

Apport de l'analyse minéralogique en pratique clinique: quels outils et quels échantillons pour quel laboratoire ?

JC Pairon

**Service de pathologies professionnelles et de l'Environnement, CHI Créteil
INSERM U955, Université Paris-Est Créteil Val de Marne
Laboratoire Amiante Fibres et Particules, Paris**

Evaluation des expositions aux particules minérales

- ◆ Interrogatoire professionnel ou environnemental + expertise
- ◆ **Biométrie** : quantification des particules minérales dans un échantillon biologique

Objectifs de l'analyse biométrologique

- ◆ **Evaluation qualitative et/ou quantitative d'expositions antérieures à des particules minérales**
 - ✓ Estimation de la charge pulmonaire
Rétention = témoin indirect de l'exposition
 - ✓ Attention: la charge en particules minérales mesurée à l'instant t reflète les mécanismes de dépôt et la clairance des particules
- ◆ **Outil du diagnostic étiologique de maladies respiratoires multifactorielles (CBP, fibrose)**

Biométrie des particules minérales

- ◆ **Quelles particules ?**
- ◆ **Quels échantillons biologiques ?**
- ◆ **Quelle méthode analytique ?**
- ◆ **Quels laboratoires ?**

Biométrie et particules minérales: quelles particules?

- ◆ **Fibres**
 - ✓ **Amiante**
 - ✓ **Fibres minérales artificielles (notamment LV, LR, LL, FCR)**
 - ✓ **Autres fibres**

- ◆ **Particules minérales non fibreuses**
 - ✓ **Silice**
 - ✓ **Métaux – cas particulier du béryllium**
 - ✓ **Autres particules**

- ◆ **Nanoparticules**

Biométrie et particules minérales: quelles particules?

◆ **Fibres**

✓ **Amiante**

✓ **Fibres minérales artificielles: problème de la faible biopersistance des fibres de LV-LR-LL (Rodelsperger et al, Eur J Oncol 1998; Soldan et al, Ann Occup Hyg 2005). Biopersistance des FCR (Sébastien et al, Ann Occup Hyg 1994; Dumortier et al, Am J Respir Crit Care Med 2001)**

✓ **Autres fibres**

◆ **Particules minérales non fibreuses**

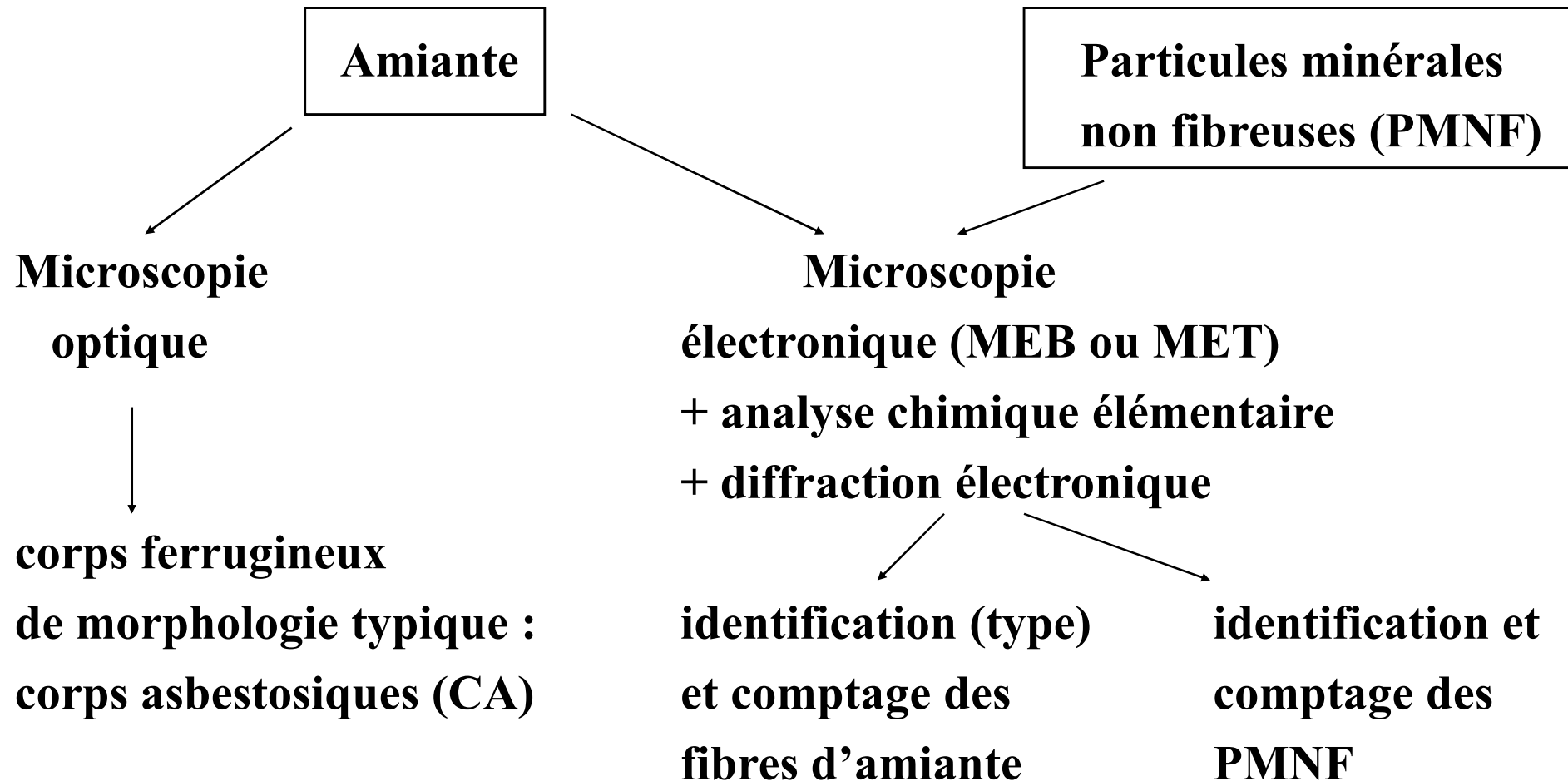
✓ **Silice**

✓ **Métaux** cas particulier du béryllium : numéro atomique, mécanisme de toxicité

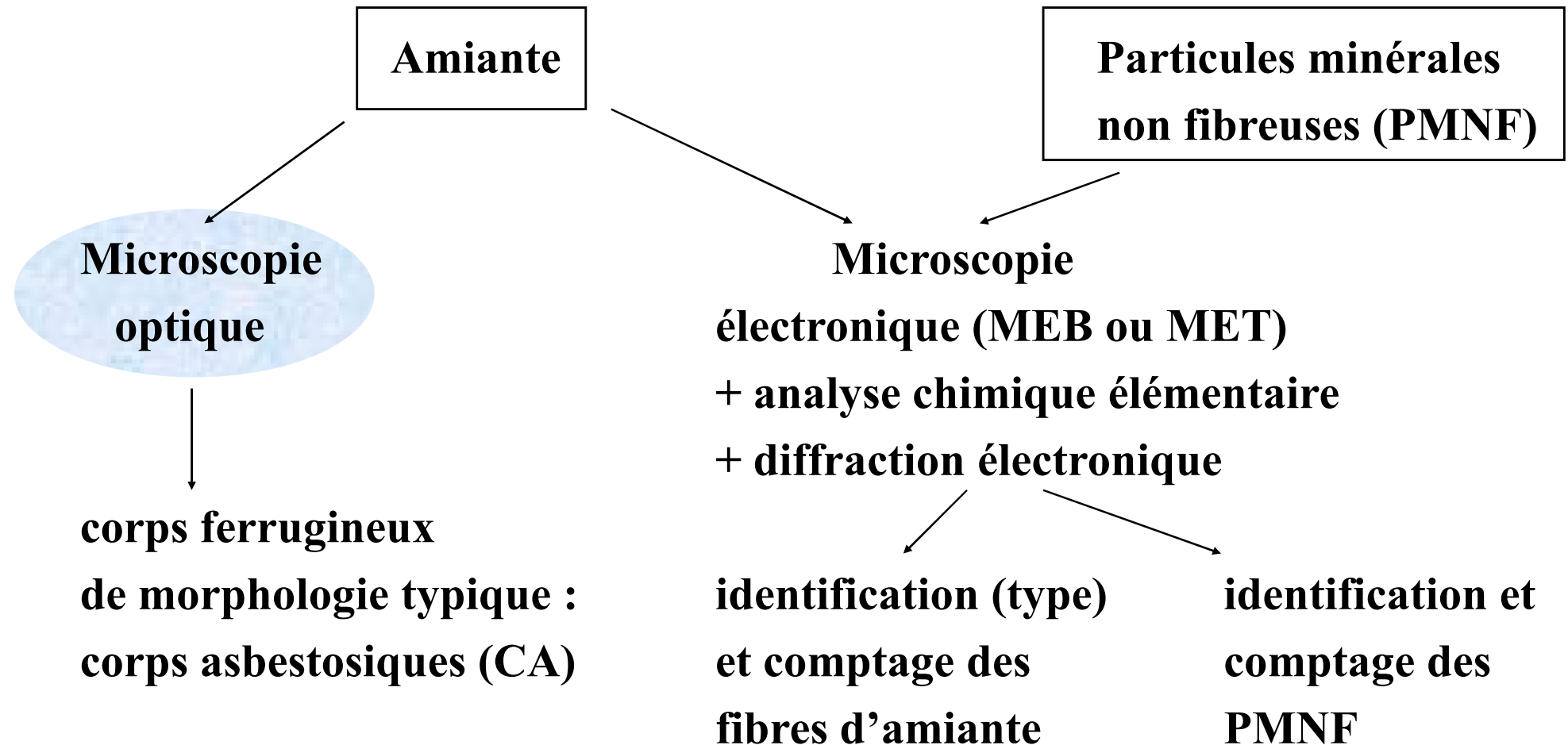
✓ **Autres particules**

◆ **Nanoparticules : préoccupation « émergente ». Absence de niveaux de référence**

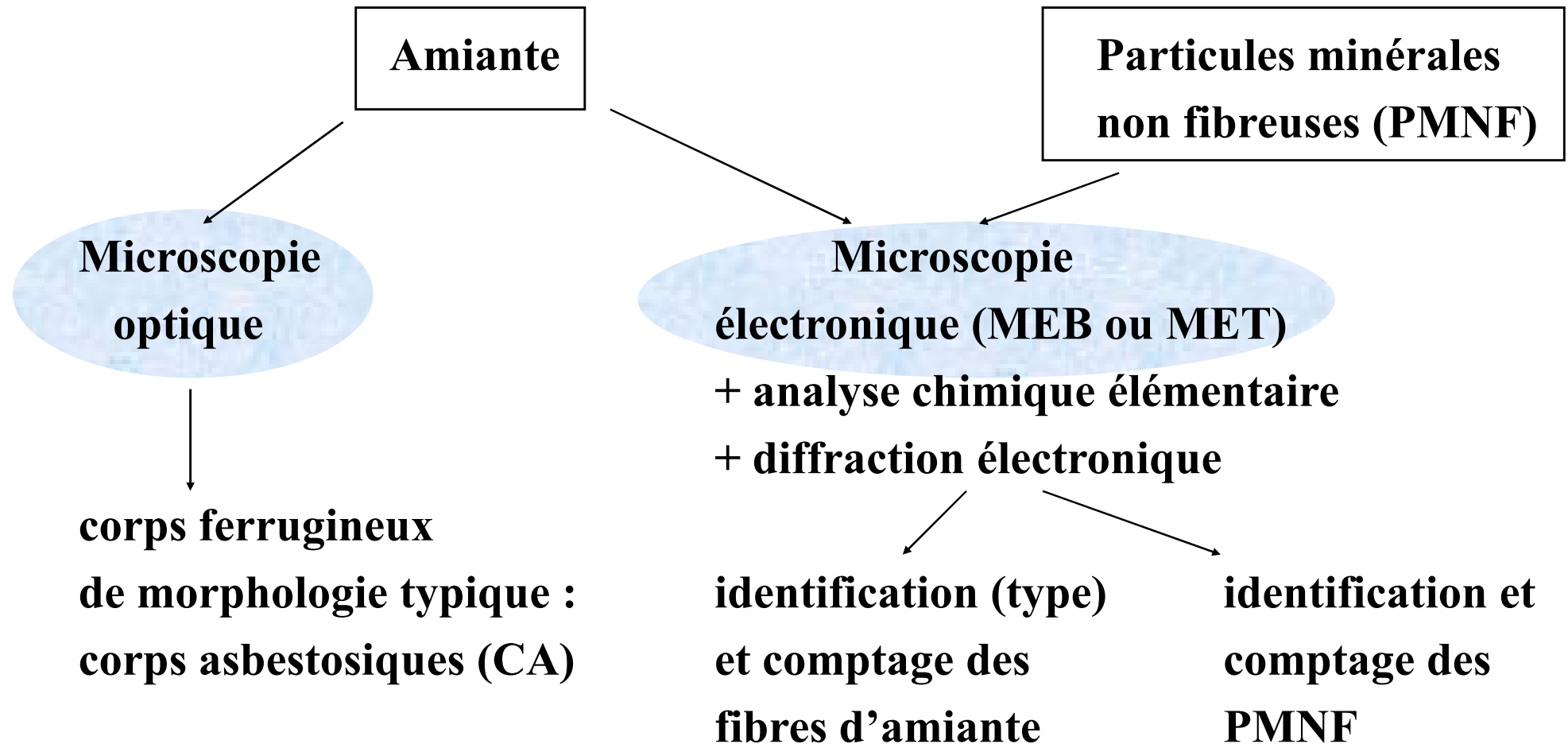
Biométrie des particules minérales : techniques analytiques



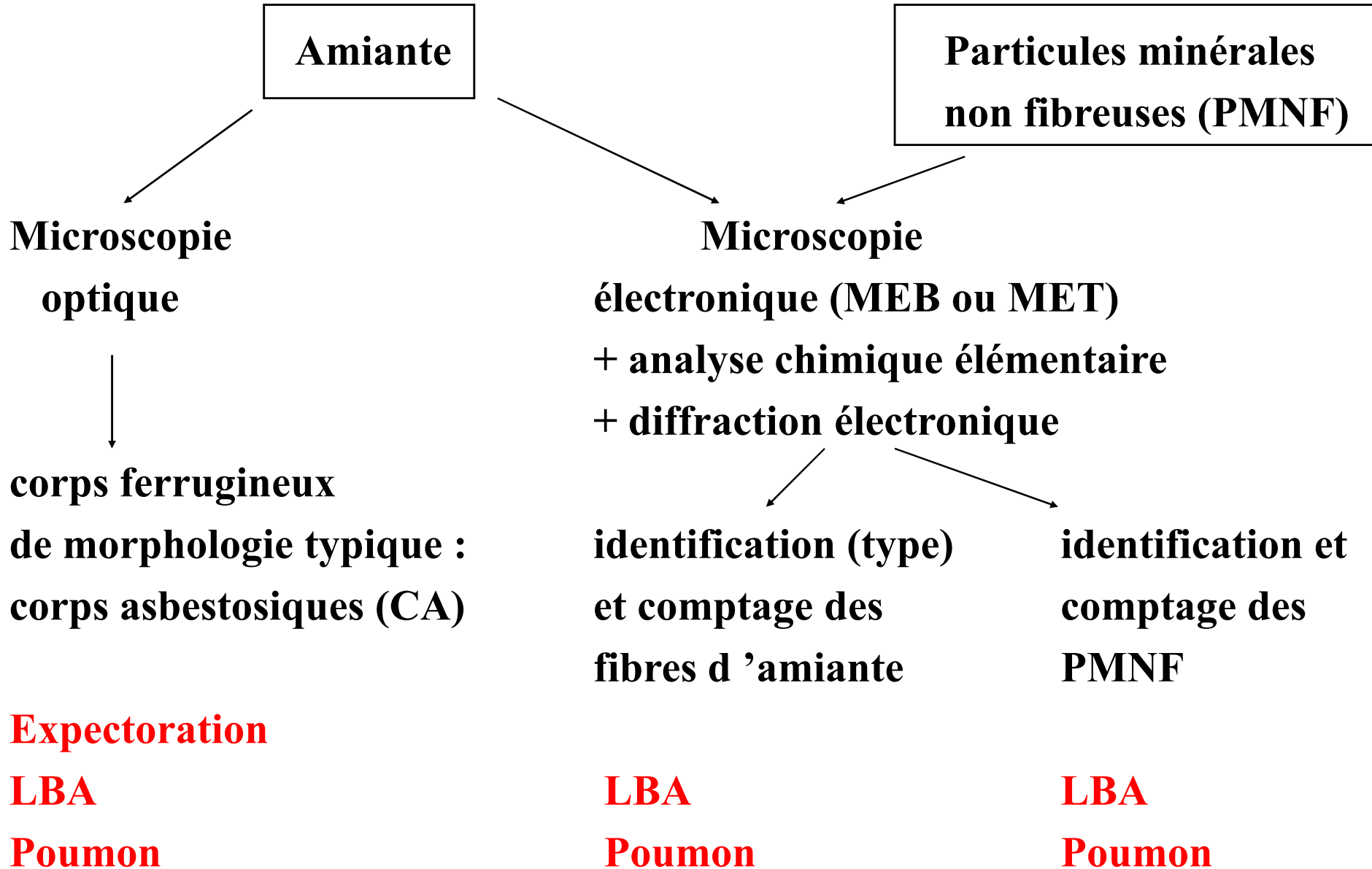
Biométrie des particules minérales : techniques analytiques



Biométrie des particules minérales : techniques analytiques



Biométrie des particules minérales : techniques analytiques



Analyses minéralogiques et échantillons biologiques : quelques aspects méthodologiques importants

- ◆ **Echantillonnage : recommandations** (ERS working group concernant l'analyse des fibres minérales. De Vuyst et al, Eur Respir J 1998, 11:1416-1426)
recueil sur formaldéhyde dépoussiéré à 10 %

Tissu pulmonaire

Variations intra-pulmonaires de concentration ++ (Gibbs et Pooley, 1996)

Idéal = 3 x 1 cm³ (apex lobe supérieur, apex et base du lobe inférieur) de **tissu indemne de tumeur ou de fibrose pleurale**

Echantillons acceptables :

- lobectomie, pneumonectomie
prélèvement de **1 cm³ minimum**
- biopsie par thoracoscopie (si grande taille)
- bloc paraffine : uniquement pour corps asbestosiques

LBA

- lobe moyen ou lingula,
- côté controlatéral à une éventuelle tumeur
- 3 x 50 ml sérum isotonique avec recueil > 30 % + analyse cytologique confirmant l'origine alvéolaire
- analyse sur au moins 10 ml et **si possible 20 ml**, de la 2^e ou 3^e fraction recueillie, non filtrés sur gaze.

Analyses minéralogiques et échantillons biologiques: aspects méthodologiques importants

- ◆ **Préparation, analyse, expression des résultats :**
 - ✓ **Digestion de la matière organique (attaque chimique par KOH, eau de Javel ou formamide), filtration, transfert sur lame (MO) ou grille (MET)**
 - ✓ **MO ou MET : s'assurer de l'absence de contamination pour les analyses en MET +++**
 - ✓ **Expression des résultats**
 - **par ml de LBA**
 - **par g de poumon sec**
 - **par expectoration (pour les corps asbestosiques. 3 expectorations recommandées)**

Pour les analyses en MET, préciser sensibilité analytique, type de fibres, granulométrie (longueur > ou < 5 microns ++)
 - ✓ **Comparaison à des valeurs de référence**

Analyse comparée des différents échantillons biologiques (amiante)

- ◆ **Tissu pulmonaire = milieu de référence**
- ◆ **Bonne corrélation entre nombre de CA dans le LBA et nombre de CA dans le tissu pulmonaire** (Sébastien et al, Am Rev Respir Dis 1988, 137:75-78; Karjalainen et al, Eur Respir J 1996, 9:1000-1005)
- ◆ **Expectoration : faible sensibilité du marqueur**
(bonne spécificité pour Teschler et al, Eur Respir J, 1996)

Avantages/inconvénients des techniques analytiques (amiante)

(ERS working group, De Vuyst et al Eur Respir J 1998, 11:1416-1426)

	Avantages	Inconvénients
Microscopie optique (MO)	<ul style="list-style-type: none">- rapide, simple- coût modéré- sensibilité (0,1 CA/ml ou 30 CA/g)	<ul style="list-style-type: none">- faible pouvoir de résolution (diamètre > 0,2 µm) donc limitée aux CA et grosses fibres
Microscopie électronique (MET)	<ul style="list-style-type: none">- pouvoir de résolution élevé (diamètre : 0,01 µm)- identification du type de fibres- quantification des paramètres dimensionnels de la fibre	<ul style="list-style-type: none">- long (surtout pour obtenir une sensibilité analytique suffisante)- coût élevé

Pour l'amiante, analyse en MO en première intention +++ malgré les limites du marqueur CA

(faux négatifs : chrysotile, variabilité interindividuelle ; faux positifs : FCR)

Niveau de rétention pulmonaire d'amiante et probabilité d'exposition antérieure

Exposition	Corps asbestosiques (MO)		Fibres (MET)	
	LBA	Poumon	LBA	Poumon
Probable	1/ml	1000/g	300/ml ?	10⁶/g (amphiboles)
Certaine	5/ml	5000/g	1000/ml?	2x10⁶/g (amphiboles) 15x10⁶/g (chrysotile)

Interprétation des résultats d'analyses minéralogiques

Amiante

- ◆ Une concentration élevée de fibres ou CA dans le LBA ou le tissu pulmonaire témoigne d'une rétention élevée par rapport à une population de référence non exposée, avec souvent une origine professionnelle, mais n'est pas une preuve de maladie.
- ◆ Un résultat « négatif » ne peut pas éliminer une exposition antérieure significative à l'amiante (chrysotile +++)
- ◆ Intérêt de ce type d'analyse surtout pour les pathologies non spécifiques suivantes :
 - ✓ cancer bronchopulmonaire ++
 - ✓ fibrose interstitielle diffuse ++
 - ✓ atélectasie ronde
 - ✓ pleurésie exsudative
 - ✓ fibrose de la plèvre viscérale
- ◆ Résultat non exigé pour une réparation en maladie professionnelle (présomption d'origine) mais utile pour certains sujets dont la maladie ne remplit pas les critères du tableau 30 ou 30bis (durée d'exposition, liste des travaux)

Particules minérales non fibreuses

Deux paramètres importants :

- ✓ **nombre total de particules** (données LEPI)
 - **LBA normal** : $4,4 \pm 11 \times 10^5$ p/ml
 - **poumon normal** : $9 \pm 8 \times 10^7$ p/g
- ✓ **répartition qualitative des particules**
(variétés minérales)
 - **ubiquitaires (> 80 % sujets) : silice-fer-silicates**
 - **fréquentes (30 à 80 % sujets) : kaolinite, mica, talc, aluminium, titane, feldspath, chrome, nickel**
 - **rares (< 30 % sujets) : étain, cuivre, manganèse, cobalt, baryum, etc.**

Profil minéralogique des PMNF de sujets non exposés professionnellement à des particules minérales (données LEPI)

	LBA	Poumon	Résultat « inhabituel »
Silice cristalline	17,2 %	14,6 %	> 30%
Silice amorphe	4,5 %	0,1 %	> 10%
Kaolinite	12,8 %	13,3 %	> 20%
Mica	11,3 %	18,7 %	> 30%
Talc	1,6 %	3,9 %	> 10%
Chlorite	1,7 %	2,3 %	
Autres phyllosilicates	0,8 %	0 %	
Feldspaths	7 %	15,1 %	> 30%
Autres silicates	5,7 %	2,1 %	> 10%
Particules calciques	13 %	6,9 %	> 30%
Fer cristallin	5,1 %	12,6 %	> 20%
Aluminium	2,2 %	2,1 %	> 10%
Titane	4,9 %	3,1 %	> 10%
Métaux composés	5,1 %	3,2 %	> 10%
Autres métaux	1,3 %	0,5 %	
Fly ash	1,5 %	0,1 %	
Divers	2,5 %	1 %	
Indéterminés	1,8 %	0 %	

Profil minéralogique 2015 des PMNF de sujets non exposés professionnellement à des particules minérales (données LEPI)

(Particules comptées: si taille de plus de 0,1 micron)

	Concentration x 10 ⁷ /g poumon m (+/- SD)	%	95 ^e percentile x 10 ⁷ /g (Résultat « inhabituel »)
Toutes particules	52,7 (+/-42,4)		135,1
Silice cristalline	8,2 (+/-10)	15,6%	26,2
Silice amorphe	0,1 (+/-0,3)	0,2%	0,6
Kaolin	1,5 (+/-2,0)	2,8%	4,1
Mica	13,2 (+/-13,3)	25,1%	43,9
Talc	0,5 (+/-0,8)	0,9%	2,4
Chlorite	0,5 (+/-0,8)	0,9%	2,4
Autres phyllosilicates	0 (+/-0,2)	0%	0
Feldspaths	4,7 (+/-5,5)	8,9%	14,8
Autres silicates	0,8 (+/-1,2)	1,5%	3,3
Particules calciques	1,4 (+/-2,7)	2,7%	8,1
Fer cristallin	1,6 (+/-1,7)	3%	5
Aluminium	1,2 (+/-2,4)	2,3%	4,9
Titane	13,1 (+/-11,5)	24,9%	32
Alliages métalliques	2 (+/-2,1)	3,8%	5,1
Autres métaux	1,7 (+/-4)	3,2%	7,4
Fly ash	0,1 (+/-0,2)	0,2%	0,2
Divers	2,1 (+/-2,8)	4%	8,1

Biopersistance démontrée de certaines PMNF dans le tractus respiratoire

(Pairon et al, Environ Health Persp, 1994)

262 sujets exposés (E⁺) avec LBA entre 1981 et 1992.

**Sujets classés en fonction de la latence écoulée depuis la
dernière exposition aux PMNF**

E1 : arrêt < 1 an

E2 : 1an < arrêt < 10 ans

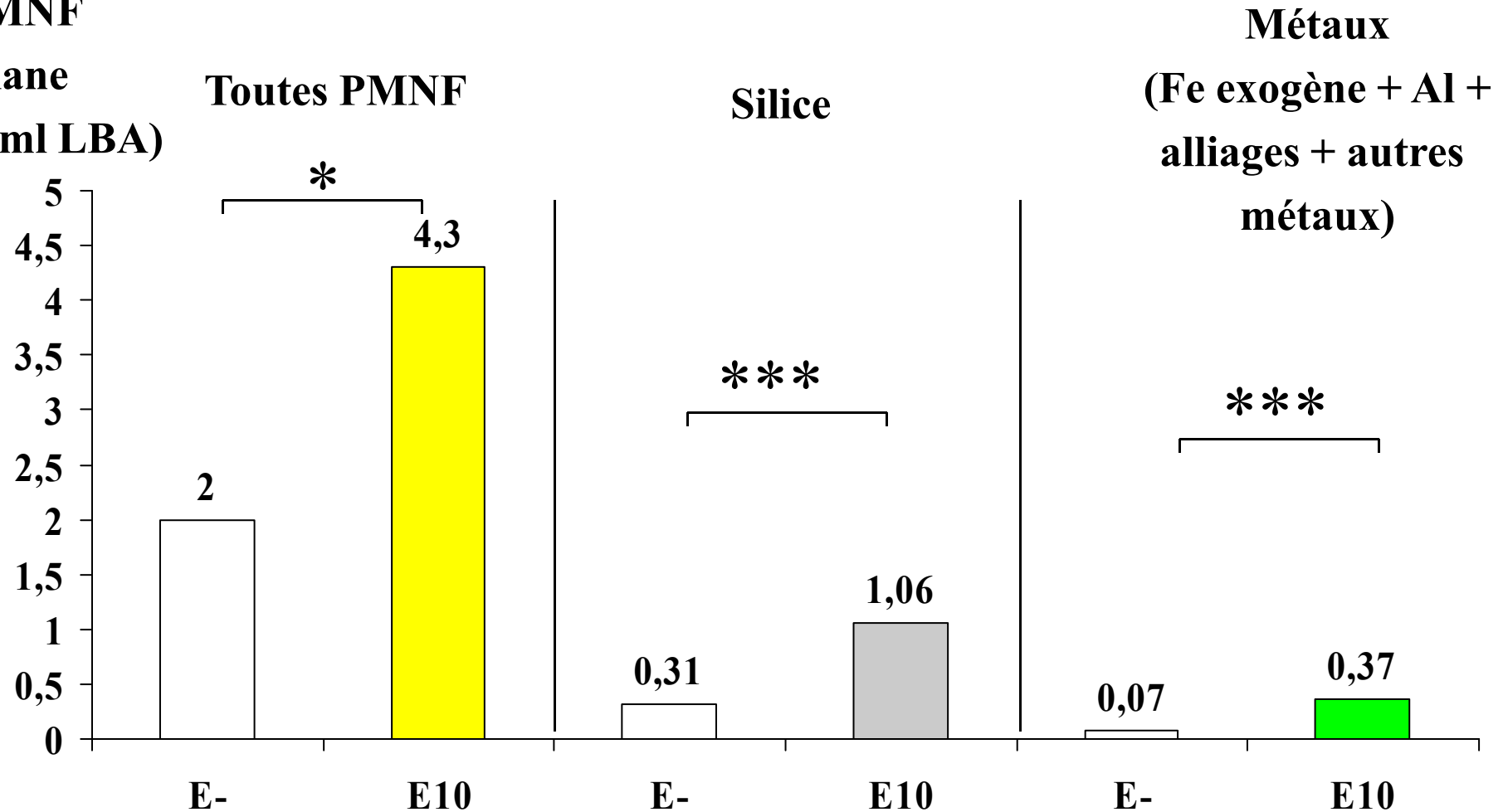
E3 : arrêt ≥ 10 ans

42 sujets témoins (E⁻)

Biopersistance de certaines PMNF dans le tractus respiratoire

[C]PMNF

(médiane
x 10⁵/ml LBA)



E- = non exposés; E10 = exposition arrêtée depuis > 10 ans

(Pairol et al. Environ Health Persp 1994)

Biométrie des PMNF dans le LBA

- ◆ **Modalité** : arrêt de l'exposition depuis au moins 15 jours, et si possible 1 mois, au moment de la réalisation du LBA (→ dose en rétention). Analyse en MET.
- ◆ **Objectif** : Aide au diagnostic étiologique d'une pathologie
 - ✓ détection « qualitative » pour les particules rares
 - ✓ analyse semi-quantitative indispensable pour les particules ubiquitaires ou fréquentes
- ◆ **Indications**
 - ✓ pathologie respiratoire multifactorielle.
Ex : cancer bronchopulmonaire, fibrose interstitielle diffuse
 - ✓ pathologie systémique avec étiologie professionnelle possible.
Ex : sclérodermie, polyarthrite rhumatoïde.
 - ✓ Inutile si silicose chez un salarié exposé de façon évidente à l'inhalation de silice à l'interrogatoire.
Ex : ancien mineur +++

Conclusion (1)

Analyse minéralogique en pratique clinique :

- ◆ **Quelles particules en 2018?**
 - ✓ Amiante → corps asbestosiques (CA) en microscopie optique
 - ✓ Particules minérales non fibreuses (notamment silice, métaux)
→ microscopie électronique à transmission
 - ✓ Ne permet d'identifier que les particules biopersistantes
- ◆ **Quels échantillons ?** Type +++ volume +++

Poumon, avec
taille suffisante
(**> 1 cm³**)

éventuellement
bloc pour CA

LBA
> 20 ml/analyse
cytologie parallèle
recommandée

arrêt expo > 15 J
si analyse MET
(indifférent si CA)

Expectoration x 3
pour CA

Autres = protocoles
de recherche

Conclusion (2)

◆ **Quelle méthode, quels laboratoires ?**

✓ **Laboratoire spécialisé sous assurance qualité**

- **mode d'expression des résultats approprié (par ml LBA ou par g poumon sec)**
- **réalisation de comparaisons intra/interlaboratoires**
- **valeurs de référence du laboratoire**

◆ **Ne pas oublier: rétention élevée de particules (CA, PMNF) dans l'échantillon**

= preuve d'une exposition antérieure anormalement élevée

≠ preuve de pathologie

L'analyse minéralogique complète l'interrogatoire professionnel et environnemental, mais ne doit pas s'y substituer +++

(un résultat négatif ne doit pas « écarter » une exposition clairement identifiée à l'interrogatoire)

Pour toute information complémentaire...

Laboratoire Amiante Fibres et particules (ex LEPI)

11 rue Georges Eastman

75013 Paris

Tel: 01 44 97 88 42 ou 01 44 97 88 43

Fax: 01 44 97 88 45

Directeur: Mr Laurent Martinon

NB: fourniture sur simple demande de flacons contenant 10 ml de formol dépoussiéré à 10% + formulaires de demande d'analyse