

# Neurotoxicité de l'aluminium : impact dans le développement de la maladie d'Alzheimer

Ouafa REBAI et Nouredine DJEBLI

Laboratoire de Microbiologie et de Biologie Végétale  
Université de Mostaganem

## I. Introduction

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie du système nerveux central. Des pertes de mémoire, une tendance à la désorientation, une confusion mentale et souvent une dépression en constituent les premiers symptômes. Elle évolue en une détérioration progressive des facultés intellectuelles. C'est l'une des plus fréquentes démences dégénératives primaires dans le monde développé et une cause prépondérante de décès. Cette maladie affecte plus de 10% de personne ayant 65 ans et plus. L'âge et un facteur de risque majeur, la probabilité de développer la maladie doublant tous les cinq ans après 65 ans. Avec l'augmentation et le vieillissement de la population, aussi bien dans les pays développés que dans les pays en voie de développement, le nombre de cas de la MA va continuer à s'accroître. Ainsi, d'après l'organisation mondiale de la santé (OMS), le nombre de personnes de plus de 60 ans atteignait 600 millions en 2001, et les prévisions annoncent 1,2 milliard en 2025 et 2 milliard en 2050. Par ailleurs, en Europe, l'une des régions du monde où la tendance au vieillissement est la plus marquée, la proportion de plus de 60 ans devrait passer de 20 à 35 % d'ici 2050 (OMS). La MA est donc actuellement un problème majeur de santé publique. Ce pendant, les retards diagnostiques des cas de démence et la difficulté du diagnostic différentiel pour la MA rendent peu aisée l'obtention de données chiffrées précises pour cette pathologie (Boustani *et al.*, 2003).

Le prolongement de l'espérance de vie des populations implique directement le risque de développer cette maladie, qui touche aujourd'hui près de 100 000 personnes en Algérie. Le chiffre n'est peut être pas important, mais la maladie guette des milliers de personnes à l'avenir. Le nombre de cas est approximatif selon les médecins puisque aucune étude n'a été menée à ce jour, sachant que deux millions de personnes sont âgées de 60 ans et plus en Algérie avec une espérance de vie moyenne de 70 ans pour les hommes et 72 ans pour les femmes.

Parmi tous les facteurs biologiques en relation avec la MA, les métaux, en particulier l'Aluminium (Al), tiennent une place essentielle (Hollosi *et al.*, 1994). Les cellules du cerveau des patients atteints d'Alzheimer contiennent de 10 à 30 fois plus d'Al que la normale (Jansson, 2001 ; Andrasi *et al.*, 2005). L'Al cause le changement de conformation de la protéine bêta-amyloïde, et conduit à son accumulation dans le cerveau, et induit par la suite l'apoptose neuronale *in vivo* et *in vitro* (Kawahara *et al.*, 2005). L'exposition chronique de plus de 12 mois au sulfate d'Al dans l'eau de boisson de rats, a entraîné le dépôt de la bêta-amyloïde dans le cerveau, et une réduction de l'expression neuronale similaire à celle observée dans le cas de la MA. Donc, l'administration chronique de l'Al serait responsable du dommage oxydatif des cellules neuronales induisant la neurodégénérescence et l'apparition de dommages (Rodella *et al.*, 2008). De plus, une étude étiologique a suggéré que l'Al pourrait augmenter le risque d'une personne normale à développer la MA, puisque ce dernier pourrait être impliqué dans la formation des plaques amyloïdes (Mizoroki *et al.*, 2007). En outre, il a été mis en évidence que l'Al possède une action délétère sur les astrocytes, cellules nourricières du cerveau (Gonçalves et Silva, 2007). De faibles doses d'aluminium peuvent aussi provoquer la mort des astrocytes, particulièrement lorsque cet Al est solubilisé dans le milieu nutritif avec la glycine, un acide aminé (Aremu *et Meshitsuka*, 2005). Cependant, Le lien direct entre l'Al et MA n'est pas encore établi définitivement. Néanmoins, il est clair que l'Al est capable d'induire une inflammation et

une génération de ROS à la fois ; or les deux contribuent à la progression du processus de la maladie.

Les objectifs de cette étude étaient d'évaluer la neurotoxicité de l'Al en s'attachant à décrire les effets éventuels de ce toxique sur le comportement et la mémoire chez un modèle animal.

## **II. Méthodologie**

### **II.1. Traitement à l'Aluminium**

40 souris adultes mâles et femelles, Albinos de l'espèce *Mus musculus* (poids corporel 32-36g), soit un âge moyen de 9 semaines, sont élevées dans des cages individuelles (un cycle lumière/obscurité de 12-12h, une température ambiante de  $22\pm 4^\circ\text{C}$ ). Les souris ont reçu un régime alimentaire standard (O.N.A.B) avec accès libre à l'eau (eau distillée). L'exposition chronique est réalisée par ingestion libre d'une eau distillée supplémentée en Al sous forme de chlorure ( $\text{AlCl}_3$ ) (Hu *et al.*, 2005) pour une période de dix semaines. Les souris ont été réparties en 2 groupes : le groupe témoin ayant reçu seulement l'eau distillé et le groupe traité par 50mg/kg/jour de  $\text{AlCl}_3$ .

### **II.2. Tests neurologiques**

#### **II.3.1. Test de des deux compartiments**

Le test consiste à mettre la souris dans une cage constituée de deux compartiments l'un éclairé, l'autre obscure communicant par un orifice médian. Ensuite, le temps de séjour de la souris dans chaque compartiment est calculé pendant 20 minutes (4 phases de 5 min.) (Costall *et al.*, 1989).

#### **II.2.2. La nage forcée**

Appelé test de Porsolt (Porsolt *et al.*, 1977), consiste à placer chaque souris dans un grand récipient contenant de l'eau à une hauteur de 20cm maintenu à une température de  $25^\circ\text{C}$ . Le but de ce test est d'obliger la souris à nager dans un espace restreint mais duquel, elle ne peut s'échapper mais de s'immobiliser. La durée de l'expérience est de 6min, le temps d'immobilité est évalué entre la première et la cinquième minute.

#### **II.2.3. Test du labyrinthe radiaire**

Ce test est effectué à l'aide d'un labyrinthe radiaire de 8 bras (Wan *et al.*, 1997). Il comporte plusieurs épreuves. Durant la Mémoire spatiale de travail, à chaque essai l'animal doit collecter la pastille de nourriture placée à l'extrémité de chaque bras sans retourner dans un bras déjà visité. Le nombre de bras répété et non répété pour chaque rat est comptabilisé pendant une période de 10 minutes. Durant l'épreuve dite non spatiale de préférence conditionnée, l'animal est déposé sur la plate forme centrale avec les deux bras fermés, puis les deux bras sont ouverts successivement pour qu'il puisse s'adapter à son nouvel environnement. Le rat est ensuite, remis dans le centre du labyrinthe et les deux bras sont ouverts simultanément, et c'est à ce moment la que le test commence. Ainsi le temps de séjour dans le bras éclairé est mesuré pendant une période de 10 minutes.

#### **II.2.4. Epreuve de la piscine de Morris**

Ce test est l'un des plus utilisés pour évaluer les capacités à mémoriser et à gérer information spatiale chez l'animal dans une situation aversive (Morris, 1984). Il utilise un

basin remplis d'une eau rendue opaque par l'addition d'un colorant et une plate forme sur laquelle la souris va chercher à se réfugier pour fuir le milieu liquide. Le bassin est entouré de repères visuels qui fournissent à l'animal le moyen de connaître sa position. Durant la mémoire spatiale de référence (MSR), la plate-forme est rendue invisible pour l'animal en étant légèrement immergée. Dans le cas de la mémoire spatiale de travail (MST), la plate-forme est apparente en étant émergée. Ces tests sont réalisés au cours de cinq séances à raison d'une séance par jour et de quatre essais successifs par séance. Les performances de chaque animal sont évaluées à partir des mesures du temps nécessaire pour atteindre la plate-forme « temps de latence ».

### **II.3. Histopathologie**

Au terme de la période d'intoxication, les souris sont anesthésiées puis sacrifiées conformément aux méthodes décrites dans la littérature (Wingerd, 1988). Les cerveaux sont rapidement extraits des boîtes crâniennes et mis dans des flacons contenant le fixateur de Bouin. Les coupes histologiques de 20 à 50 $\mu$ m d'épaisseur, obtenus à l'aide d'un microtome, sont déshydratées par immersion dans un gradient d'éthanol (50°, 70°, 96°). Ces segments sont ensuite lavés deux fois au chloroforme puis enrobés de paraffine. La coloration, réalisée selon la technique histochimique classique, se fait dans une solution Harry's hématoxyline pendant 2 minutes et pour le contraste avec une solution éosine 1% pendant 40 seconds. Après montage, les lames sont observées au microscope optique.

### **II.4. Analyse statistique**

La significativité des résultats est déterminée par le test de *Student* et les différences sont considérées comme significatives lorsque  $p < 0,05$ .

## **III. Résultats**

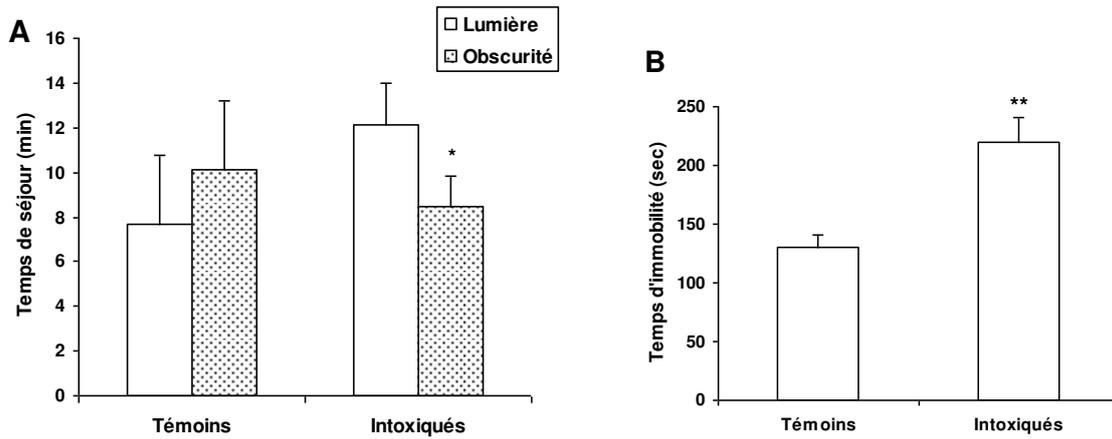
### **III.1. Étude du comportement**

La Figure 1 représente l'effet de l'intoxication par le  $AlCl_3$  sur le temps de séjour dans chaque compartiment (A) et le temps d'immobilité des souris (B).

D'après le test des deux compartiments, il apparaît que les témoins préfèrent le compartiment obscur alors que les intoxiqués passent plus de temps dans le compartiment lumineux (Fig. 1A). Ainsi on peut noter une différence significative ( $p < 0,05$ ) dans le temps de séjour dans le compartiment obscur qui est nettement inférieur à celui du compartiment lumineux pour les intoxiqués. Ce pendant il n'y a pas de différence significative dans le temps enregistré pour les témoins.

Le temps d'immobilité enregistré lors du test de la nage forcée indique une moyenne réduite chez les rats intoxiqués en comparaison aux témoins (Fig. 1B). En effet, la différence observée est significative ( $p < 0,01$ ) entre les témoins et les intoxiqués dont le temps d'immobilité est nettement inférieur.

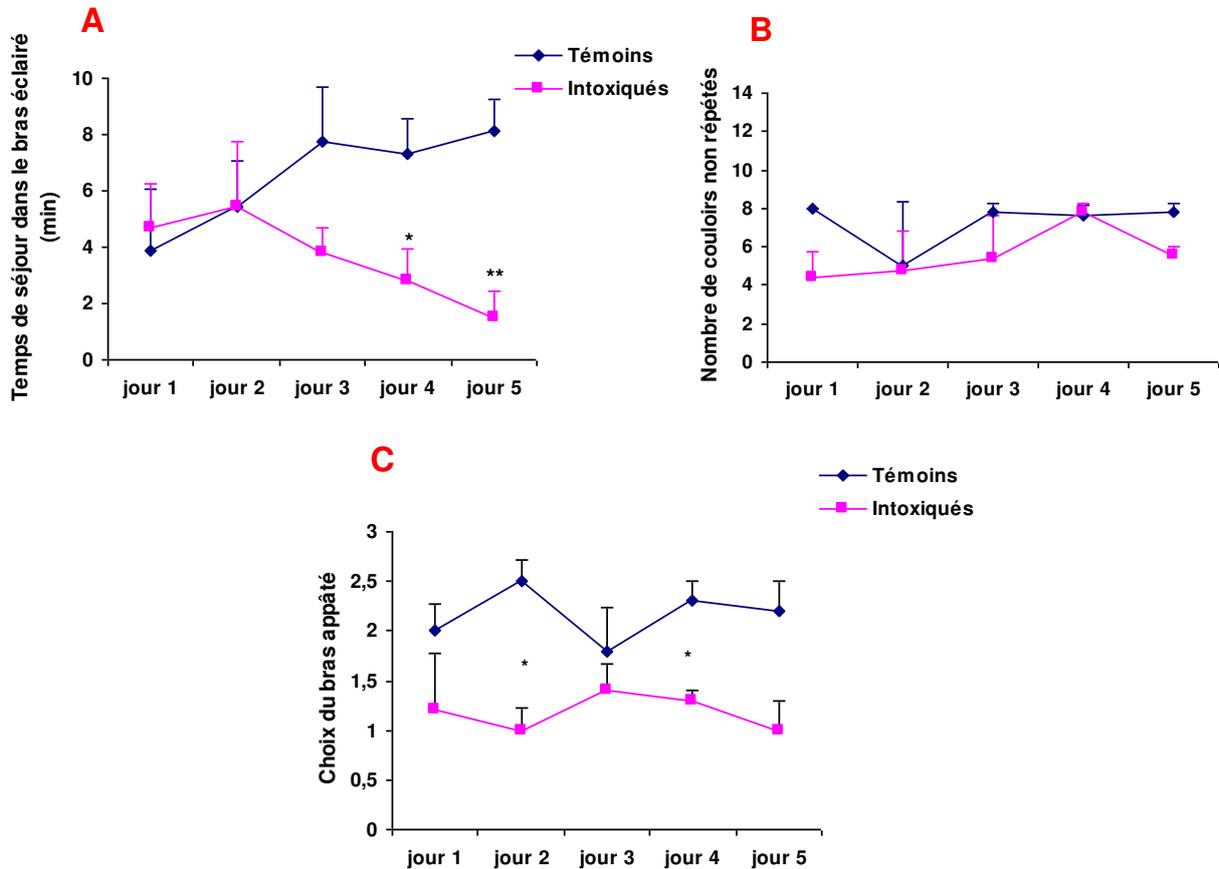
**Figure 1: Effets de l'intoxication par le  $AlCl_3$  sur des souris intoxiquées ingérant une dose de 50mg/kg/jour pendant 10 semaines comparés à des témoins sur : le test des deux compartiments (A) et le test de la nage forcée (B). \* $p < 0.05$ .**



### III.2. Étude de la mémoire

Les résultats de l'épreuve du labyrinthe radiaire à 8 bras sont représentés dans la Figure 2. Dans la version qui évalue la mémoire spatiale de travail on remarque, que le nombre de couloir non répété augmente chez les témoins jour après jour tandis qu'ils restent presque constant chez les intoxiqués (Fig. 2A). Comme on peut remarquer, que dans la deuxième version qui évalue la mémoire spatiale de préférence non conditionnée le temps de séjour dans le bras éclairé a été durant toute la période d'apprentissage, plus important chez les rats intoxiqués comparés aux rats témoins (Fig. 2B). Pour la distinction des positions, il est évident que les rats témoins choisissent plus fréquemment le bras appâté comparés aux rats intoxiqués (Fig. 2C).

**Figure 2: Effets de l'intoxication par le  $AlCl_3$  sur des souris intoxiquées ingérant une dose de 50mg/kg/jour pendant 10 semaines comparés à des témoins sur : la mémoire spatiale de travail (A), la mémoire spatiale de préférence non conditionnée (B) et la distinction des positions (C). \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$**

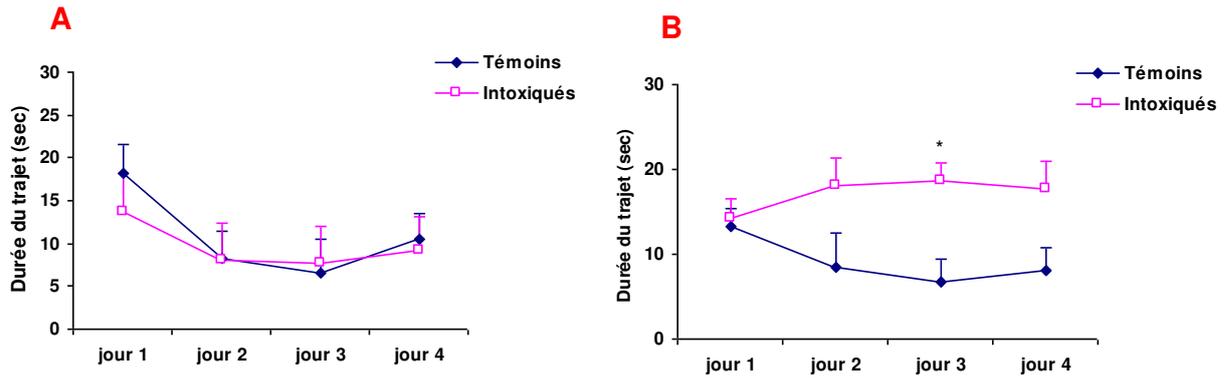


Les résultats de l'épreuve de la piscine de Morris sont représentés dans la Figure 3. Dans les deux versions du test, la mémoire spatiale de travail (MST) et mémoire spatiale de référence (MSR), le temps de latence semble être réduit au fur et à mesure des essais, ce qui semble normale vu que les animaux sont parvenus à mémoriser l'emplacement de la plate-forme avec les essais répétés.

Durant l'épreuve de MST, les rats intoxiqués au chlorure d'Aluminium mettent plus de temps à trouver la plate-forme invisible en comparaison aux témoins (Fig. 3A).

Durant la MSR, la durée du trajet jusqu'à la plate-forme visible est nettement plus élevée chez les intoxiqués que chez les témoins (Fig. 3B).

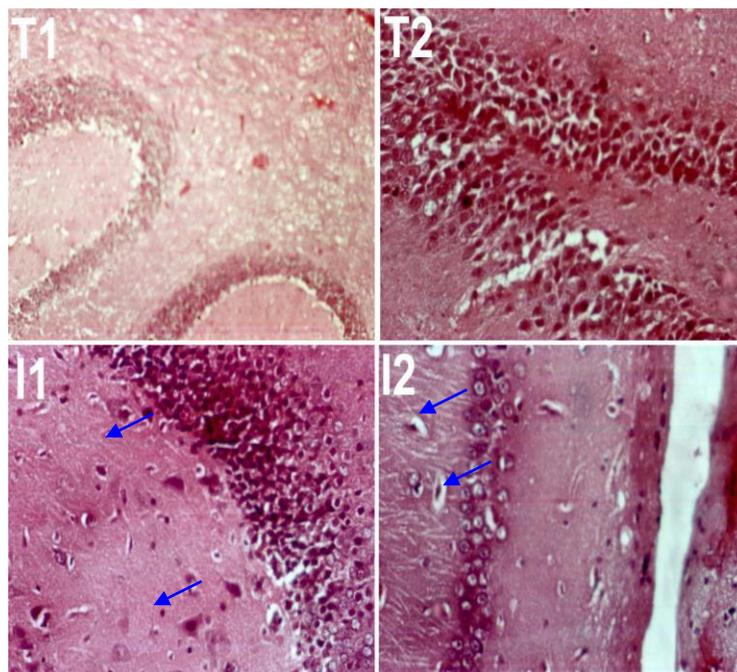
**Figure 3 : Effets de l'intoxication par le  $AlCl_3$  sur des souris intoxiquées ingérant une dose de 50mg/kg/jour pendant 10 semaines comparés à des témoins sur : la mémoire spatiale de travail (A). et la mémoire spatiale de référence (B). \* $p < 0.05$**



### III.3. Caractérisation des lésions au niveau du cerveau

L'effet de l'ingestion chronique du  $AlCl_3$  se traduit au niveau de l'hippocampe par des lésions caractéristiques, vacuolisation, dégénérescence neuronale et diminution de la densité cellulaire chez les souris intoxiquées (Figure 4)

**Figure 4. Étude microscopique de l'hippocampe. Des souris sont sacrifiées après 10 semaines d'intoxication chronique par 50mg/kg/j de  $AlCl_3$ , les cerveaux sont ensuite prélevés pour le traitement histologique. (T1-T2) Hippocampe d'un témoin. Hippocampe d'un intoxiqué présentant différents lésions : (I1) vacuolisation et dégénérescence neuronale, (I2) diminution de la densité cellulaire. [H&E : G x40]**



## IV. Discussion

La neurotoxicité de l'Al est prouvée par son effet sur la mémoire et la capacité d'apprentissage. En effet, lors de notre étude, nous nous sommes intéressées à l'étude de l'effet d'une exposition chronique au chlorure d'Al sur le comportement a été étudié par une série de tests portant sur le comportement et l'anxiété chez des souris. Les souris intoxiquées passent plus de temps dans le compartiment lumineux signe de stress et de peur contrairement aux témoins qui passent plus de temps dans le compartiment obscur, comme les résultats des études de Costall le prouve (Costall *et al.*, 1989). Dans le test de la nage forcée, l'exposition à l'Al semble augmenter le temps d'immobilité chez les souris intoxiquées. Même résultat constaté par une étude précédente (Gardier et Bourin, 2001) qui a montré que les rats présentent une dépression due à la perte de l'espoir de s'échapper, ce qui diminue le temps de latence. Ceci serait dû à des dommages au niveau de l'hippocampe, produits par l'accumulation de l'Al (Kaneko *et al.*, 2006).

La littérature nous indique que l'hippocampe permet de construire, conserver et utiliser une représentation de l'espace (carte cognitive spatiale), ainsi, les cellules hippocampiques codent la position de l'animal dans l'espace. D'autre part, la mémoire de travail est un système de stockage temporaire qui permet d'effectuer des traitements cognitifs complexes sur les éléments de stockage. D'une manière globale les résultats obtenus avec le test du labyrinthe radiaire indiquent que les souris traitées à l'Al présentent un déficit de mémoire et d'apprentissage. En effet, le nombre de couloir non répété est beaucoup plus réduit chez les rats traités à l'Al contrairement aux témoins. Dans le test de mémoire spatiale non conditionnée les souris intoxiquées passe plus de temps dans le bras éclairé qui peut être signe d'anxiété et de peur comme le montre les études. D'autre part, dans l'épreuve de la distinction des positions, le choix du bras appâté devient évident pour les souris témoins jour après jour alors que les intoxiqués montrent toujours une indécision avec un mauvais choix (Fleming, 1987) qui a été expliqué par l'accumulation de l'Al dans le cerveau et plus précisément l'hippocampe et le cortex qui sont responsables de la mémoire et la représentation spatiale. De même les résultats de l'épreuve de la piscine de Morris viennent confirmer la déficience cognitive chez les animaux intoxiqués et prouver qu'une exposition a long terme à l'Al provoque un déclin comportemental et par conséquent un déclin de la mémoire spatiale (Miu *et al.*, 2003 ; Luo *et al.*, 2007). Ces résultats semblent indiquer que les animaux traités par l'Al ont une tendance à mettre plus de temps pour arriver aux aliments et à faire plus d'erreurs.

L'Al gagne un accès facile au système nerveux central dans les conditions physiologiques normales et s'accumule dans les différentes régions du cerveau spécialement l'hippocampe, Son implication dans l'étiologie de plusieurs maladies neurodégénératives a été largement étudiée (Stacchiotti *et al.*, 2006 ; Sethi *et al.*, 2008). L'hippocampe et le cortex cérébral sont les structures clés de la mémoire. L'hippocampe étant indispensable à l'intégration de l'information spatiale, un déclin dans la capacité d'apprentissage ou de mémorisation serait probablement le résultat d'une détérioration de sa structure fonctionnelle (O'keeffe et Nadel, 1978 ; Exley et Esiri, 2006). Dans cette étude, l'examen au microscope optique des coupes de cerveaux des souris a révélée diverses lésions au niveau de l'hippocampe et du parenchyme cérébral. Au niveau de l'hippocampe, on a retrouvé une dégénérescence neuronale, une vacuolisation cytoplasmique et une diminution de la densité cellulaire, dues à l'accumulation de l'Al dans cette région (Varner *et al.*, 1998). L'examen microscopique du parenchyme cérébral, appartenant aux souris exposées au AlCl<sub>3</sub> a montré l'apparition des lésions suivantes : dégénérescence neuronale, diminution de la densité cellulaire, inclusion neuronale, et vacuolisation des cellules, ce qui concorde avec les travaux récemment réalisés (Sethi *et al.*, 2008). Les lésions trouvées au niveau de l'hippocampe peuvent être à l'origine de la diminution des facultés d'apprentissage et de mémoire observée chez les souris exposées à l'Al (Domingo *et al.*, 2006 ; Ribes *et al.*, 2008). D'autres protocoles

expérimentaux corroborent l'hypothèse selon laquelle l'Al s'accumule dans l'hippocampe et le cortex cérébral et induit une neurodégénérescence qui apparaît avec des déficits de l'apprentissage et de la mémoire (Struys-Ponsar *et al.*, 1997). Ainsi la question controversée concernant une possible contribution de la neurotoxicité de l'Al à la pathogenèse de la MA demeure d'actualité. Les études effectuées sur ce sujet ont révélé que la principale caractéristique induite par l'Al dans le cerveau des souris est une dégénérescence neurofibrillaire qui partage certaines similitudes avec celle rencontrée dans la MA (Savory *et al.*, 2003). De plus, l'Al peut également engendrer une dégénérescence granulo vacuolaire dans l'hippocampe (Walton, 2007), ainsi qu'une angiopathie dans le cortex cérébral (Exley et Esiri, 2006).

## Bibliographie

1. Andrasi E, Pali N, Molnar Z, Kosel S. Brain aluminum, magnesium and phosphorus contents of control and Alzheimer-diseased patients. *Journal of Alzheimer's Dis.* 7 (2005) Amsterdam (the Netherlands) 273–284.
2. Aremu DA, Meshitsuka S. Accumulation of aluminum by primary cultured astrocytes from aluminum amino acid complex and its apoptotic effect. *Brain Res.* 1031(2005) 284–296.
3. Boustani M., Peterson B., Hanson L. Harris R. and Lohr K.N. Screening for dementia in primary care: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 138 (2003) 927-37.
4. Costall B, Kelly ME, Naylor RJ, Onaivi ES. The effects of ondansetron (GR38032F) in rats and mice treated subchronically with diazepam. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 32 (1989) 777-785.
5. Domingo JL. Aluminum and other metals in Alzheimer's disease: a review of potential therapy with chelating agents. *J. Alzheimers Dis.* 10 (2-3) (2006) 331-341.
6. Exley C, Esiri MM. Severe cerebral congophilic angiopathy coincident with increased brain aluminium in a resident of Camelford, J. *Neurology, Neurosurgery and Psychiatry.* 77 (2006) 877-879.
7. Fleming J, Joshi JG. Ferritin: isolation of aluminum-ferritin complex from brain, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84 (1987) 7866-7870.
8. Gardier AM, Bourin M. Appropriate use of "knockout" mice as models of depression or models of testing the efficacy of antidepressants. *Psychopharmacology*, 153 (2001) 393-394.
9. Gonçalves PP, Silva VS. Does neurotransmission impairment accompany aluminium neurotoxicity? *J Inorg Biochem.* 101(2007) 1291–1338.
10. Hollosi M, Shen ZM, Perczel A, Fasman GD. Stable intrachain and interchain complexes of neurofilament peptides: a putative link between Al<sup>3+</sup> and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci.* 91 (1994) USA 4902–4906.
11. Hu H, Yang YJ, Li XP, Chen, GH. Effect of aluminium chloride on motor activity and species-typical behaviors in mice, *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Ye Bing Za Zhi.* 23 (2) (2005) 132-135.
12. Jansson ET. Aluminum exposure and Alzheimer's disease, *J. Alzheimers Dis.* 3 (6) (2001) 541-549.
13. Kaneko N, Takada J, Yasui H, Sakurai H. Memory deficit in mice administered aluminum–maltolate complex, *Bio. Metals.* 19 (2006) 83–89.
14. Kawahara M. Effects of aluminum on the nervous system and its possible link with neurodegenerative diseases. *8(2) (2005) 171-182.*

15. Luo Y, NIE J, Gong QH., Lu YF, Wu Q, Shi JS. Protective effects of icariin against learning and memory deficits induced by aluminium in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34 (8) (2007) 792-795.
  16. Miu AC, Andreescu CE, Vasiu R, Olteanu AI. A behavioural and histological study of the effects of long-term exposure of adult rats to aluminium, *Intern. J. Neurosci.* 113 (2003) 1197–1211.
  17. Mizoroki T, Meshitsuka S, Maeda S, Murayama M, Sahara N, Takashima A. Aluminum induces tau aggregation in vitro but not in vivo. *J. Alzheimers Dis.* 11(4) (2007) 419-427.
  18. Morris, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 11 (1984) 47-60.
  19. O'Keefe J, Nadel L. *The hippocampus as a cognitive map.* (1978) Oxford University Press, Oxford.
  20. Porsolt R.D, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 229 (1977) 327–336.
  21. Ribes D, Colomina MT, Vicens P. Effects of oral aluminum exposure on behavior and neurogenesis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Experimental Neurology* 214 (2008) 293-300.
  22. Rodella LF, Ricci F, Borsani E, Stacchiotti A, Foglio E, Favero G, Rezzani R, Mariani C, Bianchi R. Aluminium exposure induces Alzheimer's disease-like histopathological alterations in mouse brain. *Neuroscience* 156(4) (2008) 433-439.
  23. Savory J, Herman MM, Ghribi O. Intracellular mechanisms underlying aluminum-induced apoptosis in rabbit brain. *J. Inorg. Biochem.* 97 (1) (2003) 151-154.
  24. Sethi P, Jyoti A, Singh R, Hussain E, Sharma D. Aluminium induced electrophysiological, biochemical and cognitive modifications in the hippocampus of aging rats. *Neurotoxicology* 29(6) (2008) 1069-1079.
  25. Stacchiotti A, Rodella LF, Ricci F, Rezzani R, Lavazza A, Bianchi R. Stress proteins expression in rat kidney and liver chronically exposed to aluminium sulphate. *Neuroscience* 141(2) (2006) 131-140.
  26. Struys-Ponsar, Gustavsson P, Hogstedt C. Neuropsychiatric symptoms among welders exposed to neurotoxic metals. *British Journal of Industrial Medicine* 47(10) (1997) 704-707.
  27. Varner J, Jensen KF, Horvath W, Isaacson R. Chronic administration of aluminum–fluoride or sodium–fluoride to rats in drinking water: alterations in neuronal and cerebrovascular integrity, *Brain Research.* 784 (1998) 284–298.
  28. Walton JR. An aluminum-based rat model for Alzheimer's disease exhibits oxidative damage, inhibition of PP2A activity, hyperphosphorylated tau, and granulovacuolar degeneration. *Neuroscience* 147(9) (2007) 1275-1284.
  29. Wan RQ, K. Pang, DS. Olton, Nonhippocampal muscarinic receptors are required for nonspatial working memory, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 58 (2) (1997) 361-367.
  30. Wingerd BD, *Rat dissection manual.* The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London (1988).
-