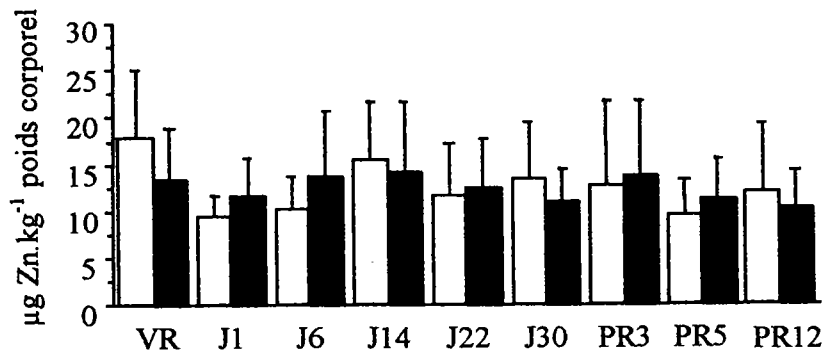
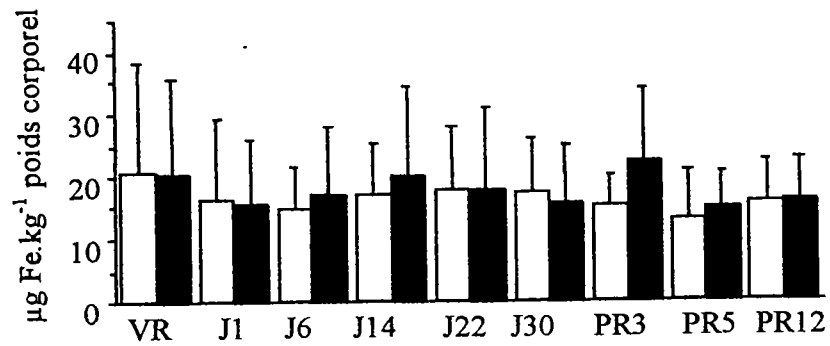
Poids des organes au moment du sacrifice, chez les rats intoxiqués par intubations gastriques (en g, excepté les surrénales en mg).

Organes	Témoin	Mn
Encéphale	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1
Moelle épinière	0,75 ± 0,06	0,79 ± 0,08
Fémur	0,82 ± 0,10	0,77 ± 0,04
Cœur	0,93 ± 0,06	0,90 ± 0,08
Poumons	1,36 ± 0,11	1,27 ± 0,17
Reins	2,1 ± 0,2	2,1 ± 0,1
Surrénales	74 ± 9	73 ± 5
Testicules	3,4 ± 0,2	3,3 ± 0,2
Rate	0,76 ± 0,09	0,74 ± 0,09
Foie	9,4 ± 0,5	9,2 ± 0,7
Œsophage	0,24 ± 0,04	0,23 ± 0,02
Estomac	1,64 ± 0,16	1,62 ± 0,11
Duodénum	0,39 ± 0,09	0,38 ± 0,08
Jéjunum	0,41 ± 0,05	0,40 ± 0,05
Iléon	0,28 ± 0,08	0,26 ± 0,09
Colon	1,64 ± 0,19	1,63 ± 0,21

Résultats exprimés en moyenne ± écart-type.

N.B. : Seuls figurent les organes prélevés dans leur totalité.

ANNEXE 3



Excrétions urinaires du fer, du zinc et du cuivre (moyenne $\pm$ écart-type).

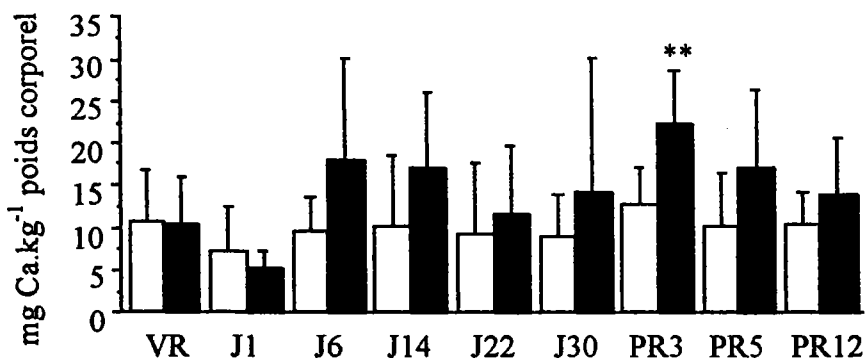
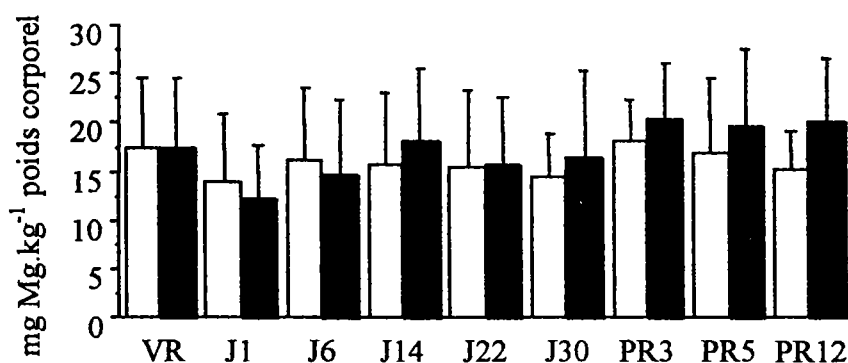
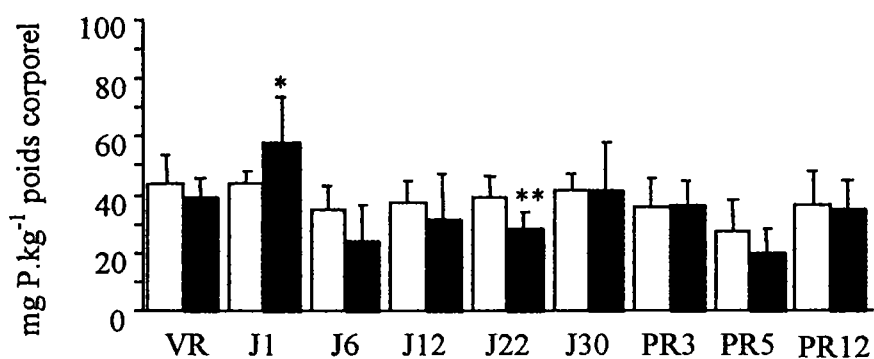
Rats intoxiqués par injections intrapéritonéales.

□ Témoin ■ Mn

VR : valeur de référence ; J : intoxication au manganèse ; PR : période de repos.

Significativement différent du groupe témoin : * $p < 0,05$.

ANNEXE 3 (suite)



Excrétions urinaires du phosphore, du magnésium et du calcium (moyenne $\pm$ écart-type).

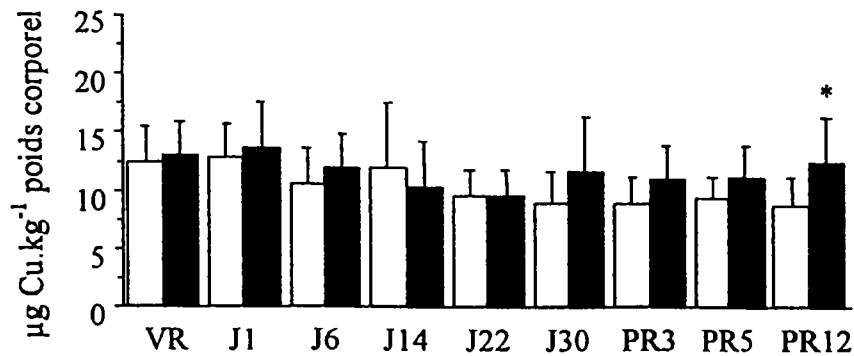
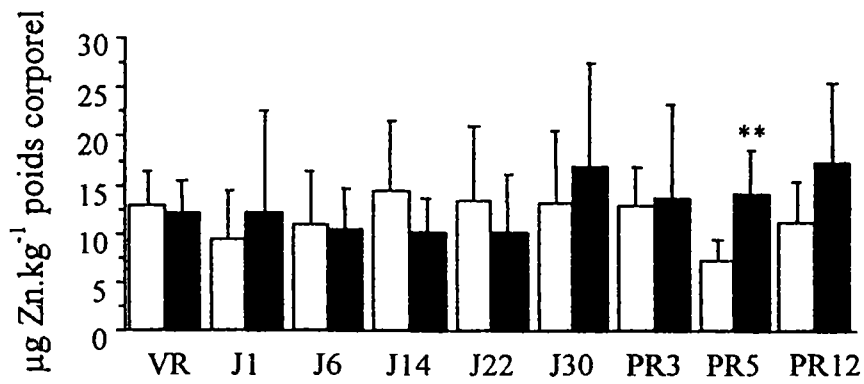
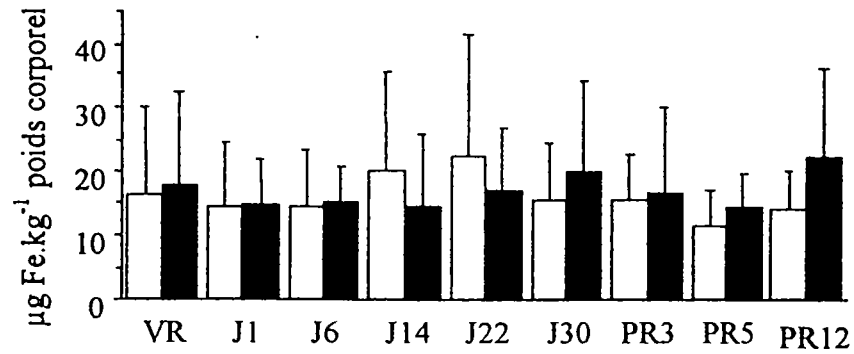
Rats intoxiqués par injections intrapéritonéales.

□ Témoin ■ Mn

VR : valeur de référence ; J : intoxication au manganèse ; PR : période de repos.

Significativement différent du groupe témoin : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

ANNEXE 4



Excrétions urinaires du fer, du cuivre et du zinc (moyenne $\pm$ écart-type).

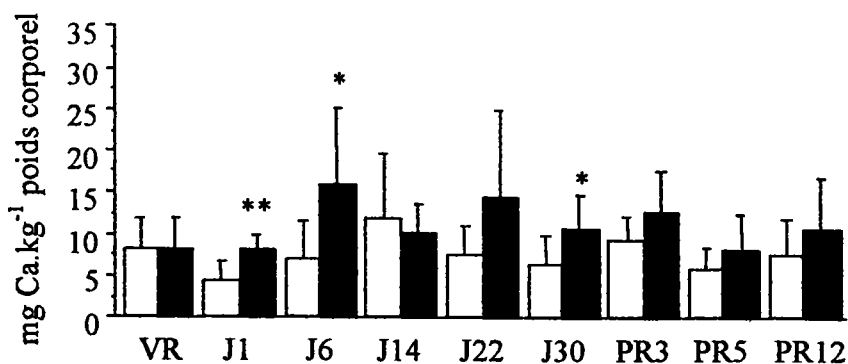
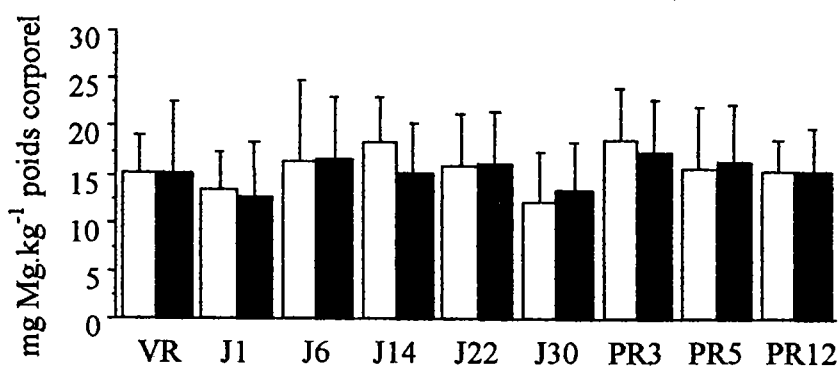
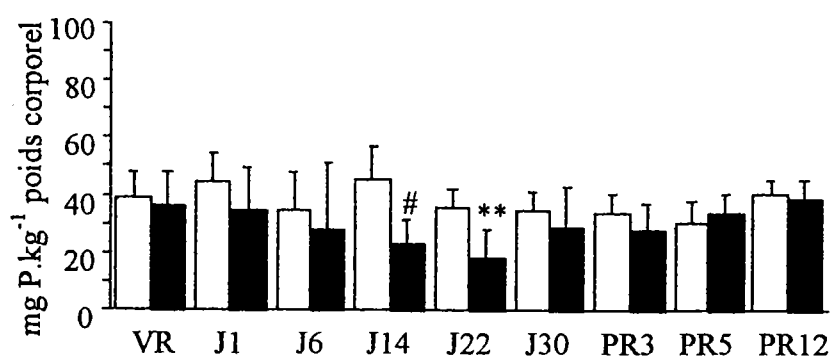
Rats intoxiqués par intubations gastriques.

□ Témoin ■ Mn

VR : valeur de référence ; J : intoxication au manganèse ; PR : période de repos.

Significativement différent du groupe témoin : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

ANNEXE 4 (suite)



Excrétions urinaires du phosphore, du magnésium et du calcium (moyenne $\pm$ écart-type).

Rats intoxiqués par intubations gastriques.

□ Témoin ■ Mn

VR : valeur de référence ; J : intoxication au manganèse; PR : période de repos.

Significativement différent du groupe témoin : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; # $p < 0,001$.

ANNEXE 5

Concentrations sanguines du manganèse et des autres éléments étudiés, chez les rats intoxiqués par injections intrapéritonéales.

Eléments	Témoin	Mn
Mn ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	10,3 $\pm$ 2,4	191,1 $\pm$ 38,7 ^{##}
Fe (mg.L^{-1})	438 $\pm$ 20	452 $\pm$ 22
Zn (mg.L^{-1})	5,1 $\pm$ 0,5	5,0 $\pm$ 0,6
Cu ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	685 $\pm$ 67	634 $\pm$ 80
P (mg.L^{-1})	377 $\pm$ 14	373 $\pm$ 28
Mg (mg.L^{-1})	45,4 $\pm$ 2,3	46,5 $\pm$ 3,2
Ca (mg.L^{-1})	127 $\pm$ 7	128 $\pm$ 11

Résultats exprimés en moyenne $\pm$ écart-type.

Significativement différent du groupe témoin : ^{##} $p < 0,0001$.

Concentrations plasmatiques du manganèse et des autres éléments étudiés, chez les rats intoxiqués par injections intrapéritonéales.

Eléments	Témoin	Mn
Mn ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	24,2 $\pm$ 4,6	29,7 $\pm$ 5,9
Zn ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	1092 $\pm$ 50	1157 $\pm$ 74
Cu ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	959 $\pm$ 55	881 $\pm$ 94
P (mg.L^{-1})	103 $\pm$ 10	110 $\pm$ 14
Mg (mg.L^{-1})	24,3 $\pm$ 1,7	26,0 $\pm$ 2,5
Ca (mg.L^{-1})	126 $\pm$ 4	127 $\pm$ 8

Résultats exprimés en moyenne $\pm$ écart-type.

ANNEXE 6

Concentrations sanguines du manganèse et des autres éléments étudiés, chez les rats intoxiqués par intubations gastriques.

Eléments	Témoin	Mn
Mn ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	10,8 $\pm$ 3,0	13,0 $\pm$ 2,8
Fe (mg.L^{-1})	444 $\pm$ 19	466 $\pm$ 18
Zn (mg.L^{-1})	5,0 $\pm$ 0,3	5,2 $\pm$ 0,3
Cu ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	697 $\pm$ 72	771 $\pm$ 58
P (mg.L^{-1})	374 $\pm$ 14	381 $\pm$ 30
Mg (mg.L^{-1})	44,5 $\pm$ 1,5	44,0 $\pm$ 2,1
Ca (mg.L^{-1})	124 $\pm$ 8	142 $\pm$ 6 [#]

Résultats exprimés en moyenne $\pm$ écart-type.

Significativement différent du groupe témoin : [#] p < 0,001.

Concentrations plasmatiques du manganèse et des autres éléments étudiés, chez les rats intoxiqués par intubations gastriques.

Eléments	Témoin	Mn
Mn ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	25,3 $\pm$ 7,0	28,9 $\pm$ 6,9
Zn ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	1113 $\pm$ 96	1110 $\pm$ 110
Cu ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	957 $\pm$ 86	913 $\pm$ 99
P (mg.L^{-1})	115 $\pm$ 9	106 $\pm$ 10
Mg (mg.L^{-1})	23,7 $\pm$ 0,7	25,5 $\pm$ 1,3
Ca (mg.L^{-1})	114 $\pm$ 8	122 $\pm$ 7

Résultats exprimés en moyenne $\pm$ écart-type.

ANNEXE 7

Distribution tissulaire des différents éléments (Fe, Zn, Cu, P, Mg et Ca),
chez les rats intoxiqués par injections intrapéritonéales.

Distribution tissulaire du fer.

($\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids frais, excepté le fémur : $\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec).

Organes	Témoïn	Mn
Encéphale	16,0 $\pm$ 1,4	15,9 $\pm$ 1,2
Moelle épinière	16,2 $\pm$ 1,8	14,3 $\pm$ 2,0
Fémur	63 $\pm$ 6	71 $\pm$ 11
Moelle osseuse	106 $\pm$ 57	108 $\pm$ 44
Cœur	67 $\pm$ 4	60 $\pm$ 5 **
Poumons	95 $\pm$ 16	84 $\pm$ 10
Reins	74 $\pm$ 6	64 $\pm$ 4 **
Surrénales	106 $\pm$ 10	102 $\pm$ 24
Testicules	18,2 $\pm$ 1,3	19,9 $\pm$ 3,7
Rate	933 $\pm$ 207	601 $\pm$ 114 **
Foie	145 $\pm$ 24	127 $\pm$ 32
Pancréas	21 $\pm$ 4	55 $\pm$ 17 ^{##}
Œsophage	20 $\pm$ 2	21 $\pm$ 3
Estomac	16,8 $\pm$ 1,6	19,3 $\pm$ 2,2 *
Duodénum	19,6 $\pm$ 1,6	23,0 $\pm$ 3,1 *
Jéjunum	16,5 $\pm$ 3,0	18,9 $\pm$ 2,3
Iléon	16,5 $\pm$ 2,9	17,9 $\pm$ 4,6
Colon	9,2 $\pm$ 1,2	12,9 $\pm$ 1,7 [#]
Muscle squelettique	12,4 $\pm$ 3,3	11,6 $\pm$ 1,3
Peau et poils	11,2 $\pm$ 0,8	11,6 $\pm$ 0,8
Tissu adipeux	10,2 $\pm$ 5,7	11,8 $\pm$ 4,4

Résultats exprimés en moyenne $\pm$ écart-type.

Significativement différent du groupe témoin : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; [#] $p < 0,001$; ^{##} $p < 0,0001$.

Distribution tissulaire du zinc.

($\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids frais, excepté le fémur : $\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec).

Organes	Témoin	Mn
Encéphale	10,0 ± 0,7	9,7 ± 0,9
Moelle épinière	5,5 ± 0,7	5,3 ± 0,6
Fémur	153 ± 10	165 ± 14
Cœur	16,3 ± 1,3	16,2 ± 0,7
Poumons	14,5 ± 0,8	14,8 ± 0,8
Reins	19,3 ± 1,7	19,5 ± 1,4
Surrénales	17,0 ± 8,0	19,2 ± 9,1
Testicules	18,5 ± 1,1	18,6 ± 1,5
Rate	16,4 ± 3,1	15,8 ± 1,1
Foie	24 ± 2	21 ± 8
Pancréas	15,5 ± 2,9	13,8 ± 1,7
Œsophage	24 ± 2	24 ± 5
Estomac	19,4 ± 1,5	21,3 ± 1,9 *
Duodénum	18,1 ± 2,6	18,9 ± 3,3
Jéjunum	17,7 ± 2,2	18,8 ± 0,8
Iléon	28 ± 7	28 ± 7
Colon	18,9 ± 1,1	18,2 ± 1,7
Muscle squelettique	7,6 ± 0,9	7,5 ± 0,7
Peau et poils	25 ± 3	26 ± 3
Tissu adipeux	2,4 ± 0,6	2,9 ± 0,7

Résultats exprimés en moyenne ± écart-type.

Significativement différent du groupe témoin : * $p < 0,05$.

Distribution tissulaire de cuivre.

($\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids frais, excepté le fémur : $\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec).

Organes	Témoin	Mn
Encéphale	$2,7 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,2$
Moelle épinière	$1,04 \pm 0,11$	$1,03 \pm 0,14$
Fémur	$1,82 \pm 0,10$	$1,97 \pm 0,24$
Cœur	$5,0 \pm 0,3$	$4,6 \pm 0,3$ **
Poumons	$1,56 \pm 0,14$	$1,49 \pm 0,15$
Reins	$7,4 \pm 1,8$	$5,6 \pm 0,7$ *
Surrénales	$1,81 \pm 0,34$	$1,73 \pm 0,48$
Testicules	$1,79 \pm 0,16$	$1,86 \pm 0,15$
Rate	$1,16 \pm 0,11$	$1,15 \pm 0,09$
Foie	$4,2 \pm 0,4$	$4,1 \pm 0,6$
Pancréas	$0,96 \pm 0,14$	$0,99 \pm 0,10$
Œsophage	$0,29 \pm 0,14$	$0,37 \pm 0,32$
Estomac	$2,1 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$
Duodénum	$1,35 \pm 0,09$	$1,47 \pm 0,27$
Jéjunum	$0,93 \pm 0,20$	$0,97 \pm 0,13$
Iléon	$0,88 \pm 0,26$	$0,75 \pm 0,34$
Colon	$1,21 \pm 0,13$	$1,35 \pm 0,10$ *
Muscle squelettique	$1,00 \pm 0,14$	$0,97 \pm 0,15$
Peau et poils	$2,1 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,4$
Tissu adipeux	$0,18 \pm 0,06$	$0,21 \pm 0,05$

Résultats exprimés en moyenne $\pm$ écart-type.

Significativement différent du groupe témoin : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Distribution tissulaire du phosphore.
 (µg.g⁻¹ de poids frais, excepté le fémur : mg.g⁻¹ de poids sec).

Organes	Témoïn	Mn
Encéphale	2,9 ± 0,1	2,9 ± 0,1
Moelle épinière	4,3 ± 0,4	4,0 ± 0,5
Fémur	91 ± 6	90 ± 9
Cœur	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1
Poumons	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1
Reins	2,5 ± 0,1	2,5 ± 0,1
Surrénales	3,1 ± 0,2	3,0 ± 0,6
Testicules	1,57 ± 0,06	1,59 ± 0,12
Rate	2,8 ± 0,2	2,9 ± 0,1
Foie	3,1 ± 0,3	2,9 ± 0,2
Pancréas	3,0 ± 0,5	2,8 ± 0,4
Œsophage	1,33 ± 0,06	1,39 ± 0,08
Estomac	1,83 ± 0,07	1,90 ± 0,08
Duodénum	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,2
Jéjunum	1,81 ± 0,31	1,85 ± 0,26
Iléon	1,83 ± 0,32	1,65 ± 0,32
Colon	1,39 ± 0,01	1,42 ± 0,10
Muscle squelettique	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1
Peau et poils	0,61 ± 0,05	0,73 ± 0,08 **
Tissu adipeux	0,22 ± 0,05	0,27 ± 0,05

Résultats exprimés en moyenne ± écart-type.
 Significativement différent du groupe témoin : ** p < 0,01.

Distribution tissulaire du magnésium.
 (µg.g⁻¹ de poids frais, excepté le fémur : mg.g⁻¹ de poids sec).

Organes	Témoïn	Mn
Encéphale	201 ± 8	202 ± 6
Moelle épinière	177 ± 17	164 ± 19
Fémur	5,0 ± 0,4	5,0 ± 0,5
Cœur	216 ± 12	211 ± 11
Poumons	204 ± 11	207 ± 9
Reins	312 ± 21	338 ± 23 *
Surrénales	184 ± 18	167 ± 37
Testicules	230 ± 8	224 ± 16
Rate	289 ± 22	293 ± 12
Foie	238 ± 22	228 ± 24
Pancréas	324 ± 61	300 ± 45
Œsophage	185 ± 7	194 ± 14
Estomac	219 ± 12	220 ± 9
Duodénum	131 ± 14	135 ± 16
Jéjunum	130 ± 25	131 ± 21
Iléon	130 ± 23	131 ± 36
Colon	157 ± 10	164 ± 12
Muscle squelettique	387 ± 21	383 ± 22
Peau et poils	108 ± 10	124 ± 19
Tissu adipeux	17,5 ± 5,0	20,7 ± 4,3

Résultats exprimés en moyenne ± écart-type.
 Significativement différent du groupe témoïn : * p < 0,05.

Distribution tissulaire du calcium.
 (µg.g⁻¹ de poids frais, excepté le fémur : mg.g⁻¹ de poids sec).

Organes	Témoin	Mn
Encéphale	262 ± 147	249 ± 100
Moelle épinière	1104 ± 927	903 ± 875
Fémur	157 ± 13	155 ± 16
Cœur	47 ± 3	48 ± 4
Poumons	160 ± 16	148 ± 12
Reins	108 ± 7,5	119 ± 12 *
Surrénales	101 ± 18,8	109 ± 30
Testicules	68 ± 12	97 ± 33 *
Rate	63 ± 4	68 ± 4 *
Foie	34 ± 4	33 ± 4
Pancréas	124 ± 28	119 ± 23
Œsophage	144 ± 51	149 ± 43
Estomac	179 ± 67	218 ± 52
Duodénum	113 ± 56	117 ± 77
Jéjunum	105 ± 39	104 ± 25
Iléon	164 ± 35	182 ± 53
Colon	179 ± 17	186 ± 30
Muscle squelettique	78 ± 7	82 ± 8
Peau et poils	149 ± 12	155 ± 11
Tissu adipeux	25 ± 5	29 ± 5

Résultats exprimés en moyenne ± écart-type.
 Significativement différent du groupe témoin : * p < 0,05.

ANNEXE 8

Distribution tissulaire des différents éléments (Fe, Zn, Cu, P, Mg et Ca),
chez les rats intoxiqués par intubations gastriques.

Distribution tissulaire du fer.

($\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids frais, excepté le fémur : $\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec).

Organes	Témoin	Mn
Encéphale	17,3 ± 1,4	15,4 ± 1,9 *
Moelle épinière	16,7 ± 2,2	15,6 ± 3,7
Fémur	71 ± 13	69 ± 8
Cœur	67 ± 4	65 ± 4
Poumons	96 ± 8	102 ± 19
Reins	71 ± 7	69 ± 6
Surrénales	128 ± 18	104 ± 5 **
Testicules	18,1 ± 3,5	18,5 ± 1,6
Rate	1015 ± 228	809 ± 167
Foie	130 ± 45	148 ± 49
Pancréas	21 ± 3	24 ± 8
Œsophage	23 ± 6	27 ± 5
Estomac	15,5 ± 1,6	17,0 ± 1,8
Duodénum	20,0 ± 2,3	17,4 ± 2,7
Jéjunum	15,0 ± 2,1	13,6 ± 1,2
Iléon	15,0 ± 5,1	15,1 ± 3,7
Colon	9,7 ± 1,4	9,4 ± 1,4
Muscle squelettique	12,2 ± 1,8	12,4 ± 1,3
Peau et poils	13,5 ± 3,2	13,0 ± 1,7
Tissu adipeux	12,1 ± 3,2	18,6 ± 9,4

Résultats exprimés en moyenne ± écart-type.

Significativement différent du groupe témoin : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Distribution tissulaire du zinc.

($\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids frais, excepté le fémur : $\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec).

Organes	Témoïn	Mn
Encéphale	9,9 ± 0,3	9,9 ± 0,8
Moelle épinière	4,9 ± 0,4	5,4 ± 0,5
Fémur	149 ± 26	160 ± 11
Cœur	15,4 ± 1,1	16,2 ± 1,3
Poumons	14,5 ± 0,8	14,8 ± 0,8
Reins	19,4 ± 1,3	18,9 ± 0,8
Surrénales	12,9 ± 0,6	14,2 ± 1,1 *
Testicules	18,2 ± 1,8	17,9 ± 0,8
Rate	16,0 ± 0,6	16,3 ± 1,2
Foie	25 ± 2	25 ± 2
Pancréas	16,6 ± 4,3	15,8 ± 2,4
Œsophage	24 ± 2	22 ± 2
Estomac	20,0 ± 1,3	19,7 ± 1,2
Duodénum	17,9 ± 2,7	17,0 ± 2,4
Jéjunum	20 ± 5	20 ± 3
Iléon	15,0 ± 1,4	16,3 ± 1,6
Colon	18,9 ± 2,3	19,6 ± 1,2
Muscle squelettique	8,2 ± 1,5	7,5 ± 0,6
Peau et poils	25 ± 4	26 ± 4
Tissu adipeux	2,6 ± 0,4	2,9 ± 0,5

Résultats exprimés en moyenne ± écart-type.

Significativement différent du groupe témoin : * $p < 0,05$.

Distribution tissulaire du cuivre.

($\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids frais, excepté le fémur : $\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec).

Organes	Témoin	Mn
Encéphale	$2,7 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,2$
Moelle épinière	$0,95 \pm 0,10$	$1,00 \pm 0,10$
Fémur	$1,79 \pm 0,33$	$1,82 \pm 0,16$
Cœur	$5,1 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,3$
Poumons	$1,53 \pm 0,14$	$1,57 \pm 0,15$
Reins	$6,5 \pm 1,3$	$6,5 \pm 1,4$
Surrénales	$1,46 \pm 0,52$	$1,68 \pm 0,16$
Testicules	$1,74 \pm 0,18$	$1,71 \pm 0,04$
Rate	$1,19 \pm 0,11$	$1,17 \pm 0,16$
Foie	$3,8 \pm 0,4$	$4,5 \pm 0,7 *$
Pancréas	$0,90 \pm 0,13$	$1,02 \pm 0,09 *$
Œsophage	$0,27 \pm 0,18$	$0,23 \pm 0,13$
Estomac	$2,01 \pm 0,11$	$1,92 \pm 0,26$
Duodénum	$1,34 \pm 0,15$	$1,33 \pm 0,18$
Jéjunum	$0,92 \pm 0,16$	$0,98 \pm 0,19$
Iléon	$0,83 \pm 0,26$	$0,76 \pm 0,23$
Colon	$1,19 \pm 0,08$	$1,27 \pm 0,14$
Muscle squelettique	$1,05 \pm 0,24$	$1,00 \pm 0,13$
Peau et poils	$2,1 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,3$
Tissu adipeux	$0,19 \pm 0,02$	$0,24 \pm 0,06 *$

Résultats exprimés en moyenne $\pm$ écart-type.

Significativement différent du groupe témoin : * $p < 0,05$.

Distribution tissulaire du phosphore.
 (µg.g⁻¹ de poids frais, excepté le fémur : mg.g⁻¹ de poids sec).

Organes	Témoin	Mn
Encéphale	3,0 ± 0,3	2,9 ± 0,2
Moelle épinière	4,1 ± 0,2	4,0 ± 0,4
Fémur	89 ± 15	90 ± 4
Cœur	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1
Poumons	2,1 ± 0,1	2,2 ± 0,1
Reins	2,5 ± 0,1	2,6 ± 0,1
Surrénales	3,1 ± 0,1	3,3 ± 0,3
Testicules	1,59 ± 0,13	1,54 ± 0,04
Rate	2,9 ± 0,1	3,0 ± 0,2
Foie	3,1 ± 0,4	3,1 ± 0,2
Pancréas	3,2 ± 0,4	3,4 ± 0,5
Œsophage	1,38 ± 0,08	1,40 ± 0,04
Estomac	1,75 ± 0,13	1,78 ± 0,11
Duodénum	2,1 ± 0,2	2,0 ± 0,2
Jéjunum	1,87 ± 0,23	1,94 ± 0,28
Iléon	1,88 ± 0,26	1,75 ± 0,24
Colon	1,36 ± 0,10	1,41 ± 0,08
Muscle squelettique	2,2 ± 0,1	2,1 ± 0,1
Peau et poils	0,62 ± 0,05	0,67 ± 0,06
Tissu adipeux	0,24 ± 0,05	0,28 ± 0,08

Résultats exprimés en moyenne ± écart-type.

Distribution tissulaire du magnésium.
 (µg.g⁻¹ de poids frais, excepté le fémur : mg.g⁻¹ de poids sec).

Organes	Témoïn	Mn
Encéphale	209 ± 15	203 ± 19
Moelle épinière	168 ± 10	166 ± 10
Fémur	4,8 ± 0,8	5,0 ± 0,3
Cœur	215 ± 10	218 ± 12
Poumons	202 ± 11	211 ± 12
Reins	313 ± 10	318 ± 18
Surrénales	178 ± 12	189 ± 11
Testicules	232 ± 19	223 ± 4
Rate	300 ± 8	301 ± 27
Foie	239 ± 24	245 ± 17
Pancréas	353 ± 27	364 ± 63
Œsophage	182 ± 11	203 ± 6 **
Estomac	209 ± 16	214 ± 8
Duodénum	143 ± 17	132 ± 18
Jéjunum	135 ± 24	140 ± 23
Iléon	130 ± 25	134 ± 30
Colon	153 ± 16	161 ± 16
Muscle squelettique	390 ± 22	397 ± 20
Peau et poils	110 ± 15	123 ± 10
Tissu adipeux	19,1 ± 3,3	22,1 ± 5,9

Résultats exprimés en moyenne ± écart-type.
 Significativement différent du groupe témoïn : ** p < 0,01.

Distribution tissulaire du calcium.

($\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids frais, excepté le fémur : mg.g^{-1} de poids sec).

Organes	Témoïn	Mn
Encéphale	453 ± 680	354 ± 313
Moelle épinière	680 ± 250	779 ± 472
Fémur	153 ± 26	160 ± 8
Cœur	49,0 ± 5,5	47,4 ± 3,8
Poumons	181 ± 47	173 ± 26
Reins	112 ± 6	112 ± 7
Surrénales	117 ± 32	102 ± 20
Testicules	64 ± 6	67 ± 5
Rate	63 ± 5	68 ± 7
Foie	36 ± 4	36 ± 3
Pancréas	125 ± 21	119 ± 22
Œsophage	132 ± 38	152 ± 29
Estomac	146 ± 36	218 ± 47 **
Duodénum	101 ± 52	71 ± 9
Jéjunum	98 ± 44	104 ± 23
Iléon	170 ± 45	183 ± 71
Colon	158 ± 19	171 ± 26
Muscle squelettique	81 ± 5	80 ± 7
Peau et poils	144 ± 8	153 ± 13
Tissu adipeux	27 ± 4	29 ± 6

Résultats exprimés en moyenne ± écart-type.

Significativement différent du groupe témoin : ** $p < 0,01$.

ANNEXE 9

Poids des organes au moment du sacrifice, chez les rats traités par les différents chélateurs (g).

Organes	Mn	DTPA	TTHA	HBED	DPTA	DPTA-OH
Encéphale	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1
Moelle épinière	0,83 ± 0,06	0,82 ± 0,05	0,84 ± 0,06	0,82 ± 0,05	0,84 ± 0,04	0,81 ± 0,07
Fémur	0,73 ± 0,07	0,76 ± 0,07	0,75 ± 0,06	0,76 ± 0,05	0,72 ± 0,05	0,74 ± 0,07
Cœur	0,91 ± 0,08	0,95 ± 0,08	0,93 ± 0,06	0,94 ± 0,03	0,91 ± 0,07	0,90 ± 0,05
Reins	2,2 ± 0,2	2,2 ± 0,2	2,2 ± 0,3	2,3 ± 0,1	2,2 ± 0,2	2,1 ± 0,1
Testicules	3,6 ± 0,3	3,4 ± 0,2	3,4 ± 0,2	3,4 ± 0,2	3,8 ± 0,1	3,8 ± 0,3
Rate	0,86 ± 0,14	0,84 ± 0,09	0,82 ± 0,08	0,84 ± 0,05	0,83 ± 0,10	0,84 ± 0,09

Résultats exprimés en moyenne ± écart-type.

N.B. : seuls figurent les organes prélevés dans leur totalité.

ANNEXE 10

Publications internationales

Effects of Subchronic Exposure to Manganese Chloride on Tissue Distribution of Three Essential Elements in Rats

Pascale Missy,¹ Marie-Claire Lanhers,¹ Lisiane Cunat,¹ Michel Joyeux,² and Daniel Burnel¹

¹Laboratoire de Chimie Générale Appliquée à la Médecine, Département Environnement et Santé Publique, Faculté de Médecine, Université Henri Poincaré, Nancy I, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

²S.E.R.E.S., Département Environnement et Santé Publique, Faculté de Médecine, Université Henri Poincaré, Nancy I, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

A subchronic treatment of manganese chloride (MnCl_2) was administered to rats by intraperitoneal (IP) route (6 mg Mn/kg of body weight/day) or oral (PO) route (75 mg Mn/kg of body weight/day) for 4 weeks. After a 2-week interval, different tissues plus the blood were sampled. An increase of manganese (Mn) concentrations was observed in most of the tissues, particularly in the nervous system (brain and spinal cord) and in femur, with the exception of liver, adrenal glands, and esophagus by IP treatment and liver, jejunum, ileum, and adipose tissue by PO treatment. Tissue accumulation of Mn was greater by IP treatment. During each of the two treatments, urinary and fecal excretion of Mn increased. The presence of Mn observed in whole blood, bone marrow, and spleen after IP treatment could be explained by the existence of competition between iron (Fe) and Mn that may appear, notably, as a disturbance in the functioning of the respiratory chain in the cells (incomplete O_2 reduction and formation of free radicals and oxygenated compounds), leading to cellular degeneration. In these experimental conditions, no obvious competition could be observed with zinc (Zn) and copper (Cu). Despite a large accumulation of Mn in the bones, no disturbance of the phosphorus-calcium metabolism was observed.

Keywords Essential Elements Interactions, Excretion, Manganese, Oxygenated Radicals, Route of Exposure, Tissue Distribution, Toxicity

Despite the fact that manganese (Mn) is considered an essential element, due to its participation in numerous enzymatic reaction (either as a cofactor or as an integral part of the enzymatic protein) (Frederick 1994), it can also prove to be toxic in

case of overexposure, the main entry route being the gastrointestinal tract and the respiratory tract (WHO 1981). The sources of overexposure to Mn are essentially work related (extraction and crushing of Mn ores, iron and steel industry and metallurgical processes, fabrication of dry batteries, use of pesticides in agriculture). However, the general public is also at risk of overexposure, notably through contaminated drinking water (Kondakis et al. 1989) and the combustion of MMT (methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl), an antiknock agent sometimes used as an additive in lead-free gasoline (Zayed, Vyscoci, and Kennedy 1999). The effects of overexposure are mainly observed as neurological disturbances due to neuron degeneration of the basal ganglia (globus pallidus principally) (Verity 1999).

The toxic effects of Mn have been widely studied, using animal models, notably concerning the accumulation of Mn in tissues (search for target organs) and interactions with various other elements (e.g., iron [Fe], zinc [Zn], copper [Cu]) after subchronic or chronic administration. Nonetheless, there is wide disparity between the different experimental protocols used concerning the doses of Mn, the administration routes (intraperitoneal [IP], oral [PO], intravenous [IV]), the length of treatment (4 to 12 weeks), as well as the number of target organs (studies limited to brain or extended over several organs) and the elements studied (magnesium [Mg], phosphorus [P], calcium [Ca], sodium [Na], potassium [K]). Thus, it is impossible at the present time to present an overall evaluation of the data. The objective of our work was thus to conduct a comparative study, as complete as possible, based on one experimental protocol, that is, subchronic daily exposure (4 weeks) to Mn chloride (MnCl_2), a chemical form that makes it possible to obtain satisfactory retention in the tissues (Cahill et al. 1980; Gianutsos et al. 1985; Roels et al. 1997). The distribution of Mn and three other essential elements (Fe, Zn, and Cu) were studied in 20 tissues. We also determined their concentrations

Received 26 March 2000; accepted 9 June 2000.

Address correspondence to Pr Daniel Burnel, Laboratoire de Chimie Générale Appliquée à la Médecine, Département Environnement et Santé Publique, Faculté de Médecine, Université Henri Poincaré, Nancy I, 9, Avenue de la Forêt de Haye, BP 184, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France. E-mail: p.missy@caramail.com

in the blood, plasma, and urine, as well as the concentration of Mn in feces. In addition, changes in the animals' body weight were monitored. With the same basic protocol, two administration routes were used: the IP route, commonly used in toxicity studies, and the PO route, common in cases of accidental over-exposure. The daily IP dose administered (6 mg Mn/kg body weight) was determined on the basis of the literature (Seth and Husain 1974; Singh, Chandra, and Tandon 1975; Singh et al. 1974; Tandon 1973; Tandon and Mathur 1976; Tandon and Singh 1975; Tandon et al. 1975); the daily PO dose (75 mg Mn/kg body weight) was determined in such a way as to obtain a quantity of absorbed Mn close to that obtained by the IP route, taking into account the data in the literature related to absorption rates, the influence of Mn present in food, and the fasting required in our study during phases of urine and feces sampling (Abrams et al. 1976a; 1976b; Davis, Zech, and Greger 1993; Greenberg, Copp, and Cuthbertson 1943; Lee and Johnson 1988; Roels et al. 1997; Weigand, Kirchgessner, and Helbig 1986).

MATERIALS AND METHODS

Chemical Products

Manganese dichloride (tetrahydrate, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) was supplied by Fluka (St Quentin Fallavier, France), sodium chloride (NaCl) was supplied by Aldrich (St Quentin Fallavier, France), and Suprapur nitric acid solution (HNO_3 , 65%) was supplied by Merck (Nogent-sur-Marne, France). Ultrapure water (Milli-Q, Millipore) was used for the preparation of all the solutions.

Animals

Outbred male albino rats of the Wistar strain (Iffa Credo, l'Arbresle, France), weighing 345 ± 20 g were housed individually in standard plastic cages in an air-conditioned room. The room was maintained at a temperature of 22° to 23°C with a 12-12 hours light-dark cycle (lights off at 7 PM). Water and standard diet (food pellets, M20 Extralabo, Provins, France) were available ad libitum.

Experimental Protocol

The rats were divided randomly into four equal groups ($n = 8$). The animals in the group treated by IP route received injections of MnCl_2 dissolved in 0.9% NaCl at a dose of 6 mg Mn/kg body weight/day for 4 weeks (5 days per week). Those in the group treated by the PO route were intubated with MnCl_2 dissolved in ultrapure water at a dose 75 mg Mn/kg body weight/day for 4 weeks (5 days per week). Each treatment group had a corresponding control group that received the solvent in the same experimental conditions. The animals were weighed every day and the administered doses were adjusted accordingly.

The urine and feces were collected on precise dates (before, during, and after the 4 weeks of exposure to Mn). To this end, the animals were kept in individual metabolism cages for 24 hours immediately after administration of the solutions; they were subjected to a solid diet in order to avoid contamination of the urine and feces. The different samples were treated with nitric acid.

After the different treatments, a 2-week rest period was observed. During this waiting time, Mn that was not bound to the tissue could be eliminated. The rats were then sacrificed, after being anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg body weight). Blood samples were taken with heparin tubes by puncture of the abdominal vein with an infusion set (Microflex, Vigon, Ecouen, France). Part of the sample was immediately centrifuged at 3000g for 3 minutes in order to recover the plasma. The plasma and blood samples were then stored at $+4^\circ\text{C}$. Just before assay, the blood was diluted 1:2 with ultrapure water. Different tissues (brain, spinal cord, femur, bone marrow, heart, lungs, liver, spleen, pancreas, kidneys, adrenal glands, testicles, esophagus, stomach, duodenum, jejunum, ileum, colon, skeletal muscle, fur and skin, adipose tissue) were rapidly collected, weighed, frozen, and kept at -18°C . Before assaying, they were thawed and treated with nitric acid.

Determination of Metals

Concentrations of Mn, Fe, Zn, and Cu were determined in the biological media by atomic emission spectrometry (Spectra-metrics Spectra Span V).

Data Analysis

Results in figures, tables, and text are expressed as the mean $\pm$ standard deviation. Student's t test was used for comparison of the means of unpaired data. For multiple comparison, analysis of variance (ANOVA) complemented with Fisher's (PLSD) test was performed. The null hypothesis was rejected at the 5% significance level ($p < .05$).

RESULTS

Weight Changes During Exposure to Mn

IP Treatment

Exposure to Mn caused a significant slowing of weight gain (determined against the reference value) from the third day of treatment till sacrifice; the shortfall being not made up during the 2-week rest period (Figure 1).

PO Treatment

Weight gain was significantly slowed from the 10th day of treatment to the 6th day of rest period, the shortfall being made up from the 7th day of the rest period onward (Figure 2).

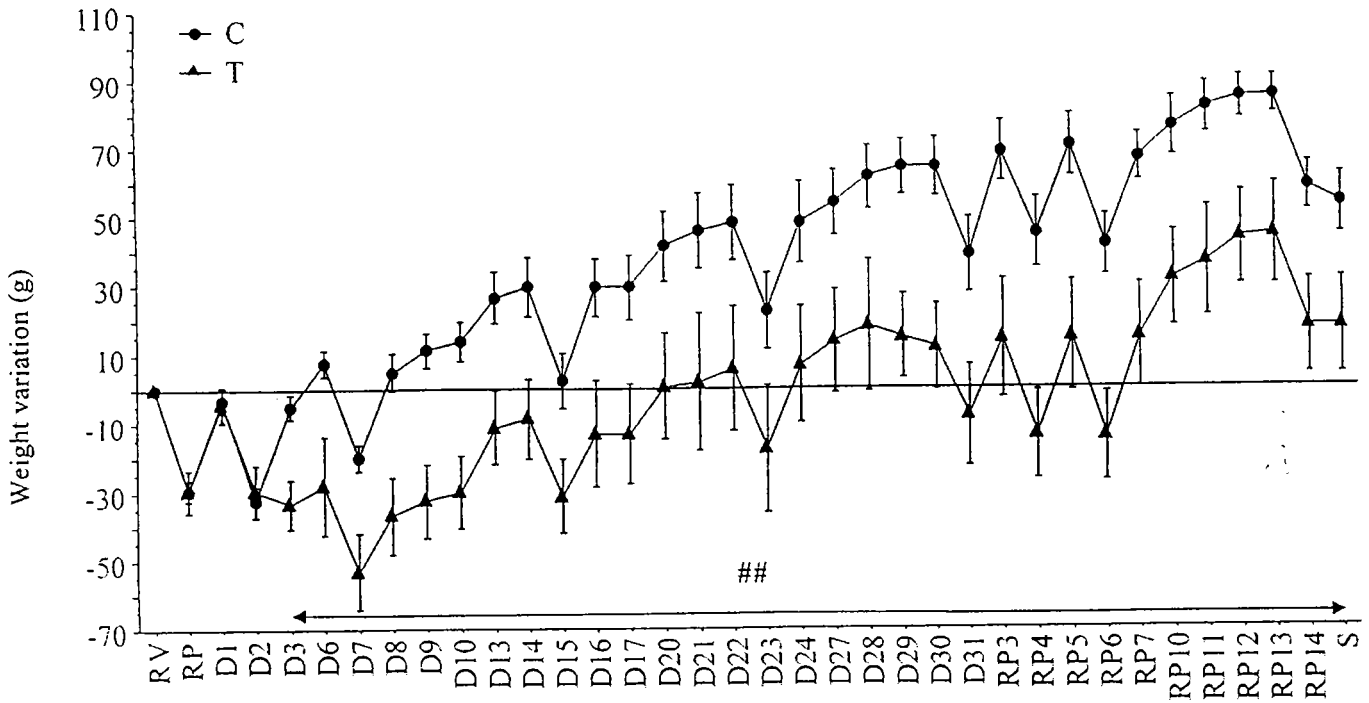


FIGURE 1

Weight variations in rats intraperitoneally exposed to MnCl_2 . RV: reference value before treatment; RP: rest period; D: day of treatment; S: sacrifice; C: control group; T: treated group. Significantly different from control group: ## $p < .0001$.

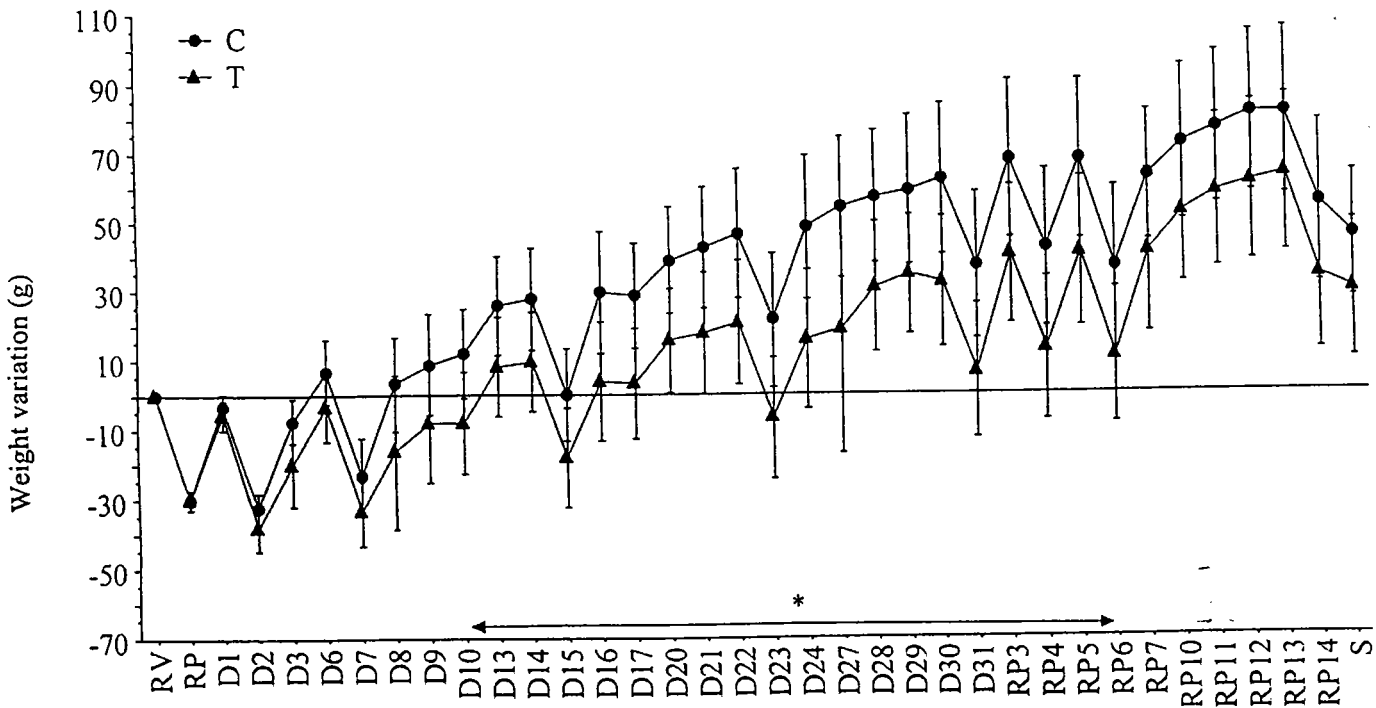


FIGURE 2

Weight variations in rats orally exposed to MnCl_2 . RV: reference value before treatment; RP: rest period; D: day of treatment; S: sacrifice; C: control group; T: treated group. Significantly different from control group: * $p < .05$.

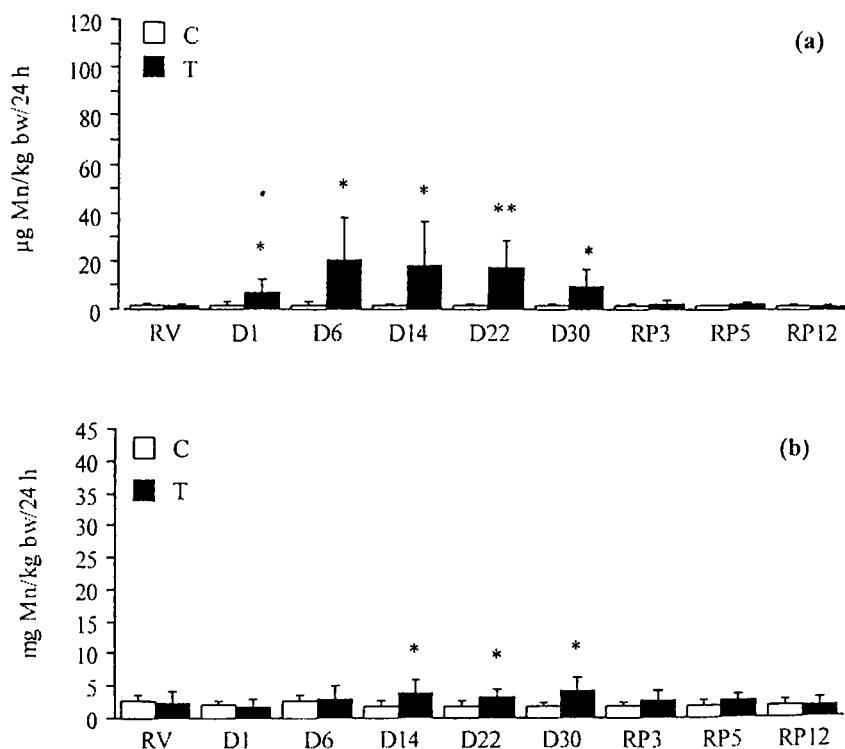


FIGURE 3

Urinary (a) and fecal (b) excretions of Mn before, during, and after IP exposure to MnCl_2 . RV: reference value before treatment; RP: rest period; D: day of treatment; C: control group; T: treated group. Significantly different from control group: * $p < .05$; ** $p < .01$.

Excretion of Mn and Other Essential Elements Studied

IP Treatment

Excretion of Mn in the urine increased significantly during the entire treatment period; it returned to normal during the rest period (Figure 3a). On the contrary, the urinary excretion of Fe, Zn, and Cu was not significantly modified (results not shown). Excretion of Mn in the feces increased significantly from the 14th day of treatment onward and returned to normal during the rest period (Figure 3b).

PO Treatment

Excretion of Mn in the urine increased during the entire treatment period; it returned to normal during the rest period (Figure 4a). In the case of Fe, Zn, and Cu, no marked disturbance was observed (results not shown). Excretion of Mn in the feces increased significantly from the 6th day of treatment and returned to normal during the rest period (Figure 4b).

Blood and Plasma Concentrations at the Time of Sacrifice

After IP treatment, level of Mn in whole blood increased significantly by a factor of 18.5 (controls = $10.3 \pm 2.4 \mu\text{g/l}$; treated = $191 \pm 39 \mu\text{g/l}$; $p < .0001$), whereas in plasma, no

significant modification was observed. After PO treatment, no change of Mn levels in whole blood and in plasma was observed (results not reported).

Tissue Concentrations of Mn, Fe, Zn, and Cu

IP Treatment

After 4 weeks of IP treatment, the concentration of Mn increased significantly in all of the tissues, except the liver, adrenal glands, and the esophagus (Table 1). The most statistically marked modifications ($p < .0001$) were obtained in the femur ($\times 27.6$), spleen ($\times 3.5$), spinal cord ($\times 2.3$), brain ($\times 2.1$), skeletal muscle ($\times 1.7$), kidneys ($\times 1.6$), lungs ($\times 1.5$) and heart ($\times 1.4$).

Many modifications were observed in the tissue distribution of the other elements studied (Table 2; only significant changes reported). Thus, the concentration of Fe increased significantly in the pancreas (+162%), colon (+40%), duodenum (+17%), and stomach (+15%), whereas it decreased in the spleen (−36%), kidneys (−14%), and heart (−10%). A significant increase in the concentration of Zn was obtained in the stomach (+10%). The concentration of Cu increased significantly in the colon (+8%), whereas it decreased in the kidneys (−24%) and heart (−8%).

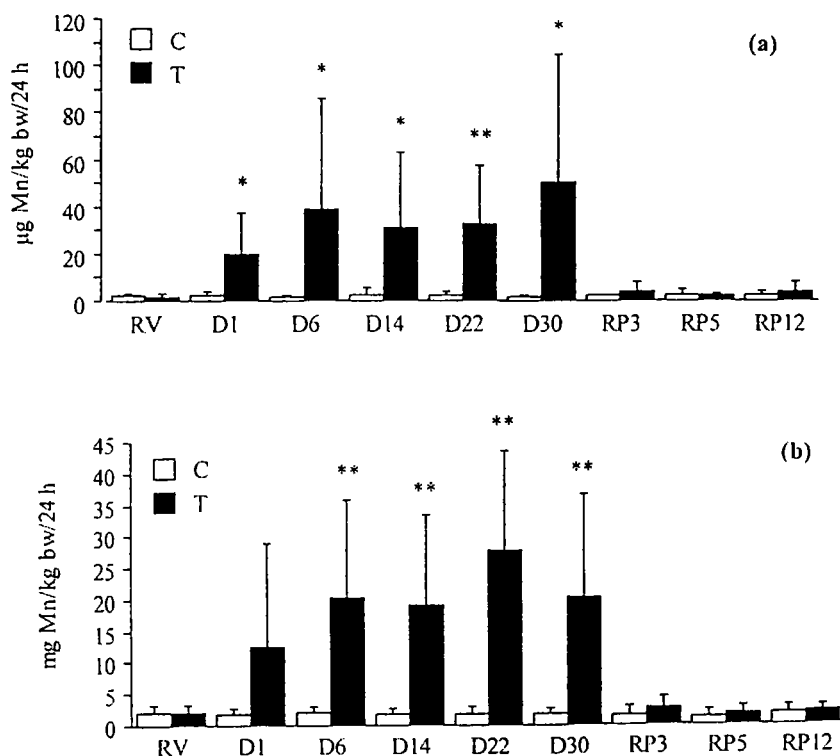


FIGURE 4

Urinary (a) and fecal (b) excretions of Mn before, during, and after PO exposure to MnCl_2 . RV: reference value before treatment; RP: rest period; D: day of treatment; C: control group; T: treated group. Significantly different from control group: * $p < .05$; ** $p < .01$.

PO Treatment

After 4 weeks of PO treatment, the concentration of Mn had significantly increased in all of the tissues with the exception of the liver, jejunum, ileum, and adipose tissue (Table 3). The most statistically marked modifications ($p < .0001$) were observed in the femur ($\times 4.0$), stomach ($\times 2.4$), spinal cord ($\times 1.5$), skeletal muscle ($\times 1.5$), and spleen ($\times 1.3$). We observed a large increase in the lungs ($\times 48.3$), less marked statistically ($p < .01$) due to wide intragroup variability.

Few modifications were observed in the tissue distribution of the other elements studied (Table 4; only significant changes reported). Thus, a significant decrease in the concentration of Fe was obtained in the adrenal glands (-19%) and brain (-11%). The concentration of Zn increased significantly in the adrenal glands ($+10\%$). Lastly, the concentration of Cu increased significantly in the adipose tissue ($+26\%$), liver ($+18\%$), and pancreas ($+11\%$).

DISCUSSION

This research was undertaken with the objective of conducting a comparative study of two types of treatment (IP and PO) based on the same toxicological experimental protocol, that is, subchronic intoxication with MnCl_2 for 4 weeks at a dose of

6 mg of Mn/kg body weight/day (IP) and 75 mg of Mn/kg body weight/day (PO); these 2 concentrations enabling the absorption of similar quantities of Mn.

The comparison of the two routes of exposure (IP and PO) shows greater accumulation with the IP route. This result seems logical in as much as the gastrointestinal barrier is bypassed, the metallic solution is directly in contact with the different organs located in the abdominal cavity. In addition, with IP administration, a larger quantity passes into the blood. After transit through the liver, which appears not to accumulate Mn in a lasting manner, the element is distributed to the other organs such as the femur (principal target organ regardless of the administration route), brain, spinal cord, skeletal muscle, and heart. The changes in urinary and fecal excretion of Mn, observed during both treatments (IP and PO), confirm the observation of greater tissue fixation following IP treatment. Thus, urinary excretion, an indication of the metallic fraction absorbed but not retained by the body, is increased in a relatively comparable manner in both treatments; on the contrary, fecal excretion, indicating essentially the not absorbed fraction, is greater in the case of oral treatment.

Comparisons of our results with those of previous studies remain difficult, due to the wide heterogeneity among the experimental protocols used. In the case of oral treatment, it is

TABLE 1
Tissue Mn concentrations after IP exposure to MnCl₂ (μg/g wet weight; except femur, μg/g dry weight)

Tissues	Groups		Significances	Factors treated/control
	Control	Treated		
Femur	1.20 ± 0.10	33 ± 8		×27.6
Spleen	0.31 ± 0.02	1.10 ± 0.18		×3.5
Spinal cord	0.32 ± 0.02	0.74 ± 0.16		×2.3
Brain	0.43 ± 0.04	0.90 ± 0.10	<i>p</i> < .0001	×2.1
Skeletal muscle	0.08 ± 0.01	0.14 ± 0.01		×1.7
Kidneys	1.51 ± 0.15	2.36 ± 0.20		×1.6
Lungs	0.23 ± 0.02	0.35 ± 0.06		×1.5
Heart	0.43 ± 0.03	0.60 ± 0.04		×1.4
Stomach	0.82 ± 0.19	1.70 ± 0.34		×2.1
Pancreas	1.13 ± 0.16	1.78 ± 0.41	<i>p</i> < .001	×1.6
Fur, skin	0.08 ± 0.02	0.12 ± 0.02		×1.5
Ileum	0.34 ± 0.17	1.63 ± 1.15		×4.8
Testicles	0.46 ± 0.03	1.46 ± 0.86	<i>p</i> < .01	×3.2
Colon	1.53 ± 0.33	2.63 ± 0.73		×1.7
Jejunum	0.28 ± 0.13	2.11 ± 2.19		×7.5
Duodenum	0.57 ± 0.10	3.36 ± 2.89		×5.9
Bone marrow	0.22 ± 0.09	1.15 ± 0.74	<i>p</i> < .05	×5.2
Adipose tissue	0.09 ± 0.03	0.20 ± 0.13		×2.2
Adrenal glands	3.12 ± 1.00	3.58 ± 1.01		—
Liver	1.88 ± 0.21	2.02 ± 0.27	NS	—
Esophagus	0.17 ± 0.06	0.29 ± 0.14		—

Note: NS, not significantly different from control group.

TABLE 2
Changes in Fe, Zn, and Cu concentrations due to IP exposure to MnCl₂ (μg/g wet weight; except femur, μg/g dry weight)

Elements	Tissues	Groups		% variations
		Control	Treated	
Fe	Pancreas	21 ± 4	55 ± 17 ^a	+162
	Colon	9.2 ± 1.2	12.9 ± 1.7 ^b	+40
	Duodenum	19.6 ± 1.6	23.0 ± 3.1 ^d	+17
	Stomach	16.8 ± 1.6	19.3 ± 2.2 ^d	+15
	Spleen	933 ± 207	601 ± 114 ^c	-36
	Kidneys	74 ± 6	64 ± 4 ^c	-14
	Heart	67 ± 4	60 ± 5 ^c	-10
Zn	Stomach	19.4 ± 1.5	21.3 ± 1.9 ^d	+10
	Colon	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1 ^d	+8
Cu	Kidneys	7.4 ± 1.8	5.6 ± 0.7 ^d	-24
	Heart	5.0 ± 0.3	4.6 ± 0.3 ^c	-8

Note: Significantly different from control group: ^a*p* < .0001; ^b*p* < .001; ^c*p* < .01; ^d*p* < .05.

interesting to mention that a Mn accumulation in the brain was also observed with a lower dose of Mn (24.3 mg Mn/kg body weight/week for 4 weeks) (Roels et al. 1997). In other experimental conditions (150 mg Mn/kg body weight every 2 days for 60 days), a reversible accumulation in the liver was observed within the 30 days that followed the end of treatment (Nikolova 1993). Such phenomenon could explain the absence of effect on liver in our study. Finally, it should be noted that the important increases of Mn concentration in the lungs and to a lesser extend in the skin and fur are most likely related to force-feeding (possible regurgitation) and must be considered carefully.

In the case of IP treatment, we can mention great differences between our results and those found in literature, such as a great accumulation of Mn in pancreas considered by the authors as a specific target organ for Mn toxicity (Scheuhammer and Cherian 1983) and a more or less delayed accumulation in liver (Jiang et al. 1992; Murthy, Srivastava, and Chandra 1981; Scheuhammer and Cherian 1982; Tandon and Mathur 1976). Concerning the presence of Mn in the brain, our results confirm those previously obtained with lower doses administered (3 and 4.16 mg of Mn/kg body weight/day) and different lengths of treatment (30, 60, and 84 days) (Jiang et al. 1992; Scheuhammer

TABLE 3
Tissue Mn concentrations after PO exposure to MnCl_2 ($\mu\text{g/g}$ wet weight; except femur, $\mu\text{g/g}$ dry weight)

Tissues	Groups		Significances	Factors treated/control
	Control	Treated		
Femur	1.2 ± 0.2	4.8 ± 1.9		$\times 4.0$
Stomach	0.88 ± 0.34	2.1 ± 0.3		$\times 2.4$
Spinal cord	0.32 ± 0.02	0.49 ± 0.05	$p < .0001$	$\times 1.5$
Skeletal muscle	0.08 ± 0.01	0.12 ± 0.01		$\times 1.5$
Spleen	0.30 ± 0.02	0.38 ± 0.03		$\times 1.3$
Lungs	0.24 ± 0.02	11.6 ± 9.1		$\times 48.3$
Fur, skin	0.08 ± 0.01	0.24 ± 0.12		$\times 3.0$
Esophagus	0.16 ± 0.04	0.48 ± 0.22		$\times 3.0$
Brain	0.40 ± 0.03	0.79 ± 0.27	$p < .01$	$\times 2.0$
Adrenal glands	2.8 ± 0.4	3.7 ± 0.5		$\times 1.3$
Kidneys	1.5 ± 0.2	1.8 ± 0.1		$\times 1.2$
Heart	0.46 ± 0.04	0.53 ± 0.04		$\times 1.1$
Duodenum	0.52 ± 0.09	0.69 ± 0.09		$\times 1.3$
Pancreas	1.2 ± 0.1	1.5 ± 0.2		$\times 1.2$
Colon	1.3 ± 0.2	1.6 ± 0.2	$p < .05$	$\times 1.2$
Testicles	0.43 ± 0.04	0.49 ± 0.02		$\times 1.1$
Adipose tissue	0.08 ± 0.02	0.14 ± 0.07		—
Liver	1.9 ± 0.2	2.0 ± 0.2		—
Jejunum	0.25 ± 0.13	0.32 ± 0.10	NS	—
Ileum	0.34 ± 0.18	0.44 ± 0.31		—

Note: NS, not significantly different from control group.

and Cherian 1982; Scheuhammer and Cherian 1981). Finally, the non-negligible accumulation of Mn observed in the intestinal tract must be considered carefully; the digestive system being in direct contact with the element administered by the IP route. This could also explain the adherent aspect of the intestines observed during autopsy, but also the macroscopic damage to

the hepatic lobes, particularly the left lobe situated just under the peritoneum (swollen edges, lobes retracted, adhesive and hardened).

The presence of Mn in whole blood but not in plasma, which is only significant after IP treatment and after 2 weeks of rest, leads us to believe that this element may be associated with certain blood elements, such as hemoglobin, instead of Fe, thus supporting results of previous studies (Borg and Cotzias 1958; Scheuhammer and Cherian 1983). The progressive disappearance of Mn in the blood would thus be closely related to the length of life and the renewal of the erythrocytes. This hypothesis correlates well with the observation of a decrease in Fe and an accumulation of Mn in spleen, the organ in which old erythrocytes are destroyed, and an accumulation of Mn in the bone marrow, often called "red marrow" due to its richness in blood cells, which plays an important role in hematopoiesis. As opposed to the spleen, no notable change in the concentration of Fe could be observed in whole blood or bone marrow, probably due to the high Fe content of these tissues, as demonstrated by the Fe/Mn ratios calculated using concentrations expressed in $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ for the blood and in $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ for bone marrow (controls Fe/Mn blood = 43,000; treated Fe/Mn blood = 2,115; controls Fe/Mn bone marrow = 472; treated Fe/Mn bone marrow = 92).

TABLE 4
Changes in Fe, Zn, and Cu concentrations due to PO exposure to MnCl_2 ($\mu\text{g/g}$ wet weight; except femur, $\mu\text{g/g}$ dry weight)

Elements	Tissues	Groups		% variations
		Control	Treated	
Fe	Adrenal glands	128 ± 18	104 ± 5^c	-19
	Brain	17.3 ± 1.4	15.4 ± 1.9^d	-11
Zn	Adrenal glands	12.9 ± 0.6	14.2 ± 1.1^d	+10
	Adipose tissue	0.19 ± 0.02	0.24 ± 0.06^d	+26
Cu	Liver	3.8 ± 0.4	4.5 ± 0.7^d	+18
	Pancreas	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.1^d	+11

Note: Significantly different from control group: $^c p < .01$; $^d p < .05$.

Assuming Mn^{2+} takes the place of Fe^{2+} in hemoglobin, the Mn-substituted hemoglobin is incapable of ensuring the O_2 transport. However, no disturbance in O_2 transport in blood will be observed, considering Fe/Mn blood ratios. In tissues, where Fe/Mn ratios are generally much lower, consequences may be more deleterious; indeed Mn^{2+} could take place of Fe^{2+} in cytochromes of cellular respiratory chain that have a structure close to hemoglobin. This can lead to incomplete reduction of O_2 with the formation of free radicals and possibly oxygenated compounds such as O_2^- and H_2O_2 , responsible for cellular degeneration, particularly in the brain, thus explaining the neurotoxicity of Mn. Effectively, in the different cytochromes of the cellular respiratory chain, the standard potential of the Fe^{3+}/Fe^{2+} couple (0.77 V in the absence of complexation) varies according to the environment of Fe, from 0.07 V (cytochrome b) to 0.55 V (cytochrome a_3), that is to say a decrease of 0.22 V in the case of a_3 (0.77 – 0.55); the potential of the O_2/H_2O couple being 0.82 V at pH 7, the last cytochrome (a_3) of the cellular respiratory chain can thus reduce O_2 to H_2O . In the case of Mn^{3+}/Mn^{2+} couple (standard potential of 1.50 V in the absence of complexation), forming complexes in a way similar to the Fe^{3+}/Fe^{2+} couple, we should be able to observe a comparable decrease in its redox potential (i.e., 1.50 – 0.22 = 1.28 V); in these conditions, the reduction of O_2 to H_2O is no longer possible, the last cytochrome of the cellular respiratory chain having a greater redox potential (1.28 V) than the O_2/H_2O couple (0.82 V).

Among the other disturbances observed in the tissue distribution of Fe, there is a large accumulation in the pancreas, confirming a previous study (Scheuhammer 1983) that explained this effect by an increase in vascularization and/or a hemorrhage and suggested a selective toxicity of Mn on the pancreatic tissue. Corroborating these hypotheses, disturbances in the endocrine functions of the pancreas, under the effect of Mn, have been reported (Baly, Lönnerdal, and Keen 1985; Hurley, Keen, and Baly 1984). An irritation, a local inflammation, following the IP treatment could also partly explain the increases in the concentration of Fe observed in the gastrointestinal tract, thus corroborating the macroscopic abnormalities observed in the intestines.

Concerning the tissue distribution of the two other elements studied (Zn and Cu), bivalent cations with chemical properties close to those of Mn, the slight disturbances observed (increases or decreases) do not make it possible to demonstrate major interactions with Mn, at least after the 2-week rest period that followed the IP and PO treatments. This observation does not exclude the existence of reversible interactions during this period, as has been previously mentioned (Scheuhammer and Cherian 1982). Moreover, data in literature are very contradictory, particularly for Cu (Gubler et al. 1954; Jiang et al. 1992; Murthy, Srivastava, and Chandra 1981; Scheuhammer and Cherian 1981; 1982; 1983; Singh et al. 1979). As Nikolova (1993) suggested, it is possible that the disturbances observed, which consist in the most part of increases of tissue concentrations, are manifestations of compensatory defense mechanisms in response to the rise in tissue concentrations of Mn.

Lastly, we must indicate that the treatments carried out (IP and PO) did not disturb phosphorus-calcium metabolism (no major disturbance in the tissue distribution of P and Ca; results not shown). Even if our work confirmed the large accumulation of Mn in the bones mentioned in literature, the Ca/Mn ratios in the femur remain very high (controls = 127,000; treated = 32,000) and the substitution of Ca by Mn thus remains very partial.

In conclusion, we observed that the greatest disturbances observed were obtained in the case of subchronic treatment by IP route, the route commonly used in testing on laboratory animals, but not very representative of real conditions in which intoxication occurs. On the other hand, treatment by oral route causes fewer effects, despite the high dose of Mn administered (equivalent to 5 g Mn/day for humans), rarely encountered in everyday life. Thus, the risks of intoxication by oral route appear to be very limited. Nonetheless, cases related to pulmonary intoxication concerning Mn workers highly exposed to dust (essentially MnO_2) cannot be neglected. Damage to the tissues observed in our study could certainly be found in this third type of intoxication, with risks of sequelae (cellular degeneration), as it has already been demonstrated for the nervous system.

REFERENCES

- Abrams, E., J. W. Lassiter, W. J. Miller, M. W. Neathery, and R. P. Gentry. 1976a. Effect of dietary manganese as a factor affecting ^{54}Mn absorption in rats. *Nutr. Rep. Int.* 14:561–565.
- Abrams, E., J. W. Lassiter, W. J. Miller, M. W. Neathery, R. P. Gentry, and R. D. Scarth. 1976b. Absorption as a factor in manganese homeostasis. *J. Anim. Sci.* 42:630–636.
- Baly, D. L., B. Lönnerdal, and C. L. Keen. 1985. Effects of high doses of manganese on carbohydrate homeostasis. *Toxicol. Lett.* 25:95–102.
- Borg, D. C., and G. C. Cotzias. 1958. Incorporation of manganese into erythrocytes as evidence for a manganese porphyrin in man. *Nature* 182:1677–1679.
- Cahill, D. F., M. S. Bercegeay, R. C. Haggerty, J. E. Gerding, and L. E. Gray. 1980. Age-related retention and distribution of ingested Mn_3O_4 in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 53:83–91.
- Davis, C. D., L. Zech, and J. L. Greger. 1993. Manganese metabolism in rats: An improved methodology for assessing gut endogenous losses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 202:103–108.
- Frederick, C. W. 1994. Biochemical and nutritional role of manganese: An overview. In *Manganese in health and disease*, ed. D. J. Klimis-Tavantzis, 1–37. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Gianutsos, G., M. D. Seltzer, R. Saymeh, M.-L. Wang Wu, and R. G. Michel. 1985. Brain manganese accumulation following systemic administration of different forms. *Arch. Toxicol.* 57:272–275.
- Greenberg, D. M., D. H. Copp, and E. M. Cuthbertson. 1943. Studies in mineral metabolism with the aid of artificial radioactive isotopes. VII. The distribution and excretion, particularly by way of the bile, of iron, cobalt, and manganese. *J. Biol. Chem.* 147:749–756.
- Gubler, C. J., D. S. Taylor, E. J. Eichwald, G. E. Cartwright, and M. M. Wintrobe. 1954. Copper metabolism. XII. Influence of manganese on metabolism of copper. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86:223–227.
- Hurley, L. S., C. L. Keen, and D. L. Baly. 1984. Manganese deficiency and toxicity: Effects on carbohydrate metabolism in the rat. *Neurotoxicology* 5:97–104.
- Jiang, Y.-M., L.-H. Ge, J.-P. Lu, S.-Q. Ji, and W.-D. Hu. 1992. Effect of PAS-Na on the levels of manganese and copper in brain, liver and serum of manganese-poisoned rats. *Chin. J. Pharmacol. Toxicol.* 6:185–188.

- Kondakis, X. G., N. Makris, M. Leotsinidis, M. Prinou, and T. Papapetropoulos. 1989. Possible health effects of high manganese concentration in drinking water. *Arch. Environ. Health* 44:175-178.
- Lee, D.-Y., and P. E. Johnson. 1988. Factors affecting absorption and excretion of ^{54}Mn in Rats. *J. Nutr.* 118:1509-1516.
- Murthy, R. C., R. S. Srivastava, and S. V. Chandra. 1981. Serum ceruloplasmin in manganese-treated rats. *Toxicol. Lett.* 7:217-220.
- Nikolova, P. 1993. Effect of manganese on essential trace element metabolism. Tissue concentrations and excretion of manganese, iron, copper, cobalt and zinc. *Trace Elem. Med.* 10:141-147.
- Roels, H., G. Meiers, M. Delos, I. Ortega, R. Lauwerys, J. P. Buchet, and D. Lison. 1997. Influence of the route of administration and the chemical form (MnCl_2 , MnO_2) on the absorption and the cerebral distribution of manganese in rats. *Arch. Toxicol.* 71:223-230.
- Scheuhammer, A. M. 1983. Chronic Manganese exposure in rats: Histological changes in the pancreas. *J. Toxicol. Environ. Health* 12:353-360.
- Scheuhammer, A. M., and M. G. Cherian. 1981. The influence of manganese on the distribution of essential trace elements. I. Regional distribution of Mn, Na, K, Mg, Zn, Fe, and Cu in rat brain after chronic Mn exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 61:227-233.
- Scheuhammer, A. M., and M. G. Cherian. 1982. Influence of chronic MnCl_2 and EDTA treatment on tissue levels and urinary excretion of trace metals in rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 11:515-520.
- Scheuhammer, A. M., and M. G. Cherian. 1983. The influence of manganese on the distribution of essential trace elements. II. The tissue distribution of manganese, magnesium, zinc, iron, and copper in rats after chronic manganese exposure. *J. Toxicol. Environ. Health* 12:361-370.
- Seth, P. K., and R. Husain. 1974. *In vitro* inhibition of succinic deshydrogenase by manganese and its reversal by chelating agents. *Environ. Physiol. Biochem.* 4:176-180.
- Singh, J., S. V. Chandra, and S. K. Tandon. 1975. Chelation in metal intoxication II: *In vitro* and *in vivo* effect of some compounds on brain, liver and testes of rats treated with manganese sulphate. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 14:497-504.
- Singh, J., R. Husain, S. K. Tandon, P. K. Seth, and S. V. Chandra. 1974. Biochemical and histopathological alterations in early manganese toxicity in rats. *Environ. Physiol. Biochem.* 4:16-23.
- Singh, S., G. S. Shukla, R. S. Srivastava, and S. V. Chandra. 1979. The interaction between ethanol and manganese in rat brain. *Arch. Toxicol.* 41:307-316.
- Tandon, S. K. 1973. Relative distribution of manganese in organs of rat. *Ind. Health* 11:121-125.
- Tandon, S. K., S. V. Chandra, J. Singh, R. Husain, and P. K. Seth. 1975. Chelation in metal intoxication. I. *In vivo* effect of chelating agents on liver and testes of manganese administered rats. *Environ. Res.* 9:18-25.
- Tandon, S. K., and A. K. Mathur. 1976. Chelation in metal intoxication V: Lowering of manganese content in poisoned rat organs. *Chemosphere* 5:319-325.
- Tandon, S. K., and J. Singh. 1975. Removal of manganese by chelating agents from brain and liver of manganese treated rats: An *in vitro* and an *in vivo* study. *Toxicology* 5:237-241.
- Verity, M. A. 1999. Manganese toxicity: A mechanistic hypothesis. *Neurotoxicology* 20:489-498.
- Weigand, E., M. Kirchgessner, and U. Helbig. 1986. True absorption and endogenous fecal excretion of manganese in relation to its dietary supply in growing rats. *Biol. Trace. Elem. Res.* 10:265-279.
- World Health Organization. 1981. *Manganese. Environmental Health Criteria* 17. Geneva: Author.
- Zayed, J., A. Vyskocil, and G. Kennedy. 1999. Environmental contamination and human exposure to manganese—contribution of methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl in unleaded gasoline. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 72:7-13.

In vitro and *in vivo* studies on chelation of manganese

P Missy¹, M-C Lanhers¹, Y Grignon², M Joyeux³ and D Burnel^{*1}

¹Laboratoire de Chimie et de Toxicologie des Métaux, Département Environnement et Santé Publique, Faculté de Médecine, Université Henry Poincaré, Nancy I, Vandoeuvre-lès-Nancy, France; ²Laboratoire d'Anatomie Pathologique, Faculté de Médecine, Université Henry Poincaré, Nancy I, Vandoeuvre-lès-Nancy, France; ³SERES, Département Environnement et Santé Publique, Faculté de Médecine, Université Henry Poincaré, Nancy I, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

This work deals with new chelating agents of manganese (Mn).

Out of 24 compounds chosen for their chemical structure supposed to be favorable for Mn complexation, six poly-aminopolycarboxylic acids proved to be efficient for displacing Mn bound to serum bovine proteins *in vitro*: TTHA, DTPA, DPTA, DPTA-OH, HBED, EDTA (mobilization $\geq 50\%$).

The first five compounds were then tested *in vivo* on rats pretreated with MnCl₂. They exhibited only slight to moderate efficacy to diminish Mn in tissues and were ineffective on increased Mn concentration in whole blood; in addition, they had different and specific mobilizing effects on other essential elements (Fe, Zn, Cu).

Their limited efficacy *in vivo* could be due to the formation of very stable complexes between Mn²⁺ and different mole-

cules such as hemoglobin and certain cytochromes, instead of Fe²⁺. This could disturb the functioning of the cellular respiratory chain, leading to an incomplete reduction of O₂ with formation of free oxygenated radicals, reduction in the energy supply, and disturbance of the cytochromes renewal mechanism. All of these phenomena could accelerate cellular aging and explain the lack of efficacy of the chelating agents towards Mn neurotoxicity (Parkinson's syndrome). *Human & Experimental Toxicology* (2000) 19, 448–456.

Keywords: manganese; intoxication; chelating agents; cellular respiratory chain; free oxygenated radicals; Parkinson's syndrome

Introduction

An essential element, manganese (Mn), can prove to be toxic in cases of chronic overexposure, for the most part professional, and can provoke, notably, neurological disorders ("manganism") of which the most striking is Parkinson's syndrome.¹ At the present time, available treatments operate on the symptomatic level (administration of L-dopa, a dopamine precursor) or consist of the administration of a chelating agent. Among the compounds clinically tested, we note EDTA (ethylenediamino-*N,N,N,N'*-tetraacetic acid), usually used in cases of lead poisoning and which increases urinary excretion of Mn;² however, this compound appears to have very little effect on clinical symptoms, notably in cases of severe or advanced Mn poisoning.^{3–8} Another compound used in cases of lead poisoning, dimercaptosuccinic acid (DMSA), has only a slight influence on the Mn level

in the urine and blood.⁹ 2,3-Dimercaptopropanol (BAL), used in cases of mercury, arsenic, and gold poisoning, has proved to be without effect in cases of Mn intoxication.^{4,6} Lastly, *para*-aminosalicylic acid (PAS), used in the past for treating tuberculosis, appears effective in the treatment of the early manifestations of Mn poisoning, as well as in severe chronic cases;¹⁰ nevertheless, the structure and number of functional groups of this molecule do not appear, *a priori*, to be favorable to efficient chelation of Mn.¹¹

Thus, due to the small amount of data available concerning the existence of efficient Mn-chelating agents, we felt it would be interesting to search for such compounds by basing our research on their chemical structure and more particularly on the presence of interesting functional groups. In effect, to complex Mn and for it to be mobilized in the tissues, the chelating agent must possess donor electron groups such as carboxyl, amine, hydroxyl, and/or thiols groups.¹²

Initially, *in vitro* screening was performed on 24 compounds including some that were reputed to be

*Correspondence: Dr D Burnel, Laboratoire de Chimie et de Toxicologie des Métaux, Département Environnement et Santé Publique, Faculté de Médecine, Université Henry Poincaré, Nancy I, 9, Avenue de la Forêt de Haye, BP 184, 54505, Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

Received 15 July 2000; accepted 18 August 2000

complexation agents for Mn. The stability constant of the complex was sometimes known. The following molecules were screened: ethylenediamino-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EDTA); diethylenetriamino-*N,N,N',N',N''*-pentaacetic acid (DTPA); ethylene-glycol-bis(2-aminoethyl)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA); nitriloacetic acid (NTA); 1,3-diaminopropane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (DPTA); 1,3-diamino-2-propanol-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (DPTA-OH); ethylenediamino-*N,N,N',N'*-tetrapropionic acid (EDTP); ethylenediamino-*N,N'*-dipropionic acid (EDDP); triethylenetetraamino-*N,N,N',N',N'',N'''*-hexaacetic acid (TTHA); ethylenediamino-*N,N'*-diacetic acid (EDDA); 1,6-diaminohexane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid; 1,4-phenylenediamino-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid; *N,N'*-di(2-hydroxybenzyl)ethylene-diamino-*N,N'*-diacetic acid (HBED); 2'-(4-hydroxyphenylazo)benzoic acid (HABA); DL-pipecolinic acid; 2,4-dihydroxypyrimidine-5-carboxylic acid; 2,4,5-trihydroxypyrimidine; gluconic acid; salicylic acid; sodium diethyldithiocarbamate (DDC); glucosaminic acid; 2-aminophenol; 3-aminophenol; hypoxanthine. Salicylic acid was preferred to PAS with a similar structure due to its greater efficacy for mobilizing tissue Mn in animals.¹³ The *in vitro* technique used had been previously developed for aluminum;^{14,15} it is based on the evaluation of the capacity of the different substances tested to displace Mn bound to bovine serum proteins.

This *in vitro* screening thus enabled us to select a certain number of compounds with a power of mobilization greater or equal to 50%. These compounds were then tested *in vivo* (intraperitoneal treatment) on rats which had been pre-treated with $MnCl_2$ according to a previously determined protocol.¹⁶ Their influence on Mn tissue distribution, urinary excretion, and levels in blood and plasma were observed, as well as their influence on tissue distribution and urinary excretion of other essential elements [iron (Fe), zinc (Zn), and copper (Cu)].

Methods

Chemical products

Mn chloride (tetrahydrate, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$), DPTA, DPTA-OH, EDTP, EDDA, DDC, 1,6-diaminohexane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, 2,4,5-trihydroxypyrimidine, 2-aminophenol and 3-aminophenol were supplied by Fluka (Saint Quentin Fallavier, France). EDTA, DTPA, EGTA, NTA, and salicylic acid were supplied by Prolabo (Paris, France). Sodium chloride (NaCl), HABA, pipecolinic acid, hypoxanthine and 2,4-dihydroxypyrimidine-5-carboxylic acid were supplied by Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). TTHA and gluconic acid were supplied by

Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). EDDP and glucosaminic acid were supplied by ICN (Orsay, France). HBED was supplied by Strem Chemicals Inc. (Bischoff, France) and 1,4-phenylenediamino-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid was supplied by Lancaster (Strasbourg, France). Suprapur[®] nitric acid solution (HNO_3 , 65%) was supplied by Merck (Nogent-sur-Marne, France). Ultrapure water (Milli-Q, Millipore) was used for the preparation of all solutions.

In vitro study

Bovine serum was obtained from freshly collected blood (Mirecourt slaughterhouse) after coagulation and centrifugation at $3000 \times g$ for 5 min. An aqueous solution of $MnCl_2$ was added to the serum to obtain a concentration of $200 \mu g$ Mn/l and the overloaded serum was kept in a water bath at $+37^\circ C$ for 30 min. Then the chelating agents were added to yield a concentration 100-fold higher than the Mn concentration. The control consisted of overloaded serum without chelating agent. The mixture was returned to the water bath for 45 min before being placed at $+4^\circ C$ to stop the complexation. Then it was placed in Centrisart I ultrafiltration tubes with rupture mass of 10,000 Da (Sartorius AG, Germany) and centrifuged at $3000 \times g$ for 1.5 h. The ultrafiltrate containing free Mn or Mn complexed by small molecules with a mass less than 10,000 (including Mn complexed to chelating agents) was stored at $+4^\circ C$ before Mn determination by atomic emission spectrometry (Spectrametrics Spectra Span V). Each compound was tested six times. Percentage of Mn mobilized was calculated according to the following formula: Mn concentration in ultrafiltrate ($\mu g/l$)/Mn concentration in overloaded serum ($\mu g/l$) $\times 100$.

In vivo study

Animals Forty-eight outbred male albino rats of the Wistar strain (Iffa Credo, l'Arbresle, France) weighing 345 ± 20 g were housed individually in standard plastic cages in an air-conditioned room. The room was maintained at a temperature of $22-23^\circ C$ with a 12-12 h light-dark cycle (lights off at 7 p.m.). Water and standard diet (food pellets, M20 Extralabo, Provins, France) were available *ad libitum*.

Experimental protocol Animals were pre-treated intraperitoneally with $MnCl_2$ dissolved in 0.9% NaCl (6 mg Mn/kg body weight/day for 4 weeks). A rest period of 72 h followed the last Mn administration. Then the animals were randomly divided in six equal groups ($n = 8$). One group (Mn group) received daily intraperitoneal injections of 0.9% NaCl for 2 weeks. The five other groups were treated with a given chelating agent previously selected in the *in vitro*

Table 1 Ability of the most effective compounds to mobilize Mn from bovine serum

Compounds	Mn in ultrafiltrate ($\mu\text{g/l}$)	Mn mobilized (%)
Control	3.0 ± 0.8	1.3
DPTA	$156 \pm 4^{**}$	78
EDTA	$138 \pm 2^{**}$	69
DTPA	$134 \pm 7^{**}$	67
DPTA-OH	$130 \pm 4^{**}$	65
TTHA	$126 \pm 6^{**}$	63
HBED	$104 \pm 3^{**}$	52

Bovine serum loaded with 200 μg Mn/l.

Significantly different from control: $^{**}P < 0.0001$.

study. These compounds were dissolved in 0.9% NaCl in a quantity equimolar to that of Mn (0.11 mmol chelating agent/kg body weight/day). The animals were weighed everyday and the doses of either Mn or chelating agent were adjusted accordingly.

The urine and feces were collected on precise dates, before (RV), at the end of exposure to Mn (D30), and during treatment with the potential chelating agents (T1, T3, and T11). To this end, animals were kept in individual metabolism cages for 24 h immediately after administration of the solutions. They were subjected to a solid diet in order to avoid contamination of urine and feces. The different samples were treated with nitric acid.

After these treatments, a second rest period of 72 h was observed. The rats were sacrificed after being anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg body weight). Blood samples were taken with heparin tubes by puncture of the abdominal vein with an infusion set (Microflex, Vigon, Ecouen, France). Part of the sample was immediately centrifuged at $3000 \times g$ for 3 min in order to recover the plasma. The plasma and blood samples were stored at $+4^\circ\text{C}$. Just before assay, the blood was diluted 1:2 with ultrapure water. Different tissues (brain, spinal cord, femur, heart, kidneys, spleen, testicles, skeletal muscle, pancreas) were rapidly collected, weighed, frozen, and kept at -18°C . Before assaying, they were thawed and treated with nitric acid.

Determination of metals

Concentrations of Mn, Zn, Fe, and Cu were determined in the biological media by atomic emission spectrometry (Spectrametrics Spectra Span V).

Data analysis

Results were expressed as the mean $\pm$ SD. Comparisons between different groups were made with the analysis of variance; if significant F values were obtained, groups were further compared with Fisher's PLSD test. If only two different groups were com-

pared, the unpaired t test was used. Comparisons within the same group at different days of treatment were made with the paired t test. The null hypothesis was rejected at the 5% significance level ($P < 0.05$).

Results

In vitro study

According to the results presented in Table 1, very little Mn (1.3%) was found in the ultrafiltrate in the control tubes (bovine serum overloaded with Mn). Among the 24 compounds tested, only the polyaminopolycarboxylic acids enabled efficient displacement of Mn ($\geq 50\%$): DPTA, EDTA, DTPA, DPTA-OH, TTHA, HBED. Five of these compounds (DTPA, TTHA, HBED, DPTA, and DPTA-OH) were retained for the *in vivo* study. These compounds presented chemical structures that were sufficiently different to enable us to obtain a wide sample concerning the geometry, nature, and number of interesting functional groups.

In vivo study

Weight variations The results obtained showed homogeneity in the weight of all of the animals before exposure to Mn (RV). At the end of exposure to Mn (D30), weight progression was observed to be significantly slower in the intoxicated animals (Mn group) than in the non-intoxicated ones (control group). This phenomenon persisted for 2 weeks

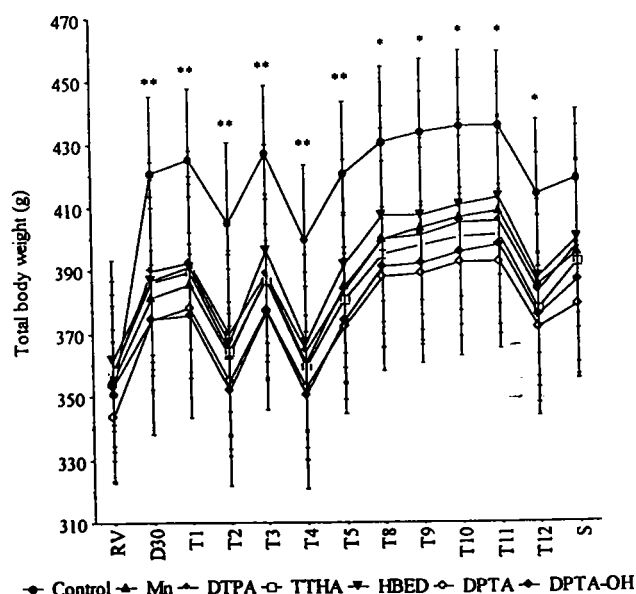


Figure 1 Variations of body weight. RV: reference value before any treatment; D30: 30th day of Mn exposure; T: treatment with the chelating agents; S: sacrifice. Significantly different from Mn group: $^{**}P < 0.01$, $^{*}P < 0.05$.

following the end of exposure to Mn, but the shortfall was made up at sacrifice (S). Lastly, treatment with the different potential chelating agents had no significant influence on the slowing of weight gain during exposure to Mn (Figure 1).

Effect of potential chelating agents on urinary excretion of Mn, Zn, Fe, and Cu In all cases, no significant difference was observed among the six experimental groups during the samples taken before (RV) and at the end of exposure to Mn (D30).

Urinary excretion of Mn – Exposure to Mn significantly increased urinary excretion of this element by a factor of nearly 7 at D30. Subsequently, in the absence of treatment with chelating agents (Mn group), it significantly fell back to practically normal values. In the case of the groups treated with the chelating agents, a significant increase in urinary excretion of Mn was observed with DTPA and TTHA compared to

samples on D30. High in the T1 samples ($\times 18$ and $\times 13$, respectively, compared to samples on D30), this effect decreased progressively during treatment ($\times 6$ and $\times 4$ at T3 and $\times 2$ at T11, respectively). No significant effect was observed with the other treatments (HBED, DPTA, and DPTA-OH) (Figure 2a).

Urinary excretion of Fe – Exposure to Mn did not significantly modify urinary excretion of Fe. During the treatments with the chelating agents, the compounds tested — with the exception of DPTA-OH — provoked a significant increase in the urinary excretion of this element. The most stable effects were obtained with HBED and DTPA ($\times 2$ and $\times 1.3$, respectively, compared to samples on D30). Concerning TTHA and DPTA, their effects on urinary excretion of Fe progressively decreased ($\times 1.8$ and $\times 1.6$ at T1, $\times 1.4$ and $\times 1.2$ at T3, respectively), becoming non-significant at the end of treatment (T11) (Figure 2b).

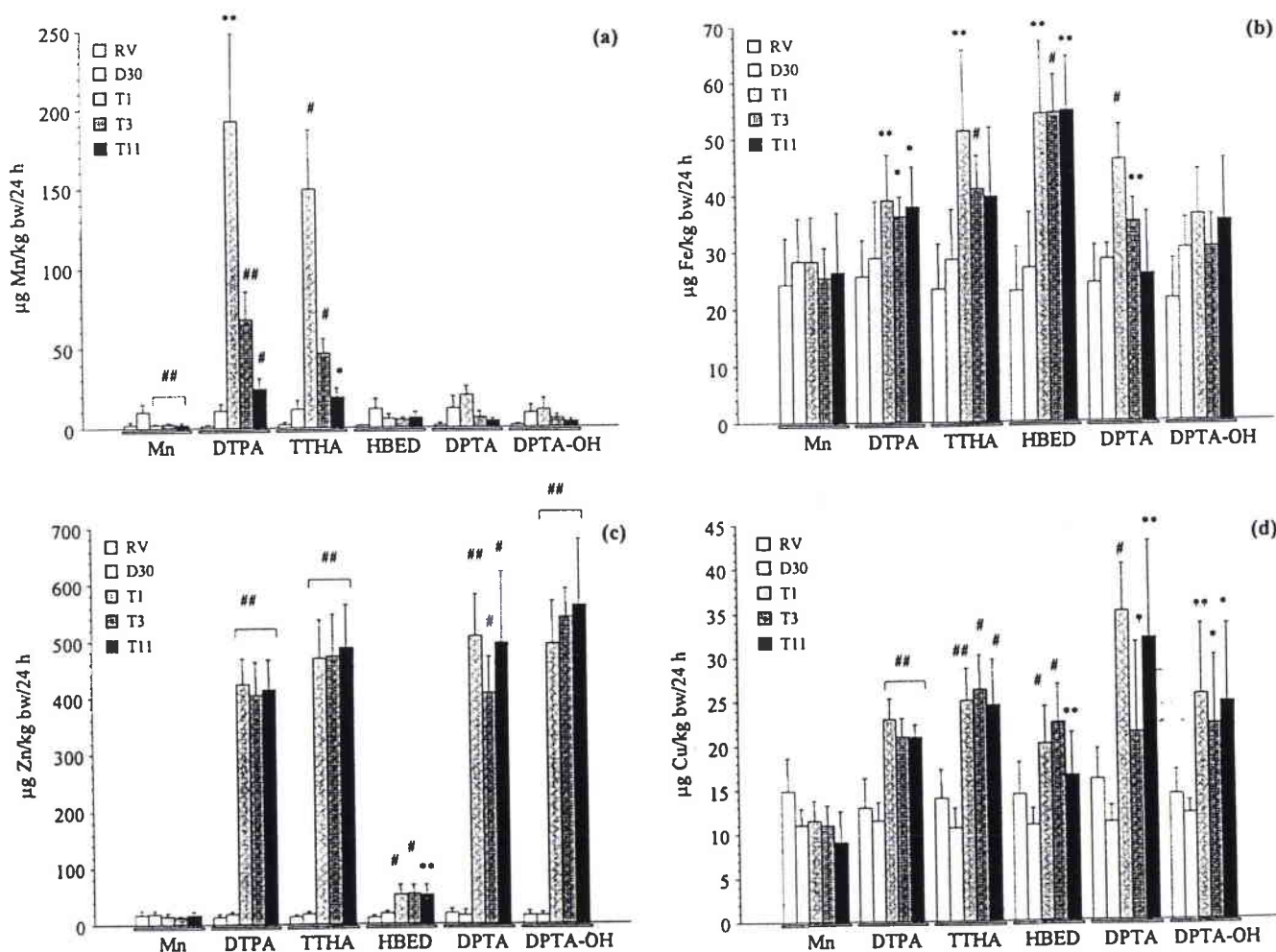


Figure 2 Urinary excretions of Mn (a), Fe (b), Zn (c), and Cu (d). RV: reference value before any treatment; D30: 30th day of Mn exposure; T: treatment with the chelating agents. Significantly different from Mn group: ## $P < 0.0001$, # $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

Table 2 Concentrations of Mn in the rats tissues ($\mu\text{g/g}$ wet weight, except femur: $\mu\text{g/g}$ dry weight)

Tissues	Control	Mn	DTPA	TTHA	HBED	DPTA	DPTA-OH
Brain	$0.56 \pm 0.04^{**}$	1.02 ± 0.09	$0.91 \pm 0.10^*$	0.99 ± 0.09	1.11 ± 0.12	1.11 ± 0.07	$1.19 \pm 0.14^{**}$
Spinal cord	$0.56 \pm 0.02^{**}$	0.98 ± 0.11	$0.80 \pm 0.09^*$	0.97 ± 0.09	1.01 ± 0.13	0.97 ± 0.11	1.06 ± 0.11
Femur	$8.7 \pm 0.1^{**}$	41 ± 5	$35 \pm 5^{**}$	38 ± 5	38 ± 6	42 ± 4	43 ± 4
Skeletal muscle	$0.16 \pm 0.01^{**}$	0.22 ± 0.02	$0.19 \pm 0.01^{**}$	0.21 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.21 ± 0.01	$0.20 \pm 0.01^*$
Heart	$0.47 \pm 0.03^{**}$	0.64 ± 0.04	$0.60 \pm 0.03^{**}$	$0.59 \pm 0.04^{**}$	$0.60 \pm 0.04^{**}$	$0.67 \pm 0.03^*$	$0.68 \pm 0.03^{**}$
Kidneys	$0.59 \pm 0.15^{**}$	1.5 ± 0.1	$1.3 \pm 0.1^{**}$	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.2	$1.4 \pm 0.1^*$	$1.4 \pm 0.2^*$
Spleen	$0.33 \pm 0.02^{**}$	1.12 ± 0.37	$0.57 \pm 0.10^{**}$	$0.57 \pm 0.10^{**}$	1.13 ± 0.44	$0.88 \pm 0.23^*$	$0.73 \pm 0.08^{**}$
Testicles	$0.38 \pm 0.03^{**}$	0.64 ± 0.1	$0.52 \pm 0.14^*$	$0.52 \pm 0.09^*$	0.69 ± 0.16	0.58 ± 0.09	0.66 ± 0.13
Pancreas	$2.8 \pm 0.2^*$	3.4 ± 0.6	$2.3 \pm 0.4^*$	$2.5 \pm 0.7^*$	3.2 ± 0.8	3.0 ± 0.3	3.4 ± 0.4

Significantly different from Mn group: $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$.

Urinary excretion of Zn – Exposure to Mn did not significantly influence urinary excretion of Zn. On the other hand, treatments with the different chelating agents provoked a significant increase in the urinary excretion of this element. The smallest effects were obtained with HBED. Relatively stable effects during the entire treatment period were observed with DTPA, TTHA, and HBED ($\times 22$, $\times 26$, $\times 2.7$, respectively). On the contrary, they were subjected to variations with the two other chelating agents ($\times 33$ at T1 and T11 and $\times 27$ at T9 for DPTA; $\times 33$ at T1 and $\times 37$ at T3 and T11 for DPTA-OH) (Figure 2c).

Urinary excretion of Cu – Exposure to Mn did not significantly modify urinary excretion of Cu. On the other hand, treatment with the different chelating agents significantly increased the urinary excretion of this element. The greatest increases were noted with DTPA, although its effects were subjected to variations during treatment ($\times 3.1$, $\times 1.9$, and $\times 2.9$ at T1, T3, and T11, respectively). Variations during treatment were also observed with HBED ($\times 1.8$, $\times 2$, and $\times 1.5$ at T1, T3, and T11, respectively). Lastly, DTPA, TTHA, and DPTA-OH manifested relatively stable effects throughout treatment ($\times 1.9$, $\times 2.4$, and $\times 2$, respectively) (Figure 2d).

Blood and plasma levels of Mn at the time of sacrifice Exposure to Mn for 4 weeks provoked a significant increase in the concentration of this element in the whole blood (control group = $10.3 \pm 2.4 \mu\text{g/l}$; Mn group = $191 \pm 39 \mu\text{g/l}$; $P < 0.0001$). On the other hand, no variation was observed in the plasma. No significant difference was observed between the Mn group and the groups treated with the different chelating agents, either on blood or on plasma Mn levels (results not reported).

Tissue concentrations of Mn, Fe, Zn, and Cu Tissue concentrations of Mn Exposure to Mn for 4 weeks provoked a significant increase in the concentration of this element in the nine tissues sampled (Mn group) visible at the moment of sacrifice (S), that is to say 2 weeks after the end of Mn exposure (from $\times 1.2$ for the pancreas to $\times 4.7$ for the femur compared to control group).

Concerning the treatment with DTPA, a consequential decrease in the concentration of Mn was observed in the spleen (-49% compared to Mn group); significant, but markedly weaker, effects were observed in the other tissues sampled (from -6% for the heart to -32% for the pancreas). An identical effect on the spleen (-49%) was obtained with

Table 3 Concentrations of Fe in the rat tissues ($\mu\text{g/g}$ wet weight, except femur: $\mu\text{g/g}$ dry weight)

Tissues	Control	Mn	DTPA	TTHA	HBED	DPTA	DPTA-OH
Brain	15.6 ± 1.4	15.6 ± 1.2	16.6 ± 1.8	15.8 ± 2.5	16.0 ± 2.7	16.8 ± 1.6	15.8 ± 1.04
Spinal cord	15.5 ± 1.8	13.6 ± 2.3	13.0 ± 2.5	14.8 ± 2.6	12.7 ± 3.1	13.3 ± 1.5	14.8 ± 2.0
Femur	90 ± 6	98 ± 16	104 ± 13	102 ± 23	84 ± 16	106 ± 15	109 ± 18
Skeletal muscle	9.4 ± 1.3	9.7 ± 1.0	9.3 ± 0.6	9.5 ± 1.3	$8.2 \pm 0.9^*$	9.8 ± 0.6	8.9 ± 0.5
Heart	$76 \pm 5^*$	70 ± 7	69 ± 3	72 ± 8	69 ± 7	71 ± 3	73 ± 4
Kidneys	$87 \pm 6^*$	77 ± 8	70 ± 7	72 ± 11	$61 \pm 10^{**}$	73 ± 3	75 ± 9.3
Spleen	$1198 \pm 208^*$	866 ± 191	$604 \pm 210^{**}$	$550 \pm 132^{**}$	$659 \pm 262^*$	757 ± 187	984 ± 307
Testicles	15.0 ± 1.3	16.7 ± 4.5	20.6 ± 7.9	19.4 ± 6.6	18.9 ± 7.4	17.1 ± 2.5	16.7 ± 3.8
Pancreas	$11.1 \pm 3.8^{**}$	35.6 ± 5.9	41.7 ± 8.2	38.2 ± 4.4	35.9 ± 5.9	35.8 ± 6.7	39.0 ± 3.3

Significantly different from Mn group: $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$.

Table 4 Concentrations of Zn in the rats tissues ($\mu\text{g}/\text{wet weight}$, except femur: $\mu\text{g}/\text{g dry weight}$)

Tissues	Control	Mn	DTPA	TTHA	HBED	DPTA	DPTA-OH
Brain	11.9 $\pm$ 0.8	11.6 $\pm$ 0.7	11.3 $\pm$ 1.1	11.3 $\pm$ 1.0	11.4 $\pm$ 0.8	12.3 $\pm$ 0.5	12.1 $\pm$ 0.5
Spinal cord	7.0 $\pm$ 0.7	6.8 $\pm$ 0.9	6.2 $\pm$ 1.3	7.0 $\pm$ 1.0	7.2 $\pm$ 0.8	6.5 $\pm$ 0.4	6.8 $\pm$ 0.1
Femur	184 $\pm$ 11	196 $\pm$ 16	178 $\pm$ 16**	179 $\pm$ 11*	191 $\pm$ 12	184 $\pm$ 15	172 $\pm$ 17#
Skeletal muscle	11.0 $\pm$ 0.9	10.9 $\pm$ 0.7	10.4 $\pm$ 0.6	10.1 $\pm$ 0.7*	9.4 $\pm$ 0.8**	11.0 $\pm$ 0.4	10.6 $\pm$ 0.5
Heart	16.9 $\pm$ 1.3	16.8 $\pm$ 1.1	16.7 $\pm$ 1.8	16.7 $\pm$ 1.3	16.6 $\pm$ 0.9	16.5 $\pm$ 1.4	16.2 $\pm$ 1.5
Kidneys	24.0 $\pm$ 1.7	24.2 $\pm$ 1.3	34.5 $\pm$ 2.9**	44.2 $\pm$ 4.3**	23.7 $\pm$ 1.6	23.1 $\pm$ 1.1	24.2 $\pm$ 1.3
Spleen	19.6 $\pm$ 1.0	20.1 $\pm$ 0.9	20.3 $\pm$ 1.4	20.6 $\pm$ 0.8	19.8 $\pm$ 1.1	20.7 $\pm$ 0.9	21.7 $\pm$ 2.0
Testicles	25.5 $\pm$ 1.1	25.6 $\pm$ 1.4	23.8 $\pm$ 2.6	26.4 $\pm$ 1.2	25.7 $\pm$ 1.4	25.1 $\pm$ 1.3	25.3 $\pm$ 1.1
Pancreas	22.6 $\pm$ 2.9	20.8 $\pm$ 2.4	18.6 $\pm$ 2.9*	18.6 $\pm$ 3.0*	20.4 $\pm$ 2.3	20.5 $\pm$ 1.0	22.8 $\pm$ 1.7

Significantly different from Mn group: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, # $P < 0.001$, ## $P < 0.0001$.

TTHA. Furthermore, this compound reduced very moderately the concentration of Mn in the heart, the testicles, and the pancreas (-8% , -19% , and -26% , respectively). A significant decrease of Mn concentration in the spleen was also observed with DPTA and DPTA-OH (-21% and -35% , respectively). These two compounds had only a slight, albeit significant, effect on the kidneys (-7%) and the heart ($+5\%$ and $+6\%$, respectively). In addition, a significant decrease was observed in the skeletal muscle (-9%) with DPTA-OH, as well as a significant increase in the brain ($+17\%$). Concerning HBED, a significant decrease was obtained in the heart (-6%) (Table 2).

Tissue concentrations of Fe – Exposure to Mn for 4 weeks provoked a significant and large increase of this element in the pancreas ($\times 3.2$), and significant decreases in the spleen (-28%), the kidneys (-11%), and the heart (-8%), visible 2 weeks after the end of exposure (comparisons between the Mn group and the control group).

In the case of groups treated with the potential chelating agents, a significant decrease in the concentration of Fe was observed in the spleen for the groups treated with DTPA, TTHA, and HBED (-30% ,

-36% , and -24% , respectively, compared to Mn group). This last compound also significantly reduced the concentration of Fe in the kidneys (-21%) and the skeletal muscle (-15%). No significant effect was observed after treatment with DPTA and DPTA-OH (Table 3).

Tissue concentrations of Zn – Two weeks after the end of exposure to Mn, no significant modification in the concentration of Zn could be observed in the nine tissues sampled (comparisons between the Mn group and the control group).

After treatment with DTPA and TTHA, a significant and consequent increase in the concentration of Zn was observed in the kidneys ($+43\%$ and $+83\%$, respectively, compared to Mn group). Slight, but significant, decreases were observed in the pancreas (-11%) and the femur (-9%) with these two compounds, as well as in the skeletal muscle (-7%) with TTHA. A significant decrease in the concentration of Zn in the skeletal muscle (-14%) was also noted with HBED. Although no significant effect was reported for DPTA, a slight decrease in the concentration of Zn was observed in the femur (-12%) with DPTA-OH (Table 4).

Table 5 Concentrations of Cu in the rats tissues ($\mu\text{g}/\text{wet weight}$, except femur: $\mu\text{g}/\text{g dry weight}$)

Tissues	Control	Mn	DTPA	TTHA	HBED	DPTA	DPTA-OH
Brain	2.4 $\pm$ 0.2	2.4 $\pm$ 0.2	2.4 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.2	2.4 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.4*	1.4 $\pm$ 0.4**
Spinal cord	1.3 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1
Femur	1.9 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.2
Skeletal muscle	1.00 $\pm$ 0.14	1.00 $\pm$ 0.09	0.98 $\pm$ 0.06	0.98 $\pm$ 0.08	0.93 $\pm$ 0.07*	0.95 $\pm$ 0.06	0.88 $\pm$ 0.07**
Heart	5.2 $\pm$ 0.3	5.1 $\pm$ 0.3	4.8 $\pm$ 0.2	4.8 $\pm$ 0.2	4.8 $\pm$ 0.2	4.9 $\pm$ 0.1	5.0 $\pm$ 0.1
Kidneys	9.5 $\pm$ 1.8	8.6 $\pm$ 1.8	7.6 $\pm$ 2.1	8.4 $\pm$ 1.2	7.6 $\pm$ 1.2	13.8 $\pm$ 2.6**	10.7 $\pm$ 1.2*
Spleen	1.4 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.1
Testicles	2.1 $\pm$ 0.2	2.0 $\pm$ 0.1	2.0 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.1
Pancreas	1.2 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1

Significantly different from Mn group: * $P < 0.05$, # $P < 0.001$, ## $P < 0.0001$.

Tissue concentrations of Cu – Two weeks after the end of exposure to Mn, no significant modification in the concentration of Cu could be observed in the nine tissues sampled (comparison between Mn group and control group).

After treatment with DPTA, a significant and consequent increase in the concentration of Cu was observed in the kidneys (+60% compared to the Mn group), as well as a significant decrease in the brain (–25%). The same trends were noted for DPTA-OH (+24% in the kidneys and –42% in the brain). In addition, this last compound slightly reduced the concentration of Cu in the skeletal muscle (–12%). Concerning HBED, only a slight, but significant, decrease was observed in the skeletal muscle (–7%). No significant effect was observed after treatments with DTPA and TTHA (Table 5).

Discussion

The objective of this work was to find new Mn-chelating agents. With this goal in mind, a preliminary selection was performed *in vitro* on 24 compounds chosen notably for their chemical structure characterized by the presence of interesting functional groups for Mn complexation (carboxyl, amine, hydroxyl, and thiol groups). The specific chelating agents of Fe present as Fe^{3+} , such as desferrioxamine, were not retained, considering their ineffectiveness with Mn present in the form of Mn^{2+} .¹⁷ Based on the evaluation of the capacity of the different compounds to displace Mn bound to serum proteins, this technique enabled us to obtain good mobilization ($\geq 50\%$) with six compounds which are all polyaminopolycarboxylic acids (TTHA, DTPA, EDTA, DPTA, DPTA-OH, HBED).

The number and the position of the carboxyl and amine groups thus appear to be the determining factor for the mobilization of Mn. Nonetheless, a number of carboxyl groups greater than four and amine groups greater than two do not appear to improve this efficacy (case of DTPA and TTHA). This could be explained by the fact that Mn^{2+} (like Fe^{2+}) cannot establish more than six coordinate bonds, the presence of additional negative charges not contributing to a better stability of the complex formed. The compounds with less than three carboxyl groups proved ineffective, despite the presence of other amine, hydroxyl, and/or thiol groups. The HBED compound was an exception (two carboxyl groups and two amine groups); the presence of two phenol groups could have favorable activity on Mn^{2+} complexation. Lastly, the nature of the carbon chain had a non-negligible influence. Thus, the efficacy of com-

pounds with a short chain (two to three carbon atoms) was relatively similar (EDTA, DPTA, DPTA-OH, TTHA, and DTPA). On the other hand, lengthening the carbon chain seems unfavorable to good mobilization of Mn (EGTA, 1,6-diaminohexane- N,N,N',N' -tetraacetic acid, EDTP). In conclusion, good *in vitro* mobilization of Mn requires the presence of a sufficient number of functional groups, in particular carboxyl and amine groups, and the presence of a particular geometry which enables the formation of a “claw” around the metallic cation during the establishment of the six coordinate bonds. It is interesting to note the ineffectiveness of salicylic acid, which is in contradiction with the results of other authors;¹³ nevertheless, this absence of effect appears logical, taking into account the chemical structure (only one carboxyl group and one hydroxyl group).

Five of these six molecules, which were efficacious *in vitro*, were retained for the *in vivo* study (TTHA, DTPA, DPTA, DPTA-OH, and HBED). The DTPA compound was chosen as the reference substance, in preference to EDTA (not retained), due to its greater efficacy for mobilizing Mn *in vivo*^{17–20} and the fact that EDTA was ineffective in clinical treatment.^{4,6}

In the given experimental conditions (intraperitoneal administration of MnCl_2 for 4 weeks at a dose of 6 mg Mn/kg of body weight/day), the five substances tested proved to be only slightly efficacious. It is interesting to note certain similarities between DTPA and TTHA. The most striking is the mobilization of Mn in the spleen (close to 50%). Nevertheless, as these two compounds increased urinary excretion of Mn during the entire treatment, mobilization in other tissues not sampled cannot be excluded. At the same time as this decrease in splenic Mn, these two substances also decreased Fe in the spleen, an effect which could be amplified (–79%) after increasing the doses of Mn (9 mg Mn/kg of body weight/day for 4 weeks) and chelating agents (0.32 mmol/kg of body weight/day for 2 weeks). On the other hand, these compounds had no influence on Mn and Fe present in the whole blood (results not reported). The lack of efficacy of the chelating agents tested could be explained by the binding of Mn^{2+} in the form of very stable complexes in the hemoglobin and certain cytochromes of the cellular respiratory chain, replacing Fe^{2+} which has similar chemical properties to Mn^{2+} .¹⁶ Thus, only free Mn or Mn in the form of moderately stable complexes would be mobilized. As the spleen has hematopoietic, storage, and erythrocyte destruction functions in rodents, mobilization of Mn from erythrocytes could only take place after their destruction. Furthermore, a premature destruction of erythrocytes related to the presence of Mn cannot be excluded and could explain the large decrease of Mn

in the spleen. As opposed to the erythrocyte fraction, plasma Mn appears very mobilizable in as much as this element does not accumulate in the plasma of the intoxicated animals, whereas it is perfectly capable of forming complexes with serum proteins (*in vitro* study). This plasma Mn could thus be distributed to other organs or eliminated in the urine, explaining, in this way, the increase in urinary excretion observed during exposure.

Certain cytochromes of the cellular respiratory chain, containing Fe, present a chemical structure related to that of hemoglobin; also, this type of binding in the form of stable complexes would be possible in replacement of Fe^{2+} ; this could explain the neurotoxicity of Mn ("manganism") and the difficulty of treating these neurological disorders with chelating agents. This hypothesis is based on the different redox potentials of the $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ and $\text{Mn}^{2+}/\text{Mn}^{3+}$ couples and the different cytochromes. Thus, the standard potential of the $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ couple (0.77 V in the absence of complexation) varies according to the Fe environment from 0.07 V (cytochrome *b*) to 0.55 V (cytochrome a_3), corresponding to a decrease of 0.22 V for the cytochrome a_3 ($0.77 - 0.55 = 0.22$ V). The redox potential of the $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ couple being 0.82 V at pH 7, the last cytochrome in the cellular respiratory chain (cytochrome a_3) can thus reduce O_2 to H_2O . In the $\text{Mn}^{2+}/\text{Mn}^{3+}$ couple (1.5 V in absence of complexation), the formation of a complex with cytochrome a_3 similarly to the $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ couple leads to a couple with a redox potential of 1.28 V ($1.50 - 0.22 = 1.28$ V). In these conditions, the reduction of O_2 to H_2O is impossible, the last cytochrome of the cellular respiratory chain having a greater redox potential (1.28 V) compared to the $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ couple (0.82 V). This type of incomplete oxygen reduction can bring about the formation of free oxygenated radicals (O_2^-) capable of oxidizing dopamine and/or its precursor, L-dopa in an orthoquinone derivative, thus explaining the manifestation of symptoms characteristic of Parkinson's disease.

Furthermore, this incomplete reduction of O_2 limits the supply of energy to the cells by slowing the phosphorylation reactions. This decrease in available energy could provoke a decrease in the activity of superoxide dismutase which intervenes in the process of the destruction of the superoxide O_2^- ion and which is synthesized in the cytosol before being transferred to the mitochondrial matrix by active transport. In the same way, the renewal of certain cytochromes (*c*, c_1 , b_2 , etc.) could be affected, their transfer from the cytosol towards the mitochondrial membrane also requiring energy. All of these phenomena (reduction in the energy supply, defective elimination of free radicals, disturbance of the cytochrome renewal mechanisms, and slowing down

of the elimination of Mn bound therein) could bring about an acceleration in the aging of the cells, particularly damaging cells that are not renewed such as nerve cells.

However, we must draw attention to the fact that in our conditions of exposure to Mn, it was not possible to demonstrate a disturbance in the level of dopamine in the brain or histological abnormalities (results not reported). The absence of such manifestations is probably related to the fact that the exposure period was too short.

Lastly, certain observations related to the disturbances caused by the different compounds tested on different essential elements are interesting. Thus, even if no notable modification was observed in the tissue distribution and urinary excretion of P, Mg, and Ca (results not reported), the five compounds tested had different and specific mobilizing effect on Fe, Zn, and Cu. The DTPA and TTHA had an effect on Fe (decreased concentration in the spleen and kidneys) and on Zn (increased concentration in the kidneys), whereas HBED only mobilized Fe (decreased concentration in the spleen and kidneys). On the other hand, DPTA and DPTA-OH appeared to have an activity more specifically targeted on Cu (decreased concentration in the brain and increased concentration in the kidneys); this type of activity could be interesting in the treatment of Wilson's disease. It should be noted that these five compounds had no specific effect on urinary excretion of Fe, Zn, and Cu (increased in all cases).

Conclusion

Of the different compounds tested during this study, two polyaminopolycarboxylic acids retained our attention (DTPA and TTHA) for their efficacy in mobilizing Mn bound to plasma proteins (*in vitro* study), as well as Mn accumulated in the body either in free form or in moderately stable complexes (*in vivo* study). On the other hand, their ineffectiveness on stable Mn complexes, notably in hemoglobin and certain cytochromes of the cellular respiratory chain, in replacement of Fe^{2+} greatly limits their interest. Indeed, their activity can only take place after liberation of the element during renewal of these cells and cellular organelles (normal life span of erythrocytes: 120 days). One would think that long-term treatment would be necessary. This treatment would have to be associated with the administration of L-dopa in view of treating Parkinson-type symptoms, and the administration of antioxidants to favor the destruction of the free radicals. Lastly, it would be necessary to monitor dietary supply of other essential elements (Fe, Zn, Cu).

References

- 1 Keen CL, Zindenberg-Cherr S. Manganese toxicity in humans and experimental animals. *Manganese in Health and Disease*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1994.
- 2 Sata F, Araki S, Murata K. Behavior of heavy metals in human urine and blood following calcium disodium ethylenediamine tetraacetate injection: observations in metal workers. *J Toxicol Environ Health* 1998; **54**: 167–178.
- 3 Cook DG, Fahn S, Brait KA. Chronic manganese intoxication. *Arch Neurol* 1974; **30**: 59–64.
- 4 Pelnaver R. Manganese poisoning. *Ind Med Surg* 1955; **24**: 1–7.
- 5 Smyth LT, Ruhf RC, Whitman NE, Dugan T. Clinical manganism and exposure to manganese in the production and processing of ferromanganese alloy. *J Occup Med* 1973; **15**: 101–109.
- 6 Tepper LB. Hazards to health. Manganese. *N Engl J Med* 1961; **264**: 347–348.
- 7 Whitlock CM, Amuso SJ, Bittenbender JB. Chronic neurological disease in two manganese steel workers. *Am Ind Hyg Assoc J* 1966; **27**: 454–459.
- 8 Wynter JE. The prevention of manganese poisoning. *Ind Med Surg* 1962; **31**: 308–310.
- 9 Rangle C. Dimercaptosuccinic acid (DMSA): negligible effect on manganese in urine and blood. *Occup Environ Med* 1995; **52**: 846–847.
- 10 Ky S, Deng H, Xie P, Hue W. A report of two cases of chronic serious manganese poisoning treated with sodium *para*-aminosalicylic acid. *Br J Ind Med* 1992; **49**: 66–69.
- 11 Sánchez DJ, Gómez M, Domingo JL, Llobet JM. Relative efficacy of chelating agents on excretion and tissue distribution of manganese in mice. *J Appl Toxicol* 1995; **15**: 285–288.
- 12 Aaseth J. Recent advance in the therapy of metal poisoning with chelating agents. *Hum Toxicol* 1983; **2**: 257–272.
- 13 Tandon SK, Mathur AK. Chelation in metal intoxication: V. Lowering of manganese content in poisoned rat organs. *Chemosphere* 1976; **5**: 319–325.
- 14 Graff L, Muller G, Burnel D. *In vitro* and *in vivo* evaluation of potential aluminum chelators. *Vet Hum Toxicol* 1995; **37**: 455–461.
- 15 Graff L, Muller G, Burnel D. *In vitro* and *in vivo* comparative studies on chelation of aluminum by some polyaminocarboxylic acids. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1995; **88**: 271–292.
- 16 Missy P, et al. Effect of subchronic exposure to manganese chloride on tissue distribution of several essential elements in rats. *Int J Toxicol* 2000; **19**, in press.
- 17 Cirkrt M, et al. The effect of some chelating agents on the biliary and urinary excretion of manganese in rats. *J Hyg, Epidemiol, Microbiol Immunol* 1987; **31**: 31–37.
- 18 Tandon SK, Singh J. Removal of manganese by chelating agents from brain and liver of manganese treated rats: an *in vitro* and an *in vivo* study. *Toxicology* 1975; **5**: 237–241.
- 19 Tandon SK, et al. Chelation in metal intoxication: I. *In vivo* effect of chelating agents on liver and testis of manganese administered rats. *Environ Res* 1975; **9**: 18–25.
- 20 Kaur G, Srivastava UC, Dwivedi RS, Srivastava RC. Influence of polyaminocarboxylic acids on the removal of manganese-54 from the body organs of sham-operated and partially hepatectomized rats. *Toxicol Lett* 1984; **22**: 1–6.

RECHERCHE DE NOUVEAUX CHELATEURS DU MANGANESE EN VUE DE LA DETOXICATION DE L'ORGANISME : ETUDES *IN VIVO* ET *IN VITRO* CHEZ LE RAT

Cette étude a porté sur la recherche de nouveaux chélateurs du manganèse.

La première partie est consacrée à la mise au point d'un protocole d'intoxication subchronique. La voie intrapéritonéale a été retenue pour intoxiquer les rats, la voie orale n'étant pas suffisamment efficace, puisque moins de 2 % du manganèse ingéré sont absorbés. Ce résultat permet d'en déduire que les risques d'intoxication alimentaire sont très faibles, voire nuls.

une accumulation de manganèse a été mise en évidence dans des tissus cibles déjà connus (rate, système nerveux central, os, globules rouges), mais également dans la moelle osseuse. Dans nos conditions d'intoxication, l'accumulation de manganèse dans le cerveau n'a pas entraîné de modifications neurochimiques et histologiques.

La deuxième partie de ce travail porte sur l'étude *in vivo* de nouveaux chélateurs préalablement sélectionnés, pour leur bon pouvoir complexant vis-à-vis du manganèse, par une technique *in vitro*. Les composés les plus efficaces *in vitro* (acides polyaminopolycarboxyliques) n'ont provoqué qu'une détoxification partielle de l'organisme ; ils sont restés sans effet sur le manganèse fixé dans les globules rouges (hémoglobine).

Ces résultats nous ont conduit aux hypothèses suivantes : le manganèse (Mn^{2+}), aux propriétés chimiques voisines de celles du fer (Fe^{2+}), se fixerait à la place de ce dernier non seulement dans l'hémoglobine, ce qui est déjà connu, mais également dans les cytochromes de la chaîne respiratoire. De ce fait, en se basant sur les potentiels redox standard des cytochromes contenant du manganèse, il a été possible de montrer l'incapacité de ces structures à réduire l'oxygène. Cette réduction incomplète de l'oxygène conduirait à la formation de radicaux libres qui sont susceptibles d'altérer les cellules et d'oxyder la dopamine en benzoquinones, impliquées dans les symptômes neurologiques observés dans les cas de manganisme.

Mots clés : manganèse, intoxication, absorption, chaîne respiratoire, radicaux oxygénés, neurotoxicité, chélateurs.

NEW MANGANESE CHELATING AGENTS FOR THE ORGANISM DETOXIFICATION: *IN VIVO* AND *IN VITRO* STUDIES IN THE RAT

This study dealt with new manganese chelating agents.

The first part is devoted to the development of a subchronic intoxication protocol. Rats were intoxicated by intraperitoneal injections, the oral route being not sufficiently effective, since less than 2 % of the ingested manganese are absorbed. This result suggests that the risks of intoxication by diet are very weak even null.

Accumulation of manganese was observed in well-known target tissues (spleen, central nervous system, bones, erythrocytes), but also in bone marrow. In our experimental conditions, the presence of manganese in the brain induced no neurochemical or histological modifications.

The second part of this work concerns the *in vivo* study of new chelating agents selected beforehand for their *in vitro* effectiveness to complex with manganese. The most effective compounds *in vitro* (polyaminopolycarboxylic acids) caused only a partial detoxification of the organism; they remained without effect on manganese bound to the erythrocytes (haemoglobin).

These results led us to the following assumptions: manganese (Mn^{2+}), which chemical properties are close to those of iron (Fe^{2+}), would take the place of this last not only in haemoglobin, that is already known, but also in the cytochromes of the respiratory chain. So, based on the standard redox potentials of the cytochromes containing manganese, it was possible to show the inability of these structures to reduce oxygen. This incomplete oxygen reduction would lead to the formation of free radicals which are capable of accelerating cell aging and oxidizing dopamine in benzoquinones, implied in the neurological symptoms observed in chronic manganism.