

UNIVERSITÉ LILLE NORD DE FRANCE  
ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ

THÈSE POUR L'OBTENTION DU  
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ LILLE NORD DE FRANCE  
Discipline : MÉDECINE ET SANTÉ AU TRAVAIL

Sébastien HULO

LE CONDENSAT D'AIR EXHALÉ : UNE NOUVELLE MATRICE POUR  
ÉVALUER L'EXPOSITION PULMONAIRE PROFESSIONNELLE

Thèse dirigée par Jean-Louis EDMÉ  
EA 4483 Impact de l'environnement chimique sur la santé humaine  
Soutenue le 27/02/2014

Jury :  
Patrick BROCHARD  
Jean Dominique DEWITTE  
Jean Louis EDMÉ  
Régis MATRAN  
Anca RADAUCEANU  
Annie SOBASZEK

*"A man's medical history and the traces of his habits and his trade are often inscribed upon the lungs - for him who can read."*

*Dr Liebow AA. Foreword. In: Spencer H. Pathology of the lung.*

*3rd ed. Oxford: Pergamon Press, 1977.*

# Remerciements

*A mes rapporteurs*

***Monsieur le Professeur Patrick BROCHARD***

*Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Je vous prie de trouver ici le témoignage de ma gratitude et de mon profond respect.*

***Monsieur le Professeur Jean-Dominique DEWITTE***

*Vous me faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.*

*Aux membres du jury*

***Madame le Professeur Annie SOBASZEK***

*Vous m'avez soutenu et accompagné tout au long de ma carrière, et pour cela, je vous en suis à tout jamais reconnaissant.*

*Vous m'avez fait découvrir le monde de la recherche et le plaisir de publier. J'espère que ce travail est à la hauteur de vos attentes et de la confiance que vous m'accordez.*

*Votre pertinence, votre clairvoyance et votre perspicacité m'ont grandement servi au cours de mon parcours. Recevez ici le témoignage de mon profond respect et de ma reconnaissance.*

***Madame le Docteur Anca RADAUCEANU***

*Vous me faites un grand honneur en acceptant de faire partie de mon jury de thèse. Je vous remercie pour votre participation active lors de ce travail et espère poursuivre notre fructueuse collaboration dans de futurs projets. Soyez assuré de mon profond respect.*

***Monsieur le Professeur Régis MATRAN***

*Vos connaissances en physiologie et votre expérience du monde scientifique m'ont de nombreuses fois aidées au cours de mes recherches et je vous en remercie.*

*Vous m'avez accepté dans votre service et je suis très honoré de la confiance que vous m'accordez. J'espère être à la hauteur de vos attentes et vous prie de trouver ici le témoignage de mon profond respect.*

*A mon directeur de thèse*

***Monsieur Jean-Louis EDME***

*Je suis fier d'avoir été et d'être encore votre élève. Chaque échange avec vous est source de connaissances. J'espère que vous trouverez dans ce travail les mêmes qualités que sont les vôtres : la rigueur scientifique, la justesse, la précision et la logique.*

*Je vous suis très reconnaissant pour votre disponibilité, votre joie de vivre et votre humanité lors de la direction de ce travail. Soyez assuré de mon entier dévouement et de mon profond respect.*

*J'espère un jour pouvoir vous tutoyer et je suis heureux de vous avoir fait découvrir le capuccino goût vanille !*

*A mes collègues de recherche*

*A mes 2 superwomen*

*Madame le Docteur Nathalie CHEROT-KORNOBIS*

*Madame le Docteur Virginie de BROUCKER*

*Votre soutien et vos attentions de tous les jours me touchent beaucoup. Je suis honoré de travailler avec vous et vous fait part ici de mon admiration envers vous pour occuper deux fonctions en même temps : celle de médecin-chercheur et celle de mère de famille. Soyez assurés de mon profond attachement et de mon respect.*

*A Jessica*

*Merci pour ton aide et tes nombreux services rendus.*

*A Sébastien et Lucie*

*Je vous suis très reconnaissant pour toute l'énergie que vous avez dépensée dans ce projet. Je vous remercie d'avoir cru en moi et aussi pour tous nos fous rires.*

*A l'équipe du service des EFR*

*Je tiens à vous remercier pour votre soutien dans ce travail et aussi pour votre joie de vivre !*

*A Mike*

*Thank you for your advice in writing publications and to teach me the language that is yours. Thanks a lot!*

### ***A mes parents***

*Vous m'avez toujours soutenu dans mes choix et dans mon travail. Vous êtes toujours là dans les moments difficiles. Sans tous vos sacrifices, je n'aurai jamais pu être ce que je suis. Je vous suis éternellement reconnaissant. Je vous aime.*

### ***A ma sœur***

*Je sais que tu tiens autant à moi que moi je tiens à toi et tu seras toujours ma protégée. Continue d'être ce que tu es, ne change rien : sincère, franche, honnête, naturelle ... et jolie aussi !!!*

### ***A ma déesse***

*Tu es venue me chercher et depuis je suis un homme heureux et amoureux. Merci pour tout l'amour que tu me portes et pour ton soutien au quotidien. Je suis fier d'être à tes côtés.*

*Je t'aime ma Doudounette !*

### ***A mes amis***

*Merci pour votre soutien et pour vos encouragements. Promis je serai un peu plus disponible ...*

## Sommaire

Remerciements .....	3
Introduction.....	9
Première partie .....	12
Dépôt des particules inhalées et mécanismes d'épuration pulmonaire.....	12
Modèles expliquant la formation et l'origine de l'EBC.....	41
Deuxième Partie .....	45
Etude n°1 : Analyse minéralogique d'un EBC recueilli chez un salarié exposé à des poussières fines de mica. ....	45
Etude n°2 : Quantification des particules métalliques dans les EBC de soudeurs exposés à des fumées de soudage issues de l'assemblage de pièce en acier doux par le procédé « Metal Inert Gas » .....	58
Etude n°3 : Quantification des particules métalliques dans les EBC de salariés exposés à des composés solubles du béryllium .....	76
Discussion générale .....	100
Conclusions et Perspectives .....	107
Bibliographie .....	108



# Introduction

L'évaluation de l'exposition des salariés en Médecine du Travail comprend la réalisation de prélèvements atmosphériques réglementés par des valeurs limites à ne pas dépasser afin d'éviter la survenue de pathologies. Les concentrations obtenues lors de ces prélèvements ne représentent que l'exposition potentielle dans le sens où elle ne prend pas en compte la réponse métabolique individuelle des salariés. Pour prendre en compte cette susceptibilité, des indicateurs biologiques d'exposition (IBE) sont utilisés lors la surveillance médicale des salariés. Ces IBE, fréquemment dosés dans le sang ou l'urine, ne représentent que le résultat d'épurations successives de différents organes (foie, rein, tractus digestif...). Même si les expositions professionnelles sont multiples et variées, la voie d'absorption principale est le poumon. Il apparaît pertinent d'évaluer la dose interne pulmonaire des toxiques d'origine professionnelle afin de détecter précocement leur impact potentiel. Ces biomarqueurs de dose interne, appelée dose biologique effective [1], tiennent compte des différences individuelles dans l'absorption ou la bioaccumulation du contaminant en question et indiquent son niveau réel dans l'organe et dans les tissus ou compartiments spécifiques [2]. En effet, connaître la dose interne pulmonaire permet de savoir quelle concentration de contaminant peut potentiellement interagir avec l'épithélium respiratoire et ainsi savoir si les capacités d'épuration de l'épithélium seront dépassés (**figure 1**). Cette interaction dépend de la dose totale de contaminant présent dans l'organe cible du contaminant mais aussi de ses caractéristiques physico-chimiques (taille, propriétés surfaciques, charge).

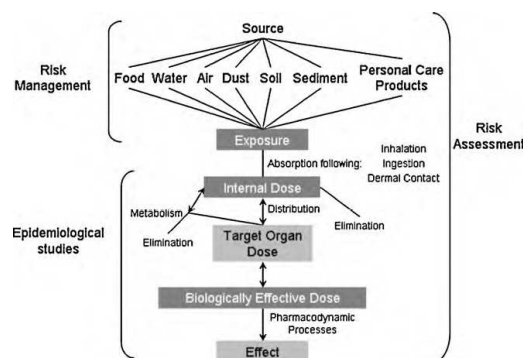


Figure 1 : Le continuum exposition-effet pour les produits chimiques de l'environnement. Tiré de [3]

Cette dose interne ne pouvait être connue qu'après réalisation d'examens invasifs comme le lavage broncho-alvéolaire. Une autre approche peut être envisagée avec l'étude des composants de l'air exhalé.

Le condensat d'air exhalé (EBC) est le liquide obtenu de façon non invasive après refroidissement de l'air expiré d'un sujet au repos. Ce liquide serait constitué de l'aérosolisation du liquide recouvrant l'épithélium respiratoire du compartiment alvéolaire et aussi du compartiment trachéobronchique ou bronchique. Beaucoup d'études se sont intéressées aux marqueurs de l'inflammation dans cette matrice mais très peu aux marqueurs de l'exposition. Notre équipe de recherche a d'ailleurs tout d'abord travaillé sur la standardisation du recueil de l'EBC ainsi que sur le dosage de biomarqueurs de l'inflammation dans l'EBC sur des populations homogènes de patients depuis 2008 [4–7]. Les modèles d'épuration pulmonaire actuels montrent que la cinétique d'épuration des particules déposées dans le parenchyme pulmonaire est variable selon la région considérée (trachéobronchique, bronchiolaire ou alvéolaire) et qu'une proportion non négligeable de ces particules a une épuration lente. Par conséquent, et dans la continuité des travaux sur les marqueurs de l'inflammation, nous émettons l'hypothèse que l'EBC pourrait être une matrice reflétant l'exposition pulmonaire en particules inhalées lors d'une exposition professionnelle.

Cette hypothèse repose sur des éléments bibliographiques permettant de suspecter la présence de particules minérales ou métalliques dans le liquide recouvrant l'épithélium respiratoire relevant d'une part des lois physiques régissant le dépôt des particules sur l'épithélium respiratoire et d'autre part sur les différentes voies d'élimination de ces particules. Ces éléments seront résumés dans la 1<sup>ère</sup> partie de ce document en rappelant les différentes structures anatomiques et histologiques de l'appareil respiratoire et en y ajoutant des données cinétiques.

Pour étayer cette hypothèse, nos travaux avaient pour objectif premier la détection de particules minérales ou métalliques dans l'EBC de salariés exposés et pour objectif second de corrélérer la concentration de ces particules dans l'EBC avec les concentrations atmosphériques de ces particules obtenues pendant leur poste de travail.

Trois études complémentaires ont été menées pour répondre à ces objectifs, la première basée sur une étude clinique, les 2 autres menées en milieu professionnel et de type exposés/non-exposés :

- la première étude concernait un salarié d'une unité de broyage de muscovite atteint d'une pneumopathie de surcharge,

- la deuxième étude concernait un groupe de soudeurs utilisant la technique « metal inert gaz » (MIG) pour assembler des structures métalliques en acier au cours de la production de transports ferroviaires,

- la troisième concernait des salariés exposés à des composés solubles de béryllium dans le secteur de l'aluminerie.

Nos 3 études seront présentées dans la deuxième partie de ce document les unes après les autres en suivant le même plan (méthodologie, résultats et discussion) puis discutées de façon plus générale en fin de manuscrit.

# Première partie

## Dépôt des particules inhalées et mécanismes d'épuration pulmonaire

### 1 Dépôt des particules inhalées dans l'appareil respiratoire

Le poumon est un organe essentiel où ont lieu les échanges gazeux. L'inspiration permet l'apport d'un air riche en dioxygène jusqu'aux alvéoles et l'expiration l'élimination du dioxyde de carbone. A raison d'un volume courant de 0,5 litre et d'une fréquence respiratoire de 12 cycles/minute chez un sujet au repos, 8 000 litres d'air sont donc quotidiennement mobilisés pour répondre aux besoins en oxygène. L'air inspiré contient de nombreuses particules dont la taille et les propriétés physico-chimiques sont différentes selon leur origine. Ces particules sont responsables de pathologies respiratoires comme l'asthme, la BPCO ou les pneumoconioses. Pour lutter contre ces agents pathogènes, l'appareil respiratoire est doté de plusieurs mécanismes de défense permettant l'élimination de ces agents.

Selon le Task Group on Lung Dynamic, l'appareil respiratoire est divisé en 3 compartiments [8] (**figure 2**):

- 1) la **région extra-thoracique** comprenant les cavités nasales et le naso-pharynx jusqu'au larynx où débute la trachée,
- 2) la **région trachéo-bronchique**, de la trachée aux bronchioles terminales,
- 3) la **région alvéolo-interstitielle** ou pulmonaire, lieu de l'hématose.

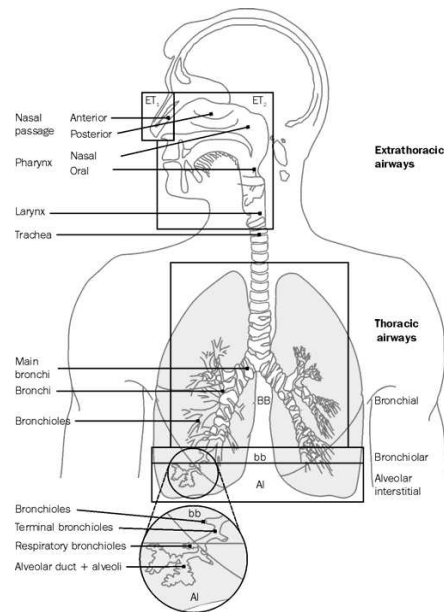


Figure 2 : Illustration des principales régions anatomiques du tractus respiratoire humain (ICRP, 1994). Abréviations: ET1: voies nasales antérieures; ET2: voies nasales postérieures, naso et oropharynx et du larynx; BB: région bronchique, y compris la trachée et les bronches; bb: bronchioles; AI: région alvéolo-interstitielle, composé des bronchioles respiratoires, les conduits et les sacs entourés par les alvéoles. Tiré de la publication 66 de l'International Commission of Radiological Protection [9].

En 1963, Weibel a proposé pour la région trachéo-bronchique et alvéolo-interstitielle, un modèle géométrique d'« arbre » bronchique comprenant une succession de divisions symétriques en « Y » [10]. Dans ce modèle, une génération correspond à la division d'un axe bronchique « mère » en 2 axes « fille » (**figure 3**).

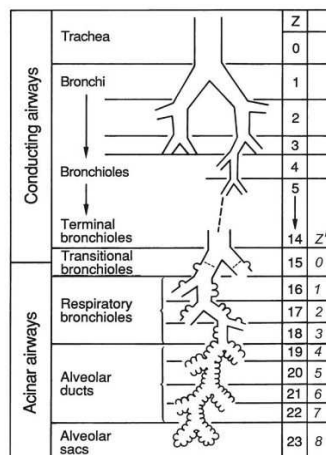


Figure 3 : Modèle des ramifications des voies aériennes du poumon et le numéro de génération correspondant. Tiré de Weibel ER.[11]

A partir du niveau des bronchioles terminales (génération 14), des alvéoles viennent interrompre la paroi des bronchioles permettant ainsi les échanges gazeux d'où le nom de bronchioles respiratoires. Lorsque toute la paroi des bronchioles est constituée d'alvéoles, on parle de conduits alvéolaires qui se poursuivent par les sacs alvéolaires et enfin les alvéoles. On appelle lobule secondaire de Miller une entité anatomique polygonale comprenant 3 à 5 unités respiratoires terminales (ou acini), chaque acinus dépendant d'une bronchiole terminale. Ces structures sont délimitées par un tissu conjonctif de soutien, les septa interlobulaires, permettant le support des veines pulmonaires et des vaisseaux lymphatiques (**figure 4**).

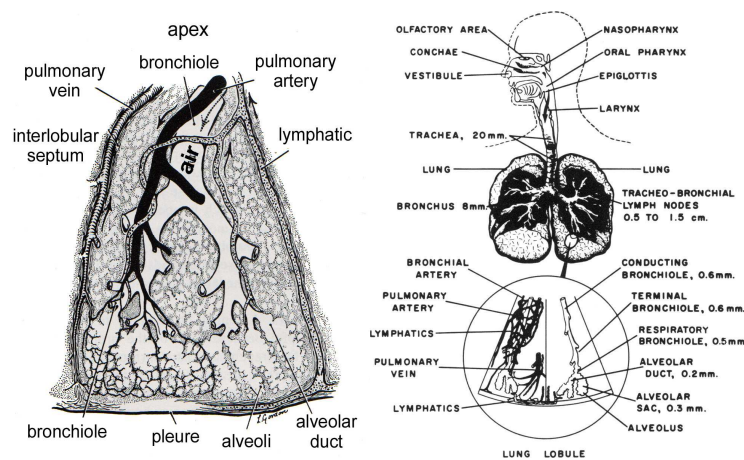


Figure 4 : Schémas représentant le lobule secondaire de Miller. Tiré de [12]

Le modèle de Weibel a ensuite été précisé par Yeh et Shum en 1980 [13]. Le tableau ci-dessous issu de cette publication fournit les caractéristiques géométriques des voies aériennes selon ce modèle (**tableau 1**).

Tableau 1 : Paramètres des voies respiratoires selon le modèle proposé par Yeh et Schum

$n$	$N$	$D$ (cm)	$L$ (cm)	$\theta$ (deg.)	$\varphi$ (deg.)	$S$ (cm <sup>2</sup> )	$V$ (cm <sup>3</sup> )	$\Sigma V$ (cm <sup>3</sup> )
1	1	2.01	10.0	0	0	3.17	31.73	31.73
2	2	1.56	4.36	33	20	3.82	16.67	48.40
3	4	1.13	1.78	34	31	4.01	7.14	55.54
4	8	0.827	0.965	22	43	4.30	4.15	59.69
5	16	0.651	0.995	20	39	5.33	5.30	64.98
6	32	0.574	1.01	18	39	8.28	8.36	73.35
7	64	0.435	0.890	19	40	9.51	8.47	81.81
8	128	0.373	0.962	22	36	13.99	13.46	95.27
9	256	0.322	0.867	28	39	20.85	18.07	113.34
10	512	0.257	0.667	22	45	26.56	17.72	131.06
11	1024	0.198	0.556	33	43	31.53	17.53	148.59
12	2048	0.156	0.446	34	45	39.14	17.46	166.05
13	4096	0.118	0.359	37	45	44.79	16.08	182.13
14	8192	0.092	0.275	39	60	54.46	14.98	197.10
15	16,384	0.073	0.212	39	60	68.57	14.54	211.64
16 <sup>a</sup>	32,768	0.060	0.168	51	60	92.65	15.57	227.21
17	65,536	0.054	0.134	45	60	150.09	20.11	247.32
18	131,072	0.050	0.120	45	60	257.36	30.88	278.20
19	262,144	0.047	0.092	45	60	454.81	41.84	320.04
20	524,288	0.045	0.080	45	60	833.84	66.71	386.75
21	104,8576	0.044	0.070	45	60	1594.39	111.61	498.36
22	209,7152	0.044	0.063	45	60	3188.78	200.89	699.25
23	419,4304	0.043	0.057	45	60	6090.97	347.19	1046.44
24	838,8608	0.043	0.053	45	60	12,181.95	645.64	1692.08
25 <sup>b</sup>	$3 \times 10^8$	0.030	0.025	45	60	-	3871.80	5563.88

$n$  : numéro de la génération;  $N$  : nombre de voies aériennes;  $D$  : diamètre de la section de la voie aérienne;  $L$  : longueur de la voie aérienne;  $\theta$  : angle de la bifurcation;  $\psi$  : angle de gravité à 90° correspondant à un tube horizontal;  $S$  : surface de section;  $V$  : volume;  $\Sigma V$  : volume cumulé ;  $a$  : Bronchioles terminales ;  $b$  : Alvéoles.

Ainsi, l'appareil respiratoire contient environ 300 millions d'alvéoles dont le diamètre est de 300  $\mu\text{m}$  ce qui représente une surface d'échange totale de 140 m<sup>2</sup> environ.

### 1.1. La région extra-thoracique

Les cavités nasales et le naso-pharynx sont recouverts d'un épithélium cylindrique pseudo stratifié cilié riche en cellules caliciformes. Les cellules de cet épithélium sont unies les une aux autres par des jonctions serrées constituant ainsi une barrière physique vis-à-vis de l'environnement extérieur. Cette région participe à l'humidification de l'air inspiré grâce à l'eau contenue dans le mucus. Elle participe également au réchauffement de l'air inspiré grâce aux shunts artério-veineux du chorion profond sous-jacent. Elle est riche en tissu lymphoïde nécessaire à la production d'immunoglobulines A sécrétées (IgA).

Lors d'une inspiration, la présence des cornets nasaux rend l'écoulement de l'air turbulent. Le dépôt des particules inhalées sur l'épithélium nasal se fait principalement par **impaction inertielle** et concerne les particules entre 2 et 20  $\mu\text{m}$ . En effet, l'inertie d'une grande particule aéroportée tend à maintenir sa trajectoire initiale lorsque le flux d'air porteur est dévié brusquement par les fosses nasales. Ainsi, la probabilité de dépôt par impaction inertielle augmente lorsque le diamètre de la particule augmente [12]. Le phénomène de filtration de cette région est plus efficace lors de l'inspiration nasale que lors d'une inspiration exclusivement buccale [14]. Par conséquent, le nombre de particules inhalées dans l'appareil respiratoire endothoracique sera plus grand lors d'un exercice intense nécessitant une respiration par voie buccale. Les particules déposées dans le mucus sont ensuite transportées par le tapis muco-ciliaire ou interagissent avec l'épithélium sous-jacent.

## 1.2. La région trachéobronchique

Les voies aériennes "conductrices" sont comprises entre la trachée (génération « 0 ») et la 15<sup>ème</sup> génération (bronchioles terminales et de transition). Il existe des différences histologiques entre la région bronchique de la génération « 0 » à la 8<sup>ème</sup> génération et la région bronchiolaire de la 9<sup>ème</sup> à la 15<sup>ème</sup> génération. L'épithélium de ces 2 régions est constitué de cellules ciliées, de cellules basales et de cellules caliciformes. Cet épithélium est rendu imperméable grâce à 3 complexes jonctionnels intercellulaires : les jonctions serrées apicales ainsi que les jonctions intermédiaires et les desmosomes latéraux. Il est recouvert d'un liquide contenant le mucus.

L'épithélium de la région bronchique comporte un cartilage de support ainsi que des glandes sécrétrices de mucus. A partir de la région bronchiolaire, les cellules basales se raréfient, il n'existe plus de cartilage ni de glandes sécrétrices et on observe la présence de cellules non-ciliées sécrétantes appelées cellules de Clara. Celles-ci ont de multiples fonctions :

- régénération de l'épithélium bronchique en proliférant après différenciation en cellule ciliée,
- détoxification des xénobiotiques et des gaz oxydants grâce à la production de cytochromes P450,
- protection de l'épithélium respiratoire par la sécrétion du glycoaminoglycane (complexe protéinique entrant dans la composition de l'hypophase), des mucines, des apoprotéines du surfactant (A, B, C et D), des protéases, des peptides antimicrobiens, des cytokines et des chimiokines [15].



Dans la région trachéobronchique, les particules inhalées se déposent principalement par **sédimentation** c'est-à-dire sous la force de la gravité. Ce phénomène survient lorsque la force gravitationnelle dépasse la résistance de l'air induite par une particule en déplacement dans l'air et concerne les particules de plus de 0,5  $\mu\text{m}$ . Dans ce contexte, la probabilité de dépôt par sédimentation augmente avec la taille de la particule et lorsque le débit de l'air dans la voie aérienne diminue. Le dépôt des particules inhalées se fait également dans une moindre mesure par impaction inertielle. La probabilité de dépôt par impaction augmente avec la taille de la particule mais aussi avec le débit aérien.

### 1.3. La région alvéolo-interstitielle

Les bronchioles respiratoires apparaissent à la 16<sup>ème</sup> génération de l'arbre bronchique. La grande majorité de la surface alvéolaire (98%) est tapissée par les pneumocytes de type I (EP1), la surface restante est occupée par les pneumocytes de type II (EP2).

Les EP1 sont de grandes cellules dont la faible épaisseur cytoplasmique (50 à 100 nm) facilite les échanges gazeux avec les capillaires alvéolaires. Elles joueraient également un rôle dans le transport des ions et dans la réparation des lésions pulmonaires.

Les EP2 sont de plus petites cellules cubiques dont le cytoplasme est riche et contient un réticulum endoplasmique, un appareil de Golgi, des granules et des corps lamellaires. Ces structures servent à sécréter les différents constituants complexes du surfactant : le film de phospholipide ainsi que les protéines du surfactant. Les EP2 participent également au transport des ions, à la réponse immunitaire, et fonctionnent comme des cellules progénitrices en réponse à des lésions pulmonaires [16] (**figure 5** et **figure 6**).

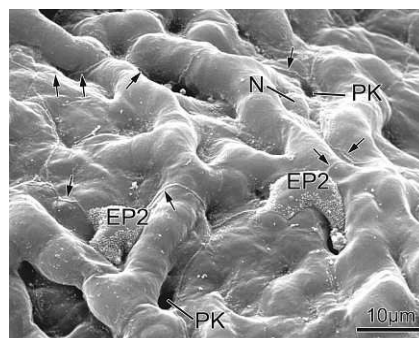


Figure 5 : Surface de la paroi alvéolaire dans le poumon humain vu par microscopie électronique à balayage révélant l'épithélium alvéolaire en mosaïque constitué d'EP1 et d'EP2. Les flèches indiquent la limite du feuillet cytoplasmique de la cellule EP1, qui s'étend sur de nombreux capillaires. On observe également 2 pores de Kohn (PK). N = noyau de la cellule EP1. Tirées de [11]

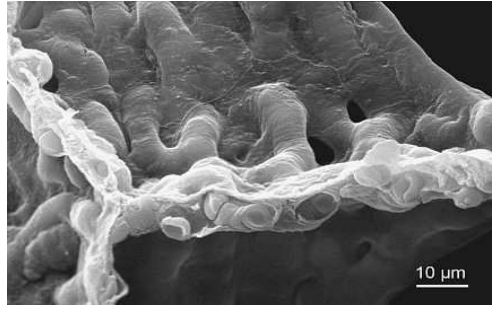


Figure 6 : Photographie au microscope électronique à balayage de la paroi alvéolaire montrant les capillaires pulmonaires avec leurs érythrocytes, séparés de l'air par une barrière de tissu très mince (EP1). Tiré de [11]

Le principal mécanisme de dépôt des particules inhalées dans le compartiment alvéolaire est la **diffusion**. Ce phénomène est provoqué par les mouvements browniens et concerne surtout les petites particules ( $<0,5 \mu\text{m}$ ) en raison de leur collision avec les molécules de l'air. Le dépôt par diffusion augmente avec la diminution de la taille des particules et la diminution de la vitesse d'écoulement de l'air dans les voies aériennes. Le dépôt par diffusion se produit principalement dans la région alvéolaire en raison de l'allongement du temps de séjour de la particule et de la faible longueur des voies aériennes. Les particules peuvent aussi se déposer par sédimentation en raison de la diminution du débit de l'air dans ces voies aériennes.

Les principaux mécanismes de dépôt des particules peuvent être résumés de la façon suivante (**tableau 2** et **figure 7**) :

Tableau 2 : Résumé des principaux mécanismes responsables du dépôt des particules dans le tractus respiratoire.

Mécanisme	Région concernée	Taille des particules
Impaction inertielle	extra-thoracique et bronchique	2 à 20 $\mu\text{m}$
Sédimentation	bronchiolaire et alvéolaire	$> 0,5 \mu\text{m}$
Diffusion	alvéolaire	$< 0,5 \mu\text{m}$

D'autres mécanismes de dépôt plus mineurs sont possibles. Il s'agit du dépôt électrostatique (ancrage des particules sur une surface par attraction électrostatique) ou de la collision (concerne surtout les particules fibreuses dont la forme est la cause de l'ancrage avec la surface de destination).

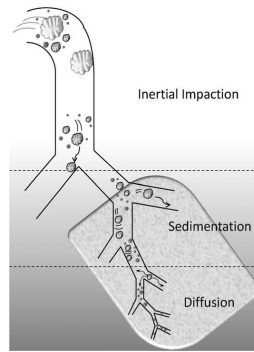


Figure 7 : Schéma représentant les dépôts de particules dans les poumons selon différents mécanismes liés à la taille des particules: impaction inertielle, la sédimentation et la diffusion. Tiré de [17].

Plusieurs équipes de recherche tentent de modéliser la fraction des particules inhalées qui se déposent dans les différentes régions de l'appareil respiratoire en fonction de la taille des particules, de leur densité ou de leur forme et d'en déduire le dépôt total dans les poumons. En voici l'un d'entre eux réalisé par la Commission Internationale de Radioprotection pour des sujets respirant par le nez lors d'un exercice léger (**figure 8**).

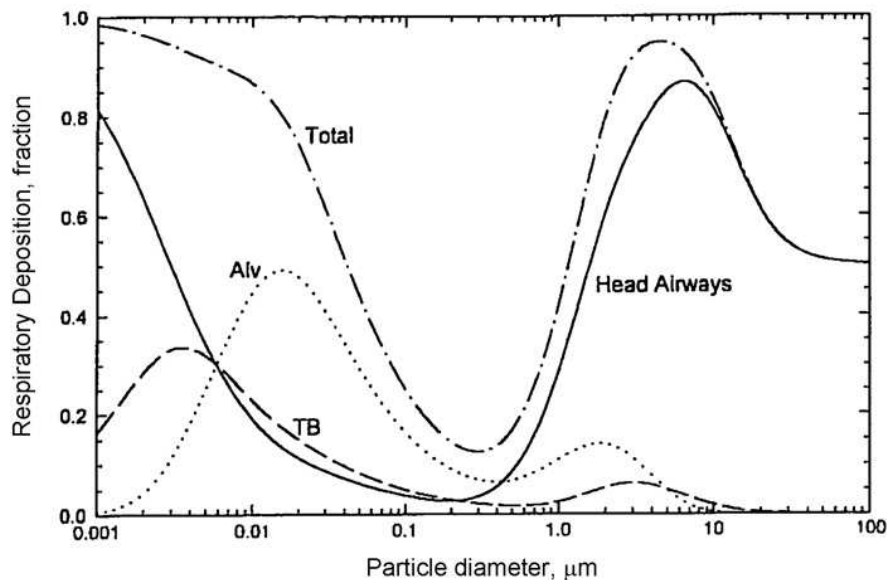


Figure 8 : Dépôt pulmonaire total et régional selon le diamètre des particules inhalées (densité de  $1\text{g/cm}^3$ ) basé sur le modèle de la Commission Internationale de Radioprotection pour des sujets respirant par le nez lors d'un exercice léger. Head Airway : région extra-thoracique ; Alv: région alvéolaire; TB: région trachéobronchique. Tiré de [18].

La fraction totale de dépôt des particules est la plus importante pour les particules dont la taille est comprise entre 1 et 100 nm et 1 et 100  $\mu\text{m}$ . Les particules de l'ordre du nanomètre sont préférentiellement déposées dans les voies aériennes supérieures en raison de la vitesse du flux d'air favorisant l'impaction inertielle mais leur dépôt s'effectue également dans la région alvéolaire. La fraction de dépôt dans la région alvéolaire montre une distribution bimodale avec un pic de fraction de dépôt de 50% pour les particules de 20 nm et un pic de 15% pour les particules de 2  $\mu\text{m}$ . La fraction de dépôt dans la région trachéo-bronchique montre également une distribution bimodale avec un pic de fraction de dépôt de 35% pour les particules de 3 nm et un pic de 5% pour les particules de 3  $\mu\text{m}$ . Dans ce modèle, les particules comprises entre 0,2 et 0,5  $\mu\text{m}$  ont une faible fraction de dépôt car leur taille rend peu probable le dépôt par sédimentation ou par diffusion. Pour les particules dont la taille est supérieure à 1  $\mu\text{m}$  le dépôt s'effectue majoritairement dans la région extrathoracique mais également dans la région alvéolaire et trachéobronchique (synthèse disponible sur la **figure 9**).

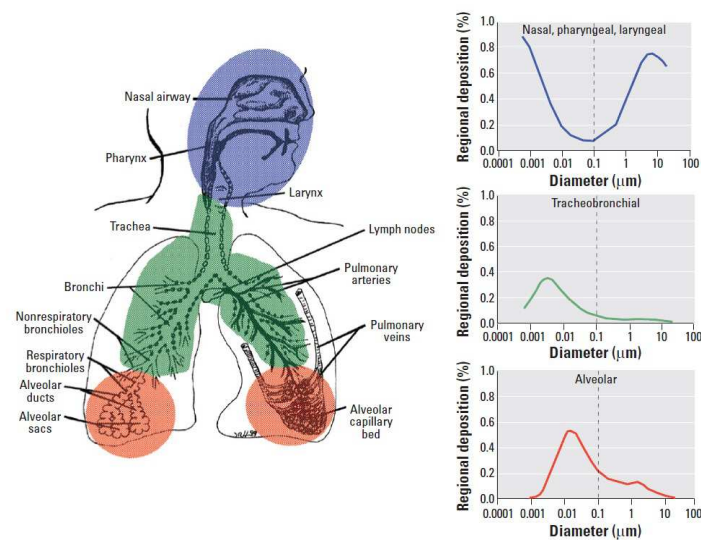


Figure 9 : Fraction de dépôt prédite de particules inhalées dans la région extrathoracique, trachéobronchique et alvéolaire lors d'une respiration par le nez (issues des données de l'ICRP (1994). Tiré de [19]

## 2 Épuration des particules déposées dans le tractus respiratoire

Une fois déposées, les particules seront éliminées du tractus respiratoire grâce à différents systèmes d'excrétion et de métabolisation selon leur localisation. La toux, l'éternuement et la déglutition sont des mécanismes réflexes permettant l'élimination des particules vers l'extérieur du corps ou vers le tractus gastro-intestinal. Pour les particules qui se sont déposées sur le tapis muco-ciliaire, les battements ciliaires de l'épithélium de la région extra-thoracique et trachéobronchique permettent l'élimination de ces particules vers le tractus digestif, c'est la clairance muco-ciliaire. Dans la région alvéolaire, les particules sont principalement phagocytées par les macrophages qui migrent ensuite vers le tapis muco-ciliaire ou vers l'interstitium. Les particules peuvent également atteindre l'hypophase par dissolution puis le compartiment intracytoplasmique des cellules épithéliales par endocytose pour les particules les plus solubles (**figure 10**). Selon sa composition, la particule sera métabolisée en trois étapes par les cellules épithéliales (activation, transformation, élimination). Certaines particules sont capables de traverser l'épithélium par l'espace intercellulaire. Les compartiments finaux de cette épuration sont l'interstitium (sous la membrane basale), la circulation sanguine et le réseau lymphatique.

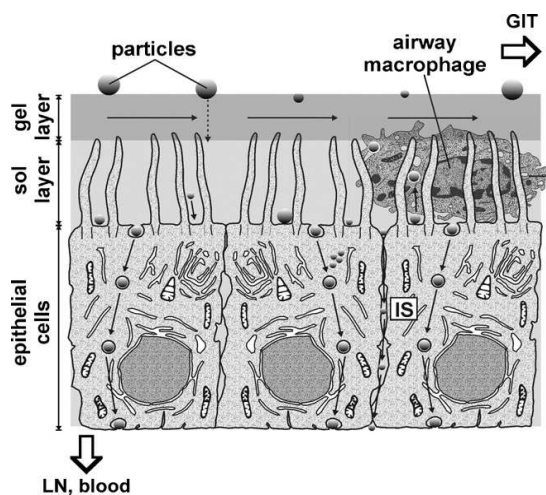


Figure 10 : Scenarii possible pour les particules atteignant le mucus. Les particules déposées sur la couche superficielle du mucus sont rapidement éliminées par le tapis mucociliaire, tandis que les particules capturées dans la phase sol périciliaire sont soumis à d'autres mécanismes de clairance plus lents (par exemple la phagocytose par les macrophages, l'endocytose dans l'épithélium des voies respiratoires). GIT = tractus gastro-intestinal, LN = ganglions lymphatiques, IS = espace intercellulaire. Tiré de [20]

## 2.1. Clairance muco-ciliaire

### 2.1.1. Mucus

Ce film constitue la première défense de l'épithélium vis-à-vis des agents biologiques ou particules inhalées. Il est constitué d'une hypophase aqueuse péri ciliaire (phase sol) dont la hauteur doit être maintenue à 7  $\mu\text{m}$  pour conserver l'efficacité des battements ciliaires, et d'une phase gel superficielle (épaisseur de 0,5 à 5  $\mu\text{m}$ ) ayant une composition protéique et chimique précise [21]. Il existe un continuum entre le liquide recouvrant l'épithélium de la région trachéobronchique et celui du compartiment alvéolaire. Le mucus disparaît progressivement jusqu'au compartiment alvéolaire où seul le surfactant persiste. Dans une zone de transition dont les limites sont mal délimitées, la phase gel du mucus serait discontinue laissant la phase sol à nu [22, 23] (**figure 11**).

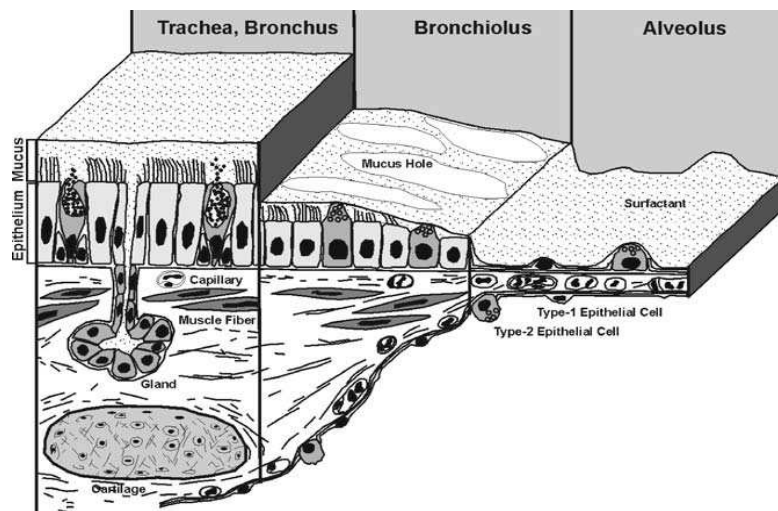


Figure 11 : Coupe schématique histologique de l'épithélium respiratoire dans les compartiments trachéobronchique, bronchiolaire et alvéolaire. Le mucus (phase gel) disparaît progressivement lorsque l'on se rapproche du compartiment alvéolaire laissant à nu la phase sol et le surfactant. Tiré de [24].

Les 2 phases ont probablement la même composition mais dans des proportions différentes. Elles sont composées de 95 à 97% d'eau, de mucines (glycoprotéines), de phospholipides et d'ions. La composition en ions (chlorure de sodium) et en eau est régulée par les transports ioniques transépithéliaux (canaux ioniques transmembranaires). Cette régulation est importante pour maintenir des caractéristiques rhéologiques idéales pour le battement ciliaire.

En effet, la viscosité de la phase sol est moins élevée pour permettre les mouvements des cils par diminution des forces de frottement. Les mucines sont de longues chaînes glycoprotéiques de haut poids moléculaire dont l'hétérogénéité des chaînes de glycanes constitue un éventail de récepteurs pour les bactéries extérieures, les empêchant ainsi d'atteindre l'épithélium respiratoire. D'autres protéines anti-bactériennes sont présentes dans le mucus : IgA, lysozyme, peroxydase, lactoferrine, transferrine, antileucoprotéase. Le mucus a également une activité anti-oxydante grâce aux enzymes qu'il contient : glutathion, catalase, superoxyde dismutase et bêta-défensines.

### 2.1.2. Les cils [25]

Un cil est constitué d'une tige, d'une zone de transition, d'un corpuscule basal et d'une racine. La longueur du cil est de 5 à 7  $\mu\text{m}$  dans la trachée et 2 à 3  $\mu\text{m}$  à la 7<sup>ème</sup> génération. La tige est constituée en périphérie de 9 paires de microtubules (A et B) reliées entre elles par des ponts de nexine. Ces microtubules interagissent avec les 2 microtubules centraux grâce à des ponts radiaires. Les fibres A sont dotées de bras de dynéine externe et interne responsables de l'activité ATPasique (**figure 12**). La tige est entourée d'une membrane plasmique identique à celle de la cellule. La tige interagit avec le cytosquelette sous-jacent grâce à la zone de transition, au corpuscule basal et à la racine.

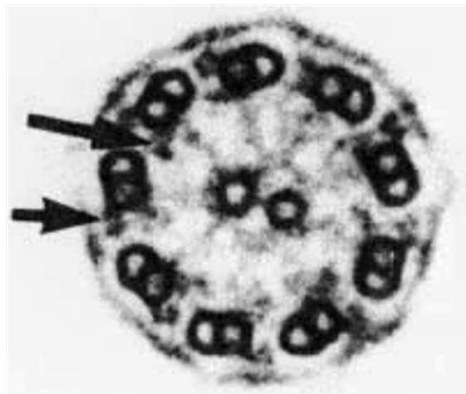


Figure 12 : Coupe transversale d'un cil au niveau de la tige. Les flèches désignent les bras de dynéine interne et externe. Tiré de [26].

L'apex du cil est muni de « griffes » qui s'accrochent à la phase gel du mucus.

Les battements ciliaires (12 à 15 battements par seconde) ont lieu dans l'hypophase et se déroulent en 4 phases [27]:

- phase active : déploiement du cil pour s'ancrer à la phase gel,
- phase de récupération, le cil se replie sur lui-même,
- phase de repos,
- phase active de propulsion du mucus.

Les battements ciliaires se font dans le sens opposé à celui de l'onde métachrone de déplacement du mucus, il s'agit donc de mouvements métachrones antiplectiques (**figure 13**).

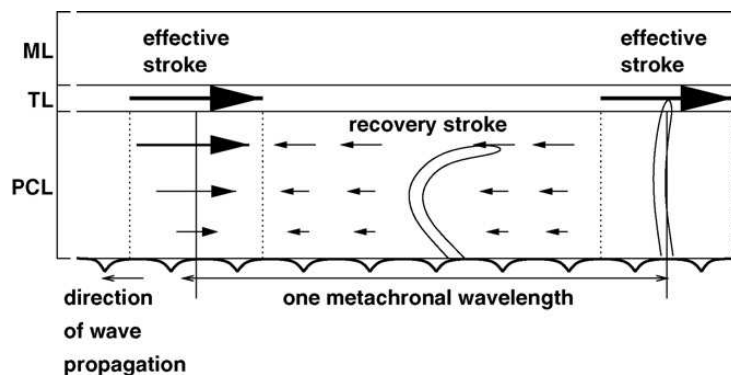


Figure 13 : Mouvements métachrones anti-plectiques du mucus sous l'action des battements ciliaires. Tiré de [28]

Dans la région extrathoracique (fosses nasales), les battements actifs des cils déplacent le film muqueux vers le carrefour aérodigestif à une vitesse moyenne très variable de 0,5 à 24 mm/minute [29]. Dans la région trachéobronchique, cette vitesse est comprise entre 1 et 15 mm/minute [30]. Plus on se rapproche des régions distales des voies aériennes, plus la fréquence de battement diminue et plus la longueur des cils diminue [31].

### 2.1.3. Le surfactant

Dans la région trachéobronchique, le surfactant se situe entre l'hypophase et le mucus. Le mucus et l'hypophase disparaissent progressivement dans les régions distales, il persiste alors une monocouche de surfactant au niveau de la surface de l'épithélium alvéolaire.



Le surfactant pulmonaire est biochimiquement complexe : il est constitué d'environ 90% de lipides et de 10% de protéines. Il est produit par les pneumocytes de type 2, les cellules de Clara mais également certaines cellules des glandes trachéo-bronchiques. Le composant lipidique tensio-actif majeur, la di-palmitoyl-phosphatidyl-choline (DPPC) est associé aux protéines du surfactant (SP) comprenant la SP-A (5,3%), la SP-B (0,7%), la SP-C (0,4%) et la SP-D (0,6%).

La DPPC est le principal composant lipidique permettant la diminution des tensions de surface à l'interface air-alvéole créées du fait de l'inégalité de taille des alvéoles, évitant ainsi le collapsus des alvéoles en fin d'expiration.

Les protéines du surfactant pulmonaire sont impliquées dans deux grands groupes de fonctions : les fonctions tensio-actives et les fonctions de défense (immunité innée). Alors que la SP-B et la SP-C sont principalement impliquées dans la diminution de la tension de surface alvéolaire, la SP-A et la SP-D sont des protéines hydrophiles principalement responsable des fonctions de défense.

Lorsque des particules atteignent la surface du surfactant, elles sont déplacées vers l'hypophase du fait des forces de mouillage. Elles sont alors principalement phagocytées par les macrophages alvéolaires et peuvent interagir avec la SP-A. En diminuant la tension superficielle des alvéoles en fin d'expiration, le surfactant facilite l'élimination des particules et des débris cellulaires vers les voies aériennes plus larges. L'interaction des particules avec la SP-A n'est pas encore bien comprise mais il semblerait que la SP-A et la SP-D puissent interagir avec les macrophages et les leucocytes pour moduler la réaction inflammatoire induite [32].

## 2.2. Phagocytose par le macrophage

Le macrophage (MP) joue un rôle essentiel dans l'élimination des particules inhalées insolubles. Son but principal est de purifier l'espace alvéolaire en phagocytant les particules toxiques pour atteindre ensuite le tapis muco-ciliaire ou l'interstitium puis les lymphatiques. Il peut également jouer le rôle de cellule présentatrice d'antigène ; il a donc un rôle pivot entre l'immunité innée et l'immunité adaptative.

Le MP est issu de la différenciation des monocytes circulants et réside à la surface de l'épithélium respiratoire, dans l'interstitium et dans les régions périvasculaires, péribronchiolaires et de la plèvre viscérale.

La reconnaissance des particules par le MP comme des éléments étrangers au poumon est mieux comprise depuis la découverte des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (pathogen-associated molecular patterns PAMP). Les récepteurs de type Toll (TLR) sont des récepteurs transmembranaires présents à la surface du MP et font partie de la famille des PAMPs. Les TLR 2 et 4 semblent être les deux TLR principaux permettant la reconnaissance des particules. Cette reconnaissance entraîne une activation en chaîne de voies intracellulaires permettant la production de médiateurs de l'inflammation par l'activation de facteurs de transcription comme le facteur nucléaire  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) ou de l'activateur de protéines 1 (AP-1). D'autres récepteurs, présents à la surface du MP, permettent la reconnaissance des particules opsonisées et non-opsonisées. L'opsonisation est un processus qui permet le marquage des particules à l'aide de protéines (opsonines) qui favoriseront la reconnaissance des particules par le MP. Les particules biologiques sont classiquement opsonisées alors que les particules non-biologiques ne le sont pas. Toutefois, ces dernières peuvent être reconnues par les récepteurs d'épuration (scavenger-receptors SR) qui, à l'inverse des TLR, limitent les réactions inflammatoires en inhibant le facteur 6 associé au récepteur du TNF (TRAF6) nécessaire à l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1 (**figure 14**) [33].

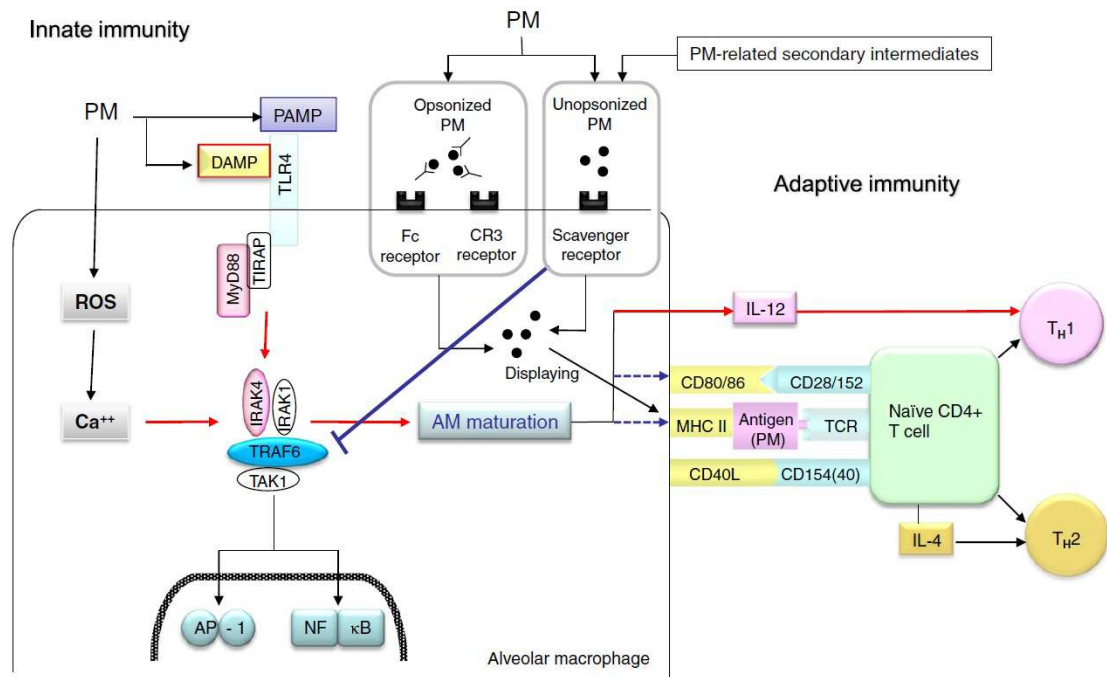


Figure 14 : Interactions entre immunité innée et immunité adaptative en réponse aux particules inhalées.

Les micro-organismes fixés aux particules sont opsonisés par des opsonines spécifiques et sont ensuite endocytés par le MP via la phagocytose « opsonine dépendante » comprenant le récepteur Fc et le récepteur CR3. Les particules non biologiques et les produits intermédiaires peuvent être phagocytés par une reconnaissance « opsonine indépendante » par les récepteurs « scavenger ». Après internalisation, les particules sont traitées et présentées avec le complexe CMH II pour interagir avec les lymphocytes T CD4 + naïfs. La voie Myd88 conduisant à la maturation des MP est activée d'une part par la reconnaissance du TLR4 avec les PAMP/DAMP et d'autre part par une activation supplémentaire par le stress oxydatif. Les voies médiées par les récepteurs « scavenger » régulent négativement la voie de Myd88, responsable de la maturation "non classique", en bloquant la dimérisation et l'ubiquitination de TRAF6.

Les flèches rouges indiquent une activation, les flèches bleues l'inhibition et les flèches bleues en pointillés l'absence d'effet ou effet indéterminé. Abréviations: PAMP : pathogen-associated molecular patterns ; TIRAP : domaine TIR contenant une protéine adaptatrice, IRAK : kinases associées au récepteur de l'interleukine-1; TAK1 : kinase activée par le TGFβ. Tiré de [33].

La reconnaissance de particules par les TLR ou les SR active le MP qui initie alors leur phagocytose : la membrane cellulaire du MP se déforme en pseudopodes qui entourent progressivement les particules pour former les phagosomes intracellulaires. Ces derniers s'unissent aux lysosomes pour former les phagolysosomes. Les lysosomes contiennent des enzymes protéolytiques et des acides (acide hypochloreux) responsables de la digestion des particules. La digestion terminée, les substrats sont ensuite éliminés vers l'extérieur du MP pour atteindre la circulation systémique si leur solubilité le permet, sinon ils subissent à nouveau une phagocytose.

L'activation du MP entraîne une activation du complément permettant le recrutement d'autres MP à partir du secteur vasculaire ou interstitiel et l'activation des MP déjà présents. D'autres phagocytes sont également recrutés comme les polynucléaires neutrophiles.

La demi-vie de rétention des particules dans le compartiment alvéolaire peut être élevée pour une particule insoluble. La clairance des particules médiée par les MP a été évaluée chez le rat

comme étant une décroissance mono-exponentielle avec un taux de clairance d'1% par jour correspondant à une demi-vie de rétention alvéolaire de 70 jours [34]. Chez l'homme, cette demi-vie de rétention alvéolaire a été évaluée à environ 300 jours [35]. Lorsque le phénomène de déposition intra-pulmonaire des particules est équivalent ou inférieur au processus de clairance alvéolaire, on peut prédire que la charge pulmonaire en particules atteint un équilibre dans la région alvéolaire au bout de 5 demi-vies [34]. Lorsque le phénomène de déposition intra-pulmonaire des particules est supérieur au taux de clairance soit par augmentation de l'exposition ou par diminution de l'efficacité des processus de clairance se produit alors le phénomène de surcharge : les particules s'accumulent progressivement dans le compartiment alvéolaire provoquant ainsi une augmentation de leur translocation vers l'interstitium, le sang et les lymphatiques. Le taux de clairance peut être insuffisant par rapport au phénomène de dépôt des particules si le nombre des MP n'est pas assez élevé, ou si leur mobilité est ralentie par le poids des particules qu'ils portent ou lorsque leur réponse chimiotactique diminue ou en raison de la toxicité directe de certaines particules [36]. Grâce aux expérimentations chez le rat, Morrow estime que l'efficacité de clairance des MP alvéolaires diminue lorsque le volume de particules phagocytées est supérieur ou égal à 6% du volume des MP alvéolaires et que les fonctions de clairance des MP sont totalement dépassées lorsque cette proportion atteint 60% [36]. En se basant sur la mesure du volume individuel moyen d'un MP alvéolaire effectuée par Dethloff et Lehnert en 1988 [37] estimé à  $2500 \mu\text{m}^3$  et sur le nombre de MP alvéolaires estimé à 7 milliards, Oberdörster estime que le volume seuil de particules phagocytées à partir duquel on observe un phénomène de surcharge est égal à  $1,11 \mu\text{L/g}$  de poumon. Ce volume correspond à une concentration de particules inhalées de  $0,8 \text{ mg/m}^3$  en considérant une durée d'exposition professionnelle de 8h/jour et 240 jours de travail par an, avec un volume courant de 1,25L, une fréquence respiratoire de 16 cycles/min et un poids pulmonaire de 950 grammes.

Dans un contexte de surcharge ou lorsque les MP n'ont pas encore eu le temps de migrer dans la région où les particules se sont déposées, les particules peuvent interagir avec le mucus ou le surfactant mais aussi avec l'épithélium respiratoire en fonction de leur solubilité.

### **2.3. Mécanismes d'épuration cellulaire**

D'autres mécanismes d'épuration existent au niveau cellulaire afin d'éviter l'accumulation intracellulaire de xénobiotiques. Ils ont été découverts sur des cellules tumorales résistantes aux chimiothérapies d'où leur nom de « Multi Drug Resistance » (MDR) ou « Multi Drug

Resistance-associated protein » (MRP). Cette épuration s'effectue par des pompes d'efflux transmembranaires de nature protéique appartenant à la superfamille des « ATP-binding cassette transporters » (ABC transporters). Des revues font le point sur la localisation de leur expression dans le poumon [38] et sur leurs fonctions [39]. Actuellement une dizaine ont été découvertes et quelques unes d'entre elles participent à l'épuration extracellulaire de composés inorganiques. La P-glycoprotéine (MDR1), la MRP2 et la protéine de résistance du cancer du sein (BCRP) sont situées au pôle apical des cellules épithéliales. MRP1 a préférentiellement une localisation basolatérale (**figure 15**). La P-glycoprotéine et la MRP1 sont également localisés dans la membrane cellulaire des macrophages alvéolaires.

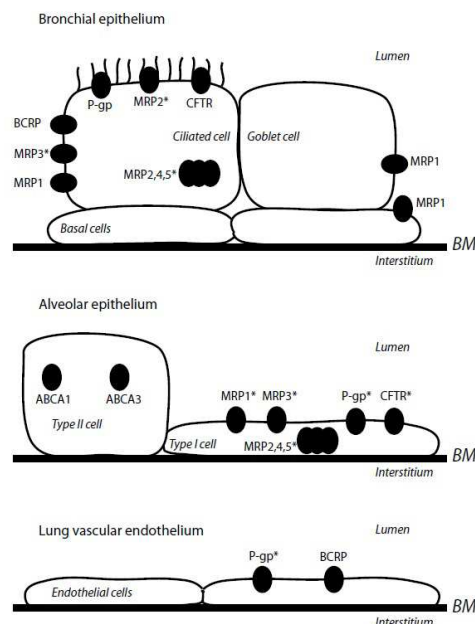


Figure 15 : Expression des transporteurs ABC dans plusieurs cellules du poumon humain. ABC, ATP-binding cassette; BM, membrane basale; BCRP, protéine de résistance du cancer du sein; CFTR, régulateur de la conductance transmembranaire de la mucoviscidose; MRP, multi-drug résistance protéin; la P-gp, la P-glycoprotéine. \* : Des résultats contradictoires existent dans la littérature. Tiré de [40].

Ces protéines sont capables d'excréter des substrats non-conjugués ou conjugués au glutathion. Ces mécanismes évitent ainsi l'accumulation intracellulaire de xénobiotiques ou leur transformation enzymatique en produit plus toxique. L'antimoine et l'arsenic ont été les 2 métalloïdes les plus étudiés comme substrat de la P-glycoprotéine, et des MRP1 et MRP2. Même si des xénobiotiques d'origine professionnelle n'ont pas encore été déterminés comme étant des substrats de ces transporteurs, il est probable que ces mécanismes d'épuration enrichissent l'hypophase ou le surfactant en métalloïdes.

#### **2.4. Particularités des nanoparticules**

Comme décrit plus haut, une partie des nanoparticules atteignent le compartiment alvéolaire. Les nanoparticules (NP) ont une taille comprise entre 1 et 100 nm. Elles peuvent être d'origine environnementale ou industrielle (fabrication intentionnelle). Comme pour les plus grandes particules, les NP peuvent interagir avec l'hypophase, les protéines du surfactant (SP-A) [41] et la membrane des cellules. L'interaction avec les cellules dépend de leur taille, de leur composition chimique et surtout de leurs caractéristiques de surface (y compris leur charge). Le rapport [surface/nombre d'atomes ou molécules totales] augmente de façon exponentielle avec la diminution de la taille des particules. Ainsi, la réactivité de surface est plus importante pour une NP par rapport à une particule de plus grande taille, et ce pour une même masse et même composition chimique [19]. Différentes voies de passage intracellulaire sont possibles : la phagocytose (via les SR [42]), la macropinocytose, l'endocytose médiée par les clathrines, l'endocytose non médiée par les clathrines ou les cavéoles, et l'endocytose médiée par les cavéoles. Un transport passif transmembranaire a également été proposé permettant aux NP d'atteindre plus facilement les mitochondries et le noyau [43].

Les études chez le rat et chez l'homme montrent que les NP sont moins phagocytées par les MP [44] que les grandes particules. Différentes hypothèses sont proposées pour expliquer ce phénomène : les NP inhiberaient les capacités phagocytiques des MP [45] et/ou atteindraient plus rapidement le compartiment interstitiel [46] par translocation ou transport paracellulaire [47]. Pour une très faible proportion, il est possible d'observer une translocation directe des NP vers la circulation systémique [48].

L'interaction des NP avec les structures cellulaires produit des espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou nitrosantes par réactions de type Fenton ou par réactions d'oxydoréduction [49]. En intracellulaire, les NP sont capables d'activer les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1 par l'intermédiaire de la voie des mitogen-activated protein kinase (MAPK) suite à l'activation du récepteur tyrosine-kinase de l'EGFR [50].

Lors d'une exposition complexe comprenant à la fois des particules de l'ordre du micron et des particules de l'ordre du nanomètre, il est important de prendre en considération ces données pour analyser la cinétique de leur épuration.

## **2.5. Passage vers les lymphatiques et la circulation systémique**

La translocation est le phénomène qui permet le transfert des particules déposées dans le poumon vers d'autres tissus du corps. Elle s'effectue principalement par le drainage lymphatique mais aussi directement par absorption dans la circulation systémique.

Les MP ayant phagocyté des particules peuvent rejoindre le compartiment interstitiel et ensuite la circulation lymphatique. Le parenchyme pulmonaire et la plèvre viscérale sont drainés par le plexus lymphatique superficiel situé sous la plèvre viscérale. Les compartiments trachéobronchique et bronchique ainsi que le tissu conjonctif péribronchique sont drainés par le plexus lymphatique profond. Les plexus lymphatiques se rejoignent dans leurs collecteurs lymphatiques efférents pour conduire la lymphe vers les nœuds lymphatiques pulmonaires et bronchopulmonaires situés dans le hile pulmonaire. De là, la lymphe atteint les troncs lymphatiques broncho-médiastinaux pour aboutir dans le confluent jugulo-subclavier.

L'absorption de particules dans la circulation systémique concerne surtout les NP [51] et dépend essentiellement de leur taux de dissolution (solubilité) [52]. Un passage du compartiment interstitiel vers le compartiment alvéolaire serait possible pour les micro et nanoparticules mais son mécanisme n'est pas encore connu [53].

## **2.6. Cinétique de la clairance pulmonaire**

La clairance pulmonaire est l'élimination de substances inhalées de l'appareil respiratoire par le transport des particules et par l'absorption dans les liquides biologiques. Elle peut être chimique ou mécanique.

La clairance chimique, essentiellement effectuée par le MP, peut avoir lieu dans le mucus ou le liquide interstitiel. Elle représente l'ensemble des processus chimiques ou enzymatiques permettant de rendre un composé plus soluble pour favoriser son passage dans la circulation systémique. Son efficacité varie selon la taille, la densité, la surface et la composition chimique du composé à dissoudre. Plus le composé est petit et soluble, plus rapide sera sa dissolution [54].

La clairance mécanique correspond au transport des particules grâce au tapis muco-ciliaire. La structure, le nombre, le mouvement et la coordination des cils présents dans les voies respiratoires ainsi que la quantité, la composition et les propriétés rhéologiques de la couche périciliaire du mucus sont des déterminants de la clairance muco-ciliaire. Les facteurs physiologiques tels que l'âge, le sexe, la posture, le sommeil et l'exercice influencent la

clairance du fait d'une modification des cils, du mucus ou de la couche périciliaire, ou une combinaison de ceux-ci. Certains polluants sont connus pour avoir un effet néfaste sur la clairance (fumée de tabac, dioxyde de soufre, acide sulfurique, dioxyde d'azote, ozone). Certaines maladies affectent la clairance comme l'asthme, la dilatation des bronches, la bronchite chronique, la mucoviscidose et certaines infections aiguës des voies respiratoires [25].

Il est possible d'étudier la cinétique de la clairance pulmonaire totale (chimique et mécanique) à l'aide de particules ou de protéines radio-marquées dont on maîtrise la taille, la forme et la charge. Pour minimiser les erreurs d'interprétation, il est nécessaire que le radionucléide utilisé soit fermement ancré sur la particule que l'on souhaite tracer. De plus, la particule doit être insoluble pour limiter son passage vers le compartiment intracytoplasmique de l'épithélium respiratoire.

La Commission Internationale de Radioprotection (ICRP) a réuni en 1994 les données expérimentales de l'étude de la clairance de l'appareil respiratoire réalisées chez l'animal et chez l'homme dans un modèle nommé « Human Respiratory Tract Model », que l'on désignera HRTM dans le reste du manuscrit. Ce modèle divise le tractus respiratoire en différents compartiments ayant un temps propre de rétention des particules au sein d'une région anatomique (**figure 16**).

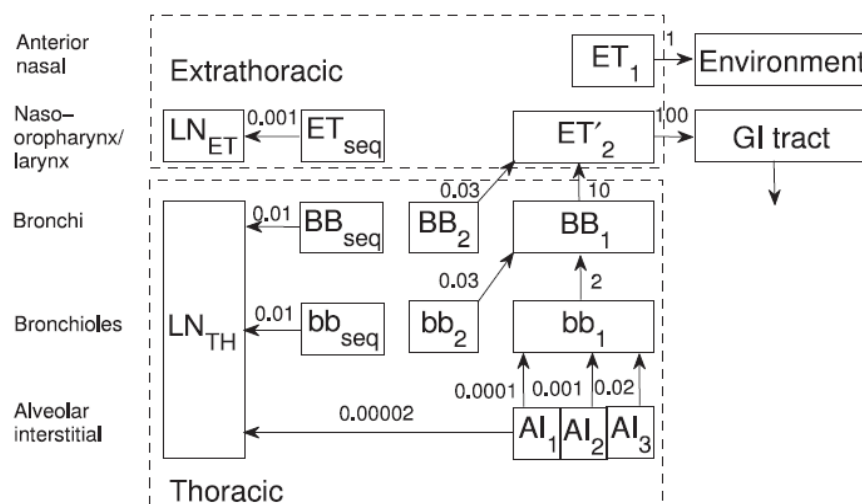


Figure 16 : Modèle du tractus respiratoire humain selon l'ICRP (1994). Tiré de [9]



Les caractéristiques cinétiques des différents compartiments sont décrites ci-dessous :

GI tract : tractus gastro-intestinal

ET<sub>1</sub> : région extra-thoracique (nasale antérieure)

ET<sub>2</sub> : ET'<sub>2</sub> + ET<sub>seq</sub>

ET'<sub>2</sub> : région comportant les fosses nasales postérieures, le larynx, le pharynx et la cavité buccale. Les particules qui se déposent dans cette région ont une faible durée de séjour avec une demi-vie ( $t_{1/2}$ ) de 10 minutes.

ET<sub>seq</sub> : compartiment où une faible proportion des particules déposées dans la région ET<sub>2</sub> (0.0005) a une longue durée de séjour avec une  $t_{1/2}$  de 700 jours.

LN<sub>ET</sub> : vaisseaux et ganglions lymphatiques drainant la région extra-thoracique.

BB<sub>1</sub> : compartiment où les particules déposées dans la région comprise entre la trachée et la 8<sup>ème</sup> génération (région bronchique « BB ») ont une courte durée de séjour ( $t_{1/2}$  de 100 minutes).

BB<sub>2</sub> : compartiment où les particules déposées dans la région bronchique ont une durée intermédiaire de séjour ( $t_{1/2}$  de 23 jours).

BB<sub>seq</sub> : compartiment où les particules déposées dans la région bronchique ont une longue durée de séjour ( $t_{1/2}$  de 70 jours). Ceci concerne une faible fraction des particules déposées dans la région bronchique (0.007).

bb<sub>1</sub> : compartiment où les particules déposées dans la région comprise entre la 9<sup>ème</sup> et la 15<sup>ème</sup> génération (région bronchiolaire « bb ») ont une courte durée de séjour grâce à une rapide clairance muco-ciliaire ( $t_{1/2}$  de 8 heures).

bb<sub>2</sub> : compartiment où les particules déposées dans la région bronchiolaire ont une durée intermédiaire de séjour ( $t_{1/2}$  de 23 jours).

bb<sub>seq</sub> : compartiment où les particules déposées dans la région bronchiolaire ont une longue durée de séjour ( $t_{1/2}$  de 70 jours). Ceci concerne une faible fraction des particules déposées dans la région bronchique (0.007).

AI<sub>1</sub> : la région alvéolo-interstitielle (AI) comprends toutes les voies aériennes à partir de la 16<sup>ème</sup> génération (bronchioles respiratoires, conduits alvéolaires, sacs alvéolaires) ainsi que le tissu conjonctif de l'interstitium. Le compartiment AI<sub>1</sub> qui concerne 30% de l'ensemble des particules déposées dans la région AI possède une relative courte durée de rétention avec une  $t_{1/2}$  de 35 jours.

AI<sub>2</sub> : Le compartiment AI<sub>2</sub> qui concerne 60% de l'ensemble des particules déposées dans la région AI possède une longue durée de rétention avec une  $t_{1/2}$  de 700 jours.

AI<sub>3</sub> : Le compartiment AI<sub>1</sub> qui concerne 10% de l'ensemble des particules déposées dans la région AI possède une très longue durée de rétention avec une  $t_{1/2}$  de 7000 jours.

LN<sub>TH</sub> : vaisseaux et ganglions lymphatiques drainant la région thoracique.

Les taux d'épuration en  $j^{-1}$  ainsi que les demi-vies d'épuration correspondantes figurent dans le tableau ci-dessous (**tableau 3**).

Tableau 3 : Taux d'épuration et demi-vie d'épuration des différents compartiments du modèle cinétique du tractus respiratoire selon l'ICRP (*la demi-vie du taux de transport de AI<sub>3</sub> vers LN<sub>TH</sub> n'est pas disponible car ce taux a été choisi comme référence*).

Depuis	Vers	Taux, j <sup>-1</sup>	t <sub>1/2</sub>
AI <sub>1</sub>	bb <sub>1</sub>	0,02	35 j
AI <sub>2</sub>	bb <sub>1</sub>	0,001	700 j
AI <sub>3</sub>	bb <sub>1</sub>	0,0001	7000 j
AI <sub>3</sub>	LN <sub>TH</sub>	0,00002	–
bb <sub>1</sub>	BB <sub>1</sub>	2	8h
bb <sub>2</sub>	BB <sub>1</sub>	0,03	23 j
bb <sub>seq</sub>	LN <sub>TH</sub>	0,01	70 j
BB <sub>1</sub>	ET' <sub>2</sub>	10	100 min
BB <sub>2</sub>	ET' <sub>2</sub>	0,03	23 j
BB <sub>seq</sub>	LN <sub>TH</sub>	0,01	70 j
ET <sub>2</sub>	GI <sub>tract</sub>	100	10 min
ET <sub>seq</sub>	LN <sub>ET</sub>	0,001	700 j
ET <sub>1</sub>	Environnement	1	17 h

Ce modèle est assez complexe mais il fournit 2 informations importantes :

- 1) les particules qui se déposent ont un temps de clairance différent selon la région anatomique concernée,
- 2) le temps de rétention d'une fraction de ces particules peut être de plusieurs années dans le compartiment alvéolo-interstitiel.

Ainsi, la clairance pulmonaire totale est classiquement décrite en 2 phases :

- une première phase rapide correspondant à l'épuration muco-ciliaire de l'épithélium cilié ; il est admis qu'une particule accrochée au tapis muco-ciliaire de la région trachéobronchique est éliminée dans les 24 heures [55].
- une deuxième phase plus lente correspondant à la clairance alvéolaire.

Les données toxicocinétiques du modèle de l'ICRP sont régulièrement affinées par d'autres études et des mises à jour du modèle sont proposées [56].

Sturm s'est intéressé à la modélisation de l'épuration de particules insolubles ( $d_{ac}=1\mu m$ ) de la région bronchique et plus particulièrement à l'épuration lente de cette région [20]. Il base son modèle sur des données expérimentales et histologiques incluant l'absorption des particules présentes dans l'hypophase par les macrophages, l'endocytose des particules par les cellules ciliées et les cellules sécrétantes mais aussi la diffusion des particules ultrafines (de taille moléculaire) à travers les espaces intercellulaires. Son modèle établit des relations cinétiques pour la région bronchique et bronchiolaire entre les compartiments suivants : le tractus gastro-intestinal, le mucus, l'hypophase, les macrophages, l'épithélium respiratoire et un 6<sup>ème</sup> compartiment comprenant le sang et les ganglions lymphatiques. Grâce à ce modèle, il estime que 35% des particules sont déposées dans le mucus (14% pour BB et 21% pour bb) et 65% dans l'hypophase (26% pour BB et 39% pour bb) (**figure 17**). Il retrouve les données du modèle HRTM en confirmant que l'épuration des particules ayant atteint le mucus (C1) est totale dans les 24 heures suivant l'inhalation et précise qu'après 80 heures, l'ensemble des particules ayant atteint l'hypophase (C2) est transféré vers le pool macrophagique (C4), le mucus et l'épithélium respiratoire (C5). La masse des particules commence à augmenter dans les ganglions lymphatiques (C6) à partir du 10<sup>ème</sup> jour et se stabilise au 100<sup>ème</sup>. La masse des particules dans le tractus gastro-intestinal (C3) augmente progressivement suivant l'épuration de ces différents compartiments.

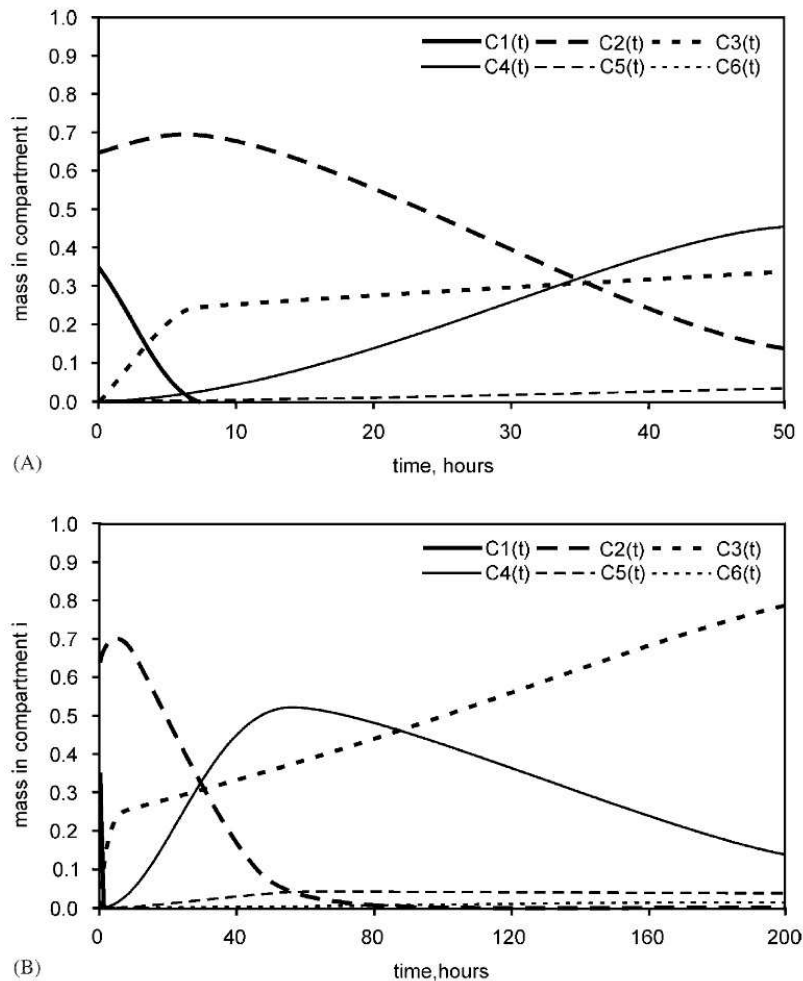


Figure 17 : Evolution de la masse des particules dans les compartiments de la région bronchique selon le modèle d'épuration de Sturm jusque la 50<sup>ème</sup> heure (A) et la 200<sup>ème</sup> heure (B) (les compartiments sont précisés dans le texte ci-dessus) [20]

Sturm montre également que 85% des particules contenues dans le compartiment bronchiolaire sont transférées dans la région bronchique dans les 10 jours, les 15% restants se retrouvant dans les macrophages ou les ganglions lymphatiques. Pour 30% de la masse de particule déposée dans la région bronchique, l'épuration vers le tractus gastro-intestinal se fait dans les 24 heures et la même masse est épurée en 10 jours. Les 40% restants sont épurés par les macrophages et vers les ganglions lymphatiques. Au total, Sturm évalue que 25% de la masse déposée dans les régions bronchique et bronchiolaire est épurée selon une clairance dite rapide (24 heures) et qu'une clairance plus lente prend ensuite le relais (5% par jour environ) ainsi 65% de la masse de particules inhalée est complètement épurée après 10 jours et 100% après 25 jours environ. Une des critiques que l'auteur fait de son modèle est l'absence de prise en compte de l'épuration très lente des particules du compartiment alvéolaire vers le compartiment bronchiolaire.

Falk *et al.* individualisent l'épuration de la région bronchiolaire en phase intermédiaire ; après avoir modélisé la cinétique d'épuration de particule de Teflon® marquées au Cr<sup>51</sup> ( $d_{ac}=6,1\mu m$ ), il estime que 25% des particules déposées dans cette région sont épurées avec une  $t_{1/2}$  d'environ 4 jours [57].

De récentes études montrent que les paramètres du modèle HRTM ne sont pas applicables pour la clairance postérieure à 2000 jours (correspondant à 5 ans et 6 mois). Ainsi, Davis et al. retrouvent une clairance plus lente que celle prédite par l'ICRP sur un suivi de 15 ans de salariés exposés accidentellement à des particules de <sup>60</sup>Co [58]. Cette différence peut s'expliquer par une clairance plus lente du compartiment alvéolo-interstitiel.

En effet, le transfert de particules du compartiment alvéolaire vers le compartiment bronchiolaire modifie de façon non négligeable les données cinétiques de ce compartiment. Ceci est en partie l'objet de l'étude de Kuempel *et al.* basée sur des données obtenues chez l'animal mais aussi grâce aux données histologiques obtenues après autopsie de mineurs de charbon [59]. Dans cette étude, les auteurs s'intéressent à la modélisation de l'épuration de la masse de particules déposées dans la région alvéolo-interstitielle en décomposant celle-ci selon les 3 compartiments suivants : le compartiment alvéolaire ( $M_A$ ), le compartiment interstitiel ( $M_I$ ) et les ganglions lymphatiques hilaires ( $M_{LN}$ ) (**figure 18**).

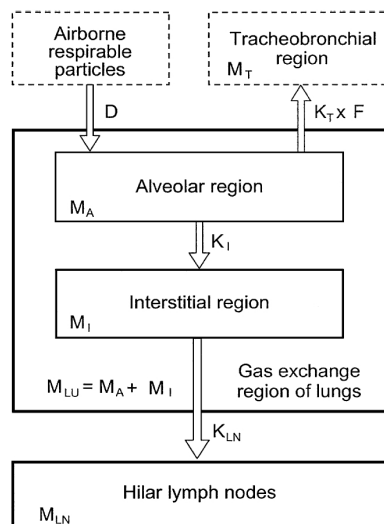


Figure 18 : Modèle à 3 compartiments de la région alvéolo-interstitielle selon Kuempel et al. [59]

Les auteurs basent leur modèle sur les mécanismes physiologiques suivants :

- 1) les particules qui se déposent dans le compartiment alvéolaire sont en premier lieu phagocytées par les macrophages alvéolaires ; ceux-ci transportent les particules jusqu'au tapis muco-ciliaire pour être ensuite éliminées vers le tractus gastro-intestinal ; une proportion de ces particules phagocytées peut rester dans le compartiment alvéolaire en provoquant la lyse des macrophages et une réaction inflammatoire,
- 2) les particules ayant échappé à la clairance macrophagique peuvent quitter le compartiment alvéolaire pour se loger dans le compartiment interstitiel où elles subiront une clairance très lente vers les vaisseaux et les ganglions lymphatiques par immersion dans les cellules endothéliales lymphatiques ou à l'aide des macrophages alvéolaires ou interstitiels,
- 3) les phénomènes de surcharge impliquent un passage plus important des particules vers le compartiment interstitiel (pris en compte dans le coefficient de clairance du compartiment alvéolaire  $K_I$ ), une saturation et une diminution de l'épuration macrophagique vers la région trachéo-bronchique (prises en compte dans le coefficient de clairance du compartiment alvéolaire  $K_T$ ).

Grâce à ce modèle, les auteurs ont prédit que la charge de particules retenue par les poumons 10 ans après une durée d'exposition moyenne de 36 ans aux particules de charbon était de 13,4 grammes alors que les données issues des autopsie des mineurs retrouvaient une rétention moyenne de 13,8 grammes. Cette masse est 4 fois supérieure à celle que le modèle HRTM prévoit (3,2 grammes), ce qui suggère que l'épuration du compartiment alvéolaire est moins rapide que ce que prévoit le modèle HRTM.

D'autres études suggèrent également que le modèle HRTM sous-estime la rétention pulmonaire de particules insolubles à long-terme. Philipson et al. ont suivi pendant 3 ans la rétention pulmonaire de 10 sujets sains ayant inhalé des particules de Teflon® ( $d_{ae} = 5,3 \mu\text{m}$ ) marquées au  $^{195}\text{Au}$  [60]. Ils montrent que la rétention à 900 jours est égale à environ 65% de celle retrouvée à 7 jours alors que le modèle HRTM prédit une rétention de 30% seulement. Un bulletin d'information technique du NIOSH, reprenant les données d'un suivi de 35 ans de sujets ayant été exposés au dioxyde de plutonium lors de l'incendie d'une usine d'armes nucléaires en 1965 [61], montre également une durée de rétention pulmonaire plus importante que ne le prévoit le modèle HRTM.

Les données de ces 3 dernières études sur la rétention pulmonaire à long terme et le modèle réaliste et simplifié du compartiment alvéolo-interstitiel de Kuempel ont été intégrés dans un nouveau modèle en vu de proposer une mise à jour de la cinétique du compartiment alvéolo-

interstitiel du modèle HRTM (**figure 19**) [35]. Ce nouveau modèle prédit que 40% de la masse des particules insolubles demeure définitivement séquestré dans le compartiment alvéolo-interstitiel ( $AI_2$ ) et sera lentement et uniquement éliminé vers les ganglions lymphatiques (LN). Les 60% restants ( $AI_1$ ) seront épurés avec une  $t_{1/2}$  de 300 jours. Les nouvelles valeurs des paramètres cinétiques des modèles rappelés à la figure 19 sont modifiées comme suit :

- $m_I$  :  $0,001 \text{ j}^{-1}$
- $m_T$  :  $0,0017 \text{ j}^{-1}$
- $m$  :  $0,0027 \text{ j}^{-1}$

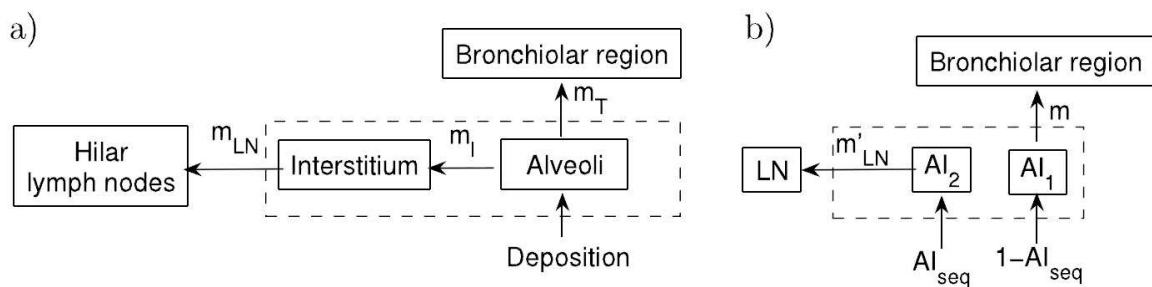


Figure 19 : a) compartiment alvéolo-interstitiel selon Kuempel et al. 2001 ; b) compartiment alvéolo-interstitiel dans le nouveau modèle de Gregoratto et al. 2010.

Ainsi, ces modèles d'épuration nous montrent que la cinétique d'épuration des particules déposées dans le parenchyme pulmonaire est variable selon la région considérée (trachéobronchique, bronchiolaire ou alvéolaire) et qu'une proportion non négligeable de ces particules a une épuration lente dont une partie séjourne plus ou moins longtemps dans le liquide recouvrant l'épithélium respiratoire. Toutefois, il faut souligner que la plupart de ces modèles sont basés sur l'étude de l'épuration de particules peu solubles pour lesquelles la durée d'épuration est plus longue que celle des particules plus solubles. En effet, les particules liposolubles traversent aisément la barrière épithéliale à l'aide de transports passifs, et les particules hydrosolubles traversent facilement l'épithélium respiratoire en passant par les espaces intercellulaires et mais aussi grâce à des transports actifs comme l'endocytose et l'exocytose. Ces particules solubles atteignent donc plus rapidement la circulation sanguine que les particules moins solubles.





Dans le cadre de l'hypothèse de notre travail où l'EBC serait une matrice reflétant l'exposition pulmonaire, plusieurs arguments permettent de suspecter que le liquide recouvrant l'ensemble de l'épithélium respiratoire contient une concentration variable de particules et que cette concentration varie dans le temps selon l'intensité et la durée de l'exposition. En effet, la lenteur de l'épuration du compartiment alvéolaire pouvant atteindre plusieurs années, ainsi que les phénomènes d'épuration cellulaire survenant au pôle apical des cellules épithéliales sont en faveur d'une concentration minimale constante même lors d'une exposition unique. De plus, cette concentration peut augmenter lors des phénomènes de surcharge puisqu'une proportion des particules déposées dans ce liquide échappe ainsi à la clairance macrophagique et qu'une phagocytose en excès peut conduire à la cytolysse des MP libérant ainsi leur contenu dans ce liquide.

L'EBC est le liquide obtenu après refroidissement de l'air exhalé d'un sujet au repos [62, 63]. Les gouttelettes contenues dans ce volume d'air expiré sont issues de l'aérosolisation du liquide recouvrant l'épithélium respiratoire. Dans cette deuxième partie, nous détaillerons les études concernant la formation de l'EBC ainsi que son origine.





## **Modèles expliquant la formation et l'origine de l'EBC**

L'air exhalé contient des composés volatils (dioxyde de carbone, monoxyde d'azote, pentane ...) et des composés non-volatils (vapeur d'eau, gouttelettes d'eau, bioaérosols). Il est possible de recueillir ces composés non-volatils après refroidissement de l'air exhalé. Le liquide ainsi obtenu est appelé condensat d'air exhalé. Différents systèmes de recueil se sont développés depuis les années 90 [63]. Les théories sur l'origine de l'EBC ne sont pas unanimes. Certains auteurs pensent que l'EBC a une origine majoritairement centrale (voies aériennes proximales) et d'autres majoritairement distale (voies aériennes distales). L'EBC ne provient pas de la bouche car les EBC recueillis par les trachéostomies ont des compositions similaires à ceux recueillis par la bouche [64, 65]. Le fait que l'on puisse doser des molécules inflammatoires non volatiles (malondialdéhyde, 8-isoprastane) ou des protéines classiquement retrouvées dans le surfactant (SP-A, SP-D, CC16) dans l'EBC [66, 67] montre que l'EBC provient en partie du liquide recouvrant l'épithélium respiratoire.

Théoriquement, l'évaporation d'un liquide dépend des caractéristiques physico-chimiques de ce liquide (densité, tension superficielle, composition chimique) mais aussi des caractéristiques de l'air dans lequel il s'évapore (hygrométrie, température, pression). Ces règles s'appliquent également lors du recueil de l'EBC. En effet, de plus faibles volumes d'EBC sont obtenus lorsque l'hygrométrie est basse [68] et l'hygrométrie de l'air inspiré est corrélée positivement au diamètre des gouttelettes expirées [69]. De plus, la température ambiante modifie de façon significative le pH de l'EBC qui devient plus bas lorsque la température baisse [70].

Une goutte d'eau peut se former à la surface d'un milieu liquide si un flux d'air est appliqué sur cette surface liquide et que son débit est suffisant pour casser les forces de liaison entre les molécules d'eau de la couche superficielle. Ce phénomène peut se produire dans les régions proximales de l'arbre bronchique où les flux turbulents sont les plus nombreux et sont capables d'arracher des gouttelettes d'eau du liquide recouvrant l'épithélium respiratoire. Ainsi, Bondesson et al. ont retrouvé presque 4 fois plus de particules de technétium radiomarquées dans l'EBC lorsqu'elles avaient un pattern de dépôt central [71]. Cependant, d'autres auteurs pensent que l'EBC a une origine plus distale et que l'aérosolisation du liquide survient majoritairement lors de l'inspiration. En effet, ces auteurs ont mesuré le nombre de

gouttelettes dans l'air exhalé de sujets appliquant différents patterns de respiration. Ils ont ainsi montré qu'une profonde expiration et une rapide inspiration augmentait le nombre de gouttelettes dans l'air exhalé alors qu'une rapide expiration n'avait pas d'effet. Ces auteurs proposent ainsi que l'EBC provient de la rupture, à l'inspiration, des bulles constituées pendant la fermeture des voies distales à l'expiration précédente. Ce modèle a été nommé le « bronchial fluid film burst », littéralement « éclatement du film liquide bronchique » (figure 20) [72].

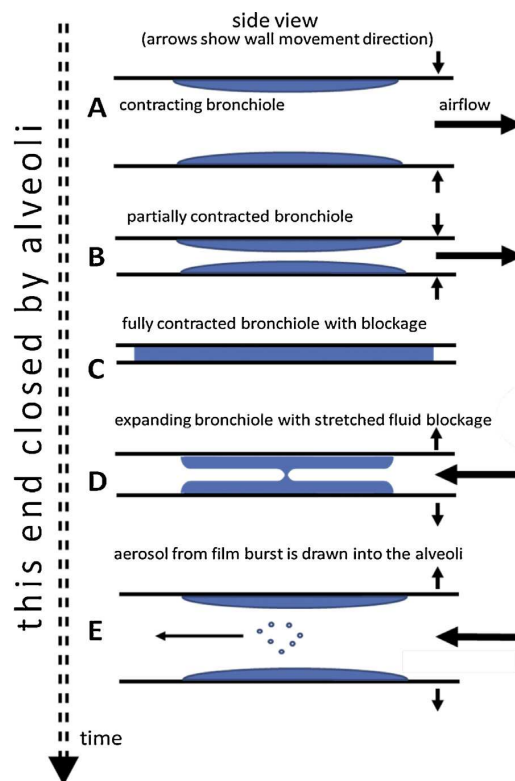


Figure 20 : Le « bronchial fluid film burst », modèle proposé pour expliquer l'origine distale de l'EBC. Tiré de [63]

Actuellement, il est raisonnable de penser que l'EBC est issu de ces 2 phénomènes sans qu'il soit possible de déterminer la part centrale de la part distale [73]. La taille des gouttelettes serait en moyenne de  $0,3 \mu\text{m}$  [74] mais peut atteindre plus d' $1 \mu\text{m}$  [75].

La dilution de l'EBC par la vapeur d'eau (molécules d'eau en suspension ne pouvant transporter aucune particule ni protéine) est importante quelle que soit son origine. Effros et al. estiment que la dilution varie approximativement entre 50 000 et 1 000:1, ce qui signifie qu'un sujet sain peut expirer de 0,02 à  $1,0 \mu\text{L}$  de liquide recouvrant l'épithélium respiratoire dans chaque millilitre d'EBC [76].

L'EBC peut être recueilli à l'aide de différents condenseurs (systèmes de refroidissement) comme le R-Tube (manchon préalablement réfrigéré entourant un tube en polypropylène), le TURBO-DECCS (condenseur électrique refroidissant un tube de polypropylène à -4°C) et l'Ecoscreen (condenseur électrique refroidissant une lamelle en téflon à -20°C). La comparaison de ces 3 appareils a montré un volume de recueil plus élevé pour l'Ecoscreen que pour le TURBO-DECCS et le R-Tube (volume médian recueilli: 2,8 ; 1,6 ; 1,5 mL respectivement). Cette étude a également souligné une meilleure portabilité pour le R-Tube et un bon compromis volume recueilli/portabilité pour le TURBO-DECCS [77].

Compte-tenu de son caractère non-invasif, l'EBC a rapidement intéressé les chercheurs pour étudier les biomarqueurs de l'inflammation, du stress oxydant et nitrosant survenant précocement au cours des pathologies pulmonaires, ce d'autant que la méthode de recueil de l'EBC ne modifie pas la composition du liquide recouvrant l'épithélium respiratoire (en comparaison avec le lavage broncho-alvéolaire et l'expectoration induite). Les publications concernant ces biomarqueurs n'ont donc cessé de croître depuis les années 90. L'intérêt d'utiliser l'EBC comme une matrice reflétant l'imprégnation pulmonaire en toxiques qu'ils soient d'origine professionnelle ou environnementale, est apparu plus tardivement. La première étude concernant cette utilisation a été publiée en 2004 et concernait des travailleurs exposés au cobalt et au tungstène [78]. Une première synthèse sur des données concernant quelques métaux a été publiée en 2006 [79] et depuis, à peine une cinquantaine d'articles concernant l'utilisation de l'EBC pour évaluer le parenchyme pulmonaire de salariés exposés a été publiée dont la plupart étudient les biomarqueurs de l'inflammation ou du stress oxydant liés à ces expositions [7]. Nous pensons que l'EBC peut fournir des informations pertinentes sur l'exposition pulmonaire suite à une exposition professionnelle. Nous avons donc analysé les EBC de salariés issus de trois secteurs d'activité professionnelle :

- la première étude concerne un salarié d'une unité de broyage de muscovite atteint d'une infiltration pulmonaire diffuse (collaboration avec le Service de Consultation de Pathologie Professionnelle et Environnement de Lille),

- la deuxième est une étude « exposé-non exposé » concernant un groupe de soudeurs utilisant la technique « metal inert gaz » (MIG) pour assembler des structures métalliques en acier au cours de la production de transports ferroviaires (collaboration avec l'Association Santé Travail de l'Arrondissement de Valenciennes - ASTAV),

- la troisième est une étude nationale « exposé-non exposé » de salariés exposés à des composés solubles de béryllium dans le secteur de l'aluminerie (collaboration avec l'Institut National de Recherche et de Sécurité - INRS).

~~~~~

# Deuxième Partie

## **Etude n°1 : Analyse minéralogique d'un EBC recueilli chez un salarié exposé à des poussières fines de mica.**

Nous présentons les résultats du bilan diagnostique initial effectué en 2007 dans le Service de Consultation de Pathologie Professionnelle et Environnement de Lille chez un salarié qui s'est vu découvrir un syndrome interstitiel. Il a bénéficié d'un examen clinique, d'explorations fonctionnelles respiratoires (EFR) avec étude de la diffusion du monoxyde de carbone (DLCO), de la mesure du monoxyde d'azote (NO) exhalé (FeNO), et d'une tomodensitométrie thoracique double source, double énergie (DSCT). Son bilan a été complété par l'analyse du liquide du lavage broncho-alvéolaire, du condensat d'air exhalé par microspectrométrie Raman et de l'analyse minéralogique d'une biopsie pulmonaire. Ce salarié travaillait dans une usine de broyage de mica dans laquelle il a été réalisé des prélèvements atmosphériques afin d'objectiver son exposition.

### **1 Matériels et méthodes de l'étude n°1**

#### *Quantification de l'exposition*

Le service prévention de la CARSAT a réalisé des prélèvements atmosphériques en utilisant des pompes GilAir™ (débit 2L/minute ; Gilian Instrument Corp., West Caldwell, N.J.), des cassettes filtrantes de 37 mm (SKC Inc, Eighty Four, PA), et des filtres correspondants en PVC (37 mm de diamètre avec des pores de 5 µm de diamètre) pour les poussières inhalables et alvéolaires. Chaque échantillon a été pesé 3 fois. Une analyse par diffraction au rayon X a également été réalisée par la CARSAT.

### *Examens paracliniques*

Les explorations fonctionnelles respiratoires comprenaient une spirométrie lente et forcée ainsi qu'un transfert du CO en apnée. Les explorations fonctionnelles respiratoires, en particulier, la capacité vitale lente (CVL), le volume expiratoire maximum seconde (VEMS), la capacité pulmonaire totale (CPT), le rapport VEMS/CVL, ont tous été réalisés par un transducteur de débit Lilly-type (Jaeger, Hoechberg, Allemagne) selon les recommandations internationales actuelles [80, 81].

Les concentrations de NO ont été mesurées avec un analyseur de NO par chimioluminescence (NOx 8000, SERES Aix en Provence, France). Les examens ont été réalisés selon les recommandations de l'ATS/ERS [82].

Le salarié a bénéficié d'une tomodensitométrie thoracique double source, double énergie (DSCT) comme décrit précédemment [83]. Le DSCT utilisé en « double énergie » permet l'étude du contenu en minéraux des ganglions lymphatiques médiastinaux ou hilaires.

### *Recueil de l'EBC*

L'EBC a été recueilli grâce au dispositif Ecoscreen (Jaeger, Würzburg, Allemagne) [4]. Le sujet respirait normalement à travers une vanne comportant deux circuits indépendants l'un pour l'inspiration, l'autre pour l'expiration. Ce dispositif est muni d'un piège à salive pour prévenir la contamination salivaire. L'air expiré est isolé et refroidi par le condenseur à -20°C. La ventilation du sujet a été surveillée en utilisant un spiromètre électronique (Ecovent Viasys, Hechberg, Allemagne) fixé au circuit expiratoire. Le sujet respirait calmement dans le dispositif jusqu'à obtenir un volume expiré total de 200 L. Le volume moyen obtenu d'EBC était de 4 mL. Après le recueil, l'EBC a immédiatement été aliquoté et conservé à -80°C. Un aliquot de 0,5 mL a été conservé pour l'analyse en microspectrométrie Raman. Le recueil de l'EBC du salarié a été effectué 48 heures après la fin d'une exposition aux poussières de mica. Un EBC a également été recueilli chez un sujet non exposé aux poussières de mica et non-fumeur (sujet contrôle) chez lequel on ne retrouvait pas d'anomalie clinique ou fonctionnelle. Les oxydes d'azote dans l'EBC (NOx) ont été dosés à l'aide de la méthode Griess.

### *Analyse minéralogique de l'EBC par microspectrométrie Raman*

Dans cette étude, la microspectrométrie Raman a été utilisée pour déterminer la composition minérale des EBC. Des particules recueillies sur les machines du poste de broyage et de tamisage ont été utilisées pour obtenir le spectre de référence des particules de mica. Les aliquots d'EBC ont été décongelés à température ambiante pour l'analyse spectroscopique Raman. L'EBC a été homogénéisé en utilisant un mélangeur vortex. Une petite quantité a été rapidement prélevée avec une pipette de type Pasteur et deux gouttes ont été déposées sur une lame de microscope. La lame porte-objet a été placée dans une boîte de Pétri pendant environ 2 heures pour sécher l'échantillon. L'échantillon a été préparé sous hotte pour éviter une contamination particulière. Cette procédure a été répétée deux fois. Un total de 200 particules a été analysé par microspectrométrie Raman pour chaque EBC (contrôle ou exposé). La spectrométrie Raman a été réalisée en utilisant un microspectromètre confocal Labram (HORIBA Gr, Jobin Yvon, Lille, France). Les spectres Raman ont été obtenus grâce à un laser hélium-néon (632,8 nm). L'impulsion de sortie faisant vibrer les minéraux avait une énergie de 5 mW. L'objectif du microscope  $\times 100$  (NA = 0,80) permettait une taille de spot de 1  $\mu\text{m}$ . La résolution spectrale était de 2  $\text{cm}^{-1}$ . Les acquisitions spectrales ont été réalisées entre 200 et 1100  $\text{cm}^{-1}$  pour prendre en compte les bandes d'intérêt. Chaque spectre a été enregistré avec un temps d'acquisition de  $2 \times 15$  secondes. Les données ont été traitées à l'aide du logiciel LabSpec (HORIBA Gr, Jobin Yvon, Lille, France). La fluorescence de fond a été soustraite des calculs de base et une filtration polynômiale a été réalisée. Le spectre de référence du mica a été calculé comme la moyenne des dix lectures spectrales.

## **2 Description de l'exposition de l'étude n°1**

Le mica est un silicate complexe d'aluminium et de potassium (type muscovite) ou de magnésium, potassium et fer (type biotite) dont l'usage commercial s'effectue principalement sous deux formes, en feuilles ou en poudre. L'usage manufacturé du mica en poudre dépend de la granulométrie sélectionnée pour une qualité industrielle ou cosmétique. Les applications industrielles du mica sont nombreuses dans la production de pneumatiques, de la peinture, des matières plastiques ou du caoutchouc. La production mondiale de mica, toutes variétés confondues, est de l'ordre de 330 000 tonnes. L'Europe représente près de 7,5% de la production avec une forte représentation de la France [84]. Une augmentation de production est à prévoir en raison de la croissance du marché dans la construction automobile et des peintures, matières plastiques et composites.

Les entreprises effectuant l'exploitation et la transformation du mica sont peu nombreuses en France. La muscovite est la variété la plus fréquente. Après extraction, celle-ci est micronisée afin d'obtenir du minerai en poudre. Cette étape de pulvérisation s'effectue dans des unités de broyage.

#### *Description de l'entreprise*

Caractérisée par l'exclusivité en France de la production de poudre de mica broyé à l'eau, l'entreprise ayant exposé ce salarié, fabrique deux types de poudre l'un à usage industrielle et l'autre à usage cosmétique. La poudre de mica à fine granulométrie est principalement réservée à l'industrie cosmétique. Le procédé de fabrication est un délaminage « wet ground », technique appréciée commercialement pour le respect du lustre naturel du mica et son aspect pailleté. L'opération s'effectue lentement par friction plus exactement que par broyage, en milieu humide. Les particules sont ensuite sélectionnées par granulométrie après sédimentation, centrifugation et séchage. La poudre de mica est ensuite conditionnée en sac de tailles variables (de 25 à 700kg).

#### *Procédé de fabrication*

Le mica, issu de différents pays (Brésil, Maroc, Inde et Chine) est stocké dans la zone de réception et conditionné dans des sacs. Il est ensuite chargé dans un chariot élévateur et déversé dans les broyeurs en fonctionnement. Après avoir broyé le minerai à sec, les broyeurs à meules sont inondés permettant de poursuivre l'opération en milieu humide. L'opération nécessite 6 à 8 heures selon la qualité initiale du produit. Le contenu des broyeurs est ensuite vidangé dans deux malaxeurs permettant d'homogénéiser le produit.

Les malaxeurs sont ensuite vidés, le minerai broyé en milieu humide est ensuite essoré mécaniquement par centrifugation. Le minerai apparaît alors sous forme pâteuse, et tombe dans une vis sans fin pour être acheminé vers un séchoir rotatif situé au centre de l'atelier pour la phase de séchage.

La granulométrie de la poudre est ensuite triée par tamisage via un ensemble de cribles vibrants. La granulométrie la plus fine est obtenue par dépoussiérage des différents tamis grâce à des manchons.



Le produit fini est ensuite conditionné dans des sacs en papier de 25 kg grâce à une ensacheuse verticale à commande mécanique. Ces sacs sont ensuite stockés dans la zone d'expédition sur des palettes d'une tonne, soit quarante sacs.

Il n'existe pas de moyen de prévention collective permettant de limiter l'exposition des salariés aux poussières de mica.

#### *Description des postes de travail*

Le chef d'équipe est chargé de vider les sacs de la zone de réception et d'approvisionner les broyeurs en minerai à l'aide d'un chariot élévateur non capoté. Il doit également vérifier le bon fonctionnement des broyeurs, malaxeurs, four et ligne de sélection. L'exposition aux poussières de mica est plus importante lors de l'ouverture des sacs et pendant le chargement des broyeurs.

Le remplissage, la pesée des sacs et la constitution des palettes sont effectués par l'opérateur à l'ensachage. L'opérateur effectue environ 120 sacs sur un poste de 8 heures. Avant expédition, les palettes sont dépoussiérées à l'aide d'une soufflette.

L'opérateur de maintenance est chargé de l'entretien des outils de production. Il intervient sur l'ensemble des équipements de l'entreprise. Son atelier se situe à proximité de l'atelier de broyage.

### 3 Résultats de l'étude n°1

#### *Empoussièrement au sein de l'entreprise*

Des prélèvements atmosphériques ou individuels ont été réalisés à plusieurs reprises par le service de prévention de la CARSAT afin d'objectiver cet empoussièrement. Ils sont effectués au moyen de pompes recueillant l'air atmosphérique pendant une durée de 6 heures. Les résultats de ces prélèvements comprennent la fraction inhalable, concentration des poussières totales pouvant être inhalées, plus ou moins associée à la fraction alvéolaire, concentration des poussières dont le diamètre aérodynamique est inférieur à  $4.25 \pm 1.5 \mu\text{m}$ . Ils sont reportés dans le **tableau 4**. Les Valeurs Limites d'Exposition Professionnelle concernant les poussières reconnues comme n'ayant qu'un effet de surcharge sur les poumons actuellement en vigueur en France sont de  $10 \text{ mg/m}^3$  pour la fraction inhalable et de  $5 \text{ mg/m}^3$  pour la fraction alvéolaire (décret du 7 décembre 1984).

L'analyse en diffractométrie par rayons X réalisée en 2005 par les services de la CARSAT objectivait un mica pur sans présence de quartz ou de cristobalite dans la limite du seuil de détection de 0.7% pour le quartz et de 0.5% pour la cristobalite.

Selon les données de l'entreprise, la granulométrie moyenne de la poudre obtenue après broyage du mica brut est de  $45 \mu\text{m}$ . Dix pourcent des particules ont un diamètre inférieur à  $10 \mu\text{m}$  et 3% un diamètre inférieur à  $5 \mu\text{m}$ .

Tableau 4 : Résultats de l'analyse des prélèvements atmosphériques personnels et d'ambiance réalisée par la CARSAT\*.

| Localisation                        | Poussières Inhalables <sup>a</sup><br>(mg/m <sup>3</sup> ) | Poussières alvéolaires <sup>b</sup><br>(mg/m <sup>3</sup> ) |
|-------------------------------------|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Chef d'équipe                       | <b>36.4 ± 7.8</b>                                          | -                                                           |
| A proximité des broyeurs            | <b>10.6 ± 2.3</b>                                          | -                                                           |
| A proximité du sécheur              | 9.9 ± 2.1                                                  | -                                                           |
| Opérateur d'ensachage               | <b>54.4 ± 11.9</b>                                         | -                                                           |
| Poste d'ensachage                   | <b>49.2 ± 10.6</b>                                         | <b>5.77 ± 0.28</b>                                          |
| Poste de pesée                      | -                                                          | 4.05 ± 0.19                                                 |
| Poste de fermeture des sacs         | -                                                          | 2.65 ± 0.15                                                 |
| A proximité des tamis               | <b>47.6 ± 10.2</b>                                         | -                                                           |
| Sur le passage du chariot élévateur | -                                                          | 1.86 ± 0.09                                                 |
| Dans le secteur de l'ensachage      | <b>27.5 ± 5.9</b>                                          | -                                                           |

\* : les valeurs en gras sont supérieures aux valeurs limites d'exposition professionnelle françaises. Les résultats sont représentés par la moyenne +/- l'écart-type.

a : réalisés en 2007

b : réalisés en 1989 et l'analyse effectuée par diffraction aux rayons X montrait qu'il n'existait pas de quartz ou de cristobalite

### *Présentation du cas clinique*

Le salarié, âgé de 35 ans, était opérateur à l'ensachage depuis 7 ans. Il ne présentait pas d'antécédents médicaux et une radiographie thoracique était normale 3 ans auparavant. Son tabagisme, sevré depuis 7 ans, était inférieur à 10 PA. Il n'a pas eu d'exposition professionnelle auparavant. Cliniquement, il présentait une dyspnée d'effort (stade 1 selon le score de dyspnée MRC) et une toux sèche. L'auscultation pulmonaire retrouvait de fins crépitations aux bases. Les EFR objectivaient un trouble ventilatoire mixte (VEMS/CVL: 68% ; CPT: 71% de la théorique). L'étude du transfert du CO et la mesure du NO exhalé étaient normales. La TDM thoracique montrait des opacités linéaires associant des micronodules de topographie centrale et périphérique associées une hyperdensité des ganglions médiastinaux. L'analyse du liquide lavage broncho-alvéolaire retrouvait une inflammation lymphocytaire modérée (37% de lymphocytes, 8% de polynucléaires neutrophiles, 2% d'éosinophiles). L'analyse du parenchyme pulmonaire au niveau du lobe moyen retrouvait la présence de

granulomes épithélioïdes et gigantocellulaires sans nécrose caséuse dont les cellules géantes contenaient des fines particules allongées biréfringentes en lumière polarisée compatibles avec des particules de mica. L'étude minéralogique de cette biopsie pulmonaire, réalisée au laboratoire d'étude des particules inhalées (LEPI) retrouvait  $69.1 \times 10^7$  particules/gramme de tissu avec une proportion élevée de mica (78%).

#### *Résultat de l'analyse minéralogique de l'EBC par microspectrométrie Raman*

L'observation microscopique de l'EBC du salarié a montré des particules de mica d'une taille variant de 10 à moins d'un micron. Les spectres Raman ont été effectués sur des particules de plus d'un micromètre. L'observation microscopique des particules de mica de référence (prélevées dans l'entreprise) a mis en évidence deux types de particules (blanc et noir), et trois spectres Raman différents ont été identifiés. La **figure 21** montre les trois spectres Raman qui ont été attribués au mica dioctaédrique, la muscovite [DMM,  $K_2Al_4(Si_6Al_2O_{20})(OH, F)_4$ ], le quartz (Qtz,  $SiO_2$ ) et l'orthoclase (Ortho;  $KAlSi_3O_8$ ) [9].

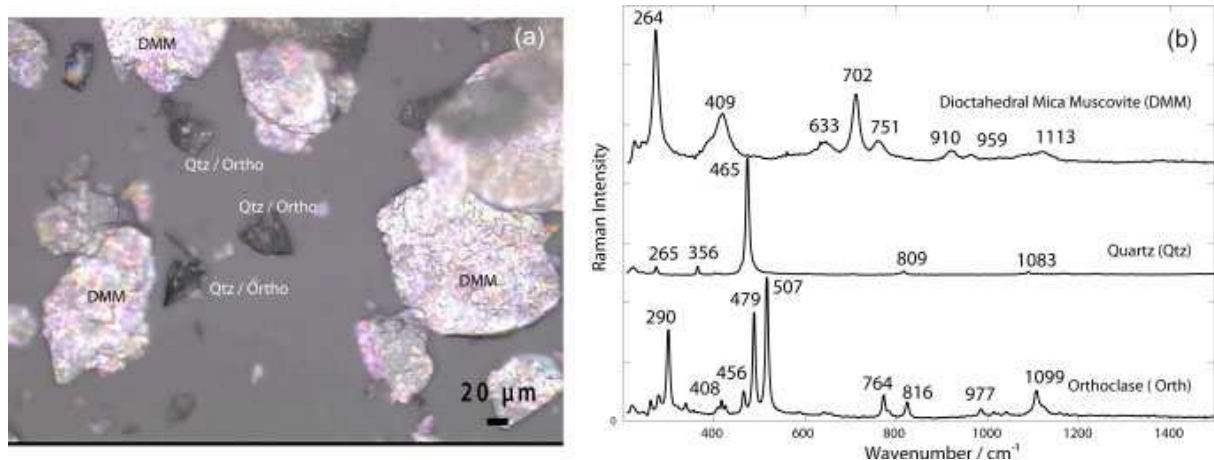


Figure 21 : (a) Observation au microscope des particules de mica recueillies dans les postes de broyage et de tamisage. (b) spectres Raman de référence : muscovite [ $(K_2Al_4(Si_6Al_2O_{20})(OH,F)_4$ ), quartz ( $SiO_2$ ), orthoclase ( $KAlSi_3O_8$ ).

L'analyse Raman de l'EBC du sujet contrôle a révélé la présence des principaux aérosols naturels tels que des particules de calcite et de gypse mais aucune particule de muscovite ou d'orthoclase (**figure 22 a, b, d et e**). Cependant, des spectres Raman de particules de quartz ont été observés. L'analyse de l'EBC du sujet exposé a révélé également la présence des principaux aérosols naturels. La figure 22 f et g montre une très bonne correspondance entre le spectre Raman de référence de muscovite et le spectre Raman de l'EBC du sujet exposé.

L'analyse spectrale comprise entre 300 et 500  $\text{cm}^{-1}$  correspond au signal Raman de la lame du microscope.

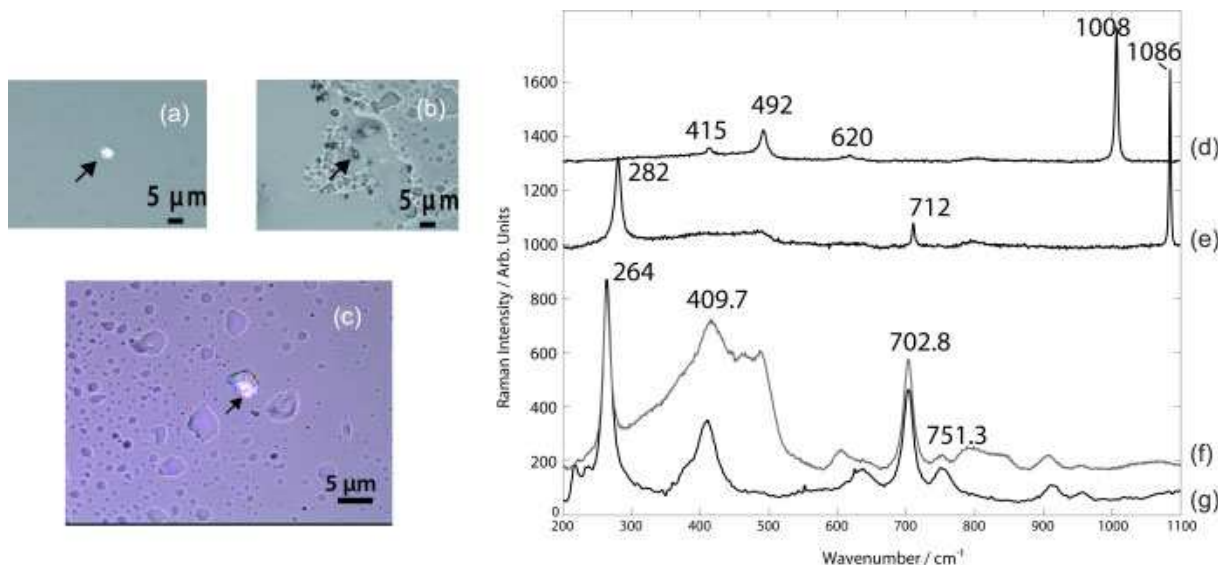


Figure 22 : Observations au microscope des particules présentes dans l'EBC du sujet contrôle : (a) calcite, (b) gypse. Observation au microscope de particule trouvée dans l'EBC du sujet exposé: (c) DMM. Les spectres Raman des particules présentes dans l'EBC du sujet contrôle: (d) gypse, (e) calcite. Comparaison du spectre Raman issu des particules retrouvées dans l'EBC du sujet exposé (f) à celui des particules prélevées dans l'entreprise (g).

La concentration des NOx dans l'EBC du sujet exposé était plus élevée que celle mesurée dans l'EBC du sujet contrôle (26,7  $\mu\text{M}$  vs 15,5  $\mu\text{M}$ ).

### *Suivi médical à 3 ans*

Le salarié a montré une rapide aggravation de son état respiratoire et son état de santé actuel le rend inapte à la reprise de son activité professionnelle. La micatose de ce salarié a été reconnue en maladie professionnelle par le système complémentaire de reconnaissance en maladie professionnelle. L'implication du médecin du travail et des services de prévention ont permis la mise en place d'aménagements de prévention collective et individuelle au sein de l'entreprise. Un aspirateur de type industriel à grande contenance raccordé à un système d'aspiration répartie dans l'ensemble de l'atelier a récemment été installé. Celui-ci permet de limiter le dépôt de poussières sur les surfaces et la remise en suspension des particules dans l'atmosphère de l'entreprise. Les salariés portent actuellement des demi-masques anti-aérosol à cartouche filtrante (Moldex® 8070, P2 R D, CE 0121) pendant l'approvisionnement des broyeurs, l'évidement des sacs et l'ensachage. Des propositions ont été formulées par les services de prévention comme la mise en place d'un capotage des broyeurs, une aspiration à la source de l'ensacheuse mécanique et le port continu des appareils de protection respiratoire.

#### 4 Discussion de l'étude n°1

Dans cette étude, nous avons qualifié des particules minérales dans l'EBC d'un salarié exposé aux poussières de mica et avons montré que ces particules avaient le même profil spectral que celles issues de l'entreprise. De plus, ces particules n'ont pas été retrouvées dans l'EBC d'un sujet non-exposé. Par conséquent, ce travail montre que l'analyse de l'EBC par microspectrométrie Raman peut être utilisée comme outil d'analyse pour identifier des marqueurs d'exposition à des particules minérales.

La microspectrométrie Raman est particulièrement appropriée pour l'analyse des particules d'aérosol et des échantillons biologiques [85]. Les échantillons peuvent être analysés directement sur l'instrument, dans un temps d'acquisition inférieur à la minute et sans préparation préalable. En outre, les spectres Raman peuvent être recueillis avec une résolution spatiale de l'ordre du micromètre. La spectrométrie Raman fournit des spectres d'empreintes, ce qui permet la différenciation d'une large gamme de substances chimiques, tels que des sels inorganiques et des composés organiques. L'efficacité de la spectroscopie Raman comme moyen d'étude des particules de poussière a été démontré dans des études précédentes. Batonneau et al. ont analysé les particules de l'air prélevé dans une fonderie industrielle située dans une zone urbaine. Dans cette étude, comme dans les études précédentes par les mêmes auteurs, la microspectrométrie Raman a montré son efficacité à discriminer à l'échelle micrométrique des particules minérales dont la composition chimique était très hétérogène [86]. Ivleva et al. ont étudié la composition minérale et organique de particules prélevées dans l'air d'une zone rurale [87]. Les deux études ont révélé la présence de calcite ( $\text{CaCO}_3$ ) et de gypse ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) sans mica dans ces prélèvements. En outre, Rinaudo et al. ont montré récemment l'efficacité de la microspectrométrie Raman pour analyser des particules minérales obtenues à partir de coupes histologiques de LBA [88].

La présence de quartz dans l'EBC de contrôle est prévisible, car le quartz est un élément naturel et habituel de l'environnement [89, 90]. Ainsi, le quartz ne peut pas être utilisé ici comme marqueur discriminant de l'exposition au mica. Contrairement à la calcite, au gypse et au quartz, la muscovite n'est pas identifiée en tant qu'aérosol naturel [86, 87]. Ainsi, le dosage de la muscovite dans l'EBC peut être considéré comme un marqueur discriminant de l'exposition à la poussière de mica. Cette analyse montre que le liquide recouvrant l'épithélium respiratoire d'un sujet non-exposé contient des particules de calcite et de gypse

sans particule de mica. Il est donc important de décrire à l'avenir sur un effectif plus important la composition minéralogique des EBC de sujets professionnellement non-exposés afin de cibler les minéraux permettant de discriminer les sujets exposés. Dans une étude portant sur 42 sujets sains non-exposés, le Laboratoire d'Etude des Particules Inhalées (LEPI) a effectué une analyse minéralogique du liquide du lavage broncho-alvéolaire et retrouve une charge minérale endoalvéolaire moyenne de  $4,4 \pm 11 \times 10^5$  particules/ml dont une proportion moyenne de micas de  $11,3 \pm 9,4$  % [91]. Malheureusement, l'analyse minérale du LBA du salarié n'a pu être réalisée.

L'analyse histologique de la biopsie pulmonaire montre la présence de particules biréfringentes au sein des cellules géantes des granulomes. La concentration des particules ainsi que la proportion minéralogique réalisées au sein du LEPI, ont été comparées aux analyses effectuées chez 35 patients sains sans exposition professionnelle. Ces dernières étaient mesurées respectivement à  $9 \pm 8 \times 10^7$  particules/gramme de tissu (moyenne  $\pm$  écart-type) et  $18,7 \pm 10,8$ %. Ces valeurs sont nettement inférieures à celle observées dans le parenchyme pulmonaire du salarié. Par ailleurs, l'analyse histologique ne montre pas de nodule silicotique typique. Par conséquent, la forte proportion de mica présente au sein du parenchyme pulmonaire peut être associée au processus fibrosant. La concentration des NOx dans l'EBC du sujet exposé était plus élevée que celle mesurée dans l'EBC du sujet contrôle ( $26,7 \mu\text{M}$  vs  $15,5 \mu\text{M}$ ). Cette concentration est probablement liée à la pneumopathie de surcharge dont est atteint le sujet exposé.

L'analyse spectrale des particules recueillies sur les machines des postes de broyage et de tamisage a mis en évidence des particules de quartz alors que les analyses de la CARSAT ne retrouvaient pas de quartz (dans la limite du seuil de détection de 0,7%) dans les particules recueillies dans l'atmosphère de l'entreprise. Les particules de quartz retrouvées sur les machines sont probablement issues du dépôt progressif des particules de quartz présentes à une très faible concentration dans l'atmosphère de l'entreprise.

Nous avons réussi à recueillir des particules de mica dans l'EBC alors qu'il a été recueilli 48h après la dernière exposition du salarié aux poussières de mica. Ces particules ont pu être recueillies dans l'EBC car elles n'étaient pas encore prises en charge par les macrophages qu'ils soient alvéolaires ou bronchiques. Compte-tenu de l'intensité de l'exposition du salarié, un phénomène de surcharge est très probablement à l'origine d'une concentration non négligeable de particules dans le liquide recouvrant l'épithélium.

La taille des particules de mica visualisées dans l'EBC du salarié en microscopie était en grande partie inférieure au micron mais des particules plus grandes ont été visualisées (10  $\mu\text{m}$ ). Le diamètre des gouttelettes exhalées est en moyenne de 0,3  $\mu\text{m}$  et peut être supérieur au micromètre lors d'une respiration calme. Ce diamètre est plus grand lorsque le sujet parle (16  $\mu\text{m}$ ) ou lorsqu'il tousse (13,5  $\mu\text{m}$ ) [92]. Les particules les plus grandes ont donc probablement été recueillies du fait de la toux que présentait le salarié.



## **5 Conclusion de l'étude n°1**

Nous avons qualifié des particules minérales dans l'EBC d'un salarié exposé aux poussières de mica et avons montré que ces particules avaient le même profil spectral que celles issues de l'entreprise. De plus, ces particules n'ont pas été retrouvées dans l'EBC d'un sujet non-exposé. Par conséquent, ce travail montre que l'analyse de l'EBC par microspectrométrie Raman peut être utilisée comme outil d'analyse qualitative pour identifier des marqueurs d'exposition à des particules minérales. L'EBC apparaît donc être une matrice reflétant l'exposition pulmonaire professionnelle. La microspectrométrie Raman permet l'analyse chimique des particules fines sans préparation préalable de l'échantillon et dans un délai d'acquisition de l'ordre de la minute. Nous montrons donc pour la première fois qu'il est possible d'obtenir de façon non-invasive et rapide des informations sur le contenu minéral des voies aériennes d'un salarié exposé. Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour valider cette nouvelle approche sur des effectifs plus grands et sur d'autres particules minérales.

# **Etude n°2 : Quantification des particules métalliques dans les EBC de soudeurs exposés à des fumées de soudage issues de l'assemblage de pièce en acier doux par le procédé « Metal Inert Gas »**

## **1 Contexte de l'étude n°2**

Plusieurs centaines de milliers de personnes occupent le poste de soudeur dans le monde. Il existe différents procédés de soudage selon les pièces métalliques à assembler et l'American Welding Society (AWS) a recensé plus de 80 processus différents. Le type le plus commun de procédé de soudage utilisé dans l'industrie est le soudage à l'arc avec protection gazeuse inactive (Metal Inert Gas MIG) [93]. Le procédé MIG peut être utilisé pour joindre deux pièces en acier doux (MIG/MS) ou en acier inoxydable (MIG/SS). Les principaux constituants des fumées de soudage issues du procédé MIG/MS sont le fer (Fe) et le manganèse (Mn) [94]. La concentration de ce dernier y est comprise entre 3,9 et 7,3 % [95].

Le Mn est principalement utilisé dans la production d'acier comme additif, d'une part pour réduire la teneur en dioxygène et en soufre, et d'autre part pour augmenter la rigidité, la dureté et la résistance de l'acier. Le Mn est également utilisé comme agent oxydant du revêtement des électrodes dans les baguettes de soudage.

L'exposition professionnelle chronique au manganèse par inhalation est associée à une augmentation des symptômes respiratoires comme la bronchite, mais aussi à une diminution de paramètres spirométriques [96–98]. Des études récentes ont mis l'accent sur les effets neurologiques précoces qui peuvent se produire à la suite d'une faible exposition professionnelle [99], c'est la raison pour laquelle la Conférence Gouvernementale Américaine des Hygiénistes Industriels (ACGIH) a proposé de réduire la valeur limite d'exposition sur 8 heures pour la fraction alvéolaire de  $0,2 \text{ mg/m}^3$  à  $0,02 \text{ mg/m}^3$ .

Le manganèse est connu pour s'accumuler dans les poumons [100]. L'utilisation du dosage du Mn dans le sang et dans l'urine comme indicateurs de l'exposition est controversée en raison

de la variabilité du métabolisme et de l'excrétion de ce métal [101–104], il est donc important de développer un indice biologique d'exposition plus fiable.

Le but de cette étude exposés/non-exposés était de doser le Mn dans les EBC d'un groupe homogène de soudeurs en même temps que d'autres métaux classiquement étudiés (nickel Ni, fer Fe et chrome Cr), et de corréler les concentrations de ces métaux dans l'EBC avec les concentrations atmosphériques de métaux dans les fumées de soudage issues d'un procédé MIG et les concentrations urinaires de ces métaux.

## **2 Matériels et méthodes de l'étude n°2**

### *Population de l'étude n°2*

Nous avons réalisé une étude transversale exposés/non-exposés à la fin d'une semaine de travail et en fin de poste sur une population de 17 soudeurs et de 16 sujets témoins non exposés. Nous avons choisi une usine dans laquelle les soudeurs ont été exposés au Mn des fumées de soudage générées lors de l'assemblage de structures métalliques pour la fabrication de véhicules ferroviaires. Le recrutement a été réalisé en collaboration avec l'Association Santé Travail de l'Arrondissement de Valenciennes (ASTAV). Le procédé de soudage MIG est utilisé dans l'usine pour assembler les structures de trains en acier doux et les conditions de soudage des postes de travail sont restées inchangées depuis plusieurs années. Au cours de notre étude, les soudeurs travaillaient sur deux lignes de production, que nous avons nommées "A" et "B" ; le processus de soudage ainsi que la composition du métal d'apport et du métal de l'électrode étaient similaires pour les deux lignes de production. Selon les données de l'entreprise, le procédé de soudage utilisait des électrodes métalliques contenant entre 1,4 à 1,62 % de Mn, de 0,005 à 1,55 % de Ni et 0,03 à 0,35 % de Cr. Tous les soudeurs travaillaient dans une salle naturellement ventilée et portaient un équipement de protection respiratoire individuel à adduction d'air (3M Speedglas™ 9100 Series Welding Shields, 3M Company, St. Paul, États-Unis) au cours du processus de soudage. Le recrutement s'est déroulé entre Juin 2011 et Mars 2012. Les critères d'inclusion des soudeurs étaient les suivants :

- ne soudant uniquement des pièces métalliques en acier doux par le procédé de soudage MIG pendant l'étude
- avoir au moins deux ans d'ancienneté à un poste de soudeur dans l'entreprise.

Les critères d'exclusions étaient la présence d'antécédents de maladies respiratoires ou de symptômes respiratoires.

Les sujets témoins non-exposés ont été recrutés dans le secteur tertiaire de la même ou dans d'autres entreprises et n'avait pas d'exposition aux fumées de soudage actuelle ou ancienne. Nous avons exclu tous les contrôles qui travaillaient dans le voisinage de la zone de soudage ou à d'autres points qui pourraient les exposer à des polluants de l'air issus d'un processus de soudage. Le groupe témoin a été recruté après les soudeurs afin d'obtenir des caractéristiques similaires en fonction de leur sexe, leur âge et leur consommation tabagique. Tous les sujets de cette étude étaient de sexe masculin. Cette étude a été réalisée après approbation du Comité d'Hygiène, de Sécurité et des Conditions de Travail. Tous les sujets ont été pleinement

informés sur les objectifs de l'étude, et ont donné préalablement leur consentement libre et éclairé.

### *Design de l'étude n°2*

Tous les sujets ont répondu à un questionnaire comportant deux parties :

- la première partie du questionnaire concernait les antécédents des sujets, en particulier respiratoires, les symptômes respiratoires, le tabagisme et la consommation de tabac. Le questionnaire concernant les symptômes respiratoires était une version du questionnaire MRC (Medical Research Council), modifié par la British Occupational Hygiene Society, traduit en français, et préalablement validé par Marez et al. [105, 106].
- la deuxième partie du questionnaire portait sur le cursus laboris, et plus précisément sur les conditions de travail et sur la durée de soudage effectuée au cours des cinq derniers jours, ainsi que sur le nombre d'années de soudage pendant leur carrière professionnelle.

Nous avons réalisé les mesures suivantes et recueilli les échantillons suivants auprès des soudeurs à la fin de la semaine de travail, après une exposition de 5 jours aux fumées de soudage, dans les locaux du service de santé au travail situés à distance des ateliers de travail :

- une courbe débit-volume
- une mesure du NO exhalé
- un EBC
- un échantillon d'urine.

Les EBC et les échantillons d'urine ont respectivement été stockés à -80°C et à -20°C. Les dosages des métaux ont été réalisés après la fin du recrutement des sujets.

### *Explorations fonctionnelles respiratoires*

Les Explorations fonctionnelles respiratoires ont été réalisées selon les recommandations de l'European Respiratory Society de 2005 [81]. Les paramètres pulmonaires (capacité vitale forcée (CVF), volume expiratoire maximal à la première seconde (VEMS), le rapport VEMS/CVF, débit expiratoire médian compris entre 25 et 75 % de la CVF (DEM<sub>25-75%</sub>)) ont été mesurés grâce à un spiromètre portable KoKo (pulmonaire Data Services, Inc, Louisville, Colo). Les données sont exprimées par le rapport des valeurs observées/théoriques (obs/pred).

### *Mesure du NO exhalé (FeNO)*

Les taux de FeNO ont été mesurés en utilisant un analyseur par chimiluminescence (NOx 8000, SERES Aix en Provence, France). Les mesures ont été réalisées selon les recommandations ATS/ERS de 2005 [107]. Les concentrations de NO ont été mesurées pendant une expiration contrôlée à un débit de 50 mL/s, au premier plateau stable durant au moins 3 secondes (la variation entre 2 mesures devant être inférieure à 10% ou moins de 1 ppb). La concentration moyenne de FeNO de 2 mesures reproductibles a été retenue.

### *Évaluation de l'exposition professionnelle aux métaux*

#### Pour les soudeurs

La fraction inhalable des poussières métalliques a été évaluée 3 fois pour la ligne de production « A » et deux fois pour la ligne de production « B » (A1, A2, A3, B1, B2) grâce à des prélèvements atmosphériques individuels sur des soudeurs pendant la durée totale d'un poste de travail (7 heures). Nous avons utilisé les pompes GilAir™ (débit de 2L/min ; Gilian Instrument Corp., West Caldwell, N.J.) avec des cassettes filtrantes de 37 mm de diamètre (MERCK KGaA, Darmstadt, Allemagne) munies de filtres en microfibres de quartz pour l'échantillonnage des poussières inhalables (diamètre 37 mm et porosité 2,5 µm, papiers Whatman™, Maidstone, Kent, Royaume-Uni). La cassette était placée à l'extérieur de l'appareil de protection respiratoire. Le manganèse (Mn), le nickel (Ni), le fer (Fe) et le chrome (Cr) ont été extraits et analysés selon la méthode de l'Institut National de Recherche et de Sécurité [108]. Brièvement, les filtres ont été extraits avec une solution mixte d'acide fluorhydrique et d'acide nitrique (3 volumes pour 2 volumes, respectivement). Les concentrations de ces éléments ont été déterminées dans les extraits à l'aide d'un spectromètre d'émission atomique par torche à plasma (ICP-AES) (modèle IRIS Intrepid XLD Duo,

Thermo Electron Corporation, Franklin, Massachusetts, USA). Les limites de détection (LOD) / quantification (LOQ) de cette méthode étaient de 0,04 / 0,21  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (Mn), 0,13 / 0,42  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (Ni), 1,7 / 2,1  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (Fe) et 0,08 / 0,83  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (Cr).

Un indice d'exposition cumulée hebdomadaire (CIW) a été calculé pour chaque soudeur en multipliant les heures auto-déclarées consacrées au soudage au cours de la semaine de travail par la concentration des mesures de métaux atmosphériques de chaque poste de travail correspondant. Un indice d'exposition cumulée a également été calculé pour le nombre total d'années de soudage (WY) en multipliant les années de soudage par l'exposition estimée par an (CIW x nombre de semaines de travail par an). Ces deux indices d'exposition ont été calculés pour chaque métal étudié (Mn, Ni, Fe et Cr).

#### Pour le groupe témoin

Il n'a pas été possible d'obtenir des prélèvements atmosphériques individuels pour les sujets non exposés, nous avons donc utilisé les niveaux d'exposition moyens de Mn, Ni, Fe et Cr pour la population générale publiés par la US Environmental Protection Agency (US EPA - 40  $\text{ng}/\text{m}^3$  pour Mn, 30  $\text{ng}/\text{m}^3$  pour Ni et Cr, 1,5  $\text{ng}/\text{m}^3$  pour Fe) [109–112]. Un indice d'exposition hebdomadaire (CIW) a été calculé pour chaque sujet témoin en multipliant les heures auto-déclarées de travaille au cours de la semaine par les concentrations métalliques atmosphériques estimées de l'US EPA. Un indice d'exposition cumulée (WY) a également été calculé en multipliant les années de travail à leur emploi actuel par les concentrations métalliques atmosphériques estimées de l'US EPA pour un an (CIW x nombre de semaines de travail par an).

#### *Recueil de l'EBC*

Les EBC ont été recueillis à l'aide d'un dispositif Ecoscreen (Jaeger™, Würzburg, Allemagne), comme décrit précédemment [4], et selon les dernières recommandations [113]. L'Ecoscreen est un condenseur alimenté sur secteur permettant de refroidir l'air expiré des sujets à l'aide de lamelles en téflon. Le principe de cet appareil a été décrit dans l'étude n°1. Un spiromètre électronique (Ecovent Viasys, Hechberg, Allemagne) raccordé au circuit expiratoire nous a permis de surveiller la ventilation du sujet. Le recueil était terminé lorsque le volume expiré total avait atteint 200 litres. Les volumes d'EBC obtenus n'étaient pas différents entre les deux groupes (médiane [Q1-Q3]) (3,5 mL [3.2 - 3.9] dans le groupe des

soudeurs vs 3,7 mL [3,2 - 4] dans le groupe des témoins,  $p=0,7$ ). Après le recueil, les EBC ont immédiatement été aliquotés et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### *Dosage des métaux dans les EBC*

Les analyses de métaux dans les EBC ont été effectuées grâce à une collaboration avec le laboratoire Ultra Trace Analyse Aquitaine (UT2A) de Pau. Deux millilitres d'EBC ont été utilisés pour déterminer la concentration des métaux dans les EBC. Les analyses ont été réalisées en duplicate. Les concentrations de Mn, Ni, Fe et Cr ont été mesurées par spectrométrie de masse par torche à plasma (ICP-MS) (ICP-MS - X Series II, Thermo Electron Corporation, Cheshire, Winsford, Royaume-Uni) en utilisant la technique d'analyse "total-quant" avec calibration externe. Les rapports masse/charge suivants ( $m/z$ ) 55 (Mn), 60 (Ni), 56 (Fe) et 52 (Cr) ont été suivis par le spectromètre de masse. Les étalons externes étaient préparés à partir de solution étalon multi-éléments (Inorganic Ventures Inc., Lakewood, NJ, USA) couvrant la gamme 0 – 1, 0 – 5, 0 - 20 et 0 - 10  $\mu\text{g/L}$  pour le Mn, Ni, Fe et Cr, respectivement. Les conditions ICP-MS ont été optimisées quotidiennement. L'eau (18M.cm) a été obtenue grâce à un système Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Les mesures ont été effectuées dans des EBC bruts. Les limites de quantifications (LOQ), estimées par 10 fois l'écart-type de la valeur du blanc ( $n=6$ ) était de 0,05  $\mu\text{g/L}$  pour le Mn, 0,2  $\mu\text{g/L}$  pour le Ni, 1  $\mu\text{g/L}$  pour le Fe et 0,5  $\mu\text{g/L}$  pour le Cr totale. L'**absence d'effet matrice** (moins de 15% de différence entre les pentes d'étalonnage obtenues dans l'eau ou l'EBC), la **linéarité** (coefficients de corrélation des courbes d'étalonnage supérieurs à 0,995 sur 3 jours différents), la **répétabilité** (moins de 15% de différence parmi 6 mesures effectuées sur un même échantillon le même jour), la **reproductibilité** (moins de 15% de différence sur les mesures effectuées sur un même échantillon 3 jours différents), la **justesse** (les mesures réalisées en triplicate sur un échantillon avec ajout dosé étaient comprises entre 85 et 115% de la valeur attendue) et la **précision** (différence entre ces triplicates inférieure à 15%) ont toutes été vérifiées.

La contamination métallique du dispositif de collecte a été étudiée en créant une matrice artificielle d'EBC. Pour cela, nous avons introduit de l'air chaud saturé d'eau dans le même condenseur de notre étude. Le débit d'air a été généré par un calibreur (Gas Exchange Calibrator, Medical Graphics UK Limited, Gloucester, Royaume-Uni) relié au condenseur en simulant un cycle respiratoire (équivalent d'une succession d'une inspiration et d'une expiration de 1 litre chacun, toutes les 3 secondes). Le calibreur a fonctionné pendant 10



minutes pour obtenir l'équivalent d'un volume expiratoire maximal cumulé de 200 L (fréquence 20 cycles/minute, volume courant de 1 litre). L'air était chauffé à 32°C et saturé en eau à travers un réchauffeur électronique externe (Aquatherm® III, Hudson RCI, Teleflex Medical, USA). L'eau (eau stérile pour inhalation USP, KendallTM, Covidien, Mansfield, Etats-Unis) contenait une faible concentration de Mn et de Ni (moyenne des mesures en duplicate) (0,096 et 0,135 µg/L respectivement). Cinq échantillons ont été recueillis. Les volumes collectés étaient les suivants (médiane [Q1-Q3]) : 3,0 [2,8 - 3,0]. Les concentrations de métaux mesurées dans cette matrice synthétique étaient les suivantes (médiane [Q1-Q3]): 0,10 [0,07 - 0,26], 0,09 [0,07 - 0,57] pour le Mn et le Ni respectivement. Le chrome et le fer n'étaient pas détectables. Par conséquent, la contamination était négligeable par rapport aux niveaux de Mn -EBC et Ni- EBC obtenus dans le groupe de soudeurs.

#### *Dosage des métaux dans l'urine*

Les analyses de métaux dans les urines ont été effectuées grâce à une collaboration avec le Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses de Lille. Les concentrations de Mn, Ni et Cr ont été déterminées en utilisant un ICP-MS Varian 820 équipé d'une interface collision/réaction (Bruker, Marne la Vallée, France). L'instrument a été utilisé en mode « sauts de pics » pour suivre les rapports masse/charge suivants (m/z) 55, 60 et 52 pour le Mn, Ni et Cr, respectivement. Cent trente millilitres/minute d'hélium ont été ajoutés au niveau du cône d'échantillonnage en tant que gaz de collision-réaction. La quantification a été réalisée en utilisant la méthode des ajouts étalons et des étalons internes (scandium, yttrium et rhodium). Les étalons ont été préparés à partir de solutions mono-élément (Merck, Darmstadt, Allemagne) et ont couvert la gamme 0 – 10, 0 - 100 et 0 - 5 µg/L pour le Mn, Ni et Cr, respectivement. L'eau (18M.cm) a été obtenue avec un système Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Les échantillons (0,5 ml) ont été dilués dix fois avant l'analyse en utilisant un diluant contenant 1 % d'acide nitrique, 0,1% de Triton et 0,2 % de butanol. Les conditions de l'ICP-MS ont été optimisés quotidiennement par des contrôles internes (Utak Laboratories Inc., Valencia, CA, USA) effectués tous les dix échantillons. Les LOQ ont été déterminées à partir des blancs de la même façon que pour les EBC (n=6), et étaient de 0,08, 0,2 et 0,2 µg/L pour le Mn, Ni, et Cr, respectivement. L'absence d'effet matrice, la linéarité, la répétabilité, la reproductibilité, la justesse et la précision de la méthode ont toutes été vérifiées, comme ci-dessus. Les concentrations de métaux dans les échantillons ont été validées par un biologiste qualifié du Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille (CHRU) et le laboratoire

participe à un programme d'assurance qualité externe (QMEQAS, INSPQ Québec, Canada). Tous les résultats ont été normalisés par la concentration de créatinine déterminée par la méthode de Jaffe.

### *Analyses statistiques*

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, États-Unis, version 9.3). Un niveau de signification bilatéral de 0,05 a été choisi pour tous les tests. Les valeurs ont été exprimées en médiane avec l'intervalle interquartile quand ils ne présentaient pas une distribution gaussienne et moyenne avec un écart type quand ils suivaient une distribution gaussienne. Les statistiques descriptives pour les valeurs des concentrations de métaux dans les EBC et l'urine, ainsi que les valeurs de l'indice d'exposition cumulée, ont montré des distributions log-normale avec des tests de normalité (test de Shapiro-Wilk). Les tests statistiques ont donc été réalisés après transformation logarithmique des données. Lorsque les valeurs sont inférieures à la LOQ, la valeur de 0,5 LOQ leur a été affectée. Pour comparer les niveaux de métaux dans les fluides biologiques (EBC et urine) entre les exposés et les contrôles, une analyse de variance (ANOVA) a été utilisée. Pour prendre en compte le rôle du tabac dans ces comparaisons, nous avons utilisé une analyse de variance à deux variables dans lequel le premier facteur est le statut de l'exposition et le deuxième facteur le statut de fumeur actif. Pour étudier la relation entre les concentrations de métaux dans les fluides biologiques et les indices d'exposition cumulée (CIW et WY), des régressions linéaires ont été utilisées. Pour tenir compte de l'effet du tabagisme dans ces relations, une analyse de covariance (ANCOVA) a été réalisée entre les concentrations de métaux et les indices d'exposition cumulée avec le statut de fumeur comme covariable. La corrélation entre deux variables quantitatives a été déterminée avec la corrélation de Pearson. L'analyse des tableaux de contingence a été réalisée avec le test exact de Fischer.

### 3 Résultats de l'étude n°2

#### *Caractéristiques de la population de l'étude n°2*

Les deux groupes étaient similaires en termes d'âge et de caractéristiques morphologiques (pas de différences significatives pour les données démographiques ou cliniques) (**tableau 5**). Tous les paramètres fonctionnels respiratoires étaient normaux pour tous les sujets participants.

Tableau 5 : Caractéristiques de la population de l'étude n°2

|                                               | Non-exposés (N=16) |                     | Soudeurs (N=17) |                      | p     |
|-----------------------------------------------|--------------------|---------------------|-----------------|----------------------|-------|
|                                               | moy [ET]           | médiane [Q1-Q3]     | moy [ET]        | médiane [Q1-Q3]      |       |
| Age, années                                   | 40.1 [11.8]        |                     | 42.1 [12.6]     |                      | 0.601 |
| Poids, kg                                     | 77.8 [8.9]         |                     | 75.7 [13.3]     |                      | 0.296 |
| Taille, cm                                    | 175.9 [6.1]        |                     | 175.0 [6.9]     |                      | 0.814 |
| Tabagisme actif [non/oui]                     | 5/11               |                     | 8/9             |                      | 0.350 |
| Paquets-Année (PY)                            |                    | 9.00 [0.50 - 18.00] |                 | 10.75 [7.00 - 27.00] | 0.351 |
| Nombre d'heures de soudage pendant la semaine |                    | -                   |                 | 21 [14 - 24.5]       | -     |
| Nombre d'années à occuper le poste de soudeur |                    | -                   |                 | 13 [9 - 36]          | -     |
| CVF (obs/pred)                                | 1.11 [0.13]        |                     | 1.07 [0.13]     |                      | 0.322 |
| VEMS (obs/pred)                               | 1.05 [0.10]        |                     | 1.00 [0.17]     |                      | 0.418 |
| VEMS / CVF                                    | 0.98 [0.06]        |                     | 0.96 [0.11]     |                      | 0.787 |
| DEM <sub>25-75</sub> (obs/pred)               | 0.85 [0.18]        |                     | 0.81 [0.29]     |                      | 0.719 |
| FeNO (ppb)                                    |                    | 7.7 [6.2 - 11.3]    |                 | 9.1 [5.3 - 12.4]     | 0.749 |

*PY: Pack-Years; CVF : capacité vitale forcée ; VEMS : volume expiratoire maximal à la première seconde ; DEM<sub>25-75</sub> : débit expiratoire médian entre 25 et 75% de la CVF; FeNO : monoxyde d'azote exhalé lors d'un débit expiratoire constant de 50 mL/s ; moy : moyenne ; ET: écart-type ; Q1 : premier quartile ; Q3 : troisième quartile.*

### *Évaluation de l'exposition professionnelle aux métaux*

Le **tableau 6** montre les concentrations atmosphériques moyennes de poussières inhalables et des métaux obtenues à différents postes de travail dans l'entreprise.

Tableau 6 : Concentrations atmosphériques moyennes de poussières inhalables et des métaux obtenues à différents postes de travail dans l'entreprise

| <b>Poste de Travail</b>                             | <b>Poussières Inhalables</b> | <b>Mn</b>           | <b>Ni</b>           | <b>Fe</b>           | <b>Cr</b>           |
|-----------------------------------------------------|------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <i>Valeurs limites d'exposition professionnelle</i> | 5 mg/m <sup>3</sup>          | 1 mg/m <sup>3</sup> | 1 mg/m <sup>3</sup> | 5 mg/m <sup>3</sup> | 2 mg/m <sup>3</sup> |
| A1                                                  | <b>11,4</b>                  | 0,88                | 0,07                | <b>5,58</b>         | 0,02                |
| A2                                                  | 4,29                         | 0,09                | 0,03                | 2,57                | 0,01                |
| A3                                                  | 3,78                         | 0,21                | 0,03                | 1,95                | 0,01                |
| B1                                                  | 2,66                         | 0,09                | 0,03                | 1,34                | 0,01                |
| B2                                                  | 1,48                         | 0,08                | 0,01                | 0,64                | 0,01                |

*Mn : manganèse ; Ni: nickel ; Fe : fer ; Cr : chrome ; les valeurs en gras représentent les valeurs supérieures aux valeurs limites d'exposition professionnelle*

La concentration de poussières inhalables était au-dessus des valeurs limites d'exposition professionnelles uniquement pour le poste de travail A1. C'est également à ce poste que les concentrations de manganèse (Mn) s'approchaient des valeurs limites sans les dépasser et que les concentrations de fer (Fe) dépassaient les valeurs limites d'exposition professionnelle. Le nickel (Ni) et le chrome (Cr) étaient présents dans la poussière à des niveaux inférieurs aux valeurs limites d'exposition professionnelle.

### *Concentrations de métaux dans les EBC et dans les urines des sujets de l'étude n°2*

Les coefficients de variation des concentrations des métaux dans l'EBC des soudeurs et des sujets non-exposés pour chaque élément métallique étaient les suivants : 2.1 [1.2 - 2.4] % vs 4,5 [2.1 - 5.6] % ; 1.2 [1 - 3] % vs 2.2 [1.4 - 3.1] % et 9 [04.03 - 11.01] % vs 9.7 [8.3 - 12.8] %, pour le Mn-EBC, le Ni-EBC et le Fe-EBC respectivement. Les Mn-EBC, Mn-U et Ni-U ont pu être quantifiés chez tous les sujets de l'étude. Le Ni-EBC a été quantifié chez tous les soudeurs et chez 62,5% des témoins. Le Fe-EBC a été quantifié chez 70,5% des soudeurs et chez 37,5% des témoins. Le Cr-U a été quantifié chez tous les soudeurs et chez 81,3% des témoins. La concentration de Mn dans l'EBC (Mn-EBC) était significativement plus élevée chez les soudeurs que chez les témoins alors que cette différence n'était pas significative dans l'urine (Mn-U - voir le **tableau 7**).

Tableau 7 : Concentrations de métaux dans les EBC et dans les urines des sujets de l'étude n°2

|                 | Non-exposés        | Soudeurs            | Effet Exposition | Effet Exposition après ajustement par le statut tabagique |
|-----------------|--------------------|---------------------|------------------|-----------------------------------------------------------|
|                 | médiane [Q1-Q3]    | médiane [Q1-Q3]     | p*               | p**                                                       |
| µg/L            |                    |                     |                  |                                                           |
| Mn-EBC          | 0.32 [0.16 - 2.47] | 4.72 [2.99 - 17.13] | < <b>0.001</b>   | < <b>0.001</b>                                            |
| Ni-EBC          | 0.24 [0.10 - 0.65] | 1.00 [0.84 - 1.46]  | < <b>0.001</b>   | < <b>0.001</b>                                            |
| Fe-EBC          | 0.50 [0.50 - 1.95] | 1.48 [0.50 - 1.94]  | 0.147            | 0.242                                                     |
| µg/g créatinine |                    |                     |                  |                                                           |
| Mn-U            | 0.38 [0.32 - 0.49] | 0.54 [0.37 - 0.76]  | 0.061            | 0.098                                                     |
| Ni-U            | 0.95 [0.56 - 1.59] | 1.56 [1.01 - 2.48]  | <b>0.049</b>     | <b>0.035</b>                                              |
| Cr-U            | 0.31 [0.20 - 0.38] | 0.72 [0.58 - 1.20]  | < <b>0.001</b>   | < <b>0.001</b>                                            |

*Mn : manganese ; Ni : nickel ; Fe : fer ; Cr : chrome ; EBC : condensat d'air exhalé ; U : urine ; Q1 : premier quartile ; Q3 : troisième quartile*

*\* : valeurs du p de l'ANOVA univariée (exposition)*

*\*\* : valeurs du p de l'ANOVA bivariée (exposition et statut tabagique)*

Les niveaux de Ni-EBC et Ni-U étaient plus élevés chez les soudeurs que chez les témoins. Les concentrations de Mn-EBC et Mn-U n'étaient pas corrélées entre-elles (p=0,41), de même que les concentrations de Ni-EBC et Ni-U (p=0,15). Il n'y avait aucune différence entre les groupes pour les concentrations de Fe-EBC. Le chrome n'était pas quantifiable dans l'EBC mais il était significativement plus élevé dans l'urine des soudeurs que dans celle des témoins (Cr-U). La prise en compte du statut tabagique dans l'ANOVA bivariée, ces différences ne modifie pas ces tendances. Cependant, nous avons constaté que le tabagisme influençait fortement les niveaux de fer dans l'EBC car les niveaux de Fe-EBC étaient significativement plus faibles chez les fumeurs que chez les non fumeurs (médiane [Q1-Q3], 0,50 [0,50 - 1,88] vs 1,59 [01.23 - 02.03], p=0,019).

Les résultats de l'analyse statistique qui a étudié la relation entre les concentrations de métaux dans les liquides biologiques et les indices d'exposition cumulée (CIW et WY), incluant tous les participants (soudeurs et témoins), sont présentés dans le **tableau 8**.

Tableau 8 : Relations entre les concentrations de métaux dans les liquides biologiques et les indices d'exposition cumulée pour chaque métal étudié

|        | CIW            |                                                                    | WY             |                                                                    |
|--------|----------------|--------------------------------------------------------------------|----------------|--------------------------------------------------------------------|
|        | $\beta$ (SE)   | $\beta$ (SE) <sup>▣</sup><br>ajustement par le statut<br>tabagique | $\beta$ (SE)   | $\beta$ (SE) <sup>▣</sup><br>ajustement par le statut<br>tabagique |
| Mn-EBC | 0.32 (0.08)*** | 0.30 (0.08)***                                                     | 0.28 (0.08)*** | 0.27 (0.08)**                                                      |
| Ni-EBC | 0.27 (0.06)*** | 0.26 (0.06)***                                                     | 0.23 (0.06)*** | 0.22 (0.06)***                                                     |
| Fe-EBC | 0.04 (0.03)    | 0.03 (0.03)                                                        | 0.04 (0.03)    | 0.03 (0.03)                                                        |
| Mn-U   | 0.11 (0.05)*   | 0.1 (0.05)                                                         | 0.11 (0.05)*   | 0.1 (0.04)*                                                        |
| Ni-U   | 0.14 (0.06)*   | 0.14 (0.06)*                                                       | 0.12 (0.05)*   | 0.13 (0.06)*                                                       |
| Cr-U   | 0.37 (0.07)*** | 0.38 (0.07)***                                                     | 0.29 (0.06)*** | 0.3 (0.06)***                                                      |

*Mn : manganèse ; Ni : nickel ; Fe : fer ; Cr : chrome ; EBC : condensat d'air exhalé ; U : urine ; CIW : indice d'exposition cumulée pour la semaine et pour chaque métal considéré (Mn, Ni, Fe et Cr respectivement) ; WY : indice d'exposition cumulée pour le nombre d'années à occuper le poste de soudeur et pour chaque métal considéré (Mn, Ni, Fe et Cr respectivement) ; ▣ : résultats de l'ANCOVA avec le statut tabagique comme covariable ;  $\beta$  (SE) : paramètre estimé (Erreur Standard) ; \* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$  ; \*\*\* :  $p < 0.001$  ; les données sont exprimées en valeurs logarithmiques.*

Les coefficients des régressions linéaires étaient significativement supérieurs à zéro pour Mn-EBC, Ni-EBC, Ni-U et Cr-U ; cela signifie que plus l'exposition cumulée est élevée, plus les concentrations des métaux dans les matrices sont élevées. Les résultats de l'analyse de covariance, qui prend en compte le statut tabagique, ont montré les mêmes tendances à l'exception de la relation entre le Mn-U et le CIW. Pour les 2 indices (CIW et WY), nous avons mis en évidence un effet négatif du statut tabagique sur le Fe-EBC, indépendant de l'effet exposition (par exemple pour l'indice WY :  $\beta = -0,55$  ; SE=0,25 ; probabilité  $\beta = 0,03$ ).

#### 4 Discussion de l'étude n°2

Cette étude est la première à montrer la possibilité et l'apport de la mesure du Mn et du Ni dans l'EBC de soudeurs exposés aux fumées de soudage issues du procédé de soudage MIG. Notre étude montre d'une part la fiabilité des mesures de concentrations de poussières métalliques dans l'EBC. D'autre part, elle montre que la concentration de Mn et de Ni dans l'EBC des soudeurs était significativement plus élevée que dans l'EBC des sujets témoins non exposés, et que cette différence était indépendante du statut tabagique. De plus, nous avons trouvé une relation entre l'exposition cumulée au Mn et au Ni et leur concentration dans l'EBC, à savoir des niveaux plus élevés de Mn et de Ni dans l'EBC des soudeurs lorsque les indices d'exposition cumulée soit pour le soudage de la semaine précédente (CIW) ou pour le nombre total d'années de soudage (WY) ont été pris en compte toujours indépendamment du statut tabagique.

Ces données mettent en évidence le potentiel de l'EBC comme matrice pouvant refléter l'exposition pulmonaire professionnelle. Les concentrations de Fe-EBC n'étaient pas significativement différents entre les groupes, cependant elles étaient plus faibles chez les fumeurs. Dans notre étude, il n'a pas été possible de détecter le Cr dans l'EBC alors que les concentrations de Cr-U étaient significativement plus élevées chez les soudeurs que chez les témoins.

Comme nous l'avons vu dans la première partie, les métaux mesurés dans l'EBC proviennent en partie des particules inhalées situées dans le liquide recouvrant l'épithélium respiratoire mais non encore épurées, mais peuvent également provenir de la lyse des cellules épithéliales ou macrophagiques qui contiennent ces métaux. Stern et al. ont montré que les plus petites particules des fumées de soudage sont principalement constituées de métaux lourds tels que Mn, Ni, Fe et Cr [114]. La quantité de particules métalliques qui peut se dissoudre dans le liquide recouvrant l'épithélium respiratoire dépend de la solubilité de ce métal. Taube a récemment montré que le Mn issu du procédé de soudage MIG n'était pas très soluble [115]. Malgré cela, nous avons pu quantifier le Mn dans l'EBC des soudeurs. Ceci s'explique en partie par le fait que les macrophages sont capables de rendre des métaux comme le Mn plus solubles pour faciliter leur épuración [116].

Nous avons pu quantifier le Mn dans tous les EBC (soudeurs et témoins), tandis que le Ni était quantifiable dans l'EBC de tous les soudeurs, mais seulement dans 62,5% des EBC des sujets non-exposés. Nous supposons ici que la quantité de Mn-EBC des sujets témoins non

exposés se compose d'une contamination de l'environnement à la fois en raison de la nature ubiquitaire de ce métal, mais aussi en tant que composant physiologique des processus enzymatiques et cellulaires. Une autre source de contamination aurait pu être le dispositif de recueil, mais nous avons montré qu'elle était négligeable et constante, et n'a donc pas d'incidence sur la comparaison des deux groupes étudiés ici. Pour les soudeurs, les données atmosphériques ont confirmé une exposition relativement faible aux fumées de soudage dans notre étude (c'est à dire inférieure aux valeurs limites d'exposition professionnelle), même si nous avons surestimé la quantité de poussière qu'ils inhalaient en plaçant la cassette de prélèvement à l'extérieur de l'équipement de protection respiratoire. Néanmoins, comme les niveaux de Mn-EBC et Ni-EBC étaient significativement plus élevés chez les soudeurs que chez les témoins, ceux-ci semblent être des marqueurs prometteurs de l'exposition professionnelle aux fumées de soudage.

Les concentrations de Mn-U n'étaient pas significativement différentes entre les soudeurs et les témoins alors que les concentrations de Ni-U étaient plus élevés chez les soudeurs que chez les non-exposés ( $p=0,049$ ), mais seulement dans une faible proportion (la médiane Ni-U chez les soudeurs étant supérieure d'environ 50 % par rapport à celle des témoins). Par rapport aux résultats retrouvés dans les EBC, les différences de concentrations urinaires en Mn ou Ni entre ces groupes étaient donc plus faible et la significativité statistique plus équivoque. Ni le Mn-EBC et le Mn-U ni le Ni-EBC et le Ni-U n'étaient corrélées entre elles. L'absence de corrélation entre les concentrations de métaux dans ces deux matrices, associés à une relation entre l'exposition et les niveaux de métaux dans les EBC, suggère que les concentrations de métaux mesurées dans l'EBC fournissent des informations toxicocinétiques complémentaires à celles mesurées dans l'urine. Pour le Mn-EBC en particulier, le fait que l'effet exposition reste important après l'ajustement par le statut tabagique et que l'on met en évidence des relations avec à la fois un indice d'exposition récente (CIW) et plus ancienne (WY), alors que cela ne l'est pour le Mn-U, suggère que l'EBC reflète mieux la dose de Mn reçu par inhalation. Ces résultats sont en accord avec le fait que le Mn et le Ni sont tous deux connus pour être transférés progressivement du poumon vers la circulation sanguine [117, 118]. Comme l'on déjà décrit d'autres auteurs, l'ajustement par le tabagisme n'a pas modifié l'effet exposition de Mn-U, sauf lors de l'utilisation de l'indice CIW (exposition récente) [119–121]. Les concentrations de Mn-U semblent donc souffrir de l'influence du tabagisme, mais restent un marqueur satisfaisant de l'exposition professionnelle au Mn pour l'ensemble de la carrière d'un soudeur puisque l'effet exposition n'est pas affecté par l'ajustement par le tabagisme en utilisant l'indice WY. La détermination du Ni-EBC dans notre étude montre



qu'il est aussi pertinent que le Mn-EBC dans l'évaluation de l'exposition des soudeurs aux fumées de soudage, ce qui ne correspondait pas à nos attentes car le Ni n'est pas le principal constituant des fumées de soudage issues du procédé de soudage MIG/MS.

Nous avons pris en compte le temps total de soudure avec et sans port d'équipement de protection respiratoire : ainsi, nos indices d'exposition cumulée reflètent davantage l'exposition potentielle plutôt que l'exposition réelle et, par conséquent, peuvent surestimer la concentration réelle de poussières inhalées. Comme il n'a pas été possible d'obtenir une évaluation de l'exposition pour chaque soudeur, nous avons choisi de construire des indices nous permettant de comparer l'intensité relative de l'exposition de chaque soudeur.

Même si nos soudeurs ont été exposés à une plus grande concentration de Fe que de Mn, les concentrations de Fe-EBC n'étaient pas significativement différentes entre les soudeurs et les témoins. Il a été montré que le fer s'accumulait dans les poumons et que la charge pulmonaire en fer augmentait au cours de l'exposition de la vie professionnelle [122]. Nous n'avons pas observé de différence significative pour le Fe-EBC entre les soudeurs et les témoins, mais nous avons trouvé un effet négatif du statut tabagique sur la Fe-EBC. Mutti et al. ont retrouvé les mêmes tendances avec des niveaux réduits de Fe-EBC chez des fumeurs mais d'autres auteurs comme Hoffmeyer et al. n'ont pas observé d'influence du tabagisme sur Fe-EBC [123, 124]. Dans une étude plus récente, Hoffmeyer et al. ont mis en évidence une corrélation entre le Fe-EBC et le nombre d'année de soudage ( $r_s = 0,523$ ) chez des soudeurs utilisant le soudage à l'arc (comprenant des soudeurs utilisant le procédé MIG) exposés à une concentration similaire de Fe dans les fumées de soudage. Ils ne retrouvaient cependant pas de corrélation entre le Fe-EBC et le fer mesuré dans l'atmosphère. Les concentrations de Fe-EBC mesurées par Hoffmeyer et al. étaient significativement plus élevées que celles mesurées dans notre étude (médiane 12,02 vs 1,48  $\mu\text{g/L}$ ), et ceci peut-être due à une exposition plus élevée puisque qu'une partie des soudeurs de cette étude ne portaient pas d'équipement de protection respiratoire alors que tous les soudeurs étudiés ici portaient des équipements [125].

Cette contradiction apparente entre l'importante différence de Mn-EBC entre les soudeurs et les témoins et l'absence d'une telle différence pour les concentrations de Fe-EBC dans notre étude peut s'expliquer par le transport transmembranaire de ces métaux au niveau des cellules de l'épithélium respiratoire. En raison de leurs propriétés chimiques similaires, le Mn et le Fe sont en compétition pour la liaison à des transporteurs de métaux tels que le *divalent metal transporter -1 (DMT-1)* [126]. Ainsi, il se peut que l'exposition concomitante au Mn et au Fe se traduise par une absorption préférentielle du Fe par les cellules épithéliales respiratoires par

l'intermédiaire de DMT-1 en raison d'une concentration de Fe plus importante dans les fumées de soudage. Nos résultats concernant le Mn-EBC et le Fe-EBC pourraient être expliqués par la faible absorption du Mn par les cellules épithéliales respiratoires conduisant à une plus forte concentration de Mn dans le liquide recouvrant l'épithélium respiratoire secondairement collecté dans l'EBC.

Le chrome n'a pas été détecté dans l'EBC des soudeurs ou des témoins de notre étude mais sa concentration était significativement plus élevée dans l'urine des soudeurs que dans celle des sujets non-exposés. En dépit d'une limite de quantification plus élevée pour le dosage du Cr (0,25 µg/L) que notre méthode (0,15 µg/L), et d'une exposition plus faible, Hoffmeyer et al. ont détecté du Cr dans l'EBC de 19 des 43 soudeurs après une journée d'exposition. Ils ont interprété leurs résultats en faisant l'hypothèse d'une rapide épuration du Cr en dehors des poumons [125]. Dans une autre étude sur des salariés d'une entreprise de chromage, Caglieri et al. ont montré une diminution importante des concentrations de Cr-EBC mesurées à la fin du poste du vendredi et celles mesurées avant le poste du lundi suivant : la limite de détection pour le Cr dans cette étude était inférieur à la nôtre (0,05 µg/L), et l'exposition était plus élevée que celle de notre étude [127]. Ainsi, le fait que nous ne puissions pas quantifier le Cr dans l'EBC de nos sujets peut être dû à l'épuration relativement rapide de ce métal en dehors des poumons, ou à notre limite de détection trop élevée pour mesurer cet élément dans l'EBC (ou du fait d'un autre aspect méthodologique).

## **5 Conclusion de l'étude n°2**

Dans cette étude pilote, nous avons été en mesure de quantifier le Mn dans l'EBC et avons trouvé que les concentrations de Mn-EBC de soudeurs étaient plus élevées que ceux de témoins non exposés, indépendamment du statut tabagique. En raison de sa relation avec les indices d'exposition cumulée, il semble que le Mn-EBC est un marqueur prometteur de l'exposition chez les soudeurs. De plus, il fournit des informations toxicocinétiques complémentaires à celles fournies par les analyses urinaires. Les concentrations de Ni-EBC ont montré des relations similaires avec les indices d'exposition, ainsi le Ni-EBC semble être aussi pertinent que le Mn -EBC pour évaluer l'exposition des soudeurs aux fumées de soudage. Nous avons également constaté que le Fe-EBC n'était pas un bon marqueur d'exposition, malgré des concentrations relativement élevées de Fe dans les fumées de soudage, et que le Cr-U reste un bon marqueur d'exposition aux fumées de soudage. Compte tenu des effets de l'exposition au Mn sur la santé des soudeurs, ces résultats doivent être confirmés par des études sur de plus larges population comprenant d'autres professions exposant au Mn.

# **Etude n°3 : Quantification des particules métalliques dans les EBC de salariés exposés à des composés solubles du béryllium**

## **1 Contexte de l'étude n°3**

Le nombre de salariés exposés au béryllium est estimé à environ 67 000 en Europe [128] et 12 000 en France selon l'étude CAREX [129]. L'exposition au béryllium est à l'origine de la béryllose, une granulomatose pulmonaire pouvant être sévère et nécessitant une phase préalable de sensibilisation [130, 131]. Du fait de l'apparition de cas de béryllose pour de faibles expositions professionnelles [132, 133], la valeur limite d'exposition professionnelle fixée par la circulaire du 12 janvier 1995 à  $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$  n'est plus adéquate [134]. Ainsi l'ACGIH a proposé récemment une révision de cette valeur à  $0,05 \mu\text{g}/\text{m}^3$  [135]. L'ANSES a également proposé une valeur plus basse à  $0,01 \mu\text{g}/\text{m}^3$  afin d'éviter tout risque de sensibilisation [136].

Le béryllium urinaire est l'indice biologique d'exposition le plus utilisé dans le cadre de la surveillance des salariés exposés mais il n'est pas assez robuste pour être quantitativement corrélé à l'intensité de l'exposition [137]. Le test de transformation lymphoblastique est un test qui permet de détecter les sujets sensibilisés mais ne semble pas suffisamment robuste pour établir la relation entre la sensibilisation et la survenue de la béryllose [138]. De plus, il reste très peu utilisé en France en raison de difficultés pratiques de réalisation (nombre de laboratoire insuffisant, transport des échantillons). Il apparaît donc indispensable de développer des indices d'exposition biologiques fiables et non-invasifs pour la surveillance des salariés exposés. Aussi, nous proposons d'utiliser l'EBC comme matrice dans laquelle les concentrations de béryllium serviront d'indicateurs d'exposition pulmonaire.

Le but principal de cette étude « exposé-non exposé » est de doser le béryllium dans l'EBC (Be-EBC) de salariés issus du secteur de l'aluminerie et de corréler cette concentration à celle retrouvée dans l'atmosphère de travail. L'objectif secondaire de cette étude est d'évaluer les conséquences de cette exposition sur le stress nitrosant par l'analyse de l'air exhalé.

## 2 Matériel et Méthode de l'étude n°3

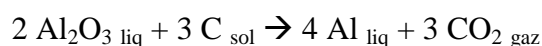
### *Population de l'étude*

Grâce à une collaboration active de l'INRS, et en se basant sur les entreprises ayant été incluses dans l'une de leurs précédentes études [129], il a été possible de recruter dans 2 entreprises différentes 30 salariés exposés à une forme soluble de béryllium (fluorure de béryllium) dont la dernière exposition date de moins de 8 jours. Les entreprises nous ont autorisés à réaliser cette étude après présentation de celle-ci en Comité d'Hygiène, de Sécurité et des Conditions de Travail (CHSCT). Dix-sept salariés ont été recrutés en novembre 2011 dans une entreprise de production d'aluminium par réduction électrolytique et 13 salariés ont été recrutés en décembre 2010 dans une entreprise prestataire de la première pour la réparation d'ouvrage en métaux et dont la principale activité est de réparer les tiges anodiques usées par le procédé d'électrolyse. Les 21 sujets non-exposés ont été recrutés entre 2009 et 2011 dans le secteur tertiaire de ces 2 entreprises et dans des entreprises non exposantes au béryllium. Les sujets dont la dernière exposition datait de plus de 8 jours ainsi que les salariés ayant un EBC contaminé (taux de protéine totale > 25 µg/mL) étaient exclus (3 et 3 sujets exclus respectivement)

### *Description des entreprises*

#### Entreprise n°1 : Production d'aluminium par réduction électrolytique

Ce procédé permet d'extraire l'aluminium métal de la bauxite qui est la forme minérale de l'aluminium. Elle contient environ 50 % d'alumine. Elle contient également une faible masse de béryllium allant de 0.01 à 4 µg/g d'alumine, variable selon son origine [139]. Elle se forme par la désagrégation de roches sédimentaires à haute teneur en minerai d'aluminium. L'alumine est le nom donné à l'oxyde d'aluminium (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) qui est extrait de la bauxite par un procédé d'affinage appelé le procédé Bayer. Le procédé d'électrolyse extrait l'aluminium sous forme métallique par réduction de l'Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. La réaction d'oxydoréduction s'effectue entre une cathode (cuve d'acier recouverte de carbone) et plusieurs anodes (bloc de braie de houille et de coke cuit scellé à une tige anodique (hexapode) par de la fonte) et a lieu dans un bain contenu dans les cathodes (**figure 23**). Un courant continu pouvant atteindre 320 000 Ampères passe de l'anode à la cathode par le bain d'électrolyse et circule ensuite vers les autres cuves via les anodes branchées en série.



Le bain en fusion (970°C) est constitué d'alumine dissoute dans de la cryolithe. L'aluminium en fusion se dépose sous forme liquide au fond de la cathode où il est récupéré lors de la coulée. L'aluminium liquide est ensuite mise en forme dans le secteur fonderie en lingot ou en barre. La réaction chimique produit du fluor qui se lie au béryllium présent dans l'alumine pour former du **fluorure de béryllium (BeF<sub>2</sub>)**, forme soluble de béryllium. Le BeF<sub>2</sub> s'accumule ainsi dans le bain liquide et dans le bain solide qui se forme à sa surface.

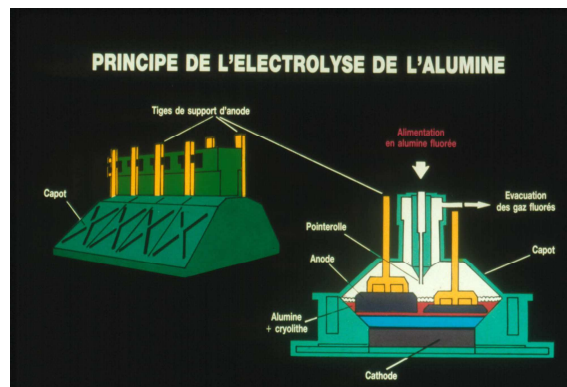


Figure 23 : Coupe d'une cuve d'électrolyse et de ses anodes.

La consommation du carbone lors du procédé d'électrolyse nécessite le remplacement régulier des anodes (15 à 18 changements sont effectués par 24 heures). Ce changement s'effectue par un salarié à l'aide d'un pont roulant (Machine de la Salle d'Electrolyse, MSE) depuis une cabine climatisée (**figure 24**) et nécessite la présence d'un autre salarié au sol pour l'ouverture des capots recouvrant les anodes. Cette tâche expose le salarié au sol au BeF<sub>2</sub> car il doit ouvrir les capots recouvrant les anodes et subir la mise en suspension dans l'air des poussières de bain solide provoquée par le déplacement de l'anode.



Figure 24 : Pont roulant (MSE) équipé d'une cabine climatisée

La récupération de l'aluminium liquide (appelée « coulée métal ») (**figure 25**) s'effectue par pompage dans une poche de coulée transportée ensuite vers le secteur fonderie par camion (COMETTO) dans des fours qui maintiennent l'aluminium sous forme liquide. Une fois vidées, les poches de coulée sont nettoyées par fraisage.



Figure 25 : Opération de pompage de l'aluminium liquide dans le bain

La « coulée métal » modifie le niveau du bain et oblige les opérateurs à ajuster la hauteur des tiges anodiques pour que les anodes soient toujours en contact avec le bain (appelée « relevage cadre »). Les anodes sont constamment recouvertes de bain broyé pour augmenter l'efficacité de la réaction d'électrolyse (appelée « entretien cuve »).

Des prélèvements d'aluminium liquide (« pion métal ») et des relevés de température sont nécessaires pour le service qualité.

L'usure des cathodes est plus lente que celle des anodes. Une cathode doit être changée tous les 5 à 8 ans. Cette opération nécessite tout d'abord l'ablation du bain solide résiduel, de l'aluminium solide, des briques réfractaires et des blocs de carbone qui recouvrent la structure métallique (appelée « débrasquage »). Cette opération est très exposante au fluorure de béryllium car elle nécessite de casser le bain solide provoquant la production de poussières volatiles. Si la structure métallique est trop endommagée, elle sera remplacée sinon elle sera de nouveau équipée en briques réfractaires, blocs de carbone et pâte à brasque (« brasquage »). Le démarrage d'une nouvelle cuve (mise sous tension) peut se faire avec du bain liquide (technique utilisée dans l'entreprise de 2002 à 2010) ou à sec avec 30 tonnes de bain solide (utilisée depuis 2010). Cette tâche expose fortement les salariés au  $\text{BeF}_2$  car elle produit énormément de poussières de bain solide en suspension dans l'air.

Le bain solide (appelé crasse et encroûtement), qui se trouve en surface du bain liquide et sur les anodes, subit un recyclage (secteur du Conducteur d'Installations Annexes CIA). Il provient de la réfection des cuves où de gros blocs de croûte doivent parfois être réduits par une mini-pelle mécanique. Ce bain solide est aussi présent sur les anodes usées desquelles il doit être retiré lors du « piquage anode/mégots ». Il est ensuite transporté vers le secteur carbone par camion (MAFI) où il sera refroidit et broyé en fines poussières dans un broyeur de grande capacité afin d'obtenir le bain broyé qui sera réutilisé en salle d'électrolyse. Un résumé des différents secteurs d'une aluminerie est présenté à la **figure 26**.

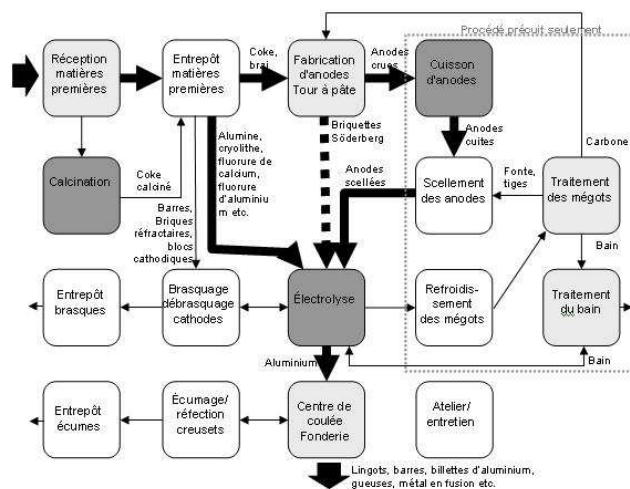


Figure 26 : Schéma général d'organisation des secteurs d'une aluminerie.



Le poste de pontonnier comprends les tâches suivantes : changement d'anode, coulée métal, entretien cuve, pion métal, balayage des surfaces.

Le CIA effectue le transport du métal par le COMETTO, nettoie la fraise utilisée pour nettoyer les poches de coulée, nettoie le broyeur de bain quand cela est nécessaire et effectue la réduction des blocs de croûtes ainsi que le piquage anode/mégôts.

Un opérateur de mesure est chargé d'effectuer des mesures (température du bain, ampérage, extraction des gaz) et de collecter les informations fournies par les pontonniers.

Le chef de poste organise et supervise les activités de la salle d'électrolyse avec l'aide des responsables de procédés.

Les salariés pénétrant dans la salle d'électrolyse doivent porter un équipement de protection respiratoire à adduction d'air muni d'une unité filtrante Jupiter<sup>®</sup> anti-poussières et anti-gaz.

#### Entreprise n°2 : Réparation des tiges anodiques

L'activité principale de cette entreprise est de remettre en état les tiges anodiques (hexapodes) utilisées dans le secteur électrolyse de l'entreprise n°1.

Un hexapode (**figure 27**) est constitué d'une tige en aluminium assemblée à 6 pieds en acier par un alliage d'aluminium, de titane et d'acier que l'on nomme « clad ». Chaque pied est complété par un rondin en acier. L'hexapode permet de suspendre le bloc anodique à la surface du bain d'électrolyse. Par conséquent, le BeF<sub>2</sub> peut s'accumuler sur les rondins, les pieds et la base de la tige d'aluminium.



Figure 27 : Tige anodique (hexapode)

Une fois séparées du bloc anodique (tâche effectuée dans une autre entreprise), les tiges anodiques sont réparées lors de différentes étapes. Après réception, les rondins sont séparés de leur pied dans le secteur de débardage par un procédé arc-air nommé gougeage à l'arc (utilisation d'électrodes raboutables JETROD 5 de type DC). Lorsqu'il existe une perte de métal sur l'une des structures, les salariés effectuent un rechargement en acier pour les pieds (procédé de soudage MIG (argon et CO<sub>2</sub>), métal d'apport THYSSEN MV 70) et en aluminium pour la tige (procédé de soudage MIG (argon-hélium), métal d'apport THYSSEN Al Si 5). Le clad est remplacé si nécessaire au même poste que le rechargement de la tige en utilisant le même procédé de soudage. Les rondins sont ensuite assemblés à leur pied par pointage puis souder pour renforcer l'ensemble (procédé de soudage MIG (argon-CO<sub>2</sub>), métal d'apport NERTALIC 70S).

#### *Design de l'étude*

Les sujets ont été recrutés sur leur lieu de travail. Des locaux administratifs, à distance des postes de travail exposants, nous ont gracieusement été prêtés par les entreprises pendant l'étude. Une camionnette spécialement équipée pour l'étude permettait de stocker les prélèvements biologiques.

Tous les sujets ont répondu à un questionnaire médical comprenant 2 parties :

- la première partie concernée leurs antécédents médicaux, leurs symptômes respiratoires ainsi que leurs habitudes tabagiques,

- la deuxième partie concernée leur parcours professionnel en mettant l'accent sur les expositions professionnelles à tropisme pulmonaire. La liste des tâches professionnelles réalisées le jour des recueils biologiques ainsi que leur durée ont été recueillies.

Les salariés bénéficiaient ensuite dans cet ordre d'un recueil d'EBC, d'une mesure du NO exhalé, d'une spirométrie, d'un recueil urinaire et d'un prélèvement sanguin veineux.

Les échantillons d'EBC et d'urine étaient conservés à -20°C durant le transport puis à -80°C. Les échantillons veineux étaient conservés entre 4 et 8°C.

### *Explorations fonctionnelles respiratoires*

Les Explorations fonctionnelles respiratoires ont été réalisées selon les recommandations de l'European Respiratory Society de 2005 [81]. Les paramètres pulmonaires (capacité vitale forcée (CVF), volume expiratoire maximal à la première seconde (VEMS), le rapport VEMS/CVF, débit expiratoire médian compris entre 25 et 75 % de la CVF ( $DEM_{25-75\%}$ )) ont été mesurés grâce à un spiromètre portable SpiroDyn'R (Société Dyn'R, Muret, France). Les données sont exprimées par le rapport des valeurs observées/théoriques (obs / pred).

### *Mesure du NO exhalé (FeNO)*

Les taux de FeNO ont été mesurés en utilisant un analyseur par chimiluminescence (NOx 8000, SERES Aix en Provence, France). Une mesure quotidienne du NO ambiant était effectuée dans la salle d'examen le jour des examens avant le recueil des échantillons biologiques. Les mesures ont été réalisées selon les recommandations ATS/ERS de 2005 [107]. Les concentrations de NO ont été mesurées pendant une expiration contrôlée à un débit de 50 mL/s, au premier plateau stable durant au moins 3 secondes (la variation entre 2 mesures devant être inférieure à 10% ou moins de 1 ppb). La concentration moyenne de FeNO de 2 mesures reproductibles a été retenue.

### *Quantification de l'exposition des salariés de l'entreprise n°1*

Des prélèvements atmosphériques individuels ont été effectués pour différents postes pendant la durée totale d'une journée de travail. Ils ont été réalisés en juin 2010 et juillet 2011. Nous avons utilisé des pompes GilAir<sup>TM</sup> (débit de pompe 2L/minute, Gilian Instrument Corp., West Caldwell, N.J.) avec des cassettes Millipore (diamètre d'ouverture 4 mm) munie d'une membrane en esters de cellulose (MEC) de 37 mm de diamètre et de 0,8 µm en porosité. La cassette était placée en dehors des équipements de protection respiratoire. Une fois le prélèvement effectué, les parois internes des cassettes étaient rincées avec 3 mL d'acide nitrique. Trois millilitres d'acide sulfurique ainsi que le liquide de rinçage étaient ajoutés à la membrane pour être ensuite minéralisée par micro-ondes. Le dosage du béryllium a été effectué par spectrophotométrie d'absorption atomique électrothermique à effet Zeeman (VARIAN SpectrAA 240 Z1) en utilisant 2 modificateurs de matrice ( $(NH_4)_2HPO_4$  et TMAOH 25%), une décomposition thermique en 5 étapes avec des paliers à 75, 120, 250 et 1300°C, et une atomisation du béryllium à 2500°C. Les valeurs des limites de détection et de quantification n'étaient pas disponibles.

### *Quantification de l'exposition des salariés de l'entreprise n°2*

Des prélèvements atmosphériques individuels ont été effectués pour différents postes pendant la durée totale d'une journée de travail. Ils ont été réalisés en novembre 2005 et en mars 2007 par la CARSAT. Nous avons utilisé des pompes GilAir™ (débit de pompe 2L/minute, Gilian Instrument Corp., West Caldwell, N.J.) avec des cassettes (diamètre d'ouverture 4 mm) munie d'un filtre en fibres de quartz de 37 mm de diamètre. La cassette était placée en dehors des équipements de protection respiratoire. Une fois le prélèvement effectué, les filtres étaient pesés au microgramme (fumées de soudage) puis minéralisés directement dans la cassette par 3 mL d'acide fluorhydrique et 2 mL d'acide nitrique. Le dosage du béryllium et de l'aluminium a été effectué par spectrométrie de masse par torche à plasma (ICP-MS). Les valeurs des limites de détection et de quantification n'étaient pas disponibles.

### *Calcul de l'indice d'exposition cumulée au béryllium (IEC)*

L'IEC a été calculé en sommant les produits du nombre d'années à réaliser une tâche par la concentration moyenne d'exposition en béryllium de cette tâche. L'unité de l'IEC est en  $\mu\text{g}/\text{m}^3 \cdot \text{année}$ . Pour les sujets contrôles, nous avons multiplié le nombre d'année de travail par une estimation de la concentration environnementale de béryllium ( $0,03 \text{ ng}/\text{m}^3$ ) [140].

### *Recueil de l'EBC*

L'EBC a été recueilli en utilisant un condenseur de type TURBO-DECCS (Transportable Unit for Research on Biomarkers Obtained from Disposable Exhaled Condensate Collection Systems, ItalChill, Parme, Italie). C'est un dispositif de production de froid par effet Peltier. Le côté froid du module à effet Peltier est relié à un support en aluminium prévu pour loger le flacon de recueil. Le TURBO, fourni avec le DECCS, est un dispositif jetable en polyéthylène servant à collecter l'EBC. Il est composé d'un embout muni d'une valve bidirectionnelle et d'un piège à salive, le tout relié à un flacon de recueil (50 ml) par un tube. La ventilation du sujet a été surveillée en utilisant un spiromètre électronique (Ecovent Viasys, Hechberg, Allemagne) fixé au circuit expiratoire. Les EBC ont été recueillis selon les dernières recommandations [113]. Le sujet respirait calmement dans le dispositif pendant 45 minutes. Les volumes moyens d'EBC n'étaient significativement pas différent entre le groupe exposé et le groupe contrôle (médiane [Q1-Q3]) (4,1 mL [3,6 – 4,9] pour le groupe exposé vs 4,1 mL

[3,8 – 4,6] pour le groupe contrôle,  $p=0.61$ ). Après le recueil, les EBC ont immédiatement été aliquotés et conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### *Dosage des métaux dans les EBC*

Les analyses de métaux dans les EBC ont été effectuées grâce à une collaboration avec le laboratoire Ultra Trace Analyse Aquitaine (UT2A) de Pau. Deux millilitres d'EBC ont été utilisés pour déterminer la concentration des métaux dans les EBC. Les analyses ont été réalisées en duplicate. Les concentrations de béryllium (Be) et d'aluminium (Al) ont été mesurés par spectrométrie de masse par torche à plasma (ICP-MS) (ICP-MS – X Series II, Thermo Electron Corporation, Cheshire, Winsford, UK) en utilisant la technique analytique « total-quant » avec calibration externe. Les rapports masse/charge suivants ( $m/z$ ) 9 (Be) et 27 (Al) ont été suivis par le spectromètre de masse. Les étalons externes étaient préparés à partir de solution étalon multi-éléments (Inorganic Ventures Inc., Lakewood, NJ, USA). Les conditions de l'ICP-MS étaient optimisées quotidiennement. L'eau (18M.cm) a été obtenue grâce à un système Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Les mesures ont été effectuées dans des EBC bruts. Les limites de quantifications (LOQ), estimées par 10 fois l'écart-type de la valeur du blanc ( $n=6$ ) était de  $0,001\ \mu\text{g/L}$  pour le Be et de  $0,1\ \mu\text{g/L}$  pour l'Al. L'**absence d'effet matrice** (moins de 15% de différence entre les pentes d'étalonnage obtenues dans l'eau ou l'EBC), la **linéarité** (coefficients de corrélation des courbes d'étalonnage supérieurs à 0,995 sur 3 jours différents), la **répétabilité** (moins de 15% de différence parmi 6 mesures effectuées sur un même échantillon le même jour), la **reproductibilité** (moins de 15% de différence sur les mesures effectuées sur un même échantillon 3 jours différents), la **justesse** (les mesures réalisées en triplicate sur un échantillon avec ajout dosé était comprises entre 85 et 115% de la valeur attendue) et la **précision** (différence entre ces triplicates inférieure à 15%) ont toutes été vérifiées. La contamination en métal du DECCS en polypropylène a été vérifiée et montre des concentrations de Be inférieures à la LOQ et une concentration de  $0,5\ \mu\text{g/L}$  pour l'Al après rinçage du DECCS à l'eau ultra pure.

#### *Dosage des marqueurs de l'inflammation dans l'EBC*

##### Nitrites/Nitrates (NOx)

Les NOx ont été dosés par la méthode de Griess modifiée (Griess Reagent Kit, Invitrogen) avec détection par spectrophotométrie (Apollo, LB912, Berthold Technologies). La réaction de Griess permet la mesure des nitrites, les nitrates étant préalablement réduits en nitrites pour

être quantifiés. La concentration mesurée représente la somme des nitrites et des nitrates présents dans les EBC. La LOQ était de 2 µM.

### TNF $\alpha$

Les concentrations de TNF $\alpha$  ont été déterminées par ELISA (kit Human TNF alpha Ultra Sensible, Invitrogen ; DO 450 nm). La LOQ était de 0,09 pg/mL.

### *Dosage des métaux dans les urines*

Les analyses de métaux dans les urines ont été effectuées grâce à une collaboration avec le Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses de Lille. Nous n'avons pas pu obtenir les urines de 6 des 13 salariés de l'entreprise n°2. Les concentrations de Be et Al ont été déterminées en utilisant un ICP-MS Varian 820 équipé d'une interface collision/réaction (Bruker, Marne la Vallée, France). L'instrument a été utilisé en mode « sauts de pics » pour suivre les rapports masse/charge suivants (m/z) 9 et 27 du Be et de l'Al respectivement. Cent trente millilitres/minute d'hélium ont été ajoutés au niveau du cône d'échantillonnage en tant que gaz de collision-réaction. La quantification a été réalisée en utilisant la méthode des ajouts étalons et des étalons internes (scandium, yttrium et rhodium). Les étalons ont été préparés à partir de solutions mono-élément (Merck, Darmstadt, Allemagne). L'eau (18M.cm) a été obtenue avec un système Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Les échantillons (0,5 ml) ont été dilués dix fois avant l'analyse en utilisant un diluant contenant 1 % d'acide nitrique, 0,1% de Triton et 0,2 % de butanol. Les conditions de l'ICP-MS ont été optimisés quotidiennement par des contrôles internes (Utak Laboratories Inc., Valencia, CA, USA) effectués tous les dix échantillons. Les LOQ ont été déterminées à partir des blancs de la même façon que pour les EBC (n=6), et étaient de 0,0064 et 4,10 µg/L pour le Be et l'Al respectivement. L'absence d'effet matrice, la linéarité, la répétabilité, la reproductibilité, la justesse et la précision de la méthode ont toutes été vérifiées, comme ci-dessus. Les concentrations de métaux dans les échantillons ont été validées par un biologiste qualifié du Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille (CHRU) et le laboratoire participe à un programme d'assurance qualité externe (QMEQAS, INSPQ Québec, Canada). Tous les résultats ont été normalisés par la concentration de créatinine déterminée par la méthode de Jaffe.

### *Analyses statistiques*

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, États-Unis, version 9.3). Un niveau de signification bilatéral de 0,05 a été choisi pour tous les tests. Les valeurs ont été exprimées en médiane avec l'intervalle interquartile. Les statistiques descriptives pour les valeurs des concentrations de métaux dans les EBC et l'urine, ainsi que les valeurs de l'indice d'exposition cumulée, ont montré des distributions log-normale avec des tests de normalité (test de Shapiro-Wilk). Les tests statistiques ont donc été réalisés après transformation logarithmique des données. Lorsque les valeurs sont inférieures à la LOQ, la valeur de 0,5 LOQ leur a été affectée. Pour comparer les niveaux de métaux dans les fluides biologiques (EBC et urine) entre les exposés et les contrôles, une analyse de variance (ANOVA) a été utilisée. Pour prendre en compte le rôle du tabac dans ces comparaisons, nous avons utilisé une analyse de variance à deux variables dans lequel le premier facteur est le statut de l'exposition et le deuxième facteur le statut de fumeur actif. Pour étudier la relation entre les concentrations de métaux dans les fluides biologiques et les indices d'exposition cumulée (CIW et WY), des régressions linéaires ont été utilisées. Pour tenir compte de l'effet du tabagisme dans ces relations, une analyse de covariance (ANCOVA) a été réalisée entre les concentrations de métaux et les indices d'exposition cumulée avec le statut de fumeur comme covariable. La corrélation entre deux variables quantitatives a été déterminée avec la corrélation de Spearman. L'analyse des tableaux de contingence a été réalisée avec le test exact de Fischer.

### 3 Résultats de l'étude n°3

#### *Caractéristiques des 2 groupes*

Le groupe contrôle étaient constitué d'une proportion significativement plus importante de femmes et moins importante de fumeurs actifs. L'ensemble des paramètres fonctionnels respiratoires étaient normaux pour tous les sujets participants et nous n'avons pas noté de différence entre les 2 groupes (**tableau 9**).

Tableau 9 : Caractéristiques de la population de l'étude n°3

|                                        | <b>Non exposés (N=21)</b> | <b>Exposés (N=30)</b> | <b>p</b>          |
|----------------------------------------|---------------------------|-----------------------|-------------------|
| Age (année)                            | 44 [36 - 49]              | 40 [32 - 47]          | 0.3941            |
| Taille (cm)                            | 165 [162 - 175]           | 174 [172 - 180]       | <b>0.0006</b>     |
| Poids (kg)                             | 71 [68 - 82]              | 80 [70 - 90]          | <b>0.0448</b>     |
| Sexe (H/F)                             | 10/11                     | 28/2                  | <b>0.0005</b>     |
| Tabac (Actif/Non actif)                | 7/14                      | 19/11                 | <b>0.0349</b>     |
| Dyspnée (oui/non)                      | 16/5                      | 25/5                  | 0.2254            |
| IEC ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ .année) | 0.001 [0.001 - 0.001]     | 1.943 [0.956 - 3.972] | <b>&lt;0.0001</b> |
| CVF (obs / pred)                       | 1.076 [1.022 - 1.165]     | 1.027 [0.933 - 1.067] | 0.0543            |
| VEMS (obs / pred)                      | 1.094 [1.027 - 1.139]     | 1.024 [0.986 - 1.091] | 0.2593            |
| VEMS/CV (obs / pred)                   | 1.050 [0.998 - 1.081]     | 1.070 [1.007 - 1.102] | 0.2993            |
| DEM <sub>25-75</sub> (obs / pred)      | 0.982 [0.861 - 1.112]     | 1.042 [0.829 - 1.285] | 0.3463            |

*IEC : indice d'exposition cumulée ; CVF : capacité vitale forcée ; VEMS : volume expiratoire maximal à la première seconde ; DEM<sub>25-75</sub> : débit expiratoire médian entre 25 et 75% de la CVF.*

#### *Quantification de l'exposition des salariés de l'entreprise n°1*

Les concentrations atmosphériques de béryllium les plus élevées concernaient le poste de pontonnier et l'opération de débrasquage (**tableau 10**). La concentration moyenne de NO ambiant était très élevée dans la salle d'examen lors des recrutements (moyenne +/- écart-type) : 223 +/- 43 ppb.



Tableau 10 : Concentrations atmosphériques de béryllium mesurées sur des prélèvements individuels effectués lors de différentes tâches dans l'entreprise n°1.

| Tâche                | Concentration atmosphérique de Béryllium ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) |              |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------|--------------|
|                      | Juin 2010                                                             | Juillet 2011 |
| Pontonier            | 0.354                                                                 | 0.07         |
| Débrasquage          | 0.265                                                                 | 0.16         |
| Démarrage cuve       | 0.095                                                                 | -            |
| CIA                  | 0.015                                                                 | 0.09         |
| Piquage anode/mégots | 0.042                                                                 | 0.02         |
| MAFI                 | 0.016                                                                 | 0.04         |
| Brasquage            | 0.095                                                                 | -            |
| Opérateur mesures    | 0.023                                                                 | 0.03         |
| Responsable procédé  | 0.045                                                                 | 0.02         |
| Chef de poste        | 0.03                                                                  | -            |

#### *Quantification de l'exposition des salariés de l'entreprise n°2*

L'exposition des salariés aux fumées de soudage était très importante dans cette entreprise et la majorité des tâches avaient des concentrations atmosphériques qui dépassaient la valeur limite d'exposition professionnelle française fixée à  $5 \text{ mg}/\text{m}^3$  (sauf le poste rechargement tige/soudage clad) (**tableau 11**). La concentration moyenne de NO ambiant était faible lors des recrutements (moyenne +/- écart-type) :  $0,13 \text{ +/- } 0,23 \text{ ppb}$ .

Tableau 11 : Concentrations atmosphériques des fumées de soudage mesurées sur des prélèvements individuels effectués lors de différentes tâches dans l'entreprise n°2.

| Tâche                             | Concentration atmosphérique des fumées de soudage ( $\text{mg}/\text{m}^3$ ) |           |
|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
|                                   | Novembre 2005                                                                | Mars 2007 |
| Dépose rondins (délardage)        | 52,5                                                                         | 144       |
| Rechargement pied                 | 6,06                                                                         | 7,01      |
| Rechargement tige et soudage clad | 1,91                                                                         | 1,85      |
| Soudage des rondins/pieds         | 5,95                                                                         | 14,8      |

Les concentrations atmosphériques de béryllium en  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  et d'aluminium en  $\text{mg}/\text{m}^3$  sont présentées dans le **tableau 12** et le **tableau 13**. La tâche où la concentration de béryllium était la plus élevée était le délardage et celle où la concentration d'aluminium était la plus élevée était le rechargement tige/soudage clad. Ces concentrations sont toutefois inférieures à la valeur limite d'exposition professionnelle qui est de  $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$  pour le béryllium et de  $5 \text{ mg}/\text{m}^3$  pour l'aluminium.

Tableau 12 : Concentrations atmosphériques de béryllium mesurées sur des prélèvements individuels effectués lors de différentes tâches dans l'entreprise n°2.

| Tâche                             | Concentration atmosphérique de Béryllium ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) |           |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------|
|                                   | Novembre 2005                                                         | Mars 2007 |
| Dépose rondins (délardage)        | 1,200                                                                 | 1,600     |
| Rechargement pied                 | 0,300                                                                 | 0,400     |
| Rechargement tige et soudage clad | 0,400                                                                 | 0,400     |
| Soudage des rondins/pieds         | 0,125                                                                 | 0,005     |

Tableau 13 : Concentrations atmosphériques d'aluminium mesurées sur des prélèvements individuels effectués lors de différentes tâches dans l'entreprise n°2.

| Tâche                             | Concentration atmosphérique en Aluminium ( $\text{mg}/\text{m}^3$ ) |           |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-----------|
|                                   | Novembre 2005                                                       | Mars 2007 |
| Dépose rondins (délardage)        | 0,285                                                               | 0,85      |
| Rechargement pied                 | 0,08                                                                | 0,37      |
| Rechargement tige et soudage clad | 2,45                                                                | 1,07      |
| Soudage des rondins/pieds         | 0,085                                                               | 0,13      |

#### *Concentrations des métaux dans l'EBC et dans les urines*

Les taux de quantification de Be et d'Al étaient significativement plus élevés chez les salariés exposés (**tableau 14** et **tableau 15**).

Tableau 14 : Taux de quantification du béryllium dans les EBC (%)

|                  | Non-exposés | Exposés    | p             |
|------------------|-------------|------------|---------------|
| Non quantifiable | <b>90%</b>  | 77%        | <b>0.0485</b> |
| Quantifiable     | 10%         | <b>33%</b> |               |

Tableau 15 : Taux de quantification de l'aluminium dans les EBC (%)

|                  | Non-exposés | Exposés    | p             |
|------------------|-------------|------------|---------------|
| Non quantifiable | <b>76%</b>  | 23%        | <b>0,0002</b> |
| Quantifiable     | 24%         | <b>77%</b> |               |

Neuf des dix EBC dans lesquels le béryllium a été quantifié parmi les exposés provenaient des salariés de l'entreprise n°1. On peut donc supposer qu'il existe un effet « entreprise ». En créant un profil du contenu métallique des EBC des salariés des 2 entreprises, on observe que le profil où le Be et l'Al sont quantifiables en même temps concerne plus les salariés de l'entreprise n°1 alors que le profil où seul l'Al est quantifiable individualise mieux l'entreprise n°2 (**tableau 16**). Le béryllium n'a pas été quantifié dans l'urine de 4 salariés exposés (13%) et de 2 salariés non-exposés (10%). L'aluminium a été quantifié dans tous les échantillons d'urine.

Tableau 16 : Profil du contenu métallique des EBC des salariés des entreprises n°1 et 2

| <b>EBC</b>    | <b>Entreprise 1</b> | <b>Entreprise 2</b> | <b>p</b>      |
|---------------|---------------------|---------------------|---------------|
| Al(+) / Be(-) | 23,5                | <b>69,3</b>         | <b>0.0147</b> |
| Al(+) / Be(+) | <b>53</b>           | 7,7                 |               |
| Al(-) / Be(-) | 23,5                | 23                  |               |
| Al(-) / Be(+) | 0                   | 0                   |               |

*Be(+)* : béryllium quantifiable dans l'EBC;

*Al(+)* : aluminium quantifiable dans l'EBC;

*Be(-)* : béryllium non-quantifiable dans l'EBC;

*Al(-)* : aluminium non-quantifiable dans l'EBC

Les concentrations de béryllium dans l'EBC (Be-EBC) étaient significativement plus élevées chez les salariés exposés après ajustement par le statut tabagique mais les concentrations urinaires de Be n'étaient pas différentes entre les groupes. Les concentrations d'aluminium dans l'EBC (Al-EBC) étaient significativement plus élevées chez les salariés exposés alors qu'elles ne l'étaient pas dans l'urine (**tableau 17**).

Tableau 17 : Concentrations des métaux dans les EBC et dans les urines des salariés de l'étude n°3.

|                        | <b>Non exposés (N=21)</b> | <b>Exposés (N=30)</b> | <b>Effet exposition*</b> | <b>Effet exposition après ajustement par le statut tabagique**</b> |
|------------------------|---------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Be-EBC (ng/L)          | 0.5 [0.5 - 0.5]           | 0.5 [0.5 - 1.38]      | 0.0526                   | <b>0.0254</b>                                                      |
| Al-EBC (µg/L)          | 0.05 [0.05 - 0.05]        | 2.16 [1.1 - 4.2]      | <b>&lt;0.0001</b>        | <b>0.0003</b>                                                      |
| Be-U (ng/g créatinine) | 8 [6 - 23]                | 9 [5 - 17]            | 0.641                    | 0.4044                                                             |
| Al-U (µg/g créatinine) | 7.02 [4.42 - 14.3]        | 8.9 [5.5 - 20.1]      | 0.1448                   | 0.3422                                                             |

*Be* : béryllium ; *Al* : aluminium ; *EBC* : condensat d'air exhalé ; *U* : urine

\* : valeurs du p de l'ANOVA univariée (exposition)

\*\* : valeurs du p de l'ANOVA bivariée (exposition et statut tabagique)

Compte-tenu de l'effet « entreprise », les concentrations de Be-EBC et d'Al-EBC sont significativement plus élevées dans les EBC des salariés de l'entreprise n°1 que dans ceux des sujets témoins alors que les concentrations des métaux mesurées dans les urines ne sont pas différentes entre exposés/non-exposés. Ces analyses ne sont pas modifiées après prise en compte du statut tabagique (**tableau 18**).

Tableau 18 : Concentrations des métaux dans les EBC et dans les urines des salariés de l'entreprise n°1.

|                        | Non exposés        | Entreprise 1     | Effet exposition* | Effet exposition après ajustement par le statut tabagique** |
|------------------------|--------------------|------------------|-------------------|-------------------------------------------------------------|
| Be-EBC (ng/L)          | 0.5 [0.5 - 0.5]    | 1.1 [0.5 - 2]    | <b>0.0027</b>     | <b>0.002</b>                                                |
| Al-EBC (µg/L)          | 0.05 [0.05 - 0.05] | 2.5 [1.5 - 4.7]  | <b>0.0003</b>     | <b>0.0007</b>                                               |
| Be-U (ng/g créatinine) | 8 [6 - 23]         | 6 [4 - 10]       | 0.0897            | 0.0649                                                      |
| Al-U (µg/g créatinine) | 7.02 [4.42 - 14.3] | 7.2 [4.8 - 11.3] | 0.7472            | 0.9472                                                      |

Be : béryllium ; Al : aluminium ; EBC : condensat d'air exhalé ; U : urine

\* : valeurs du p de l'ANOVA univariée (exposition)

\*\* : valeurs du p de l'ANOVA bivariée (exposition et statut tabagique)

Concernant l'entreprise n°2, les données montrent que l'Al-EBC et l'Al-U sont significativement plus élevées que chez les sujets contrôles alors que le Be-EBC ou le Be-U ne sont pas différentes entre les 2 groupes. La prise en compte du tabac ne modifie pas ces résultats (**tableau 19**).

Tableau 19 : Concentrations des métaux dans les EBC et dans les urines des salariés de l'entreprise n°2.

|                        | Non exposés        | Entreprise 2    | Effet exposition* | Effet exposition après ajustement par le statut tabagique** |
|------------------------|--------------------|-----------------|-------------------|-------------------------------------------------------------|
| Be-EBC (ng/L)          | 0.5 [0.5 - 0.5]    | 0.5 [0.5 - 0.5] | 0.8054            | 0.9747                                                      |
| Al-EBC (µg/L)          | 0.05 [0.05 - 0.05] | 1.8 [1.1 - 3]   | <b>0.0014</b>     | <b>0.0081</b>                                               |
| Be-U (ng/g créatinine) | 8 [6 - 23]         | 18 [13 - 46]    | 0.0515            | 0.1921                                                      |
| Al-U (µg/g créatinine) | 7.02 [4.42 - 14.3] | 20.1 [9 - 68]   | <b>0.006</b>      | <b>0.0365</b>                                               |

Be : béryllium ; Al : aluminium ; EBC : condensat d'air exhalé ; U : urine

\* : valeurs du p de l'ANOVA univariée (exposition)

\*\* : valeurs du p de l'ANOVA bivariée (exposition et statut tabagique)

Les concentrations de Be-EBC et Al-EBC n'étaient pas corrélées à leur concentration urinaire respective que l'on fasse les analyses pour les 2 entreprises en même temps ou séparément.

Neuf des dix EBC dans lesquels le béryllium a été quantifié parmi les exposés provenaient des salariés de l'entreprise n°1. Le coefficient de la régression linéaire évaluant la relation entre la concentration de Be-EBC et l'IEC était significativement plus grand que zéro lorsque l'analyse incluait l'entreprise n°1 et les sujets contrôles ( $\beta$  : 0,082 ; SE : 0,023 ;  $p=0,001$ ). Les mêmes analyses effectuées uniquement chez les exposés ne sont plus significatives. Les concentrations de Be-EBC et Al-EBC étaient fortement corrélées ( $p<0,0001$ ).

Les concentrations de Be-U étaient positivement corrélées aux concentrations de Al-U ( $p < 0,0001$ ,  $r = 0,88$ ) sans être corrélées à l'IEC ( $p = 0,78$ ). On observait les mêmes tendances si l'analyse statistique était effectuée uniquement chez les exposés [Al-U ( $p < 0,0001$ ,  $r = 0,91$ ); IEC ( $p = 0,43$ )].

### Marqueurs de l'inflammation dans l'air exhalé

Lorsque l'on effectue les analyses statistiques sur l'ensemble de la population, les niveaux de FeNO sont significativement plus élevés chez les salariés exposés après ajustement par le statut tabagique que chez les contrôles. Les concentrations de NOx ou de TNF $\alpha$  dans l'EBC (NOx-EBC, TNF-EBC) n'étaient pas différentes entre les groupes (**tableau 20**). Par ailleurs, les concentrations de FeNO n'étaient pas corrélées aux NOx-EBC ( $p = 0,08$ ).

Tableau 20 : Marqueurs de l'inflammation dans l'air exhalé des salariés de l'étude n°3

|                      | Non exposés      | Exposés          | Effet exposition* | Effet exposition après ajustement par le statut tabagique** |
|----------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------------------------------------------------|
| FeNO (ppb)           | 9.3 [6.8 - 20.4] | 15 [9.1 - 28.5]  | 0.0688            | <b>0.0015</b>                                               |
| NOx ( $\mu$ M)       | 8.2 [5.1 - 10.5] | 7.8 [5.4 - 11.8] | 0.9669            | 0.7541                                                      |
| TNF $\alpha$ (pg/mL) | 1.3 [0.7 - 1.7]  | 0.9 [0.6 - 1.3]  | 0.188             | 0.2802                                                      |

FeNO : NO exhalé ; NOx : Nitrites/Nitrates dans le condensat d'air exhalé ; TNF : Tumor Necrosis Factor

\* : valeurs du p de l'ANOVA univariée (exposition)

\*\* : valeurs du p de l'ANOVA bivariée (exposition et statut tabagique)

Lorsque l'on compare l'entreprise n°1 aux sujets contrôles, on observe des concentrations de FeNO significativement plus élevées chez les exposés que chez les contrôles et des concentrations de NOx-EBC significativement plus basses après ajustement ou non du statut tabagique (**tableau 21**). Il est important de préciser que les conditions d'examens ne sont pas homogènes entre exposés et non-exposés car les concentrations de NO ambiant, pour cette entreprise, étaient très élevées.

Tableau 21 : Marqueurs de l'inflammation dans l'air exhalé des salariés de l'entreprise n°1

|                | Non exposés      | Entreprise n°1     | Effet exposition* | Effet exposition après ajustement par le statut tabagique** |
|----------------|------------------|--------------------|-------------------|-------------------------------------------------------------|
| FeNO (ppb)     | 9.3 [6.8 - 20.4] | 17.9 [14.7 - 28.5] | <b>0.0024</b>     | <b>&lt;0.0001</b>                                           |
| NOx ( $\mu$ M) | 8.2 [5.1 - 10.5] | 5.4 [4.4 - 6.3]    | <b>0.0088</b>     | <b>0.0116</b>                                               |
| TNF (pg/mL)    | 1.3 [0.7 - 1.7]  | 1.1 [0.7 - 1.3]    | 0.7653            | 0.7795                                                      |

FeNO : NO exhalé ; NOx : Nitrites/Nitrates dans le condensat d'air exhalé ; TNF : Tumor Necrosis Factor

\* : valeurs du p de l'ANOVA univariée (exposition)

\*\* : valeurs du p de l'ANOVA bivariée (exposition et statut tabagique)

Lorsque l'on compare l'entreprise n°2 aux sujets contrôles, on observe des concentrations de NOx-EBC significativement plus élevées après ajustement ou non du statut tabagique. Les concentrations de FeNO (mesurées dans de bonnes conditions FiNO < 5ppb) ou de TNF-EBC n'étaient pas différentes entre les groupes (**tableau 22**). Les concentrations de FeNO n'étaient pas corrélées aux NOx-EBC (p=0,98).

Tableau 22 : Marqueurs de l'inflammation dans l'air exhalé des salariés de l'entreprise n°2

|             | Non exposés      | Entreprise n°2     | Effet exposition* | Effet exposition après ajustement par le statut tabagique** |
|-------------|------------------|--------------------|-------------------|-------------------------------------------------------------|
| FeNO (ppb)  | 9.3 [6.8 - 20.4] | 9.1 [6.3 - 11.8]   | 0.8682            | 0.1388                                                      |
| NOx (µM)    | 8.2 [5.1 - 10.5] | 12.3 [10.9 - 13.7] | <b>0.0013</b>     | <b>0.0095</b>                                               |
| TNF (pg/mL) | 1.3 [0.7 - 1.7]  | 0.8 [0.6 - 1]      | 0.0997            | 0.1615                                                      |

*FeNO : NO exhalé ; NOx : Nitrites/Nitrates dans le condensat d'air exhalé ; TNF : Tumor Necrosis Factor*

\* : valeurs du p de l'ANOVA univariée (exposition)

\*\* : valeurs du p de l'ANOVA bivariée (exposition et statut tabagique)

Les concentrations de FeNO étaient positivement corrélées avec le Be-EBC (p=0,006 ; r=0,38) mais pas avec l'Al-EBC (p=0,46) ni avec l'IEC (p=0,14). Les concentrations de NOx-EBC étaient négativement corrélées avec le Be-EBC (p=0,0045 ; r= -0,4) sans être corrélé à l'Al-EBC (p=0,3) ni à l'IEC (p=0,84).

#### 4 Discussion de l'étude n°3

Cette étude est la première à montrer qu'il est possible de quantifier un composé soluble du béryllium et de l'aluminium dans l'EBC de salariés issus du secteur de la production électrolytique d'aluminium. Malgré une exposition à de faibles concentrations atmosphériques de béryllium et de façon indépendante du statut tabagique, nous avons montré que les Be-EBC étaient significativement plus élevées chez les salariés exposés que les sujets non-exposés et que cette concentration était positivement corrélée à l'exposition cumulée. Nous avons également mis en évidence l'utilité du dosage de l'Al-EBC chez ces mêmes salariés. L'analyse de l'air exhalé a également permis de mettre en évidence les effets de cette exposition sur l'épithélium respiratoire par la voie du stress nitrosant.

Cette étude montre également l'intérêt de doser l'aluminium dans l'EBC de salariés exposés aux fumées de soudage issues d'un procédé MIG pour le soudage de pièces en aluminium. De plus, l'analyse de l'air exhalé a montré que cette exposition avait des effets différents sur la voie du stress nitrosant.

Nous n'avons quantifié du béryllium dans l'EBC d'un seul des salariés de l'entreprise 2 alors que la tâche de débardage exposait à une concentration atmosphérique moyenne de béryllium supérieure à celles mesurées pour l'entreprise n°1. L'exposition au béryllium est certes plus faible dans l'entreprise n°1 mais elle est continue durant tout le poste car il existe une contamination de l'atmosphère de la salle d'électrolyse. En effet, la quantité de Be dans la bauxite varie de 0,13 à 0,6 mg/kg et peut même atteindre 180 mg/kg dans la bauxite provenant de la Jamaïque [141]. Selon Skaugset et al., le Be se concentre progressivement dans l'atmosphère de la salle d'électrolyse au cours de la production [141]. Selon Greenbaum et al., le fluorure de Be s'évaporerait dans l'atmosphère en même temps que les composés fluorés compte tenu de sa température de sublimation (environ 960°C) [142]. Taiwo et al. ont mesuré une concentration moyenne de 0,22 µg/m<sup>3</sup> de Be dans une aluminerie américaine [143]. Cette concentration était plus élevée dans les alumineries françaises (0,388 µg/m<sup>3</sup>) lors de prélèvements réalisés entre 2004 et 2006 [129]. Nous n'avons pas mesuré la concentration atmosphérique d'Al dans l'entreprise n°1 mais Skaugset et al. ont montré que la concentration atmosphérique de Be était corrélée à celle d'Al dans l'atmosphère d'une salle d'électrolyse à anodes précuites ( $r > 0,9$ ) selon l'équation suivante :  $Al (\mu\text{g}/\text{m}^3) = 3 \times Be (\text{ng}/\text{m}^3) + 25$  (obtenue visuellement selon la Figure 2 de cette publication [141]). Ainsi, il est possible d'obtenir la concentration moyenne prévisible d'Al dans la salle d'électrolyse durant le poste

de pontonnier en appliquant cette équation, on obtient une concentration moyenne de 1090  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  soit 1,1  $\text{mg}/\text{m}^3$  d'Al. Selon Thomassen et al., le changement d'anode est le processus qui expose le plus aux particules ultrafines [144]. Cette tâche est incluse dans le poste de pontonnier poste le plus exposant au Be et à l'Al. Comme nous l'avons exposé dans l'introduction, ces particules sont susceptibles d'atteindre le compartiment alvéolaire ce qui pourrait expliquer la quantification à la fois du Be et de l'Al dans les EBC des salariés de l'entreprise n°1.

La tâche de débardage, la plus exposante au Be dans l'entreprise n°2, s'effectue de façon ponctuelle à la réception des tiges anodiques. De plus, l'IEC de l'entreprise n°2 est plus faible que celui de l'entreprise n°1 (1,51 [0,72 – 2,99] vs 2.41 [1.53 - 3.97]). Ceci explique en partie la plus faible proportion de quantification de Be dans l'EBC des salariés de l'entreprise n°2. L'exposition atmosphérique en Al des salariés de l'entreprise n°2 est composée de l'Al présent sur les rondins, les pieds et la partie basse de la tige auquel s'ajoute l'Al issu des fumées de soudage lors du rechargement de la tige/changement de clad. La concentration atmosphérique moyenne en Al de cette tâche est nettement plus élevée que celle prévisible dans la salle d'électrolyse. Les particules émises lors du soudage peuvent également atteindre le compartiment alvéolaire puisqu'elles ont une taille moyenne de  $1\mu\text{m}$  et moins de 7% de ces particules ont un diamètre inférieur à 100 nm [145]. Ainsi, ayant une exposition plus importante à l'Al et moins importante au béryllium, on peut comprendre que le profil d'EBC où seul l'Al est quantifiable soit plus fréquent chez les salariés de l'entreprise n°2.

Le Be a été quantifié en même temps que l'Al dans l'EBC de 2 des sujets contrôles qui ont été recrutés au sein de l'entreprise n°1. L'Al seul a été quantifié dans l'EBC de 3 autres sujets contrôles recrutés dans une entreprise de type tertiaire. L'Al est un métal très ubiquitaire dont les concentrations dans l'atmosphère d'une zone urbaine peuvent atteindre  $8\mu\text{g}/\text{m}^3$  [146]. L'Al est également présent dans de nombreux produits cosmétiques rendant possible une contamination des EBC. La plus grande proportion de quantification d'Al chez les témoins peut s'expliquer par une origine environnementale mais aussi par la contamination du système de recueil. En effet, nous avons mis en évidence une contamination du DECCS en Al de  $0,5\mu\text{g}/\text{mL}$ . Cependant, nous n'avons pas retrouvé de contamination du DECCS en Be et les concentrations atmosphériques environnementales béryllium sont plus basses ( $0,03\text{ ng}/\text{m}^3$ ) [140], ce métal étant moins ubiquitaire. Ainsi, la probabilité d'une contamination de Be environnementale ou provenant du système de recueil est faible, par conséquent les 2 sujets



chez qui nous avons quantifié le Be et l'Al dans l'EBC sont des sujets qui méconnaissent leur exposition.

Les concentrations de Be urinaire n'étaient pas différentes entre les groupes exposés/non-exposés. Comme le montrent d'autres études, le béryllium urinaire n'est pas un bon marqueur d'exposition [137, 147]. Les concentrations d'Al urinaire chez les salariés de l'entreprise n°1 n'étaient pas non plus différentes de celles des contrôles. Les concentrations d'Al obtenues dans l'EBC des salariés de l'entreprise n°1 étaient quant à elles plus élevées que celles observées chez les sujets contrôles. Les concentrations d'Al dans l'EBC et dans les urines des salariés de l'entreprise n°2 étaient plus élevées que celles obtenues chez les sujets contrôles. L'exposition principale d'Al pour ces salariés est l'activité de rechargement tige/changement clad par procédé MIG. Plusieurs études ont montré que la demi-vie d'excrétion urinaire de l'Al chez des salariés exposés aux fumées de soudage contenant de l'Al pouvait varier de quelques jours à plusieurs mois et qu'elle était dépendante de la durée d'exposition et de l'intensité d'exposition [148–150]. Les concentrations de métaux dosés dans l'EBC des salariés n'étaient pas corrélées avec les concentrations mesurées dans leur urine. Ainsi, l'analyse du contenu métallique de l'EBC apporte des informations toxicocinétiques complémentaires à celles fournies par l'analyse urinaire.

Même pour de faibles expositions, une sensibilisation au Be est possible. Taiwo et al. ont mis en évidence une sensibilisation concernant 0,47% des salariés exposés à une concentration moyenne de Be de  $0,25 \mu\text{g}/\text{m}^3$  dans une aluminerie [133]. Ainsi il apparaît pertinent de développer des indices biologiques d'exposition au Be fiables et l'EBC semble être une matrice prometteuse dans ce domaine. Selon Kent et al., la concentration de particules dont la taille est inférieure à  $3,5 \mu\text{m}$  et qui se déposent dans le compartiment alvéolaire serait une mesure d'exposition plus pertinente pour prédire l'incidence de la sensibilisation ou de la béryllose [151]. Issu en partie du liquide recouvrant l'épithélium respiratoire distal où se déposent les particules de cette taille, l'EBC pourrait être la matrice permettant de mesurer cet indice mais ceci reste à vérifier dans une étude longitudinale.

Le tabac peut être une source supplémentaire de béryllium. En effet, les concentrations de Be contenues dans le tabac ont été estimées à 0,47, 0,68, et  $0,74 \mu\text{g}/\text{cigarette}$ , ce qui correspond à un apport supplémentaire d'environ  $1,5 \mu\text{g}/\text{jour}$  pour un sujet fumant 20 cigarette par jour [152]. C'est pour cela que systématiquement nous avons pris en compte le tabac comme

cofacteur de l'exposition dans nos analyses statistiques. Comme le montrent nos résultats, la prise en compte du tabac modifie que très légèrement les analyses statistiques.

Nous avons trouvé des réponses différentes concernant les marqueurs du stress nitrosant dans l'air exhalé des salariés des 2 entreprises. La concentration moyenne de NO ambiant dans l'entreprise n°1 était plus élevée que celle mesurée dans les entreprises où les témoins ont été recrutés (223 +/- 43 ppb vs 9,43 +/- 21 ppb). Nous avons donc procédé à des analyses entreprise par entreprise. La prise en compte du tabac est primordiale dans l'interprétation des résultats du FeNO. Le tabagisme est connu pour diminuer les concentrations de FeNO car le NO contenu dans la fumée de cigarette inhibe la production de NO par un mécanisme de rétrocontrôle sur la NO synthase [153]. Compte-tenu des niveaux de NO ambiant dans l'entreprise n°1, il serait logique que les salariés de cette entreprise aient des niveaux de FeNO bas or les résultats que nous obtenons dans cette étude montrent le contraire même si l'ajustement de nos analyses statistiques par le statut tabagique modifie le degré de significativité de nos tests.

Les niveaux de NOx-EBC des salariés de l'entreprise n°1 étaient plus bas que chez les salariés non-exposés. Des données similaires ont été retrouvées dans une étude de cohorte de plus de 900 sujets où les niveaux de NOx-EBC étaient plus bas chez les sujets exposés aux concentrations environnementales les plus hautes d'ozone [154]. Les fumées de soudage contiennent de l'ozone et cependant les niveaux de NOx-EBC chez les salariés de l'entreprise n°2 étaient plus élevés que chez les sujets non-exposés. Une autre étude a pourtant retrouvé des niveaux de NOx-EBC plus élevés chez des soudeurs utilisant différents procédés de soudage [155]. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour mieux comprendre les interactions des différents constituants de l'exposition des salariés avec les voies du stress nitrosant utilisées par l'épithélium respiratoire.

## **5 Conclusion de l'étude n°3**

Nous avons été capables de doser le béryllium dans l'EBC de salariés exposés à un composé soluble de béryllium dans la production d'aluminium par électrolyse. Les concentrations de Be-EBC étaient significativement plus élevées chez les salariés du secteur de l'électrolyse que chez les sujets contrôles et étaient corrélées à l'IEC de ces salariés indépendamment du statut tabagique. Nous avons également montré l'utilité de doser l'Al dans l'EBC de ces salariés et plus spécifiquement chez les salariés du secteur de réparation des tiges anodiques exposés à des fumées de soudage contenant de l'Al. De plus, les données fournies par l'analyse en contenu métallique de l'EBC complètent celles fournies par l'analyse urinaire. L'analyse de l'air exhalé a permis de montrer que la réponse des voies du stress nitrosant différait selon l'exposition des salariés. Nous pensons alors que l'EBC est une matrice utilisable pour la quantification du Be présent dans le liquide recouvrant l'épithélium respiratoire dans le but de prévenir une future sensibilisation.

# Discussion générale

Nos travaux nous ont permis de valider notre hypothèse de départ à savoir que l'EBC est une matrice biologique permettant de refléter l'exposition pulmonaire en particules inhalées en :

- identifiant des particules de mica dans l'EBC d'un salarié ayant un spectre Raman similaire à celui des particules recueillies dans l'entreprise [156, 157],

- en quantifiant des concentrations de particules métalliques, ayant des propriétés physiques (taille) et chimiques (composition, solubilité, minérale/métallique) différentes, dans l'EBC de salariés récemment exposés,

- et en corrélant positivement ces concentrations de particules métalliques avec un indice d'exposition cumulée [158].

Nous avons pu également montrer que l'EBC était une matrice fournissant des informations complémentaires à celles fournies par l'analyse urinaire.

Depuis plusieurs années, l'un des points forts de notre équipe de recherche est l'utilisation d'une méthodologie robuste pour l'analyse des constituants de l'EBC de sujets malades [4, 5] et cette exigence méthodologique a été poursuivie en milieu professionnel [6, 7, 156, 157]. En effet, nous avons été attentifs et vigilants sur les différentes méthodologies de l'analyse de particules dans l'EBC et dans les urines. La mise au point des dosages des particules dans l'EBC a nécessité de nouvelles collaborations avec la Faculté Dentaire de Lille pour l'utilisation de la spectrométrie Raman, avec le laboratoire UT2A de Pau pour le dosage des métaux dans l'EBC et avec le CUMA de la Faculté de Pharmacie de Lille pour les dosages des métaux dans l'urine. Ces collaborations nous ont permis de participer à la mise au point des méthodes de dosage fiables et reproductibles (décrites dans les études respectives de ce manuscrit). Cette exigence méthodologique nous a amenés à prendre en compte l'influence du système de recueil sur nos analyses. En effet, de nombreuses études sur les condensats ont montré l'importance des systèmes de recueil. Dans notre travail, 2 appareils différents ont été utilisés pour le recueil de l'EBC. L'Ecoscreen I, un appareil encombrant qui permet de recueillir un volume d'EBC supérieur aux autres appareils comme le R-Tube ou le DECCS du TURBO (étude non encore publiée). C'est pour nos analyses un déterminant important. En effet deux millilitres d'EBC ont été nécessaires pour l'analyse de ces particules. Sachant

qu'un EBC a un volume moyen de 3 ml pour une durée de recueil de 20 minutes avec l'Ecoscreen, le volume restant est à peine suffisant si l'on veut doser les marqueurs d'effet. D'autres mises au point méthodologiques d'analyse seront effectuées afin de réduire le volume nécessaire à l'analyse particulière. Par ailleurs Hoffmeyer et al. ont souligné l'importance du système de recueil et ont montré des concentrations plus élevées de métaux dans les EBC des témoins recueillis par l'Ecoscreen I que par l'Ecoscreen2. Ils interprètent ces résultats par une contamination possible de métaux provenant de la lamelle de recueil utilisée [124]. Pour nos 2 dernières études, il était donc important de vérifier la non-contamination de ces appareils en particules métalliques. Nos résultats ont montré qu'il existait une contamination de très faible importance pour le manganèse, le nickel et l'aluminium. Certaines caractéristiques de l'EBC sont influencées par l'exposition et n'ont pas été prises en compte dans nos études comme le pH [159, 160] ou la température de la pièce lors du recueil [70]. Ce dernier paramètre est important à prendre en compte car il joue également un rôle sur le dosage des métaux dans l'EBC [161].

Nos études sont des études avec de faibles effectifs mais nous voulions obtenir des groupes homogènes d'exposition et des salariés n'ont pas été retenus en raison des données obtenues lors de leur interrogatoire. De plus, le questionnaire ainsi que les recueils biologiques ont été réalisés sur le temps de travail des salariés. Le temps moyen compris entre l'interrogatoire et la fin des recueils biologiques était d'une heure environ pour l'étude n°2 et d'une heure et 30 minutes pour l'étude n°3. Des postes d'intérim ont dû être créés dans l'étude n°3 pour compenser l'absence des salariés recrutés. Notre temps de présence dans les entreprises étant limité, il était difficile d'augmenter ces effectifs compte-tenu des coûts que cela pouvait engendrer.

Nous avons réussi à quantifier des particules métalliques dans l'EBC de salariés exposés et nos résultats sont cohérents avec d'autres études déjà publiées. Les experts réunis au Breath Summit de Parme en 2011 ont admis que l'EBC a pour origine le liquide recouvrant l'épithélium respiratoire et que, dès lors, il apparaît donc raisonnable de vouloir doser des composés solubles reflétant l'exposition professionnelle et/ou environnementale dans cette matrice constituée à 99% d'eau [162]. Nos résultats montrent que nous avons réussi à doser dans l'EBC des particules considérées comme peu solubles. Le fluorure de béryllium est soluble dans l'eau alors que le manganèse contenu dans les fumées de soudage issues du procédé MIG l'est moins, cependant nous avons dosé ces 2 métaux dans l'EBC. L'action chimique des macrophages sur les particules insolubles peuvent les rendre plus solubles pour

favoriser leur épuration [163]. Néanmoins, il a été montré que les composés les plus solubles du béryllium sont plus toxiques pour les macrophages favorisant ainsi leur cytolysse et la libération de leur contenu [164, 165]. Par conséquent, ces 2 mécanismes expliquent en partie la persistance de ces métaux dans le liquide recouvrant l'épithélium respiratoire. Comme d'autres auteurs (**tableau 23**), il a été possible de doser des particules métalliques dans l'EBC car la taille de ces particules était inférieure à celle des gouttelettes qui les transportent jusqu'au condenseur. En effet, la taille des particules des fumées de soudage mais aussi des particules dans l'atmosphère de la salle d'électrolyse est de l'ordre du micromètre dont une partie est nanométrique et le diamètre moyen des gouttelettes exhalées est de 0,3 µm lorsque que l'on respire calmement mais peut atteindre 16 µm lorsque l'on parle et 13,5 µm lors de la toux [92]. L'étude n°1 semble montrer que l'analyse minéralogique de l'EBC était possible et qu'elle permettait de distinguer une exposition professionnelle d'une exposition environnementale. Nous ne connaissons pas d'autres études ayant analysé le contenu minéral de l'EBC. Les études étudiant les minéraux comme l'amiante ou à la silice ont préféré utiliser l'EBC pour doser les marqueurs d'effets résultant de cette exposition [166–174]. De même, il est difficile de comparer nos résultats concernant le béryllium dans l'EBC car, à notre connaissance, il n'existe pas d'autres études ayant déjà réalisé les mêmes analyses. Nous avons montré que l'analyse quantitative des métaux dans l'EBC était un indicateur pertinent de l'exposition pulmonaire professionnelle concernant 2 secteurs d'activité. D'autres études ont analysé les mêmes métaux que ceux dans nos études et le lecteur pourra se référer au **tableau 23** qui résume les résultats de ces études. Le **tableau 23** résume la revue de la littérature sur les dosages des autres métaux dans l'EBC. Afin de faciliter les comparaisons seuls les résultats de fin de poste ou de fin de semaine ont été retranscrits.

Tableau 23 : Publications des études ayant mesuré les concentrations de métaux chez des salariés exposés.

| Secteur d'activité / Type d'exposition              | Type d'étude | N (E/NE) | Concentration atmosphérique des métaux (µg/m3) |      |      |       |    |    | Concentration des métaux dans l'EBC en µg/L (exposés vs non exposés) |                    |             |                    |    |             | Recueil      |             |
|-----------------------------------------------------|--------------|----------|------------------------------------------------|------|------|-------|----|----|----------------------------------------------------------------------|--------------------|-------------|--------------------|----|-------------|--------------|-------------|
|                                                     |              |          | Mn                                             | Ni   | Fe   | Cr    | Be | Al | Mn                                                                   | Ni                 | Fe          | Cr                 | Be | Al          |              |             |
| Production d'aluminium (salle d'électrolyse)        | E/NE         | 17/21    | -                                              | -    | -    | -     | -  | -  | -                                                                    | -                  | -           | -                  | -  | 1,1 vs 0,5* | 2,5 vs 0,05* | TURBO-DECCS |
| Réparation de tiges anodiques                       | E/NE         | 13/21    | -                                              | -    | -    | -     | -  | -  | -                                                                    | -                  | -           | -                  | -  | 0,5 vs 0,5  | 1,8 vs 0,05* | TURBO-DECCS |
| Fumée de soudage (MIG/MS)                           | E/NE         | 17/16    | -                                              | -    | -    | -     | -  | -  | 4,72 vs 0,32*                                                        | 1 vs 0,24*         | 1,48 vs 0,5 | < 0,5              | -  | -           | -            | Ecoscreen   |
| Fonderie de recyclage d'alliages de plomb [175]     | E/NE         | 16/22    | -                                              | -    | -    | -     | -  | -  | 2,7 vs 0,53*                                                         | -                  | -           | 3,2 vs 0,52*       | -  | -           | -            | Ecoscreen   |
| Galvanisation (nickel) [176]                        | E/NE         | 39/50    | -                                              | -    | -    | -     | -  | -  | -                                                                    | 1,39 vs 0,039*     | -           | -                  | -  | -           | -            | -           |
| Fumées de soudage (GMAW/MS) [125]                   | E transv.    | 43       | -                                              | 1,5  | 2000 | 1,2   | -  | -  | -                                                                    | 1,12               | 12,02       | <0,25              | -  | -           | -            | Ecoscreen2  |
| Recyclage du plomb (batterie) [177]                 | E/NE         | 17/54    | 0,2                                            | 0,2  | 20   | 0,15  | -  | 3  | -                                                                    | 5,46 vs 0,43 pg/L* | -           | 3,08 vs 0,83 pg/L* | -  | -           | -            | Ecoscreen   |
| Fabrication de batteries [177]                      | E/NE         | 83/54    | 0,01                                           | 0,01 | 0,5  | 0,015 | -  | 1  | -                                                                    | 1,63 vs 0,43 pg/L* | -           | 2,28 vs 0,83 pg/L* | -  | -           | -            | Ecoscreen   |
| Fumées de soudage (Acier doux et inox) [124]        | E/NE         | 36/24    | -                                              | -    | -    | -     | -  | -  | -                                                                    | 2,55 vs 1,2*       | 50 vs 1,79* | -                  | -  | -           | -            | Ecoscreen2  |
| Entreprise de chromage [178]                        | E longit.    | 14       | -                                              | -    | -    | 3,6   | -  | -  | -                                                                    | -                  | -           | 2,2                | -  | -           | -            | TURBO-DECCS |
| Entreprise de chromage [127]                        | E/NE         | 24/25    | -                                              | -    | -    | 5     | -  | -  | -                                                                    | -                  | -           | 7,8 vs 0,25*       | -  | -           | -            | TURBO-DECCS |
| Entreprise de chromage [179]                        | E longit.    | 10       | -                                              | -    | -    | 4,6   | -  | -  | -                                                                    | -                  | -           | 2,6                | -  | -           | -            | TURBO-DECCS |
| Métaux dans l'EBC de sujets sains non-exposés [161] | -            | 8        | -                                              | -    | -    | -     | -  | -  | 0,57                                                                 | 0,87               | -           | 0,25               | -  | -           | -            | Rtube       |
| Métaux dans l'EBC de sujets témoins [123]           | -            | 50       | -                                              | -    | -    | -     | -  | -  | 0,1                                                                  | 1                  | 10          | -                  | -  | -           | 1            | TURBO-DECCS |

E : exposé ; NE : non-exposés ; E transv. : Etude transversale ; E longit. : Etude longitudinale ; \* : différence significative

Les métaux les plus étudiés dans l'EBC sont le chrome et le nickel. L'intérêt qu'ils présentent est justifié par leur effet cancérigène. Sur l'ensemble de ces études, il est difficile de comparer l'exposition de nos salariés à celle des autres études car les secteurs professionnels étudiés sont différents et la description des expositions n'est pas assez précise ou n'est que qualitative. Néanmoins, deux études réalisées par la même équipe de recherche se rapprochent de l'exposition de notre 2<sup>ème</sup> étude [124, 125]. Ces études ont retrouvés des concentrations de Fe-EBC et de Ni-EBC plus élevées chez des soudeurs utilisant le soudage à l'arc (dont fait partie le MIG) que chez des sujets non-exposés. Le fait que nous n'ayons pas retrouvé de différence de concentration de Fe-EBC entre les groupes exposés/non-exposés peut être dû à une plus faible exposition en rapport avec le port d'équipement de protection respiratoire ou à une compétition du Fe avec le Mn (discuté dans l'étude n°2). De plus, nous avons trouvé un effet négatif du tabac sur le Fe-EBC. Mutti et al. ont également montré le même effet du tabac sur le Fe-EBC chez des fumeurs sans que l'on puisse donner d'explication physiologique à ces observations [123].

L'EBC a également été utilisé comme marqueur d'exposition dans d'autres secteurs d'activité et des résultats similaires ont été retrouvés pour d'autres métaux comme le cobalt (Co). En effet, une équipe italienne a retrouvé des concentrations de Co-EBC significativement plus élevées chez des salariés peu exposés dans une entreprise de production de métaux durs (cobalt/tungstène) (40,7 nmol/L) que chez des sujets non-exposés (0,7 nmol/L). Les concentrations étaient d'autant plus élevées chez les salariés plus exposés (163 nmol/L) [180].

Nous avons trouvé des corrélations positives entre les concentrations des particules métalliques dans l'EBC et les indices d'exposition cumulée. Les analyses statistiques ont d'abord été orientées vers les comparaisons de taux de détectabilité entre deux groupes exposés-non exposés. Ensuite les niveaux de concentrations de particules ont été analysés en tenant compte d'un facteur confondant incontournable, le tabac. Dans un 3<sup>ème</sup> temps nous avons analysé dans un modèle multilinéaire les relations entre les concentrations de particules métalliques et des indicateurs d'exposition cumulée, dans une démarche dose-effet. Cette dernière approche appliquée aux deux groupes peut être critiquée. En effet, le fait d'inclure les sujets non-exposés dans l'analyse statistique crée un nuage de point autour d'une exposition cumulée proche de zéro, pouvant favoriser l'apparition d'une corrélation significative. Nous avons fait ce choix car nous pensons qu'il est important de prendre en compte les salariés ayant été exposés à de faibles concentrations qu'elles soient



professionnelles ou environnementales. Des expositions intermédiaires ou un plus grand nombre de sujets nous auraient permis de pallier ce défaut en ayant un nuage de point plus dispersé mais le recrutement de cette catégorie de salariés n'était pas possible sur la durée de ce projet. Autre point le calcul des indices d'exposition a été réalisé sur la base de concentrations atmosphériques mesurées avant le recueil des échantillons biologiques et sur des données d'exposition déclarées par les salariés lors de l'interrogatoire. De plus, les particules atmosphériques ont été prélevées en dehors des équipements de protection respiratoire ce qui signifie que nos indices d'exposition reflètent davantage l'exposition potentielle des salariés que leur exposition réelle. Malgré tous ces inconvénients ces indices nous semblent particulièrement pertinents car ils permettent de comparer l'intensité de l'exposition relative d'un salarié à un autre.

Ces résultats (concentrations de métaux dans l'EBC plus élevés chez les salariés que chez les contrôles, corrélations positives entre les concentrations de métaux dans l'EBC et les indices d'exposition cumulée) ont été trouvés chez des salariés récemment exposés et peuvent être interprétés avec les données physiologiques citées dans la première partie de ce manuscrit. En effet, les particules ayant atteint le compartiment alvéolaire ont une demi-vie d'épuration lente, et on peut supposer que leur concentration dans le liquide recouvrant l'épithélium respiratoire varie davantage en fonction de l'exposition que de l'efficacité des systèmes d'épuration. Une proportion de l'EBC provient également des régions pulmonaires plus proximales où l'épuration est nettement plus rapide. Les relations entre les caractéristiques de l'exposition (durée, latence et intensité) et les concentrations des métaux dans l'EBC sont complexes et les résultats obtenus à partir de nos études transversales ne permettent pas de comprendre ces observations.

L'EBC apparaît donc être une matrice pertinente pour évaluer le contenu qualitatif du liquide recouvrant l'épithélium respiratoire mais les relations quantitatives des concentrations des métaux avec les concentrations atmosphériques devront être vérifiées sur de plus larges populations.

Nous n'avons pas retrouvé de corrélation entre les concentrations des métaux dosés de l'EBC et celles dosées dans l'urine. Une autre étude a trouvé des résultats similaires pour le chrome montrant ainsi que l'EBC fournit des informations complémentaires à celles de l'analyse urinaire [178].

Lorsque les condensats sont utilisés pour quantifier des marqueurs d'exposition (métaux) il est presque toujours l'unique source d'informations. Aussi, les comparaisons avec d'autres techniques analysant le liquide recouvrant l'épithélium respiratoire comme le LBA ou l'expectoration induite (EI) sont peu nombreuses dans la littérature. Une étude a montré que les concentrations de fer pro-oxydant dans l'EBC étaient similaires à celles dosées dans le LBA de patients ayant bénéficié d'une chirurgie cardiopulmonaire [181]. Paris et al. ont montré que le nombre de corps asbestosiques comptés dans l'EI de salariés retraités anciennement exposé à l'amiante était positivement corrélé avec l'intensité, la durée et la durée cumulée de l'exposition aux fibres d'amiante [182]. L'analyse du LBA et de l'EI est surtout centrée sur le comptage cellulaire et sur les marqueurs de l'inflammation, le LBA étant surtout utilisé pour le comptage des fibres comme l'amiante. Une étude israélienne ne montrait pas de corrélation entre la durée de l'emploi et le nombre de particules comptées dans le LBA de salariés issus d'une entreprise utilisant des métaux durs et de l'oxyde d'aluminium [183]. Une autre étude a permis de corréler le nombre d'années d'exposition et le nombre de particule dans l'EI de soudeurs [184]. L'EBC présente 2 avantages importants par rapport à ces 2 techniques : il est non-invasif et il représente la région distale et proximale de l'ensemble des lobes pulmonaires alors que ces 2 autres techniques n'étudient qu'un seul lobe (LBA) ou la partie proximale des voies aériennes (EI).

L'association de l'utilisation de l'EBC et d'une étude minéralogique du parenchyme pulmonaire obtenu par biopsie permettrait de comprendre davantage les paramètres cinétiques de l'épuration des particules en étudiant la proportion des particules ayant quitté le liquide recouvrant l'épithélium respiratoire et celle ayant gagnée l'épithélium respiratoire ainsi que les structures sous-jacentes. Goldoni et al. ont combiné ces 2 techniques pour mettre en évidence la contamination en chrome issu des instruments chirurgicaux. Cette étude a montré que la concentration de chrome dans l'EBC était corrélée à celle mesurée dans le parenchyme de patients après l'exérèse chirurgicale de leur cancer bronchopulmonaire [185].

Même si les études 2 et 3 entrent dans des processus de recherche universitaire elles ont été réalisées en entreprise avec des collaborations étroites avec le médecin du travail. Les résultats ont été présentés en CHSCT et une fiche de résultats individuels a été éditée pour les soudeurs. Ainsi les salariés ont bénéficié d'un retour de résultats collectifs et individuels. Il faut également souligner le travail important de l'INRS pour le recrutement des salariés de l'étude béryllium.

# Conclusions et Perspectives

Nos résultats montrent que le dosage dans l'EBC de particules issues d'une exposition professionnelle est fiable et source d'informations complémentaires sur l'exposition. La 1<sup>ère</sup> étude a souligné l'intérêt de l'analyse qualitative des particules minérales dans l'EBC. Les deux autres études ont mis en évidence l'importance de la quantification des concentrations de particules métalliques dans les EBC. En particulier la 2<sup>ème</sup> étude a montré que le dosage du Mn dans l'EBC fournissait des données complémentaires aux dosages urinaires. De plus, la 3<sup>ème</sup> étude a montré que le dosage de plusieurs métaux permettait de mettre en évidence des profils dans l'EBC pouvant discriminer une exposition d'une autre. La concentration des particules métalliques dans l'EBC est liée à leurs concentrations dans l'atmosphère professionnelle. Ainsi, l'EBC apparaît être une matrice prometteuse pour l'évaluation de l'exposition pulmonaire en toxiques professionnels.

Pour conforter ces données, des études longitudinales sur des groupes homogènes d'exposition seront nécessaires afin de déterminer la rétention pulmonaire des particules à plus long terme et de confirmer les corrélations entre les concentrations retrouvées dans l'EBC et celles dans l'atmosphère professionnelle. De plus, des études longitudinales chez des salariés retraités anciennement exposés nous permettraient de déterminer le délai de latence maximal pendant lequel l'EBC pourrait être utilisé pour évaluer l'exposition professionnelle. Ce type d'étude nous permettrait d'analyser le taux de détection de particule dans les EBC en fonction de la durée entre la fin de l'exposition et le recueil de l'EBC. Ces résultats permettraient de déterminer en partie l'origine de l'EBC en se basant sur la variabilité de la cinétique d'épuration selon le compartiment de dépôt des particules.

Afin d'obtenir des valeurs de référence, des études en population générale seront nécessaires pour déterminer les niveaux de base en minéraux et métaux dans l'EBC. Il est aussi important que les analyses de particules dans les condensats, qui restent dans le domaine de la recherche, puissent évoluer (analyse dans des petits volumes) et se standardiser (problèmes de coûts).

Par ailleurs nos travaux ont permis de mettre en place des collaborations avec différentes équipes de recherche : l'INRS, la Faculté de Chirurgie Dentaire (EA 4490), Ultra Traces Analyses Aquitaine, le Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses de l'Université de Lille 2.

# Bibliographie

1. Smolders R, Bartonova A, Boogaard PJ, Dusinska M, Koppen G, Merlo F, Sram RJ, Vineis P, Schoeters G: **The use of biomarkers for risk assessment: Reporting from the INTARESE/ENVIRISK Workshop in Prague.** *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2010, **213**:395–400.
2. Vainio H: **Use of biomarkers in risk assessment.** *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2001, **204**:91–102.
3. Angerer J, Bird MG, Burke TA, Doerrner NG, Needham L, Robison SH, Sheldon L, Zenick H: **Strategic biomonitoring initiatives: moving the science forward.** *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 2006, **93**:3–10.
4. Edmé JL, Tellart AS, Launay D, Nevriere R, Grutzmacher C, Boulenguez C, Labalette M, Hachulla E, Hatron PY, Dessaint J-P, Matran R, Sobaszek A: **Cytokine concentrations in exhaled breath condensates in systemic sclerosis.** *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al* 2008, **57**:151–156.
5. Chérot-Kornobis N, Hulo S, Edmé J-L, de Broucker V, Matran R, Sobaszek A: **Analysis of nitrogen oxides (NOx) in the exhaled breath condensate (EBC) of subjects with asthma as a complement to exhaled nitric oxide (FeNO) measurements: a cross-sectional study.** *BMC Res. Notes* 2011, **4**:202.
6. De Broucker V, Hulo S, Cherot-Kornobis N, Lartigau-Sezary I, Matran R, Sobaszek A, Edme JL: **Interest of exhaled biomarkers in occupational asthma to latex: a case report.** *Arch. Environ. Occup. Health* 2012, **67**:170–176.
7. Chérot-Kornobis N, Hulo S, de Broucker V, Hassoun S, Lepage N, Edmé JL, Sobaszek A: **Induced sputum, exhaled NO, and breath condensate in occupational medicine.** *J. Occup. Environ. Med. Am. Coll. Occup. Environ. Med.* 2012, **54**:922–927.
8. Bates DV, Fish BR, Hatch TF, Mercer TT, Morrow PE: **Deposition and retention models for internal dosimetry of the human respiratory tract. Task group on lung dynamics.** *Health Phys.* 1966, **12**:173–207.
9. International System of Radiological Protection: *Human Respiratory Tract Model for Radiological Protection. ICRP Publication 66.* Elsevier Science Ltd. Oxford: 1994, **24 (1-3)**.
10. Weibel ER: **The Morphometry of the Human Lung.** *Academic Press* 1963:New–York.
11. Weibel ER: **What makes a good lung?** *Swiss Med. Wkly.* 2009, **139**:375–386.
12. Stuart BO: **Deposition and clearance of inhaled particles.** *Environ. Health Perspect.* 1984, **55**:369–390.
13. Yeh HC, Schum GM: **Models of human lung airways and their application to inhaled particle deposition.** *Bull. Math. Biol.* 1980, **42**:461–480.
14. Lippmann M, Yeates DB, Albert RE: **Deposition, retention, and clearance of inhaled particles.** *Br. J. Ind. Med.* 1980, **37**:337–362.
15. Reynolds SD, Malkinson AM: **Clara cell: progenitor for the bronchiolar epithelium.** *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2010, **42**:1–4.
16. Dobbs LG, Johnson MD, Vanderbilt J, Allen L, Gonzalez R: **The great big alveolar TI cell: evolving concepts and paradigms.** *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2010, **25**:55–62.
17. Carvalho TC, Peters JI, Williams RO 3rd: **Influence of particle size on regional lung deposition--what evidence is there?** *Int. J. Pharm.* 2011, **406**:1–10.
18. Hinds WC: **Respiratory deposition.** In *Aerosol Technol. Prop. Behav. Meas. Airborne Part.* 2nd edition. New York: Wiley; 1999:233–259.
19. Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J: **Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles.** *Environ. Health Perspect.* 2005, **113**:823–839.
20. Sturm R: **A computer model for the clearance of insoluble particles from the tracheobronchial tree of the human lung.** *Comput. Biol. Med.* 2007, **37**:680–690.

21. Fahy JV, Dickey BF: **Airway mucus function and dysfunction.** *N. Engl. J. Med.* 2010, **363**:2233–2247.
22. Mercer RR, Russell ML, Crapo JD: **Mucous lining layers in human and rat airways.** *Ann Rev Resp Dis* 1992, **145**:355.
23. Sears PR, Davis CW, Chua M, Sheehan JK: **Mucociliary interactions and mucus dynamics in ciliated human bronchial epithelial cell cultures.** *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2011, **301**:L181–186.
24. Sturm R, Hofmann W: **Stochastic modeling predictions for the clearance of insoluble particles from the tracheobronchial tree of the human lung.** *Bull. Math. Biol.* 2007, **69**:395–415.
25. Houtmeyers E, Gosselink R, Gayan-Ramirez G, Decramer M: **Regulation of mucociliary clearance in health and disease.** *Eur. Respir. J.* 1999, **13**:1177–1188.
26. Braun J-J, Hoffmann L, Gentine A: **[The respiratory mucociliary system and its exploration in primary ciliary dyskinesia].** *Ann. Oto-Laryngol. Chir. Cervico Faciale Bull. Société Oto-Laryngol. Hôp. Paris* 2005, **122**:69–75.
27. Liote H, Puchelle E, Zahm J-M: **Physiologie et physiopathologie de l'épuration du mucus des voies aériennes.** *EMC - Pneumol.* 1999:1–15 [Article 6–000–A–67].
28. Smith DJ, Gaffney EA, Blake JR: **Modelling mucociliary clearance.** *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2008, **163**:178–188.
29. Puchelle E, Zahm JM, Girard F, Bertrand A, Polu JM, Aug F, Sadoul P: **Mucociliary transport in vivo and in vitro. Relations to sputum properties in chronic bronchitis.** *Eur. J. Respir. Dis.* 1980, **61**:254–264.
30. Salathe M: **Regulation of mammalian ciliary beating.** *Annu. Rev. Physiol.* 2007, **69**:401–422.
31. Daviskas E, Anderson SD, Gonda I, Bailey D, Bautovich G, Seale JP: **Mucociliary clearance during and after isocapnic hyperventilation with dry air in the presence of frusemide.** *Eur. Respir. J.* 1996, **9**:716–724.
32. Crouch E, Hartshorn K, Ofek I: **Collectins and pulmonary innate immunity.** *Immunol. Rev.* 2000, **173**:52–65.
33. Miyata R, van Eeden SF: **The innate and adaptive immune response induced by alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter.** *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2011, **257**:209–226.
34. Oberdörster G: **Lung particle overload: implications for occupational exposures to particles.** *Regul. Toxicol. Pharmacol. RTP* 1995, **21**:123–135.
35. Gregoratto D, Bailey MR, Marsh JW: **Modelling particle retention in the alveolar-interstitial region of the human lungs.** *J. Radiol. Prot. Off. J. Soc. Radiol. Prot.* 2010, **30**:491–512.
36. Morrow PE: **Possible mechanisms to explain dust overloading of the lungs.** *Fundam. Appl. Toxicol. Off. J. Soc. Toxicol.* 1988, **10**:369–384.
37. Dethloff LA, Lehnert BE: **Pulmonary interstitial macrophages: isolation and flow cytometric comparisons with alveolar macrophages and blood monocytes.** *J. Leukoc. Biol.* 1988, **43**:80–90.
38. Scheffer GL, Pijnenborg ACLM, Smit EF, Müller M, Postma DS, Timens W, van der Valk P, de Vries EGE, Scheper RJ: **Multidrug resistance related molecules in human and murine lung.** *J. Clin. Pathol.* 2002, **55**:332–339.
39. Leslie EM, Deeley RG, Cole SPC: **Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense.** *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005, **204**:216–237.
40. Van der Deen M, de Vries EGE, Timens W, Scheper RJ, Timmer-Bosscha H, Postma DS: **ATP-binding cassette (ABC) transporters in normal and pathological lung.** *Respir. Res.* 2005, **6**:59.
41. Schulze C, Schaefer UF, Ruge CA, Wohlleben W, Lehr C-M: **Interaction of metal oxide nanoparticles with lung surfactant protein A.** *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Für Pharm. Verfahrenstechnik EV* 2011, **77**:376–383.
42. Kanno S, Furuyama A, Hirano S: **A murine scavenger receptor MARCO recognizes polystyrene nanoparticles.** *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 2007, **97**:398–406.
43. Mühlfeld C, Gehr P, Rothen-Rutishauser B: **Translocation and cellular entering mechanisms of nanoparticles in the respiratory tract.** *Swiss Med. Wkly.* 2008, **138**:387–391.

44. Geiser M, Casaulta M, Kupferschmid B, Schulz H, Semmler-Behnke M, Kreyling W: **The role of macrophages in the clearance of inhaled ultrafine titanium dioxide particles.** *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2008, **38**:371–376.
45. Lundborg M, Johard U, Låstbom L, Gerde P, Camner P: **Human alveolar macrophage phagocytic function is impaired by aggregates of ultrafine carbon particles.** *Environ. Res.* 2001, **86**:244–253.
46. Oberdörster G, Ferin J, Lehnert BE: **Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury.** *Environ. Health Perspect.* 1994, **102 Suppl 5**:173–179.
47. Fazlollahi F, Sipos A, Kim YH, Hamm-Alvarez SF, Borok Z, Kim K-J, Crandall ED: **Translocation of PEGylated quantum dots across rat alveolar epithelial cell monolayers.** *Int. J. Nanomedicine* 2011, **6**:2849–2857.
48. Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schürch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, Im Hof V, Heyder J, Gehr P: **Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells.** *Environ. Health Perspect.* 2005, **113**:1555–1560.
49. Wilson MR, Lightbody JH, Donaldson K, Sales J, Stone V: **Interactions between ultrafine particles and transition metals in vivo and in vitro.** *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2002, **184**:172–179.
50. Wu W, Jaspers I, Zhang W, Graves LM, Samet JM: **Role of Ras in metal-induced EGF receptor signaling and NF-kappaB activation in human airway epithelial cells.** *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2002, **282**:L1040–1048.
51. Nemmar A, Hoet PHM, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, Vanbilloen H, Mortelmans L, Nemery B: **Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans.** *Circulation* 2002, **105**:411–414.
52. Kreyling WG, Semmler-Behnke M, Takenaka S, Möller W: **Differences in the biokinetics of inhaled nano-versus micrometer-sized particles.** *Acc. Chem. Res.* 2013, **46**:714–722.
53. Geiser M, Kreyling WG: **Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles.** *Part. Fibre Toxicol.* 2010, **7**:2.
54. Brain JD, Godleski J, Kreyling W: **In vivo evaluation of chemical biopersistence of nonfibrous inorganic particles.** *Environ. Health Perspect.* 1994, **102 Suppl 5**:119–125.
55. Bailey MR, Fry FA, James AC: **The long-term clearance kinetics of insoluble particles from the human lung.** *Ann. Occup. Hyg.* 1982, **26**:273–290.
56. Bailey MR, Ansoberlo E, Guilmette RA, Paquet F: **Updating the ICRP human respiratory tract model.** *Radiat. Prot. Dosimetry* 2007, **127**:31–34.
57. Falk R, Philipson K, Svartengren M, Bergmann R, Hofmann W, Jarvis N, Bailey M, Camner P: **Assessment of long-term bronchiolar clearance of particles from measurements of lung retention and theoretical estimates of regional deposition.** *Exp. Lung Res.* 1999, **25**:495–516.
58. Davis K, Marsh JW, Gerondal M, Bailey MR, Le Guen B: **Assessment of intakes and doses to workers followed for 15 years after accidental inhalation of 60CO.** *Health Phys.* 2007, **92**:332–344.
59. Kuempel ED, O’Flaherty EJ, Stayner LT, Smith RJ, Green FH, Vallyathan V: **A biomathematical model of particle clearance and retention in the lungs of coal miners.** *Regul. Toxicol. Pharmacol. RTP* 2001, **34**:69–87.
60. Philipson K, Falk R, Gustafsson J, Camner P: **Long-term lung clearance of 195Au-labeled teflon particles in humans.** *Exp. Lung Res.* 1996, **22**:65–83.
61. Mann J, Kirchner R: **Evaluation of Lung Burden Following Acute Inhalation Exposure to Highly Insoluble PuO<sub>2</sub>.** *Health Phys. August 1967* 1967, **13**:877–882.
62. Dodig S, Cepelak I: **Exhaled breath condensate--from an analytical point of view.** *Biochem. Medica* 2013, **23**:281–295.
63. Kubáň P, Foret F: **Exhaled breath condensate: Determination of non-volatile compounds and their potential for clinical diagnosis and monitoring. A review.** *Anal. Chim. Acta* 2013, **805**:1–18.
64. Kietzmann D, Kahl R, Müller M, Burchardi H, Kettler D: **Hydrogen peroxide in expired breath condensate of patients with acute respiratory failure and with ARDS.** *Intensive Care Med.* 1993, **19**:78–81.

65. Carpenter CT, Price PV, Christman BW: **Exhaled breath condensate isoprostanes are elevated in patients with acute lung injury or ARDS.** *Chest* 1998, **114**:1653–1659.
66. Larsson P, Mirgorodskaya E, Samuelsson L, Bake B, Almstrand A-C, Bredberg A, Olin A-C: **Surfactant protein A and albumin in particles in exhaled air.** *Respir. Med.* 2012, **106**:197–204.
67. Font-Ribera L, Kogevinas M, Zock J-P, Gómez FP, Barreiro E, Nieuwenhuijsen MJ, Fernandez P, Lourencetti C, Pérez-Olabarría M, Bustamante M, Marcos R, Grimalt JO, Villanueva CM: **Short-term changes in respiratory biomarkers after swimming in a chlorinated pool.** *Environ. Health Perspect.* 2010, **118**:1538–1544.
68. McCafferty JB, Bradshaw TA, Tate S, Greening AP, Innes JA: **Effects of breathing pattern and inspired air conditions on breath condensate volume, pH, nitrite, and protein concentrations.** *Thorax* 2004, **59**:694–698.
69. Holmgren H, Bake B, Olin A-C, Ljungström E: **Relation between humidity and size of exhaled particles.** *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 2011, **24**:253–260.
70. Koczulla AR, Noeske S, Herr C, Dette F, Pinkenburg O, Schmid S, Jörres RA, Vogelmeier C, Bals R: **Ambient temperature impacts on pH of exhaled breath condensate.** *Respirol. Carlton Vic* 2010, **15**:155–159.
71. Bondesson E, Jansson LT, Bengtsson T, Wollmer P: **Exhaled breath condensate-site and mechanisms of formation.** *J. Breath Res.* 2009, **3**:016005.
72. Johnson GR, Morawska L: **The mechanism of breath aerosol formation.** *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 2009, **22**:229–237.
73. Effros RM, Dunning MB 3rd, Biller J, Shaker R: **The promise and perils of exhaled breath condensates.** *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2004, **287**:L1073–1080.
74. Fairchild CI, Stampfer JF: **Particle concentration in exhaled breath.** *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 1987, **48**:948–949.
75. Papineni RS, Rosenthal FS: **The size distribution of droplets in the exhaled breath of healthy human subjects.** *J. Aerosol Med. Off. J. Int. Soc. Aerosols Med.* 1997, **10**:105–116.
76. Effros RM, Biller J, Foss B, Hoagland K, Dunning MB, Castillo D, Bosbous M, Sun F, Shaker R: **A simple method for estimating respiratory solute dilution in exhaled breath condensates.** *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003, **168**:1500–1505.
77. Chérot-Kornobis N. **Évaluation méthodologique et clinique des marqueurs de l'atteinte pulmonaire dans l'air exhalé : comparaison de sujets présentant une pathologie respiratoire chronique et sujets témoins.** [Thèse de Doctorat]. France: Université de Lille 2. 2012. Disponible : <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00786452>.
78. Goldoni M, Catalani S, De Palma G, Manini P, Acampa O, Corradi M, Bergonzi R, Apostoli P, Mutti A: **Exhaled breath condensate as a suitable matrix to assess lung dose and effects in workers exposed to cobalt and tungsten.** *Environ. Health Perspect.* 2004, **112**:1293–1298.
79. Mutti A, Corradi M: **Recent developments in human biomonitoring: non-invasive assessment of target tissue dose and effects of pneumotoxic metals.** *Med. Lav.* 2006, **97**:199–206.
80. Miller MR, Crapo R, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, Enright P, van der Grinten CPM, Gustafsson P, Jensen R, Johnson DC, MacIntyre N, McKay R, Navajas D, Pedersen OF, Pellegrino R, Viegi G, Wanger J: **General considerations for lung function testing.** *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* 2005, **26**:153–161.
81. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, Crapo R, Enright P, van der Grinten CPM, Gustafsson P, Jensen R, Johnson DC, MacIntyre N, McKay R, Navajas D, Pedersen OF, Pellegrino R, Viegi G, Wanger J: **Standardisation of spirometry.** *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* 2005, **26**:319–338.
82. ATS/ERS: **ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005.** *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2005, **171**:912–930.
83. Flohr TG, McCollough CH, Bruder H, Petersilka M, Gruber K, Süß C, Grasruck M, Stierstorfer K, Krauss B, Raupach R, Primak AN, Küttner A, Achenbach S, Becker C, Kopp A, Ohnesorge BM: **First performance evaluation of a dual-source CT (DSCT) system.** *Eur. Radiol.* 2006, **16**:256–268.

84. British Geological Survey: *World mineral production 2006-2010*. Keyworth, Nottingham: British Geological Survey; 2012.
85. Chalmers JM, Griffiths PR: *Handbook of vibrational spectroscopy*. Chichester, UK: J. Wiley; 2002, 5.
86. Batonneau Y, Sobanska S, Laureyns J, Bremard C: **Confocal microprobe Raman imaging of urban tropospheric aerosol particles**. *Environ. Sci. Technol.* 2006, **40**:1300–1306.
87. Ivleva NP, McKeon U, Niessner R, Pöschl U: **Raman Microspectroscopic Analysis of Size-Resolved Atmospheric Aerosol Particle Samples Collected with an ELPI: Soot, Humic-Like Substances, and Inorganic Compounds**. *Aerosol Sci. Technol.* 2007, **41**:655–671.
88. Rinaudo C, Allegrina M, Fornero E, Musa M, Croce A, Bellis D: **Micro-Raman spectroscopy and VP-SEM/EDS applied to the identification of mineral particles and fibres in histological sections**. *J. Raman Spectrosc.* 2010, **41**:27–32.
89. Choël M, Deboudt K, Flament P: **Development of Time-Resolved Description of Aerosol Properties at the Particle Scale During an Episode of Industrial Pollution Plume**. *Water. Air. Soil Pollut.* 2010, **209**:93–107.
90. Song Y-C, Ryu J, Malek MA, Jung H-J, Ro C-U: **Chemical speciation of individual airborne particles by the combined use of quantitative energy-dispersive electron probe X-ray microanalysis and attenuated total reflection Fourier transform-infrared imaging techniques**. *Anal. Chem.* 2010, **82**:7987–7998.
91. Mulliez P, Billon-Galland M-A, Dansin E, Janson X, Plisson J-P: **[Bronchial anthracosis and pulmonary mica overload]**. *Rev. Mal. Respir.* 2003, **20**:267–271.
92. Chao CYH, Wan MP, Morawska L, Johnson GR, Ristovski ZD, Hargreaves M, Mengersen K, Corbett S, Li Y, Xie X, Katoshevski D: **Characterization of expiration air jets and droplet size distributions immediately at the mouth opening**. *J. Aerosol Sci.* 2009, **40**:122–133.
93. Antonini JM: **Health effects of welding**. *Crit. Rev. Toxicol.* 2003, **33**:61–103.
94. Antonini JM, Taylor MD, Zimmer AT, Roberts JR: **Pulmonary responses to welding fumes: role of metal constituents**. *J. Toxicol. Environ. Health A* 2004, **67**:233–249.
95. IARC: **Welding**. In *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. Vol 49 Chromium Nickel Weld*. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France: 1990:447–508.
96. Bowler RM, Roels HA, Nakagawa S, Drezgic M, Diamond E, Park R, Koller W, Bowler RP, Mergler D, Bouchard M, Smith D, Gwiazda R, Doty RL: **Dose-effect relationships between manganese exposure and neurological, neuropsychological and pulmonary function in confined space bridge welders**. *Occup. Environ. Med.* 2007, **64**:167–177.
97. Roels H, Sarhan MJ, Hanotiau I, de Fays M, Genet P, Bernard A, Buchet JP, Lauwerys R: **Preclinical toxic effects of manganese in workers from a Mn salts and oxides producing plant**. *Sci. Total Environ.* 1985, **42**:201–206.
98. Roels H, Lauwerys R, Buchet JP, Genet P, Sarhan MJ, Hanotiau I, de Fays M, Bernard A, Stanescu D: **Epidemiological survey among workers exposed to manganese: effects on lung, central nervous system, and some biological indices**. *Am. J. Ind. Med.* 1987, **11**:307–327.
99. Laohaudomchok W, Lin X, Herrick RF, Fang SC, Cavallari JM, Shrairman R, Landau A, Christiani DC, Weisskopf MG: **Neuropsychological effects of low-level manganese exposure in welders**. *Neurotoxicology* 2011, **32**:171–179.
100. Leem JH, Hong YC, Song JS, Park W, Han HS: **Pulmonary fibrosis in a steel mill worker**. *J. Korean Med. Sci.* 2000, **15**:224–228.
101. Hoet P, Vanmarcke E, Geens T, Deumer G, Haufroid V, Roels HA: **Manganese in plasma: a promising biomarker of exposure to Mn in welders. A pilot study**. *Toxicol. Lett.* 2012, **213**:69–74.
102. Järvisalo J, Olkinuora M, Kiilunen M, Kivistö H, Ristola P, Tossavainen A, Aitio A: **Urinary and blood manganese in occupationally nonexposed populations and in manual metal arc welders of mild steel**. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 1992, **63**:495–501.
103. Roels HA, Ghyselen P, Buchet JP, Ceulemans E, Lauwerys RR: **Assessment of the permissible exposure level to manganese in workers exposed to manganese dioxide dust**. *Br. J. Ind. Med.* 1992, **49**:25–34.



104. Zheng W, Fu SX, Dydak U, Cowan DM: **Biomarkers of manganese intoxication.** *Neurotoxicology* 2011, **32**:1–8.
105. British Occupational Hygiene Society Committee on Hygiene Standards, Sub-Committee on Vegetable Textile Dusts: **A basis for hygiene standards for flax dust.** *Ann. Occup. Hyg.* 1980, **23**:1–17.
106. Marez T, Edmé JL, Boulenguez C, Shirali P, Haguenoer JM: **Bronchial symptoms and respiratory function in workers exposed to methylmethacrylate.** *Br. J. Ind. Med.* 1993, **50**:894–897.
107. American Thoracic Society, European Respiratory Society: **ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide.** *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2005, **171**:912–930.
108. INRS: *INRS - Métaux-Métalloïdes - Fiche Metropol 003/V01.* Paris, France: 2008.
109. U.S. Environmental Protection Agency: *Health Effects Support Document for Manganese. Report No. EPA 822-R-03-003.* Health and Ecological Criteria Division, Washington DC 20460: 2003.
110. U.S. Environmental Protection Agency: *Health assessment document for nickel. Report No. EPA/600/8-83/012F.* Office of Research and Development, Washington DC: 1985.
111. U.S. Environmental Protection Agency: *Noncarcinogenic effects of chromium: Update to health assessment document. Report No. EPA/600/8-87/048F.* Office of Health and Environmental Assessment, Washington DC: 1990.
112. U.S. Environmental Protection Agency: *Air Pollution Aspects of Iron and its Compounds. Report prepared for the National Air Pollution Control Administration Consumer Protection and Environmental Health Service (Contract No. PH-22-68-25).* Washington DC: 1969.
113. Horváth I, Hunt J, Barnes PJ, Alving K, Antczak A, Baraldi E, Becher G, van Beurden WJC, Corradi M, Dekhuijzen R, Dweik RA, Dwyer T, Effros R, Erzurum S, Gaston B, Gessner C, Greening A, Ho LP, Hohlfeld J, Jöbbsis Q, Laskowski D, Loukides S, Marlin D, Montuschi P, Olin AC, Redington AE, Reinhold P, van Rensen ELJ, Rubinstein I, Silkoff P, Toren K, Vass G, Vogelberg C, Wirtz H: **Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions.** *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* 2005, **26**:523–548.
114. Stern RM, Berlin A, Fletcher A, Hemminki K, Jarvisalo J, Peto J: **International conference on health hazards and biological effects of welding fumes and gases.** *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 1986, **57**:237–246.
115. Taube F: **Manganese in occupational arc welding fumes--aspects on physiochemical properties, with focus on solubility.** *Ann. Occup. Hyg.* 2013, **57**:6–25.
116. Lundborg M, Lind B, Camner P: **Ability of rabbit alveolar macrophages to dissolve metals.** *Exp. Lung Res.* 1984, **7**:11–22.
117. Newland MC, Ceckler TL, Kordower JH, Weiss B: **Visualizing manganese in the primate basal ganglia with magnetic resonance imaging.** *Exp. Neurol.* 1989, **106**:251–258.
118. Kalliomäki PL, Olkinuora M, Hyvärinen HK, Kalliomäki K: **Kinetics of nickel and chromium in rats exposed to different stainless-steel welding fumes.** *IARC Sci. Publ.* 1984:385–393.
119. Lin T-S, Wu C-C, Wu J-D, Wei C-H: **Oxidative DNA damage estimated by urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and arsenic in glass production workers.** *Toxicol. Ind. Health* 2012, **28**:513–521.
120. Soleo L, Lovreglio P, Panuzzo L, D'Errico MN, Basso A, Gilberti ME, Drago I, Tomasi C, Apostoli P: **[Health risk assessment of exposure to metals in the workers of the steel foundry and in the general population of Taranto (Italy)].** *G. Ital. Med. Lav. Ergon.* 2012, **34**:381–391.
121. Watanabe T, Nakatsuka H, Ohashi M, Ikeda M: **Levels of manganese in the urine of female farmers in non-polluted regions in Japan.** *Sci. Total Environ.* 1989, **79**:85–93.
122. Stern RM, Drenck K, Lyngenbo O, Dirksen H, Groth S: **Thoracic magnetic dust content, occupational exposure, and respiratory status of shipyard welders.** *Arch. Environ. Health* 1988, **43**:361–370.
123. Mutti A, Corradi M, Goldoni M, Vettori MV, Bernard A, Apostoli P: **Exhaled metallic elements and serum pneumoproteins in asymptomatic smokers and patients with COPD or asthma.** *Chest* 2006, **129**:1288–1297.

124. Hoffmeyer F, Weiß T, Lehnert M, Pesch B, Berresheim H, Henry J, Raulf-Heimsoth M, Broding HC, Bünger J, Harth V, Brüning T: **Increased metal concentrations in exhaled breath condensate of industrial welders.** *J. Environ. Monit. JEM* 2010.
125. Hoffmeyer F, Raulf-Heimsoth M, Weiss T, Lehnert M, Gawrych K, Kendzia B, Harth V, Henry J, Pesch B, Brüning T: **Relation between biomarkers in exhaled breath condensate and internal exposure to metals from gas metal arc welding.** *J. Breath Res.* 2012, **6**:027105.
126. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA: **Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter.** *Nature* 1997, **388**:482–488.
127. Caglieri A, Goldoni M, Acampa O, Andreoli R, Vettori MV, Corradi M, Apostoli P, Mutti A: **The effect of inhaled chromium on different exhaled breath condensate biomarkers among chrome-plating workers.** *Environ. Health Perspect.* 2006, **114**:542–546.
128. Kauppinen T, Toikkanen J, Pedersen D, Young R, Ahrens W, Boffetta P, Hansen J, Kromhout H, Maqueda Blasco J, Mirabelli D, de la Orden-Rivera V, Pannett B, Plato N, Savela A, Vincent R, Kogevinas M: **Occupational exposure to carcinogens in the European Union.** *Occup. Environ. Med.* 2000, **57**:10–18.
129. Vincent R, Catani J, Créau Y, Frocaut A-M, Good A, Goutet P, Hou A, Leray F, André-Lesage M-A, Soyeux A: **Occupational exposure to beryllium in French enterprises: a survey of airborne exposure and surface levels.** *Ann. Occup. Hyg.* 2009, **53**:363–372.
130. Marchand-Adam S, Valeyre D: **[Chronic pulmonary berylliosis: a model of interaction between environment and genetic predisposition (Part 1). Mineralogy, toxicology, epidemiology and risk factors].** *Rev. Mal. Respir.* 2005, **22**:257–269.
131. Marchand-Adam S, Guillon F, Brauner M, Valeyre D: **[Chronic beryllium disease: a model of interaction between environmental exposure and genetic predisposition. Pathogenesis and clinical features (Part 2)].** *Rev. Mal. Respir.* 2005, **22**:271–287.
132. Kelleher PC, Martyny JW, Mroz MM, Maier LA, Rutenber AJ, Young DA, Newman LS: **Beryllium particulate exposure and disease relations in a beryllium machining plant.** *J. Occup. Environ. Med. Am. Coll. Occup. Environ. Med.* 2001, **43**:238–249.
133. Taiwo OA, Slade MD, Cantley LF, Kirsche SR, Wesdock JC, Cullen MR: **Prevalence of beryllium sensitization among aluminium smelter workers.** *Occup. Med. Oxf. Engl.* 2010, **60**:569–571.
134. Borak J: **The beryllium occupational exposure limit: historical origin and current inadequacy.** *J. Occup. Environ. Med. Am. Coll. Occup. Environ. Med.* 2006, **48**:109–116.
135. American Conference of Governmental Industrial Hygienists: *Beryllium and Compounds: TLV® Chemical Substances 7th Edition Documentation.* Cincinnati: 2009:14.
136. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail: *Valeurs limites d'exposition en milieu professionnel - Le béryllium et ses composés.* Maisons-Alfort: 2010:74.
137. Apostoli P, Schaller KH: **Urinary beryllium--a suitable tool for assessing occupational and environmental beryllium exposure?** *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 2001, **74**:162–166.
138. Donovan EP, Kolanz ME, Galbraith DA, Chapman PS, Paustenbach DJ: **Performance of the beryllium blood lymphocyte proliferation test based on a long-term occupational surveillance program.** *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 2007, **81**:165–178.
139. Lindsay SJ, Dobbs DCL: **Beryllium in Pot Room Bath.** In *Essent. Read. Light Met.* edited by Bearne G, Dupuis rc, Tarcy G John Wiley & Sons, Inc.; 2013:596–601.
140. WORLD HEALTH ORGANIZATION: *Beryllium : health and safety guide.* Geneva: WORLD HEALTH ORGANIZATION; 1990.
141. Skaugset NP, Ellingsen DG, Dahl K, Martinsen I, Jordbekken L, Drabløs PA, Thomassen Y: **Occupational exposure to beryllium in primary aluminium production.** *J. Environ. Monit. JEM* 2012, **14**:353–359.
142. Greenbaum MA, Foster JN, Arin ML, Farber M: **THE THERMODYNAMIC AND PHYSICAL PROPERTIES OF BERYLLIUM COMPOUNDS. I. ENTHALPY AND ENTROPY OF VAPORIZATION OF BERYLLIUM FLUORIDE<sup>1,2</sup>.** *J. Phys. Chem.* 1963, **67**:36–40.

143. Taiwo OA, Slade MD, Cantley LF, Fiellin MG, Wesdock JC, Bayer FJ, Cullen MR: **Beryllium sensitization in aluminum smelter workers.** *J. Occup. Environ. Med. Am. Coll. Occup. Environ. Med.* 2008, **50**:157–162.
144. Thomassen Y, Koch W, Dunkhorst W, Ellingsen DG, Skaugset N-P, Jordbekken L, Arne Drabløs P, Weinbruch S: **Ultrafine particles at workplaces of a primary aluminium smelter.** *J. Environ. Monit. JEM* 2006, **8**:127–133.
145. Dasch J, D'Arcy J: **Physical and chemical characterization of airborne particles from welding operations in automotive plants.** *J. Occup. Environ. Hyg.* 2008, **5**:444–454.
146. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR): *Toxicological profile for Aluminum.* Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service: 2008:310.
147. Muller C, Mazer B, Salehi F, Audusseau S, Chevalier G, Truchon G, Larivière P, Paquette V, Lambert J, Zayed J: **Urinary levels, tissue concentrations and lung inflammation after nose-only exposure to three different chemical forms of beryllium.** *J. Appl. Toxicol. JAT* 2010, **30**:411–415.
148. Elinder CG, Ahrengart L, Lidums V, Pettersson E, Sjögren B: **Evidence of aluminium accumulation in aluminium welders.** *Br. J. Ind. Med.* 1991, **48**:735–738.
149. Sjögren B, Elinder CG, Lidums V, Chang G: **Uptake and urinary excretion of aluminum among welders.** *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 1988, **60**:77–79.
150. Sjögren B, Lidums V, Håkansson M, Hedström L: **Exposure and urinary excretion of aluminum during welding.** *Scand. J. Work. Environ. Health* 1985, **11**:39–43.
151. Kent MS, Robins TG, Madl AK: **Is total mass or mass of alveolar-deposited airborne particles of beryllium a better predictor of the prevalence of disease? A preliminary study of a beryllium processing facility.** *Appl. Occup. Environ. Hyg.* 2001, **16**:539–558.
152. Bruce RM, Odin M: **Beryllium and beryllium compounds.** 2001, **Concise international chemical assessment document (CICAD), no. 32.** Geneva, World Health Organization:75.
153. Karrasch S, Ernst K, Behr J, Heinrich J, Huber RM, Nowak D, Wichmann H-E, Baumeister SE, Meisinger C, Ladwig K-H, Holle R, Jörres RA, Schulz H, KORA Study Group: **Exhaled nitric oxide and influencing factors in a random population sample.** *Respir. Med.* 2011, **105**:713–718.
154. Rava M, Varraso R, Decoster B, Huyvaert H, Le Moual N, Jacquemin B, Künzli N, Kauffmann F, Zerimech F, Matran R, Nadif R: **Plasma and exhaled breath condensate nitrite-nitrate level in relation to environmental exposures in adults in the EGEA study.** *Nitric Oxide Biol. Chem. Off. J. Nitric Oxide Soc.* 2012, **27**:169–175.
155. Gube M, Ebel J, Brand P, Göen T, Holzinger K, Reisinger U, Kraus T: **Biological effect markers in exhaled breath condensate and biomonitoring in welders: impact of smoking and protection equipment.** *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 2010, **83**:803–811.
156. Falgayrac G, Chérot-Kornobis N, Broucker V de, Hulo S, Edmé J-L, Sobaszek A, Penel G: **Noninvasive molecular identification of particulate matter in lungs by Raman microspectrometry.** *J. Raman Spectrosc.* 2011, **42**:1484–1487.
157. Hulo S, Cherot-Kornobis N, Edme J-L, de Broucker V, Falgayrac G, Penel G, Legrand-Cattan K, Remy J, Sobaszek A: **Mica dust and pneumoconiosis: example of a pure occupational exposure in a muscovite milling unit.** *J. Occup. Environ. Med. Am. Coll. Occup. Environ. Med.* 2013, **55**:1469–1474.
158. Hulo S, Cherot-Kornobis N, Howsam M, Crucq S, de Broucker V, Sobaszek A, Edme J.: **Manganese in exhaled breath condensate: a new marker of exposure to welding fumes.** *Toxicol. Lett.* :in submission in Toxicology Letters.
159. Boyce PD, Kim JY, Weissman DN, Hunt J, Christiani DC: **pH increase observed in exhaled breath condensate from welding fume exposure.** *J. Occup. Environ. Med. Am. Coll. Occup. Environ. Med.* 2006, **48**:353–356.
160. Hoffmeyer F, Raulf-Heimsoth M, Lehnert M, Kendzia B, Bernard S, Berresheim H, Düser M, Henry J, Weiss T, Koch HM, Pesch B, Brüning T, Weldox Group: **Impact of different welding techniques on biological effect markers in exhaled breath condensate of 58 mild steel welders.** *J. Toxicol. Environ. Health A* 2012, **75**:525–532.

161. Fox JR, Spannhake EW, Macri KK, Torrey CM, Mihalic JN, Eftim SE, Lees PSJ, Geyh AS: **Characterization of a portable method for the collection of exhaled breath condensate and subsequent analysis of metal content.** *Environ. Sci. Process. Impacts* 2013, **15**:721–729.
162. Corradi M, Mutti A: **News from the Breath Analysis Summit 2011.** *J. Breath Res.* 2012, **6**:020201.
163. Lundborg M, Eklund A, Lind B, Camner P: **Dissolution of metals by human and rabbit alveolar macrophages.** *Br. J. Ind. Med.* 1985, **42**:642–645.
164. Finch GL, Lowther WT, Hoover MD, Brooks AL: **Effects of beryllium metal particles on the viability and function of cultured rat alveolar macrophages.** *J. Toxicol. Environ. Health* 1991, **34**:103–114.
165. Finch GL, Verburg RJ, Mewhinney JA, Eidson AF, Hoover MD: **The effect of beryllium compound solubility on in vitro canine alveolar macrophage cytotoxicity.** *Toxicol. Lett.* 1988, **41**:97–105.
166. Chow S, Campbell C, Sandrini A, Thomas PS, Johnson AR, Yates DH: **Exhaled breath condensate biomarkers in asbestos-related lung disorders.** *Respir. Med.* 2009, **103**:1091–1097.
167. Lehtimäki L, Oksa P, Järvenpää R, Vierikko T, Nieminen R, Kankaanranta H, Uitti J, Moilanen E: **Pulmonary inflammation in asbestos-exposed subjects with borderline parenchymal changes on HRCT.** *Respir. Med.* 2010, **104**:1042–1049.
168. Lehtonen H, Oksa P, Lehtimäki L, Sepponen A, Nieminen R, Kankaanranta H, Saarelainen S, Järvenpää R, Uitti J, Moilanen E: **Increased alveolar nitric oxide concentration and high levels of leukotriene B(4) and 8-isoprostane in exhaled breath condensate in patients with asbestosis.** *Thorax* 2007, **62**:602–607.
169. Pelclová D, Fenclová Z, Kacer P, Kuzma M, Navrátil T, Lebedová J: **Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress in exhaled breath condensate in subjects with asbestos exposure.** *Ind. Health* 2008, **46**:484–489.
170. Pelclová D, Fenclová Z, Kacer P, Navrátil T, Kuzma M, Lebedová JK, Klusácková P: **8-isoprostane and leukotrienes in exhaled breath condensate in Czech subjects with silicosis.** *Ind. Health* 2007, **45**:766–774.
171. Pelclová D, Fenclová Z, Syslová K, Vlčková S, Lebedová J, Pecha O, Běláček J, Navrátil T, Kuzma M, Kačer P: **Oxidative stress markers in exhaled breath condensate in lung fibroses are not significantly affected by systemic diseases.** *Ind. Health* 2011, **49**:746–754.
172. Pelclová D, Fenclová Z, Vlčková S, Lebedová J, Syslová K, Pecha O, Beláček J, Navrátil T, Kuzma M, Kacer P: **Leukotrienes B4, C4, D4 and E4 in the exhaled breath condensate (EBC), blood and urine in patients with pneumoconiosis.** *Ind. Health* 2012, **50**:299–306.
173. Syslová K, Kačer P, Kuzma M, Pankráčová A, Fenclová Z, Vlčková S, Lebedová J, Pelclová D: **LC-ESI-MS/MS method for oxidative stress multimarker screening in the exhaled breath condensate of asbestosis/silicosis patients.** *J. Breath Res.* 2010, **4**:017104.
174. Syslová K, Kacer P, Kuzma M, Najmanová V, Fenclová Z, Vlčková S, Lebedová J, Pelclová D: **Rapid and easy method for monitoring oxidative stress markers in body fluids of patients with asbestos or silica-induced lung diseases.** *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 2009, **877**:2477–2486.
175. Félix PM, Franco C, Barreiros MA, Batista B, Bernardes S, Garcia SM, Almeida AB, Almeida SM, Wolterbeek HT, Pinheiro T: **Biomarkers of exposure to metal dust in exhaled breath condensate: methodology optimization.** *Arch. Environ. Occup. Health* 2013, **68**:72–79.
176. Romano A, Aiani MR, Brambilla M, Brambilla P, Carcano M, Galbiati E, Porro S, Mascagni P: **[Metabolomic profiles of exhaled breath condensate of 39 nickel exposed workers].** *G. Ital. Med. Lav. Ergon.* 2012, **34**:682–686.
177. Félix PM, Almeida SM, Pinheiro T, Sousa J, Franco C, Wolterbeek HT: **Assessment of exposure to metals in lead processing industries.** *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2013, **216**:17–24.
178. Goldoni M, Caglieri A, De Palma G, Acampa O, Gergelova P, Corradi M, Apostoli P, Mutti A: **Chromium in exhaled breath condensate (EBC), erythrocytes, plasma and urine in the biomonitoring of chrome-plating workers exposed to soluble Cr(VI).** *J. Environ. Monit. JEM* 2010, **12**:442–447.
179. Goldoni M, Caglieri A, Poli D, Vettori MV, Corradi M, Apostoli P, Mutti A: **Determination of hexavalent chromium in exhaled breath condensate and environmental air among chrome plating workers.** *Anal. Chim. Acta* 2006, **562**:229–235.

180. Goldoni M, Catalani S, De Palma G, Manini P, Acampa O, Corradi M, Bergonzi R, Apostoli P, Mutti A: **Exhaled breath condensate as a suitable matrix to assess lung dose and effects in workers exposed to cobalt and tungsten.** *Environ. Health Perspect.* 2004, **112**:1293–1298.
181. Mumby S, Chung KF, McCreanor JE, Moloney ED, Griffiths MJD, Quinlan GJ: **Pro-oxidant iron in exhaled breath condensate: a potential excretory mechanism.** *Respir. Med.* 2011, **105**:1290–1295.
182. Paris C, Galateau-Salle F, Creveuil C, Morello R, Raffaelli C, Gillon JC, Billon-Galland MA, Pairon JC, Chevreau L, Letourneux M: **Asbestos bodies in the sputum of asbestos workers: correlation with occupational exposure.** *Eur. Respir. J.* 2002, **20**:1167–1173.
183. Schwarz Y, Kivity S, Fischbein A, Abraham JL, Fireman E, Moshe S, Dannon Y, Topilsky M, Greif J: **Evaluation of workers exposed to dust containing hard metals and aluminum oxide.** *Am. J. Ind. Med.* 1998, **34**:177–182.
184. Fireman E, Lerman Y, Stark M, Schwartz Y, Ganor E, Grinberg N, Frimer R, Landau DA, Zilberberg M, Barenboim E, Jacovovitz R: **Detection of occult lung impairment in welders by induced sputum particles and breath oxidation.** *Am. J. Ind. Med.* 2008, **51**:503–511.
185. Goldoni M, Caglieri A, Corradi M, Poli D, Rusca M, Carbognani P, Mutti A: **Chromium in exhaled breath condensate and pulmonary tissue of non-small cell lung cancer patients.** *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 2008, **81**:487–493.

## LE CONDENSAT D'AIR EXHALÉ : UNE NOUVELLE MATRICE POUR ÉVALUER L'EXPOSITION PULMONAIRE PROFESSIONNELLE

Dans le cadre d'une action préventive, la mesure de la dose interne pulmonaire est plus pertinente que la mesure de l'exposition atmosphérique car la dose interne est la quantité de toxique pouvant interagir avec les cellules de l'épithélium respiratoire. En santé-travail, le dosage urinaire est fréquemment utilisé mais il ne représente que le résultat final de l'épuration de multiples organes. Le **condensat d'air exhalé** (EBC) est le liquide obtenu de façon non invasive après refroidissement de l'air expiré d'un sujet au repos. Ce liquide est constitué de l'aérosolisation du liquide recouvrant l'épithélium respiratoire du compartiment alvéolaire et aussi du compartiment trachéobronchique ou bronchique. Nous proposons d'utiliser l'EBC comme une approche alternative pour la surveillance biologique des salariés. Les modèles cinétiques d'épuration pulmonaire actuels montrent que les particules déposées dans le compartiment alvéolaire ont une épuration très lente. Nous avons donc voulu savoir si l'EBC était une matrice reflétant l'exposition pulmonaire en particules inhalées.

**Objectifs :** 1) évaluer la faisabilité de la détection de particules minérales ou métalliques dans l'EBC de salariés exposés, 2) corrélérer la concentration de ces particules dans l'EBC avec les concentrations atmosphériques de ces particules obtenues pendant le poste de travail et avec les dosages urinaires.

**Matériel et Méthode :** Nous avons analysé les EBC de salariés issus de trois secteurs d'activité professionnelle. La **1<sup>ère</sup> étude** concernait un salarié d'une unité de broyage de **muscovite** atteint d'une infiltration pulmonaire diffuse. La **2<sup>ème</sup> étude** était une étude « exposé/non-exposé » concernant un groupe de **soudeurs** utilisant la technique « metal inert gaz » (MIG). La **3<sup>ème</sup> étude** était une étude « exposé/non-exposé » de salariés exposés à des composés solubles de **béryllium** dans le secteur de l'aluminerie dans 2 entreprises différentes.

### Résultats

**Etude n°1 :** L'analyse minéralogique de l'EBC a retrouvé des particules ayant le même profil spectral en spectrométrie Raman que les particules prélevées dans l'atmosphère de l'entreprise. L'analyse minéralogique du parenchyme pulmonaire a montré la présence d'une concentration élevée de particules compatibles avec des particules de muscovite.

**Etude n°2 :** Les concentrations de manganèse et de nickel dans l'EBC (Mn-EBC, Ni-EBC) dosées par ICP-MS étaient significativement plus élevées chez les soudeurs que chez les témoins alors que cette différence n'était pas significative pour le Mn urinaire (Mn-U). Les concentrations de Mn-EBC et de Ni-EBC ne sont pas corrélées avec leur concentration respective dans l'urine. Les régressions linéaires ont trouvé des coefficients significativement positifs entre les concentrations de Mn-EBC, Ni-EBC, Ni-U et Cr-U et les indices d'exposition cumulée.

**Etude n°3 :** Les concentrations de béryllium et d'aluminium dans l'EBC (Be-EBC, Al-EBC) étaient significativement plus élevées chez les sujets de l'entreprise n°1 que chez les témoins alors que leurs concentrations dans les urines ne l'étaient pas. Les régressions linéaires ont trouvé des coefficients significativement positifs entre les concentrations de Be-EBC et celle d'Al-EBC mais aussi entre les concentrations de Be-EBC et l'indice d'exposition cumulée. Les concentrations d'Al-EBC et Al-U étaient significativement plus élevées chez les sujets de l'entreprise n°2 que chez les témoins.

### Conclusions

Nos résultats montrent que le dosage dans l'EBC de particules issues d'une exposition professionnelle est fiable et source d'informations complémentaires sur l'exposition. La **1<sup>ère</sup> étude** a souligné l'intérêt de l'analyse qualitative des particules minérales dans l'EBC. Les deux autres études ont mis en évidence l'importance de la quantification des concentrations de particules métalliques dans les EBC. La concentration des particules métalliques dans l'EBC est liée à leurs concentrations dans l'atmosphère professionnelle. Ainsi, l'EBC apparaît être une matrice prometteuse pour l'évaluation de l'exposition pulmonaire en toxiques professionnels.