

# Imprégnation saturnine légère, régime athérogène et leur association : résultats obtenus chez le lapin pour le calcium et le magnésium plasmatiques et pour le magnésium érythrocytaire\*)

De M. Speich, C. Métayer, B. Bousquet, P. Arnaud, Van Goc Nguyen, H. L. Boiteau.

Faculté des Sciences Pharmaceutiques, 1 rue Gaston Veil, F-44035 Nantes Cédex.

## Zusammenfassung

Plasma-Ca, Plasma-Mg und Erythrozyten-Mg wurden während 24 Wochen bei 4 Gruppen von Kaninchen beobachtet, die wie folgt behandelt wurden: Gr. I: normale Diät; Gr. II: Wasser mit  $9,66 \mu\text{mol/l}$  Blei; Gr. III: atherogene Diät; Gr. IV: atherogene Diät plus  $9,66 \mu\text{mol/l}$  Blei. Die statistische Auswertung mittels Varianzanalyse und Newman-Keuls Test ergab eine signifikante Abnahme des Erythrozyten-Mg in G. III und IV, die besonders ausgeprägt in der letzten Gruppe war. Dieses Phänomen könnte darauf beruhen, daß sie durch die Hypercholesterinämie bedingte Hemmung der  $(\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase})$  und  $\text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$  stärker ausgeprägt war nach zusätzlicher Blei-Belastung.

## Summary

Levels of plasma Ca and Mg and of erythrocyte Mg were observed for 25 weeks in 4 groups of rabbits receiving different diets: I (normal diet), II (water with  $9,66 \mu\text{mol/l}$  of lead), III (atherogenic diet) and IV (atherogenic diet +  $9,66 \mu\text{mol/l}$  of lead). Statistical study of the results by analysis of variance and the Newman-Keuls test shows a significant drop in erythrocyte Mg in groups III and IV, especially marked in the latter group. This phenomenon may result from an inhibition of  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$  and  $\text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$  resulting from the effect of hypercholesterolemia aggravated by low level lead exposure.

## Résumé

Les taux de Ca et de Mg plasmatiques et le taux de Mg érythrocytaire ont été suivis pendant 25 semaines dans quatre groupes de lapins nourris avec des régimes différents: lot I (régime normal), lot II (eau avec  $9,66 \mu\text{mol/l}$  de plomb), lot III (régime athérogène), lot IV (régime athérogène + eau avec  $9,66 \mu\text{mol/l}$  de plomb). L'étude statistique des résultats par l'analyse de variance et la méthode de Newman-Keuls fait apparaître une diminution significative du Mg érythrocytaire dans les lots III et IV, particulièrement marquée dans le lot IV. Ce phénomène pourrait résulter d'une inhibition de la  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$  et de la  $\text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$  sous l'action de l'hypercholestérolémie, action renforcée par l'élévation de l'imprégnation saturnine.

\* \* \*

## Introduction

Au cours de travaux antérieurs [11, 12] nous avons étudié les mouvements du magnésium et

du calcium dans l'organisme de sujets atteints d'infarctus du myocarde, maladie considérée comme l'une des plus fréquentes manifestations de l'athérosclérose. Cela nous a amenés à rechercher, chez le Lapin, les modifications du métabolisme de ces électrolytes sous l'influence de deux facteurs de risque qui interviennent dans le développement de l'athérosclérose: un régime hyperlipidique, dont les effets athérogènes ont été amplement démontrés dans cette espèce [6, 9] et une imprégnation saturnine, dont l'action athérogène a été moins étudiée, mais en faveur de laquelle il existe plusieurs arguments [3, 4, 7, 13]. Nous avons tenté de réaliser une imprégnation saturnine légère, telle qu'elle peut apparaître dans certains cas de pollution générale de l'environnement, afin de tester l'hypothèse d'une éventuelle synergie entre ces deux facteurs.

## Matériel et méthodes

### Expérimentation animale

L'expérimentation a porté sur quatre groupes de six lapins adultes non sélectionnés, vivant dans des cages métalliques à l'intérieur d'une animalerie climatisée à  $20^\circ \text{C}$ , éclairée artificiellement pendant douze heures sur vingt-quatre.

Les animaux ont été soumis, durant vingt-cinq semaines, aux régimes suivants:

— Groupe I (régime normal): 100 g par jour et par animal d'aliment «Lapins entretien 112 U.A.R.» et *ad libitum* de l'eau ordinaire dont la teneur en plomb est restée inférieure à  $25 \mu\text{mol/l}$  pendant toute la durée de l'expérimentation;

— Groupe II (plomb): nourriture identique à celle du groupe I, mais *ad libitum* une solution de plomb ( $9,66 \mu\text{mol/l}$ ) sous forme d'acétate;

— Groupe III (régime athérogène): 100 g par jour et par animal d'un mélange à parties égales d'aliment «Lapins entretien 112 U.A.R.» et d'ali-

\*) Resultats présentés au 3<sup>e</sup> Symposium International sur le Magnésium, Baden-Baden, 22.—28. 8. 1981.

ment « Régime athérogène 1,33 pour lapin U.A.R. » contenant 35 g/Kg de matières grasses animales et 13,3 g/Kg de cholestérol; comme boisson, *ad libitum* de l'eau ordinaire;

— Groupe IV (régime athérogène + plomb): nourriture identique à celle du groupe III et *ad libitum* la solution de plomb du groupe II.

Les échantillons de sang ont été prélevés dans la veine marginale de l'oreille sur des animaux à jeun depuis douze heures. La première série de prélèvements (temps 0) a eu lieu à l'issue d'une période d'adaptation de trois jours, pendant laquelle tous les lapins ont consommé l'alimentation et la boisson du groupe I. Les prélèvements suivants ont été effectués aux jours: 42, 77, 105, 133 et 172 de l'expérimentation.

#### *Méthodes de dosage du plomb, du calcium et du magnésium*

Le plomb a été dosé dans le sang total par spectrométrie d'absorption atomique sans flamme, selon une méthode mise au point dans le laboratoire [1].

Le calcium et le magnésium plasmatiques ainsi que le magnésium érythrocytaire ont été analysés par spectrométrie d'absorption atomique avec flamme.

#### *Analyse statistique des résultats*

La normalité des populations a été vérifiée par le test de *Shapiro* et *Wilk*. Les éventuelles valeurs aberrantes ont été recherchées à l'aide du test de *Dixon*. Les distributions ont été comparées, selon les cas, par l'analyse de variance simple ou avec répétition, après vérification de l'homogénéité des variances par le test de *Bartlett*. A l'issue de l'analyse de variance, la comparaison individuelle des moyennes a été effectuée selon la méthode de *Newman-Keuls*. Lorsque les distributions n'étaient pas normales, nous avons eu recours aux tests non paramétriques de *Kruskal-Wallis* et de *Friedman*.

### Résultats et discussion

#### *Plomb dans le sang (Tableau 1)*

La consommation d'une solution de plomb à 9,66  $\mu\text{mol/l}$  entraîne une élévation de la plombémie dans les groupes II et IV par rapport à celle des autres groupes. Cette augmentation, significative dès le 42<sup>ème</sup> jour, se maintient jusqu'à la fin de l'expérimentation, traduisant une imprégnation saturnine légère qui correspond bien à

l'objectif fixé. Chez des rats buvant, depuis vingt-cinq semaines, une eau contenant 4,8  $\mu\text{mol/l}$  de plomb, *Moore* et coll. [8] ont rapporté une plombémie de 3,3  $\mu\text{mol/l}$ , près de dix fois supérieure à celle de nos lapins. Cette différence semblerait indiquer que l'ingestion de plomb élève moins la plombémie du Lapin que celle du Rat. Par ailleurs, le plomb sanguin des lapins du groupe II présente des variations significatives en fonction du temps et du sujet. La valeur la plus élevée a été trouvée le 42<sup>ème</sup> jour, donc dès le début de l'absorption de plomb. Après 172 jours, son taux sanguin a diminué. *Moore* et coll. [8] ont constaté un phénomène analogue.

#### *Calcium et magnésium plasmatiques (Tableaux 2 et 3)*

Aucune différence significative n'apparaît entre les taux de calcium plasmatique des quatre groupes de lapins, en fonction des régimes. Par contre, le calcium plasmatique de ces quatre lots de lapins varie significativement en fonction du temps et du sujet. Chez des lapins consommant du suif de bœuf, *Dougherty* et *Iacono* [5] ont également observé des modifications du calcium plasmatique entre le 1<sup>er</sup> et le 140<sup>ème</sup> jour. Ils ont signalé que les mécanismes de l'homéostasie du calcium chez le Lapin diffèrent de ceux des autres espèces. Il existerait probablement une relation directe entre l'apport alimentaire de cet élément, son excrétion urinaire et son taux plasmatique.

Les mêmes commentaires peuvent être faits à propos des valeurs du magnésium plasmatique. Nous n'avons pas retrouvé chez les lapins, recevant la solution de plomb, la diminution significative du magnésium sérique rapportée par *Soldatovic* et coll. [10]. Il est vrai que ces auteurs administraient à leurs animaux des doses de plomb très supérieures aux nôtres.

#### *Magnésium érythrocytaire (Tableau 4)*

Les divers régimes ont une action dès le 42<sup>ème</sup> jour et jusqu'à la fin de l'expérimentation. La comparaison individuelle des quatre moyennes montre l'existence de trois ensembles différant entre eux de façon significative: groupes I et II (Témoins et Plomb), groupe III (Athérogène) et enfin groupe IV (Athérogène + Plomb). Ces résultats tendraient à prouver que la sortie du magnésium des érythrocytes, sous l'action du régime athérogène, est accentuée en présence d'une imprégnation saturnine, même faible. Nous

Tab. 1: Comparaison des taux de plomb sanguin:

(1) horizontalement, en fonction des régimes, par la méthode de Kruskal-Wallis;

(2) verticalement, en fonction du temps (42<sup>ème</sup> au 172<sup>ème</sup> jour\*) et du sujet, par la méthode de Friedman.

n = 6 lapins, \* dans le but de comparer uniquement les régimes

Temps (jours)	Plomb sanguin nmol/l (Moyenne et écart-type)				
	I Témoins n = 6	II Plomb n = 6	III Athérogène n = 6	IV Athérogène + plomb n = 6	
0	126 (74,3)	116 (106)	135 (73,4)	91,1 (89,8)	(1) p < 0,05
42	108 (23,1)	351 (153)	143 (46,2)	235 (75,4)	p < 0,001
77	246 (30,8)	285 (99,0)	206 (44,5)	266 (62,4)	p < 0,02
105	131 (27,3)	206 (35,0)	102 (74,5)	198 (54,9)	p < 0,001
133	135 (17,1)	263 (69,6)	188 (121)	200 (53,9)	p < 0,005
172	29,0 (13,7)	155 (55,7)	105 (71,7)	195 (60,5)	p < 0,001
	(2) p < 0,005	p < 0,05	p > 0,05	p > 0,05	

Tab. 2: Comparaison des taux de calcium plasmatique:

(1) horizontalement, en fonction des régimes, par analyse de variance simple;

(2) verticalement, en fonction du temps (42<sup>ème</sup> au 172<sup>ème</sup> jour\*) et du sujet, par analyse de variance avec répétition.

n = 6 lapins, \* dans le but de comparer uniquement les régimes

Temps (jours)	Calcium plasmatique mmol/l (Moyenne et écart-type)				
	I Témoins n = 6	II Plomb n = 6	III Athérogène n = 6	IV Athérogène + plomb n = 6	
0	2,83 (0,27)	3,33 (0,16)	3,21 (0,30)	3,19 (0,16)	(1) p < 0,01
42	3,03 (0,09)	3,04 (0,12)	2,99 (0,16)	3,43 (0,25)	p < 0,001
77	3,34 (0,15)	3,44 (0,19)	3,57 (0,30)	3,33 (0,21)	p > 0,05
105	3,16 (0,13)	3,14 (0,11)	3,29 (0,19)	3,30 (0,12)	p > 0,05
133	2,90 (0,16)	2,77 (0,24)	2,95 (0,22)	2,95 (0,07)	p > 0,05
172	2,98 (0,10)	2,79 (0,16)	2,95 (0,14)	2,89 (0,19)	p > 0,05
	(2) p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	

Tab. 3: Comparaison des taux de magnésium plasmatique:

(1) horizontalement, en fonction des régimes, par analyse de variance simple;

(2) verticalement, en fonction du temps (42<sup>ème</sup> au 172<sup>ème</sup> jour\*) et du sujet, par analyse de variance avec répétition.

n = 6 lapins, \* dans le but de comparer uniquement les régimes

Temps (jours)	Magnésium plasmatique mmol/l (Moyenne et écart-type)				
	I Témoins n = 6	II Plomb n = 6	III Athérogène n = 6	IV Athérogène + plomb n = 6	
0	1,05 (0,09)	0,99 (0,20)	1,12 (0,10)	0,91 (0,10)	(1) p > 0,05
42	0,89 (0,18)	0,99 (0,05)	0,90 (0,17)	0,92 (0,18)	p > 0,05
77	0,73 (0,09)	0,93 (0,10)	0,89 (0,12)	0,88 (0,16)	p > 0,05
105	0,84 (0,09)	0,90 (0,07)	0,93 (0,10)	0,85 (0,06)	p > 0,05
133	0,78 (0,10)	0,79 (0,04)	0,80 (0,08)	0,78 (0,11)	p > 0,05
172	0,72 (0,09)	0,77 (0,05)	0,80 (0,09)	0,75 (0,06)	p > 0,05
	(2) p < 0,01	p < 0,001	p > 0,05	p < 0,01	

Tab. 4: Comparaison des taux de magnésium érythrocytaire:

(1) horizontalement, en fonction des régimes, par analyse de variance simple;

(2) verticalement, en fonction du temps (42<sup>ème</sup> au 172<sup>ème</sup> jour\*) et du sujet, par analyse de variance avec répétition.

n = 6 lapins, \* dans le but de comparer uniquement les régimes

Temps (jours)	Magnésium érythrocytaire mmol/l (Moyenne et écart-type)				
	I Témoins n = 6	II Plomb n = 6	III Athérogène n = 6	IV Athérogène + plomb n = 6	
0	4,12 (0,41)	4,39 (0,40)	4,52 (0,47)	4,02 (0,47)	(1) p > 0,05
42	4,15 (0,17)	4,18 (0,18)	3,85 (0,29)	3,26 (0,28)	p < 0,001
77	4,73 (0,26)	4,68 (0,23)	3,63 (0,38)	2,92 (0,28)	p < 0,001
105	4,28 (0,43)	4,75 (0,29)	3,80 (0,46)	3,26 (0,18)	p < 0,001
133	4,29 (0,19)	4,46 (0,37)	3,46 (0,37)	3,10 (0,21)	p < 0,001
172	4,17 (0,23)	4,40 (0,23)	3,63 (0,51)	2,98 (0,13)	p < 0,001
	(2) p < 0,005	p < 0,005	p ≤ 0,05	p < 0,01	

ne pouvons pas parler de synergie, puisque le plomb seul, au taux sanguin obtenu, est sans action sur le magnésium globulaire. Il faut donc envisager la potentialisation d'un régime par l'autre. Le phénomène peut être expliqué si l'on admet que la diminution du magnésium érythrocytaire est liée à une modification de l'activité des ATPases membranaires:  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$  et  $\text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ . En effet, *Torkhovskaya* et coll. [14] ont montré qu'un régime athérogène fait apparaître, chez le Lapin, une diminution de l'activité de ces ATPases. Par ailleurs, *Caspers* et *Siegel* [2], étudiant l'action du plomb *in vitro* sur la membrane de l'érythrocyte humain, ont trouvé que ce métal provoque une inhibition irréversible ou très lentement réversible des ATPases de cette membrane. Dès lors, deux hypothèses peuvent être envisagées: d'une part, le régime athérogène abaisse le seuil d'action du plomb, dont l'effet sur le magnésium érythrocytaire vient s'ajouter à celui produit par l'hyperlipidémie, d'autre part la légère élévation de l'imprégnation saturnine suffit pour stimuler la fuite du magnésium hors de l'érythrocyte sous l'influence du régime athérogène. Nous poursuivons actuellement nos travaux dans ce domaine.

## Conclusion

Chez le Lapin, la consommation d'un régime hyperlipidique entraîne une diminution du taux de magnésium érythrocytaire. Cet abaissement est accentué par l'administration de faibles doses de plomb, juste suffisantes pour provoquer une augmentation significative de l'imprégnation saturnine. A ces concentrations, le plomb seul ne modifie pas la valeur du magnésium érythrocytaire.

## References

- [1] *Boiteau, H. L., Métayer, C.*: Microdosage du plomb, du cadmium, du zinc et de l'étain dans les milieux biologiques par spectrométrie d'absorption atomique après minéralisation et extraction. *Analisis* **6** (1978) 350—358.
- [2] *Caspers, M. L., Siegel, G. J.*: Inhibition by lead of human erythrocyte  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{adenosine triphosphatase}$  associated with binding of  $^{210}\text{Pb}$  to membrane fragments. *Biochim. Biophys. Acta* **600** (1980) 27—35.
- [3] *Charyev, O. G., Krasovsky, G. N., Lamentova, T. G.*: Problem of the atherogenic action of lead. *Gig. Sanit.* n° 2 (1979) 9—12.
- [4] *Dingwall-Fordyce, I., Lane, R. E.*: A follow-up study of lead workers. *Br. J. Ind. Med.* **20** (1963) 313—315.

- [5] *Dougherty, R. M., Iacono, J. M.*: Effects of dietary calcium on blood and tissue lipids, tissue phospholipids, calcium and magnesium levels in rabbits fed diets containing beef tallow. *J. Nutr.* **109** (1979) 1934—1945.
- [6] *Kritchevsky, D., Tepper, S. A., Kim, H. K., Story, J. A., Vesselinovich, D., Wissler, R. W.*: Experimental atherosclerosis in rabbits fed cholesterol-free diets. Comparison of peanut, corn, butter, and coconut oils. *Exp. Mol. Pathol.* **24** (1976) 375—391.
- [7] *Lane, R. E.*: Health control in organic lead industries. A follow-up of exposed workers. *Arch. Environ. Health* **8** (1964) 243—250.
- [8] *Moore, M. R., Meredith, P. A., Goldberg, A., Carr, K. E., Toner, P. G., Lawrie, T. D. V.*: Cardiac effects of lead in drinking-water of rats. *Clin. Sci. Mol. Med.* **49** (1975) 337—341.
- [9] *Ross, A. C., Minick, C. R., Zilvermit, D. B.*: Equal atherosclerosis in rabbits fed cholesterol-free, low fat diet or cholesterol-supplemented diet. *Atherosclerosis* **29** (1978) 301—315.
- [10] *Soldatović, D., Bresjanac, M., Petrovic, C.*: Promena sadržaja kalcijuma i magnezijuma u serumu zivotinja hronično trovanih olovom. *Arh. Farm. Beograd* **15** (1965) 1—6.
- [11] *Speich, M., Bousquet, B., Nicolas, G.*: Concentrations of magnesium, calcium, potassium, and sodium in human heart muscle after acute myocardial infarction. *Clin. Chem.* **26** (1980) 1662—1665.
- [12] *Speich, M., Bousquet, B., Nicolas, G., De Lajartre, A. Y.*: Incidences de l'infarctus du myocarde sur les teneurs en magnésium plasmatique, érythrocytaire et cardiaque. *Rev. Fr. Endocrinol. Clin.* **20** (1979) 159—163.
- [13] *Sroczyński, J., Zajusz, K., Kossmann, S., Wegiel, A.*: The effect of experimental lead poisoning on the development of atherosclerosis. *Pol. Med. J.* **7** (1968) 196—201.
- [14] *Torkovskaya, T. I., Artemova, L. G., Khodzhauliev, B. G., Rudenko, T. S., Polessky, V. A., Azizova, O. A.*: Structural and functional changes in erythrocyte membranes in experimental atherosclerosis. *Biull. Eksp. Biol. Med.* **89** (1980) 675—678.

(For the authors: Michelle Speich, Biochimie Pharmaceutique, U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques, 1, Rue Gaston Veil, F-44035 Nantes Cedex, France)