



HAL
open science

Caractérisation par microsonde laser LAMMA de poussières de mine de charbon et recherche de nouveaux paramètres de nocivité spécifique

Jean-Luc Tourmann

► **To cite this version:**

Jean-Luc Tourmann. Caractérisation par microsonde laser LAMMA de poussières de mine de charbon et recherche de nouveaux paramètres de nocivité spécifique. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Verlaine - Metz, 1993. Français. NNT : 1993METZ018S . tel-01775477

HAL Id: tel-01775477

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01775477v1>

Submitted on 24 Apr 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THESE DE DOCTORAT

présentée à:
L'UNIVERSITÉ DE METZ

pour l'obtention du titre de:
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ

Mention:
Chimie, Chimie-Physique

par
Jean-Luc TOURMANN

**Caractérisation par microsonde laser LAMMA
de poussières de mine de charbon
et recherche
de nouveaux paramètres de nocivité spécifique**

Soutenue le 29 novembre 1993 devant la Commission d'Examen:

J.F. MULLER (Président), Professeur à l'Université de Metz

B. FUBINI (Rapporteur), Professeur à l'Université de Turin

F. ADAMS (Rapporteur), Professeur à l'Université d'Anvers

R. KAUFMANN, Professeur à l'Université de Düsseldorf

P. VASSEUR, Professeur à l'Université de Metz

B. PRÉAT, Professeur à la Faculté Polytechnique de Mons

vb 80441.

THESE DE DOCTORAT

présentée à:
L'UNIVERSITÉ DE METZ

pour l'obtention du titre de:
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ

Mention:
Chimie, Chimie-Physique

par
Jean-Luc TOURMANN

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	19930565
Cote	S/M3 93/18
Loc	Magasin

**Caractérisation par microsonde laser LAMMA
de poussières de mine de charbon
et recherche
de nouveaux paramètres de nocivité spécifique**

Soutenue le 29 novembre 1993 devant la Commission d'Examen:

J.F. MULLER (Président), Professeur à l'Université de Metz

B. FUBINI (Rapporteur), Professeur à l'Université de Turin

F. ADAMS (Rapporteur), Professeur à l'Université d'Anvers

R. KAUFMANN, Professeur à l'Université de Düsseldorf

P. VASSEUR, Professeur à l'Université de Metz

B. PRÉAT, Professeur à la Faculté Polytechnique de Mons

Avant-propos

Mes travaux de recherche à l'aide de la microsonde laser LAMMA ont débuté à l'Université de Metz dans l'équipe dirigée par le Professeur J.F. Muller.

L'étude faisant l'objet du présent mémoire a été effectuée à l'Institut de Médecine Laser de l'Université de Düsseldorf dirigé par le Professeur R. Kaufmann.

Elle a bénéficié du soutien financier de la Commission des Communautés Européennes (Direction Générale V, Luxembourg).

Ce travail concerne la caractérisation par microsonde laser LAMMA de la fraction respirable de poussières d'origines diverses. La composition minéralogique et les propriétés toxicologiques de ces poussières ont été déterminées dans le cadre de projets de recherche antérieurs de la Commission des Communautés Européennes.

Les objectifs du présent travail seront présentés à la fin de l'introduction générale (*chapitre 1*). La méthode d'analyse par microsonde LAMMA sera présentée dans la partie expérimentale du *chapitre 2*. Un screening des éléments détectables par microsonde LAMMA dans diverses poussières de mine de charbon de la Ruhr sera présenté dans le même chapitre. Une étude de poussières de silice de référence (*chapitre 3*) permettra d'établir un schéma de classification des particules individuelles. Ce schéma de classification sera utilisé pour la caractérisation de poussières de mine de charbon riches en quartz (*chapitre 4*) puis de poussières à teneurs en quartz moindres (*chapitre 5 et 6*). Le chapitre 5 sera consacré à l'étude de la nocivité spécifique à l'origine stratigraphique des poussières de mine. Le chapitre 6 sera orienté vers l'apport des analyses LAMMA aux études comparatives des tests de nocivité. Le travail sera complété par la caractérisation de poussières recueillies sur poumons de mineur de charbon décédés avec des degrés de pneumoconiose variés (*chapitre 7*).

Une discussion générale sera consacrée (*chapitre 8*) aux avantages et aux limites de la caractérisation par microsonde LAMMA, à l'originalité et à la spécificité des paramètres identifiés dans le présent travail. L'ensemble des résultats sera replacé dans le cadre des approches étiopathogéniques actuelles (*chapitre 9*). Une conclusion générale précèdera les perspectives d'applications en hygiène industrielle présentées au *chapitre 10*.

La plupart des échantillons ont aimablement été mis à notre disposition par le Professeur K. Robock et par le Docteur L. Armbruster de l'Institut DMT (Deutsche Montan Technologie, ex-Bergbau-Forschung, Essen). Les poussières britanniques du chapitre 4 ont été fournies par le Professeur J.M.G. Davis de l'IOM (Institute of Occupational Medicine, Edinburgh). Le Professeur H.J. Einbrodt de l'Institut d'Hygiène et de Médecine du Travail (Université d'Aix-La-Chapelle) a mis à notre disposition les poussières recueillies sur poumons de mineurs de charbon étudiées au chapitre 7.

Remerciements

Monsieur le Professeur *R. Kaufmann*, père de la technique LAMMA et toujours pionnier de l'actuelle spectrométrie LAMMS, m'a proposer le présent sujet de recherche et accueilli dans son Institut. Je lui exprime mes remerciements les plus chaleureux pour l'honneur et la confiance qui m'ont ainsi été accordés. Je le remercie également pour la totale liberté qu'il m'a toujours laissée, tant dans l'utilisation de la microsonde LAMMA, dans l'approche du sujet ou dans le choix de l'Université où je présenterai mon mémoire de thèse. Je rends un hommage particulier à sa clairvoyance intellectuelle et scientifique qui m'ont guidé durant ce travail.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur *J.F. Muller* qui a guidé mes premiers pas dans la recherche scientifique et m'a permis de découvrir la technique LAMMA à l'époque où elle venait de naître et d'arriver en France. Je le remercie également d'assurer la présidence du jury et d'assumer la fonction de directeur de thèse. Il me donne ainsi l'opportunité de présenter un mémoire rédigé dans ma langue maternelle. Son expérience dans le domaine des applications de la microsonde LAMMA en hygiène industrielle et ses conseils m'ont été d'un grand recours lors de la rédaction du mémoire.

Que soient remerciés ici Madame le Professeur *B. Fubini* et Monsieur le Professeur *F. Adams* pour avoir accepté de faire partie du jury de thèse et, de surcroît, d'en être les rapporteurs. J'ai ainsi l'honneur de voir mon travail jugé par des spécialistes de la physico-chimie des surfaces solides et/ou de l'analyse des aérosols par microsonde LAMMA.

J'ai également l'honneur de remercier Mademoiselle le Professeur *P. Vasseur* et Monsieur le Professeur *B. Préat* de faire partie de ce jury de thèse. Je retrouve ainsi mon ancienne directrice de D.E.A qui a su éveiller ma passion pour la toxicologie de l'Environnement. J'espère, en retour et par le présent travail, satisfaire son intérêt (entre autres) pour les interactions entre toxiques. Je suis heureux que mon travail puisse bénéficier du jugement et de l'expérience en hygiène industrielle, notamment sur les mines de charbon, de Monsieur le Professeur *B. Préat*. De plus, sa longue expérience en qualité d'Expert à la Commission des Communautés Européennes permettront de juger de l'ensemble et de la finalité de mon travail.

Pour mener à bien cette thèse (et satisfaire ma curiosité) j'ai dû multiplier les visites de différents instituts, chercher à obtenir des échantillons ou des informations, tenter d'établir des contacts scientifiques... J'ai été reçu en de nombreux endroits et c'est toujours avec un sentiment d'accomplissement que je suis reparti! Je tiens donc à remercier les nombreuses personnes qui se sont très cordialement laissées harceler par une multitude de questions. Mais je me vois dans l'obligation d'exprimer ma gratitude d'une manière bien trop impersonnelle, car sous forme d'une liste collective:

- le Professeur *K. Robock* et les Drs. *L. Armbruster*, *L. Kühn*, *E. Kainka-Stänicke*
de l'Institut DMT de Ventilation, de Climatisation et de Lutte contre
l'Empoussiérage (ex-Bergbau Forschung, Essen),

- le Professeur *J. Bruch* et les Drs. *B. Rehn* et *M.R. Joos* de l'Institut d'Hygiène et de Médecine du Travail (Université d'Essen),
- les Professeurs *H. Idel*, *W. Hilscher*, *N. Seemayer*, *H. Behrendt* et les Drs. *J. Friemann* et *B. Molik* de l'Institut Médical d'Hygiène de l'Environnement (Université de Düsseldorf)
- le Professeur *G. Strübel* de l'Institut de Minéralogie Technique et Appliquée (Université de Giessen)
- le Dr. *W. Kriegseis* de l'Institut de Physique I (Université de Giessen)
- le Professeur *H.J. Einbrodt* et le Dr. *A. Brammertz* de l'Institut d'Hygiène et de Médecine du Travail (Université d'Aix-La-Chapelle)
- le Professeur *P. Munder* de l'Institut Max Planck d'Immunobiologie (Fribourg)
- le Professeur *R. Mannhold* du Centre de Recherche Biomédicale (Université de Düsseldorf)
- le Professeur *M. Wolf* et le Dipl.-Geol. *H.M. Schulz* de l'Institut de Géologie et Géochimie des Gisements de Pétrole et de Charbon (Université d'Aix-La-Chapelle)
- le Professeur *H.D. Bauer* de l'Institut de Recherche sur les Substances Dangereuses (Bochum)
- le Dr. *A. Vieth-Redemann* du Bureau Géologique de Rhénanie-Westphalie (Kréfeld)
- le Professeur *J.M.G. Davis* et les Drs. *A. Robertson*, *J. Addison* et *K. Donaldson* de l'Institut de Médecine du Travail (Edinbourg)
- le Professeur *M. de Sousa* de l'Institut des Sciences Biomédicales Abel Salazar (Université de Porto)
- le Professeur *H. Pézerat* et le Dr. *D. Costa* du groupe "Solides et Cancérogénèse" du Laboratoire de Réactivité de Surface et Structure (Université P. et M. Curie, Paris)
- les Drs. *P. Sébastien*, *S. Honnons* et *O. Blanchard* de l'Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (ex-CERCHAR, Verneuil-en-Halatte).

Je n'oublierai pas, après ce rapide tour d'Europe, d'exprimer ma gratitude aux personnes qui ont, dans la vie quotidienne de laboratoire, contribué à la réalisation de ce travail. Je remercie *K. Michels* pour son excellente assistance technique lors des premières campagnes de mesure LAMMA. Il a été suivi par Madame *E. Borcescu* dont j'ai su apprécier la minutie du travail exécuté. Je rends un hommage particulier à la patience dont elle a fait preuve face à un travail fastidieux et ...surtout à mon égard!. J'exprime, à ce titre également, ma profonde gratitude à *D. Kirsch* sans lequel je n'aurais jamais pu rédiger en allemand un volumineux rapport final de recherche pour la CECA. Je remercie *M. Schürmann* pour les fructueuses discussions sur la Géologie (des gisements de charbons ou autres) et l'accès à sa merveilleuse collection privée d'échantillons. Je tiens également à remercier *tous les collègues* de l'Institut de Médecine Laser et *G. Krier* du LSMCL de l'Université de Metz qui m'ont aidé à surmonter les "tristes" réalités et les imprévus techniques d'un travail sur un instrument sophistiqué.

Il me reste, enfin, à remercier la Direction Générale V de la Commission des Communautés Européennes pour le soutien financier et l'intérêt qui a été porté à ce travail. Je citerai, en son nom, Messieurs *G. Todini*, *B. Le Goff*, *W. Obst*, *G. Aresini* et *J.P. Rihoux*. Ces personnes m'ont également assuré un soutien logistique en ouvrant l'accès, sur un simple coup de téléphone, à la masse d'informations et de littérature scientifiques accumulée depuis de nombreuses années par la CECA.

Résumé

Les connaissances étiopathogéniques actuelles sur la pneumoconiose du houilleur (improprement dénommée "silicose") sont fragmentaires. Le concept de "nocivité spécifique" des poussières de mine (ou nocivité expérimentale en accord avec les données épidémiologiques) doit permettre, en hygiène industrielle, de reconnaître et de classer les poussières de mines dangereuses afin d'établir, sur des bases scientifiques, des valeurs limites d'empoussiérage.

Les études de nocivité sont basées sur deux éléments indispensables pour évaluer l'aptitude des poussières à induire une fibrose pulmonaire: les résultats des tests toxicologiques *in vitro* et *in vivo* et, d'autre part, la caractérisation physico-chimique des poussières (composition minéralogique et granulométrique, propriétés de surface...).

Il existe de nombreuses incertitudes relatives au concept de nocivité spécifique. Elles se traduisent par des divergences, voire des contradictions flagrantes, entre les données épidémiologiques, les données de nocivité expérimentale et les données physico-chimiques des poussières. Les discordances les plus frappantes portent sur la teneur en quartz des poussières, minéral pourtant bien connu pour ses propriétés cytotoxiques et fibrogènes.

Le présent travail concerne la caractérisation par microsonde laser LAMMA de la fraction respirable de poussières de mine prélevées dans différentes mines européennes associées à des risques de pneumoconiose connus et très diversifiés. Les propriétés toxicologiques et les données minéralogiques de ces poussières sont connues.

L'approche méthodologique est fondée sur une caractérisation au niveau de la particule individuelle permettant d'établir des "histogrammes chimiques". Ceux-ci dévoileront les éléments (ou combinaisons d'éléments) dont "l'incidence" sur la population de particules analysées permet d'expliquer les données épidémiologiques ou de nocivité expérimentale.

Une première étude de poussières de silice de référence a permis d'établir un schéma de classification des particules individuelles contenant du quartz. L'utilisation de ce schéma sur certaines poussières de mines riches en quartz a permis d'identifier le degré de contamination de la surface du quartz comme un paramètre de modulation de la nocivité du quartz des poussières de mine. Ce résultat, en accord avec ceux d'autres auteurs qui avaient déjà émis cette hypothèse, permet d'entrevoir l'effet de modulation en tant que paramètre de nocivité spécifique.

Mais l'ensemble de l'étude propose d'attribuer un rôle plus déterminant au fer (et/ou métaux lourds) associé à la fraction minérale des poussières de mines. Cette conclusion est étayée par des corrélations avec les données de nocivité expérimentale ou certaines données épidémiologiques. De plus, elle converge avec les connaissances récentes tirées de la littérature scientifique permettant d'envisager un principe toxique pour les poussières de mine. Ce dernier se rapporte aux propriétés oxydo-réductrices de la surface des particules. Une validation toxicologique et physico-chimique de cette hypothèse permettrait d'acquérir des connaissances d'ordre étiopathogénique et devrait ouvrir de nombreuses perspectives d'applications en hygiène industrielle.

... Nous pourrions descendre plus bas encore, montrer, comme l'a fait Ruskin dans ses *Ethics of the Dusts*, les habitudes, le caractère et les ruses des cristaux, leurs querelles, ce qu'ils font quand un corps étranger vient troubler leurs plans, qui sont plus anciens que tout ce que notre imagination peut concevoir, la manière dont ils admettent ou rejettent l'ennemi: la victoire possible du plus faible sur le plus fort, par exemple le Quartz tout-puissant qui cède courtoisement à l'humble et sournois Epidote et lui permet de le surmonter; la lutte tantôt effroyable, tantôt magnifique du cristal de roche avec le fer; ...

in: *La Vie des Abeilles (1901)*
par Maurice Maeterlinck
Prix Nobel de Littérature

Sommaire

Chapitre 1: Introduction: la pneumoconiose du houilleur et les poussières de mine de charbon	1
1.1) La pneumoconiose du houilleur	2
1.1.1) Approche épidémiologique	2
1.1.2) Aspects anatomo-pathologiques et cliniques	5
1.1.3) Approche étiopathogénique	7
1.2) Les poussières de mine de charbon	14
1.2.1) Etudes de la nocivité des poussières	14
1.2.2) Caractérisation des poussières de mines	17
1.3) Objectifs et présentation du travail	22
Chapitre 2: Partie expérimentale et caractérisation des poussières par microsonde LAMMA	25
2.1) La microsonde laser LAMMA	25
2.1.1) Principe physique	26
2.1.2) Description instrumentale	28
2.2) Matériels et méthodes	30
2.2.1) Origine et préparation des échantillons	30
2.2.2) Enregistrement et traitement des spectres LAMMA	31
2.2.3) Irradiance laser	33
2.2.4) Nombre de particules analysées par échantillon	36
2.3) Recherche et définition des éléments majeurs, mineurs et traces des poussières de mine de charbon - Cas de la matière organique	38
2.3.1) Eléments majeurs	39
2.3.2) Eléments mineurs et traces	41
2.3.3) Matière organique	45
Chapitre 3: Etude des poussières de silice de référence	47
3.1) Partie expérimentale	47
3.2) Résultats	49
3.3) Discussion	56
3.4) Etude de l'influence de l'irradiance laser	61

Chapitre 4: Caractérisation de poussières de mine riches en quartz	64
4.1) Partie expérimentale	64
4.2) Résultats	67
4.3) Discussion	70
4.4) Recherche de paramètres de nocivité indépendants du quartz	74
Chapitre 5: Etude de la nocivité spécifique à l'origine stratigraphique des poussières	79
5.1) Partie expérimentale	82
5.2) Résultats	83
5.3) Discussion	85
Chapitre 6: Apports de l'analyse LAMMA aux études comparatives des tests de nocivité	90
6.1) Partie expérimentale	91
6.2) Résultats	96
6.3) Discussion	112
Chapitre 7: Etude de poussières recueillies sur poumons de mineur de charbon	119
7.1) Partie expérimentale	119
7.2) Résultats	121
7.3) Discussion	128
Chapitre 8: Discussion générale	132
8.1) Avantages et limites de la caractérisation des poussières de mine par microsonde LAMMA	133
8.2) Paramètres modulant la nocivité du quartz	138
8.3) Paramètres de nocivité indépendants du quartz	141
8.4) Spécificité des paramètres	146
Chapitre 9: Situation des résultats dans le contexte des approches étiopathogéniques	151
Chapitre 10: Conclusion et perspectives d'applications en hygiène industrielle	159
Annexe	164
Littérature	165

CHAPITRE 1

Introduction:

La pneumoconiose du houilleur Les poussières de mine de charbon

Les affections pulmonaires du mineur, déjà mentionnées par Hippocrate, furent attribuées aux poussières "ulcérant" les poumons par G. Agricola qui, dans son traité *De re Metallica* (1556), proposait déjà des méthodes préventives de ventilation des mines. Il mentionnait également que, suite au décès de leurs maris, les femmes des mineurs de certaines régions des Carpates se mariaient jusqu'à sept fois!. La révolution industrielle ne tarda pas à révéler les nuisances ou les ravages causés par les atmosphères empoussiérées dans des secteurs autres que les industries extractives: métallurgie, bâtiment, verre, céramique, polissage, textile... (Iler, 1979; Holt, 1987)

Le terme de **pneumoconiose** (du grec *pneuma* et *conios*, signifiant souffle et poussière) fut introduit à la fin du 19^{ème} siècle pour regrouper l'ensemble des affections pulmonaires occasionnées par des poussières minérales ou organiques. L'inhalation et la déposition pulmonaire des poussières peuvent cependant provoquer des troubles respiratoires et des lésions pulmonaires d'origines variées (cancer, asthme...). Un sens plus strict, adopté en 1946, définissait une pneumoconiose comme une fibrose pulmonaire (dépôt excessif de tissu conjonctif) causée par les poussières de silice (silicose), d'amiante (asbestose), d'oxydes de fer (sidérose) ... (Holt, 1987).

Les pneumoconioses sont caractérisées par des lésions fibroconiotiques du poumon profond. Elles sont d'une nature composite associant, dans des proportions variables, divers matériaux d'origine exogène et endogène: poussières, cellules inflammatoires (macrophages...) et cellules du tissu conjonctif (fibroblastes), constituants de la matrice du tissu conjonctif (collagène...), microcalcifications...

Ces lésions ne sont pas comparables à celles d'une fibrose pulmonaire résultant d'une cicatrisation après une agression de type tuberculeux. Cette dernière sera localisée et ne dépassera pas le domaine du tissu pathologique. Les lésions fibroconiotiques sont de nature fibroproliférative: la fibrose y représente un processus pathologique en soi qui va conduire à la destruction des structures pulmonaires. Ce caractère évolutif pourra faire progresser la pathologie au sein de formes de **pneumoconiose simple** ou vers des formes compliquées dites de **fibrose massive progressive (FMP)**. Cette dernière sera plus fréquemment associée aux complications infectieuses ou aux insuffisances cardio-ventilatoires.

De nos jours, les pneumoconioses comptent parmi les plus fréquentes et les plus graves des maladies professionnelles. En France, pour l'année 1983, 1590 nouveaux cas de pneumoconioses telles que la silicose, la pneumoconiose du mineur de charbon et l'asbestose ont été enregistrés, soit 26% du total des maladies professionnelles. Pour la même année, 80% des décès par maladies professionnelles en France ont été reconnus imputables à ces seules pneumoconioses (soit 852 décès) (Amoudru, 1987).

1.1) La pneumoconiose du houilleur

1.1.1) Approche épidémiologique

Les études épidémiologiques sont basées sur le dépistage radiologique des lésions qui sont répertoriées selon le système international de classification radiographique du Bureau International du Travail (ILO, 1980). Ce système permet de classer et de quantifier les opacités en fonction de leur aspect, leur taille et leur dissémination sur les champs pulmonaires (Chrétien, 1980). On y distingue les opacités irrégulières (de types s, t, u) et les opacités d'aspect punctiforme (de type p < 1.5 mm), micronodulaire (de type q = 1.5-3 mm) ou nodulaire (de type r = 3-10 mm). La pneumoconiose simple est identifiable par des opacités de taille inférieure au cm (de type p, q, r) dont la concentration déterminera la sévérité de l'atteinte (de catégorie 1 < 2 < 3). Les larges opacités de la fibrose massive progressive, dont la taille varie de 1 à 15 cm, sont classées en catégories A < B < C.

Si les industries de surface ne sont pas épargnées par les pneumoconioses, il apparaît que le secteur minier, notamment du charbon, est un grand pourvoyeur de cas de pneumoconioses. Pour l'année 1983, 76% des nouveaux cas en France étaient enregistrés dans le seul secteur des mines de charbon. Le nombre total de cas reconnus de pneumoconiose du houilleur était alors de plus de 30000 en Grande-Bretagne, 44000 en France et 52000 en RFA. Le nombre de décès annuels dûs à cette pneumoconiose était de 4000 aux USA en 1976 et 1126 en RFA pour 1983. En France, ce nombre a peu évolué au cours des deux dernières décennies, soit environ 900 décès annuels. Les estimations au niveau mondial font état de 50000 nouveaux cas annuels et indiquent que le nombre de mineurs et ex-mineurs atteints de pneumoconiose du houilleur dépasserait le million (Amoudru, 1987; Mahieu, 1990).

En France, le seuil de reconnaissance médico-légale des pneumoconioses a été abaissé, en 1980, de la catégorie 2 à la catégorie 1. De même, les opacités irrégulières, qui sont plus fréquentes aujourd'hui que par le passé, sont désormais reconnues. Malgré

l'abaissement du seuil de reconnaissance, les données épidémiologiques révèlent une évolution favorable qui reflète les effets de la prévention et les progrès de la lutte technique contre l'empoussiérage. Ainsi, pour l'ensemble des charbonnages français, l'incidence des pneumoconioses reconnues, de l'ordre de 2% en 1955, descend à 1.3% (1970) puis à 0.4% (1985). La prévalence des catégories ≥ 1 passe de 43.5% (1974) à 17.3% (1984). L'âge d'apparition des nouveaux cas (46 ans en 1969; 57 ans en 1986) et l'âge moyen au décès (50 ans en 1945; 70 ans en 1986) ont favorablement progressés (Mahieu, 1990).

Les études épidémiologiques montrent que la FMP est associée à une plus haute mortalité que la pneumoconiose simple (Miller and Jacobsen, 1985; Atuhaire et al., 1985). La nature des facteurs gouvernant son apparition a fait l'objet de nombreuses études qui concernent le rôle de la concentration atmosphérique en poussières et de la durée de l'exposition.

Il en ressort que l'**exposition cumulée** aux poussières joue un rôle central décisif dans le développement d'une FMP (de catégorie A, B ou C) dont l'effet primaire est de provoquer une pneumoconiose simple de catégorie ≥ 1 prédisposant à la FMP (Hurley et al., 1987; Mac Laren et al., 1989). Le risque de FMP accroît également avec l'âge du mineur mais indépendamment de la catégorie de pneumoconiose simple. Enfin, bien que l'incidence de FMP soit faible parmi les mineurs non-pneumoconiosés ou de faible pneumoconiose simple, la taille de cet effectif contribue à environ la moitié des cas de progression vers la FMP (Shenan et al., 1981; Soutar, 1987).

Toutefois, l'endémie de la pneumoconiose du houilleur n'est pas corrélée à l'importance des effectifs dans les différents bassins houillers. Le trait le plus frappant des données épidémiologiques se traduit par une étonnante **disparité géographique** existant entre les différents bassins, voire au sein d'un même bassin. En France, par exemple, les niveaux d'endémie pour la Provence, la Lorraine et le Nord-Pas de Calais sont, respectivement: nul, faible et très fort (Amoudru, 1978, 1987). Les mêmes disparités apparaissent quant à la gravité de la maladie (âge d'apparition des nouveaux cas, âge au décès, nombre de décès imputables, risque de complications...). Pour la RFA, l'endémie est plus faible en Saar que dans la Ruhr (Reisner, 1971; Reisner and Robock, 1977). De telles disparités se retrouvent également en Grande-Bretagne (Jacobsen et al., 1971; Bennett et al., 1979; Hurley et al., 1982), aux USA (Lainhart, 1969; Naeye et al., 1971)...

Les raisons de ces disparités, qui ne s'expliquent pas forcément en terme de différences d'exposition entre les bassins, ne sont pas élucidées. On admet donc aujourd'hui que

l'exposition aux poussières est l'un des facteurs responsable de la pneumoconiose ou que "l'exposition et la pneumoconiose simple sont deux facteurs parmi ceux connus ou suspectés de jouer un rôle en FMP" (Hurley et al., 1987).

L'existence de facteurs liés à la qualité des poussières inhalées a donc été évoquée. Le **rang du charbon** exploité (ou degré de maturation dans l'échelle de houillification) est le plus fréquemment cité (un rang élevé se traduisant par un appauvrissement en matières volatiles et un enrichissement relatif en carbone).

Aux Etats-Unis, les prévalences de pneumoconiose simple et de FMP sont en relation non seulement avec les expositions estimées, mais reflètent également des disparités régionales liées au rang et à l'âge du charbon: prévalences élevées et haut rang dans les Appalaches, tendance réciproque dans l'Ouest américain (Bennett et al., 1979; Attfield and Moring, 1992). La prévalence des pneumoconioses (60%) ou de la FMP (14%) est plus élevée dans les mines d'antracite (haut rang) de l'est de la Pennsylvanie que celles des charbons de rangs inférieurs (47% et 2.4% respectivement) du centre et de l'ouest de la Pennsylvanie (Morgan et al., 1972).

En Europe, on peut noter qu'au sein du bassin de la Ruhr, la prévalence des pneumoconioses de catégorie ≥ 1 augmente avec le niveau d'empoussiérage, mais sera multipliée par un facteur 10 en passant des veines de charbons flambants (bas rang) aux veines de charbons gras (haut rang) (Reisner al., 1982, 1985a). En Saar, la fréquence des pneumoconioses peut atteindre des valeurs 20 fois plus élevées dans les mines exploitant des charbons de haut rang où les concentrations de poussières sont, pourtant, comparables à celles des mines de charbons de rang inférieur (Lauhütte et al., 1971). L'étude de 250 mines en Grande-Bretagne montre que la prévalence des pneumoconioses de catégorie ≥ 1 est 5 fois plus élevée pour les mines exploitant de l'antracite que celles exploitant des charbons de rang inférieur (Bennett et al, 1979). Des différences existent cependant entre les mines de rangs égaux qui, selon ces auteurs, pourraient s'expliquer par des empoussiérages éventuellement différents ou par l'existence de facteurs autres que le rang. D'autres études anglaises indiquent que le rang du charbon n'influence pas la progression vers la FMP (Shennan et al., 1981).

Il apparaît donc que l'exposition aux poussières et/ou le rang du charbon exploité ne suffisent pas à expliquer toutes les données épidémiologiques. La composition minéralogique et plus particulièrement la **teneur en quartz** des poussières ont été mises en cause. Des cas de progression très rapide de pneumoconiose simple ont été observés chez des mineurs de charbon exposés à des poussières riches en quartz produites lors de

conditions d'exploitation défavorables (Seaton et al., 1981). D'autres études indiquent que de fortes expositions au quartz contribuent à la rapidité de progression de la pneumoconiose simple et à l'évolution vers la FMP (Hurley et al., 1982; Jacobsen and Mac Laren, 1982).

De nombreux travaux montrent, cependant, que le risque de développer une pneumoconiose simple n'est pas influencé par les teneurs en quartz habituelles des poussières (Walton et al., 1977; Reisner, 1975; Hurley et al., 1982). Des divergences apparaissent également au niveau de la répartition régionale des pneumoconioses: l'exposition au quartz est, d'une manière générale, plus élevée dans les mines de Saar, de Lorraine ou d'Ecosse que dans les mines à plus haut risque de la Ruhr, du Nord-Pas de Calais ou du Pays de Galles. Les veines de charbon de haut rang du bassin de la Ruhr (associées aux prévalences de pneumoconiose simple les plus élevées) sont les moins riches en quartz (Reisner, 1971; Reisner and Robock, 1977; Reisner et al., 1982, 1985a).

Finalement, il reste à mentionner que certains auteurs ont, dès le début du siècle, mis en doute le rôle du quartz dans l'étiologie de la pneumoconiose du houilleur (Collis and Gilchrist, 1928; Heppleston, 1951; Morgan 1971). Ils se référaient, par exemple, aux soutiers des navires exposés à des poussières très pauvres en quartz qui, pourtant, développaient des pneumoconioses très proches de la silicose.

1.1.2) Aspects anatomo-pathologiques et cliniques

D'un point de vue anatomo-pathologique, les lésions fibroconiotiques du mineur de charbon rappellent, macroscopiquement, l'aspect nodulaire des lésions observées chez le silicosé, avec une coloration noire due à la présence des particules de charbon. Contrairement à la fibrose diffuse caractérisant certaines pneumoconioses (asbestose), les "nodules silicotiques" sont des lésions compactes et dures se présentant sous des formes circonscrites de petite taille (nodules de 1 à 5 mm), des formes nodulaires confluentes (lésions de 1 à 3 cm) ou des lésions massives d'aspect pseudo-tumoral pouvant atteindre des tailles supérieures à 10 cm (Cordier et al.; 1987; Gosselin et Le Bouffant, 1987).

Cette analogie avec la silicose vraie de l'ouvrier exposé à la silice fut en partie responsable de l'ancienne dénomination médico-légale de silicose désignant la pneumoconiose du houilleur. L'existence, bien connue, de pneumoconiose de type silicotique chez le mineur de charbon affecté au creusement de la roche (Faulds et al., 1959; Seaton et al. 1981) confortait l'utilisation de ce terme.

Toutefois, il existe des différences essentielles entre le nodule silicotique bien circonscrit, riche en collagène, pratiquement acellulaire, avec des particules de silice préférentiellement disposées à la périphérie du nodule et, d'autre part, le macule dû aux poussières de charbon.

Le macule ("coal nodule" de Cough ou nodule fibroconiotique de Policart) est une accumulation de poussières de 1 à 4 mm de diamètre, à teneur en collagène moindre et au contour d'autant plus incertain qu'il est associé à de l'emphysème (Heppleston, 1951). Cette forme d'emphysème est un trait distinctif de nombreux macules qui se traduit par un espace contenant de l'air suite à la destruction des tissus pulmonaires et cernant le macule. Ces lésions associées à l'emphysème présentent des opacités radiographiques plus irrégulières (Cockroft et al., 1982) qui ne facilitent pas le diagnostic radiologique.

Dans les poumons des mineurs exposés aux poussières de charbon de haut rang la plupart des lésions de pneumoconiose simple sont pigmentées par les poussières; les lésions de FMP semblent alors résulter de l'élargissement progressif d'une lésion unique. Les lésions de pneumoconiose simple des mineurs de charbon de bas rang, dont le centre est souvent libre de poussières, peuvent présenter, dans des cas extrêmes, de très grandes similitudes avec les nodules silicotiques. Les lésions de FMP semblent alors provenir d'une fusion de petits nodules avoisinants (Davis et al., 1983).

En résumé, on peut retenir que les lésions fibroconiotiques de la pneumoconiose du houilleur représentent des entités anatomiques différentes qui pourront évoluer vers la fibrose massive: les macules primaires de charbon qui, par l'apport de poussières et de collagène, se transforment en agrégats de poussières cernés de fibrose ("amas fibroconiotiques") et peuvent cohabiter avec des nodules silicotiques vrais.

Les données radiologiques ou anatomo-pathologiques sont difficiles à corréler aux symptômes de difficultés respiratoires (dyspnée), surtout au cours des premières étapes de la pathologie. Certaines études montrent que, contrairement à la FMP, la pneumoconiose simple n'est pas nécessairement associée à un dysfonctionnement pulmonaire (Carpenter et al., 1956; Rogan et al. 1973). Pour les cas de dyspnée en pneumoconiose simple, l'emphysème semble être le facteur principal d'invalidité (Heppleston, 1951). L'emphysème est, cependant, retrouvé en pneumoconiose simple et en FMP. Dans les deux cas, l'emphysème semble plus communément associé aux lésions de type "p" que celles de type "q" ou "r" (Ryder et al., 1970). On peut noter que d'autres auteurs ont mis en évidence de la dyspnée et de l'emphysème chez des mineurs ne présentant pas d'anomalies radiologiques (Naeye and Dellinger, 1972).

Ces observations contradictoires doivent être replacées dans le contexte d'une pathologie à caractère chronique, définie à la base comme une fibrose pulmonaire, mais faisant intervenir des troubles respiratoires et des lésions pulmonaires d'origines variées: le macule primaire, la fibrose, la bronchite chronique, l'emphysème et, dans certains cas, la tuberculose.

Il reste également à préciser que la maladie à évoluer au cours des dernières décennies. Il y a 20 ou 30 ans, la pneumoconiose apparaissait souvent de façon inopinée chez des mineurs plus jeunes (35 ans dans le Nord-Pas de Calais!) et se présentait sous une forme silicotique dont le profil évolutif était celui d'une silicose (Mahieu, 1990). De nos jours, la fibrose moins caractérisée de lésions diverses, où "l'amas fibroconiotique" remplace ou prédomine sur le nodule silicotique, favorise une évolution plus lente de la maladie. C'est ainsi que les termes d'antracose, d'antracosilicose, de pneumoconiose à poussières mixtes ou de pneumoconiose de houilleur ont remplacé le terme de silicose.

1.1.3) Approche étiopathogénique

Bien que l'agent étiologique de la pneumoconiose du houilleur soit "connu" (en l'occurrence les poussières de mine), il est actuellement impossible d'étayer une théorie de pathogénèse. En effet, la complexité de la **toxicocinétique** des particules inhalées (inhalation, déposition, élimination, translocation, séquestration...) justifie des connaissances plutôt fragmentaires sur leur toxicodynamique (mécanismes cellulaires et biochimiques mis en jeu, principe toxique des surfaces solides...). Cette toxicologie très particulière et propre aux particules inhalées ne favorise pas l'approche des pathomécanismes. Quelques rappels de toxicocinétique des particules inhalées permettront de mieux cerner la portée des connaissances actuelles sur l'étiopathogénèse de la pneumoconiose du houilleur.

Le destin des particules pénétrant l'appareil respiratoire (particules "inhalables") est, avant tout, déterminé par leur diamètre aérodynamique (d_{ae}). Les particules avec un $d_{ae} > 30 \mu\text{m}$ sont préférentiellement déposées dans le domaine extrathoracique (nez, gorge, larynx). Sur la fraction thoracique de particules, celles qui sont qualifiées de "**respirables**" ($d_{ae} \approx 2-3 \mu\text{m}$) ont une probabilité de pénétration et de déposition alvéolaire plus élevée que les particules de taille moindre (qui seront exhalées). Celles avec un $d_{ae} > 10 \mu\text{m}$ se déposeront au niveau de l'appareil trachéo-bronchial (Stahlhofen et al., 1980; Vincent and Armbruster, 1981; Vincent, 1991).

L'élimination des particules déposées dans l'alvéole pulmonaire (ou fraction "alvéolaire") est principalement assurée par le macrophage alvéolaire, dont le rôle est de phagocyter puis détruire ou transporter les corps étrangers vers l'escalator mucociliaire. Une fraction du matériel déposé sera éliminée vers le système lymphatique et pleural par des macrophages migrant au travers de l'interstitium (ou tissu conjonctif interstitiel de la barrière alvéolo-capillaire servant aux échanges gazeux).

Certains des macrophages chargés de poussières vont cependant s'accumuler dans la lumière alvéolaire ou dans l'interstitium. Les accumulations de macrophages préférentiellement disposées au niveau des divisions des bronchioles représentent les macules primaires de poussières (Heppleston, 1951). Une partie des poussières déposées dans l'alvéole peut échapper à la phagocytose, s'accumuler dans la lumière alvéolaire ou pénétrer l'interstitium. La fraction interstitielle de particule, d'épuration plus difficile, se trouve ainsi séquestrée dans l'interstitium; elle sera (ou non) prise en charge par le macrophage interstitiel.

On peut donc attribuer aux différents mécanismes de déposition alvéolaire et de rétention interstitielle un rôle souverain dans la pathogénèse d'une pneumoconiose. Les estimations de durée de résidence pulmonaire semblent en accord avec la prévalence des pneumoconioses simples de catégories ≥ 1 (Reisner et al., 1985a) ou avec l'incidence des FMP (Mac Laren et al., 1989). Les études de la charge coniotique des poumons de mineurs décédés apportent également des informations révélatrices sur les phénomènes de rétention des particules.

Dès 1951, l'hypothèse d'une pneumoconiose simple résultant d'une surcharge pulmonaire est émise. L'élimination des particules ne pouvant plus être assurée, cette surcharge "mécanique" conduirait à une rétention accrue des poussières (Heppleston, 1951). On observait à cette époque que la sévérité de la pneumoconiose augmentait avec la teneur totale en poussière des poumons, mais indépendamment de leur composition et de leur teneur en quartz. (King and Nagelschmidt, 1945; King et al., 1956; Faulds et al., 1959; Spink and Nagelschmidt, 1963). Le rôle du quartz fut d'abord contesté en FMP (Nagelschmidt et al., 1963), puis mis en avant après avoir mesuré des teneurs en quartz plus élevées dans les lésions de FMP que celles de pneumoconiose simple (Pratt, 1968; Vyskocyl et al., 1970).

Il apparaît ensuite que les poumons des mineurs de charbon de haut rang sont les plus riches en charbon et les plus pauvres en quartz. On attribue aux poumons atteints de FMP un taux d'accumulation de poussières plus élevé que ceux de pneumoconiose

simple et d'autant plus élevé que le rang du charbon est élevé (Bergmann and Casswell, 1972).

D'autres auteurs confirment que la masse totale de poussières retenues augmente avec la sévérité de la pneumoconiose et avec le rang du charbon. Pour les mineurs de charbon de haut rang, ils relèvent peu de différences dans la composition des poussières retenues en pneumoconiose simple ou en FMP (Davis et al., 1979; Ruckley et al., 1981). Ils notent également peu de différences de composition entre les poussières des mines de charbon de haut rang et celles retenues dans les poumons (Davis et al., 1983).

La richesse en quartz des lésions de FMP s'observe plus particulièrement chez les mineurs de charbon de bas rang dont les poumons sont les plus riches en minéraux et quartz (Davis et al. 1979; Ruckley et al. 1981). Les poussières retenues dans les poumons de ces mineurs semblent s'enrichir en matière minérale par rapport aux poussières du fond (Davis et al. 1983) voire en quartz (Douglas et al., 1986).

Ces résultats s'opposent à certaines observations mentionnant une présence accrue de particules minérales dans les poumons fortement fibrosés de mineur de charbon de haut rang (Naeye et al., 1971; Naeye and Dellinger, 1972). Ils semblent également en désaccord avec les phénomènes de transfert et d'accumulation du quartz dans les ganglions lymphatiques (lymphotropisme) observés chez les mineurs de charbon (Kühn, 1987).

Toutefois, ces observations ont le mérite de souligner l'importance des mécanismes de toxicocinétique dans l'étiopathogénèse de la pneumoconiose du houilleur. Les résultats suggèrent l'existence d'une rétention différentielle des particules qui serait d'autant plus marquée que la pneumoconiose progresse. L'hypothèse d'une pneumoconiose due à une simple surcharge pulmonaire est contestée (Amoudru, 1987).

Aucune des connaissances actuelles ne met en évidence une relation dose-effet directe, notamment pour la FMP. Des expériences d'inhalation sur l'animal et de modélisation de la cinétique d'accumulation mettent en exergue le rôle de la séquestration des particules (Vincent et al., 1987, Vincent and Donaldson, 1990). De telles approches sont nécessaires pour explorer la relation entre l'exposition aux poussières et la dosimétrie.

L'intervention de facteur(s) surajouté(s), dont la nature et le rôle restent encore à préciser, a été évoquée dans la progression vers la FMP par analogie avec la silicose vraie (Vigliani and Pernis, 1958, 1963; Balmes, 1990; Pernis and Vigliani, 1982). Des

facteurs d'ordre immunologique (Caplan, 1953; Burrel, 1972) ou d'ordre infectieux ont été envisagés (Heppleston, 1951; James, 1954; Cochrane, 1962; Genez-Rieux et al., 1965; Devulder et al., 1977).

Les tentatives d'identification de facteur(s) de susceptibilité individuelle chez le mineur de charbon ont, jusqu'à présent, échoués (Rasche et al., 1982; Boyd et al., 1984). La naissante "épidémiologie moléculaire" (Borm et al., 1990; Janssen et al., 1992) permettra sans doute d'éclaircir la situation. Elle est fondée sur l'identification de "biomarqueurs moléculaires" révélateurs d'exposition aux poussières, de la pneumoconiose ou de susceptibilités individuelles.

La physiopathologie des pneumoconioses ne simplifie pas la recherche des facteurs impliqués dans la pneumoconiose simple ou la FMP. En effet, les mécanismes responsables de l'apparition et de l'évolution de la fibrose sont encore peu connus. Ils se traduisent par une cascade de réactions biologiques dont l'inflammation de l'alvéole (alvéolite) sera le mécanisme initiateur.

Des processus ultimes conduisent à la synthèse et la déposition par les fibroblastes des constituants de la matrice du tissu conjonctif (collagène et élastine). Ces processus font appel au recrutement des fibroblastes par des facteurs chimiotactiques (fibronectine), à l'attachement des fibroblastes par l'intermédiaire de fibronectine à la matrice extracellulaire, puis à la prolifération et/ou l'activation des fibroblastes (Keogh and Crystal, 1982; Hunninghake et al., 1984).

L'alvéolite correspond à une accumulation dans la lumière alvéolaire et l'interstitium de cellules inflammatoires et immunes (macrophages, leucocytes polynucléaires et lymphocytes). Le rôle du macrophage dans la réponse inflammatoire n'est pas limité à la phagocytose des particules déposées dans l'alvéole. Bien au contraire, les fonctions sécrétrices et (immuno)régulatrices du macrophage lui font jouer un rôle central dans la pathogénèse des pneumoconioses.

Des mécanismes d'**activation du macrophage** le conduisent à relarguer des facteurs de chimiotactisme (fibronectine...) et à produire une batterie de plus de 100 médiateurs cellulaires qui peuvent stimuler l'activation ou la prolifération des autres cellules inflammatoires ou du fibroblaste (Wahl, 1985; Nathan, 1987a; Heppleston, 1991). On trouvera dans la figure 1.1 quelques exemples d'interactions moléculaires faisant intervenir le macrophage et d'autres partenaires cellulaires (d'après Tourmann and Kaufmann, 1992).

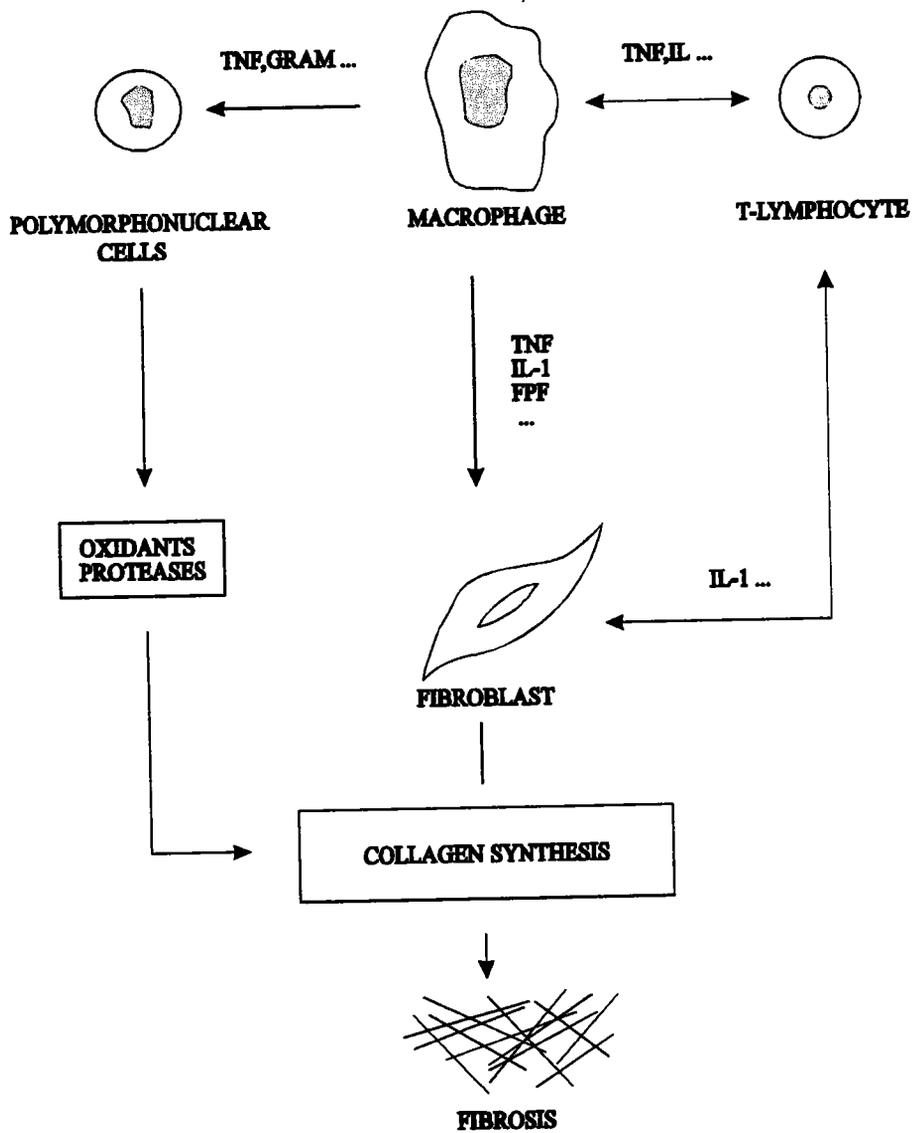


Figure 1.1: Exemples d'interactions cellulaires et moléculaires impliquées en fibrogénèse

La notion de "facteurs fibrogènes" stimulant les fibroblastes revient, historiquement, au travaux de Heppleston et Styles (1967). Leurs travaux ont servi de base aux très nombreuses expérimentations montrant que le macrophage incubé avec des poussières était capable de relarguer dans son milieu de culture des facteurs de nature protéique qui, une fois isolés, stimulent la prolifération des fibroblastes ou la synthèse du collagène (Aalto and Kulonen, 1979; Bittermann et al., 1982; Leslie et al., 1984; Lugano et al., 1984; Schmidt et al., 1984; Gritter et al., 1986; Hübner and Seemayer, 1992).

Le macrophage activé relargue de très nombreux autres médiateurs du type cytokines et facteurs de croissances tels que le Tumor Necrosis Factor (TNF), les interleukines (IL-1, IL-6...), les Growth Factors (GF) du type Transforming-GF, Alveolar-Macrophage-Derived-GF ... (Wahl, 1985; Nathan, 1987a; Heppleston, 1991). La plupart de ces médiateurs sont non-spécifiques de l'activation/prolifération des fibroblastes ou de cellules inflammatoires et immunes particulières. De plus, ils ont un caractère hautement inter-coopératif. Le TNF seul, par exemple, stimule la prolifération du fibroblaste mais en interaction avec l'IL-1 il va inhiber cette prolifération (Vilcek et al., 1986; Elias, 1988).

Cependant, les propriétés pro-inflammatoires et pro-fibrogènes de ces médiateurs leur confèrent un rôle dans la physiopathologie de la pneumoconiose du houilleur. Les macrophages alvéolaires humains exposés *in vitro* aux poussières de mine relarguent du TNF et de l'IL-6 (Gosset et al., 1991). Des travaux sur l'animal ont permis de localiser le TNF dans les nodules silicotiques grâce à la technique d'hybridisation *in situ*. L'application d'anticorps anti-TNF permet de bloquer la déposition de collagène (Piguet et al., 1990).

La clé des mécanismes d'apparition et d'évolution des fibroses ne se trouve pas uniquement dans un relargage de médiateur(s) stimulant, de façon spécifique ou non, la prolifération et/ou l'activation des fibroblastes. Il faut rappeler que le macrophage relargue des espèces activées de l'oxygène ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , H_2O_2 ...) et des enzymes hydrolytiques et protéolytiques (collagénases, élastases, hydrolases ...) (Hunninghake et al., 1984).

De plus, le macrophage peut stimuler les polynucléaires à produire de tels oxydants ou protéases grâce à des médiateurs non-spécifiques (TNF) ou spécifiques aux polynucléaires (Granulocyte Activation Mediator) (Nathan, 1987b; Maly et al., 1988). Ceux-ci vont participer à des processus oxydatifs et protéolytiques de dégradation des constituants cellulaires et matriciels de l'interstitium. Certains auteurs pensent que la dégradation du tissu conjonctif joue un rôle dans les processus fibrosants chroniques en

amplifiant et prolongeant la réponse inflammatoire et les mécanismes de réparation (Brown and Donaldson, 1988, 1989).

Enfin, il faut noter que la modulation et la promotion de la réponse inflammatoire semblent faire intervenir les métabolites de l'acide arachidonique qui sont relargués par le macrophage (prostaglandines, leucotriènes...). Ces médiateurs lipidiques participent à de nombreuses interactions qui, potentiellement, peuvent moduler la dégradation du tissu conjonctif et réguler, voire amplifier, la production de cytokines (Hunninghake et al., 1984; Dubois et al., 1989; Kuhn et al., 1990).

La plupart des travaux décrits ci-dessus font appel à des modèles expérimentaux de silicose effectués sur l'animal ou, plus généralement, sur cultures *in vitro* de macrophages animaux ou humains. L'étude des caractéristiques cellulaires et biochimiques du poumon profond chez le pneumoconiosé est possible grâce à la technique du lavage broncho-alvéolaire (LBA) (Voisin et al., 1985, 1987).

Les études du liquide recueilli par LBA révèlent l'existence d'une alvéolite macrophagique chez le mineur de charbon. Des polynucléaires, des lymphocytes et des protéases sont également recueillis par LBA (Sablonnière et al, 1983). Mais il faut surtout retenir que, malgré leurs charges en poussières, les macrophages récupérés par LBA sont bien vivants et activés.

Ils relarguent spontanément de grande quantité de fibronectine, de facteur de chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles, d'oxidants ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2) et de cytokines (TNF, IL-1) (Wallaert et al., 1987, 1990; Rom et al., 1987). D'autres études indiquent que les macrophages recueillis chez le mineur avec FMP sont plus activés qu'en pneumoconiose simple (Lassalle et al., 1989).

On peut donc retenir que le macrophage participe à de nombreuses interactions du type cellules/médiateurs/cellules, oxidants/antioxydants, protéases/antiprotéases. Il a pour fonction de stimuler la synthèse du collagène mais aussi de recruter et d'activer les autres cellules inflammatoires. Il est capable d'initier, d'amplifier et de prolonger la réponse inflammatoire. On s'accorde aujourd'hui à penser que la persistance de l'alvéolite sur de grandes périodes joue sans doute un rôle majeur dans le passage à la chronicité des processus fibrosants.

1.2) Les poussières de mine de charbon

Les connaissances épidémiologiques sur la pneumoconiose du houilleur, qui dévoilent l'existence de facteurs quantitatifs et qualitatifs liés aux poussières inhalées, nous permettent d'introduire le concept de "**nocivité spécifique des poussières de mine**". On peut la définir comme une nocivité déterminée expérimentalement qui, pour être qualifiée de "spécifique", devra être en accord avec les données épidémiologiques.

Les études de nocivité spécifique sont, en fait, basées sur deux éléments indispensables pour évaluer l'aptitude des poussières à induire des lésions fibroconiotiques: les résultats de tests toxicologiques *in vitro* et *in vivo* et, d'autre part, la caractérisation physico-chimique des poussières (composition minéralogique, granulométrie des particules...).

En hygiène industrielle, la nocivité spécifique doit permettre de reconnaître et de classer les poussières dangereuses afin d'établir, sur des bases scientifiques, des valeurs limites d'empoussiérage. Il s'agit de déterminer des paramètres mesurables mais plus élaborés que, par exemple, le rang du charbon exploité ou la simple teneur en quartz des poussières. Les études de nocivité spécifique permettent l'accès à certaines données inaccessibles aux études épidémiologiques (étude des relations dose/effet, influence des paramètres physico-chimiques des poussières). Elles peuvent fournir, dans les limites d'une extrapolation des résultats à l'homme, des informations d'ordre étiopathogénique.

1.2.1) Etudes de la nocivité des poussières

Les tests de nocivité sont fort nombreux et très diversifiés: on distingue les tests sur cultures de cellules (tests *in vitro* de cytotoxicité) et les tests qui font appel aux expérimentations sur l'animal (tests *in vivo* d'histotoxicité et dits de fibrogénicité).

Si les études de médiateurs cellulaires libérés par des cellules animales ou humaines émergent aujourd'hui dans la panoplie de tests de nocivité, les **tests *in vitro* de cytotoxicité** les plus couramment utilisés font appel à des cultures de macrophages animaux en incubation avec des poussières. La détermination de la cytotoxicité des poussières se réfère à des mesures d'activités métaboliques ou de viabilité cellulaire: concentrations enzymatiques intracellulaires ou dans le milieu de culture (lactate déhydrogénase, phosphatase acide...), vitesses de croissance cellulaire, consommation d'oxygène ou de glucose... Les résultats sont généralement rapportés à des cultures témoins en présence de quartz ou de poussières inertes (TiO₂) ou en l'absence de poussières.

Les tests *in vivo* d'histotoxicité les plus communs se font par injection aux animaux d'une dose unique de poussières par voie intra-péritonéale ou intra-trachéale. La nocivité sera déterminée au niveau des poumons ou des ganglions lymphatiques: élévation en taille et en poids, poids de collagène formé, teneur en lipides pulmonaires, quantité de poussières récupérée en fin d'expérience... D'autres tests s'intéressent à l'examen histologique qualitatif des lésions pulmonaires ou à la détermination histomorphométrique semi-quantitative des lésions QTA (Quartz-Typical-Area) des ganglions.

La nocivité des poussières de mine a fait l'objet d'un nombre impressionnant d'études où la toxicité propre au quartz a retenu une attention particulière. Il faut clairement discerner les études concernant les poussières de charbon broyé, les mélanges artificiels charbon/quartz et les vraies poussières de mine, c'est à dire la fraction respirable de poussières volantes prélevées dans les mines. Ces dernières ont fait l'objet de peu d'études d'inhalation chronique sur l'animal compte tenu des quantités élevées de poussières nécessaires à ces expérimentations.

La cytotoxicité des vraies poussières de mine s'avère extrêmement variable d'un test à l'autre ou, pour un test donné, entre différentes poussières. Elle n'est pas toujours en relation avec la teneur en quartz des poussières et peut être supérieure à la cytotoxicité attendue en se référant à cette teneur en quartz. Par contre, de meilleures corrélations sont obtenues avec la teneur en cendres des poussières. On s'accorde à penser que la matière minérale est un facteur déterminant de la cytotoxicité (Seemayer et al., 1977; Gormley et al., 1979; Davis et al., 1982; Robock und Reisner, 1982; Bruch et al., 1983a; Bruch, 1985, 1987).

Il est apparu très tôt que les poussières obtenues par broyage de charbon sont peu fibrogènes sur l'animal (Belt and King., 1945; Dolgner et al., 1967) voire inertes (Schlipkötter, 1958; Klösterkötter et al., 1963). Par contre, un apport artificiel de quartz donnera un caractère fibrogène aux poussières d'antracite ou de charbon de rang inférieur (Attygale et al., 1956) et proportionnellement à la teneur en quartz du mélange (Schlipkötter et al., 1971; Le Bouffant et al., 1977).

Les tests *in vivo* montrent que la fibrogénicité des vraies poussières de mine est variable mais, d'une manière générale, très inférieure à la fibrogénicité des poussières de quartz. On a donc attribué le caractère peu fibrogène du quartz dans les vraies poussières de mine à diverses contaminations de surface. Le rôle du charbon et notamment des

minéraux argileux associés au quartz a été évoqué. Des études de sables quartzeux, de mélanges artificiels quartz/charbon ou quartz/argiles ont permis de suspecter des contaminations de surface par de l'aluminium adsorbé ou, plus exactement, à de l'aluminium relargué *in vivo* par les argiles puis réadsorbé sur la surface du quartz. Il a été expérimentalement démontré que la durée et l'intensité de cet effet dépendent de la nature des argiles et de leur teneur dans les mélanges (Le Bouffant et al., 1977, 1982, 1987b).

Il faut cependant remarquer que les études précédemment citées se rapportent à des mélanges artificiels qui sont peu représentatifs de la composition, de la granulométrie et de l'hétérogénéité des vraies poussières de mine. Les études des vraies poussières de mine montrent que la matière minérale (quartz et minéraux associés) joue un rôle beaucoup plus complexe.

En effet, les tests intra-trachéaux montrent que la fibrose pulmonaire est plus prononcée pour les poussières riches en quartz et en minéraux associés. Les minéraux et les particules fines sont préférentiellement éliminées vers les ganglions lymphatiques. A l'inverse, le taux de rétention pulmonaire est plus élevé pour le charbon et les grosses particules. Le lymphotropisme du quartz est promoteur de la pénétration ganglionnaire des autres minéraux et du charbon, mais sera inhibé par les minéraux associés au quartz (Reisner et al., 1983; Rosmanith et al., 1981, 1985, 1988).

D'autres auteurs soulignent que la fibrogénicité des poussières de mine est, d'une manière générale, très faiblement corrélée avec la teneur en quartz des poussières. La pénétration des poussières dans les tissus pulmonaires ou les ganglions leur apparaît essentiellement déterminée par la teneur totale en matière minérale. La teneur en quartz ne semble pas jouer un rôle particulier. Ils observent des taux de pénétration ganglionnaire plus élevés pour les fines particules qui correspondent à la fraction la plus riche en matière minérale et la plus cytotoxique. L'élimination des poussières vers le système lymphatique est déterminée par leur cytotoxicité. Ces auteurs notent cependant que les particules les plus fibrogènes au niveau des ganglions seront les plus fines pour certaines poussières et inversement pour d'autres (Bruch, 1985, 1987; Bruch and Hilscher, 1988).

Une recherche communautaire de la Commission des Communautés Européennes, consacrée à l'étude comparative de 27 tests de nocivité différents (12 tests *in vitro* et 15 tests *in vivo*), a montré que la nocivité de ces poussières est avant tout liée à leur teneur totale en matière minérale. Il est également apparu qu'il serait vain de vouloir cerner tous

les paramètres de nocivité d'une poussière au moyen d'un test unique et qu'il est souvent difficile d'observer des corrélations avec les données épidémiologiques (Bruyet, 1987, Le Bouffant, 1987a, Le Bouffant et al., 1988).

Enfin, il reste à mentionner les résultats d'études d'inhalation de mélanges artificiels quartz/charbon ou de poussières de mine. Elles mettent en évidence le lymphotropisme du quartz et suggèrent que le transport lymphatique du quartz facilite le transport des autres particules (Robertson et al., 1984; Vincent et al., 1987). Des lésions fibroconiotiques pulmonaires semblables aux nodules silicotiques sont observées par inhalation de poussières de mine riches en quartz (Robertson et al., 1988). Certaines d'entre elles peuvent, cependant, produire uniquement de la fibrose interstitielle diffuse (Davis et al., 1991).

En résumé, on peut retenir que le concept de "nocivité spécifique" est une grandeur complexe de caractère multidimensionnel. Les études *in vitro* et *in vivo* montrent que la teneur en matière minérale gouverne la nocivité des poussières de mine. Jusqu'à présent, aucun paramètre déterminant de la matière minérale n'a été clairement identifié. Le rôle de la teneur en quartz reste ambigu. L'effet protecteur des minéraux associés au quartz et les interactions entre minéraux ont été particulièrement évoqués (Le Bouffant et al., 1977, 1982, 1987b). D'autres auteurs rappellent que les teneurs en quartz habituelles des poussières sont faibles et que la nature mixte des poussières de mine permet d'imaginer des effets de modulation voire des effets nouveaux et une nocivité propre à ce genre de matériaux (Bruch, 1987).

1.2.2) Caractérisation des poussières de mine

La caractérisation des poussières respirables recueillies dans les mines fait appel à diverses méthodes physico-chimiques:

- détermination du rang du charbon par mesure du pouvoir de réflexion de la vitrinite ou de la teneur en matière volatile (chauffage à 900°C sous vide),
- détermination par Coulter Counter ou par microscopie électronique de la granulométrie des particules,
- mesure de la surface spécifique des poussières par cryoadsorption de krypton (méthode BET) ou par calcul basé sur le diamètre moyen des particules,
- études de la teneur en matière minérale, de la composition minéralogique et chimique des poussières.

L'étude des constituants inorganiques des poussières fait l'objet d'une attention particulière en nocivité expérimentale. En effet, les charbons contiennent des quantités variables de matériaux inorganiques de nature et d'origine diverses. La matière inorganique des végétaux, les complexes organométalliques ou les minéraux formés ou déposés dès les premières étapes de houillification sont les plus intimement liés au charbon et sont qualifiés de constituants "syngénétiques".

Les minéraux d'origine "épigénétique" sont formés ou déposés plus tardivement (après la consolidation du charbon) ou peuvent résulter de l'altération de minéraux syngénétiques. Ils sont moins finement divisés que les minéraux syngénétiques et occupent généralement des failles géologiques ou s'intercalent dans les veines de charbon (Stach et al., 1975).

Il est souvent difficile de certifier l'origine des minéraux identifiés dans les charbons dont une liste (non exhaustive) est présentée dans le tableau 1.1. Le quartz et les minéraux argileux tels que les micas (illites, séricite, muscovite) ou la kaolinite sont d'origine syngénétique ou épigénétique. Les minéraux argileux sont les plus abondants et peuvent représenter 60 à 80% de la matière minérale totale des charbons. Le quartz ne représente que 1 à 10% de la matière minérale totale des charbons qui varie, d'une manière générale, de 10 à 30% (Valkovic, 1983).

Les carbonates, second groupe par ordre d'abondance, seront d'origine syngénétique (dolomite, sidérite) ou épigénétique (calcite, ankérite). Ils se retrouvent aussi bien dans les bassins de type "limnique" (ou bassins continentaux du type sarro-lorrain) que de type "paralique" (ou bassins côtiers tels que la Ruhr ou le Nord-Pas de Calais).

La dolomite est un minéral caractéristique des charbons déposés dans les bassins paraliques ayant subi une forte influence marine. Elle peut y former des concrétions de taille variant de 1 à 40 cm ("coal balls") qui seront de remarquables marqueurs stratigraphiques (Stach et al., 1975). La calcite, d'origine épigénétique et en faible concentration pour la plupart des charbons datant du Carbonifère (-280 à -350 Mio. d'année) sera le constituant majeur de la matière minérale des charbons datant du Crétacé (-70 à -130 Mio. d'années) tels que ceux de Gardanne en Provence.

Les oxydes, hydroxydes et disulfures de fer sont des constituants non négligables de la plupart des charbons. La pyrite, relativement commune, est caractéristique des bassins paraliques où elle se présente sous une forme framboïdale ou nodulaire. Elle est alors d'origine syngénétique et indique que les bassins ont subi une forte influence marine et une intense activité bactérienne.

Tableau 1.1: Constituants minéraux des charbons⁽¹⁾ et composition minéralogique de la fraction respirable de 23 poussières de mines de charbon⁽²⁾

Minéraux			Teneurs rapportées à la fraction minérale des charbons ⁽¹⁾						Teneurs dans les poussières de mines ⁽²⁾		
			<1%	1-5%	5-10%	10-30%	30-60%	>60%	Teneurs moyennes	Valeurs limites	
Aluminosilicates et silicates	Illite	$K_{0.5}Al_2(Al_{0.5}Si_{3.5}O_{10})(OH)_2$	}					*	*	17.4	2.8 - 33.8
	Séricite/muscovite	$KAl_2(AlSi_3O_{10})(OH)_2$								9.0	2.1 - 20.4
	Kaolinite	$Al_4(Si_4O_{10})(OH)_8$			*	*			
	Montmorillonite	$Al_2(Si_4O_{10})(OH)_2 \cdot nH_2O$			*	*			
	Chlorite	$(Mg,Fe)_6Al_4(Si_4O_{10})(OH)_8$			*					≈ 1.0	≤ 2.9
	Zircon	$ZrSiO_4$			*				
Carbonates	Sidérite	$FeCO_3$			*	*			≈ 1.0	≤ 2.5	
	Calcite	$CaCO_3$			*	*			2.0	..	
	Ankérite	$CaFe(CO_3)_2$			*	*			
	Dolomite	$CaMg(CO_3)_2$		*	*				≈ 1.0	≤ 3.0	
Oxydes et hydroxydes	Quartz	SiO_2		*	*				4.9	1.5 - 11.6	
	Limonite	$Fe_2O_3 \cdot nH_2O$		*	*				
	Hématite	Fe_2O_3		*					
	Goethite	$FeOOH$		*					
	Diaspore	$AlOOH$		*					
	Rutile	TiO_2	*						
(Di)sulfures et sulfates	Pyrite	FeS_2		*	*				≈ 1.0	≤ 4.5	
	Marcassite	FeS_2		*					
	Galène	PbS		*					
	Baryte	$BaSO_4$		*					
	Gypse	$CaSO_4 \cdot 2H_2O$		*					< 1.0	≤ 2.0	
Chlorures	Halite	$NaCl$	}	*	*				< 1.0	< 1.0	
	Sylvine	KCl									
Phosphates	Apatite	$Ca_5(PO_4)_3(F,OH...)$		*					

(1) d'après Stach et al., 1975

(2) teneur moyenne en charbon = 58.8% (valeurs limites: 16.4-82.8%); d'après Le Bouffant, 1987a

La teneur en matière minérale des poussières respirables se rapporte à une mesure de teneur en cendres déterminée à basse température (150°C) sous plasma d'oxygène (LTA, Low Temperature Ashing). Elle est souvent confondue avec les teneurs en cendres qui sont mesurées par pesée du résidu d'incinération à l'air à des températures plus élevées (jusqu'à 815°C). La mesure du rendement en cendres s'accompagne d'un dégagement de l'eau de constitution des minéraux, d'une décomposition des carbonates avec dégagement de CO₂, d'une oxydation des pyrites en oxydes de fer et d'une transformation du soufre organique en sulfates. Ces modifications se traduisent généralement par une perte de poids et une teneur en cendres inférieure à la teneur en matière minérale (Valkovic, 1983).

La teneur en matière minérale de la fraction respirable des poussières de mine est extrêmement variable (de 10 à 90%) et systématiquement plus élevée que celle des charbons exploités. Cette tendance s'accroît pour les poussières de mine de charbon de bas rang ($\geq 40\%$ de matière volatile) qui sont plus riches en matière minérale ($> 50\%$) que celles de charbon de haut rang (matière volatile $< 12\%$, matière minérale $< 30\%$) (d'après Le Bouffant, 1987a). Cette richesse en minéraux résulte des techniques d'extraction qui abattent le charbon (et sa propre matière inorganique) sans épargner les roches intercalaires ou les épontes de la veine de charbon (nommées "toit" et "mur").

La détermination de la **composition minéralogique des poussières** est basée sur des mesures de diffraction des rayons X (RX) et de spectroscopie infrarouge (IR). Les études de diffraction RX, rarement consacrées à des poussières originales, sont effectuées sur des poussières ayant subi un LTA voire sur des cendres obtenues à 380°C ou 450°C. Les analyses de spectroscopie IR sont effectuées sur des poussières ayant au moins subi un LTA et sur des cendres obtenues à 380°C ou 700°C. Pour les deux méthodes analytiques, le choix du traitement thermique des poussières dépend de la nature du minéral à analyser. Les méthodes de calibration (standard interne ou externe), le choix des matériaux de référence (origine géologique et granulométrie) et les méthodes de correction des interférences sont également variables d'un laboratoire à l'autre.

Une comparaison entre les méthodologies appliquées dans différents laboratoires européens (Le Bouffant, 1987a) a montré que les résultats sont plus concordants pour la spectroscopie IR que la diffraction RX. Les analyses de kaolinite et notamment de quartz se sont avérées les plus concordantes et les plus fidèles. Les résultats pour l'illite/séricite sont considérés comme satisfaisants compte-tenu des difficultés analytiques propres à ce genre de matériaux. Cette étude a souligné l'importance du choix des matériaux de

référence: effets de granulométrie pour la détermination du quartz et problèmes de cristallinité des minéraux argileux.

Les valeurs extrêmes et les teneurs moyennes des constituants minéraux de 23 poussières respirables de mines européennes de charbon sont données dans le tableau 1.1 (Le Bouffant, 1987a). On peut considérer que les teneurs moyennes des trois constituants majeurs (quartz/kaolinite/micas) sont approximativement dans les rapports 1/2/4. Ces valeurs ne sont données qu'à titre indicatif car il existe d'une poussière à l'autre des fluctuations d'ordre 1 à 10 pour les teneurs des différents minéraux ou leurs concentrations relatives. La teneur en quartz des poussières respirables est en moyenne de l'ordre de 5% et dépassera rarement 10%.

La détermination de la **composition chimique** des poussières de mine, des charbons ou de la matière minérale des épontes est basée sur les analyses de cendres par spectrométrie de fluorescence X et d'absorption atomique. Les oxydes des 10 éléments majeurs (Si, Al, Fe, K, Ca, Mg, Na, Ti, S, P) représentent plus de 95% de la masse des cendres de ces matériaux. Leurs teneurs relatives expriment l'échelle suivante: $\text{SiO}_2 > \text{Al}_2\text{O}_3 > \text{Fe}_2\text{O}_3 > \text{CaO}, \text{K}_2\text{O}, \text{MgO}, \text{Na}_2\text{O}, \text{TiO}_2, \text{SO}_3, \text{P}_2\text{O}_5$. La teneur en oxyde de silicium (quartz inclus) représente généralement 50-60% de la masse de ces cendres. Pour les poussières de mine, elle tombe à environ 30% en se rapportant à la masse des poussières non-calcinées.

Les rapports $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ (quartz inclus) seront très variables: 2.8 ± 1.3 pour la matière minérale des épontes, 2 ± 0.2 pour les poussières de mine, 1.3 ± 0.3 à 1.6 ± 0.5 pour les charbons. Ces valeurs, calculées sur des données empruntées à la littérature, sont propres aux poussières, charbons et minéraux associés de la Ruhr (Ruhrkohlehandbuch, 1987; Kühn et al., 1987). Elles révèlent la contribution de la matière minérale des épontes à celle des poussières.

Il faut également noter que les rapports $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ de la matière minérale des épontes (1.6 ± 0.1 , quartz exclus) ou de certaines illites isolées dans le bassin de la Ruhr ou du pays de Galles ($\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3 = 1.4$ à 1.6) s'éloignent des valeurs des illites de dépôts géologiques non-charbonneux ($\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3 = 1.9$) et se rapprochent des valeurs de la kaolinite ($\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3 = 1.2$). Ces valeurs traduisent un enrichissement en aluminium que l'on retrouvera également dans certaines phases minérales proches des illites, faiblement cristallinisées, finement divisées mais minéralogiquement non-identifiables qui ont été détectées en grande quantité (jusqu'à 60% en masse) dans la matière minérale des charbons de la Ruhr ou de la Saar (Kühn et al., 1987).

1.3) Objectifs et présentation du travail

Il existe de nombreuses incertitudes relatives au concept de nocivité spécifique des poussières de mine de charbon. Elles sont illustrées par des divergences ou des contradictions flagrantes entre les données épidémiologiques, les résultats des tests de nocivité et les données physico-chimiques des poussières. Les discordances les plus frappantes ont trait à la teneur en quartz des poussières, minéral bien connu pour ses propriétés cytotoxiques et fibrogènes. La teneur totale en matière minérale gouverne la nocivité expérimentale des poussières. Mais les analyses minéralogiques n'ont pas permis d'identifier les paramètres déterminant la nocivité de ces poussières.

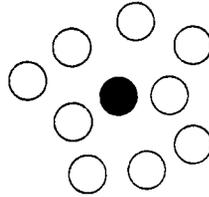
Il faut rappeler que les vraies poussières de mine sont des poussières mixtes, c'est à dire des mélanges complexes de constituants organiques et minéraux qui représentent des populations hétérogènes de particules. L'hétérogénéité au niveau de la particule individuelle est ignorée par les méthodes analytiques conventionnelles utilisées en routine (spectroscopie IR ou diffraction RX). Elles fournissent des résultats d'analyse globale (donnés en concentrations massiques) qui ne dévoilent en rien la distribution des divers composants au sein des poussières.

La distribution des constituants des matériaux particuliers peut être imaginée, notamment pour les composants mineurs ou traces, par deux cas de figures extrêmes. Ceux-ci sont illustrés (pour des constituants de même masse spécifique et des particules isométriques) par la figure 1.2. Elle modélise une teneur massique en quartz de 10% (déterminée par analyse globale) signifiant d'une part:

- que 10% de la population de particules sont des particules exclusivement constituées de quartz (**mélange "exogène"**),
- ou, à l'autre extrême, que toutes les particules sont de nature mixte et contiennent chacune une fraction de 10% en masse de quartz (**mélange "endogène"**).

Il apparaît, d'un point de vue toxicologique, que ces deux extrêmes représentent deux situations fondamentalement différentes: la surface du quartz, accessible dans un mélange exogène, sera masquée par des constituants protecteurs dans un mélange endogène.

Mélange exogène:



Mélange endogène:

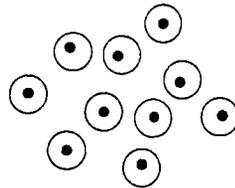


Figure 1.2: Modélisation d'une teneur massique de 10% en quartz (déterminée par analyse globale) et formant un mélange exogène ou un mélange endogène

On peut donc s'interroger sur les limites des études de nocivité spécifique basées uniquement sur des méthodes analytiques conventionnelles et se demander si les raisons des divergences précédemment évoquées ne sont pas à chercher dans la nature hétérogène des particules.

Ce raisonnement montre qu'une caractérisation au niveau de la particule individuelle s'avère impérative pour les études visant à corréliser les données toxicologiques aux paramètres physico-chimiques des poussières mixtes.

Le présent travail est consacré à une telle caractérisation de poussières d'origine diverses. Dans la panoplie actuelle des techniques analytiques capables de caractériser des poussières respirables au niveau de la particule individuelle, la microsonde laser couplée à la spectrométrie de masse (microsonde LAMMA, voir chapitre 2) est un outil analytique de haute sensibilité et de grande sélectivité.

Cette méthode analytique sera d'abord utilisée sur des poussières de silice de référence. Elles seront étudiées afin d'élaborer un schéma de classification des particules individuelles pouvant distinguer les mélanges exogène et endogène de quartz. Le reste du travail sera consacré à l'étude de vraies poussières de mine de charbon et de poussières recueillies sur poumons de mineurs.

Le schéma de classification des poussières de silice et la caractérisation des autres poussières sont fondamentalement basés sur les éléments détectables au niveau de la particule individuelle. On y cherchera des critères de groupes de particules (éléments ou combinaisons d'éléments) permettant de différencier les poussières par des "histogrammes chimiques".

Ces derniers serviront à identifier les particules dont la présence dans les poussières pourrait expliquer les données expérimentales de nocivité, les données anatomo-pathologiques des poussières récupérées sur poumons humains et/ou les données épidémiologiques.

L'identification des paramètres de modulation de la nocivité propre au quartz sera l'objectif premier de ce travail. Les contaminations de la surface du quartz, dont le rôle à déjà été mis en exergue par la littérature scientifique, feront l'objet d'une attention particulière. Mais on concentrera l'étude sur les vraies poussières de mines plutôt que sur le cas des silices ou des mélanges artificiels.

On tentera également de cerner des paramètres de nocivité jusqu'à présent insoupçonnés, indépendants du quartz et susceptibles d'être validés par de futures expérimentations *in vitro* ou *in vivo*.

La concordance (ou la divergence) entre les données épidémiologiques et les données de nocivité expérimentale servira de base pour discuter la spécificité des paramètres identifiés.



CHAPITRE 2

Partie expérimentale et caractérisation des poussières par microsonde LAMMA

2.1) La microsonde laser LAMMA

L'idée d'utiliser les sources d'ions induites par laser en spectrométrie de masse est apparue dans les années 1960. Les instruments développés, de résolution spatiale et de limites de détection insuffisantes, ne permettaient pas d'effectuer des analyses dans le domaine du micromètre (Kovalev et al., 1978; Conzemius and Capellen, 1980; Van Vaeck and Gijbels, 1989). C'est en 1975 que Kaufmann et Hillenkamp présentent une configuration d'instruments capables de satisfaire aux besoins des analyses dans le domaine considéré. Le premier instrument commercial, la microsonde LAMMA 500® (Leybold-Heraeus, Cologne), fut disponible dès 1978.

La configuration de base de ces instruments consiste à coupler, au travers d'un microscope, une source laser pulsée et un spectromètre de masse à temps de vol. La source laser est utilisée pour "vaporer" et partiellement ioniser l'échantillon. Les informations analytiques sont obtenues par la spectrométrie de masse des ions formés. Cette configuration offre l'avantage d'effectuer des analyses localisées et sensibles sur des microvolumes d'échantillon préalablement choisis (10^{-12} - 10^{-13} cm³).

Originellement vouée à l'étude des tissus biologiques, l'analyse par spectrométrie LAMMS (LAsER Microprobe Mass Spectrometry) dépasse aujourd'hui le cadre de la recherche biomédicale et trouve de nombreuses applications dans les autres domaines scientifiques. On trouvera dans la littérature de nombreux articles de revues décrivant les applications dans:

- le domaine biomédical (Kaufmann 1982a; Kaufmann et al., 1978, 1979, 1986, 1989; Verbueken et al., 1985, Tourmann et al., 1990),
- en analyse des aérosols et des fibres (Kaufmann, 1986; Wieser and Wurster, 1986; De Waele and Adams, 1986; Van Grieken and Xhoffer, 1992),
- en sciences des matériaux et en spectrométrie de masse des composés inorganiques (Verbueken et al., 1988; Clarke, 1989; Holm and Holtkamp, 1989),
- en spectrométrie de masse des composés organiques et notamment des biomolécules peu volatiles et thermolabiles (Hillenkamp, 1985; Hillenkamp and Karas, 1990; Spengler and Kaufmann, 1992; Hillenkamp et al., 1993).

2.1.1) Principe physique

La spectrométrie LAMMS est basée sur l'excitation électromagnétique par laser d'échantillons en phase solide. Les processus de transfert et de déposition d'énergie qui apparaissent au cours de l'interaction laser/solide dépendent de l'irradiance (densité de puissance) au niveau du point d'impact du laser. Des processus d'absorption non-linéaires apparaissent pour des irradiances suffisamment élevées ($> 10^6$ W/cm²). Ceux-ci peuvent induire des transformations physiques de l'échantillon de nature et d'intensité diverses: désorption en phase gazeuse, désorption/ionisation, formation de microplasma...

Il n'existe actuellement aucune théorie unifiant tous les processus physiques participant à l'ionisation laser de la phase solide des matériaux inorganiques ou organiques. Les mécanismes d'ionisation laser diffèrent lorsqu'ils concernent directement la phase solide de l'échantillon ou la phase gazeuse susjacente à l'échantillon (Muller et al., 1993). L'ionisation en phase gazeuse est contrôlable car les principes de base de la spectroscopie atomique ou moléculaire s'y appliquent. Elle permet d'augmenter le rendement ionique par la technique de post-ionisation des neutres émis dans la phase gazeuse.

L'ionisation directe de la phase solide met en jeu des mécanismes ultra-rapides de déposition d'énergie. Leurs contributions effectives à l'ionisation et leurs effets sur les résultats finaux restent difficiles à évaluer. En pratique, on a coutume de distinguer plusieurs modes de formation d'ions en fonction de l'irradiance:

- à **haute irradiance** ($>10^{10}$ W/cm²) des ions élémentaires seront préférentiellement formés
- à **moyenne irradiance** ($<10^{10}$ W/cm² et $> 10^8$ W/cm²) on retrouvera les ions élémentaires éventuellement accompagnés d'ions "clusters" (ou ions de recombinaisons) dont la nature dépend du solide étudié
- à **basse irradiance** ($<10^7$ - 10^8 W/cm²) prédominent les processus de "désorption laser". Ils favorisent l'analyse des molécules organiques car la fragmentation des molécules est limitée en mode désorption. Ces dernières seront détectées sous forme d'ions de protonation (M + H)⁺, de cationisation (M + Na)⁺... Une optimisation des conditions de déposition de l'énergie laser dans une matrice absorbant cette énergie a permis de mettre au point la technique MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation) (Hillenkamp and Karas, 1990; Hillenkamp et al., 1993). Elle permet la désorption/ionisation de molécules "intactes" et de très hautes masses (< 350 kDa). Cette

technique est très efficace en analyse des biopolymères tels que les protéines, glycolipides, oligo-nucléotides...

Il n'existe pas de seuil de transition bien défini entre ces différents modes d'ionisation. De nombreux paramètres physiques vont être déterminants: nature de l'échantillon, géométrie échantillon/laser, longueur d'onde du laser, mode de focalisation... Ils imposent des limites quant aux possibilités de quantification en spectrométrie de masse induite par laser. On retiendra, dans le cadre du présent travail consacré à la matière minérale des poussières, que la matrice de l'échantillon et le potentiel d'ionisation (PI) de l'élément considéré vont influencer les processus d'ionisation et le rendement ionique.

L'irradiance doit franchir une valeur de seuil d'ionisation qui dépendra d'**effets de matrice**: nature des liaisons chimiques, concentrations des autres éléments, réseau cristallin... La préexistence d'ions dans les solides ioniques et l'énergie du réseau cristallin vont être déterminants. Une étude d'halogénures alcalins a montré l'existence d'une loi exponentielle reliant le seuil d'ionisation et l'énergie de réseau des différents halogénures étudiés (Muller, 1982).

Le seuil d'ionisation à franchir sera également plus bas pour les éléments facilement ionisables tels que les alcalins (PI = 4-5 eV) et dont les **limites de détection** sont les plus basses (0.1-10 ppm) (Wechsung et al., 1978; Surkyn and Adams, 1982). Les limites de détection des éléments à potentiels d'ionisation plus élevés (par exemple Hg, Pt, Cd à PI ≥ 9 eV) sont de l'ordre de quelques centaines de ppm.

Ces limites de détection sont remarquables compte-tenu de la faible quantité de matériel analysé pour chaque impulsion laser (de l'ordre de quelques picogrammes). La quantité absolue d'élément ainsi détectable est de l'ordre de 10^{-17} - 10^{-19} grammes. Les limites de détection peuvent être améliorées d'un facteur 10 voire 100 par ionisation laser résonante, c'est à dire en calant la longueur d'onde du laser sur des raies élémentaires définies (Krier et al., 1985; Verdun et al., 1987; Hubert et al., 1992).

La formation des ions est un processus quasi-instantané qui ne dépassera pas la durée de l'impulsion laser (10-15 nS). La spectrométrie de masse à temps de vol est une méthode de choix pour les sources pulsées d'ions. La très haute transmission de tels spectromètres de masse n'est pas étrangère aux limites de détection atteintes en spectrométrie LAMMS.

La spectrométrie de masse à temps de vol (TOF, Time-Of-Flight) consiste à séparer des ions de masses différentes ayant acquis, grâce à un potentiel électrostatique d'accélération U_{TOF} , une même énergie cinétique E_{cin} . Ils atteignent des vitesses v différentes qui vont permettre de les séparer en fonction de leur temps de vol t le long d'un trajet d . Ainsi, pour un ion de masse m et de charge élémentaire e :

$$E_{cin} = 1/2 mv^2 = eU_{TOF}$$

$$v = (2eU_{TOF}/m)^{1/2}$$

$$v = d/t \Rightarrow t = d/(2eU_{TOF}/m)^{1/2}$$

Pour un trajet d et un potentiel d'accélération U_{TOF} constants:

$$t = km^{1/2} \quad (k = \text{constante})$$

On voit que le temps de vol t des ions est directement proportionnel à la racine carrée de leur masse m . Un tel spectromètre de masse sépare donc les ions par paquets d'ions de masse définie et offre l'avantage, par simple changement de polarité des potentiels, d'analyser les ions positifs ou les ions négatifs du microplasma généré par le pulse laser. La résolution en masse du spectromètre sera améliorée à l'aide d'un réflecteur d'ions (voir ci-dessous) pour atteindre une valeur $m/\Delta m$ proche de 500 (à la masse 200).

2.1.2) Description instrumentale

L'instrument utilisé dans le présent travail est une microsonde LAMMA 500® (Wechsung et al., 1978; Vogt et al., 1981). Un schéma, donné en figure 2.1, montre les trois éléments de base de cet instrument: la source laser, le spectromètre de masse TOF et une version modifiée du microscope (Kaufmann, 1982) permettant la visualisation en UV des échantillons ($\lambda = 260 \pm 10$ nm).

L'échantillon monté sur grille de microscope électronique ($\varnothing = 3$ mm) se trouve sur un manipulateur en x,y et sera observé en transmission au travers d'une fenêtre de quartz. Un laser pilote à He-Ne permet de sélectionner un point d'intérêt analytique au sein de l'échantillon. Un laser Nd-YAG ($\lambda = 1064$ nm, $\tau = 15$ ns), quadruplé en fréquence, déclenché en mode Q-switched, parfaitement colinéaire au laser pilote sera focalisé au niveau de l'échantillon sur un diamètre de l'ordre du micron.

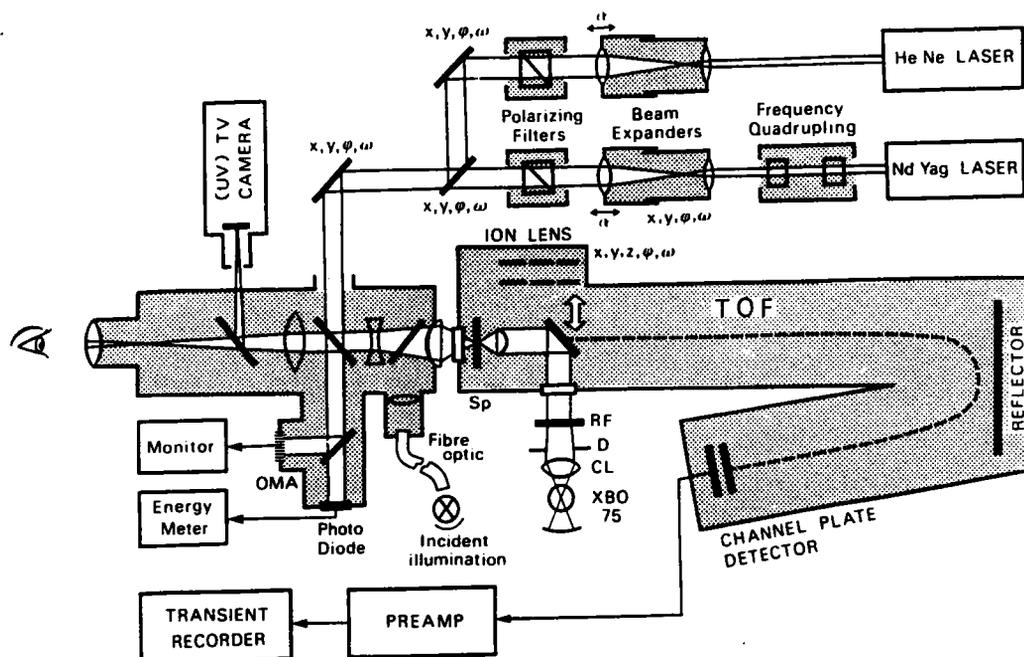


Figure 2.1: Représentation schématique de la microsonde laser LAMMA 500

Tableau 2.1: Données techniques de la microsonde LAMMA 500

Microscope	Objectif: Ultrafluar x10, x32, x100 (Zeiss) Transillumination UV: lampe XBO 75W/2 (Osram) + filtre réflexion (Schott) Caméra UV: TSU C2400 (Hamamatsu)
Laser	Laser pilote: He-Ne 4 mW (Spectra-Physics) Laser UV: Nd-YAG System 2000 (JK Laser)
TOF	Leybold-Heraeus GmBH (1.8 m., réflecteur inclus) $U_{TOF} = \pm 3$ kV $U_{LENS} = \pm 1.2$ kV $U_{REF} = \pm 0.14$ kV Système vide: Pompes rotative/turbomoléculaire/ionique (Leybold-Heraeus)
Détecteur	Tandem-MCP (Galiléo MCP 40) + préamplificateur x5 (Advantek GPD)
Enregistreur	Biomation 8100 (Gould)
Informatique	PC-AT IBM-compatible (Fox) Programme ULISSES 7.2 (Chips-At-Work GmBH, Bonn)

L'irradiance au point d'impact du laser (10^7 - 10^9 W/cm²) suffit à "vaporer" et partiellement ioniser l'échantillon. Les ions formés dans le microplasma sont accélérés par un potentiel de ± 3000 volts et focalisés par une lentille ionique sur l'axe du spectromètre de masse. Après un trajet libre de champ de 120 cm, les ions sont réfléchis sur un angle de près de 180° par un réflecteur ionique. Ce dernier compense les différences de temps de vol des ions de masses égales mais d'énergies cinétiques initiales différentes; il est destiné à améliorer la résolution du spectromètre de masse.

Après un dernier trajet de 60 cm les ions arrivent au détecteur effectuant une conversion ion/électron et une amplification en cascade d'électrons. Le signal, stocké dans un enregistreur de signaux transitoires (100 MHz) sera visualisé sur un oscilloscope et envoyé vers un microordinateur. Les détails des données techniques de la microsonde LAMMA 500 sont donnés dans le tableau 2.1.

2.2) Matériels et méthodes

2.2.1) Origine et préparation des échantillons

Les détails sur les méthodes de prélèvement, l'origine stratigraphique et la composition minéralogique des poussières seront donnés dans les chapitres respectifs aux différentes poussières. Tous les échantillons de cette étude sont des poussières respirables ($\varnothing = 1-4 \mu\text{m}$) de propriétés toxicologiques connues:

- les poussières de silice de référence (chapitre 3) sont des matériaux broyés en laboratoire dont on a isolé la fraction respirable.
- les poussières de mines riches en quartz (chapitre 4) ont été prélevées au fond sur les filtres secs de dépoussiéreurs (poussières allemandes) ou d'auxiliaires de ventilation (poussières britanniques) installés en voies d'évacuation; la fraction respirable de ces poussières a été isolée en laboratoire.
- les poussières à faible teneur en quartz des chapitres 5 et 6 ont été prélevées au fond (en taille ou en voie) sur échantillonneur BAT II; celui-ci permet de recueillir directement la fraction respirable des poussières volantes.

La seule condition imposée aux échantillons destinés aux analyses LAMMA est une stabilité au vide (10^{-6} - 10^{-7} mbar). Les échantillons ont été analysés sans aucun traitement préalable (lavage, métallisation ou élimination de la fraction de charbon); ils correspondent exactement aux échantillons utilisés dans les tests sur cellule ou sur l'animal. Les poussières sont déposées par adhésion sur une grille de microscope électronique (200 mesh) recouverte d'un film de formvar (polyvinylformaldéhyde, épaisseur $< 0.05 \mu\text{m}$).

Une méthode d'analyse en profil de profondeur par tirs laser répétitifs sur les particules individuelles est décrite au chapitre 4. Elle nécessite de maintenir les particules sous le microscope malgré l'onde de choc induite par le premier tir laser. Les particules ont donc été fixées dans une feuille de formvar. Celle-ci a été préparée par mise en suspension des poussières dans une solution à 1.4% de formvar/chloroforme ($\approx 1\text{mg}$ de poussière/ml de solution).

La suspension de particules est étalée et séchée sur support de verre. Une répétition des opérations permet de préparer une feuille de formvar d'épaisseur avoisinant $0.5 \mu\text{m}$. La feuille chargée de particules, détachée et récupérée par flottation sur eau bidistillée, sera repêchée sur papier filtre, séchée à l'air puis montée sur grille sandwich.

2.2.2) Enregistrement et traitement des spectres LAMMA

Seuls les spectres d'ions positifs des particules ont été enregistrés dans la présente étude. Des tentatives préliminaires avaient montré que les spectres d'ions négatifs des poussières de mines étaient très riches en signaux mais dont la plupart étaient non-spécifiques aux différentes phases minérales et résultaient de recombinaisons en phase gazeuse. La matière organique des charbons, source de nombreuses interférences, peut conduire à l'interprétation erronée de tels spectres. Nous avons donc accepté de perdre les informations analytiques relatives aux éléments identifiables sur spectres d'ions négatifs (S, P, Cl, F...).

Afin d'obtenir des spectres LAMMA complets des particules (éléments majeurs, mineurs et traces) mais suffisamment résolus et sur un domaine dynamique étendu, deux enregistreurs de signaux transitoires ont été utilisés en parallèle: le premier était calé sur le domaine de masse des éléments majeurs (de 20 à 90 Daltons) avec une sensibilité de 500 mV; le second, calé sur un grand domaine de masse (5 à 210 Daltons), permet d'identifier les éléments mineurs ou traces (sensibilité 5 mV).

Les spectres des éléments majeurs ont été enregistrés et calibrés en masse sur microordinateur IBM-compatible à l'aide du programme *ULISSES*. La résolution en masse de la microsonde LAMMA permet de reconnaître les massifs isotopiques de la plupart des éléments mais ne suffit pas à discriminer certains signaux d'interférences. Par exemple, un signal à la masse 56 Daltons peut être attribué à l'isotope $^{56}\text{Fe}^+$ ou à l'ion moléculaire CaO^+ . La discrimination sera effectuée en fonction des critères suivants: les signaux $^{40}\text{Ca}^+$ et $^{57}\text{CaOH}^+$ qui accompagnent le signal CaO^+ et, d'autre part, les autres signaux isotopiques du fer ($^{54}\text{Fe}^+$ et $^{57}\text{Fe}^+$). Cet exemple montre qu'une interprétation de spectre sur ordinateur sans l'assistance d'un programme tenant compte de telles interférences serait erronée. L'exploitation et la classification des spectres n'a donc pas été informatisée.

Pour cette raison, l'intensité des signaux n'a pas pu être quantifiée lors de l'exploitation des spectres. L'objectif de notre travail n'est pas de fournir des résultats quantitatifs exprimés en termes de concentrations absolues (ou relatives) des différents éléments dans les particules. Les connaissances actuelles fragmentaires sur les processus d'ionisation laser des phases solides et sur les rendements ioniques des différents éléments justifient peu cette approche, surtout pour des matrices aussi complexes que les poussières de mines. Rappelons que l'objectif principal du présent travail est de déterminer des critères de groupes de particules (éléments ou combinaisons d'éléments) dont on veut étudier la distribution sur des populations de particules.

L'amplitude des signaux a donc été simplement codée selon le schéma suivant:

- **signaux d'intensité codée "0"**: signaux proches des limites de détection,
- **signaux d'intensité codée "1"**: amplitude atteignant 5 à 30% de l'échelle de saturation de l'enregistreur,
- **signaux d'intensité codée "10"**: amplitude saturée ou pouvant atteindre la saturation.

Les intensités de signaux ont été pondérées, dans la mesure du possible, par normalisation sur une **référence interne**, c'est à dire un signal élémentaire choisi en fonction des critères suivants:

- distribution de l'élément sur la totalité de la population de particules (ou au moins sur une classe définie de particule),
- l'élément possède un isotope dont l'intensité du signal varie de l'amplitude "1" à "10" ($^{41}\text{K}^+$, $^{30}\text{Si}^+$, $^{26}\text{Mg}^+$...).

Cette normalisation des intensités des signaux s'est avérée simple et efficace dans le cadre d'une exploitation des spectres non-informatisée.

La figure 2.2 illustre la normalisation des amplitudes des signaux de trois spectres en utilisant le signal $^{41}\text{K}^+$ comme référence interne. L'intensité, par exemple, du signal $^{56}\text{Fe}^+$ sera codée:

- "10" dans le spectre 2.2a (rapport $^{56}\text{Fe}^+ / ^{41}\text{K}^+ > 1$)
- "1" dans le spectre 2.2b (rapport $^{56}\text{Fe}^+ / ^{41}\text{K}^+ \approx 1$)
- "0" dans le spectre 2.2c (rapport $^{56}\text{Fe}^+ / ^{41}\text{K}^+ < 1$).

Le signal du fer dans le spectre 2.2c sera donc considéré d'amplitude moindre que dans le spectre 2.2b malgré les hauteurs de signaux comparables dans les deux cas.

Les résultats finaux des analyses LAMMA seront donnés sous forme "**d'histogrammes chimiques**" exprimés en "**incidence**". Ces histogrammes permettent de caractériser les poussières en fonction de critères de groupes de particules. Ces critères de groupes sont basés sur des éléments ou des combinaisons d'éléments. On précisera d'abord que ces combinaisons d'éléments ne doivent pas être confondues avec les ions de recombinaisons d'éléments (ou "clusters") précédemment évoqués (voir chapitre 2.1.1).

Une incidence sera définie comme la fréquence d'apparition de particules caractérisées par un élément ou une combinaison d'éléments: x *particules* sur 100 *particules* présentent l'élément A ou la combinaison ABC... Elle est donc rapportée à la population totale de particules analysées (voir ci-dessous) et sera exprimée en "**particules-%**". On précisera également qu'une telle unité n'exprime rien d'une fraction en masse de la particule.

2.2.3) Irradiance laser

L'irradiance au niveau du point d'impact laser gouverne les processus d'ionisation et les rapports des intensités de signaux observés dans les spectres. La transmission du laser (ou l'énergie laser) est modulable sur la microsonde LAMMA par un système de filtre polarisant. Des mesures d'énergie laser permettent de calculer les valeurs numériques de l'irradiance.

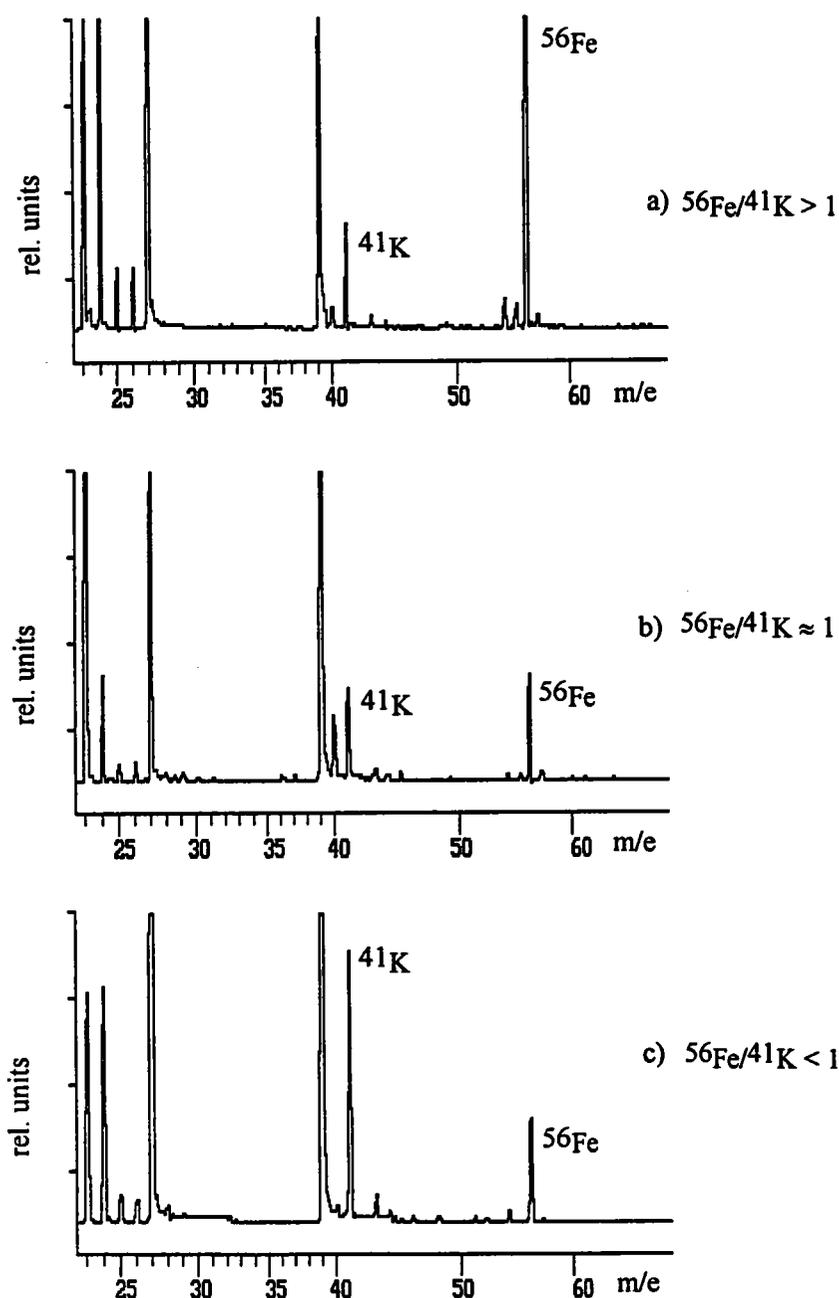


Figure 2.2: Exemples de normalisations d'amplitudes rapportées à l'intensité du signal $^{41}\text{K}^+$

Afin d'opérer dans des conditions expérimentales parfaitement définies, il est souvent préférable de fixer ce paramètre par utilisation de matériaux standards. Des coupes de résine standard SK2 (résine de Spurr dopée en Li, Na, K, Sr et Pb, concentration 10 mM, épaisseur 0.2 μm) et, d'autre part, des paillettes de muscovite (mica blanc) ont été utilisées pour standardiser les conditions d'irradiance.

Les conditions d'irradiance seront définies selon les critères suivants:

- utilisation de **100% de transmission laser** pour les études à irradiance élevée ($\approx 5.10^8$ W/cm²),
- utilisation de **30% de transmission laser** pour les études à irradiance moindre ($\approx 5.10^7$ W/cm²).

Les spectres de paillettes de muscovite obtenus à 30% et 100% de transmission laser (figure 2.3) montrent les effets de l'irradiance sur les rapports d'intensité des signaux. Le rapport des amplitudes de signaux $^{28}\text{Si}/^{27}\text{Al}$ (normalisés sur l'intensité du signal isotopique ^{41}K) sera codé "1"/"10" à irradiance moindre et sera codé "10"/"10" à irradiance élevée. Cet effet traduit (en première approximation, voir chapitre 2.1.1) les effets liés au potentiel d'ionisation d'éléments difficilement ionisables tels que le silicium (PI = 8.5 eV).

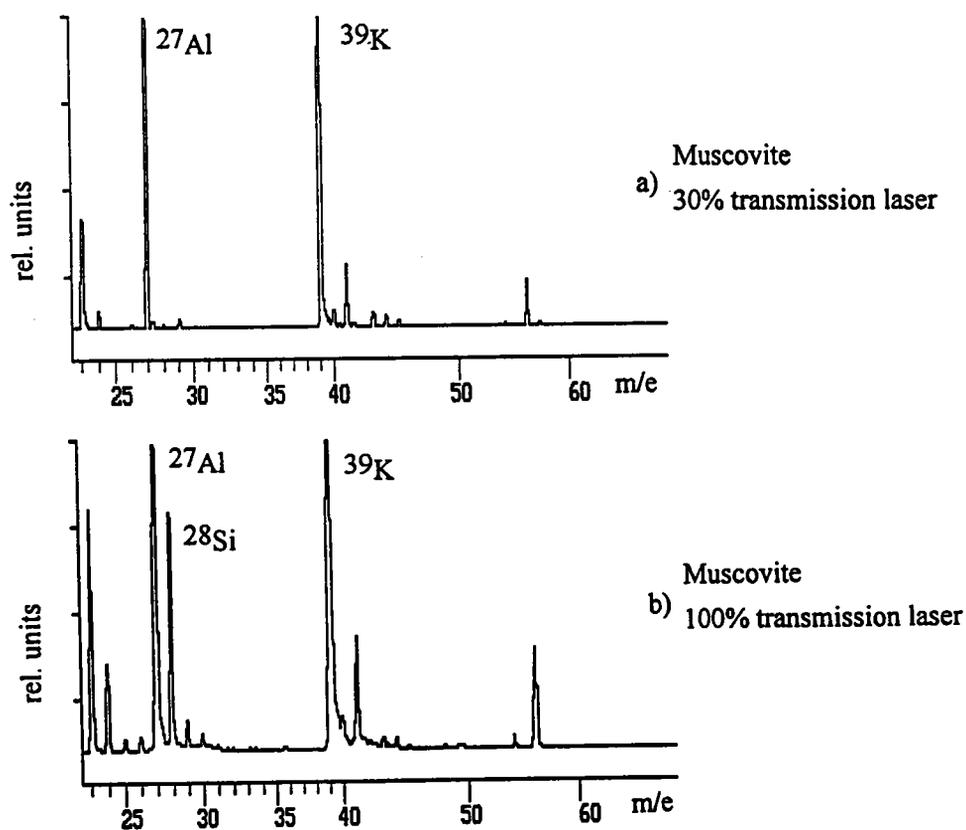


Figure 2.3: Spectres de paillettes de muscovite obtenus à 30% et 100% de transmission laser

Une augmentation de l'amplitude du signal ^{28}Si parallèle à l'irradiance a déjà été décrite pour des micro-particules de verres standards (Surkyn and Adams, 1982). Ces auteurs ont également observé des variations d'amplitudes des signaux dûes aux écarts de focalisation du laser.

On aura donc pris soin, dans le présent travail, à focaliser le faisceau laser pilote sur la feuille de formvar (et non sur le coeur des particules) afin de minimiser les écarts de focalisation d'une particule à l'autre.

Ces observations soulignent la nécessité d'opérer avec des conditions analytiques standardisées dans le cadre d'un travail visant à déterminer des incidences d'éléments (ou de combinaisons d'éléments) basées sur des rapports d'intensités de signaux.

2.2.4) Nombre de particules analysées par échantillon

Les études de caractérisation de particules individuelles sont coûteuses en temps d'accumulation des données et d'exploitation des résultats. Un compromis doit être recherché entre un temps d'analyse raisonnable et le fondement statistique des informations obtenues. L'absence de méthodes analytiques pouvant fournir des valeurs comparatives et le caractère destructif des analyses LAMMA ne facilitent pas cette approche.

Des essais par intra-comparaison des résultats obtenus (au sein d'un échantillon) sur un nombre croissant de particules analysées peuvent répondre aux études de reproductibilité. Une précédente étude LAMMA de 3 poussières de mines de charbon (Barths und Schmitz, 1985) a montré que les incidences des éléments variaient peu au sein des échantillons ($\approx 5\%$ de leurs valeurs) en comparant les résultats basés sur l'analyse de 100 et 500 particules/échantillon. On choisira donc de déterminer les **incidences des éléments par analyse de $N \geq 100$ particules/échantillon**

La reproductibilité des incidences de combinaisons d'éléments restait à tester par intra-comparaison. Les résultats sont présentés dans le tableau 2.2 pour 4 combinaisons d'éléments testées sur 5 échantillons. Ces combinaisons d'éléments, dont on discutera l'importance tout au long de ce travail, seront définies ultérieurement. Les valeurs d'incidence, empruntées aux 5 échantillons du chapitre 4, sont basées sur l'analyse de 500 et 1000 particules/échantillon.

Tableau 2.2: Intra-comparaison des incidences de 4 combinaisons d'éléments (particules-%) basées sur l'analyse de 500 et 1000 particules/échantillon (5 échantillons testés: TF4, TF1, GED, TF5, BIL)

Combinaisons d'éléments	Nombre de particules analysées	TF4	TF1	GED	TF5	BIL
		Classe I	500	1.7	1.0	0.4
	1000	1.6	1.3	0.7	0.4	0.4
Classe II	500	23.8	21.1	21.9	4.2	2.5
	1000	23.6	18.9	17.5	4.9	6.0
Fe "10" +...	500	36.4	33.3	30.1	32.2	25.9
	1000	35.8	31.4	29.0	30.6	23.8
Fe,Mg(Ca)	500	23.8	26.5	5.2	19.9	17.0
	1000	24.2	22.6	4.1	16.0	18.5

L'intra-comparaison des incidences basées sur 500 et 1000 particules analysées montre que les résultats sont relativement concordants. Les déviations peuvent être marquées pour certaines incidences inférieures à 10 particules-% (par exemple les particules de classe II de l'échantillon BIL). On peut conclure que 500 particules suffisent à discerner les échantillons en fonction de l'incidence de certains groupes de particules et que les différences entre les échantillons ont trait à des critères propres aux échantillons. On pourra, par exemple, distinguer les échantillons BIL et TF5 des 3 autres échantillons par l'incidence des particules de classe II ou différencier l'échantillon GED des autres poussières par l'incidence des particules du groupe Fe,Mg(Ca).

Ces conclusions sont concordantes avec celles d'autres auteurs ayant analysé un nombre croissant de particules de poussières de mines de charbon par microsonde électronique automatisée. Leur analyses répétées (200 à 1100 particules/échantillon) portant sur des nombres cumulés de particules variant de 2200 à 4400 particules/échantillon leur ont permis de conclure que 400-500 particules suffisaient à différencier les échantillons avec une fiabilité raisonnable (Addison et al., 1990).

On choisira donc de baser les **incidences de combinaisons d'éléments sur l'analyse de $N \geq 500$ particules/échantillon**. Seules les incidences des combinaisons d'éléments des poussières de silice de référence (chapitre 3) porteront sur $N \geq 100$ particules/échantillon car les incidences seront de l'ordre de 20 à 100 particules-% (et non 0 à 30 particules-% comme dans le cas précédent).

2.3) Recherche et définition des éléments majeurs, mineurs et traces des poussières de mine de charbon - Cas de la matière organique

Une première caractérisation de vraies poussières de mines de charbon permettra de définir les éléments majeurs, mineurs et traces. Elle permettra aussi d'illustrer les seuils de détection choisis pour ces éléments et la matière organique. Les résultats portent sur 19 poussières de mines de la Ruhr empruntées à l'étude de Reisner et Robock (1975) que l'on abordera ultérieurement (chapitre 5). L'origine stratigraphique des poussières, leur teneur en cendres (tableau 2.3) et les conditions expérimentales (irradiance) sont diversifiées afin d'effectuer un screening aussi large que possible.

Tableau 2.3: Origine et composition minéralogique de 19 poussières de mines de la Ruhr (d'après Reisner et Robock, 1975)

Horizon	Echantillon	% cendres 800°C	% masse			
			Quartz	Illite	Kaolinite	Divers
Horster	1	51.0	6.0	24.1	20.1	0.9
	2	50.3	6.5	29.8	13.2	0.8
	3	47.9	5.9	21.2	18.2	2.7
	7	54.9	6.3	27.1	19.6	1.9
	8	62.1	9.0	37.0	14.0	2.1
Obere Essener	11	21.6	2.7	9.8	6.5	2.6
	13	33.5	4.8	17.7	9.9	1.2
	14	27.3	3.7	13.4	9.4	0.9
	19	27.2	3.5	15.3	8.0	0.4
	25	33.8	2.9	21.6	8.5	0.7
	26	40.7	6.2	18.5	15.3	0.7
Untere Essener	33	14.7	1.3	8.3	6.2	0.6
	34	17.5	1.7	11.3	4.1	0.4
	36	20.2	1.8	12.5	4.9	1.0
	42	27.9	3.4	15.6	8.7	0.3
Bochumer	53	9.2	1.4	5.0	2.6	0.3
	67	9.8	1.2	6.3	2.2	0.1
	74	9.1	0.8	6.1	2.2	0.0
	77	16.3	1.7	11.7	2.7	0.2

2.3.1) Eléments majeurs

Les éléments dont les oxydes représentent la majorité de la masse des cendres de charbons et de poussières de mines (voir chapitre 1.2.2) seront définis comme éléments majeurs (^{23}Na , ^{24}Mg , ^{27}Al , ^{28}Si , ^{39}K , ^{40}Ca , ^{48}Ti et ^{56}Fe).

Les valeurs moyennes (minimales et maximales) des incidences en éléments majeurs obtenues à 100% de transmission laser (d'intensité de signal codée "0", "1" ou "10") sont présentées dans la figure 2.4 (120-130 particules/échantillon). Elles se rapportent à un premier lot de 9 échantillons (01, 03, 07, 13, 14, 19, 25, 34, 36).

La distribution des intensités de signaux est variable d'un élément à l'autre. L'aluminium est principalement détecté avec un signal d'amplitude "10". Le potassium est uniformément détecté avec un signal d'intensité "1" ou "10". Ces deux éléments sont marqueurs de la matière minérale. Les autres éléments seront plus fréquemment détectés avec des signaux d'amplitude "1" (Na, Mg, Si, Ca, Fe) voire "0" (Ti).

L'incidence des particules révélant du silicium avec un signal d'amplitude "10" représente moins de 20 particules-%. Ce résultat est surprenant compte-tenu des conditions expérimentales (100% de transmission laser) qui favorisent la détection de cet élément difficilement ionisable (voir spectres étalons de muscovite par exemple, figure 2.3).

Il faut cependant replacer cette observation dans le contexte des poussières de mines qui contiennent des particules sans silicium (charbons, carbonates), des particules de minéraux à faible teneur en silicium (kaolinite) et des particules d'illites dont la teneur en silicium est plus faible que celle de la muscovite étalon (illites enrichies en aluminium, voire chapitre 1.2.2). Ces minéraux contribuent à la faible incidence de particules à signal Si "10". Ceci nous confortera ultérieurement dans l'utilisation d'un tel signal comme marqueur de la présence de quartz dans les particules minérales (voir chapitre 3).

Nous choisirons de placer le **seuil de détection des éléments majeurs à l'intensité de signal \geq "1"**. Les incidences cumulées pour les intensités de signaux "1" et "10" varient de 10 particules-% pour le titane à 50 particules-% (Ca) pour atteindre 70-100 particules-% pour les autres éléments (Na, Mg, Al, Si, K, Fe).

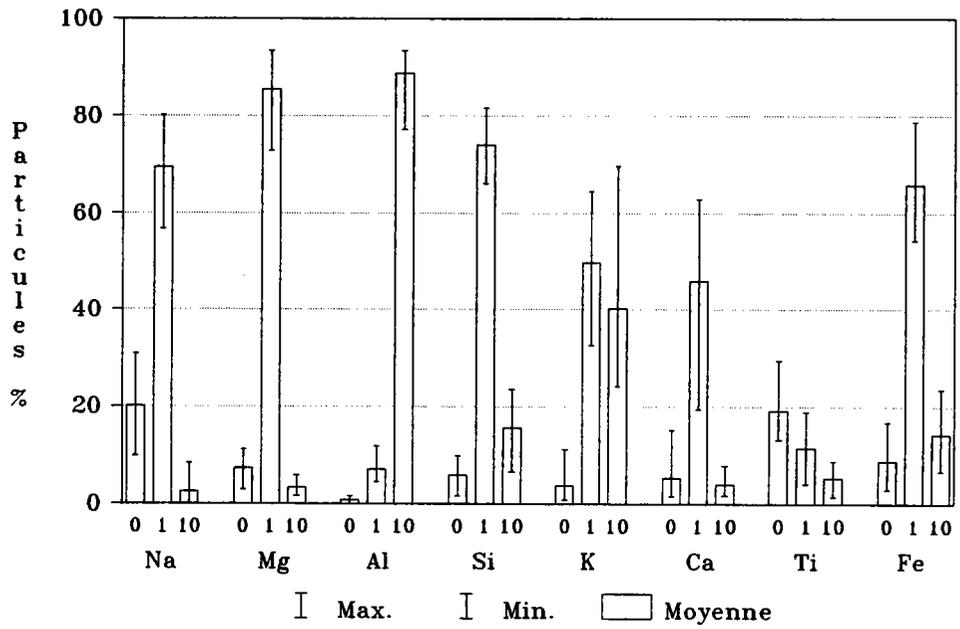


Figure 2.4: Distribution des intensités de signaux ("0", "1" ou "10") des éléments majeurs obtenue à 100% de transmission laser (lot de 9 poussières, voir texte)

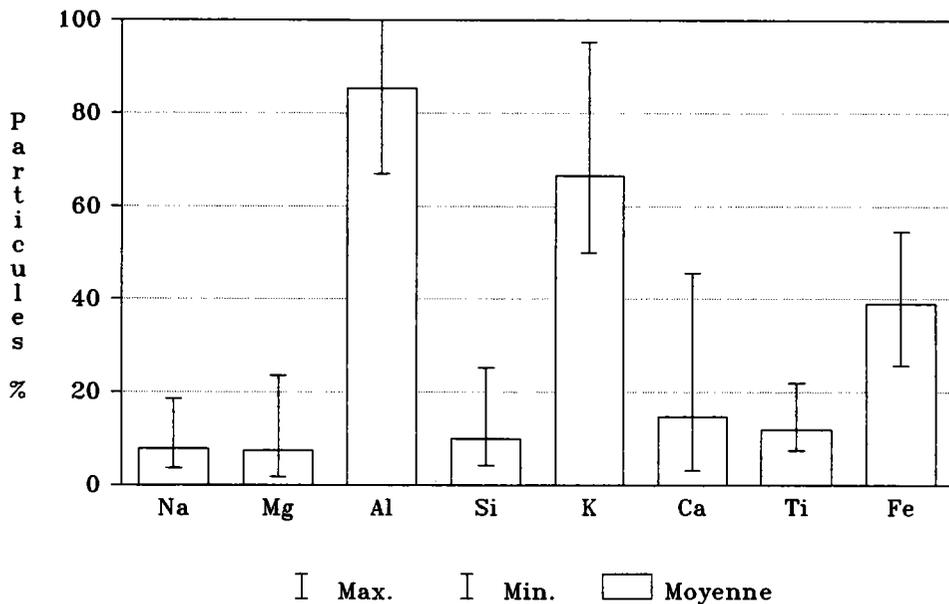


Figure 2.5: Incidences cumulées des éléments majeurs (amplitudes de signaux codées "1" et "10") obtenues à 30% de transmission laser (lot des 10 poussières restantes, voir texte)

La majorité des analyses LAMMA de ce mémoire ont été effectuées à 30% de transmission laser. Les incidences cumulées moyennes (amplitudes $\geq "1"$) obtenues dans ces conditions d'irradiance sont présentées dans la figure 2.5 (120-130 particules/échantillon). Ces données concernent le lot restant de 10 poussières (échantillons 02, 08, 11, 26, 33, 42, 53, 67, 74 et 77).

L'aluminium et le potassium sont les éléments les plus fréquemment détectés et seront intercorrélés dans les spectres. Ils restent de bons marqueurs de la matière minérale dans ces conditions d'irradiance (30% de transmission laser). Ils serviront de critère directeur dans la détermination des combinaisons d'éléments. L'abondance des particules contenant du potassium permettra d'utiliser le signal isotopique $^{41}\text{K}^+$ comme référence interne pour la normalisation des spectres (voir ci-dessus). Le fer sera le troisième élément en terme d'abondance dans les populations de particules.

On essaiera, à titre d'orientation, de comparer les incidences de l'aluminium, du potassium et du fer pour des poussières à teneurs en matière minérale extrêmement variables. Les 10 échantillons du lot analysé à 30% de transmission laser ont été classés par ordre croissant de teneur en cendres (figure 2.6a). On observe un accroissement parallèle des incidences de l'aluminium (figure 2.6b) et du potassium (figure 2.6c). Seule l'incidence du fer semble se comporter différemment. Ce résultat montre que les incidences de certains éléments peuvent varier indépendamment.

Mais on notera que des échantillons pauvres en matière minérale (par exemple 53, 67, 74) contiennent autant de particules chargées de fer (voire plus, cas de la poussière 77) que des échantillons très riches en matière minérale (cas de la poussière 08, par exemple). On reviendra au chapitre 5 sur l'origine stratigraphique (et le rang élevé des charbons) de ces poussières pauvres en matière minérale totale, mais apparemment enrichies en fer.

2.3.2) Eléments mineurs et traces

Le seuil de détection des éléments mineurs (^7Li , $^{85/87}\text{Rb}$, ^{88}Sr , ^{138}Ba) a été choisi à l'intensité de signal "0". Les signaux n'atteindront que très rarement l'amplitude "10" même à 100% de transmission laser. Les incidences cumulées de ces éléments (amplitudes $\geq "0"$) seront inférieures à 20 particules-%. Seul le lithium, de présence quasi-ubiquitaire sur la population des particules, pourra atteindre une incidence en moyenne de 80 particules-%.

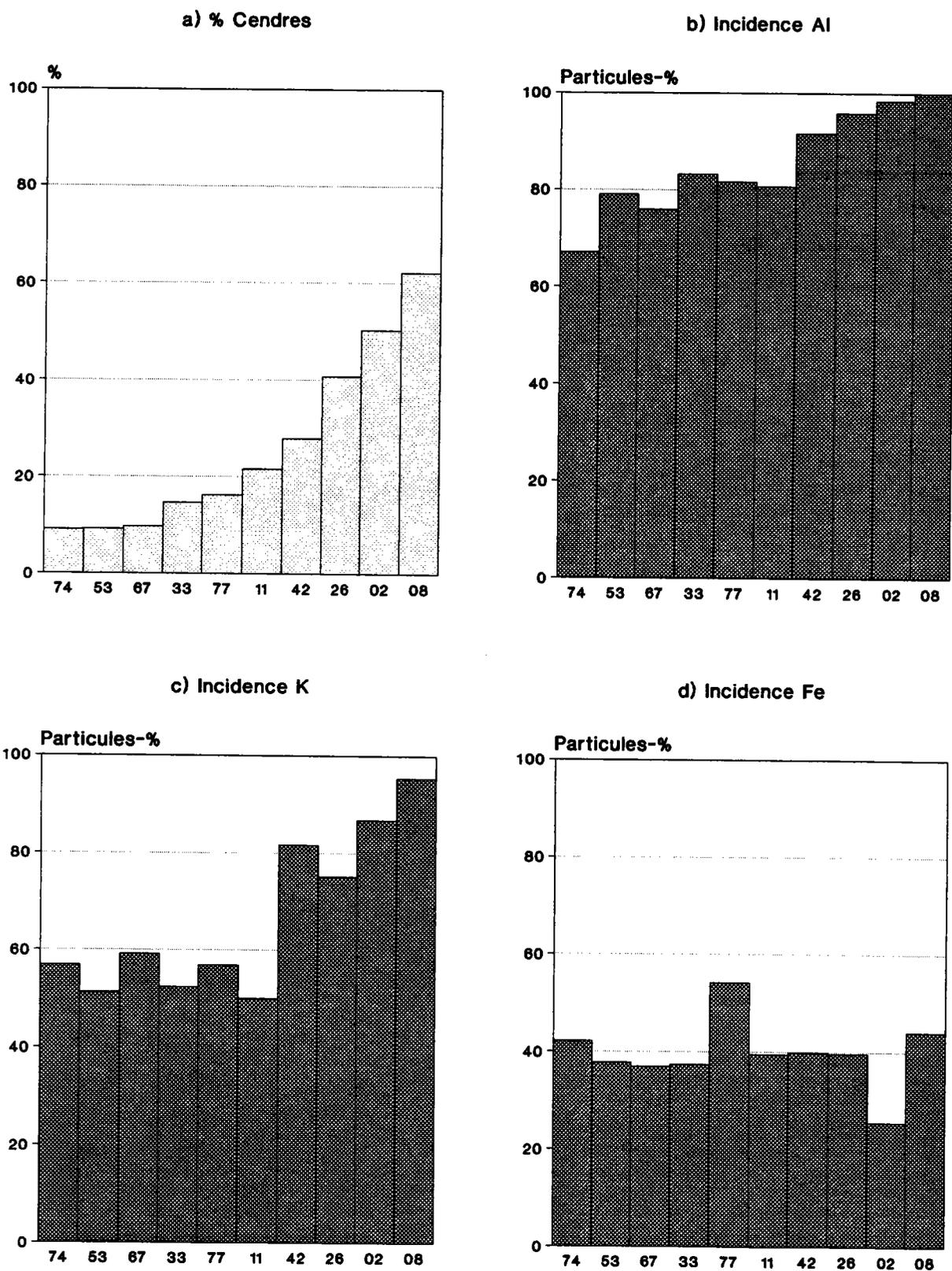


Figure 2.6: Teneurs en cendres (a), incidences en aluminium (b), en potassium (c) et en fer (d) du lot de 10 poussières analysées à 30% de transmission laser (voir texte)

Il n'existe pas de données dans la littérature concernant la présence de ces 4 éléments dans les poussières (ou les charbons) de la Ruhr. Les estimations au niveau mondial font état de concentrations variant de 100 à 500 ppm dans les charbons (Valkovic, 1983).

Aucun seuil de détection n'a été fixé pour les **éléments traces**: métaux lourds, terres rares (La, Ce, Pr, Nd, Sm), zirconium.... Seule la reconnaissance du massif isotopique des éléments a été choisie comme critère de détection.

Les incidences de ces éléments, basées sur les analyses des 19 échantillons précédents (à 30% ou 100% de transmission laser), sont inférieures à 10 particules-%. Une classification des intensités de signal n'a donc pas été entreprise. Les valeurs maximales des incidences des éléments traces sont présentées en figure 2.7.

La littérature ne fournit aucune données sur les concentrations d'éléments traces dans les poussières de mines. La figure 2.7 donne, à titre d'orientation, les teneurs maximales de ces éléments pour les charbons de la Ruhr à teneur en cendres variant de 10 à 30% (Ruhrkohlehandbuch, 1987; Kautz et al., 1984). Aucune comparaison des valeurs n'est possible avec les données de l'analyse LAMMA.

Cette figure indique simplement que de nombreux éléments potentiellement toxiques existent en concentrations non négligeables dans les charbons et sont détectés par microsonde LAMMA au niveau des poussières de mines.

Plusieurs éléments traces peuvent être liés à la présence de phases minérales telle que $ZrSiO_4$ ou de pyrite associée aux sulfures de plomb ou de zinc. L'origine d'autres éléments traces doit cependant être recherchée dans des phases minérales qui ont révélé par analyse LAMMA des contaminations par des métaux lourds:

- paillettes minérales à Al, Si, K, Ca + Fe-Cr-Ni-Mo dans la matière minérale d'épontes,
- particules non-identifiées de Ca-Fe-Ni-Cu
- nodules de sidérite contaminées par le manganèse...

Parmi les éléments connus pour être associés à la phase organique des charbons (Be, B, Ga, Ge, V) (Valkovic, 1983) le vanadium et le beryllium ont pu être détectés par analyse LAMMA de particules de charbons.

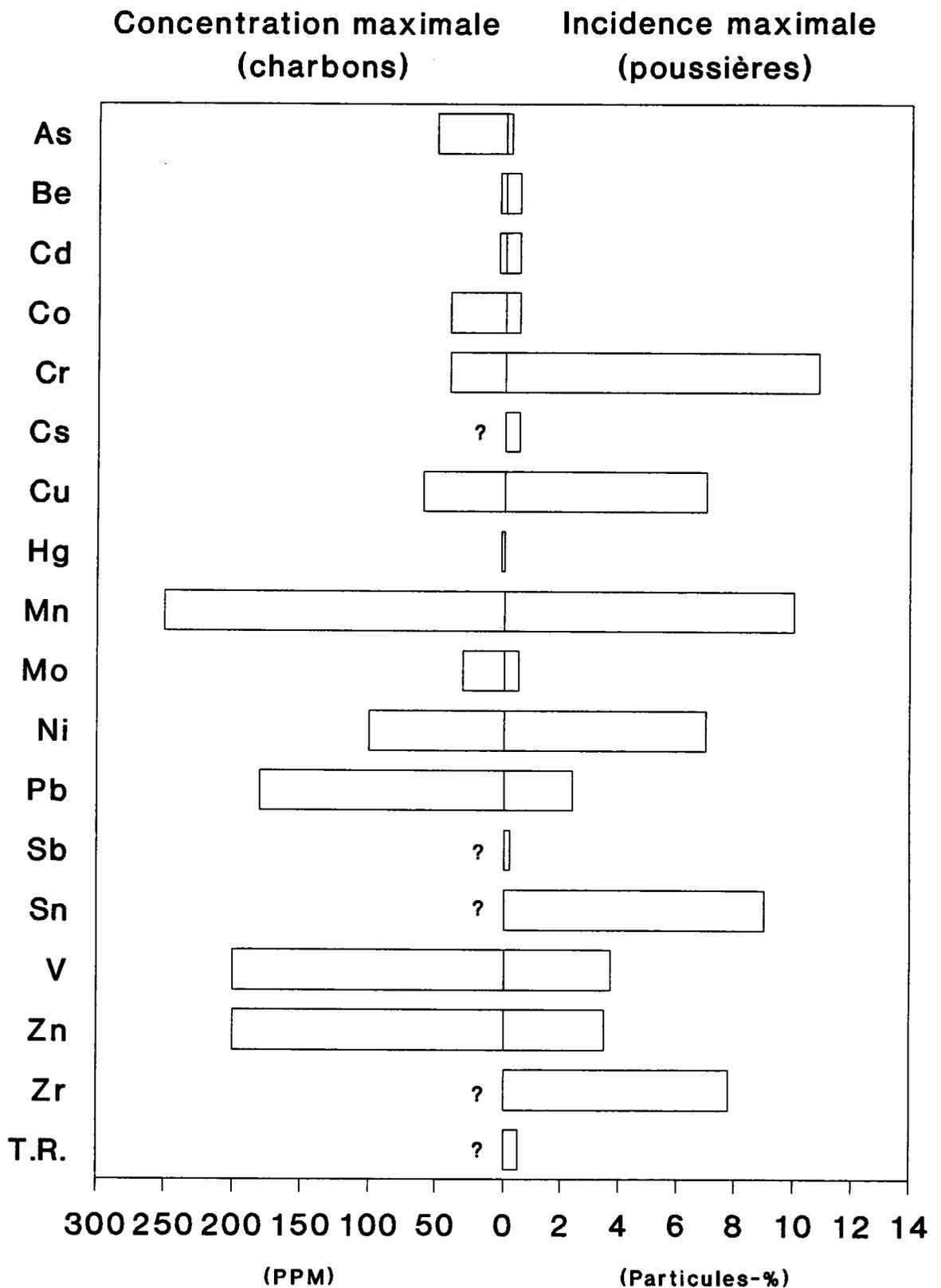


Figure 2.7: Incidences maximales des éléments traces détectables par microsonde LAMMA dans les poussières de mines de la Ruhr (*droite*) et concentrations maximales en éléments traces des charbons de la Ruhr (*gauche*) (N.B.: ces dernières ne sont données qu'à titre purement indicatif, voir texte)

2.3.3) Matière organique

Le seuil de détection de la matière organique correspond à la présence simultanée d'au moins 3 clusters C_nH_m (pour $n = 3-5$) dont les amplitudes représentent environ 3-5% de l'échelle de saturation.

Les particules des poussières de mines peuvent être ainsi différenciées en particules de composition mixte organique/inorganique (figure 2.8a) et en particules "purement" organiques (figure 2.8b).

L'incidence cumulée de ces deux groupes de particules varie de 5 à 65 particules-% (figure 2.9a) et présente généralement une corrélation inverse avec la teneur en cendres des poussières (figure 2.9e). Cette corrélation inverse se rapporte à 6 échantillons précédemment cités (02, 08, 11, 26, 33, 42). Les analyses ont été effectuées à 30% de transmission laser (120-130 particules/échantillons).

Ces mêmes échantillons ont été analysés à 100% de transmission laser. De telles conditions d'irradiance exalte l'intensité des signaux organiques. Mais elles ne modifient pas notablement les incidences cumulées des particules de composition mixte organique/inorganique et des particules "purement" organiques (voir figure 2.9b, 500 particules/échantillon).

Les résultats d'analyse à 100% de transmission laser révèlent également une corrélation inverse avec la teneur en cendres des poussières. Il en sera de même pour les incidences des sous-groupes de particules à composition mixte organique/inorganique ou des particules "purement" organiques (voir figure 2.9c et d).

Enfin, on retiendra que les incidences cumulées seront supérieures à 65 particules-% pour des poussières très riches en matière organique (teneurs en cendres < 10%) telles que les poussières de charbon de haut rang précédemment citées (échantillons 53, 67, 74).

A l'inverse, les incidences cumulées seront inférieures à 5 particules-% pour les poussières à teneur en cendres variant de 70 à 90% (échantillons du chapitre 4 par exemple). Les poussières de mines étudiées dans le suite du travail auront des teneurs en cendres variant de 10 à 90%.



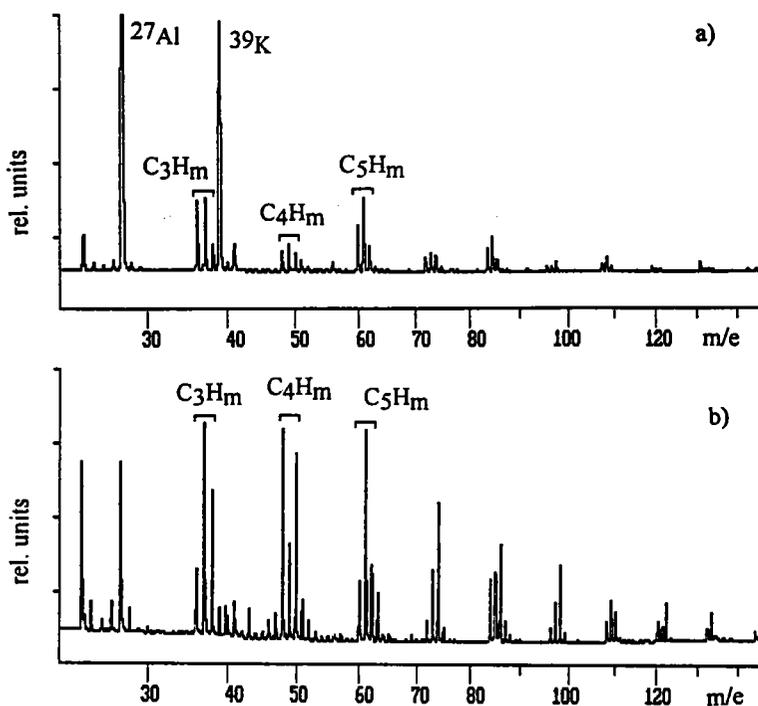


Figure 2.8: Spectres d'une particule à composition mixte organique/inorganique (a) et d'une particule "purement" inorganique (b)

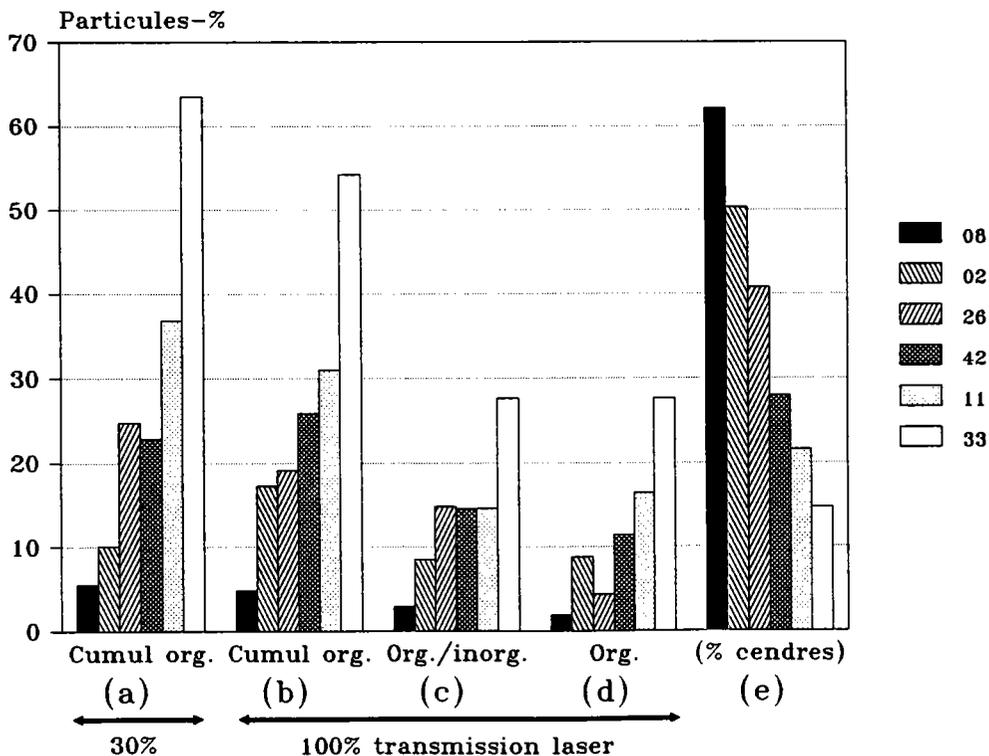


Figure 2.9: Incidences cumulées des particules organiques obtenues à 30% (a) et à 100% de transmission laser (b); incidences des sous-groupes de particules de composition mixte organique/inorganique (c) ou de composition "purement" organique (d) obtenues à 100% de transmission laser; teneurs en cendres des échantillons (e) (voir tableau 2.3)

CHAPITRE 3

Etude des poussières de silice de référence

La caractérisation de vraies poussières de mines (voir chapitre 2.3) dévoile la complexité de ces matériaux: particules de compositions mixtes, éléments d'incidences variables d'un échantillon à l'autre, éléments intercorrélés dans les spectres des particules individuelles, variation de l'intensité des signaux élémentaires d'une particule à l'autre. La dimension des problèmes, déjà indiquée pour les analyses conventionnelles, augmentera pour les tentatives de corrélation des paramètres de groupes de particules aux données toxicologiques.

Il est donc avantageux de procéder par étape en travaillant sur des systèmes minéralogiques plus simples, possédant un seul agent toxique. Ils devraient permettre d'esquisser une relation entre un paramètre physico-chimique (connu ou suspecté) et la réponse biologique. Les poussières de silice pure (synthétique ou naturelle) représentent de tels systèmes. Mais les sables quartzeux d'origine sédimentaire semblent représenter les mélanges les plus proches des vraies poussières de mines.

Ce chapitre est consacré à la caractérisation de telles poussières à teneur en silice cristalline ou amorphe élevée (84-100%) mais de cytotoxicité extrêmement variable. Une poussière ne contenant que 49% de quartz sera discutée à titre comparatif. L'objectif est d'établir un schéma de classification des particules basé sur des combinaisons d'éléments. On testera l'existence de corrélations potentielles entre les incidences des divers groupes (ou classes) de particules et les données de cytotoxicité. La dernière partie du travail sera consacrée à l'influence de l'irradiance laser sur le schéma de classification.

3.1) Partie expérimentale

L'étude porte sur 11 poussières d'origine diverses:

- 8 sables quartzeux provenant de gîtes géologiquement différents: Dörentrup (échantillon DQ12), Mol (MOL), Hirschau (HIR), Haltern (HAL), Freihung (FRI), Grasleben (GRA), Nemours (NEM) et Gambach (GAM),
- 1 cristal de roche KQ BRA I provenant du Brésil (BRA),
- 1 verre de silice amorphe pure Suprasyl-W (SUP),
- 1 sable quartzeux ne contenant que 49% de quartz provenant du gîte de Zelking (ZEL).

Le verre de silice et le cristal de roche ont été broyés sous eau sur broyeur à bille d'agate; la fraction respirable a été isolée par sédimentation. Celle des sables quartzeux (broyage à sec sur bille d'acier) a été isolée par centrifugation dans l'air sur séparateur Walther-Laborsichter. Le maximum de distribution granulométrique (taille des particules isolées < 7µm) correspond à la fraction 1-2 µm (Robock und Klosterkötter, 1975).

Les données sur la composition minéralogique et la cytotoxicité des poussières, empruntées à la littérature, sont présentées dans le tableau 3.1. Les données sur l'intensité du signal d'aluminium détecté par spectroscopie ESCA proviennent d'autres études (Kriegseis et al., 1979a, 1983).

Le test de cytotoxicité TTC.RA consiste à mesurer la dépression d'une activité cellulaire à la réduction du TTC (Chlorure de 2,3,5-Triphényl Tetrazolium). Des macrophages péritonéaux de cobayes sont mis 120 mn en incubation avec les poussières (0.6 mg/8.10⁶ cellules). Les résultats (100 - TTC.RA%) sont rapportés à des macrophages témoins non-exposés aptes à 100% de réduction du TTC (Klosterkötter und Robock, 1967).

Tableau 3.1: Composition minéralogique, intensité du signal de l'aluminium détecté par spectroscopie ESCA et données de cytotoxicité des 11 poussières de silice de référence (d'après Robock und Klosterkötter, 1975)

Poussière	%Quartz	Cytotoxicité (100-TTC.RA%)	Al-ESCA.10 ⁻² (Int. rel.)	%Kaolinite	%Corindon
DQ12	87.0	97.0	3.9	0.0	0.0
SUP	100.0*	94.0	0.0	0.0	0.0
BRA	95.7	94.0	0.0	0.0	0.0
MOL	89.8	90.0	10.0	1.7	0.0
HIR	95.2	82.0	6.8	4.3	0.0
HAL	96.8	81.0	11.9	1.8	0.0
FRI	88.2	69.0	9.6	2.0	0.0
GRA	93.0	62.0	--	0.5	3.3
NEM	84.0	55.0	22.2	0.5	4.1
GAM	84.0	35.0	29.4	2.2	5.0
ZEL**	48.6	41.0	--	1.9	0.0

*100% de silice amorphe

**Echantillon contenant 17% de feldspath

La cytotoxicité des poussières apparaît très variable (100-TTC.RA% = 35-97%) malgré les teneurs en silice semblables des échantillons (84-100%). La cytotoxicité de l'échantillon (ZEL) à teneur en quartz moindre (49%) est de l'ordre de 41%.

Les résultats LAMMA portent sur l'analyse à 30% de transmission laser de 100-130 particules/échantillon ($\varnothing = 1-2 \mu\text{m}$).

Les éléments mineurs ou traces (Li, Rb, Sr, Ba, Zr) n'ont pas été considérés. La classification des spectres se rapporte aux signaux ^{28}Si , ^{27}Al et à ceux des autres éléments regroupés sous le label X (X = Na, Mg, K, Ca, Ti et/ou Fe).

Les intensités des signaux Si, Al et X sont codées selon le schéma "0", "1" ou "10". Les intensités des signaux Al et X ont été normalisées l'intensité de l'isotope ^{30}Si .

3.2) Résultats

Seulement 9 combinaisons des intensités des signaux Si.Al.X sont fréquentes parmi les 27 différentes combinaisons possibles. Elles sont présentées dans le schéma de classification de la figure 3.1.

	Si	Al	X
Classe I	10	0	0
(Particules à dominante Si)	10	1	0
	10	1	1
Classe II	10	10	0
(Particules à dominante Si,Al)	10	10	1
	10	10	10
Classe III	1	10	0
(Particules à dominante Al)	1	10	1
	1	10	10

Figure 3.1: Schéma de classification des particules d'après les amplitudes des signaux Si.Al.X codées "0", "1" ou "10" (X = Na, Mg, K, Ca, Ti et/ou Fe)

Ce schéma de classification permet de distinguer les 3 classes suivantes de particules:

- les **particules de la classe I** ou particules à dominante Si à signaux satellites Al et X d'amplitudes $\leq "1"$,
- les **particules de la classe II** ou particules à dominante Si,Al(X) à signaux satellites d'intensité codée "10" (notamment pour l'aluminium),
- les **particules de la classe III** ou particules à dominante Al(X), c'est à dire des particules à spectres non-dominés par le silicium.

Des spectres illustrant les 3 classes de particules (figure 3.2) montrent un spectre de particule de la classe I (groupe Si.Al.X = 10.0.0), de la classe II (groupe Si.Al.X = 10.10.10) et un spectre de particule de la classe III (groupe Si.Al.X = 1.10.10).

Cette classification permet déjà de distinguer le verre de silice SUP et le cristal de roche BRA des échantillons de sables quartzeux. Pour ces derniers, les incidences des groupes de particules sont distribuées sur les 3 classes de particules.

Le verre de silice SUP et le cristal de roche BRA révèlent uniquement des particules de classe I. L'échantillon SUP (100% de silice pure) contient 100% de particules du groupe Si.Al.X = 10.0.0. L'incidence de ces particules est de 54 particules-% pour le cristal de roche BRA auxquelles s'ajoutent 36 particules-% d'un groupe exotique de particules à dominante Si mais de combinaison Si.Al.X = 10.0.1 (X = Na).

Les incidences des 3 classes de particules pour les 8 sables quartzeux sont présentées en figure 3.3 (hormis l'échantillon ZEL qui sera discuté ultérieurement). L'échantillon DQ12 révèle la plus haute incidence de particules de classe I (93.5 particules-%) pour une teneur globale en quartz de 87%. L'échantillon GAM à teneur en quartz similaire (84%) ne contient que 29.3% de particules de classe I.

Les corrélations potentielles entre les incidences de particules et la cytotoxicité apparaissent dans la figure 3.3 car les échantillons sont classés (de gauche à droite) par ordre de cytotoxicité croissante (au sein de chaque classe de particules). Une corrélation positive est dévoilée pour les incidences des particules de classe I mais une corrélation inverse pour les particules de classe II ou de classe III.

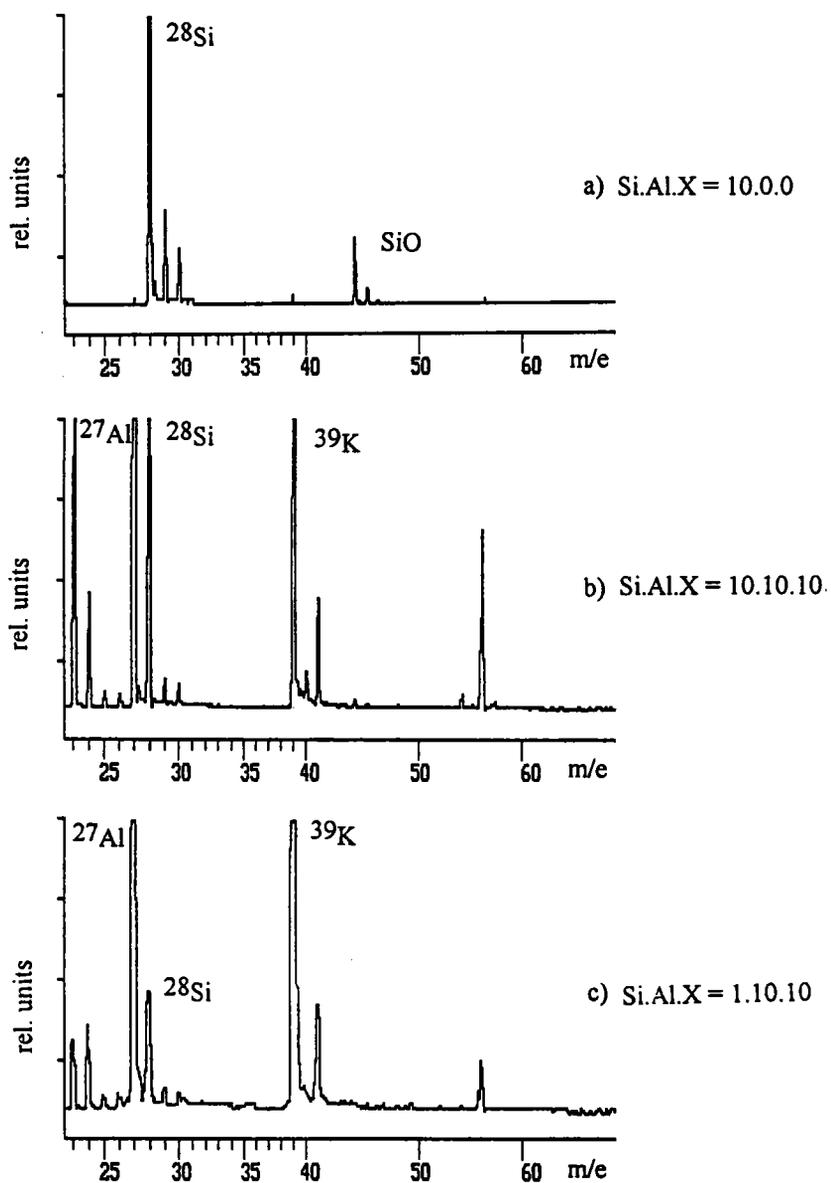


Figure 3.2: Exemples de spectres de la classe I (Si:Al:X = 10.0.0), de la classe II (Si:Al:X = 10.10.10) et de la classe III (Si:Al:X = 1.10.10)

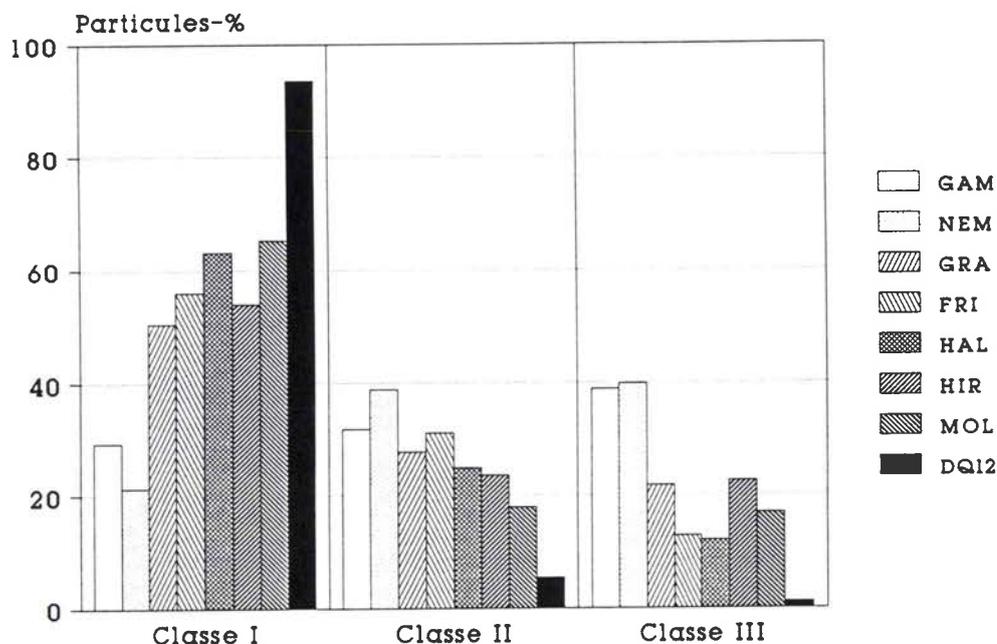


Figure 3.3: Incidences en particules de la classe I, II et III pour les 8 sables riches en quartz (échantillons SUP, BRA et ZEL exclus) et classés par ordre de cytotoxicité croissante

On peut préciser que la somme des incidences des 3 classes de particules représente plus de 90% (généralement 99%) de la population totale de particules. On doit s'attendre à trouver une corrélation négative pour le cumul des incidences de particules de classe II et III puisque l'incidence des particules de classe I présente une corrélation positive avec la cytotoxicité. On peut cependant remarquer que chacune des deux classes de particules à dominante Al (classe II et classe III) est négativement corrélée avec la cytotoxicité. Ces résultats montrent que la présence d'aluminium dans les particules à dominante Si (classe II) agit en tant que facteur inhibant la cytotoxicité des particules.

Les corrélations obtenues pour l'ensemble des échantillons analysés (SUP, BRA et les 8 sables riches en quartz) sont représentées graphiquement dans la figure 3.4. L'incidence des particules de classe I montre une corrélation positive avec la cytotoxicité ($r = +0.88$, figure 3.4a). L'incidence des particules de classe II dévoile une corrélation négative ($r = -0.82$, figure 3.4b). La corrélation entre la cytotoxicité et la teneur globale en quartz des échantillons est plus faible ($r = +0.61$, figure 3.4c) que celle obtenue avec l'incidence des particules de classe I.

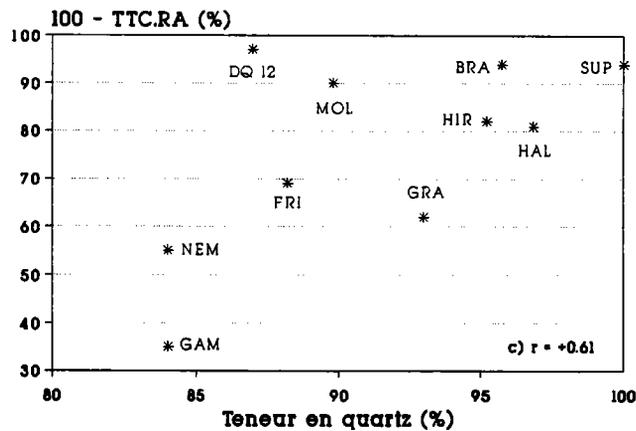
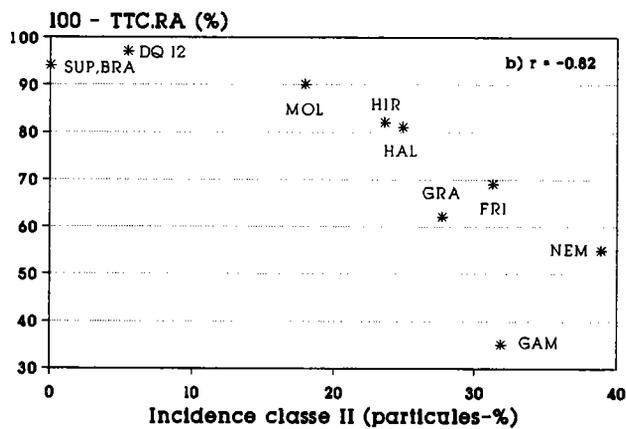
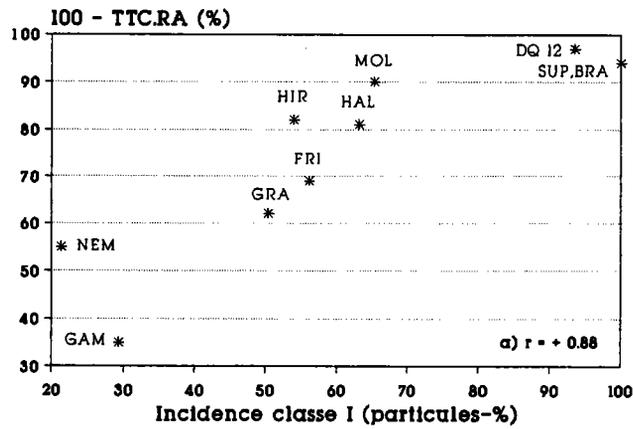


Figure 3.4: Corrélations entre la cytotoxicité (100-TTC.RA) des silices de référence (échantillons ZEL exclus) et l'incidence des particules de la classe I (a), de la classe II (b) et de la teneur globale en quartz (c) (N.B.: échelle de teneur en quartz = 84-100%)

On peut se demander si un groupe donné de particules au sein de chaque classe sera responsable des corrélations observées. Les incidences des 9 différents groupes et leurs incidences cumulées 2 à 2 (au sein de chaque classe) ont été corrélées à la cytotoxicité. Les résultats sont présentés de manière synoptique dans la figure 3.5 pour les 8 sables riches en quartz.

Aucun groupe de particules (excepté Si.Al.X = 10.10.1) ne montre de corrélations (positive ou négative) avec les données de cytotoxicité. Seules les incidences cumulées révèlent des corrélations positives au sein de la classe I et des corrélations négatives pour les classes II et III (voir figure 3.5)

	Si	Al	X		CORRELATIONS		
Classe I	10	0	0	⇒	0	}	+
	10	1	0	⇒	0		
	10	1	1	⇒	0		
Classe II	10	10	0	⇒	0	}	-
	10	10	1	⇒	-		
	10	10	10	⇒	0		
Classe III	1	10	0	⇒	0	}	-
	1	10	1	⇒	0		
	1	10	10	⇒	0		

Figure 3.5: Représentation synoptique des résultats des corrélations (positive, nulle ou négative) entre les données de cytotoxicité et:

- l'incidence de chaque groupe de particule
- l'incidence cumulée deux-groupes-à-deux
- l'incidence de chaque classe de particule

Mais on peut remarquer que des indices de facteurs de cytotoxicité (ou d'inhibition de la cytotoxicité) sont tout de même dévoilés par certains groupes de particules (voir figure 3.6). La corrélation négative précédemment évoquée pour l'incidence du groupe Si.Al.X = 10.10.1 peut s'observer dans la figure 3.6.

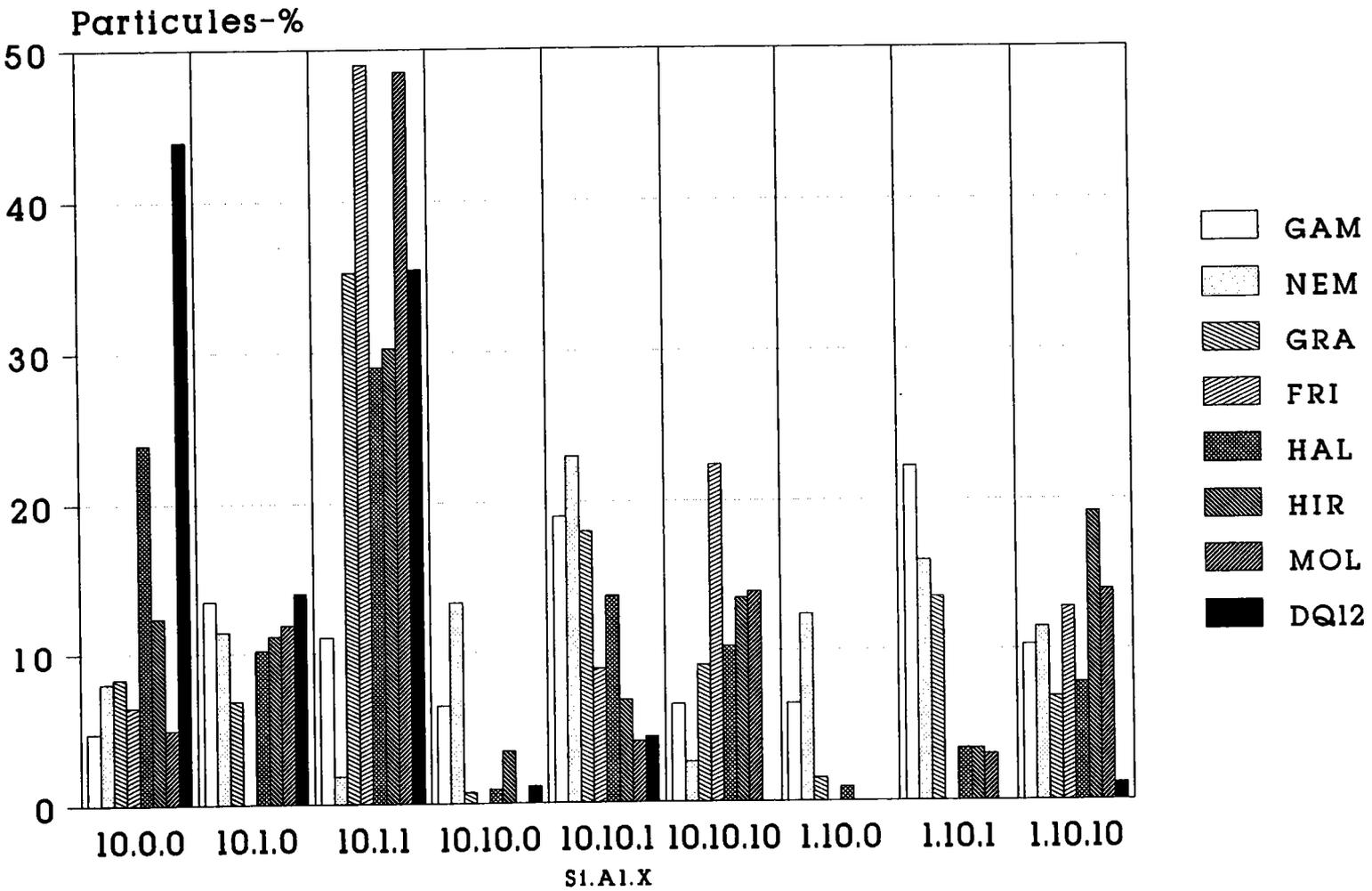


Figure 3.6: Incidences des 9 groupes de particules pour les sables riches en quartz (échantillons SUP, BRA et ZEL exclus) et classés par ordre de cytotoxicité croissante (au sein de chaque groupe)

On remarquera également que le sable quartzueux le plus cytotoxique (DQ12) est le plus riche en particule de quartz les plus "pures" (Si.Al.X = 10.0.0). Les échantillons les moins cytotoxiques (GAM, NEM et GRA) sont les plus riches en particules du groupe Si.Al.X = 1.10.1. Cette observation est en accord avec les données minéralogiques (voir tableau 3.1) qui indiquent que ces échantillons sont contaminés par du corindon (Al_2O_3).

3.3) Discussion

Les analyses LAMMA montrent de très nettes différences quant aux spectres des particules individuelles d'échantillons à teneurs en silice pourtant comparables. La présence de particules à dominante Si (classe I) indique l'existence d'un mélange exogène de quartz (cas idéal des échantillons SUP et BRA). L'incidence de telles particules pourra alors être considérée comme un paramètre déterminant la cytotoxicité.

Ainsi, les différences extrêmes de cytotoxicité pour les poussières GAM et DQ12 à teneurs globales en quartz identiques ($\approx 85\%$ de quartz) sont parallèles aux différences d'incidence de particules de classe I (29.3 et 93.5 particules-%, respectivement).

A l'inverse, l'incidence des particules riches en aluminium (classe II et III) possède un effet modulateur sur la cytotoxicité. Les propriétés inhibitrices de l'aluminium sur la nocivité propre au quartz sont bien connues et trouvent des applications (sous forme de sels solubles) à des fins prophylactiques, voire en tentative thérapeutique de la silicose (Le Bouffant et al., 1987c).

La nature physico-chimique de l'aluminium détecté par analyse LAMMA dans les poussières naturelles telles que les sables quartzueux reste à déterminer. Les variantes minéralogiques communes pour l'aluminium sont les suivantes:

- en substitution du silicium tétracoordonné et contamination de surface du quartz,
- sous forme d'aluminosilicates,
- sous forme de systèmes mixtes quartz/aluminosilicates.

Ces 3 différentes formes minéralogiques seront caractérisées par la présence simultanée de signaux d'aluminium et de silicium dans les spectres LAMMA. Il est impossible d'attribuer, de manière absolue, les résultats des analyses LAMMA à une variante particulière.

Mais on peut noter que les incidences cumulées de particules riches en aluminium (classe II + III) sont en accord avec les résultats d'analyses de l'aluminium par spectroscopie ESCA (figure 3.7) effectuées antérieurement sur 9 échantillons de notre étude (Kriegseis et al., 1979a, 1983).

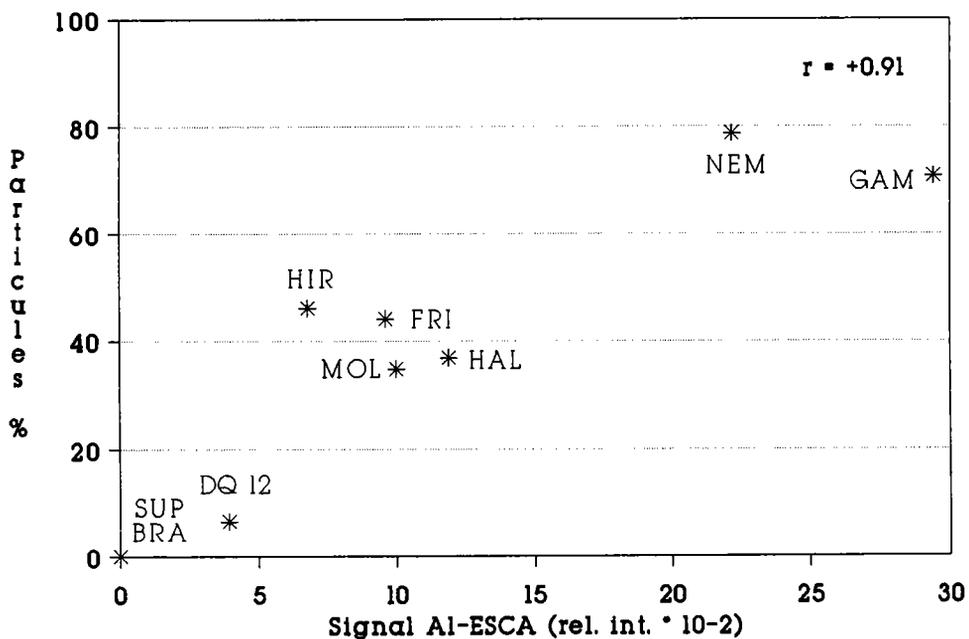


Figure 3.7: Corrélation ($r = 0.91$) entre l'incidence cumulée de particules riches en aluminium (classe I + II) et l'intensité du signal d'aluminium détecté par spectroscopie ESCA (échantillons GRA et ZEL exclus car non étudiés par spectroscopie ESCA)

Cette concordance avec les résultats d'une méthode d'analyse de surface suggère que l'aluminium détecté par LAMMA correspond à des contaminations superficielles d'aluminium. La présence simultanée dans les spectres LAMMA de signaux d'aluminium et de signaux satellites d'éléments X caractéristiques des aluminosilicates ($X = K, Ca...$ d'intensité codée "1" ou plus fréquemment "10", voir figure 3.6) indique qu'il s'agira probablement de contaminations superficielles d'aluminosilicates.

Des études par spectroscopie Auger de l'échantillon GAM ont montré qu'il s'agissait effectivement de contaminations superficielles argileuses. Un traitement par acide phosphorique ou chlorhydrique du sable se traduit par une diminution des signaux Al, K, Ca et une augmentation simultanée de la cytotoxicité (test de relargage de lactate déshydrogénase). Des études par spectroscopie Auger à balayage ont montré que l'aluminium de la poussières GAM ne correspondait pas exclusivement à des particules de corindon, mais qu'il était uniformément distribué sur toute la population de particules. Ces auteurs ont conclu que les contaminations superficielles d'aluminium se rapportaient à des contaminations par des minéraux argileux plutôt que l'aluminium (Kriegseis et al., 1979a, 1979b, 1983, 1987).

On peut donc déduire que les critères des groupes de particules déterminés par analyse LAMMA peuvent être interprétés selon le schéma suivant:

- **particules à dominante Si (classe I)** = particules de quartz "pur" à surface non-contaminée ou très faiblement contaminée par l'aluminium des aluminosilicates,
- **particules à dominante Si,Al (classe II)** = particules de quartz à surface contaminée par l'aluminium (éventuellement à contamination partielle)
- **particules à dominante Al (classe III)** = particules argileuses à teneur en quartz nulle (ou mineure).

Des tests sur l'animal ont montré une fibrogénicité d'expression retardée pour les poussières GAM et NEM riches en particules de classe II. Le caractère fibrogène de ces poussières apparait seulement après 12 mois de séjour dans les poumons de rats pour atteindre la fibrogénicité d'un quartz de référence (cristal de roche de Madagascar) dont l'effet était immédiat (Le Bouffant et al., 1982). On peut supposer que ce retard de fibrogénicité est dû à l'instabilité *in vivo* des fines contaminations superficielles des particules de la classe II.

L'échantillon ZEL révèle, comparativement aux autres silices de référence, des différences extrêmes quant aux incidences des particules de classe I, II ou III (voir figure 3.8, 320 particules analysées). L'incidence des particules de la classe I (2.5 particules-%) ou de la classe II (11.5 particules-%) apparaissent très faibles dans le cas de cette poussière.

On rappellera que l'échantillon ZEL (49%) est pauvre en quartz comparativement aux autres silices de référence (84-100%). Mais une telle teneur en quartz sera bien plus élevée que celles des vraies poussières de mines (teneur en quartz inférieure à 10%).

Cette observation suggère que l'incidence des particules de la classe I sera probablement très faible dans le cas des poussières de mines. On peut déjà s'interroger sur le potentiel cytotoxique attribuable aux particules de quartz "pur" (classe I) de telles poussières.

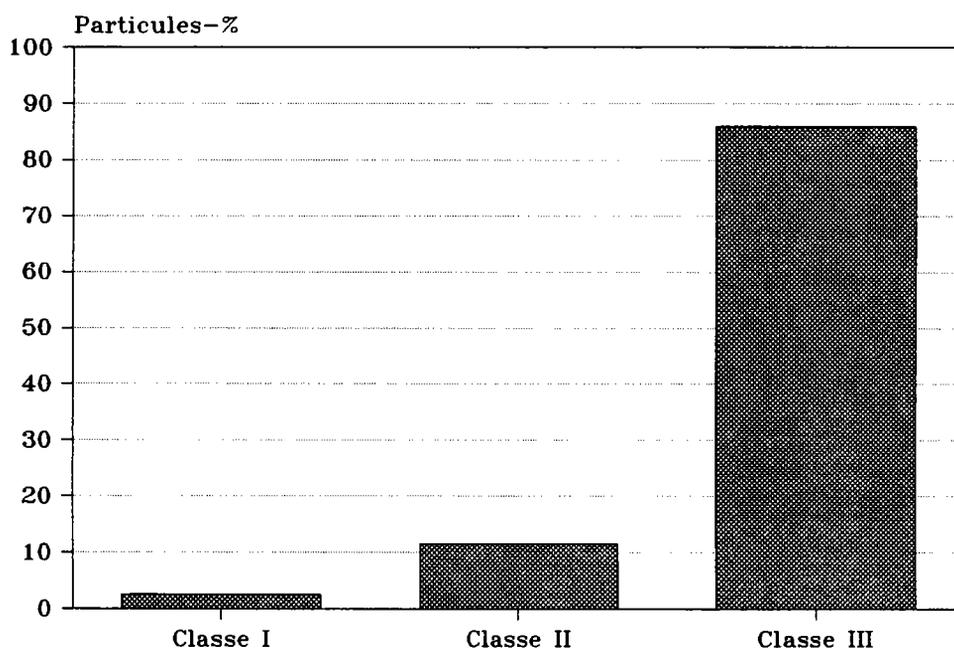


Figure 3.8: Incidence en particules de la classe I, II et III pour l'échantillon ZEL (teneur en quartz = 49%)

Mais le trait le plus frappant de l'échantillon ZEL se rapporte au cumul des incidences des particules de la classe I et II (14 particules-%). Ce cumul des particules de quartz "pur" et des particules de quartz à surface contaminée par l'aluminium ne reflète en rien la teneur de quartz de cet échantillon (49%).

Ce quartz se trouve donc principalement distribué sous forme d'un mélange endogène au sein des particules de la classe III. Chaque particule d'un tel mélange aurait (en première approximation et dans le cadre du modèle de la figure 1.1) une teneur individuelle en quartz de 49% en masse (ou 40% en tenant compte du quartz déjà mis en évidence dans les 14% de particules de classes I et II).

Il est surprenant qu'une telle teneur en quartz ne contribue pas au signal du silicium des particules de la classe III dont l'intensité du signal Si n'est que de "1". Ces résultats suggèrent que l'analyse LAMMA se rapproche plus d'une ablation des argiles de surface que d'une analyse du volume total de la particule.

L'existence des particules à surfaces contaminées par les argiles (classe II) ne nous permet d'ignorer l'éventuelle cytotoxicité propre à ces contaminations, ni celle des particules argileuses de la classe III. En effet, de nombreuses études *in vitro* montrent que la cytotoxicité des (alumino)silicates, extrêmement variable, peut atteindre celle du quartz (Le Bouffant et al., 1977; Adamis and Timar, 1980; Gormley and Addison, 1983; Kriegseis et al., 1987).

Il existe cependant des divergences d'opinion quant à la nature des propriétés minéralogiques pouvant expliquer les différences de cytotoxicité entre minéraux argileux: différences de cristallinité, granulométries variables, surface spécifique ou contaminations par le quartz.

On peut illustrer l'éventualité d'une cytotoxicité propre aux minéraux argileux par le cas de l'échantillon ZEL, pauvre en quartz (49%) et de cytotoxicité (41%) voisine de celle de l'échantillon GAM (35%). Les analyses LAMMA ne révèlent que 2.5% de particules de quartz "pur" de la classe I. On rappellera, à titre de comparaison, que l'incidence de telles particules est de 30 particules-% pour l'échantillon GAM.

L'exploitation des spectres LAMMA a montré que la poussière ZEL était plus riche en particules chargées de fer à signal d'amplitude \geq "1" (incidence $>$ 65 particules-%) que les autres échantillons de cette étude (incidence $<$ 30 particules-%).

Des études par spectroscopie Auger avaient également mis en évidence la richesse en fer de l'échantillon ZEL, probablement sous forme d'oxyde de fer (Serafin, 1984). Un traitement acide avait mis en évidence une diminution du signal Auger du fer et une augmentation de la cytotoxicité. Un rôle protecteur a donc été attribué aux contaminations de surface par le fer.

Il faut cependant rappeler qu'un tel traitement acide (HCl 12N, 5heures, 100°C) ne sera pas spécifique à l'élimination du fer. Ces mêmes analyses montrent en effet une diminution simultanée des signaux Al, K et Ca. Les analyses LAMMA révèlent que le

quartz de l'échantillon ZEL se trouve emballé dans une matrice principalement constituée d'Al, K et Fe qui ne rappelle en rien une matrice d'oxyde de fer.

Il serait donc prématuré de conclure à un effet protecteur du fer. Il serait nécessaire, pour résoudre la question, d'étudier des échantillons répondant aux critères suivants:

- teneur globale en quartz et incidence des particules de la classe I similaires à celles de l'échantillon ZEL (2.5 particules-%),
- incidences des éléments X (Fe exclus) similaires à celles de l'échantillon ZEL,
- mais différences notoires de cytotoxicité pouvant être mises en relation avec les incidences des particules chargées de fer.

De tels échantillons n'ont, jusqu'à présent, pas été trouvés dans les collections de sables quartzeux actuellement disponibles.

3.4) Etude de l'influence de l'irradiance laser

Les précédents résultats ont démontré qu'il était possible, grâce aux analyses LAMMA effectuées à 30% de transmission laser, de distinguer des variantes de particules pourtant caractérisées par la présence simultanée des signaux Al et Si (voir schéma de classification). Les résultats suggèrent que ces conditions d'irradiance orientent les analyses LAMMA vers la "surface" (ablation) plutôt que le volume des particules individuelles.

On a également émis des premières considérations quant à l'éventuel potentiel cytotoxique des contaminations argileuses. Celles-ci ont, jusqu'à présent, retenu peu d'attention dans les études de nocivité des vraies poussières de mine. Mais les analyses LAMMA effectuées à 30% de transmission laser n'expriment pas le maximum des capacités de détection attribuable à la technique. Des analyses effectuées à plus haute irradiance (100% de transmission laser) semblent plus prometteuses quant à la détection des métaux lourds ou d'autres éléments difficilement ionisables.

Le choix de telles conditions analytiques nécessite de vérifier si le schéma de classification des particules établi à 30% de transmission laser reste valide à irradiance plus élevée.

Il a donc été choisi d'analyser à 100% de transmission laser 4 des échantillons de silice de référence (120-130 particules/échantillon). On les choisira à teneurs en quartz comparables (84-90%) mais de mélange à caractère exogène (DQ12, MOL) ou endogène (NEM, GAM). Les incidences de particules à divers rapports d'intensité de signaux Si/Al seront comparées aux résultats obtenus à irradiance moindre (tableau 3.2).

Tableau 3.2: Incidences en particules à signal Al "10" et en particules à dominante Si(Al) (voir texte) obtenues à 30% et 100% de transmission laser sur des silices formant des mélanges exogène ou endogène

Echantillons		DQ12	MOL	NEM	GAM
%Quartz		87.0	89.8	84.0	84.0
Mélange		exogène	exogène	endogène	endogène
Transm. laser 30%	Incidence Al "10"	6.5	34.8	78.7	70.7
" 100%	" Al "10"	3.4	6.6	16.4	18.1
Transm. laser 30%	Incidence Si(Al)	98.9	69.3	57.6	54.7
" 100%	" Si(Al)	95.5	92.6	93.6	92.6

Il est surprenant de constater que l'incidence des particules à signal Al "10" (classe I + II) est plus élevée à 30% qu'à 100% de transmission laser (tableau 3.2). Seule une explication de caractère dual permet d'interpréter ce résultat:

- ablation à haute irradiance orientée vers le coeur des particules et saisie du quartz masqué en profondeur des particules,
- sous-estimation de l'aluminium car la saisie du coeur de quartz exacerbe simultanément l'intensité et la largeur du signal ^{28}Si qui va couvrir le signal ^{27}Al .

Il serait souhaitable de démontrer qu'une analyse effectuée à 100% de transmission laser saisit le coeur de quartz. Il faudrait à ce titre vérifier l'augmentation des incidences de particules contenant du quartz. Les incidences cumulées des 6 groupes de particules de la classe I (à dominante Si) et de la classe II (à dominante Si,Al) devraient alors être plus élevées à 100% de transmission laser.

Il faut cependant rappeler que les aluminosilicates peuvent alors révéler non seulement des spectres à dominante Al (classe III), mais aussi des spectres du groupe Si.Al.X = 10.10.10 de la classe II (voir spectre de la muscovite obtenu à 100% de transmission laser, figure 2.3).

Cet effet nous contraint à modifier le schéma de classification et à considérer comme particules contenant du quartz celles des 3 groupes de la classe I et celles des 2 groupes Si.Al.X = 10.10.0 et 10.10.1 de la classe II (voir figure 3.1). Ces 5 groupes de particules seront classés sous le générique de particules à dominante Si(Al).

Une comparaison des incidences obtenues à 30% et 100% de transmission laser (tableau 3.2) montre que:

- à 30% de transmission laser, les incidences des particules Si(Al) varient de 70 à 99 particules-% pour les échantillons DQ12 et MOL. Elles sont de l'ordre de 58 particules-% pour les échantillons NEM et GAM. Ces différences révèlent encore le mélange de quartz à caractère exogène pour les échantillons DQ12, MOL et endogène pour les échantillons NEM, GAM.

- les incidences des particules Si(Al) seront, à 100% de transmission laser, supérieures à 90 particules-% pour les 4 échantillons. Cette similitude rappelle les teneurs en quartz comparables des 4 échantillons.

Ces résultats montrent qu'une analyse à 100% de transmission laser saisit la totalité du quartz des particules. Mais elle ne permet plus de distinguer les particules de quartz "pur" de classe I et les particules de classe II contaminées par l'aluminium (voir ci-dessus les effets d'élargissement du signal Si).

Nous choisirons donc d'effectuer la majorité des analyses des poussières de mine à 30% de transmission laser. Mais il faudra ainsi accepter de perdre certaines informations quant à la présence d'éléments traces. Seules les poussières du chapitre 5, pour lesquelles on cherchera à détecter des métaux lourds, seront étudiées à 100% de transmission laser.



CHAPITRE 4

Caractérisation de poussières de mine riches en quartz

L'étude des poussières de silice de référence a permis d'établir un schéma de classification des particules individuelles. Il permet (à 30% de transmission laser), de déterminer le caractère exogène ou endogène de mélanges à teneurs globales en quartz identiques. La présente étude a pour objectif d'appliquer ce schéma de classification à certaines poussières de mine de fibrogénicité connue qui ont été sélectionnées selon les critères suivants:

- les poussières sont riches en matière minérale (teneurs en cendres variant de 70 à 90%) afin de présenter une matrice inorganique similaire à celle des silices de référence,
- les teneurs globales en quartz sont élevées et comparables (15-26%) mais la fibrogénicité des échantillons sera extrêmement variable.

L'étude porte sur 5 échantillons prélevés en Allemagne et en Grande-Bretagne dans des districts à risque de pneumoconiose différent. Les données expérimentales de nocivité des poussières sont en accord avec les données épidémiologiques.

La fibrogénicité des poussières allemandes à été déterminée par des tests intrapéritonéaux et intratrachéaux; celle des poussières britanniques par des expériences d'inhalation. La diversité des tests nous conduit à présenter séparément l'étude des poussières allemandes et celle des poussières britanniques.

La seconde partie du chapitre consistera à voir si le choix de tels échantillons permet de cerner des paramètres de nocivité spécifiques indépendants du quartz et propre à la matière minérale des différents bassins.

4.1) Partie expérimentale

Les échantillons allemands concernent 1 poussières de la Saar (TF5) et 2 poussières provenant de la Ruhr (TF1, TF4) prélevées sur les filtres secs de dépoussiéreurs installés en voie. Différentes fractions granulométriques ont été isolées en laboratoire par élutriation dans l'air (séparateur Alpine AG Multiplex 100 MZR). Les échantillons analysés par LAMMA correspondent à la fraction KD (maximum de distribution granulométrique à 3 μm). L'origine stratigraphique et la composition minéralogique des poussières sont données dans le tableau 4.1 (d'après Reisner et al., 1985b, 1988).

Tableau 4.1: Origine et composition minéralogique des poussières de mine riches en quartz (d'après Reisner et al., 1985b; Davis et al., 1991)

	TF5	TF1	TF4	GED	BIL
Origine	Saar Ottweiler Stéph. A	Ruhr Wittener Westph. A	Ruhr Essener Westph. B	Nottinghamshire Gedling	Ecosse Bilston Glen
%Cendres 380°C	86.2	91.8	77.8	86.3	75.5
700°C	82.3	88.3	72.3		
% (IR)					
Quartz	25.9	19.4	18.3	15.7	18.4
Illite	40.0	50.0	28.0	32.3	17.0
Kaolinite	8.0	4.0	11.0	18.6	25.5
Feldspaths	1.0	7.0	3.0		
Carbonate	1.0	1.0	3.0		
% (XRD)					
Quartz	26.5	21.3	19.1		
Chlorite	4.0	2.0	2.0		
Siderite	6.0	7.0	5.0		
Calcite	1.0	--	--		

La fibrogénicité des poussières TF a été déterminée par injection de 50 mg de poussières/ml de solution saline physiologique sur rats Wistar femelles (condition SPF). Les données expérimentales sur la rétention pulmonaire des poussières, leur pénétration ganglionnaire et les lésions ganglionnaires provoquées ont été publiées (Rosmanith et al., 1988; Bruch and Hilscher, 1988).

Une étude complète plus récente concerne la comparaison des résultats des tests de fibrogénicité obtenus dans différents laboratoires allemands (Molik and Hilscher, 1989). Les données de fibrogénicité se rapportent à la déposition des poussières, aux changements de taille des poumons et des ganglions ainsi qu'aux réactions fibrotiques observées au niveau de ces organes 6, 12 et 18 mois après application des poussières (aires fibrotiques dans les poumons et QTA dans les ganglions).

Les différents tests s'accordent à classer les poussières selon l'échelle $TF5 < TF1 \approx TF4$. On rappellera que ces différences entre l'échantillon de la Saar (TF5) et ceux de la Ruhr (TF1, TF4) sont en accord avec les données épidémiologiques.

Les échantillons britanniques concernent une poussière du comté de Nottingham (GED) et une poussière d'Écosse (BIL) prélevées sur les filtres secs d'auxiliaires de ventilation installés en voie. Des nuages de poussières respirables ont été préparés par générateur de Wright utilisé pour alimenter des chambres d'inhalation.

Les poussières analysées par LAMMA correspondent à la fraction respirable collectée dans les nuages sur échantillonneur Casella MRE 113A. Le maximum de distribution granulométrique correspond à 2-3 μm . La composition minéralogique des poussières est donnée dans le tableau 4.1 (d'après Davis et al., 1991).

La fibrogénicité des poussières britanniques a été étudiée sur rats Wistar mâles (condition SPF) exposés par inhalation pendant 12 ou 18 mois (20 mg/m^3 , 7 heures/jours, 5 jours/semaine). Les données de fibrogénicité se rapportent aux examens histologiques des lésions pulmonaires et ganglionnaires au 12^{ème} et 18^{ème} mois ou, pour les rats survivants, au 28^{ème} mois.

La fibrogénicité des deux poussières présente un profil évolutif caractéristique pour chacune d'elles mais la fibrose varie entre des extrêmes inhabituelles: **GED** << **BIL**.

En effet, la poussière GED (à teneurs en matière minérale et en quartz comparables à celles de la poussière BIL) induit uniquement de la fibrose pulmonaire diffuse sur l'animal. Elle ne provoque pas de lésions nodulaires malgré sa teneur en quartz élevée. L'échantillon GED est représentatif d'un district à très faible risque de pneumoconiose (comté de Nottingham) bien que l'exposition au quartz y soit très élevée.

La poussière BIL induit de la fibrose pulmonaire diffuse et de nombreux nodules fibroconiotiques sur l'animal. Elle correspond à une mine exploitant une veine de charbon associée à un très haut risque de pneumoconiose et une progression anormalement rapide de la fibrose (Seaton et al., 1981; Davis et al., 1991).

Les analyses LAMMA ont été effectuées à 30% de transmission laser dans l'espoir de concentrer les analyses sur la surface des particules (1000 particules/échantillon). Le diamètre des particules analysées correspond à celui du maximum de distribution granulométrique des échantillons.

4.2) Résultats

Les teneurs en cendres comparables des échantillons TF (70-90%) ne permettent pas d'expliquer les différences de fibrogénicité entre les poussières de la Ruhr (TF1/TF4) et celle de la Saar (TF5). L'échelle de fibrogénicité devient plus intrigante en examinant les teneurs globales en quartz des 3 poussières: l'échantillon TF5, le moins fibrogène, est le plus riche en quartz (figure 4.1a).

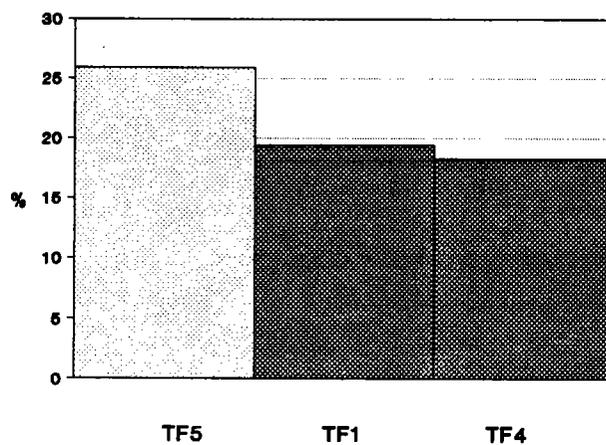
Les analyses LAMMA montrent que les incidences en particules à dominante Si (classe I) sont inférieures à 1.6 particules-% et que les deux échantillons fibrogènes TF1 et TF4 sont les plus riches en particules de quartz "pur" (figure 4.1b). Les mêmes différences se traduisent quant aux incidences des particules à dominante Si,Al de la classe II (figure 4.1c). Les données d'incidence des deux histogrammes sont en accord avec l'échelle de fibrogénicité (TF5 < TF1 ≈ TF4).

Mais les résultats d'analyse LAMMA semblent inconsistants avec la haute teneur globale en quartz de l'échantillon TF5. Elle n'apparaît ni par l'incidence des particules de la classe I, ni par celle des particules de la classe II. On peut donc déduire que le quartz de l'échantillon TF5 est distribué sur le reste de la population de particules et forme un mélange endogène avec les particules de la classe III (environ 80 particules-% de l'échantillon TF5). Les contaminations de la surface du quartz de ces particules peuvent être attribuées aux aluminosilicates car les particules de la classe III sont à dominante Al,K.

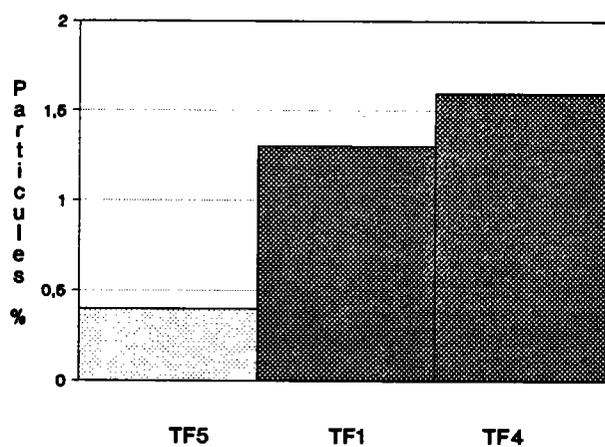
On peut également en conclure que ces particules peuvent contenir, comparativement à la fraction de quartz des particules de la classe II, une fraction moindre de quartz qui serait enfouie dans le coeur de ces particules sans être dévoilée par un tir unique au laser.

Cette dernière supposition implique que les analyses LAMMA concernent la "surface" plutôt que le volume des particules. Ceci peut être démontré de façon convaincante en effectuant une analyse en profil de profondeur des particules individuelles. Elles peuvent être analysées par tirs répétitifs au laser après fixation dans le formvar (voir chapitre 2.2.1). La figure 4.2 illustre le cas d'une particule présentant un spectre d'aluminosilicate de la classe III après un premier tir au laser (spectre 4.2a). Après ablation des contaminations argileuses de surface par 9 tirs au laser, cette particule révèle un spectre de particule de quartz "pur" de la classe I (figure 4.2b).

a) Teneur en quartz



b) Classe I



c) Classe II

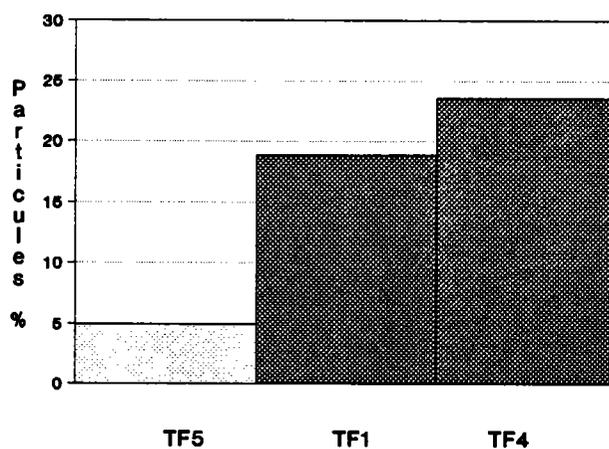


Figure 4.1: Teneur globale en quartz (a), incidence en particules de la classe I (b) et de la classe II (c) des échantillons TF (fibrogénicité: TF5 < TF1 ≈ TF4)

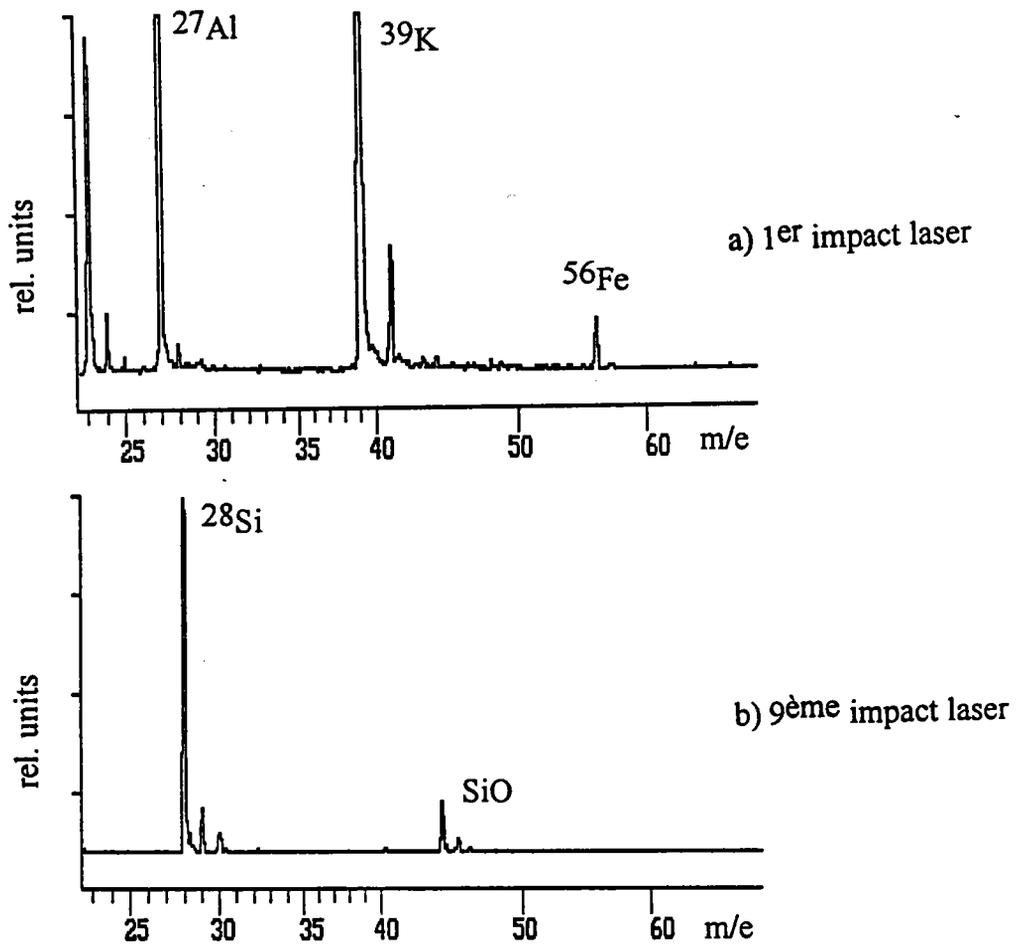


Figure 4.2: Exemple d'une particule d'aluminosilicate (spectre *a*) montrant après 9 tirs au laser un spectre de la classe I (*b*)

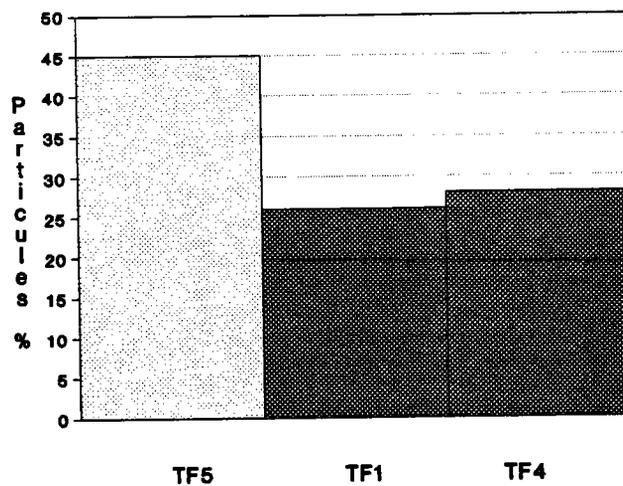


Figure 4.3: Résultats d'analyses en profil de profondeur des 3 échantillons TF (incidence des particules de la classe I + II détectées après 1 ou plusieurs tirs laser, voir texte)

Les résultats d'analyses en profil de profondeur des 3 échantillons TF (450 particules par échantillon) sont présentés en figure 4.3. Cet histogramme montre l'incidence totale des particules caractérisées, après 1 ou plusieurs tirs laser (10 tirs laser en moyenne), par un spectre à dominante Si (de classe I ou II). Le bilan de quartz total ainsi détecté est en accord avec les teneurs globales en quartz des 3 échantillons TF (voir figure 4.1a).

Les teneurs en quartz comparables des échantillons GED et BIL (figure 4.4a) ne permettent pas d'expliquer leurs différences de fibrogénicité (GED << BIL). Les résultats d'analyse LAMMA montrent à nouveau que ces poussières à teneurs globales en quartz élevées contiennent peu de particules de quartz "pur" de la classe I (figure 4.4b). Les différences entre les échantillons s'accroissent pour les incidences de particules de la classe II (figure 4.4c). Ces deux histogrammes montrent toutefois que le quartz est de mélange à caractère exogène pour l'échantillon le moins fibrogène (GED)!

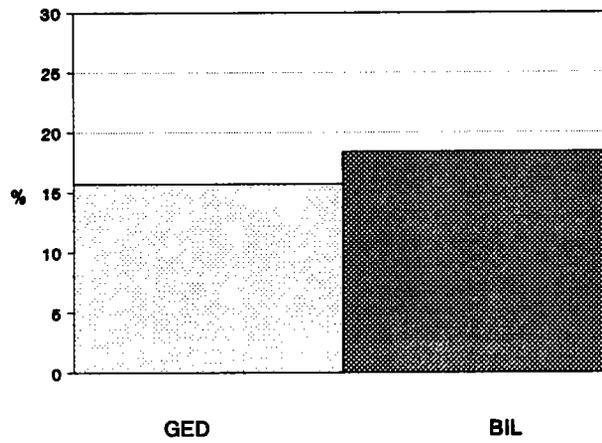
4.3) Discussion

Les résultats d'analyses des 5 échantillons riches en minéraux (70-90% de cendres) et en quartz (16-26%) confortent ceux obtenus pour les silices de référence: existence de mélange exogène (ou endogène) de quartz et incidences variables mais très faibles des particules de quartz "pur" de la classe I (< 2 particules-%). L'analyse de la silice de référence ZEL avait déjà permis de suspecter la faible teneur en particules de quartz "pur" des poussières de mine (voir chapitre 3.3).

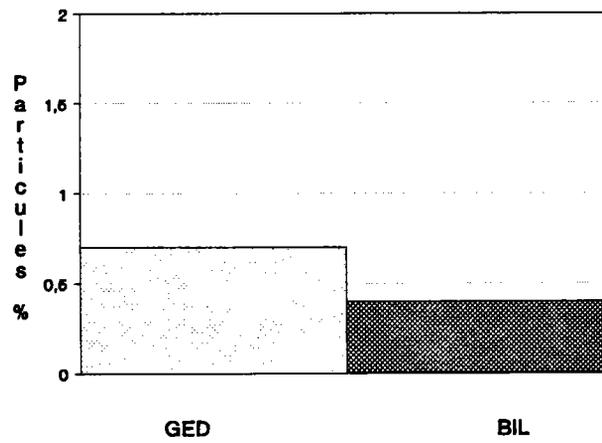
Les différences de fibrogénicité des échantillons TF (non-corrélées avec leur teneur en quartz) peuvent être expliquées en termes de contaminations de la surface des particules de quartz: existence d'un mélange exogène de quartz pour les poussières fibrogènes TF1/TF4 et d'un mélange endogène pour la poussière TF5 de fibrogénicité moindre. Ces observations sont en accord avec les nombreuses autres études qui avaient permis de suspecter le rôle protecteur des contaminations de la surface du quartz des poussières de mine (Le Bouffant et al., 1977, 1982, 1987b, 1988; Walton et al., 1977; Kriegseis and Scharmann, 1982).

Les analyses en profil de profondeur des particules individuelles ont dévoilé l'existence de contaminations massives de la surface du quartz au sein des particules de la classe III. Le caractère fortement endogène du mélange de quartz de la poussière peu fibrogène TF5 a pu être ainsi confirmé.

a) Teneur en quartz



b) Classe II



c) Classe I

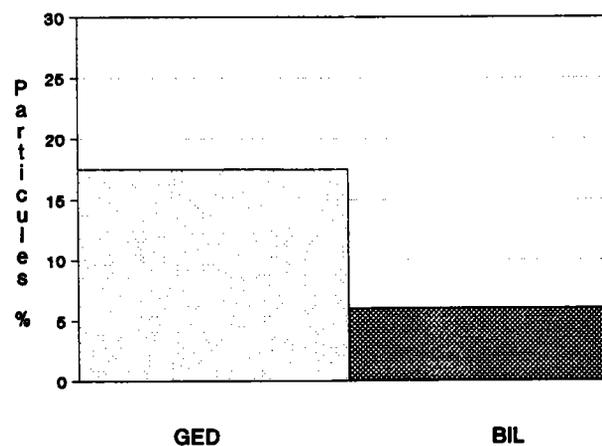


Figure 4.4: Teneur globale en quartz (a), incidence en particules de la classe I (b) et de la classe II (c) des échantillons GED et BIL (fibrogénicité: GED \ll BIL)

Cette étude par tirs répétitifs au laser sur les particules individuelles démontre également les capacités analytiques, déjà suspectées par l'étude des silices de référence, de la microsonde LAMMA: orientation des analyses vers la "surface" plutôt que le volume total de la particule analysée.

Les incidences élevées des particules de la classe II et la corrélation positive avec la fibrogénicité des poussières TF méritent une attention particulière. Il faut rappeler que l'incidence des particules de classe II est négativement corrélée avec la cytotoxicité des poussières de silice de référence. Cette divergence entre les résultats d'un test de cytotoxicité à court terme (2 heures) et les résultats des tests de fibrogénicité à long terme peut s'expliquer par une dissolution *in vivo* des contaminations superficielles durant le séjour des poussières dans les tissus biologiques (jusqu'à 18 mois).

La dissolution des contaminations superficielles a déjà été évoquée pour les silices de référence à fibrogénicité d'expression retardée (voir chapitre 3.3). Cette observation se rapporte cependant à des poussières broyées en laboratoire qui expriment peu l'hétérogénéité naturelle et la stabilité des contaminations de surface des vraies poussières de mine. Une contamination partielle des particules de quartz de la classe II permettrait également d'expliquer la corrélation positive observée avec l'incidence de ces particules. Cette hypothèse nécessiterait une confirmation expérimentale.

En résumé, on peut retenir que le schéma de classification des particules individuelles établi pour les silices de référence reste valide pour les poussières de mine. Il sera ultérieurement interprété de la manière suivante:

- particules de la classe I ou particules de quartz "pur" à surface non contaminée et à propriétés cytotoxiques et fibrogènes,

- particules de la classe II ou particules de quartz à surface faiblement (ou partiellement) contaminée et à pouvoir non-fibrosant (ou potentiellement fibrosant),

- particules de la classe III ou particules d'aluminosilicates à teneur en quartz mineure (ou nulle) qui ne peut être dévoilée qu'après ablation des couches argileuses de surface.

La différenciation par analyse LAMMA entre les poussières TF1/TF4 et, d'autre part, l'échantillon TF5 se rapproche du concept de "nocivité spécifique" des poussières. En effet, il est connu que les poussières des mines de charbon de la Saar (échantillon TF5) sont généralement riches en matière minérales (>60%) et en quartz (>7%). Les mines de

Saar sont pourtant associées à une incidence de pneumoconiose moins élevée que celles de la Ruhr (échantillons TF1/TF4) dont les poussières sont moins riches en minéraux et en quartz.

Ces différences restaient inexplicables bien que les degrés de contaminations de la surface du quartz, révélés dans la présente étude, aient été suspectés (Kriegseis and Scharmann, 1982; Schlipkötter et al., 1982; Bruch et al., 1983b). Ils semblent donc être caractéristiques de la matière minérale des deux bassins: teneur en quartz faible mais contaminations de la surface du quartz moindre dans la Ruhr (et inversement pour la Saar). La concordance avec les données épidémiologiques permet de proposer le degré de contamination de la surface du quartz comme un paramètre de nocivité spécifique.

Les échantillons britanniques GED et BIL proviennent de mines à risque de pneumoconiose très différents. Ces poussières, à teneurs en matière minérale et en quartz élevées et comparables, révèlent pourtant des différences inhabituelles de fibrogénicité.

L'échantillon GED, à teneur en quartz élevée (16%) ne provoque pas de fibrose nodulaire sur l'animal. Il provient d'une mine du comté de Nottingham qui exploite depuis 50 ans la même veine de charbon. Ce district est connu pour sa haute exposition au quartz dont la teneur dans la fraction respirable des poussières peut atteindre 20%. Il est pourtant associé à une prévalence des pneumoconioses qui compte parmi les plus basses de Grande-Bretagne (Davis et al., 1991).

A l'inverse, l'échantillon BIL provient d'une mine exploitant une veine de charbon associée (dans une mine adjacente à celle de l'échantillon BIL et exploitant cette même veine) à un haut risque et une progression très rapide de la pneumoconiose (Seaton et al., 1981).

Cette poussière BIL est la plus fibrogène sur l'animal. Les analyses LAMMA révèlent un mélange de quartz endogène pour l'échantillon BIL et un mélange exogène pour l'échantillon GED. Cette corrélation inverse avec les données expérimentales ou épidémiologiques nous autorise à chercher des paramètres de nocivité indépendants du quartz.

4.4) Recherche de paramètres de nocivité indépendants du quartz

Les analyses LAMMA ont montré que les 5 échantillons étaient riches en particules chargées de fer (à signal d'amplitude "10") dont les incidences varient de 24 à 36 particules-%. Ces particules présentent des combinaisons d'éléments du type Fe,Mg(Ca) et Fe,Al(K)(X) (avec X = Na, Mg, Si, Ca et/ou Ti d'intensité codée "0" ou "1").

La population de particules du groupe Fe,Mg(Ca) peut être divisée en particules des sous-groupes Fe,Mg et Fe,Mg,Ca dont les spectres sont caractérisés par des signaux Fe et Mg (d'amplitudes "10") et des signaux satellites du calcium d'amplitudes "1" ou "10". Des signaux Na, Al, K, Mn et éventuellement P (d'amplitude "0" ou "1") sont également observés (figure 4.5a).

Les données minéralogiques des poussières TF (tableau 4.1) permettent de suspecter des minéraux chargés de fer tels que la sidérite ou la chlorite. Une comparaison des spectres d'une sidérite de référence (figure 4.5b) ou d'une chlorite de référence (figure 4.5c) montre que la matrice des particules Fe,Mg(Ca) est constituée de sidérite (spectres à dominante Fe,Mg) plutôt que de chlorite (spectres à dominante Fe,Al).

Les incidences des particules Fe,Mg(Ca) des échantillons TF (figure 4.6a) varient de 16 à 25 particules-%. Les échantillons TF1/TF4 de la Ruhr sont, tendentiellement, les plus riches en sidérite. Il faut rappeler que les teneurs globales en sidérite des échantillons TF sont similaires (tableau 4.1). La sidérite de l'échantillon de la Saar (TF5) semble être distribuée sur le reste de la population de particules (mélange endogène) et forme apparemment un mélange à caractère exogène pour les poussières de la Ruhr.

Ces différences entre les deux bassins houillers sont plus prononcées en considérant les sous-groupes de particules Fe,Mg et Fe,Mg,Ca. Les échantillons de la Ruhr montrent que seulement 59% des particules de sidérite de l'échantillon TF1 (61% pour l'échantillon TF4) sont contaminées par du calcium (intensité de signal "10"). Cette proportion passe à 90% pour l'échantillon TF5 de la Saar (voir Tourmann and Kaufmann, 1993).

Ces différences sont difficiles à interpréter compte-tenu de la stoechiométrie variable des carbonates (solution solides de Fe,Mg,Ca). Mais elles révèlent probablement des contaminations de la sidérite de la Saar par des carbonates de calcium.

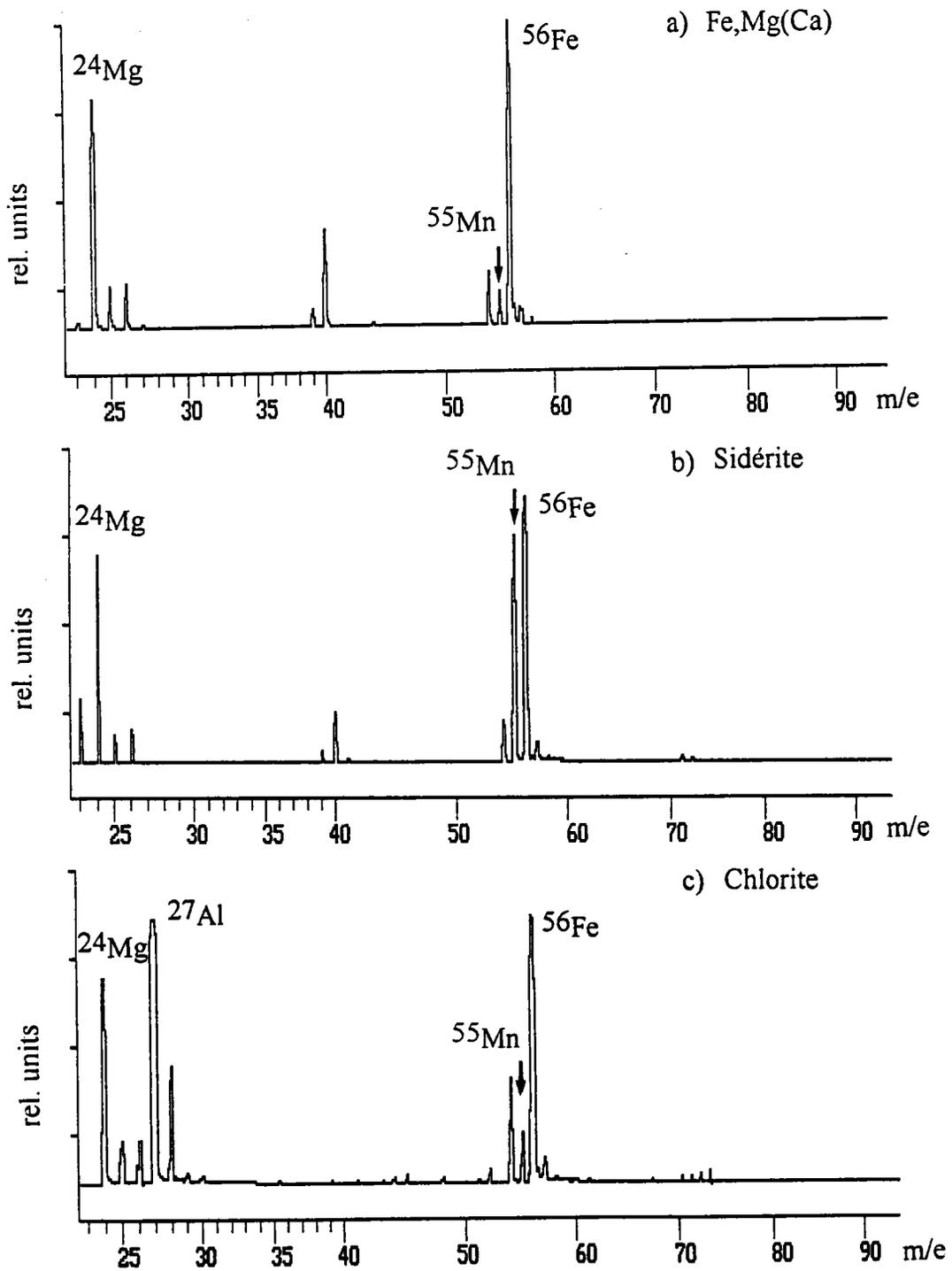


Figure 4.5: Exemples de spectres de particules à dominante Fe, Mg(Ca) des poussières de mine (a), d'une sidérite de référence (b) et d'une chlorite de référence (c)

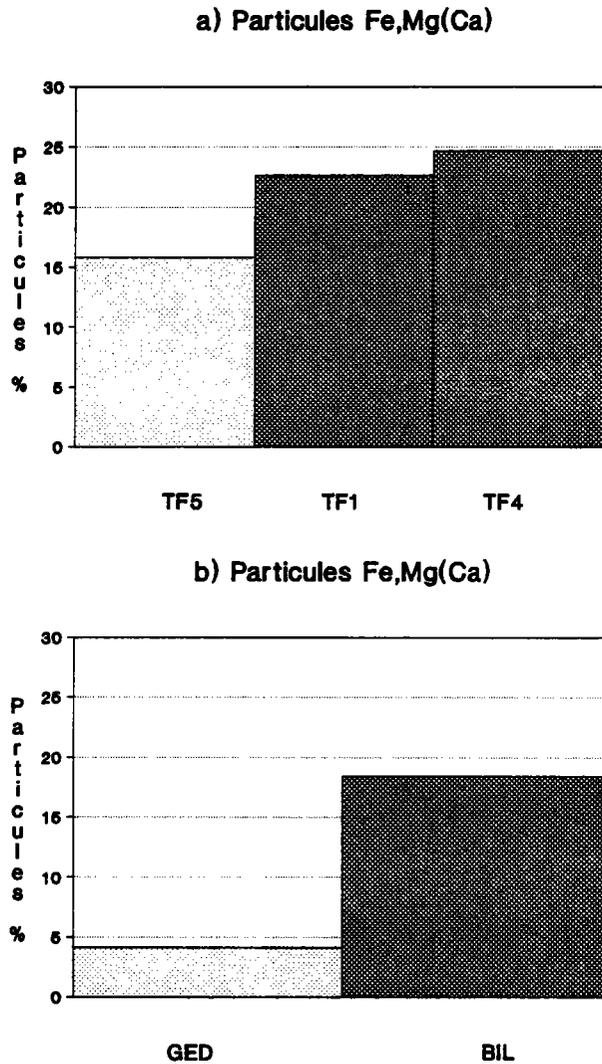


Figure 4.6: Incidence en particules à dominante Fe,Mg(Ca) des échantillons TF (a, fibrogénicité: TF5 < TF1,TF4) et des échantillons britanniques (b, fibrogénicité: GED << BIL)

Cette conclusion serait concordante avec les résultats d'études de la matière minérale de ces bassins houillers qui montrent une prépondérance en carbonate de calcium (dolomite) pour la matière minérale de la Saar. A l'inverse, la présence de concrétions locales mais massives de sidérite nodulaire dans la Ruhr est en faveur, lors des opérations minières, d'une dispersion de particules de sidérite "pure" (mélange exogène) (Kühn et al., 1985).

La figure 4.6b montre les incidences des particules Fe,Mg(Ca) pour les échantillons britanniques. On remarque que la poussière BIL est plus riche en particules de sidérite (18.5 particules-%) que l'échantillon GED (4 particules-%).

Cette observation est en accord avec certaines données géologiques qui indiquent la présence, dans la mine adjacente à celle de l'échantillon BIL et exploitant la même veine de charbon, de couches de sables très probablement cimentés par de la sidérite (Addison J., Institute of Occupational Medicine, Edinburgh, communication personnelle). La fermeture de cette mine adjacente ne permet plus d'effectuer des prélèvements.

Ces considérations d'ordre géologique mériteraient une attention particulière dans le cadre du concept de nocivité spécifique. En effet, elles reflètent les différences d'endémie des pneumoconioses entre les bassins de la Ruhr et de la Saar ou des mines d'Ecosse et du comté de Nottingham. On rappellera que le risque de pneumoconiose est totalement opposé à la richesse en quartz des poussières prélevées en Saar ou dans le comté de Nottingham.

Il est tentant d'attribuer la fibrose nodulaire (plus au moins prononcée) provoquée par les poussières TF1, TF4, TF5 et BIL aux hautes incidences en particules de sidérite (>15 particules-%). A l'inverse, l'inaptitude de l'échantillon GED à induire une fibrose nodulaire pourrait être attribuée à une incidence moindre (< 5 particules-%).

Il faut cependant rappeler que les poussières allemandes ont été testées sur l'animal par injection (intra-trachéale ou intra-péritonéale) et les poussières britanniques par inhalation. Les conditions de déposition, d'élimination et de rétention des particules sont alors différentes.

La richesse en matière minérale des 5 échantillons permet d'expliquer les hautes incidences en particules de sidérite qui, habituellement, sont inférieures à 5 particules-% dans les poussières de mine. Les échantillons à faibles incidences en particules de sidérite sont, dans les tests intratrachéaux, aptes à produire de la fibrose nodulaire. On peut donc supposer que l'échantillon GED induirait de la fibrose nodulaire par test intra-trachéal.

En conclusion, on pourra retenir que les particules de sidérite semblent potentialiser la fibrose nodulaire induite par les particules de quartz "pur" (cas des échantillons TF et BIL) et très probablement participer à la progression rapide de la fibrose chez l'homme (cas de la mine d'Ecosse).

Il apparait également que le choix d'échantillons riches en matière minérale permet d'identifier des facteurs modulant la nocivité du quartz (contaminations de surface) et de cerner des facteurs de nocivité spécifique indépendants du quartz et propre à la matière minérale des différents bassins.

○○○○○○○○○○

CHAPITRE 5

Etude de la nocivité spécifique à l'origine stratigraphique des poussières

La précédente étude de poussières de mine riches en quartz a montré que leur fibrogénicité dépendait de facteurs autres que l'incidence en particules de quartz "pur". La recherche de facteurs de nocivité indépendants du quartz est d'autant plus impérative pour la cytotoxicité des poussières de mine à faibles teneurs en quartz (< 10%) car cette cytotoxicité sera généralement supérieure à celle attendue en se référant à la teneur en quartz des poussières (Bruch, 1987).

De nombreuses études ont montré que la cytotoxicité de telles poussières dépend de leur teneur totale en matière minérale plutôt que de leur teneur en quartz (Reisner and Robock, 1975; Gormley et al., 1979). Les paramètres de la matière minérale gouvernant cette cytotoxicité n'ont, jusqu'à présent, pas été identifiés.

L'objectif du présent chapitre consiste à tenter d'identifier des paramètres de la matière minérale des poussières de mine pouvant déterminer leur cytotoxicité. L'étude porte sur des poussières prélevées dans différents horizons stratigraphiques du bassin de la Ruhr. Ils avaient permis à Reisner et Robock d'introduire le concept de "nocivité spécifique à l'origine stratigraphique des poussières" (Reisner et Robock, 1975).

Ces auteurs avaient montré que la cytotoxicité de ces poussières (test de réduction du TTC, voir chapitre 3) dépendait peu de leur teneur en quartz. Ils avaient par contre établi, au sein de chaque horizon stratigraphique, une relation linéaire avec la teneur en cendres des poussières. La figure 5.1 (d'après Reisner et Robock, 1975) illustre cette relation pour 3 horizons d'âges stratigraphiques croissants (Horster, Obere Essener et Untere Essener).

Il y apparaît que des poussières provenant d'horizons stratigraphiquement jeunes (Horster) peuvent exhiber la même cytotoxicité (par exemple 100-TTC.RA = 35%) que des poussières prélevées dans des horizons plus âgés (Untere Essener). La teneur en cendres de tels échantillons "isotoxiques" sera cependant 2 à 3 fois plus élevée pour les poussières provenant des horizons les plus jeunes. Réciproquement, les poussières isotoxiques prélevées dans les horizons plus âgés seront enrichies en matière organique.

Tableau 5.1: Cytotoxicité (100 - TTC.RA), âge stratigraphique, teneur en cendres et en quartz (d'après Reisner et Robock, 1975) et incidences LAMMA des 19 groupes de particules identifiés dans les 6 échantillons des ensembles isotox-1 et isotox-2

Données d'après Reisner and Robock (1975)	ISOTOX-1				ISOTOX-2			
	42	26	08		33	11	02	
%Cytotoxicité	48.0	46.1	47.5		29.1	21.2	32.5	
Age stratigraphique	âgé			jeune	âgé		jeune	
%Cendres	27.9	40.7	62.1		14.7	21.6	50.3	
%Quartz	3.4	6.2	9.0		1.3	2.7	6.5	
Incidence LAMMA (particules-%)	ISOTOX-1				ISOTOX-2			
	42	26	08	moy.	33	11	02	moy.
1= Al,K	9.8	5.0	17.5	10.8	2.6	5.7	8.2	5.5
2= Al,K + Fe	15.5	15.6	13.4	14.8	5.1	11.3	16.8	11.1
3= Al,K + Ti	1.7	3.8	1.1	2.2	1.9	1.6	2.1	1.9
4= Al,K + Fe + Ti	0.4	3.2	1.4	1.7	1.7	1.3	1.6	1.5
5= Al,K + (Fe/Ti)	31.3	24.9	32.2	29.5	11.1	13.0	20.8	15.0
6= Si (+Al)	0.6	1.4	3.8	1.9	1.0	2.1	2.1	1.7
7= Ca	0.0	2.0	2.6	1.5	0.7	5.5	2.4	2.9
8= Ti	1.8	2.4	0.7	1.6	1.6	0.8	2.9	1.8
9= Al	2.3	4.5	3.8	3.5	2.2	4.9	4.6	3.9
10= Fe	2.2	5.0	2.4	3.2	3.1	5.0	3.2	3.8
11= Ba	0.9	0.4	1.0	0.8	0.0	1.6	0.8	0.8
12= Pb	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.2
13= Zr	0.4	1.6	0.5	0.8	0.7	0.3	0.3	0.4
14= Mg+Al+Si+K+Fe	1.0	1.0	4.1	2.0	0.0	0.8	1.6	0.8
15= Mg+Ca+Fe	0.0	1.2	0.5	0.6	0.0	1.6	1.1	0.9
16= Inclassifiable	3.2	5.1	8.2	5.5	2.7	6.0	7.4	5.4
17= Métaux lourds	2.8	3.1	1.7	2.5	11.6	7.6	6.4	8.5
18= CnHm + Al,K...	14.5	14.9	2.8	10.7	27.6	14.6	8.6	16.9
19= CnHm	11.4	4.3	1.9	5.9	26.6	16.4	8.8	17.3

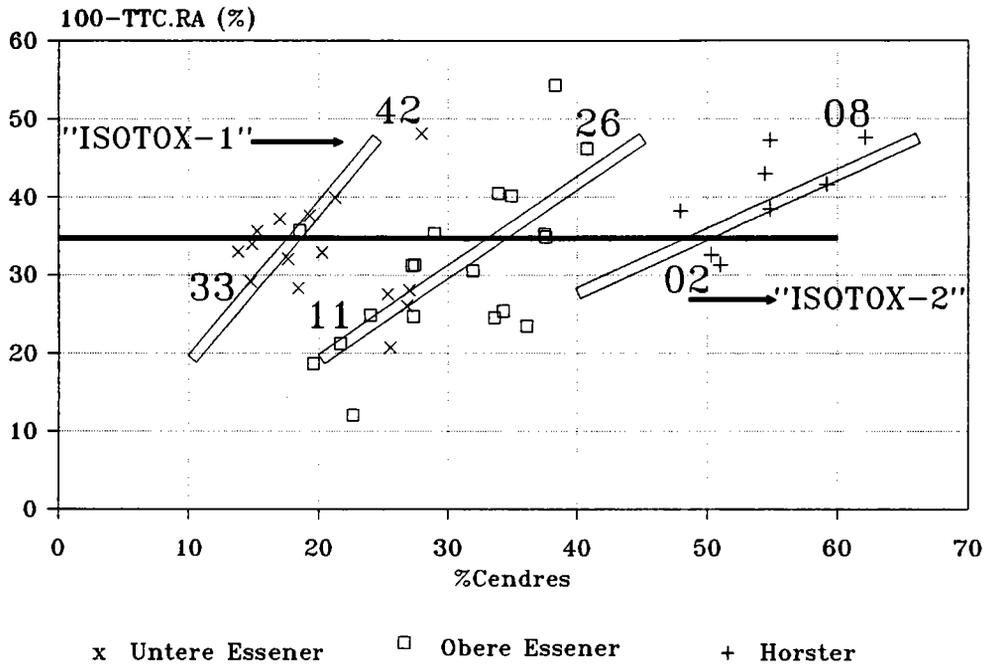


Figure 5.1: Relation linéaire entre la cytotoxicité (100 - TTC.RA) et la teneur en cendres des poussières établie par Reisner et Robock (1975) pour 3 horizons de la Ruhr d'âge stratigraphique croissant (Untere Essener = *âgé*, Horster = *jeune*).

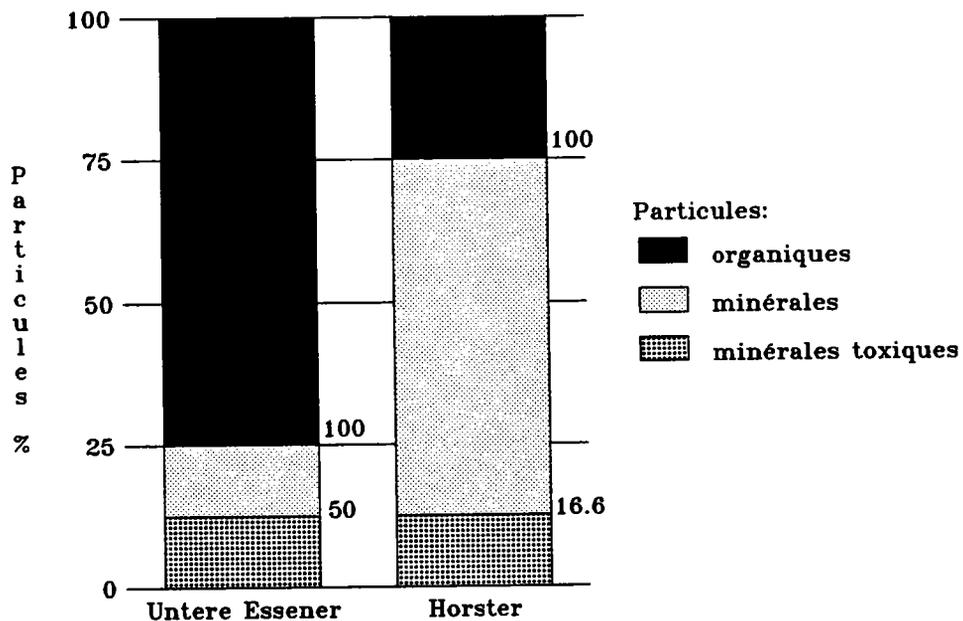


Figure 5.2: Modélisation des incidences en particules organiques, en particules minérales et en particules minérales toxiques pour 2 poussières isotoxiques d'âge stratigraphique différent (Untere Essener = *âgé*, Horster = *jeune*)

On peut en déduire que la matière organique des poussières provenant d'horizons stratigraphiquement âgé est cytotoxique ou, à l'autre extrême, que la matière minérale de ces poussières est plus cytotoxique que celles des poussières prélevées dans les horizons les plus jeunes.

L'existence d'une corrélation positive entre la cytotoxicité et la teneur en cendres des poussières nous permet, en première approximation, d'exclure la participation de la matière organique et de retenir l'hypothèse d'une cytotoxicité déterminée par la fraction inorganique des poussières. Cette dernière pourra être assimilée à la matière minérale en admettant l'existence d'une relation linéaire entre la cytotoxicité et la teneur en matière minérale des poussières similaire à celle observée pour la teneur en cendres.

La figure 5.2 illustre le cas de 2 échantillons d'âges stratigraphiques et de teneurs en matière minérale variables mais de même cytotoxicité. Elle permet de reconnaître deux échantillons isotoxiques ayant une même incidence en particules minérales toxiques (par exemple 12.5 particules-%).

Nous tenterons donc d'identifier les facteurs potentiellement cytotoxiques de la matière minérale des poussières de mine en étudiant des ensembles de poussières isotoxiques prélevées dans différents horizons stratigraphiques. Ceux-ci devront exprimer une incidence constante par intra-comparaison au sein des ensembles d'échantillons isotoxiques. On effectuera ensuite une inter-comparaison entre ensembles d'échantillons isotoxiques.

5.1) Partie expérimentale

Deux ensembles d'échantillons isotoxiques ("isotox-1" et "isotox-2") ont été choisies aux deux extrêmes de l'échelle de cytotoxicité déterminée par Reisner et Robock (voir figure 5.1):

- les échantillons **08, 26 et 42** de cytotoxicité égale à 50% (**isotox-1**)
- les échantillons **02, 11 et 33** de cytotoxicité voisine de 30% (**isotox-2**).

Les 6 échantillons ainsi sélectionnés, de cytotoxicité et teneur en quartz variables (tableau 5.1), présentent des différences extrêmes quant à leurs teneurs en cendres qui varient de 30 à 60% pour les échantillons de l'ensemble isotox-1 et de 15 à 50% pour ceux de l'ensemble isotox-2. Les détails sur la composition minéralogique des poussières sont donnés dans le tableau 2.3 (voir chapitre 2).

Les analyses LAMMA (500 particules/échantillon) ont été effectuées à 100% de transmission laser afin de détecter les éléments traces tels que les métaux lourds. La taille des particules analysées correspond au maximum de distribution granulométrique (1.5-2 μm).

5.2) Résultats

Les analyses LAMMA révèlent l'existence de 19 groupes de particules définis par différentes combinaisons d'éléments (tableau 5.1). Les particules des groupes 1 à 5 représentent les particules minérales les plus communes (20 à 70 particules-%). Leurs spectres à dominante Al,K dévoilent une nature argileuse. Des éléments associés tels que le fer et/ou le titane peuvent être détectés avec des signaux d'amplitudes "10" (groupes 2, 3 et 4) ou "1" (groupe 5). Environ 90% des particules de ce dernier groupe contiennent du fer.

Les particules du groupe 6, de spectres à dominante Si(Al), représentent des particules de quartz "pur" et/ou de quartz contaminé par de l'aluminium. Le choix des conditions analytiques (100% de transmission) ne permet pas de distinguer entre ces deux variantes (voir l'étude de l'influence de l'irradiance laser, chapitre 3.4).

Les particules des groupes 7 à 13 sont des particules à spectre dominé par un élément majoritaire (Ca, Ti, Al, Fe, Ba, Pb ou Zr). Elles sont très probablement constituées d'(hydr)oxydes, carbonates, sulfures, sulfates... de ces éléments (calcite, rutile, corindon...).

Les combinaisons d'éléments des groupes 14 à 16 représentent des minéraux non-identifiables ou des particules non-classifiables. Les particules du groupe 17 sont des particules minérales contaminées par des métaux lourds tels que Cr, Ni, Cu, Pb, Mn, V, Zn et/ou Mo. Elles sont généralement constituées d'une matrice argileuse (spectres à dominante Al,K) contenant éventuellement du fer. Les particules de composition mixte inorganique/organique ou de composition "purement" organique sont classées dans les groupes 18 et 19.

L'intra-comparaison au sein de chaque ensemble d'échantillons isotoxiques (voir tableau 5.1) montre que les incidences des particules argileuses contenant du fer (groupes 2 et 5) sont constantes pour l'ensemble isotox-1.

Ces particules argileuses contenant du fer peuvent être suspectées (conformément à la figure 5.2) de participer à la cytotoxicité des poussières 08, 26 et 42 dont l'âge stratigraphique et la teneur en cendres sont variables.

Il faut cependant noter que leurs incidences décroissent avec l'âge stratigraphique des échantillons de l'ensemble isotox-2. La cytotoxicité de ces derniers échantillons semble liée à la présence de particules contaminées par les métaux lourds (groupe 17) dont l'incidence augmente avec l'âge stratigraphique des poussières.

Des corrélations positives sont observées (tableau 5.1) entre l'âge stratigraphique des échantillons et les incidences des particules organiques des groupes 18 et 19. Elles reflètent, au sein de chaque ensemble d'échantillons isotoxiques, l'enrichissement en matière organique des poussières (pauvres en minéraux) provenant d'horizons stratigraphiquement plus âgés. La richesse en particules organiques de tels échantillons (par exemple 33 et 42) exprime cependant un enrichissement relatif de leur matière minérale en particules potentiellement toxiques (groupes 2, 5 et 17).

Une inter-comparaison des deux ensembles d'échantillons isotoxiques révèle que les incidences moyennes en particules chargées de fer (groupes 2 et 5) sont plus élevées pour l'ensemble isotox-1 (14.8 et 29.5 particules-%, respectivement) que pour l'ensemble isotox-2 de cytotoxicité moindre (11.1 et 15.0 particules-%, respectivement).

Ces différences d'incidences ne sont pas très prononcées (facteurs 1.3 et 2, respectivement) mais correspondent approximativement à la différence de cytotoxicité des deux ensembles d'échantillons (facteur 1.7). Les incidences moyennes des particules minérales contaminées par les métaux lourds (groupe 17) expriment une relation inverse avec la cytotoxicité des deux ensembles.

On ne peut cependant procéder à une telle inter-comparaison des ensembles isotox-1 et isotox-2 qu'en écartant les différences de cytotoxicité liées aux paramètres purement physiques de la matière minérale (surface spécifique...). En effet, ceux-ci vont croître parallèlement à la teneur en matière minérale et avec la cytotoxicité. On déplorera l'absence de mesure de surface spécifique dans l'étude de Reisner et Robock.

Une tentative complémentaire de détermination des constituants minéraux potentiellement cytotoxiques consisterait à comparer au sein de chaque horizon stratigraphique deux échantillons à même teneur en cendres mais de cytotoxicité variable. Cette approche permettrait de contourner les effets propres aux paramètres purement physique de la

matière minérale car la teneur en matière minérale serait identique pour les deux échantillons.

Les 6 échantillons sélectionnés pour cette étude, dont la cytotoxicité et la teneur en cendres varient simultanément, ne permettent pas cette approche. Seuls les échantillons 11 (Obere Essener) et 42 (Untere Essener), dont les teneurs en cendres et les incidences en particules organiques sont similaires, répondent à de tels critères.

Une comparaison, pour les deux échantillons 11 et 42, des incidences en particules des groupes 2 et 5 (voir tableau 5.1) révèle un facteur d'enrichissement de 1.4 pour le groupe 2 et un facteur 2.4 pour le groupe 5. Ces facteurs reflètent les différences de cytotoxicité des deux échantillons (facteur 2.3). Mais les teneurs en cendres comparables des deux poussières suggèrent surtout un enrichissement en particules cytotoxiques de la matière minérale de l'échantillon stratigraphiquement âgé (poussière 42).

5.3) Discussion

La stratégie de la présente étude, basée sur la notion de "nocivité spécifique à l'origine stratigraphique des poussières" (Reisner et Robock, 1975) et sur l'examen d'échantillons isotoxiques, a pour objectif de cerner les paramètres potentiellement cytotoxiques de la matière minérale des poussières de mine. Une tentative d'identification de facteurs cytotoxiques indépendants du quartz semblait d'autant plus impérative que la cytotoxicité des poussières de mine est généralement très variable, non-corrélée à leur teneur en quartz ou plus élevée que cette teneur en quartz ne permet de le prédire (Bruch, 1987).

Les deux ensembles d'échantillons isotoxiques sélectionnés laissent toutefois prévoir, en premier lieu, une corrélation entre la cytotoxicité et la teneur en quartz des poussières. La teneur en quartz moyenne de l'ensemble isotox-1 (50% de cytotoxicité) est de l'ordre de 6% (voir tableau 5.1). Elle est environ deux fois plus élevée que celle de l'ensemble isotox-2 (3% de quartz, 30% de cytotoxicité). Mais les résultats d'analyses LAMMA ne révèlent pas de différences notoires d'incidences en particules de quartz du groupe 6: 1.9 et 1.7 particules-% pour les ensembles isotox-1 et isotox-2, respectivement.

On peut également rappeler que la présence d'aluminium dans les particules du groupe 6 (spectres à dominante Si,(Al)) agit en tant que facteur inhibant la cytotoxicité déterminée par le test de réduction du TTC (voir l'étude des silices de référence, chapitre 3).

L'étude de Reisner et Robock avait déjà montré que la cytotoxicité des échantillons dépendait plus de leur teneur en cendres que de leur teneur en quartz. Mais les analyses LAMMA montrent clairement que les incidences en particules de quartz ne suffisent pas à expliquer la cytotoxicité de ces échantillons. On se basera, à ce titre, sur la relation observée entre l'incidence des particules de quartz "pur" (classe I) et la cytotoxicité des poussières de silice de référence (chapitre 3, figure 3.4a).

On rappellera d'abord que la cytotoxicité des silices a également été déterminée par le test du présent chapitre (réduction du TTC). Une regression basée sur la relation de la figure 3.4a permet d'estimer le nombre de particules de la classe I nécessaire à exprimer, par exemple, la cytotoxicité de l'ensemble isotox-1 (50%). Elle indique qu'une incidence de 21% de particules de quartz "pur" serait nécessaire pour exprimer cette cytotoxicité.

Aucun des échantillons sélectionnés dans la présente étude ne dévoile de telles incidences en particules de quartz "pur" (ou du groupe 6). Il apparait donc nécessaire, contrairement à l'étude des silices de référence, d'identifier des facteurs de cytotoxicité indépendants du quartz plutôt que de déterminer des facteurs modulant la cytotoxicité du quartz.

Notre approche méthodologique, basée sur des intra-comparaisons au sein d'ensembles d'échantillons isotoxiques et sur des inter-comparaisons d'ensembles à permis de cerner, parmi 19 groupes différents de particules, 2 groupes de particules potentiellement cytotoxiques:

- les particules argileuses (micas et/ou kaolinite) contaminées par le fer (groupe 2 et 5),
- les particules minérales (principalement argileuses) contaminées par les métaux lourds et éventuellement par le fer (groupe 17).

La contribution de chacun de ces facteurs (voire des autres particules minérales) à la cytotoxicité totale des poussières ne peut pas être déterminée de manière absolue. En effet, les résultats montrent que la cytotoxicité des poussières de l'ensemble isotox-1 serait liée aux contaminations des argiles par le fer et celle des poussières de l'ensemble isotox-2 à la présence de métaux lourds.

La complexité des vraies poussières de mine ne nous permet pas d'obtenir, ni même d'espérer fournir, des informations sans équivoque quant aux contributions individuelles des paramètres de cytotoxicité. Il faut rappeler que l'objectif de la présente étude est de tenter de cerner au sein de la matière minérale des constituants potentiellement

cytotoxiques, indépendants du quartz et dont l'activité mérite d'être confirmée par l'étude *in vitro* de minéraux de référence.

Les différences d'incidences en particules chargées de fer (groupe 2 et 5) parallèles aux différences de cytotoxicité des deux ensembles (voir les résultats de l'inter-comparaison) et la nature même des contaminations des particules du groupe 17 (métaux lourds) laissent raisonnablement entrevoir ces particules comme de bons candidats cytotoxiques.

La méthode de comparaison d'échantillons isotoxiques (mais à teneurs en matière minérale extrêmement variables) ouvre également des perspectives intéressantes quant aux études de nocivité de la matière minérale des poussières pauvres en minéraux. Les résultats suggèrent que la matière minérale de tels échantillons (provenant des horizons stratigraphiquement âgés) soit enrichie en particules potentiellement cytotoxiques des groupes 2, 5 et/ou 17 (cas des échantillons 33 et 42).

La figure 5.2 a servi à illustrer le cas de 2 échantillons isotoxiques (d'âge stratigraphique et à teneur en matière minérale variables) dont les incidences en particules minérales toxiques sont comparables (12.5 particules-%). La fraction des particules minérales toxiques apparaît cependant plus élevée (par normalisation des incidences sur la fraction des particules minérales) pour l'échantillon stratigraphiquement le plus âgé et pauvre en minéraux (50 particules-%). Elle ne représentera que 16.6 particules-% pour l'échantillon stratigraphiquement jeune et riche en minéraux.

Cette observation permet d'avancer l'hypothèse qu'aux faibles variations de la teneur en matière minérale des poussières de charbon de haut rang (pauvres en matière minérale mais enrichies en particules minérales toxiques) peuvent suivre des différences notoires de cytotoxicité.

D'autres auteurs ont suspecté la matière minérale des poussières de charbon de haut rang (pauvres en minéraux) d'être plus cytotoxique (à masse égale) que celle des poussières de charbons de bas rang (Gormley et al., 1979; Reisner and Robock, 1982). La nature physico-chimique des facteurs de cytotoxicité de la matière minérale n'a pas été discutée ou identifiée par ces auteurs.

Les échantillons de la présente étude, d'âges stratigraphiques différents, n'expriment pas de différences notoires en terme de rang du charbon exploité dans les 3 horizons stratigraphiques étudiés: les poussières 02 et 08 de l'horizon Horster se rapportent à un

"Gasflammkohle" (≈charbon flambant sec); celles des horizons Obere Essener et Untere Essener à un "Gaskohle" (≈charbon flambant gras à charbon gras).

Un enrichissement de la matière minérale associée aux charbons de haut rang a déjà été évoqué dans la caractérisation des poussières présentée au chapitre 2. On y avait remarqué que seule l'incidence des particules chargées de fer ne diminuait pas en parallèle avec la teneur en cendres des poussières (figure 2.6). Elle apparaissait aussi élevée pour les poussières des mines de charbon de bas rang (riches en matière minérale) que pour celles prélevées dans les mines de charbon de haut rang et pauvres en matière minérale (cas des échantillons 53, 67, 74 et 77, voir figure 2.6). Ces charbons ("Esskohle", charbons 1/2-Gras) représentaient ceux du plus haut rang de l'étude de Reisner et Robock.

Il convient de préciser, à ce stade de la discussion, que la relation linéaire entre la teneur en cendres et la cytotoxicité des poussières des 3 horizons stratigraphiques de la présente étude a servi de modèle à Reisner et Robock pour expliquer la haute prévalence des pneumoconioses dans les mines de charbon de haut rang (Reisner et al., 1982; 1985a). Ils ont observé la même relation linéaire pour les poussières des mines de la Ruhr exploitant des charbons de haut rang (horizons Bochumer et Wittener). La prévalence des pneumoconioses y était dix fois plus élevée que dans les mines de charbons de bas rang (et stratigraphiquement plus jeunes) de la présente étude.

Ces auteurs avaient déjà remarqué que pour une même cytotoxicité (par exemple 35%), la teneur en cendres des poussières diminuait parallèlement avec l'âge stratigraphique et le rang du charbon (voir figure 5.3). Les poussières des horizons stratigraphiquement les plus âgés (haut rang, haute prévalence) nécessitent moins de matière minérale (%Cendres ≈ 15%) que celles stratigraphiquement plus jeunes (%Cendre ≈ 50%). Une relation similaire a été observée pour les poussières de la Saar. Ces auteurs avaient ainsi attribué une nocivité plus élevée et spécifique à la matière minérale des charbons de haut rang.

On proposera d'attribuer cette spécificité à l'enrichissement de la matière minérale des charbons de haut rang en particules minérales toxiques (voir modèle, figure 5.2) pouvant contenir du fer et/ou des métaux lourds. Cette hypothèse nécessite d'identifier les conditions géologiques pouvant conduire à cet enrichissement de la matière minérale des charbons de haut rang. Il faudra également préciser la physico-chimie de ces particules minérales (nature minéralogique, spéciation des métaux...). Mais l'hypothèse mérite surtout d'être confirmée en étudiant des poussières répondant aux critères suivants:

- prélèvement dans des veines de charbon stratigraphiquement définies dont le rang varie des charbons flambants à celui des anthracites,
- prélèvement au sein des différentes veines de poussières à teneurs en matière minérale extrêmement variables (et aussi élevée que possible pour les charbons de haut rang),
- existence de différences notoires de nocivité (notamment de fibrogénicité) présentant une relation linéaire (au sein de chaque horizon) avec la teneur en matière minérale des échantillons.

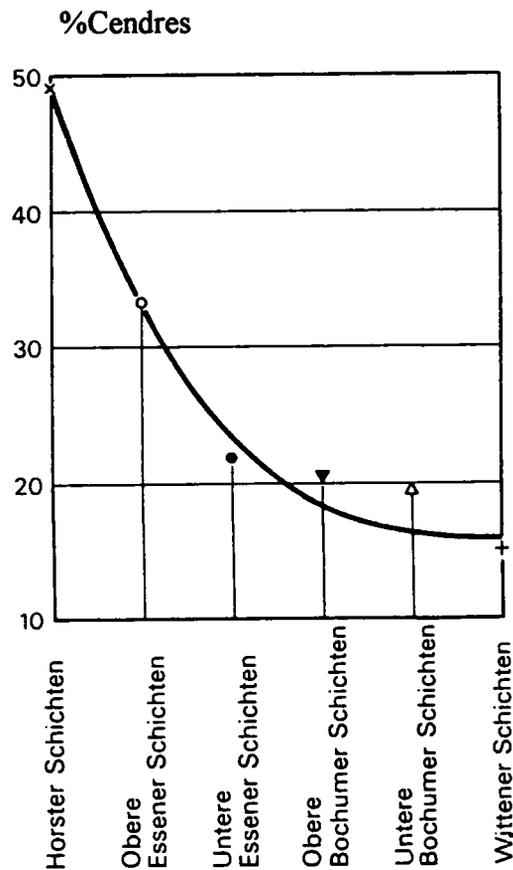


Figure 5.3: Relation entre la teneur en cendres et l'âge stratigraphique de poussières présentant une même cytotoxicité de 35% (d'après Reisner and Robock, 1975)

L'étude de ces échantillons permettrait de fonder la notion de "nocivité spécifique à l'origine stratigraphique des poussières" sur des résultats de tests de fibrogénicité, voire en accord avec les données épidémiologiques. Un programme de recherche de la Commission des Communautés Européennes actuellement en cours, initié par le Professeur K. Robock, est consacré à l'étude de telles poussières.



CHAPITRE 6

Apports de l'analyse LAMMA aux études comparatives des tests de nocivité

Les collections actuelles de vraies poussières de mines ne disposent pas d'échantillons répondant aux critères précédemment évoqués (fibrogénicité dépendant de la teneur totale en matière minérale et spécifique à l'origine stratigraphique des poussières, voir chapitre 5). Un programme de recherche financé par la Commission des Communautés Européennes (programme H1), dont l'objectif est d'établir l'existence d'une telle relation, est actuellement en cours. Il devrait nous permettre, dans un avenir proche, d'avoir accès à des poussières dont la fibrogénicité serait spécifique à l'origine stratigraphique des échantillons.

La mise en évidence de l'existence (ou non) de cette relation spécifique pose le problème du choix du test de fibrogénicité. La batterie des différents tests utilisés dans les études de nocivité livre fréquemment des résultats divergents, voire contradictoires, quant à la nocivité *in vivo* (ou *in vitro*) d'une poussière donnée. Ces considérations nous contraignent à placer l'approche méthodologique et les conclusions développées au précédent chapitre dans les limites d'observations basées sur un seul test de nocivité (test de réduction du TTC).

En effet, une récente étude communautaire consacrée à la comparaison de 27 tests de nocivité différents (utilisés sur 23 poussières) a montré qu'il serait vain de vouloir cerner les paramètres de nocivité d'une poussière au moyen d'un test unique (voir rapport de synthèse publié par Le Bouffant, 1987a; Bruyet, 1987; Le Bouffant et al., 1988). L'analyse statistique des résultats des différents tests (12 tests *in vitro* et 15 tests *in vivo*) a mis en évidence des disparités entre tests *in vitro* et tests *in vivo*, ainsi qu'entre tests de même nature.

La famille des tests *in vivo*, clairement distincte de celle des tests *in vitro*, inclus 2 sous-ensembles de tests consacrés d'une part à l'étude des réactions des tissus pulmonaires (tests *in vivo* pulmonaires) et, d'autre part, celui des tests *in vivo* ganglionnaires. Un complément d'analyse a établi que les résultats des tests pulmonaires étaient plus proches des résultats des tests *in vitro* que de ceux des tests ganglionnaires.

La nature minéralogique des constituants pouvant expliquer les disparités (ou similitudes) entre les différents tests n'a pas été identifiée. Seule la teneur totale en matière minérale des poussières semblait influencer les résultats de certains tests.

L'étroite inter-corrélation existant entre la teneur totale en matière minérale et la teneur globale en quartz, en kaolinite ou en micas (illite/séricite/muscovite) n'a pas permis d'isoler un paramètre minéralogique déterminant.

Il semblait donc intéressant de voir si des analyses LAMMA permettaient d'éclaircir la situation, c'est-à-dire identifier les paramètres de la matière minérale responsables des différences (ou similitudes) entre tests de nocivité. L'étude porte sur 15 poussières empruntées aux 23 échantillons du projet de recherche communautaire précédemment cité. Les résultats LAMMA seront présentés et discutés parallèlement aux résultats d'analyses minéralogiques conventionnelles afin de vérifier si les conclusions tirées de l'étude des 23 poussières (d'après Le Bouffant, 1987a) restent valables pour le lot des 15 poussières de la présente étude.

6.1) Partie expérimentale

Les 15 échantillons étudiés concernent des poussières prélevées sur échantillonneur BAT II dans des mines de Belgique (6 poussières), de France (4 poussières) et de Grande-Bretagne (5 poussières). L'origine stratigraphique et la composition minéralogique des poussières, empruntées à la littérature, sont données dans le tableau 6.1.

Les analyses LAMMA, effectuées à 30% de transmission laser, portent sur 1000 à 1500 particules/échantillon dont le diamètre correspond à celui du maximum de distribution granulométrique (1.5-2 μm). Les incidences des éléments ou combinaisons d'éléments suivantes seront discutées:

- particules de la classe I ou particules de quartz "pur",
- particules à dominante AlK (avec ou sans Ti) ou particules argileuses de micas et/ou kaolinite,
- particules à dominante AlKFe ou particules argileuses contaminées par le fer (d'intensité de signal codée "1" ou "10"),
- particules à dominante FeX (X = Al, Mg et/ou Ca) ou particules minérales (sidérite, chlorite et minéraux non-identifiés) contenant du fer (d'intensité de signal codée "10"),
- particules contenant du manganèse (limite de détection placée à l'amplitude "1") en combinaison avec tout autre élément,

Tableau 6.1: Origine et composition minéralogique des échantillons
(d'après Le Bouffant, 1987a)

	Origine	% M.M.*	%Quartz	%Kaolin.	%Micas	%Divers
B49W	Belgique Campine Westphalien B	44.9	5.6	7.9	19.7	2% Bassanite
B55W	Belgique Campine Westphalien A	26.3	3.7	4.8	12.4	
B61W	Belgique Campine Westphalien A	18.6	1.9	1.9	6.7	2.5% Calcite
B68Z	Belgique Campine Westphalien A	53.4	6.7	9.5	25.1	
B71AZ	Belgique Campine Westphalien A	51.4	5.0	7.4	23.2	2.5% Sidérite
B72Z	Belgique Campine Westphalien A	43.8	8.6	9.1	18.8	2.5% Sidérite
F1	France Nord-P. de C. Westphalien C	46.9	3.9	6.0	14.6	8.5% Calcite 2.0% Bassanite
F2	France Lorraine Stéphanien A	83.6	10.6	13.9	32.1	3.5% Chlorite
F3	France Auvergne Stéphanien B	31.6	5.0	10.4	14.6	
F6	France Provence Crétacé	37.6	1.9	3.7	2.1	15.0% Calcite 4.5% Pyrite 2.9% Gypse
UKQ	Gr.-Bretagne Nottinghamsh. Westphalien C	73.1	5.1	16.9	20.9	4.0% Calcite
UKVA	Gr.-Bretagne South Wales Westphalien A	42.2	3.8	10.3	12.6	3.0% Calcite 2.0% Bassanite
UKVB	Gr.-Bretagne South Wales Westphalien B	26.1	1.9	4.9	10.6	
UKW	Gr.-Bretagne South Wales Westphalien B	17.2	1.7	1.8	9.5	
UKY	Gr.-Bretagne Durham Westphalien B	32.0	3.7	4.7	12.2	2.0% Calcite 2.0% Bassanite

*Teneur en Matière Minérale (LTA 150°C)

- particules contenant du calcium (limite de détection placée à l'amplitude "1") en combinaison avec tout autre élément (ou non dans le cas des particules de calcite pure).

Les 27 tests utilisés pour caractériser la nocivité de ces échantillons, très diversifiés, se rapportent à:

- 4 tests *in vivo* histologiques se rapportant aux résultats qualitatifs d'examen histologiques des tissus pulmonaires ou ganglionnaires après application intra-trachéale des poussières (tableau 6.2),

- 12 tests *in vitro* quantitatifs sur cultures de cellules incubées avec les poussières (voir description, tableau 6.3),

- 11 tests *in vivo* quantitatifs faisant appel à l'application des poussières sur l'animal par voie intra-trachéale ou intra-péritonéale (5 tests pulmonaires et 6 tests ganglionnaires, voir tableau 6.4).

Il faut noter que les résultats de certains tests *in vitro* (viabilité et croissance cellulaires, activités enzymatiques cellulaires...) varient en sens inverse de la nocivité des poussières. Les résultats des autres tests *in vitro* et ceux des tests *in vivo* varient dans le même sens que la nocivité des poussières.

Tableau 6.2: Description des tests *in vivo* qualitatifs (d'après Le Bouffant, 1987a)

HL-	histologie des poumons au bout de 12 mois d'évolution: absence / présence de fibrose rats Wistar, application IT: 50 mg pouss. / 0.5 ml sol. physiol.
HP-	histologie des poumons au bout de 24 mois: dépôts coniotiques / amas coniotiques / amas fibroconiotiques rats Sprague-Dawley, application IT: 75 mg pouss. / 1.5 ml sol. physiol.
HG-	histologie des ganglions au bout de 24 mois: dépôts inertes / fibrose réticuline / fibrose collagène rats Sprague-Dawley, application IT: 75 mg pouss. / 1.5 ml sol. physiol.
DP-	histologie des poumons au bout de 18 mois: réaction cellulaire faible / intermédiaire / intense rats Wistar, application IT: 50 mg pouss. / 1 ml sol. Dulbecco tamponnée

Tableau 6.3: Description des tests *in vitro* quantitatifs (d'après Le Bouffant, 1987a)

OXY	Consommation cellulaire d'oxygène en équivalents-quartz 4.8 mg poussières / $8 \cdot 10^6$ macrophages alvéolaires (lapin)
LAM	% lactate déhydrogenase dans le milieu de culture 0.4 mg poussières / $5 \cdot 10^5$ macrophages P-388-D-1
GAM	% glucoseaminidase dans le milieu de culture 0.4 mg poussières / $5 \cdot 10^5$ macrophages P-388-D-1
LDM	% lactate déhydrogenase dans le milieu de culture rapporté aux témoins (non-exposés) 1 mg poussières / $2 \cdot 10^6$ macrophages P-388-D-1
PAM	% phosphatase acide dans le milieu de culture rapporté aux témoins (non exposés) 1 mg poussières / $2 \cdot 10^6$ macrophages P-388-D-1
*VIA	Viabilité cellulaire rapportée aux témoins (TiO_2) 0.4 mg poussières / $5 \cdot 10^5$ macrophages P-388-D-1
*INC	Croissance cellulaire rapportée aux témoins (non-exposés) 0.5 mg poussières / $1 \cdot 10^6$ macrophages P-388-D-1
*LAC	% lactate déhydrogenase cellulaire rapporté aux témoins (TiO_2) 0.4 mg poussières / $5 \cdot 10^5$ macrophages P-388-D-1
*GAC	% glucoseaminidase cellulaire rapporté aux témoins (TiO_2) 0.4 mg poussières / $5 \cdot 10^5$ macrophages P-388-D-1
*LDC	% lactate déhydrogenase cellulaire rapporté aux témoins (TiO_2) 1 mg poussières / $2 \cdot 10^6$ macrophages P-388-D-1
*PAC	% phosphatase acide cellulaire rapporté aux témoins (non-exposés) 1 mg poussières / $2 \cdot 10^6$ macrophages P-388-D-1
*TTC	% activité cellulaire de réduction du TTC rapporté aux témoins (non-exposés) 0.6 mg poussières / $8 \cdot 10^6$ macrophages péritonéaux (cobaye)

*Tests dont les résultats varient en sens inverse de la nocivité des poussières

Tableau 6.4: Description des tests *in vivo* quantitatifs (d'après Le Bouffant, 1987a)

TESTS PULMONAIRES	
SK6	Poids des poussières recueillies dans les ganglions* (au bout de 6 mois) rats Wistar, application IT**: 50 mg pouss. / 0.5 ml sol. physiol.
LG6	Poids des poumons (6 mois) rats Wistar, application IT: 50 mg pouss. / 0.5 ml sol. physiol.
COP	Poids de collagène pulmonaire / poids de poussières recueillies dans les poumons (24 mois) rats Sprague-Dawley, application IT: 75 mg pouss. / 1.5 ml sol. physiol.
LIP	Augmentation du poids des lipides pulmonaires / poids de poussières recueillies dans les poumons (24 mois) rats Sprague-Dawley, application IT: 75 mg pouss. / 1.5 ml sol. physiol.
POU	Augmentation du poids des poumons / poids de poussières recueillies dans les poumons (24 mois) rats Sprague-Dawley, application IT: 75 mg pouss. / 1.5 ml sol. physiol.
TESTS GANGLIONNAIRES	
LNQ	Aire moyenne en Quartz-Typical-Area (QTA) ganglionnaire (14 mois) rats Wistar, application IP***: 50 mg pouss. / 5 ml sol. physiol.
QTG	QTA ganglionnaire moyen exprimé en % de la section des ganglions (18 mois) rats Wistar, application IP: 50 mg pouss. / 5 ml sol. physiol.
LNG	Poids ganglionnaire moyen (14 mois) rats Wistar, application IP: 50 mg pouss. / 5 ml sol. physiol.
GAN	Poids ganglionnaire / poids de poussières recueillies dans les ganglions (24 mois) rats Sprague-Dawley, application IT: 75 mg pouss. / 1.5 ml sol. physiol.
LNA	Section ganglionnaire moyenne (14 mois) rats Wistar, application IP: 50 mg pouss. / 5 ml sol. physiol.
COG	Poids de collagène ganglionnaire / poids de poussières recueillies dans les ganglions (24 mois) rats Sprague-Dawley, application IT: 75 mg pouss. / 1.5 ml sol. physiol.

*SK6 = test révélat, cependant, une réponse d'élimination pulmonaire

**IT = intra-trachéale

***IP = intra-péritonéale

6.2) Résultats

La nature qualitative des 4 tests histologiques nous conduit à considérer séparément les résultats de ces tests. Ces examens histologiques permettent de considérer la grande majorité des poussières comme non- ou faiblement fibrogènes. Seules les poussières F2, UKQ et notamment B72Z induisent des réactions plus marquées pour l'ensemble des 4 tests. Cette dernière poussière se distingue très fortement du lot d'échantillons par l'importance des lésions observées (voir Le Bouffant, 1987a).

L'examen des données minéralogiques (tableau 6.1) indique que les poussières F2 et UKQ sont les plus riches en matière minérale, mais que seule la poussière F2 semble enrichie en quartz (10.6%). La poussière B72Z, bien que la plus fibrogène, ne se distingue pas par une teneur exceptionnelle en quartz (8.6%) ou en matière minérale (43.8%).

Les résultats d'analyses LAMMA ne dévoilent, pour ces 3 échantillons, aucune différence significative quant à l'incidence en particules de quartz "pur" de la classe I (figure 6.1) ou en particules argileuses de spectres à dominante AlK (figure 6.2). Les poussières F2 et UKQ sont, par contre, enrichies en particules argileuses contaminées par le fer (figure 6.3).

La combinaison d'éléments FeX (figure 6.4) ne permet pas de différencier les poussières F2, UKQ ou B72Z des autres échantillons. La poussière B72Z se distingue singulièrement par l'incidence des particules contenant du manganèse (17 particules-%, voir figure 6.5). Enfin, on pourra noter que près de la totalité des particules de la poussière F6 (peu fibrogène) contient du calcium (figure 6.6). Cette incidence inhabituelle en calcium reflète la nature calcaire du bassin minier, datant du Crétacé, de l'échantillon F6 (mine de Gardanne, Provence).

Les 4 tests *in vivo* histologiques nous permettent donc de suspecter, parmi 6 groupes de particules, le potentiel fibrosant des particules argileuses contaminées par le fer et/ou des particules minérales contenant du manganèse. Les 4 autres groupes de particules ne semblent pas jouer de rôle particulier. Il reste, cependant, à affiner ces conclusions grâce aux données quantitatives des 12 tests *in vitro* (tableau 6.5) et des 11 autres tests *in vivo* (tableau 6.6). Ces données doivent permettre d'approfondir notre approche en terme de corrélation afin d'étudier plus finement la nocivité de ces 6 groupes de particules.

Classe I

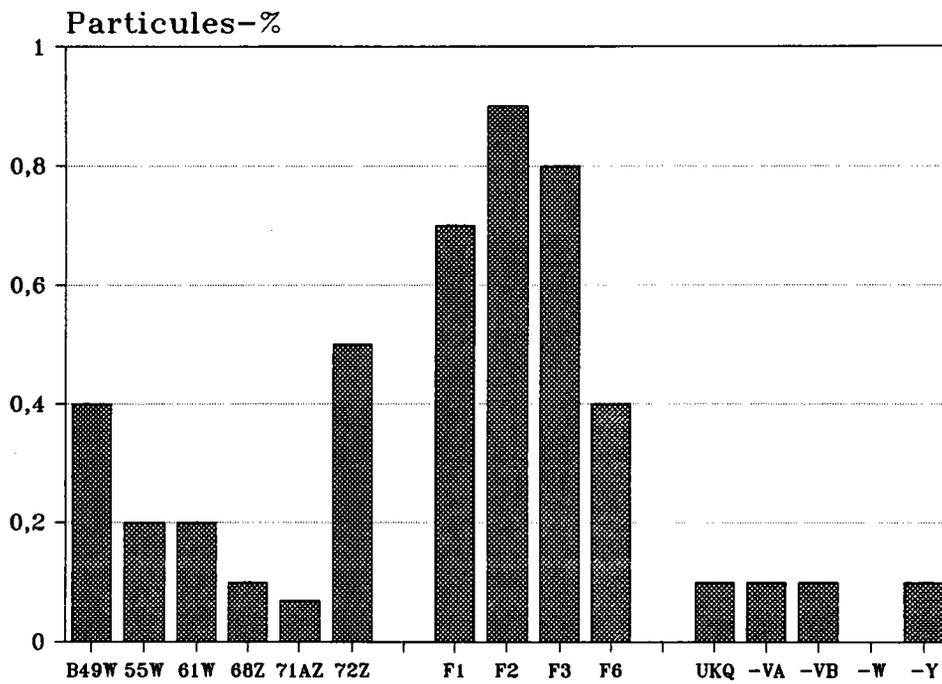


Figure 6.1: Incidence en particules de quartz "pur" de la classe I (15 poussières)

AlK

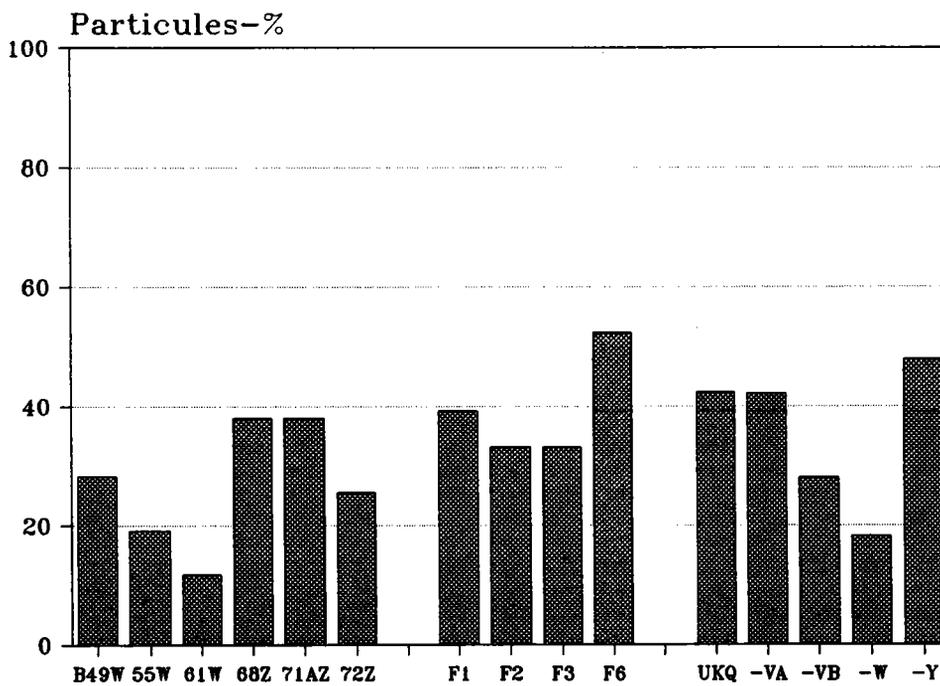


Figure 6.2: Incidence en particules à dominante AlK (15 poussières)

AlKFe

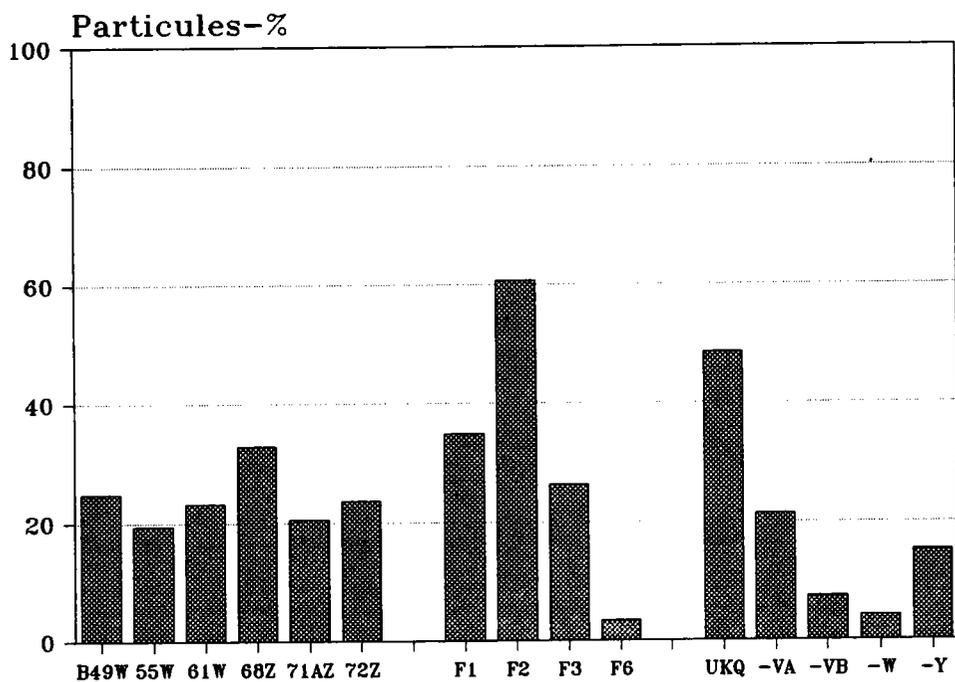


Figure 6.3: Incidence en particules à dominante AlKFe (15 poussières)

FeX

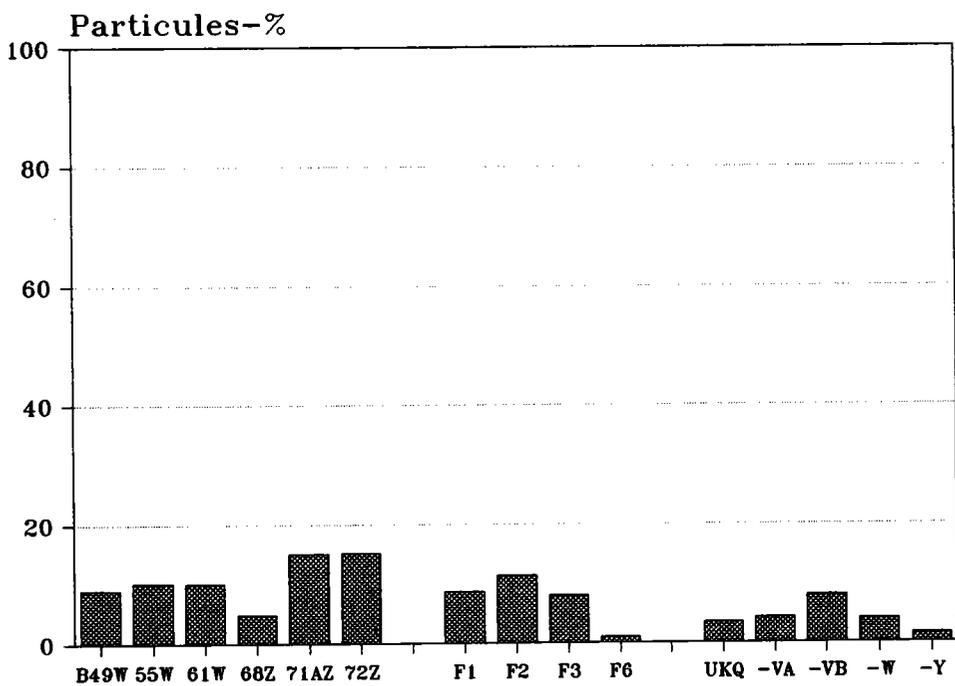


Figure 6.4: Incidence en particules à dominante FeX (X = Al/Mg/Ca) (15 poussières)

Mn

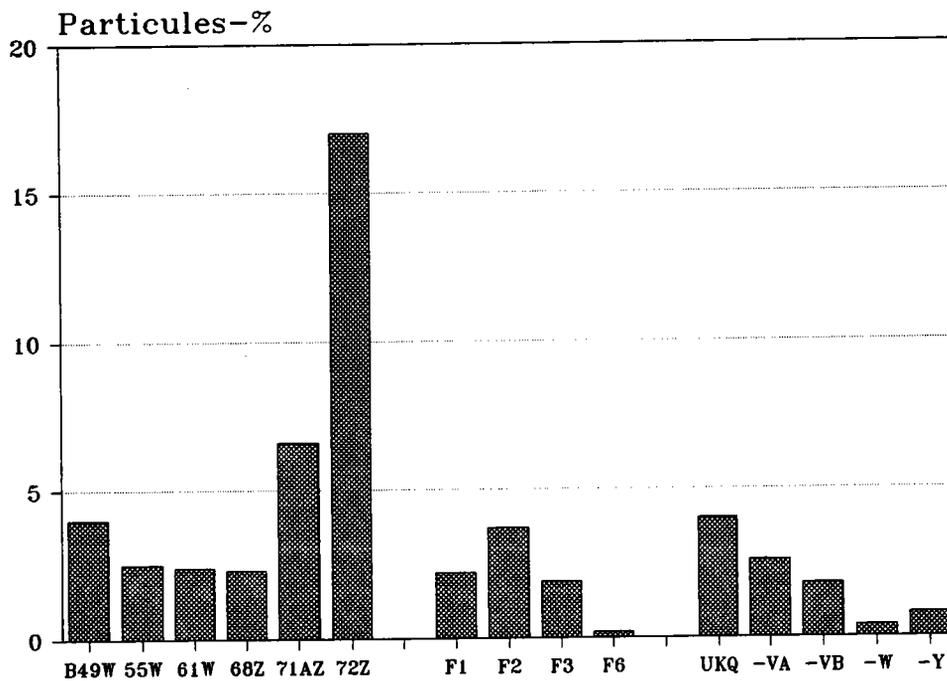


Figure 6.5: Incidence en particules contenant du manganèse (15 poussières)

Ca

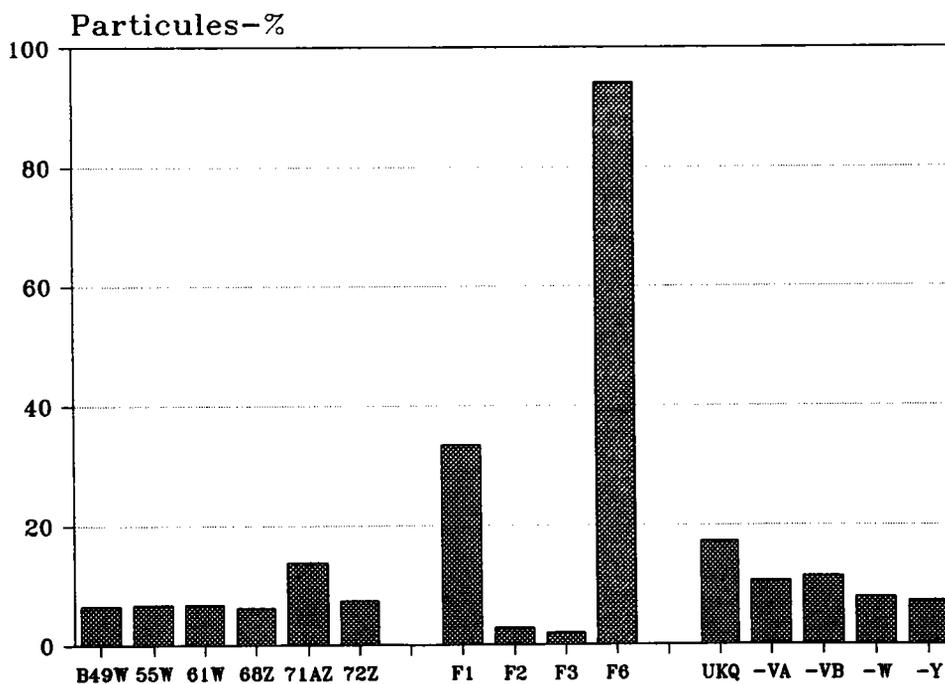


Figure 6.6: Incidence en particules contenant du calcium (15 poussières)

Tableau 6.5: Données quantitatives des tests *in vitro* (d'après Le Bouffant, 1987a)

	OXY	LAM	GAM	LDM	PAM	*VIA	*INC	*LAC	*GAC	*LDC	*PAC	*TTC
B49W	0.14	36.7	47.8	1.89	2.48	67.7	0.62	80.1	96.0	0.93	0.65	43
B55W	0.10	36.5	48.0	1.75	2.79	70.0	0.54	79.3	96.1	0.60	0.49	39
B61W	0.10	30.0	48.6	1.49	1.91	87.2	0.72	88.5	114.2	0.90	0.85	45
B68Z	0.25	34.6	51.4	2.26	4.00	76.3	0.58	83.0	85.9	0.59	0.63	49
B71AZ	0.21	34.7	50.4	2.26	3.46	80.5	0.52	81.8	87.8	0.79	0.73	23
B72Z	0.20	30.8	49.2	2.13	3.87	88.3	0.63	84.5	96.2	0.74	0.58	24
F1	0.11	35.0	47.7	1.99	2.51	69.0	0.63	83.5	108.9	0.63	0.65	28
F2	0.39	39.0	49.2	2.19	3.30	50.7	0.54	70.0	71.7	0.58	0.55	36
F3	0.12	35.4	43.0	1.77	1.75	78.7	0.71	79.8	120.3	0.79	0.89	34
F6	0.04	27.0	44.6	1.50	2.99	81.6	0.65	85.6	129.6	0.93	0.62	24
UKQ	0.40	32.3	57.3	2.59	4.08	73.6	0.57	88.7	89.8	0.59	0.59	39
UKVA	0.17	26.2	52.2	2.44	3.69	84.9	0.69	94.5	118.5	0.59	0.63	37
UKVB	0.06	19.3	50.8	1.46	1.60	92.9	0.82	100.8	137.6	0.69	0.67	32
UKW	0.11	21.1	52.2	1.89	3.24	92.6	0.78	100.0	125.2	0.59	0.72	39
UKY	0.13	17.2	51.6	1.44	1.52	95.9	0.80	104.9	135.7	0.80	0.73	35
Moy.	0.17	30.4	49.6	1.94	2.88	79.3	0.65	87.0	107.6	0.72	0.67	35
Min.	0.04	17.2	44.6	1.44	1.52	50.7	0.52	70.0	71.7	0.58	0.49	23
Max.	0.40	39.0	57.3	2.59	4.08	95.9	0.82	104.9	137.6	0.93	0.89	49

*Tests dont les résultats varient en sens inverse de la nocivité des poussières

Tableau 6.6: Données quantitatives des tests *in vivo* (d'après Le Bouffant, 1987a)

	SK6	LG6	COP	LIP	POU	LNQ	QTG	GAN	LNA	COG
B49W	1.55	2.22	1.1	2.0	33.7	72.9	10.8	61.4	13.6	0.57
B55W	0.94	2.22	0.8	1.1	24.6	20.4	26.0	32.5	9.7	0.39
B61W	0.63	2.04	0.6	0.8	18.9	19.5	19.6	96.9	15.2	1.25
B68Z	1.24	2.36	0.9	0.8	20.0	4.1	18.5	29.8	9.3	0.36
B71AZ	1.46	1.58	1.0	0.9	26.2	7.1	9.3	32.8	13.6	0.28
B72Z	1.21	2.47	0.8	1.5	26.2	55.1	44.8	111.1	24.6	1.43
F1	1.47	1.92	1.0	0.6	21.5	38.4	22.3	68.6	11.1	0.60
F2	4.21	2.39	1.5	1.4	27.5	96.0	16.4	46.4	18.2	0.52
F3	1.14	1.94	0.7	0.8	17.2	35.8	28.3	78.8	13.6	0.70
F6	0.52	2.01	1.2	1.1	19.4	1.8	6.0	51.9	5.7	0.30
UKQ	2.46	2.76	1.5	1.7	23.9	11.1	5.9	41.1	8.0	0.52
UKVA	2.14	1.95	1.1	1.8	32.9	34.1	11.6	62.0	8.7	0.80
UKVB	1.31	1.77	0.9	1.1	21.8	11.9	28.9	37.0	11.5	0.52
UKW	0.65	1.75	0.7	0.3	14.4	16.1	12.3	46.3	11.3	0.63
UKY	1.34	1.97	0.7	1.0	18.0	19.3	13.1	66.2	10.1	0.89
Moy.	1.48	2.09	1.0	1.1	21.7	29.6	18.3	57.5	12.3	0.65
Min.	0.52	1.58	0.6	0.3	14.4	1.8	5.9	32.5	5.7	0.28
Max.	4.21	2.76	1.5	2.0	33.7	96.0	44.8	111.1	24.6	1.43

Un premier examen de ces données quantitatives révèle cependant les divergences existant entre les différents tests. La poussière UKQ, par exemple, est la plus cytotoxique d'après les tests OXY, GAM, LDM ou PAM mais n'apparaît que très moyennement cytotoxique d'après le test LAM (tableau 6.5). La poussière B72Z, qui se distingue par sa nocivité d'après les 4 tests *in vivo* histologiques précédents, n'apparaît comme la plus nocive que pour les tests *in vivo* quantitatifs QTG, GAN, LNA et COG (4 tests sur 11, voir tableau 6.6).

Les corrélations significatives existant entre les résultats des tests quantitatifs *in vitro* ou *in vivo* et les données minéralogiques conventionnelles (teneurs en matière minérale, en quartz, en kaolinite et en micas) sont données dans le tableau 6.7. Il y apparaît que la teneur en matière minérale et la composition minéralogique des poussières n'influencent pas les résultats de certains tests (par exemple GAM, LDC, POU, QTG...). La famille des tests *in vivo* ganglionnaires semble particulièrement indépendante de la teneur totale en matière minérale et de la composition minéralogique des poussières.

Pour d'autres tests, au contraire, elles représentent des facteurs déterminants (OXY, LDM, SK6...). Il faut cependant constater qu'il est impossible de discerner le constituant minéralogique le plus influant. En effet, les tests qui révèlent une corrélation avec la teneur en matière minérale expriment, d'une manière générale, une corrélation simultanée avec la teneur de la plupart ou de tous les minéraux dosés. Ce comportement indique évidemment que les teneurs en matière minérale et en minéraux dosés sont étroitement corrélées deux-à-deux comme le montre la matrice de corrélation du tableau 6.8 ($p < 0.01$). Il faut donc conclure que les analyses conventionnelles montrent uniquement (et une nouvelle fois) que "tout ce qui n'est pas du charbon dans les poussières de mine paraît également nocif". Il reste à mentionner que ces résultats, empruntés à la littérature et basés sur 15 poussières, sont en accord avec ceux obtenus sur les 23 poussières de l'étude communautaire (Le Bouffant, 1987a).

La matrice de corrélation obtenue pour les résultats d'analyses LAMMA est présentée dans le tableau 6.9. Il y apparaît très clairement que les corrélations deux-à-deux des incidences des 6 groupes de particules n'atteignent aucunement la significativité précédemment mentionnée pour les résultats d'analyses conventionnelles. Seules les incidences en particules contenant du manganèse et celles de combinaison FeX semblent dépendantes ($r = 0.68$, $p < 0.01$). Ces observations laissent entrevoir des perspectives intéressantes quant à l'étude des corrélations potentielles entre les résultats des tests quantitatifs *in vitro* ou *in vivo* et les données d'analyses LAMMA.

Tableau 6.7: Corrélations significatives ($p < 0.05$) entre les données minéralogiques des poussières et les résultats des tests *in vitro* et *in vivo* (d'après Le Bouffant, 1987a)

		%M.M.	%Quartz	%Kaolin.	%Mica
Tests <i>in vitro</i>	OXY	0.89	0.74	0.86	0.83
	LAM	0.54	0.60		0.60
	GAM				
	LDM	0.71	0.55	0.77	0.68
	PAM	0.57		0.52	
	*VIA	-0.71	-0.61	-0.54	-0.64
	*INC	-0.68	-0.59	-0.52	-0.64
	*LAC	-0.54	-0.65		-0.56
	*GAC	-0.75	-0.78	-0.62	-0.85
	*LDC				
	*PAC				
	*TTC				
Tests <i>in vivo</i> pulmonaires	SK6	0.84	0.70	0.77	0.75
	LG6	0.59	0.58	0.66	
	COP	0.86		0.71	
	LIP			0.58	
	POU				
Tests <i>in vivo</i> ganglionnaires	LNQ		0.70		0.52
	QTG				
	LNG				
	GAN				
	LNA		0.62		
	COG				

p < 0.05 **p < 0.01**

*Tests *in vitro* dont les résultats varient en sens inverse de la nocivité des poussières

Tableau 6.8: Matrice de corrélation des données minéralogiques
(d'après Le Bouffant, 1987a)

	%M.M.	%Quartz	%Kaolin.	%Micas
%M.M.	1.00			
%Quartz	0.77	1.00		
%Kaolin	0.85	0.71	1.00	
%Mica	0.82	0.88	0.73	1.00

Tableau 6.9: Matrice de corrélation des données d'analyses LAMMA

	Classe I	AlK	AlKFe	FeX	Mn	Ca
Classe I	1.00					
AlK	0.06	1.00				
AlKFe	0.50	0.09	1.00			
FeX	0.33	-0.51	0.26	1.00		
Mn	0.17	-0.18	0.19	0.68	1.00	
Ca	0.08	0.54	-0.32	-0.40	-0.23	1.00

Les corrélations significatives entre les incidences LAMMA et les résultats des tests quantitatifs sont présentées dans le tableau 6.10. On peut d'emblée remarquer que certains tests ne dépendent de l'incidence d'aucun type de particules. Certains de ces tests (LDC, PAC, TTC, LIP, POU, GAN) étaient déjà indépendants de la teneur totale en matière minérale ou de celles des minéraux dosés par les méthodes conventionnelles (voir tableau 6.7).

Certains des résultats du tableau 6.10 nécessitent une discussion préliminaire qui, ne concernant pas notre objectif principal, ne sera plus abordée ultérieurement. Ainsi, l'absence de corrélation entre les résultats du test TTC et l'incidence des particules à dominante AlKFe est, à première vue, en forte contradiction avec les résultats obtenus au chapitre 5 (voir la discussion concernant les particules de nature similaire des groupes 2 et 5 du chapitre précédent). Il faut toutefois remarquer qu'il n'existe pas dans la présente étude (et contrairement au précédent chapitre) de corrélation entre les résultats du test TTC et la teneur totale en matière minérale des échantillons (voir tableau 6.7). L'existence de ce lien était décisive quant à l'approche méthodologique développée au chapitre 5.

On remarquera également, dans le tableau 6.10, que toutes les corrélations (positives ou négatives) varient dans le sens espéré de la nocivité des poussières, exception faite du test GAM ($r = -0.63$). La corrélation négative existant entre les résultats du test GAM et l'incidence des particules de la classe I peut être considérée comme une observation *a priori* douteuse.

L'ensemble des résultats plus vraisemblables fournit, par contre, un cortège d'éléments permettant d'atteindre l'objectif fixé par la présente étude. Le tableau 6.10 permet en effet d'observer que:

- 3 tests *in vitro* sur 12 (excepté le test GAM) répondent à la présence des particules de quartz pur de la classe I. L'existence d'une telle corrélation ($r = 0.71$) n'apparaît que pour le seul test *in vivo* LNQ (1 test sur 11).
- la réponse des tests *in vitro* semblent spécifique à la présence du fer des particules à dominante FeX et, de manière bien plus significative (7 tests sur 12), aux contaminations des argiles par le fer (particules à dominante AlKFe).

- aucun des 23 tests quantitatifs ne révèle de corrélations avec les incidences des particules à dominante AIK ou des particules contenant du calcium. Ces particules apparaissent comme inertes.

- aucun des 12 tests *in vitro* ou des 5 tests *in vivo* pulmonaires ne dévoilent de corrélation avec l'incidence des particules contenant du manganèse. Seuls quelques tests ganglionnaires (4 tests sur 6) montrent l'existence d'un tel lien.

- les tests *in vivo* ganglionnaires semblent plus particulièrement répondre à la présence des particules à dominante FeX qu'à dominante AIKFe (4 tests sur 5, exception faite du test LNQ).

- la réponse des tests *in vivo* pulmonaires SK6, LG6 et COP (3 tests sur 5) apparaît exclusivement liée aux contaminations des argiles par le fer (particules à dominante AIKFe).

La significativité des corrélations obtenues dans le cas des tests *in vitro* pour ces mêmes particules à dominante AIKFe (tests avec $p < 0.01$) est un critère additionnel montrant l'existence d'une similitude entre les tests *in vivo* pulmonaires et les tests *in vitro*. La contamination des argiles par le fer plutôt que la présence de particules à dominante FeX semble donc gouverner, tel un dénominateur commun, la réponse de ces 2 familles de tests.

On peut donc conclure, d'après les résultats d'analyse LAMMA, qu'il existe 3 noyaux de tests de nocivité (répondant à différents types de particules):

- les tests *in vitro* (particules à dominante AIKFe et/ou de la classe I),
- les tests *in vivo* pulmonaires (particules à dominante AIKFe)
- et les tests *in vivo* ganglionnaires (particules à dominante FeX et/ou Mn).

Les résultats des tests *in vitro* sont plus proches des résultats des tests *in vivo* pulmonaires que de ceux des tests *in vivo* ganglionnaires. En effet, ces derniers ne répondent pas à la présence des particules à dominante AIKFe. Seul le test *in vivo* ganglionnaire LNQ semble à cet égard présenter un caractère intermédiaire. Il s'agit également du seul test ganglionnaire répondant à la présence des particules de la classe I.

Tableau 6.10: Corrélations significatives ($p < 0.05$) entre les résultats d'analyses LAMMA et les résultats des tests *in vitro* et *in vivo*

		Classe I	AlK	AlKFe	FeX	Mn	Ca
Tests <i>in vitro</i>	OXY			0.86			
	LAM	0.56		0.67	0.53		
	GAM	-0.63					
	LDM			0.61			
	PAM						
	*VIA	-0.62		-0.77			
	*INC			-0.60			
	*LAC	-0.67		-0.62	-0.54		
	*GAC			-0.77	-0.53		
	*LDC						
	*PAC						
	*TTC						
Tests <i>in vivo</i> pulmonaires	SK6			0.82			
	LG6			0.65			
	COP			0.61			
	LIP						
	POU						
Tests <i>in vivo</i> ganglionnaires	LNQ	0.71		0.56			
	QTG				0.56	0.59	
	LNG				0.72	0.79	
	GAN						
	LNA				0.79	0.79	
	COG					0.52	

$p < 0.05$ $p < 0.01$

*Tests *in vitro* dont les résultats varient en sens inverse de la nocivité des poussières

Cette discrimination entre les différents tests, basée sur des corrélations entre les résultats d'analyses LAMMA et les résultats des tests de nocivité, masque évidemment l'existence d'inter-corrélations entre les résultats des tests similaires. Une vérification concernant ce point permettra également de montrer que nos conclusions, basées sur l'étude de 15 poussières, sont en accord avec celles de l'étude communautaire consacrée à 23 poussières.

Les corrélations obtenues d'une part entre les résultats des tests *in vitro* et, d'autre part, ceux des tests *in vivo* pulmonaires et ganglionnaires (tableau 6.11) dévoilent le caractère voisin des tests *in vitro* et des tests *in vivo* pulmonaires. Le caractère intermédiaire du test ganglionnaire LNQ est indiqué par l'existence des corrélations avec les résultats des tests *in vitro* VIA et LAC.

La matrice de corrélation obtenue entre les résultats des tests *in vivo* pulmonaires et ganglionnaires (tableau 6.12) met en exergue les dissemblances entre ces tests. Elle souligne le caractère particulier du test LNQ qui représente le seul test ganglionnaire en corrélation avec les tests pulmonaires SK6 et POU.

Les corrélations observées entre les résultats des différents tests *in vitro* ne seront pas amplement interprétées; elles sont présentées dans le tableau 6.13 par souci d'exhaustivité. On se contentera de noter que les tests LAM et LAC fournissent les résultats les plus intimement corrélés ($r = - 0.96$, $p < 0.0001$) et que ces deux tests sont les seuls qui révèlent l'existence de corrélations pour 3 critères d'analyse LAMMA (particules de la classe I et particules à dominantes AIKFe et FeX, voir tableau 6.10).

Tableau 6.11: Corrélations significatives ($p < 0.05$) entre tests *in vitro* et tests *in vivo* quantitatifs (d'après Le Bouffant, 1987a)

		Tests <i>in vitro</i>											
		OXY	LAM	GAM	LDM	PAM	*VIA	*INC	*LAC	*GAC	*LDC	*PAC	*TTC
Tests <i>in vivo</i> pulmonaires	SK6	0.81			0.56		-0.66			-0.58			
	LG6	0.67							-0.57		-0.53		
	COP	0.67			0.57		-0.65	-0.55				-0.56	
	LIP												
	POU												
Tests <i>in vivo</i> ganglionnaires	LNQ						-0.61		-0.52				
	QTG												
	LNG												
	GAN												
	LNA												
	COG												

*Tests dont les résultats varient en sens inverse de la nocivité des poussières

Tableau 6.12: Corrélations significatives ($p < 0.05$) entre résultats des tests *in vivo* quantitatifs (d'après Le Bouffant, 1987a)

		Tests <i>in vivo</i> pulmonaires					Tests <i>in vivo</i> ganglionnaires					
		SK6	LG6	COP	LIP	POU	LNQ	QTG	LNG	GAN	LNA	COG
Tests <i>in vivo</i> pulmonaires	SK6	1.00										
	LG6		1.00									
	COP	0.75		1.00								
	LIP		0.54	0.58	1.00							
	POU				0.85	1.00						
Tests <i>in vivo</i> ganglionnaires	LNQ	0.64				0.55	1.00					
	QTG							1.00				
	LNG						0.53	0.67	1.00			
	GAN								0.64	1.00		
	LNA						0.63	0.67	0.86	0.61	1.00	
	COG							0.54	0.65	0.91	0.64	1.00

Tableau 6.13: Corrélations significatives ($p < 0.05$) entre résultats des tests *in vitro*
(d'après Le Bouffant, 1987a)

	OXY	LAM	GAM	LDM	PAM	*VIA	*INC	*LAC	*GAC	*LDC	*PAC	*TTC
OXY	1.00											
LAM		1.00										
GAM	0.55		1.00									
LDM	0.78		0.53	1.00								
PAM	0.63			0.85	1.00							
*VIA	-0.54	-0.85				1.00						
*INC	-0.58	-0.85		-0.62	-0.63	0.76	1.00					
*LAC		-0.96				0.86	0.82	1.00				
*GAC	-0.77	-0.83		-0.69	-0.63	0.76	0.90	0.78	1.00			
*LDC			-0.54	-0.57						1.00		
*PAC					-0.56		0.53				1.00	
*TTC												1.00

*Tests dont les résultats varient en sens inverse de la nocivité des poussières

6.3) Discussion

La discrimination entre les différents tests observée à partir des résultats d'analyses LAMMA est en parfait accord avec les conclusions de l'analyse statistique des résultats de l'étude communautaire. Cette étude n'avait cependant pas permis d'identifier, grâce aux méthodes analytiques conventionnelles, des constituants minéralogiques capables d'expliquer les différences ou similitudes entre tests. Notre étude LAMMA, basée sur la détermination de l'incidence d'éléments ou de combinaisons d'éléments, permet de proposer des paramètres plus ou moins spécifiques à chaque famille de tests.

Les résultats des tests *in vitro* semblent ainsi dépendre de l'incidence en particules de quartz "pur" (classe I) et, de manière plus significative et similaire aux tests *in vivo* pulmonaires, de l'incidence des particules argileuses contaminées par le fer (combinaison AlKFe). La présence des particules à dominante FeX et/ou des particules contenant du manganèse semble influencer les résultats des tests *in vivo* ganglionnaires. Seul le test ganglionnaire LNQ semble occuper une place intermédiaire entre les 3 noyaux de tests.

Il est remarquable d'observer, sur un ensemble de 27 tests de nocivité, que seuls 4 tests (LAM, VIA, LAC et LNQ) sont en corrélation avec l'incidence des particules de quartz "pur" de la classe I (exception faite de la corrélation négative observée pour le test GAM). La présente étude permet donc à nouveau d'émettre un doute quant au potentiel nocif attribuable au quartz des poussières de mines. On pourra, à ce titre, se référer à l'absence de corrélation existant pour les 2 poussières britanniques du chapitre 4 ou les 6 échantillons du chapitre 5.

Ces observations mettent l'accent sur l'urgente nécessité à identifier, au sein de la matière minérale des poussières de mine, des paramètres de nocivité indépendants du quartz. Les résultats suggèrent à nouveau d'attribuer une nocivité propre aux particules contenant du fer et/ou des métaux lourds (manganèse).

Une prudence s'impose cependant quant aux corrélations observées entre les résultats des tests ganglionnaires et l'incidence du manganèse car les coefficients de corrélation cachent en fait une courbe de régression obtenue sur 2 points. La figure 6.7 illustre de telles corrélations pour les tests LNG ou LNA ($r = 0.79$). Le premier point reflète la richesse exceptionnelle en manganèse de l'échantillon B72Z; l'autre point se traduit par le centre de gravité du nuage de points représentant les 14 autres poussières à faibles incidences de manganèse.

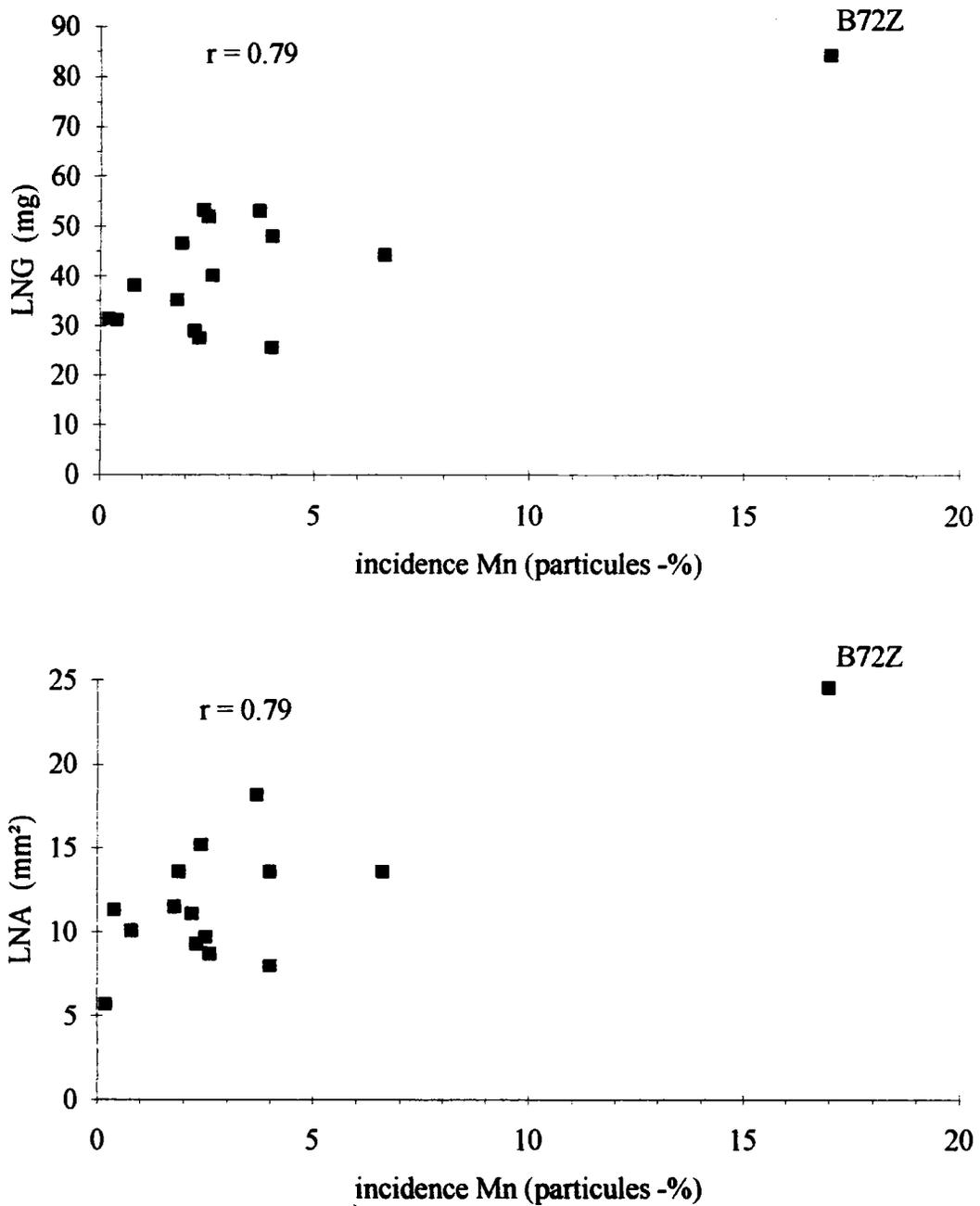


Figure 6.7: Exemples de corrélations entre l'incidence du manganèse et les résultats du test LNG (*Haut*) ou du test LNA (*bas*)

De plus, l'inter-corrélation existant entre les incidences du manganèse et celles particules à dominante FeX ($r = 0.68$, voir tableau 6.9) ne nous autorise à attribuer à la réponse au manganèse des tests ganglionnaires qu'une apparente spécificité.

Ces limitations nous incitent malgré tout à retenir le manganèse comme un candidat potentiellement toxique. Il convient d'abord de rappeler que les tests *in vivo* histologiques (tests qualitatifs) suggèrent d'attribuer un rôle particulier à cet élément car ils dévoilent la fibrogénicité exceptionnelle de la poussière B72Z. On rappellera, à ce titre, que ni la teneur en quartz, ni la teneur en matière minérale ne caractérisent cette poussière dont le seul trait distinctif est, parmi les 6 critères d'analyses LAMMA, une richesse inhabituelle en manganèse. La littérature ne fournit pas d'informations particulières sur le potentiel fibrogène de cet élément et ne permet pas d'avancer l'ébauche d'une explication quant à l'apparente spécificité de la réponse des tests ganglionnaires au manganèse.

Les résultats de cette étude proposent d'attribuer, de manière moins ambiguë, un potentiel nocif au fer des poussières de mines détecté dans les particules à dominantes AlKFe et/ou FeX. En effet, les corrélations obtenues pour ces 2 types de particules, illustrées à titre d'exemple pour les tests GAC ($r = -0.77$) et LNA ($r = 0.79$) (voir figure 6.8) ne dévoilent pas de corrélations biaisées par l'assymétrie des nuages de points. Il reste cependant impossible d'expliquer, à partir de nos résultats ou de la littérature, la réponse plus spécifique d'une part des tests *in vitro* et *in vivo* pulmonaires à la combinaison d'éléments AlKFe et, d'autre part, celle des tests *in vivo* ganglionnaires à la combinaison FeX.

Le caractère particulier des résultats du test ganglionnaire LNQ reste également inexplicable. On pourra toutefois noter que ce test représente le seul test *in vivo* en corrélation avec l'incidence des particules de quartz "pur" de la classe I. On peut, à ce titre, rappeler que ce test, consacré à la quantification des "Quartz-Typical-Area" (QTA) ganglionnaires, est doué d'une relative spécificité au quartz. Il subsiste cependant une ambiguïté quant aux résultats du test similaire QTG (QTA ganglionnaires rapporté à la section des ganglions) qui n'expriment pas cette corrélation.

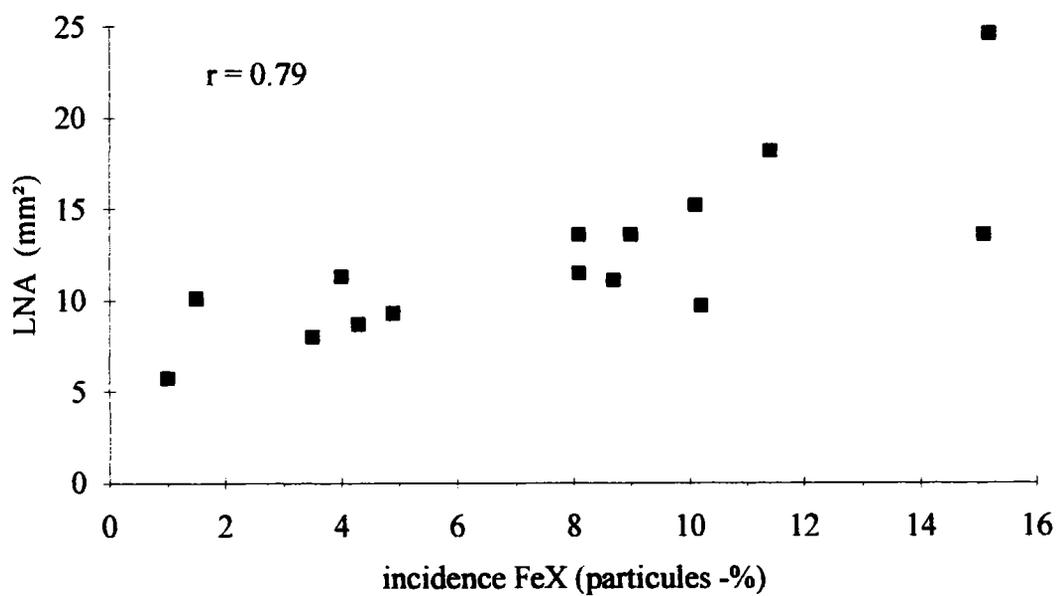
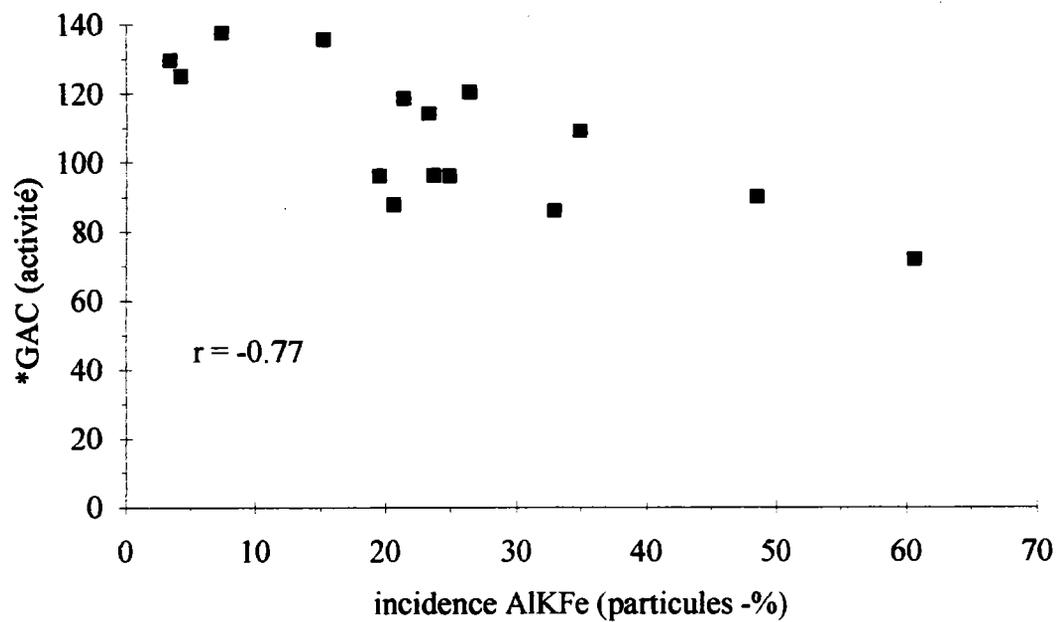


Figure 6.8: Exemples de corrélations entre l'incidence des particules à dominante AlKFe et les résultats du test GAC (*haut*) ou entre l'incidence des particules à dominante FeX et les résultats du test LNA (*bas*)

L'étude fournit, par contre, un ensemble d'indices concernant le rôle étiopathogénique du fer qui sera plus amplement abordé dans la discussion générale (chapitre 8) et dans l'approche étiopathogénique des résultats (chapitre 9). On se contentera, à ce stade de la discussion, de remarquer l'absence de toute corrélation entre la nocivité (quelque soit le test) et l'incidence des particules à combinaison AIK. Cette observation indique très probablement que les particules argileuses ne sont pas nocives tant qu'elles ne sont pas contaminées par le fer (cas de la combinaison AIKFe).

La discussion, dans un cadre épidémiologique, des résultats de la présente étude sera limitée car il faut déplorer les divergences, voire les contradictions flagrantes, observées entre les résultats des tests de nocivité de l'étude communautaire et les données épidémiologiques. Ces contradictions se traduisent ainsi dans la présente étude au niveau, par exemple, de la fibrogénicité (déterminée par les tests *in vivo* histologiques qualitatifs) des échantillons suivants (d'après Le Bouffant, 1987a):

- la poussière B72Z (riche en manganèse et exceptionnellement fibrogène) prélevée dans une mine du siège Z à risque moins élevé (pour des niveaux d'empoussiérage comparables) que celui du siège W (cas des poussières B49W, B55W et B61W),

- la poussière F2 (riche en particules à dominante AIKFe et nettement fibrogène) prélevée dans le bassin lorrain à risque moindre que celui de la poussière F1 (peu fibrogène, Nord-Pas de Calais) et très nettement inférieur à celui de la poussière F3 peu fibrogène prélevée en Auvergne (avec, entre les différents bassins, des gisements de charbon et des méthodes d'exploitation très diverses et des conditions d'empoussiérage inconnues),

- les poussières peu fibrogènes prélevées dans le Pays de Galles (UKW, UKVA et UKVB) où la prévalence des pneumoconioses est (pour un empoussiérage moindre) plus élevée que dans le comté de Nottingham (cas de la poussière UKQ riche en particules à dominante AIKFe et nettement fibrogène).

Il apparaît d'emblée que l'absence de données homogènes quant à l'empoussiérage rend délicate la confrontation des données épidémiologiques avec la nocivité ou la composition minéralogique des poussières. De plus, les disparités des méthodes d'évaluation du risque entre les pays concernés limitent la confrontation aux sous-ensembles de chaque pays.

D'autres raisons ont été évoquées dans le rapport communautaire pour expliquer l'aspect aléatoire des résultats de l'étude: manque de représentativité des poussières prélevées (composition et granulométrie), teneur en matière minérale et composition minéralogique variables durant l'exposition des mineurs, différences entre les gisements et rangs des charbons exploités ...

Il nous paraît impératif d'ajouter un facteur dont l'influence n'a pas été abordée dans le rapport de la recherche communautaire. Rappelons d'abord que le paramètre gouvernant la nocivité expérimentale des poussières de mines est, contrairement au rang du charbon, la teneur en matière minérale. Il faut donc déplorer, pour les 23 échantillons de l'étude communautaire, que seuls les échantillons F2 (Lorraine) et UKQ (comté de Nottingham) soient enrichis en matière minérale (> 70%).

On peut supposer, par exemple, qu'une poussière du Nord-Pas de Calais à teneur en matière minérale similaire à celle de la poussière de Lorraine F2 (73% de matière minérale et très nocive) exprimerait très probablement une nocivité différente de celle de la poussière F1 (Nord-Pas de Calais, moins de 50% de matière minérale et modérément nocive). La nocivité de cette poussière du Nord-Pas de Calais pourrait même être supérieure à celle de la poussière lorraine de la présente étude.

D'un point de vue analytique également, l'étude d'une poussière riche en matière minérale prélevée, par exemple, dans une mine du siège Z (origine de la poussière B72Z) permettrait de caractériser la nature et la physico-chimie des minéraux chargés de manganèse.

Le choix et l'étude LAMMA de tels échantillons riches en matière minérale s'étaient avérés particulièrement fructueux dans le cas des échantillons de la Saar, de la Ruhr, d'Ecosse et du comté de Nottingham (voir chapitre 4). Cette approche avait permis d'identifier des paramètres de nocivité spécifique, c'est-à-dire propre à la matière minérale des différents bassins, en accord avec la géologie des gisements, en corrélation avec les données de nocivité expérimentale et, avant tout, avec les données épidémiologiques.

En résumé, il faut donc retenir que la présente étude LAMMA apporte des informations qui s'accordent avec la nocivité expérimentale des poussières, mais sans aucune spécificité d'ordre épidémiologique. Cette approche permet, contrairement aux méthodes analytiques conventionnelles, de mettre en évidence des paramètres physico-chimiques pouvant expliquer la similitude des différentes familles de tests de nocivité expérimentale.

Même ainsi limités à la notion de nocivité expérimentale, les résultats obtenus suffisent à ouvrir des perspectives nouvelles quant aux approches de validation des tests de nocivité *in vitro* ou *in vivo*, voire des mécanismes de pathogénèse. Ces aspects seront développés ultérieurement (chapitres 9 et 10).



CHAPITRE 7

Etude de poussières recueillies sur poumons de mineur de charbon

Les analyses LAMMA des précédents chapitres ont montré que les poussières de mines contiennent généralement moins de 2% de particules de quartz "pur" de la classe I. Des incidences comparables ont été observées pour les poussières riches en quartz dont la teneur en quartz varie de 15 à 26% (chapitre 4). La majorité de la surface du quartz des poussières de mines de charbon semble donc contaminée par de l'aluminium ou masquée par les argiles inhibant la nocivité propre au quartz.

Il n'existe pas dans la littérature de données sur la stabilité des contaminations superficielles du quartz lors d'un contact prolongé avec les tissus pulmonaires. Nous avons donc choisi d'étudier la biopersistence à long-terme de ces contaminations en analysant des poussières récupérées par digestion *post-mortem* de poumons de mineurs de charbon décédés avec des pneumoconioses variant de la pneumoconiose simple à la FMP.

L'objectif de l'étude consiste à vérifier si les poussières ainsi récupérées sont enrichies en particules de quartz "pur" et/ou s'il existe une corrélation entre l'incidence de telles particules et la gravité de la pneumoconiose. On examinera également les corrélations avec les incidences des éléments majeurs (Na, Mg, Al, Si, K, Ca, Ti, Fe).

7.1) Partie expérimentale

La digestion des tissus pulmonaires et la récupération des poussières ont été effectuées à l'Institut d'Hygiène et de Médecine du Travail de l'Université d'Aix-La-Chapelle (Prof. Dr. H.J. Einbrodt) par la méthode de digestion au formamide (72 heures, 135 °C). Celle-ci, effectuée en milieu neutre et non-aqueux, évite les altérations de la matière minérale et organique des charbons (Thomas and Stegemann, 1954; Otto and Winzer, 1957). Les poussières sont récupérées par filtration puis lavées à l'eau distillée.

Les 11 poussières étudiées ont été recueillies sur 11 mineurs de la Ruhr décédés entre les années 1950 et 1963 avec des degrés de pneumoconiose variés. Ceux-ci, déterminés à l'autopsie, se réfèrent aux critères anatomo-pathologiques variant de la fibrose diffuse ou micronodulaire de la pneumoconiose simple (+), la fibrose nodulaire (++) pour atteindre les lésions nodulaires et massives propres à la FMP (+++) (Einbrodt, communication personnelle, voir également Worth et al., 1968).

Les poussières récupérées se rapportent aux poussières accumulées dans l'alvéole et l'interstitium des poumons car les ganglions lymphatiques régionaux ont été isolés avant la digestion des poumons. Le degré de pneumoconiose et la durée de l'exposition des mineurs, la teneur en poussières de leur poumons et les teneurs en cendres et en quartz des poussières récupérées sont données dans le tableau 7.1 (d'après Einbrodt). L'intervalle entre le début de l'exposition et l'âge au décès montre que les poussières ont séjourné jusqu'à 40 ou 50 ans dans les tissus pulmonaires des mineurs.

Tableau 7.1: Données anatomo-pathologiques, d'exposition et de dose*, teneurs en cendres et en quartz des poussières récupérées sur poumons de mineurs de charbon

Echantillon	Fibrose	Exposition (années)	%Poussières*	%Cendres	%Quartz
L38	+	16.0	14.6	16.0-24.0	4.3
L42	+	18.0	17.8	17.0	3.6
L118	+	25.0	5.4	33.0-38.0	5.0
L214	+	?	16.2	15.0	1.8-3.4
L215	+	19.5	9.4	25.0-30.0	2.5-4.2
L52	++	30.0	5.4	38.0	6.2
L246	++	?	40.2	10.0-12.0	0.5-2.0
L223	+++	43.0	10.7	54.0	1.0-9.0
L236	+++	?	29.6	24.0-27.0	3.4-5.4
L237	+++	23.5	18.2	16.0-18.0	2.0-3.0
L239	+++	22.0	5.1	65.0	33.0

(*) poids de poussières en % du poids de poumons secs sans poussières

Les analyses LAMMA (400-450 particules/échantillon) ont été effectuées à 30% de transmission laser sur des particules de tailles voisines du maximum de distribution granulométrique (0.5-1.5 μm). Le passé professionnel de certains mineurs (durée d'exposition et mines d'emploi) n'a pas pu être retracé d'après les archives médico-légales. Il était donc difficile de choisir des poussières servant de référence à celles de l'exposition. Des données comparatives d'incidences des éléments majeurs seront cependant discutées.

Elles se rapportent aux incidences moyennes obtenues sur 10 poussières analysées dans les mêmes conditions analytiques (100 particules/échantillon) qui ont été sélectionnées parmi les échantillons de l'étude de Reisner et Robock (chapitre 5) selon les critères suivants:

- échantillonnage vers la fin des années 1960 dans 5 horizons stratigraphiques du bassin de la Ruhr (Horster, Obere/Untere Essener, Obere/Untere Bochumer) dont le rang du charbon exploité varie des charbons flambants aux charbons gras à courte flamme,
- choix de 2 échantillons/horizon de teneurs en cendres extrêmement variables permettant ainsi aux poussières de référence de couvrir un domaine de teneurs en cendres variant de 10 à 60%.

7.2) Résultats

Les incidences en particules de quartz "pur" (classe I) sont données pour les 11 échantillons dans la figure 7.1. Il n'apparaît pas de corrélation avec le degré de pneumoconiose des mineurs. Aucune des incidences en particules de quartz "pur" ne dépasse 1.5 particules-%. L'échantillon L239, malgré sa richesse en quartz (33%, voir tableau 7.1), ne fait pas exception. Les incidences sont donc comparables à celles obtenues pour les poussières prélevées dans les mines de charbon étudiées jusqu'à présent (< 2 particules-%).

On peut conclure que le contact à long-terme des poussières avec les tissus pulmonaires n'affectent pas la stabilité des contaminations de surface du quartz et que les données anatomo-pathologiques ne s'expliquent pas par la présence des particules de quartz "pur". Il semble donc nécessaire de chercher d'autres paramètres des poussières pouvant être mis en relation avec le degré de pneumoconiose.

Les incidences en éléments majeurs (d'intensité codées "1" ou "10") ne présentent pas de corrélation pour le silicium (figure 7.2), le magnésium (figure 7.3), le sodium (figure 7.4) ou le titane (figure 7.5). Ces incidences sont également comparables à celles obtenues pour les poussières servant de référence. Seuls les échantillons L223 et L239 riches en cendres (teneur > 50%, voir tableau 7.1) sont, comparativement aux poussières de référence ou aux autres poussières récupérées sur poumons, enrichies en magnésium (figure 7.3) (ou en silicium pour la poussière L239, voir figure 7.2).

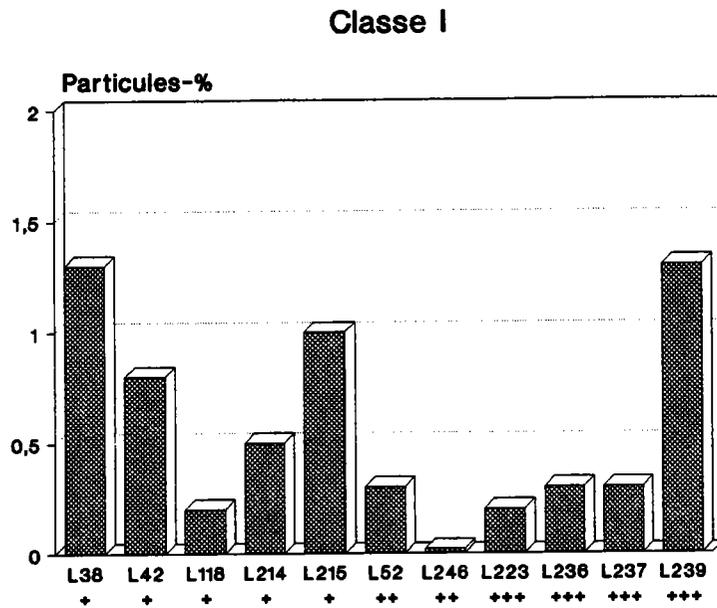


Figure 7.1: Incidence en particules de quartz "pur" (classe I) des 11 poussières recueillies sur poumons de mineurs de charbon

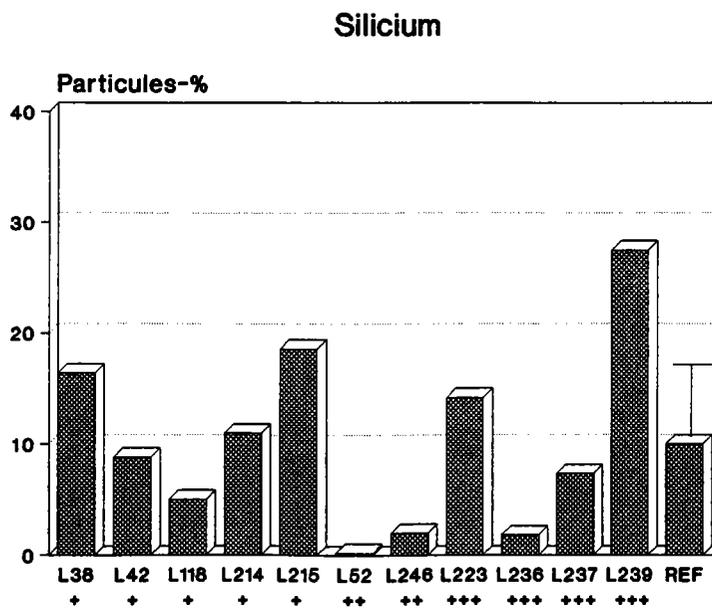


Figure 7.2: Incidence du silicium pour les 11 poussières recueillies sur poumons et les 10 poussières de référence (moy. $\pm \sigma$)

Magnesium

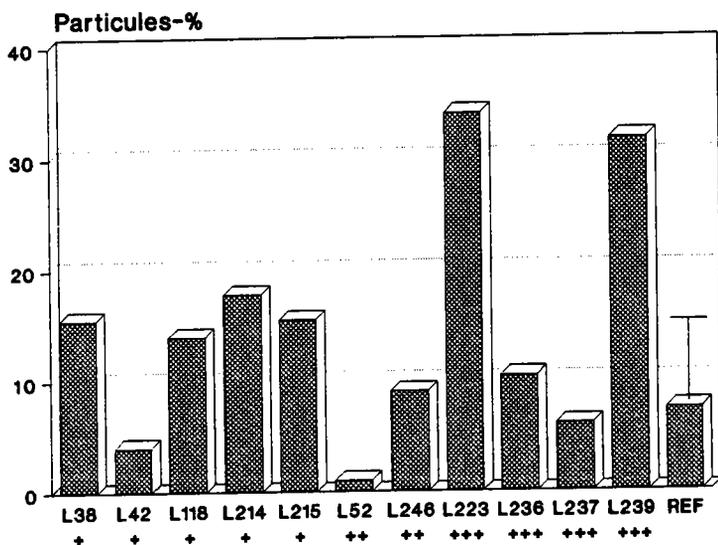


Figure 7.3: Incidence du magnésium pour les 11 poussières recueillies sur poumons et les 10 poussières de référence (moy. $\pm \sigma$)

Sodium

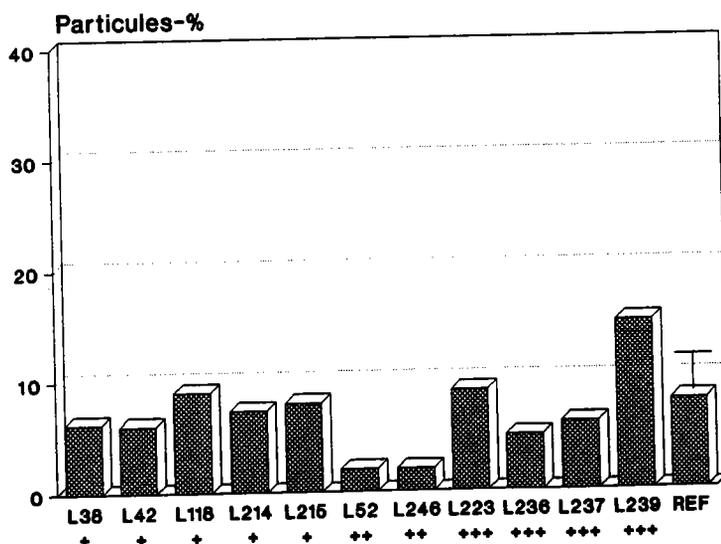


Figure 7.4: Incidence du sodium pour les 11 poussières recueillies sur poumons et les 10 poussières de référence (moy. $\pm \sigma$)

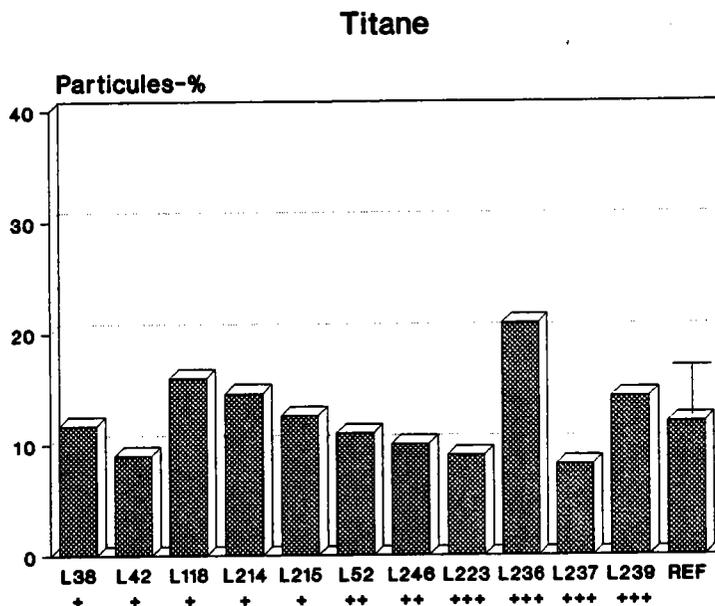


Figure 7.5: Incidence du titane pour les 11 poussières recueillies sur poumons et les 10 poussières de référence (moy. $\pm \sigma$)

Les incidences en éléments marqueurs des aluminosilicates tels que l'aluminium (figure 7.6) et le potassium (figure 7.7) ne présentent pas de corrélation avec le degré de pneumoconiose. Elles sont également comparables à celles des poussières de référence.

Il apparaît par contre que les poussières récupérées sur poumons sont, comparativement aux poussières de référence, enrichies en calcium (figure 7.8) mais indépendamment de la gravité de la pathologie.

Ce calcium additionnel reflète les microcalcifications bien connues, d'origine endogène et intra-cellulaire, qui apparaissent en réponse à la présence des poussières minérales dans les tissus pulmonaires (Davis, 1970; Brody and Hill, 1982; Brody, 1987).

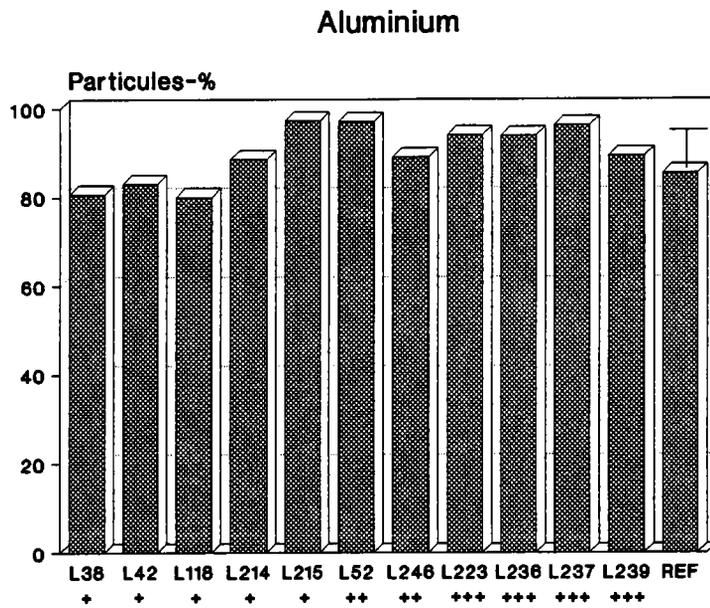


Figure 7.6: Incidence de l'aluminium pour les 11 poussières recueillies sur poumons et les 10 poussières de référence (moy. $\pm \sigma$)

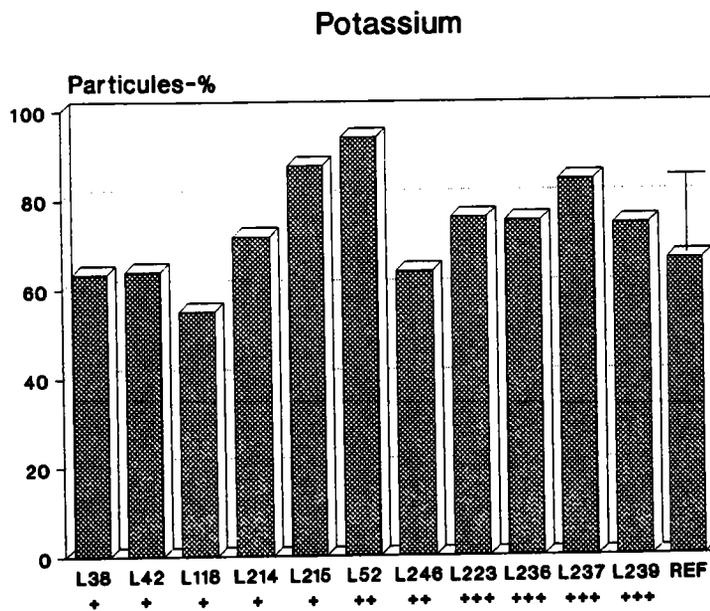


Figure 7.7: Incidence du potassium pour les 11 poussières recueillies sur poumons et les 10 poussières de référence (moy. $\pm \sigma$)

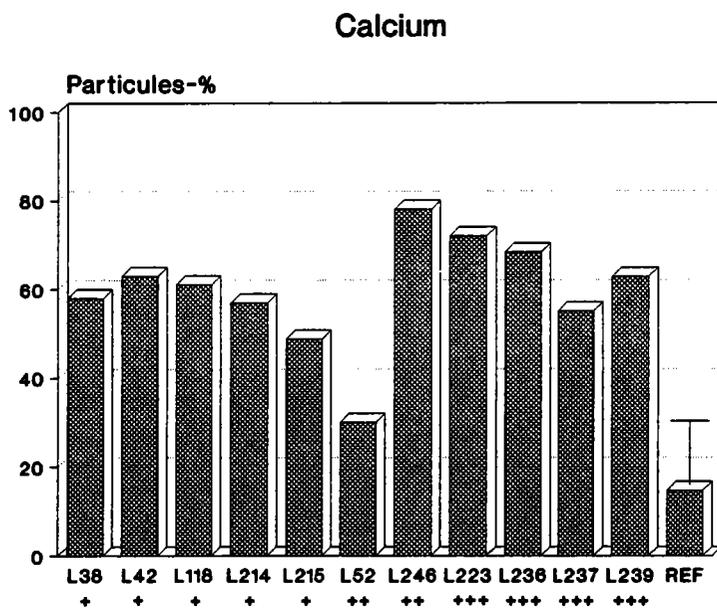


Figure 7.8: Incidence du calcium pour les 11 poussières recueillies sur poumons et les 10 poussières de référence (moy. $\pm \sigma$)

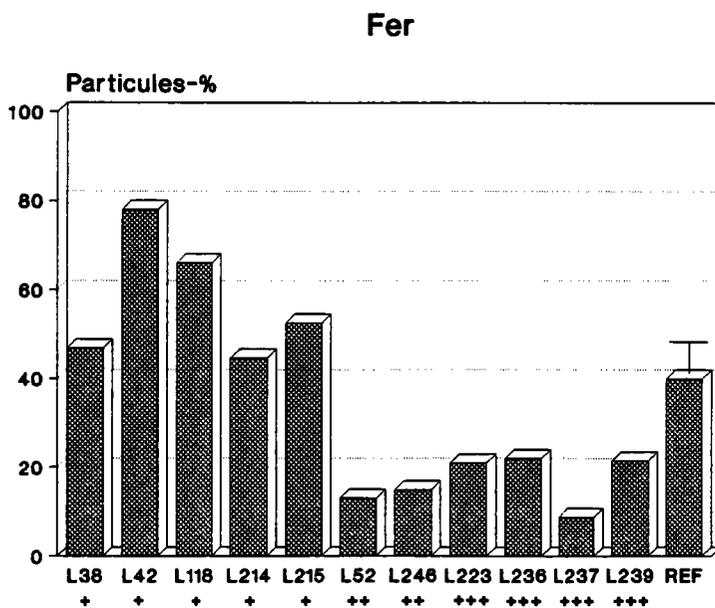


Figure 7.9: Incidence du fer pour les 11 poussières recueillies sur poumons et les 10 poussières de référence (moy. $\pm \sigma$)

La figure 7.9 montre que les incidences en particules chargées de fer sont plus faibles (17 particules-% en moyenne) pour les poussières recueillies sur poumons avec fibrose nodulaire (++) et fibrose nodulaire massive (+++) que celles récupérées sur poumons de pneumoconiose simple (+) dont l'incidence moyenne représente 58 particules-%. On peut en déduire que l'incidence élevée en fer observée pour la pneumoconiose simple résulte d'une déposition de fer endogène (voir discussion) ou, à l'autre extrême, que la fibrose nodulaire (++) et la fibrose massive (+++) sont associées à un relarguage *in vivo* du fer des poussières. Une comparaison de l'incidence moyenne du fer des poussières récupérées sur poumons fortement fibrosés (17 particules-%) avec celle des poussières de référence (40 particules-%) favorise la seconde hypothèse.

Il reste également à mentionner les résultats pour les autres paramètres de la matière minérale des poussières de mines dont on a discuté l'importance au cours des précédents chapitres (incidences des particules de la classe II, des particules Fe,Mg(Ca) et incidence du manganèse). Les résultats (tableau 7.2) ne dévoilent pas de corrélation avec le degré de pneumoconiose ni de différences significatives avec les poussières de référence.

Tableau 7.2: Incidences des particules de la classe II, des particules Fe,Mg(Ca) et des particules contenant du manganèse pour les 11 poussières récupérées sur poumons

Echantillon	Degré de pneumoconiose	Classe II (particules-%)	Fe,Mg(Ca) (particules-%)	Mn (particules-%)
L38	+	3.4	0.8	0.8
L42	+	1.8	0.0	0.3
L118	+	2.2	1.4	0.6
L214	+	3.9	0.6	1.8
L215	+	5.2	0.0	1.6
L52	++	0.0	0.0	0.8
L246	++	1.0	0.0	0.0
L223	+++	7.8	0.4	1.0
L236	+++	1.2	0.0	0.0
L237	+++	3.1	0.0	0.8
L239	+++	5.8	0.2	0.8

7.3) Discussion

L'effet protecteur des contaminations de surface du quartz (aluminium et/ou minéraux argileux) à été observé lors de nombreuses expérimentations *in vitro* et *in vivo* (Le Bouffant et al., 1977, 1982; Kriegseis et al., Kriegseis et al., 1987). Les analyses LAMMA des vraies poussières de mines ont clairement montré que la majorité du quartz de ces poussières se trouve sous forme de mélange endogène (incidence des particules de la classe I < 2 particules-%).

L'existence d'une pathologie proche de la silicose chez le mineur de charbon nous a conduit à vérifier s'il existait une corrélation entre la gravité de la pneumoconiose et l'incidence en particules de quartz "pur". Une telle corrélation à été observée pour la fibrogénicité sur l'animal de certaines poussières de mines (voir l'étude des échantillons TF, chapitre 4). L'expression retardée de la fibrogénicité des poussières de silices naturelles (Le Bouffant et al., 1982) ou l'augmentation de leur cytotoxicité après traitement chimique (Kriegseis et al., 1987) conduisaient également à vérifier si les contaminations de surface du quartz étaient stables après un contact prolongé avec les tissus pulmonaires.

On s'attendait donc à observer une élévation de l'incidence en particules de quartz "pur" (> 2 particules-%) et/ou une corrélation avec le degré de pneumoconiose. Les résultats montrent cependant que la majorité du quartz des poussières récupérées sur poumons est toujours contaminée par les argiles. Ces poussières ne révèlent aucun enrichissement en particules de quartz "pur" ni de corrélation entre l'incidence de telles particules et la gravité de la pneumoconiose.

Une attention particulière doit être portée sur l'échantillon L239 (degré de pneumoconiose +++) exceptionnellement riche en quartz (33%). On pouvait s'attendre que cette poussière reflète l'exposition d'un mineur à une poussière originellement riche en particules de quartz "pur". Mais elle serait, dans le cas contraire, la poussière la plus susceptible de dévoiler un enrichissement en particules de quartz "pur" voire en particules de quartz partiellement contaminées de la classe II. Les résultats montrent cependant que la poussière L239 ne contient pas plus de particules des classes I (1.3 particules-%) et II (5.8 particules-%) que les autres poussières récupérées sur poumons ou que des poussières de mines riches en quartz telles que celles du étudiées au chapitre 4. Ces faibles incidences peuvent également être rapprochées des incidences obtenues pour la silice de référence ZEL (49% de quartz) qui ne contenait que 2.5 et 11.5% de particules des classes I et II (voir chapitre 3).

Les résultats suggèrent donc la stabilité à long-terme (jusqu'à 40-50 ans) des contaminations superficielles du quartz et l'absence d'une libération en milieu pulmonaire de nouvelles surfaces du quartz. Il s'avère ainsi nécessaire de chercher d'autres paramètres des poussières pouvant expliquer les différents degrés de pneumoconiose en écartant toutefois l'intervention de facteurs tels que les susceptibilités individuelles ou les effets de dose. Les doses de poussières accumulées (voir tableau 7.1) ne semblent pas expliquer les données anatomo-pathologiques (dans les limites du nombre de cas de notre étude).

La corrélation inverse observée entre l'incidence du fer et la gravité de la fibrose semble contradictoire avec le rôle du fer suspecté dans les précédents chapitres. D'autres auteurs ont montré que les poumons des mineurs de charbon décédés avec une pneumoconiose simple contenaient plus de fer endogène (hémoglobine et surtout hémosidérine) que ceux de populations témoins ou ceux des mineurs de charbon atteints de FMP (Bergmann and Casswell, 1972; Sweet et al., 1974; Guest, 1978). Leurs résultats, basés sur des méthodes d'analyses globales (spectroscopie Mössbauer, absorption atomique, spectrométrie de fluorescence RX) ne sont pas directement comparables à ceux de notre étude au niveau de la particule individuelle. De plus, ces études ne concernent pas des poussières récupérées sur poumons mais des échantillons de poumons secs ou des minéralisats de poumons livrant des résultats sur le fer total (d'origine exogène et endogène).

Seule l'étude publiée par Einbrodt (1967), qui se rapporte à des poussières récupérées sur poumons (80 mineurs de charbon de la Ruhr), nous fournit des éléments de discussion. Les résultats de cette étude (reproduits dans le tableau 7.3) révèlent un accroissement de la teneur en fer des poussières (rapportées aux poumons) avec la durée d'exposition des mineurs non-pneumoconiosés ou atteints d'une pneumoconiose légère (+). Cette tendance s'inverse cependant chez les mineurs fortement pneumoconiosés (++ et +++) dont la durée d'exposition est supérieure à 20 ans.

Cette inversion de la teneur en fer des poussières récupérées chez les mineurs fortement pneumoconiosés rappellent les durées d'exposition (voir tableau 7.1) et les résultats de notre étude. Il faut cependant rappeler que les données d'analyses globales des méthodes d'analyses conventionnelles ne sont pas directement comparables à celles des résultats d'analyse LAMMA. De plus, les teneurs en fer sont rapportées aux poumons (mg Fe_2O_3 /poumon) et non aux poussières.

Mais on peut surtout déplorer l'absence de valeurs comparatives se rapportant à des poussières témoins. Les différences observées avec le degré de pneumoconiose et la durée d'exposition, discutées par Einbrodt sur la base d'une déposition de fer endogène, restent ainsi difficile à interpréter.

Tableau 7.3: Teneurs moyennes en fer des poussières (mg Fe₂O₃/poumon) récupérées sur poumons de mineurs de degrés de pneumoconiose et durées d'exposition variés (d'après Einbrodt, 1967)

Exposition (années)	Degré de pneumoconiose	
	0 et +	++ et +++
1-10	121.7	512.6
11-20	218.8	706.7
21-30	295.9	259.4
31-40	399.7	182.2

Le choix des poussières de référence nous a permis de suspecter un relarguage du fer exogène des particules dans le cas de la fibrose nodulaire (++) et de la fibrose massive (+++). On peut également suspecter, comparativement aux autres éléments dont l'incidence n'expriment ni de corrélation avec le degré de pneumoconiose ni de différences avec les poussières de référence, que le relarguage du fer possède le caractère d'une lixiviation des surfaces.

En effet, l'aspect sélectif du relarguage du fer apparait pour les échantillons L223 et L239 riches en matières minérales et en magnésium. Les spectres des particules argileuses contaminées par le fer (voir chapitre 8, discussion générale) ou des particules de sidérite (Fe,Mg(Ca)) indiquent que le fer et le magnésium sont deux éléments étroitement inter-corrélés. Les hautes incidences en magnésium des poussières L223 et L239 (figure 7.3) et l'appauvrissement respectif de ces échantillons en fer soulignent le caractère probablement préférentiel du relarguage *in vivo* du fer.

D'autres auteurs ont noté que les poumons des mineurs les plus fibrosés (Weiss, 1975) ou atteints de FMP (Sweet et al., 1974) étaient tendentiellement enrichies en magnésium. Enfin, il reste mentionner que la transformation progressive *in vivo* de la structure cristalline d'aluminosilicates tels que l'illite et, simultanément, le relarguage sélectif d'éléments (notamment du fer) ont été démontrés par des expérimentations sur l'animal (Berry et al., 1978).

Il semble ainsi raisonnable de retenir l'hypothèse d'une fibrose dont la gravité (ou la progression) serait associée à un relargage (sélectif) du fer des poussières de mines de charbon. Cette hypothèse reste à confirmer par l'étude d'un plus grand nombre d'échantillons afin d'écartier les facteurs tels que les susceptibilités individuelles et/ou les effets de dose. Des études sur le devenir biologique du fer ainsi relargué permettrait de confirmer son importance dans l'étiopathogénèse de la pneumoconiose du houilleur.



CHAPITRE 8

Discussion générale

Un rappel succinct des connaissances actuelles sur la pneumoconiose du houilleur (plus amplement développées dans l'introduction, chapitre 1) nous permettra de structurer la discussion générale de ce mémoire.

Bien que l'agent étiologique soit connu, la complexité des recherches sur la pneumoconiose du houilleur dépasse de loin celle des recherches consacrées aux autres pneumoconioses. En effet, la nature mixte et hétérogène des poussières de mine de charbon ne facilite ni les études de caractérisation physico-chimique (composition, propriétés de surface...) ni les études épidémiologiques ou de nocivité expérimentale. Nous choisirons donc, en premier lieu, de discuter les **avantages et limites de la caractérisation des poussières de mine par microsonde LAMMA.**

Héritage d'un passé scientifique, le rôle étiopathogénique du quartz a fait l'objet de très nombreuses études:

- malgré la nature composite de ces poussières et la faible teneur en quartz des poussières respirables (en moyenne 5% et dépassant rarement 10%),
- malgré les disparités géographiques existant pour les données épidémiologiques des différents bassins miniers (ou au sein d'un même bassin); elles ne s'expliquent pas en termes d'exposition ou de teneurs en quartz des poussières.

Les différences existant entre les lésions du mineur de charbon et les lésions silicotiques vraies, connues depuis les travaux de Cough, d'Heppleston ou de Policart, permettaient d'envisager l'existence d'agents étiologiques autres que le quartz (ou des mécanismes pathogéniques différents).

De plus, les tentatives thérapeutiques ou de traitements prophylactiques, efficaces en silicose, se sont récemment avérées inefficaces dans le cas des poussières de mine de charbon. Ces dernières semblent ainsi posséder une nocivité "résiduelle".

Enfin, les études *in vitro* et *in vivo* ne désignent pas la teneur en quartz (dont la nocivité est indéniable) comme facteur gouvernant la nocivité expérimentale des poussières mais plutôt leur teneur totale en matière minérale. Toutefois, ces études de nocivité ne permettent pas d'incriminer un composant minéralogique déterminant.

Ces rappels (simplifiés) ont le mérite de poser la dimension des problèmes. On pourra, à la lumière de données épidémiologiques ou expérimentales contradictoires, postuler l'existence dans les poussières de mine de **paramètres modulant la nocivité du quartz** et/ou de **paramètres de nocivité indépendants du quartz** qui seront successivement discutés. Une discussion de la **spécificité des paramètres** identifiés dans le présent travail sera enfin abordée.

8.1) Avantages et limites de la caractérisation des poussières de mine par microsonde LAMMA

Le choix, parmi les méthodes actuelles d'analyse des particules individuelles, de la microsonde laser LAMMA paraît d'emblée justifié en termes de résolution spatiale, de rapidité d'acquisition des données analytiques, de sensibilité et sélectivité des analyses par spectrométrie de masse. Ces capacités analytiques permettent ainsi l'étude d'un nombre statistiquement significatif de particules de vraies poussières de mine, respirables en taille et, enfin, à l'état natif.

Ce dernier point met en valeur les corrélations observées avec les données de nocivité des poussières (testées *in vitro* et *in vivo* sans préparation préalable) ou avec les données épidémiologiques (dans les limites des méthodes actuelles de prélèvement des poussières respirables).

Le présent travail ajoute une nouvelle dimension à la méthodologie. En effet, il a été démontré que les analyses LAMMA étaient orientées vers la "surface" plutôt que le volume de la particule individuelle, notamment en opérant à irradiance moindre. Cette observation est en accord avec les résultats d'autres études concernant la détection par microsonde LAMMA de plomb adsorbé à la surface de particules de calcite (Wouters et al., 1988). Il est inutile de souligner l'importance de ce point dans le cadre d'une toxicologie faisant intervenir des interactions entre la surface des particules et les cellules ou tissus biologiques.

Les avantages d'une telle analyse en mode d'ablation ont été poussés jusqu'à la mise au point d'une méthode d'analyse en profil de profondeur des particules individuelles. Elle permet d'établir des bilans analytiques, par exemple, de quartz (voir chapitre 4) ou de sidérite (voir Tourmann and Kaufmann, 1993). Cette méthode autorise, dans une certaine mesure, une confrontation entre les résultats d'analyses LAMMA et les données analytiques globales.

La discussion de ce dernier point et des limites de l'analyse LAMMA nécessite cependant d'être approfondie en termes d'analyses qualitatives et quantitatives.

Principalement axée sur la détermination des éléments chimiques (et de leurs combinaisons), notre approche analytique n'a pas fondamentalement consisté en l'identification des minéraux au niveau de la particule individuelle (hormis, d'une manière générale, le quartz, voir chapitre 3). Elle semble ainsi se démarquer d'une approche analytique conventionnelle (démarche qualitative puis quantitative).

Il convient de préciser qu'au départ de notre travail seule une étude, initiée par les Professeurs Kaufmann R. (Université de Düsseldorf) et Bruch J. (Université de Essen) avait été consacrée à la caractérisation par microsonde LAMMA de la fraction respirable de vraies poussières de mine de charbon (Kaufmann et al, 1982b; Barths and Schmitz, 1985). Il est apparu plus important, à la vue des résultats de cette étude de faisabilité, d'orienter les recherches sur des poussières d'origine et de nocivité extrêmement variables plutôt que sur l'identification des minéraux en fonction des spectres LAMMA.

De plus, une caractérisation préliminaire des poussières (voir chapitre 2.3) a révélé la présence de 30 différents éléments détectables par la technique LAMMA. La complexité d'une approche toxicologique de tels résultats et la dimension des problèmes analytiques étaient posées dès le départ.

Enfin, il paraissait d'emblée qu'une étude de la composition des particules individuelles, basée sur des comparaisons avec les spectres de minéraux de référence, soit vouée à l'échec. En effet, l'absence de banques de minéraux prélevés dans les différentes mines de charbon ne nous autorisait pas à choisir des matériaux de référence dans des collections minéralogiques classiques (problèmes de la représentativité des propriétés physico-chimiques, de la granulométrie, de l'origine géologique, des contaminations...).

Mais il faut surtout rappeler que seule une étude de microdiffraction d'électrons permettrait, contrairement à toute tentative d'identification basée sur des méthodes stoechiométriques, de déterminer la nature minéralogique de particules individuelles respirables. Une telle approche permettrait de reconnaître les phases minérale sur la base de leurs paramètres cristallographiques. Mais la nature complexe de la matière minérale des poussières de mine de charbon et surtout la faible cristallinité (voire l'état amorphe) de ses constituants limitent l'applicabilité de cette méthode.

La stratégie choisie consistait donc à déterminer les incidences d'éléments ou de combinaisons d'éléments (quel que soit le minéral incriminé!) pouvant expliquer les données expérimentales de nocivité ou les données épidémiologiques. L'examen de tels "histogrammes chimiques" s'est révélé fructueux à la vue des résultats obtenus qui, de plus, ont mis en évidence l'existence d'un dénominateur commun au niveau des combinaisons d'éléments: le fer (et/ou les métaux lourds).

Il semblait important de souligner dans quelle mesure notre approche devait se distinguer d'une démarche analytique attendue en premier lieu (analyse qualitative puis quantitative). Mais il faut noter qu'une tentative d'identification minéralogique au niveau de la particule individuelle reste toutefois une démarche souhaitable.

En effet, parmi les rares minéraux facilement identifiables grâce à leurs spectres LAMMA typiques (sidérite, calcite/gypse/bassanite, rutilé...), certaines "anomalies" ont été décelées entre les données de composition minéralogique des poussières et les résultats d'analyses LAMMA. On opposera, à titre d'exemple, la teneur en sidérite des échantillons TF (environ 6%, voir chapitre 4.1) à leurs incidences en particules identifiées comme tel (de 16 à 25 particules-%) ou la teneur en calcite/gypse de l'échantillon F6 (18%, voir chapitre 6) à son incidence en particule contenant du calcium (97 particules-% !, voir figure 6.6).

Cette confrontation des résultats d'analyse LAMMA avec les données minéralogiques globales (dans le cas, en première approximation, d'un mélange exogène) rappelle déjà les problèmes de l'origine du minéral de référence nécessaire aux analyses minéralogiques conventionnelles (cristallinité des phases minérales). Mais elle permet surtout d'évoquer les problèmes liés aux traitements préalables aux analyses minéralogiques des poussières (décomposition thermique des carbonates ...). On peut ainsi poser une première question quant à la quantitativité réelle des données minéralogiques conventionnelles.

Mais c'est surtout l'absence de méthode d'analyse de la surface libre du quartz qui pénalise tous les efforts de recherche sur les poussières silicogènes. L'essence de notre travail se rapporte donc en premier lieu au concept de population de particules formant des mélanges exogène ou endogène. L'originalité de l'approche permet indirectement d'estimer le degré de contamination de la surface du quartz:

- ainsi un mélange exogène contiendra par exemple 10% de particules de quartz "pur" à surface "non-contaminée" (ou faiblement contaminée, voir modèle, chapitre 1.3),
- et, à l'autre extrême, un mélange endogène révélera que chaque particule contient une fraction de 10% de quartz. Les analyses LAMMA ne fournissent pas, dans le cas d'un mélange endogène, de telles données quantitatives. Mais elles dévoilent que l'incidence en particules de quartz "pur" sera nulle dans ce cas et, réciproquement, que la surface du quartz sera masquée par des contaminations (plus ou moins massives).

Ce modèle et l'applicabilité de l'analyse par microsonde LAMMA ont été testés sur des poussières de silice de référence (chapitre 3). Cette étude dévoile la réelle hétérogénéité des mélanges (traduite par 3 classes -ou 9 groupes- de particules). Le modèle a pu être validé par confrontation des résultats LAMMA avec ceux, d'une part de spectroscopie infrarouge et de réelles techniques d'analyse de surface (spectroscopies ESCA et Auger) et, d'autre part, avec les données de cytotoxicité des silices (ou de fibrogénicité de certains échantillons).

Une tentative de quantification du schéma de classification permettrait d'estimer l'épaisseur des contaminations de surface ou révéler, pour les particules mixtes de la classe II, l'éventuelle présence d'îlots de surface libre de quartz. On pourrait ainsi parfaire l'actuelle scission entre particules toxiques (classe I) et non-toxiques (classe II).

Il faut cependant rappeler l'ordre de grandeur des incidences en particules de la classe I (<2 particules-%) et de la classe II (<10 particules-%) observées au cours de nos diverses études de poussières de mine. On peut, d'un point de vue toxicologique, déjà émettre un doute quant à la nécessité d'une quantification du schéma de classification.

En revanche, elle permettrait d'affiner les bilans comparatifs des analyses LAMMA avec les données minéralogiques. On aurait ainsi le moyen de chercher, dans les poussières de mine de charbon, d'éventuels excès de quartz détectables par analyse LAMMA. Dans un tel cas, la présence d'une silice insoupçonnée car "amorphe" aux analyses minéralogiques aurait été démontrée. Le potentiel nocif d'une telle silice, d'origine volcanique (tonsteins, voir Préat, 1993) ou biogénique (phytolithes, voir Préat, 1990; Abraham, 1978) a peu retenu l'attention jusqu'à présent.

D'un point de vue instrumental également, certaines améliorations permettrait de repousser les limites de la caractérisation par microsonde LAMMA. Un couplage à la technologie de l'ionisation laser résonante, déjà réalisé par le Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser de l'Université de Metz, avait permis d'améliorer les analyses (notamment des métaux lourds) en termes de sensibilité et de sélectivité (Krier et al., 1985; Verdun et al., 1987). Cette technologie permet également d'entrevoir une approche quantitative des analyses LAMMS (Hubert et al., 1992).

Les gains en sensibilité et sélectivité faciliterait l'analyse d'éléments tels que le manganèse, le zinc... Mais ils permettraient surtout de contourner les problèmes d'interférences entre les signaux d'ions élémentaires et les signaux organiques que l'on rencontre pour les poussières à teneurs en cendres inférieure à 10%. Cette approche faciliterait la caractérisation de la matière minérale des poussières de mine de charbons de haut rang (charbons maigres et anthracites) qui n'a pas pu être abordée dans la présente étude.

Il faut également rappeler les avantages potentiels d'un gain en résolution du spectromètre de masse couplé à une microsonde laser. A cet effet, on opposera la résolution en masse de la microsonde LAMMA ($m/\Delta m = 500$) à celle d'une microsonde laser FTMS (Fourier Transform Mass Spectrometry) ($m/\Delta m = 2000-4000$ en mode direct, $m/\Delta m = 20\ 000$ à $200\ 000$ en mode hétérodyne). Le prototype d'une telle microsonde, développé par le LSMCL précédemment cité, a effectivement montré qu'une haute résolution en masse permet d'identifier sans ambiguïté les différents éléments, leurs ions de recombinaisons (ou "clusters") et de les différencier des interférences organiques (Muller et al., 1989). Les capacités analytiques de cet instrument (résolution spatiale et sensibilité) permettent d'envisager certaines applications sur les particules des poussières de mines.

On retiendra que la sensibilité des analyses LAMMA 500 est (plus que) satisfaisante dans l'état actuel des connaissances sur les particules individuelles des poussières de mine. Par contre, on pourra déplorer les limites imposées par le domaine dynamique du système d'enregistrement des signaux. Elles nous auront peut-être masqué des résultats relatifs aux éléments majeurs (aluminium notamment). On citera, par exemple, l'étude des poussières récupérées sur poumons (chapitre 7) qui n'avaient pas permis d'observer un éventuel relargage d'aluminium dans les poumons.

Il faut enfin rappeler que la technique LAMMA 500, bien que très versatile, reste actuellement une technique sophistiquée et très coûteuse, notamment en temps d'opérateur. On essaiera de situer l'ampleur du travail d'exploitation des spectres permettant, finalement, d'obtenir des "histogrammes chimiques". Ceux des 5 poussières allemandes et britanniques du chapitre 4 sont basés sur l'exploitation de 5000 spectres. Les 6 histogrammes de l'étude comparative des tests de nocivité (15 poussières, voir chapitre 6) se rapportent à 18755 spectres. L'ensemble du travail présenté dans ce mémoire fait appel à l'exploitation de près de 42000 spectres.

L'acquisition des données est relativement rapide; mais une automatisation de la procédure d'analyse des particules reste souhaitable. Afin de diminuer le coût et la durée des analyses LAMMA, il faudrait surtout avoir recours à un système informatique performant de traitement des données (interprétation et classification statistique des spectres). Cette voie permettrait d'étendre le nombre d'échantillons analysables "en routine".

On soulignera, en guise de conclusion, que la caractérisation par microsonde LAMMA reste une approche méthodologique inégalable dans l'état actuel des connaissances toxicologiques et analytiques sur les poussières respirables des mines de charbon. En effet, malgré de souhaitables améliorations méthodologiques et instrumentales, cette approche d'une toxicologie faisant intervenir des particules individuelles s'avère être un progrès fondamental en terme de justesse de la caractérisation. Elle a permis de chercher des paramètres de modulation de la nocivité du quartz, voire des paramètres jusqu'à présent insoupçonnés.

8.2) Paramètres modulant la nocivité du quartz

Il convient, dans le cadre d'une telle discussion, de préciser la notion de modulation de la nocivité du quartz. On choisira de fonder cette modulation sur la base de tout paramètre dont la présence diminue la nocivité du quartz, mais dont seule l'absence permet d'atteindre l'entière nocivité du quartz. On distinguera ainsi les paramètres de modulation de la nocivité du quartz des paramètres additifs (ou synergiques). Il s'agira donc, parmi les autres constituants potentiellement nocifs des poussières, d'exclure ceux dont la propre nocivité peut s'ajouter (ou sur-ajouter) aux effets de la modulation.

L'étude de la cytotoxicité des silices de référence (voir chapitre 3) illustre cette tentative de définition. La présence de particules mixtes (classe II) aura un effet antagoniste à la cytotoxicité des poussières (corrélation négative), tandis que l'absence de telles particules et la présence simultanée de particules de la classe I permettra d'atteindre l'entière cytotoxicité du quartz.

La nature du paramètre de modulation se rapporte à la présence d'aluminium en conjonction avec le quartz des particules. Cet aluminium a pu être attribuer aux contaminations de la surface du quartz par de l'aluminium, ou plus précisément, par des aluminosilicates. Cette conclusion est en accord avec celle d'autres auteurs qui ont étudié les mêmes silices (Kriegseis et al., 1979a, 1979b, 1983, 1987). Les résultats ont à nouveau montré l'importance, dans un cadre toxicologique, à déterminer le degré de (non-)contamination de la surface du quartz plutôt que la teneur en quartz d'une poussière.

L'hypothèse d'une nocivité des poussières de mine ainsi inhibée par les contaminations de surface du quartz avait déjà été émise à partir d'études de sables quartzeux et de mélanges artificiels quartz/argiles ou quartz/charbon (Le Bouffant et al., 1977; 1982; 1987b). Mais il restait difficile à démontrer cet effet sur les vraies poussières de mine de charbon ou à voir dans quelle mesure les contaminations de surface peuvent moduler la nocivité de ces poussières.

Dans le cadre de notre travail, seule l'étude des 3 échantillons TF (chapitre 4) à effectivement permis de suspecter un effet de modulation. Mais les analyses LAMMA montrent surtout que la surface non-contaminée du quartz (telle que nous l'avons définie par l'incidence des particules de quartz "pur" de la classe I) apparait comme négligeable pour la majorité des vraies poussières de mine de charbon.

En effet, sur l'ensemble de l'étude, aucune poussière ne dévoile d'incidence en particules de la classe I supérieure à 2 particules-%. La richesse pourtant exceptionnelle en quartz des échantillons du chapitre 4 (16 à 26%) n'a pas permis de détecter plus de 1.6 particules-% de la classe I. L'étude des 15 échantillons d'origine variée (chapitre 6) et à teneurs en quartz plus représentatives de la majorité des poussières de mine (< 11%) fait tendre la moyenne de l'incidence en particules de la classe I vers 3 particules pour 1000.

De tels résultats correspondent grossièrement à ceux d'observations en microscopie à contraste de phase de poussières de mine de charbon (Nebe and Strübel, 1981). Ils sont également en accord avec les incidences obtenues en analyse par microsonde électronique à dispersion d'énergie RX (<2 particules-%) (voir Prétat, 1990, Wallace et

al., 1990). Des observations de particules en microscopie STEM (Scanning Transmission Electron Microscope) ont confirmé leur nature mixte (quartz/argile/charbon) (voir Préat, 1990).

Une étude en spectroscopie Auger à balayage (résolution latérale = 0.2-0.5 μm) n'à pas permis de détecter de surface libre de quartz dans les poussières de mine de charbon, même douées de propriétés fibrosantes (Kriegseis and Scharmann, 1982). Une étude par spectrométrie SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry) de telles poussières (réduites en cendres) a également mis en évidence des masques d'aluminium sur la surface du quartz (voir Robock, 1991).

Ces résultats permettent d'émettre un doute sur l'étendue (voire l'existence) des surfaces de quartz non-contaminées dans les poussières de mine de charbon. On peut donc estimer que les contaminations de surface sont moins représentatives d'un paramètre de modulation que d'un facteur inhibant fortement (totalement) la nocivité du quartz des poussières de mines.

De plus, l'étude des poussières récupérées sur poumons de mineurs de charbon (chapitre 7) suggère la biopersistence à long-terme des contaminations superficielles et l'absence, en milieu pulmonaire, d'une libération de nouvelles surfaces de quartz. On rappellera enfin, dans le cadre de cette dernière éventualité, les expérimentations démontrant un relarguage *in vivo* de l'aluminium et l'effet inhibiteur de sa réadsorption sur le quartz (Le Bouffant et al., 1977, 1982, 1987b).

Toutes ces observations convergentes soulignent l'urgente nécessité à identifier d'autres paramètres de nocivité des poussières de mine de charbon. Mais il reste, à ce titre, à mentionner un dernier résultat de notre tentative d'identification des paramètres de modulation de la nocivité spécifique du quartz.

La figure 8.1 montre, pour l'ensemble du présent travail, la relation établie entre l'incidence en particules de quartz "pur" (classe I) et la teneur globale en quartz (ou silice) des silices de référence (11 poussières) et des poussières de mine analysées à 30% de transmission laser (20 poussières). Le domaine de teneur globale en quartz (ou silice) des échantillons varie ainsi de 1 à 100% en masse. L'absence d'une relation linéaire entre les deux variables rend vaine toute tentative d'extrapolation des connaissances épidémiologiques ou expérimentales de la silicose (cas des poussières riches en silice)   la pneumoconiose du houilleur (teneur en quartz des poussières <10%).

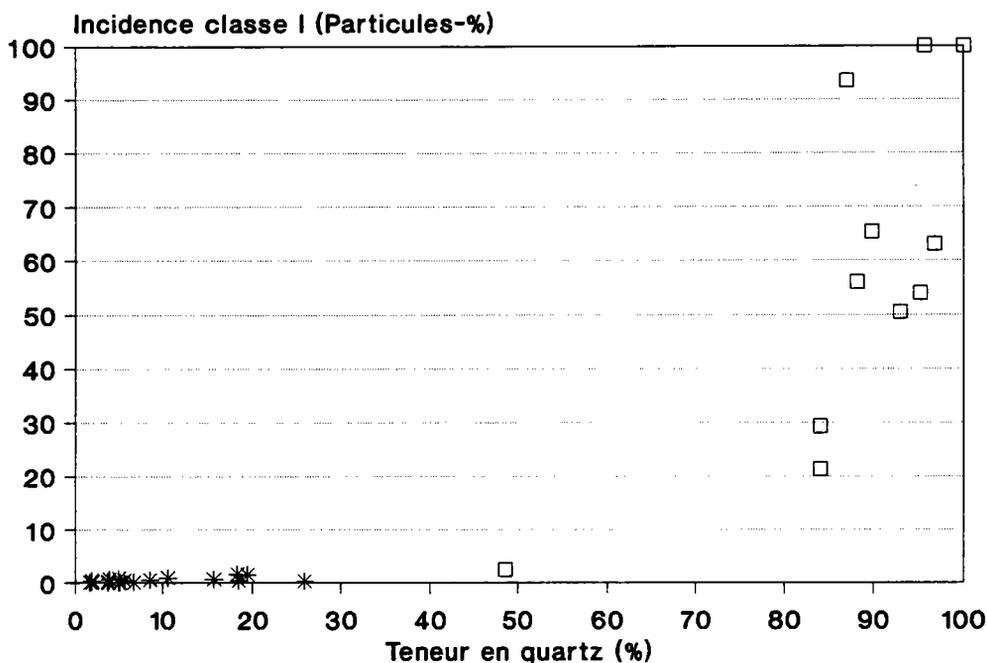


Figure 8.1: Incidences en particules de quartz "pur" de la classe I en fonction de la teneur globale en quartz des silices de référence (□) et des poussières de mine (*) de l'ensemble de la présente étude

8.3) Paramètres de nocivité indépendants du quartz

Nous définirons ceux-ci comme tout paramètre dont la nocivité propre viendra s'ajouter (en synergie ou non) à celle du quartz ou comme tout paramètre dépourvu d'une nocivité propre mais dont la présence dans les poussières permettra au quartz d'exprimer sa nocivité spécifique.

Il convient de rappeler que seule la matière minérale des poussières a été explorée à ce titre dans le cadre du présent travail. En effet, le domaine de teneur en matière minérale des différents échantillons (teneurs en cendres variant de 15 à 90%) et la diversité de l'origine stratigraphique des poussières se prêtaient à une telle approche. De plus, les données de nocivité expérimentale des poussières dépendaient de cette teneur en matière minérale.

Toutefois, ces considérations ne nous permettent pas d'exclure la participation de la matière organique à la nocivité des poussières. On trouvera dans la littérature (Jafari et

al., 1988; Dalal et al., 1989) et surtout dans les travaux de l'équipe "Solides et Cancérogénèse" du Laboratoire de Réactivité de Surface et Structure (Université P. et M. Curie, Paris) des études consacrées aux propriétés des charbons susceptibles de jouer un rôle dans la pneumoconiose du houilleur (Huang, 1991; Huang et al., 1991).

En ce qui concerne la matière minérale des poussières, le présent travail a montré l'existence de corrélations pour l'incidence des particules à combinaisons d'éléments suivantes:

- Fe,Mg(Ca) (voir chapitre 4)
- AlKFe et AlKFe/Ti (cas des particules des groupes 2 et 5 du chapitre 5)
- AlKFe (avec ou sans Ti) (échantillons du chapitre 6)
- FeX (X= Al, Mg et/ou Ca) (échantillons du chapitre 6)
- AlK (+Fe) + Cr,Ni,Cu,Pb,Mn,V,Zn et/ou Mo (particules du groupe 17 du chapitre 5)
- Mn (et/ou FeX) (chapitre 6).

Le fer notamment (et/ou les métaux lourds) apparaît comme un dénominateur commun aux particules dont les incidences sont en relation avec les données de nocivité. Mais il faut rappeler que de tels éléments ont, jusqu'à présent, peu retenu l'attention dans les études de nocivité des poussières de mine de charbon.

Seules quelques études, notamment sur les charbons américains, ont permis de suspecter leur potentiel nocif. Des analyses de minéralisats de poumons de mineurs de Virginie Occidentale ont montré, comparativement aux minéralisats de poumons non-exposés, un enrichissement en divers métaux lourds (Fe, Ni, Mn...). Cet enrichissement pouvait atteindre un facteur 10 à 30 pour le Be, Co, Cr ou V (Keenan et al., 1971; Carlberg et al., 1971). D'autres auteurs ont associé la richesse en Fe, Ni, Cu et Pb des charbons provenant de Pennsylvanie à la haute incidence en pneumoconiose de ce district minier (Sorenson et al., 1974). Les concentrations en fer (nickel) de ces charbons étaient 10 fois (5 fois) plus élevées que celles de charbons de l'Utah (district associé à un risque moindre).

Mais ces études ne concernent pas directement la nocivité expérimentale des vraies poussières de mine de charbon. La présence dans ces poussières de métaux (lourds) pourra être associée à la fraction organique du charbon (complexes organo-métalliques de V ou Be) ou, plus spécifiquement, à la fraction minérale (Mn, Mo, Pb, ...). D'autres éléments présenteront une affinité intermédiaire avec la matière organique (Valkovic,

1983). La présence de phases minérales contaminées par les métaux lourds a déjà été discutée (voir la détermination des éléments traces, chapitre 2.3.2).

L'intime association du fer avec d'autres éléments typiques de la matière minérale des poussières (voir combinaisons ci-dessus) permet, en premier lieu, de rejeter l'hypothèse d'un fer associé à la fraction organique.

La nature minéralogique de ces particules chargées de fer se rapporte à la sidérite pour la combinaison Fe,Mg(Ca) (voir l'identification au chapitre 4, figure 4.5) et très probablement aux chlorites pour la combinaison FeX (voir spectre typique, figure 4.5). On notera, dans les spectres de ces deux phases minérales, la présence de manganèse. Cette association du manganèse aux chlorites expliquerait la corrélation ($r = 0.68$) entre l'incidence du manganèse et celle des particules à combinaison FeX observée au chapitre 6.

La pyrite, minéral relativement commun dans les charbons et facilement reconnaissable par ses spectres LAMMA à dominante FeS aura toutefois peu retenu notre attention dans le cas des poussières de mines. On précisera que les teneurs globales en pyrite des poussières de la présente étude étaient généralement inférieure à 1-2% (maximum 4.5% dans le cas de la poussière F6 du chapitre 6). On peut ainsi expliquer la détection sporadique des particules à dominante FeS et l'absence de tentative de quantification des incidences. Mais on notera que de tels spectres ne sont pas apparus pour les poussières récupérées sur les poumons (chapitre 7). Cette observation conforte les résultats de l'examen en microscopie électronique à balayage des mêmes échantillons qui n'avaient révélé aucune particule de pyrite (Kainka-Stänicke, 1992).

La combinaison d'éléments AlKFe est, comparativement aux autres combinaisons porteuses de fer, la plus fréquente des combinaisons (jusqu'à 60 particules-%, voir le cas de l'échantillon F2, chapitre 6). Elle présente également la majorité des corrélations avec les données de nocivité (voir chapitres 5 et notamment 6). L'association du fer aux éléments caractéristiques des argiles (Al et K) nous indique leur nature minéralogique: micas (illites/séricite/muscovite) et/ou kaolinite.

La minéralogie de tels phyllosilicates (ou silicates à tétraèdres SiO_4 disposés en feuillets) permet d'expliquer la présence de fer, notamment dans les micas: substitution du silicium tétracoordonné par de l'aluminium et compensation des valences par du potassium en position intercalaire. Cette compensation sera assurée par des éléments divalents (Fe^{II} et Mg^{II}) lorsque la substitution par l'aluminium augmente. D'autres micas présenteront du

fer di- ou trivalent en substitution de l'aluminium. Ces différentes variantes minéralogiques permettent d'expliquer la détection du fer dans les particules d'argiles sous forme de combinaison AlKFe.

Mais un tel enrichissement en fer des phyllosilicates pourrait prendre une autre dimension dans le cas des micas associés aux charbons. Rappelons que ces micas sont, comparativement aux illites des gisements non-charbonneux, très nettement enrichis en aluminium (voir introduction, chapitre 1.2.2). Cette "surcharge" en aluminium permet d'imaginer un enrichissement concomitant en fer. L'importance d'un tel fer, divalent et potentiellement biodisponible car intercalaire, sera discutée dans l'approche étiopathogénique des résultats (chapitre 9).

Il convient d'abord de tenter, à partir de nos résultats, d'attribuer une divalence au fer associé aux micas des poussières de mine (sans toutefois exclure l'existence de fer trivalent). Les études par microsonde LAMMA ont déjà montré qu'il était possible, dans une certaine mesure, d'obtenir au niveau de la particule individuelle des informations de spéciation moléculaire des sulfures, oxydes... de nickel (Ro and al., 1991) ou sur la spéciation des degrés d'oxydations du chrome (Poitevin et al., 1989; Hachimi et al., 1993). Une telle approche est basée sur l'étude des rapports d'intensité des signaux obtenus dans les spectres en mode d'ions positifs et/ou négatifs. Elle mériterait d'être tentée pour le fer sur des poussières riches en matière minérale afin de limiter les problèmes d'interférences avec les signaux de la matière organique.

Les seuls indices accumulés en faveur de la divalence du fer se rapportent à la présence simultanée des signaux du fer et du magnésium dans les spectres des particules de micas. Il est apparu, lors de l'exploitation des spectres, que les amplitudes des signaux du fer et du magnésium augmentaient simultanément dans les spectres des particules argileuses (à dominante AlK) contaminées par le fer. De tels spectres sont illustrés en figure 8.2. Ils montrent un accroissement de l'amplitude du signal de fer de l'intensité codée "0" (figure 8.2a) à, par exemple, une amplitude supérieure à "1" (figure 8.2b). L'amplitude du signal de magnésium, ayant simultanément augmentée, sera codée "1" dans le spectre 8.2b.

Il n'a malheureusement pas été possible de déterminer l'incidence des particules simultanément enrichies en fer et en magnésium. On rappellera, à ce titre, que les seuils de détection des éléments majeurs ont été placés à l'amplitude "1" (voir chapitre 2.3.1) et que les amplitudes des signaux sont simplement répertoriées sur la base des codes "0", "1" ou "10". Aucune tentative de corrélation entre les données de nocivité et l'incidence

des particules simultanément enrichies en fer et magnésium n'aura donc été effectuée dans l'espoir d'attribuer une nocivité au fer divalent.

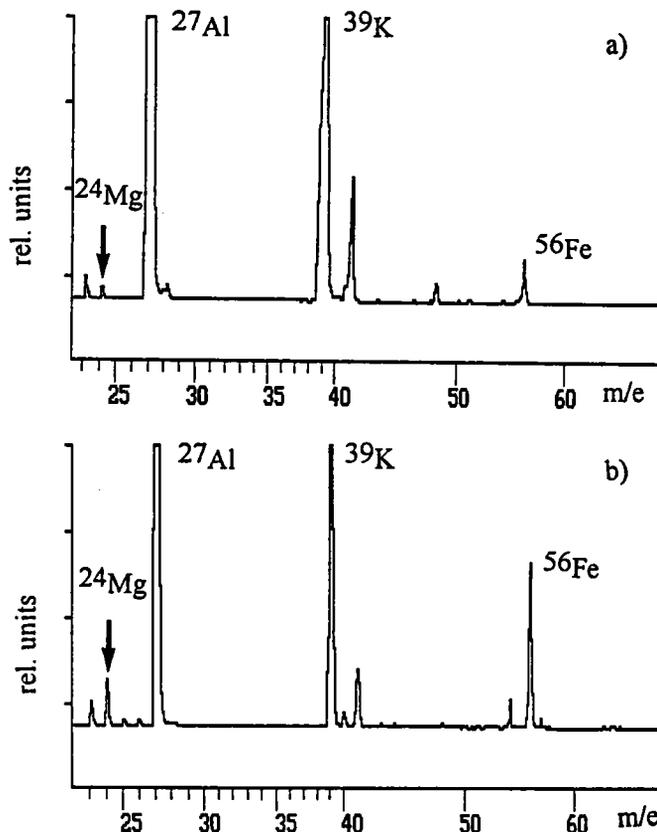


Figure 8.2: Exemples de spectres de particules argileuses (à dominante Al,K) montrant l'augmentation simultanée de l'amplitude des signaux Fe et Mg; l'amplitude du signal Mg (codée "0" dans le spectre 8.2a et codée "1" dans le spectre 8.2b) varie sous le niveau du seuil de détection choisi pour les éléments majeurs (voir texte)

On retiendra, à ce stade de la discussion, l'existence de fer divalent (sans exclure le fer trivalent) dans la majorité des phases minérales des poussières de mine: sidérite (FeCO_3), chlorites $((\text{Mg,Fe})_6\text{Al}_4(\text{Si}_4\text{O}_{10})(\text{OH})_8)$, pyrite (FeS_2) et enfin les micas (voir ci-dessus).

La présence de fer divalent dans les poussières de mine a fait l'objet de peu d'études (Doughty and Dwiggins, 1973). Par contre, de nombreuses études par spectroscopie Mössbauer concernent les charbons. Elles ont permis de rejeter l'hypothèse d'un fer associé à la fraction organique (Huffman and Higgins 1978; Smith and al. 1978). La pyrite représente la phase majoritaire de certains charbons (Levinson and Jacobs, 1977). Elle s'oxyde à l'air en sulfates durant les opérations minières (Montano, 1977). D'autres auteurs ont mis en évidence un signal de fer divalent non-pyritique (Lefelhorz et al.,

1967) qui a été attribuer aux prochlorites (ripidolite) (Vassamillet, 1972). Enfin, une étude corrélatrice en spectroscopie Mössbauer/microsonde électronique a révéler la présence de pyrite, sidérite, chlorite... et de minéraux argileux ferreux dont les spectres Mössbauer correspondent à ceux d'ardoises riches en illites (Lee and al., 1978).

L'existence de fer divalent, démontrée dans les phases minérales associées aux charbons, semble ainsi irréfutable pour les poussières de mine de charbon. La présence dans les poussières de mine de matière minérale provenant des épontes (elle-même naturellement contaminée par du fer divalent) ne pourra que contribuer à la présence de fer divalent dans ces poussières.

8.4) Spécificité des paramètres

Une discussion de la spécificité des paramètres nocivité nécessite de définir avec précaution cette notion spécificité. Il a été choisi de fonder la notion de nocivité spécifique des poussières de mine (voir introduction, chapitre 1.2) sur une nocivité déterminée expérimentalement qui, pour être qualifiée de spécifique, devra être en accord avec les données épidémiologiques.

De tels paramètres de nocivité spécifique (en accord avec les données épidémiologiques) ont été identifiés dans le présent travail (degrés de contamination de la surface du quartz ou présence de sidérite, voir ci-dessous). On rappellera cependant les limites des études épidémiologiques basées sur le dépistage radiologique: faible sensibilité mais bonne spécificité quant à la nature des lésions observées (fibrose pulmonaire interstitielle humaine).

Mais la présente étude a également démontré l'existence de paramètres propres aux différentes méthodes expérimentales (voir l'étude comparative des tests de nocivité et la discussion ci-dessous). Ces paramètres spécifiques à la nocivité expérimentale étaient peu ou non-concordants avec les données épidémiologiques.

Ces premières considérations sur la spécificité montrent déjà les difficultés d'une tentative de définition. Mais c'est l'absence de données "expérimentales" chez l'être humain et toutes les difficultés à étudier une pathologie de caractère chronique qui imposent des limites à la notion de spécificité de la nocivité. Un recours au modèle animal reflètera ses propres limites dans les études de nocivité: meilleure sensibilité que l'épidémiologie, mais spécificité moindre quant à la nature des effets observés (toxicité

cellulaire, réactions pulmonaires primaires à l'application des poussières...). Seuls les tests *in vivo* voués aux examens histologiques des lésions fibrotiques permettront, dans une certaine mesure, l'accès à de réelles données expérimentales de fibrogénicité.

Les paramètres de nocivité spécifique ont été identifiés par l'étude de poussières riches en matière minérale (chapitre 4). Cette étude a montré qu'il était possible de distinguer la matière minérale de différents bassins miniers à risques de pneumoconiose variés: Ruhr, Saar, Ecosse et comté de Nottingham. Ainsi, le degré de contamination de la surface du quartz des poussières de la Saar (généralement riches en matière minérale et en quartz) est apparue supérieur à celui des poussières de la Ruhr (généralement moins riches en matière minérale et en quartz). Ces résultats sont en accord avec les données expérimentales de nocivité et les données épidémiologiques des deux bassins miniers. Ils ont permis de confirmer l'hypothèse d'autres auteurs (Kriegseis and Scharmann, 1982; Schlipkötter et al., 1982; Bruch et al., 1983b).

L'étude du degré de contamination de la surface du quartz des poussières britanniques GED et BIL a fourni des résultats totalement opposés à ceux des poussières allemandes. La poussière BIL, qui présente le plus grand degré de contamination de la surface du quartz, était la plus fibrogène sur l'animal. Elle provient d'une veine de charbon d'Ecosse connue pour être associée à une progression anormalement rapide des pneumoconioses (Seaton et al, 1981). A l'inverse, la poussière GED (inapte à produire de la fibrose nodulaire sur l'animal) présentait des degrés de contaminations moindres de la surface du quartz. Elle provient d'un district minier (comté de Nottingham) connu pour sa très haute exposition au quartz mais sa prévalence des pneumoconioses qui compte parmi les plus basses de Grande-Bretagne. Le cas de ces poussières britanniques a donc permis de chercher des paramètres de nocivité indépendants du quartz.

La présence de sidérite, caractéristique de la poussière d'Ecosse, a pu être identifiée comme un paramètre de nocivité spécifique (en accord avec les données épidémiologiques). Cette présence de sidérite a pu être confortée par des informations d'ordre géologique (voir chapitre 4). On rappellera que la sidérite n'a jamais suscité d'intérêt dans les études épidémiologiques de ces deux bassins miniers ou des autres bassins de charbon.

Une spécificité a ainsi été établie entre différents bassins miniers. Une différenciation au sein d'un même bassin de charbon reste une entreprise délicate dans l'état actuel de notre approche méthodologique. On remarquera, à ce titre, la similitude des résultats LAMMA pour les deux poussières TF1 et TF4 prélevées dans des horizons stratigraphiques très

distincts de la Ruhr (voir chapitre 4). Les deux poussières UKVA et UKVB du Pays-de-Galles (chapitre 6) sont également difficiles à discriminer.

Il a toutefois été possible de différencier des poussières de la Ruhr en ayant recours à une stratégie méthodologique basée sur la notion de "nocivité spécifique à l'origine stratigraphique des poussières" (Reisner et Robock, 1975) (voir chapitre 5). Elle a permis d'identifier des paramètres potentiellement cytotoxiques de la matière minérale de poussières isotoxiques, à teneurs en matière minérale variables et provenant d'horizons stratigraphiques différents.

Les paramètres identifiés (fer et/ou métaux lourds) semblent être liés à l'âge stratigraphique des poussières. Ils suggèrent, dans le cadre du modèle alors développé (voir figure 5.2), un enrichissement en particules toxiques spécifique à la matière minérale des poussières de mine de charbon de haut rang (ou, du moins, stratigraphiquement âgés).

Mais cette hypothèse nécessite une confirmation par l'étude de poussières prélevées dans de telles mines. On rappellera les difficultés propres à cette tentative:

- interférences dans les spectres LAMMA des signaux de la matière organique,
- difficulté à trouver des poussières de mine de charbon de haut rang riches en matière minérale,
- non-existence de poussières présentant une relation linéaire entre la nocivité et la teneur en matière minérale
- et, surtout, absence de tests de nocivité suffisamment sensibles donc capables de différencier de telles poussières.

La stratégie méthodologique développée au chapitre 5 n'a donc pas été appliquée au cas des mines charbons de haut rang (charbons maigres et anthracites). Il est impossible de se prononcer, par exemple, sur les degrés de contaminations de la surface du quartz dans les poussières de telles mines. On notera, en ce qui concerne le fer, que les essais préliminaires sur les poussières des mines de charbon du plus haut rang de l'étude de Reisner et Robock (Esskohle \approx charbons 1/2-gras) suggèrent une richesse en fer (voir figure 2.6 et discussion 5.3).

Mais on a déjà mentionné (chapitre 5.3) que l'hypothèse d'un enrichissement en particules minérales toxiques spécifique au rang des charbons mériterait surtout d'être démontrée sur des poussières dont la nocivité a été établie par des tests de fibrogénicité

sur l'animal. Le choix du test de nocivité risque cependant d'influencer la spécificité des résultats.

En effet, il nous reste à replacer toutes ses considérations sur les paramètres de nocivité spécifique dans le cadre de la nocivité expérimentale. Cette étude a montré l'existence de paramètres spécifiques à la nocivité expérimentale (voir chapitre 6). La spécificité de certains paramètres minéralogiques a pu être attribuée aux différentes méthodes expérimentales utilisées:

- réponse des tests *in vitro* et *in vivo* pulmonaires à la présence de particules à combinaison AlKFe
- et, d'autre part, réponse des tests *in vivo* ganglionnaires à la présence de particules à combinaison FeX et/ou Mn.

Cette discrimination était en accord avec celle obtenue par une analyse statistique des résultats des différents tests (Le Bouffant, 1987a). Aucune spécificité d'ordre épidémiologique n'a été démontrée. La spécificité expérimentale des paramètres identifiés reste inexplicable dans l'état actuel des connaissances toxicologiques sur les poussières, notamment sur le rôle du fer. Mais cette étude aura clairement démontré l'existence, en nocivité expérimentale, d'un "effet test".

On tentera d'illustrer celui-ci grâce aux résultats de tests très similaires et au sein d'une même famille de tests (voir tableau 6.10). On se basera d'abord sur les tests ganglionnaires LNG (poids ganglionnaire) et LNA (section ganglionnaire). Une comparaison des corrélations observées avec les incidences en particules à combinaisons d'éléments FeX et/ou Mn montre que la réponse ganglionnaire est concordante pour les deux tests: la section des ganglions (test LNA) augmente parallèlement au poids des ganglions (test LNG). Par contre, le test ganglionnaire GAN (poids des ganglions) ne révèle aucune corrélation avec l'incidence des particules à combinaisons FeX et/ou Mn. Il faudra, avant de mettre en doute la corrélation observée pour les tests précédents, remarquer que le test GAN diffère par le mode d'application des poussières: application par voie intra-trachéale au lieu de la voie intra-péritonéale (voir tableau 6.4).

Il apparaît ainsi que seule une application à l'organe cible (voie intra-péritonéale pour les tests LNG et LNA) met en évidence une réaction ganglionnaire à la présence de particules à combinaison FeX et/ou Mn. Le cas du test LNQ (application intra-péritonéale et observations des QTA), dont la relative spécificité aux lésions induites par le quartz a déjà été discutée (chapitre 6.3), illustre également cet effet par une corrélation

avec l'incidence des particules de la classe I. Le choix du mode d'application reste donc déterminant quant à l'observation des effets biologiques. Mais il peut induire des faux-positifs (ou faux-négatifs) car une application à l'organe cible ignore la toxicocinétique des particules (élimination, translocation, rétention...). Un tel "effet test" va également dépendre de la disparité des paramètres mesurés, des doses appliquées, des souches animales utilisées... Il mérite d'être considéré dans toute tentative d'attribution de spécificité à la nocivité expérimentale des poussières.

Enfin, on discutera la spécificité de la nocivité attribuable à un élément tel que le fer. L'abondance dans le monde minéral (et minier) du fer permet *a priori* d'émettre un doute quant à une potentielle spécificité. On rappellera simplement que le nom de l'élément ne laisse rien prédire quant à la spécificité de son environnement physico-chimique et minéralogique, de ses degrés d'oxydations, de sa biodisponibilité...

A ce titre, on opposera la fréquence des pneumoconioses à poussières mixtes (silicosidrose) dans deux bassins miniers de fer allemands. Pour des expositions au quartz élevées et comparables, ces deux bassins présentent des différences extrêmes pour l'ensemble des mines de fer allemandes: 21/1000 cas dans le Siegerland, mais aucun cas identifié dans les mines d'hydroxydes de fer du Salzgittergebiet (Bauer et al., 1976). Il reste à mentionner que le minerai extrait dans le Siegerland est un carbonate de fer (sidérite).



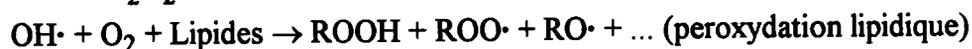
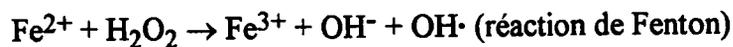
CHAPITRE 9

Situation des résultats dans le cadre des approches étiopathogéniques

L'originalité des résultats mérite de tenter d'élaborer une hypothèse sur la nocivité des poussières de mine de charbon. Il convient d'abord de poser le **principe toxique** envisageable pour la nocivité de la matière minérale des poussières. Il est évident que celui-ci se rapportera fondamentalement aux interactions entre la surface des particules et le milieu biologique. Les propriétés de surface d'autres matériaux particuliers (fibreuse ou non) susceptibles d'expliquer leur potentiel cytotoxique, fibrogène ou carcinogène ont fait l'objet de nombreux travaux (voir, entre autres, Pézerat, 1991; Fubini, 1992; Fubini et al., 1993). On y cherchera les propriétés des surfaces inorganiques les plus susceptibles d'expliquer les corrélations observées entre les données de nocivité et les résultats LAMMA (notamment sur le fer).

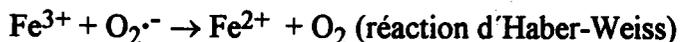
On peut, à cet effet, retenir la notion de sites actifs de surface à propriétés oxydo-réductrices (sans exclure la participation d'autres propriétés). On limitera, par souci de clarté, la discussion aux cas des sites actifs à fer divalent (sans exclure le fer trivalent). L'intervention d'autres mécanismes tels que le relargage des métaux lourds et leur activité en inhibition enzymatique ne seront pas exclus, mais discutés accessoirement.

Après la phagocytose des particules, les sites réducteurs de surface vont participer (au sein du phagolysosome) aux mécanismes d'explosion oxydante à visée antibactérienne. Ils vont contribuer à la formation et au relargage d'espèces activées de l'oxygène, radicalaires ou non ($\text{OH}\cdot$, H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$...). Ces dernières vont participer aux mécanismes de peroxydation des lipides membranaires (Freeman and Crapo, 1982; Halliwell, 1984; Halliwell and Gutteridge, 1989). Ces mécanismes sont présentés dans la chaîne réactionnelle suivante:



Dans le cadre de ce schéma réactionnel, le relargage du radical hydroxyl $\text{OH}\cdot$, très réactif et très toxique, apparaît comme l'entité pouvant initier les mécanismes radicalaires de peroxydation lipidique.

Une seconde réaction, intimement associée à la réaction de Fenton, va participer au recyclage du fer divalent. Elle permet également d'envisager la participation du fer trivalent des surfaces:



D'une manière générale, de tels processus radicalaires sont intensivement étudiés dans les mécanismes de "stress oxydant" (Sies, 1985) pouvant conduire à l'inflammation des tissus, à la fibrose, au vieillissement cellulaire, au cancer...

Il a été expérimentalement démontré que les surfaces des poussières de pyrite, sidérite, phyllosilicates... étaient effectivement capables de produire des radicaux hydroxyls grâce aux mécanismes précédents. Le modèle expérimental utilisé consiste à mettre ces poussières en présence d'un milieu acellulaire, doté d' H_2O_2 et simulant le milieu lysosomal. On laissera réagir le radical hydroxyl sur une molécule cible puis on détectera les espèces radicalaires générées (plus stables que le radical $\text{OH}\cdot$) par la technique du piégeage de spin en RPE (Résonance Paramagnétique Electronique).

On citera, en référence à ce modèle, les nombreux travaux du groupe "Solides et Cancérogénèse" de l'Université P. et M. Curie (Zalma et al. 1987a, 1987b; Costa, 1989; Costa et al., 1989a, 1989b, Pézerat, 1991; Dzwigaj, et al., 1993; Guignard et al., 1993a, 1993b). Ces travaux sont consacrés aux phases minérales qui nous intéressent dans le cas des mines de charbon. La présence d'espèces radicalaires à la surface des silices a également fait l'objet de nombreuses études (voir Fubini et al., 1989). Mais ces travaux sont consacrés aux propriétés oxydo-réductrices des surfaces de nombreuses autres poussières: amiantes et substituts, mines de fer, mines d'or ...

Les propriétés oxydo-réductrices de surface doivent également être présentées en terme de **biodisponibilité des toxiques** à l'interface solide/milieu biologique. Elle nécessite de prendre en considération l'accessibilité aux sites actifs de surface (par exemple le fer divalent), mais aussi les mécanismes de lixiviation des surfaces pouvant conduire à un relargage du fer (ou des métaux lourds).

L'accessibilité au fer divalent doit être considérée en fonction:

- de la nature des différentes phases minéralogiques,
- des mécanismes de passivation et d'activation des surfaces,

- des processus permettant *in vivo* l'accès et le renouvellement du fer à la surface des particules.

Ces aspects ont été étudiés par le groupe "Solides et Cancérogénèse" cité ci-dessus. On retiendra de leurs travaux que l'accessibilité au fer divalent est, en premier lieu, plus facile à envisager dans le cas de la pyrite ou la sidérite que pour les phyllosilicates (micas et chlorites). Dans ce dernier cas, seules les faces latérales de l'empilement des feuillets de tétraédres SiO_4 permettra l'accès au fer. Il sera également limité à ce niveau aux différentes couches contenant du fer divalent: couches brucitiques Mg-Fe(OH)_2 de la chlorite, fer divalent en substitution de l'aluminium des micas... On voit donc que la nature de l'environnement minéralogique du fer peut déjà moduler les propriétés oxydo-réductrices des surfaces. On comprendra aussi, en terme de biodisponibilité, l'intérêt à vérifier si l'enrichissement en fer des micas associés aux charbons se rapporte à un fer en position intercalaire.

Les travaux du groupe précédemment cité ont permis de démontrer que l'oxydation à l'air des particules (passivation des surfaces) va pouvoir diminuer (cas de la sidérite par exemple) mais aussi exacerber l'activité des poussières dans le modèle acellulaire (cas de la pyrite notamment). En effet, des mécanismes d'activation des surfaces vont restituer ou faciliter l'accès au fer: dissolution partielle de la couche passivante (solubilisation des sulfates de la pyrite oxydée) et éventuelle amplification par de la coprécipitation (phosphates de Mg-K pour la couche brucitique des chlorites).

De tels mécanismes, ainsi que la présence en milieu biologique de molécules réductrices ou complexantes, vont participer à l'activation *in vivo* des surfaces. La participation du fer d'origine biologique (fer endogène) et l'existence de mécanismes de type catalytique ont été envisagés afin d'expliquer la chronicité des effets biologiques observés.

Pour la biodisponibilité par lixiviation de surface, on se rapportera aux études de relargage du fer (ou des métaux lourds) faites sur des charbons:

- mesures des concentrations élémentaires dans les eaux de drainage d'une veine de charbon et observation des taux de relargage suivants: $\text{Mn} > \text{Zn} > \text{Pb} > \text{Fe} > \text{Ni} > \text{Cu} > \text{Co}$ (Valkovic, 1983).
- mise en évidence d'un fer hautement dialysable dans les anthracites de Pennsylvanie (Morrow et al, 1982).

Des essais d'éluotion par des milieux très diversifiés (solution acides/basiques, solution physiologique, milieu Gamble, liquide recueilli par lavage broncho-alvéolaire de rats, sérum humain) ont été effectués sur des charbons de Pennsylvanie (haut rang et haut risque de pneumoconiose) et de l'Utah (bas rang, bas risque). Elles ont déjà mis en évidence les propriétés chélatantes et le pouvoir d'inhibition enzymatique des éluats (Kober et al., 1976). Elles ont montré, en accord avec les données épidémiologiques, une inhibition de croissance cellulaire plus prononcée pour les charbons de Pennsylvanie et liée à la teneur en nickel de l'éluat (Christian et al., 1979). A l'inverse, les éluotions du fer et du nickel étaient nulles ou moindres pour les charbons de l'Utah (Nord and Bingham, 1973).

On notera, pour le fer et le nickel, une biodisponibilité potentielle en relation avec le rang du charbon. Ces observations sont également en faveur d'une prédisposition des métaux lourds à participer aux processus d'inhibition enzymatique. Dans le cadre des processus oxydants évoqués ci-dessus, une mise en commun des arguments d'accessibilité du fer divalent et des observations sur le relarguage du fer des charbons permet d'imaginer un effet de synergie.

Des observations convergentes à cette conclusion ont été faites sur les amiantes. Les propriétés oxydo-réductrices de ces matériaux sont mises en relation avec la présence de fer à la surface des fibres. L'aptitude des amiantes à la biodégradation et au relarguage *in vitro* et *in vivo* de fer a été établie (Holmes and Morgan, 1967; Jaurand et al., 1977, Parry, 1985; Morgan and Holmes, 1986). Il a récemment été démontré qu'une mobilisation du fer des amiantes par des chélateurs (Lund and Aust, 1990) exacerbe ses propriétés oxydo-réductrices (Lund and Aust, 1991a).

On rappellera, dans ce contexte, nos observations à propos des poussières récupérées sur poumons de mineurs qui suggèrent un relarguage du fer en milieu pulmonaire, apparemment sélectif et en relation avec la gravité de la fibrose (chapitre 7). On pourrait déjà tenter d'établir une relation causale entre la fibrose (ou sa progression) et les mécanismes radicalaires (ou enzymatiques) précédemment évoqués.

Mais il faudrait tenir compte non seulement de la production des espèces activées de l'oxygène, mais aussi de l'activation du macrophage et des autres cellules inflammatoires, de la persistance à long-terme de l'inflammation, du relarguage de cytokines et de facteurs de croissance ... (Hunninghake et al., 1984; Donaldson et al., 1984; Voisin et al, 1987; Bégin et al. 1989; Hubbard, 1989; Gosset et al., 1991) (voir chapitre 1). Le rôle en fibrose (et sa progression) de cette cascade de réactions biologiques et moléculaires est

indéniable mais obscur. Il fait intervenir des réponses de "stress moléculaire" au stress oxydant induit par les particules inorganiques. On peut citer, entre autre, une altération des défenses anti-oxydantes telles que les enzymes anti-oxydantes (Mn-superoxyde dismutase...) (Janssen, 1993).

On essaiera, à la lumière de nos résultats, d'apporter une éventuelle contribution quant au rôle en pathogénèse du fer et des mécanismes radicalaires (ou enzymatiques). On choisira, à ce stade de l'approche étiopathogénique, de limiter leurs effets à la cytotoxicité des particules et de poursuivre la discussion en terme de **toxicocinétique des particules**.

On argumentera cette restriction en se rapportant aux résultats de l'étude comparative des tests de nocivité (voir tableau 6.10). Ils indiquent déjà que les tests *in vitro* (de cytotoxicité) répondent particulièrement à la présence de fer: 7 tests sur 8 (en éliminant les 4 tests qui ne présentent aucune corrélation avec les paramètres de la matière minérale).

Le cortège des tests *in vivo* quantitatifs répondant à la présence de fer (combinaisons d'éléments AlKFe et FeX) se rapporte plus à une mesure de réponse pulmonaire ou ganglionnaire que de fibrose (poids de poumon, poids des ganglions...). Parmi les tests *in vivo* pulmonaires, seul le test SK6 apparaît très fortement influencé par la présence de fer ($r = 0.82$, $p < 0.01$). Il paraît capital, à ce stade de la discussion, de rappeler que le test SK6 mesure le poids des poussières recueillies dans les ganglions après application intratrachéale d'une dose unique de poussières (voir tabelau 6.4). Il reflète une réaction d'élimination pulmonaire des poussières au travers de l'interstitium et vers les ganglions lymphatiques (lymphotropisme).

Une mise en commun de ces deux composantes décrit donc le fer comme responsable de la cytotoxicité et, simultanément, de la translocation des poussières. Cette conclusion est en accord avec les observations d'autres auteurs qui ont montré que la pénétration ganglionnaire des poussières est gouvernée par leur cytotoxicité (Bruch, 1985, 1987; Bruch and Hilscher, 1988).

Leurs travaux ont permis d'élaborer un modèle toxicocinétique de translocation des particules où, à partir d'un dépôt primaire alvéolaire, se forme un dépôt secondaire localisé dans un compartiment plus profond du poumon (interstitium, système lymphatique). Le dépôt secondaire des particules déterminera la dose effective des poussières ayant atteint l'organe cible et, finalement, les effets observés à ce niveau.

Mais la notion de cytotoxicité des poussières donne un caractère paradoxal à ce modèle. En effet, la cytotoxicité des particules peut conduire à la nécrose cellulaire (ou la mort cellulaire avec libération des particules phagocytées) pour ainsi diminuer l'aptitude du macrophage à éliminer les particules. Mais elle se traduit simultanément par une augmentation de la durée du séjour alvéolaire des particules. Un mécanisme continu de phagocytose/libération/re-phagocytose pouvant expliquer l'élimination pulmonaire a été évoqué (Bruch, 1985). Il se traduirait par un effet de "dilution" des particules sur la population des macrophages continuellement recrutés pour, finalement, restituer leur aptitude à l'élimination pulmonaire des particules.

Ce modèle est convergent avec les travaux ayant montré l'absence de relation directe entre la cytotoxicité des particules (propriétés de lyse macrophagique) et leur aptitude à activer les macrophages alvéolaires humains (Wallaert et al., 1990). En effet, les macrophages récupérés par lavage broncho-alvéolaire sur poumons de pneumoconiosés sont chargés en poussières, même plusieurs années après cessation de l'exposition. Des mécanismes continus de phagocytose/cytolyse/re-phagocytose des particules ont également été évoqués par ces auteurs pour expliquer la durée de séjour pulmonaire des particules. Les macrophages alvéolaires finalement récupérés sur les poumons sont bien vivants et activés (relarguage de médiateurs cellulaires, d'oxydants...).

On peut également, dans le cadre de la toxicocinétique des particules, faire référence aux mécanismes radicalaires liés au fer des amiantes qui ont fait l'objet des plus nombreuses études. L'internalisation des fibres dans les cellules épithéliales ou leur cytotoxicité sont étudiées en relation avec les mécanismes de production d'espèces activées de l'oxygène à la surface de ces matériaux (voir Lund and Aust, 1991b). Il a été expérimentalement démontré que ces propriétés peuvent être inhibées en présence d'anti-oxydants (superoxyde dismutase...) ou grâce au pré-traitement des fibres par des chélateurs du fer (desferrioxamine B...).

Ces considérations toxicocinétique d'élimination au travers de l'interstitium pulmonaire permettent raisonnablement d'envisager que survienne, après séquestration interstitielle des particules, une fibrose pulmonaire induite par l'accumulation interstitielle:

- des particules contenant du fer (qui seraient fibrogènes ou non),
- des particules de quartz "pur" (dont le pouvoir fibrogène est indéniable),
- voire, à l'extrême, de toute autre particule.

Ces 3 cas de figures suggèrent que l'élimination des particules cytotoxiques (contenant du fer) puisse faciliter la pénétration interstitielle des autres particules. Cette hypothèse permet ainsi d'attribuer au fer un rôle fibrosant indirect (*via* les mécanismes radicalaires ou enzymatiques de cytotoxicité et de translocation des particules) plutôt qu'une fibrogénicité propre.

On comprendra ainsi la définition des paramètres de nocivité indépendants du quartz (chapitre 8.3) qui avait été étendue aux paramètres dépourvus d'une nocivité (fibrogénicité) propre, mais dont la présence permet au quartz d'exprimer sa nocivité spécifique.

Le pouvoir fibrogène propre aux minéraux des poussières de mines contenant du fer (divalent) reste à établir par des expérimentations sur l'animal, mais en tenant compte de la physico-chimie de l'élément. On retiendra, dans l'état actuel des connaissances, que la majorité des minéraux de "référence" testés en nocivité (muscovite, kaolinite, feldspaths...) apparaissent comme cytotoxiques, mais bien moins fibrogènes que le quartz (Adamis and Timar, 1981; Gormley and Addison, 1983; Behrendt and Hilscher, 1989). La chlorite, la sidérite ou la pyrite n'ont, jusqu'à présent, pas retenu d'attention dans ces études.

Mais on retiendra surtout certains travaux consacrés aux interactions entre différentes phases minérales. Ils ont montré qu'un minéral doué de propriétés fibrogènes intrinsèques (anhydrite en application intra-trachéale, par exemple) se comportait très différemment selon la nature des phases minérales qui lui sont associées (Rosmanith et al., 1987, 1989; Weller and al., 1987; Rosmanith and Weller, 1991; Brammertz et al., 1992). L'anhydrite sera ainsi capable d'inhiber le pouvoir fibrosant du quartz ou de poussières de mines. En revanche, elle sera incapable d'inhiber et va même intensifier la fibrose induite par certains activateurs de durcissement des matériaux de construction utilisés dans les mines. On précisera que ces activateurs sont à base de sulfates de fer et de potassium. Ces études ont montré que les interactions entre minéraux ne peuvent pas être calculées en terme purement additifs.

Il reste enfin, dans un cadre étiopathogénique, à mentionner les études de relargage de médiateurs cellulaires élicité par les minéraux chargés de fer des poussières de mine. On notera, dans l'état de nos connaissances de la littérature scientifique, que ces études sont inexistantes. On mentionnera toutefois les essais préliminaires de relargage de TNF α (Tumor Necrosis Factor, voir chapitre 1) aimablement effectués par le Professeur P.G.

Munder (Institut Max Planck d'Immunobiologie, Freiburg). Ils ont permis de montrer que certaines sidérites étaient capables d'induire un relargage anormalement élevé de TNF par des macrophages. Celui-ci n'était pas neutralisable par l'addition d'anti-corps anti-TNF. Cet effet est resté inexplicable jusqu'à présent.

○○○○○○○○○○

CHAPITRE 10

Conclusion et perspectives d'applications en hygiène industrielle

La présente étude de caractérisation par microsonde LAMMA de poussières de mine de charbon propose d'attribuer un rôle déterminant au fer (et/ou métaux lourds) associé à la fraction minérale de ces poussières. Les résultats expérimentaux sont étayés par des corrélations avec les données de nocivité des poussières de mine ou certaines données épidémiologiques. Au-delà des limites, en terme de causalité, d'une approche par corrélations, les résultats convergent avec les connaissances récentes tirées de la littérature scientifique.

Ces considérations suffisent à justifier une demande de **validation physico-chimique et toxicologique** quant à l'hypothèse d'une nocivité spécifique au fer (et/ou métaux lourds) des poussières de mine de charbon.

La validation physico-chimique devra s'orienter sur l'environnement physico-chimique de ces éléments. La matière minérale des poussières de mine de charbon devra faire l'objet d'analyses minéralogiques avancées et d'études de la spéciation des degrés d'oxydations. Les conditions géologiques (origine paralique ou limnique des charbons, influences volcaniques...) pouvant conduire à l'enrichissement en fer de la matière minérale mériteraient d'être considérées.

Les propriétés oxydantes de la matière minérale et son aptitude à relarguer des espèces activées de l'oxygène devront être confirmées. Des essais de mobilisation du fer en milieu simulant le milieu cellulaire (ou pulmonaire) permettraient d'affirmer la biodisponibilité du fer. L'hypothèse d'un fer en position intercalaire dans les micas associés aux charbons reste à démontrer.

On précisera surtout que ces études nécessiteront l'accès à une banque de minéraux prélevés dans les différents bassins ou veines de charbon. On peut, à ce titre, placer de nombreux espoirs dans l'actuel "programme de recherche H1" initié à la Commission des Communautés Européennes par le Professeur K. Robock. On y aura pris soin, lors de la campagne de prélèvement des poussières de mine, à échantillonner la matière minérale des épontes de différents horizons stratigraphiques. Ceux-ci ont déjà été soumis à un examen minéralogique et pétrographique.

La validation toxicologique de notre hypothèse pourra également bénéficier de tels échantillons. Elle nécessite d'évaluer la cytotoxicité et la fibrogénicité des minéraux chargés de fer puis d'attribuer cette nocivité au fer di- ou trivalent. Des études d'interactions entre minéraux (tests avec ou en absence de quartz...) permettraient de décomposer la nocivité attribuable aux différentes phases minérales des poussières de mine. La réponse apparemment spécifique des 3 familles de tests aux différentes combinaisons d'éléments devra être élucidée.

Mais ces études *in vitro* et *in vivo* devront se concentrer sur des aspects peu considérés jusqu'à présent. Un plan expérimental rigoureux (tenant compte de "l'effet test") devra être établi afin d'étudier, par exemple, le relargage du fer, la fraction séquestrée dans l'interstitium ou les poussières ayant migré vers le système lymphatique... Une telle approche permettra de cerner le rôle du fer dans la toxicocinétique des poussières mixtes.

Une étude au niveau cellulaire et moléculaire de la réponse inflammatoire (relargage de cytokines et autres médiateurs cellulaires, d'oxydants, de protéases...) devra confirmer la réponse macrophagique au fer. Mais elle devra également s'orienter sur les interactions du fer avec d'autres acteurs à rôle pro-inflammatoire, pro-fibrogène ou immunorégulateur (lymphocytes, polynucléaires...) afin d'explorer le devenir biologique du fer relargué.

Enfin, il reste à rappeler que la validation de notre hypothèse restera un problème entier en terme de spécificité des paramètres validés. Elle ne pourra être rapportée qu'au modèle animal ou aux modèles, récemment élaborés, de cellules humaines en culture pour, finalement, dépendre d'un "effet test". On sera restreint par les limites de l'extrapolation des résultats du modèle animal à l'homme et par toutes les difficultés à modéliser une pathologie à caractère chronique. Cette validation se ferait donc dans les limites de l'épidémiologie actuelle ou, peut-être, dans le cadre de la naissante épidémiologie moléculaire.

Les **perspectives d'applications en hygiène industrielle** de notre approche méthodologique concernent d'abord les autres industries extractives, notamment celles concernées par des problèmes de silicose vraie. Le schéma de classification des particules de quartz servirait de base à la caractérisation de poussières silicogènes exposant les carriers, tunneliers... au risque de pneumoconiose.

Mais d'une manière générale, ces perspectives couvrent plusieurs domaines de l'hygiène industrielle: la mesure des poussières, la détermination de leurs caractéristiques (physico-

chimiques et toxicologiques), l'élaboration de modèles dosimétriques et l'étude des facteurs d'ambiance.

Les études comparatives de l'instrumentation d'échantillonnage des poussières (Vincent, 1991) pourraient bénéficier de notre approche méthodologique: comparaison entre poussières prélevées sur échantillonneurs statique et personnel, comparaison des différentes fractions granulométrique (thoraciques et respirables)... Cette instrumentation pourrait être validée par comparaison avec la fraction alvéolaire récupérée sur poumon animal ou humain.

La caractérisation physico-chimique des poussières mixtes par les méthodes analytiques conventionnelles est actuellement la seule voie raisonnablement applicable dans un programme de surveillance d'empoussiérage. Mais la justesse d'une telle caractérisation pourrait être améliorée grâce à notre approche méthodologique. On citera, par exemple, le cas de la sous-estimation des carbonates dans les poussières mixtes (voir discussion précédente). L'étude de la contribution à l'empoussiérage des substances d'origine non-minière peut être abordée (résidus diesels...).

On peut même envisager, dans un avenir proche, la mise au point de méthodes "on-line" et "on-site" de caractérisation des poussières. On citera, à ce titre, les récents travaux réalisés par les groupes de l'université de Delaware (Mac Keown et al., 1991; Thomson and Murphy, 1993, Johnston et al., 1993), de l'Université de Delft (Kievit et al., 1992) ou de l'Université de Düsseldorf (Hinz et al., 1993). Ils se consacrent au développement de la technologie LAMPAS (LAsEr Microprobe mass analyser for Particles in the Airborne State). Elle doit permettre d'effectuer simultanément le prélèvement et l'analyse des particules atmosphériques. Fondamentalement basée sur le prélèvement par pompage différentiel, l'ionisation laser et la spectrométrie de masse à temps de vol, cette technologie est vouée à la caractérisation des particules individuelles dans leur état naturel (car sans aucun recours préliminaire à l'impaction sur un support analytique). De très récents résultats ont montré la faisabilité de la méthode car ils ont permis de discriminer dans l'air prélevé en laboratoire des particules d'aérosols tels que la fumée de tabac, la suie ou des particules métalliques (Hinz et al., 1993).

Une confirmation de l'hypothèse aurait une conséquence pratique en hygiène industrielle car elle servirait à l'élaboration des tests de nocivité. Ceux-ci doivent être simples, rapides et peu onéreux. Ils doivent fournir des résultats pouvant se substituer aux données épidémiologiques afin de pouvoir apprécier au plus tôt les effets de la lutte technique contre l'empoussiérage ou détecter les anomalies d'exposition. On rappellera, dans le cas des poussières de mine de charbon par exemple, qu'on manque actuellement

de tests de nocivité suffisamment sensibles pour évaluer la nocivité à long-terme des poussières (Le Bouffant, 1990). Nous rajouterons que la spécificité des tests reste déterminante. Dans le cas d'une validation de notre hypothèse, on pourrait ainsi éliminer de la batterie des tests de nocivité ceux qui ne répondent pas à la présence de fer. Dans le cas contraire, on aurait appris que la majorité des tests actuellement utilisés sont biaisés par la présence du fer, donc fondamentalement inaptes à tester la nocivité réelle des poussières.

Les études de la cinétique d'accumulation pulmonaire des poussières s'intéressent aux mécanismes d'élimination et de rétention des particules. La fraction alvéolaire des particules inhalées (ou fraction des particules respirables effectivement déposées dans l'alvéole pulmonaire) reste très délicate à étudier. Elle mériterait même d'être scindée en termes de fraction intra-alvéolaire et de fraction interstitielle. Mais seule une approche *in situ* permettrait une telle distinction.

Les capacités analytiques de la microsonde LAMMA et les résultats d'essais préliminaires sur coupes de tissus pulmonaires (résultats non-présentés) ont montré la faisabilité d'une étude *in situ*. On rappellera également que l'étude des poussières récupérées sur poumons de mineurs (chapitre 7) permet déjà d'envisager l'utilisation du calcium comme marqueur de la fraction séquestrée dans l'interstitium. Notre approche méthodologique pourrait donc contribuer à l'élaboration des modèles dosimétriques. En effet, ces derniers nécessitent d'appréhender les effets cumulés de la charge coniotique du poumon, de la toxicocinétique (rétention interstitielle des particules) et du "transfert de nocivité" en milieu pulmonaire (Vincent, et al., 1987; Vincent and Donaldson, 1990).

L'élaboration des valeurs limites d'exposition à l'empoussiérage reste l'objectif premier en hygiène industrielle. Le concept de nocivité spécifique doit permettre de reconnaître et classer les poussières dangereuses. Il s'agit donc de décomposer la nocivité des poussières mixtes afin de déterminer les paramètres à prendre effectivement en compte dans une valeur limite d'empoussiérage. Mais, dans l'état actuel des connaissances, seule la concentration en particules respirables est un paramètre facile à cerner. On essaiera d'imaginer, dans le cadre de l'industrie minière en général, l'impact d'une validation de l'hypothèse d'une nocivité spécifique au fer des poussières. Elle pourrait servir à l'élaboration de valeurs limites d'exposition sur les bases scientifiques suivantes:

- les **mesures relatives à l'exposition** (concentrations en poussières respirables, durées d'exposition...),

- les **modèles dosimétriques** ayant permis d'élaborer des paramètres de toxicocinétique (élimination, translocation, rétention des particules...),
- un **principe toxique** dont la spécificité physico-chimique va moduler les effets sur le modèle animal (et l'homme),
- enfin, un **paramètre de correction** de "l'effet test" lié aux incontournables biais des modèles *in vitro* et *in vivo* de nocivité expérimentale.

Une lecture (voir annexe) du Mémoire relatif à l'établissement d'un sixième programme de recherche en matière d'"hygiène industrielle dans les mines" (paru au Journal Officiel des Communautés Européennes daté du 22 Janvier 1991) soulignera l'urgente demande existant pour de telles applications. Elle permettra également de situer le cadre dans lequel s'inscrit le présent travail, l'importance des objectifs atteints et ... l'étendue du travail restant à faire!.

○○○○○○○○○○

ANNEXE

Extraits du:

Mémoire relatif à l'établissement d'un sixième programme de recherche en matière d'"hygiène industrielle dans les mines"

JO n° C14 du 22. 1. 1991, p. 8

2. Mesure des poussières et détermination de leurs caractéristiques

- ...

- Les progrès de la technologie et des méthodes d'analyses devront être mis à profit pour mieux connaître la composition des poussières, leurs caractéristiques de surface et leur effet biologique. Une attention particulière devrait être également portée aux poussières provenant de substances non minières et à leur interaction possible avec les poussières minières. Une étude détaillée de la nature et des teneurs en constituants minéraux et organiques des poussières de nombreuses couches ainsi que leurs propriétés physico-chimiques de surface doit être poursuivie afin de pouvoir apporter de plus amples informations sur la variation du risque pneumoconiotique. Par ailleurs, de nouvelles générations d'échantillonneurs ainsi que certains appareils plus anciens ont été soumis à un examen critique comparatif au cours d'une étude communautaire. De tels instruments devraient être retenus pour de nouvelles études.

- Des modèles dosimétriques incorporant les types d'activité du sujet et les facteurs pathogènes, physico-chimiques ou biologiques de la poussière devront être élaborés pour d'une part, quantifier le risque coniotique et d'autre part, fixer des normes pour réduire le risque de maladie au minimum.

- ...

3. Facteurs d'ambiance et affections d'origine professionnelle

- ...

- On essayera d'établir des bases scientifiques (études biophysiques et biochimiques) permettant d'élaborer des valeurs limites d'empoussiérement pour les poussières mixtes et leurs composants.

- ...

- Poursuite des études relatives à la nocivité à long terme des poussières et des facteurs susceptibles de l'influencer (horizons stratigraphiques, compositions minéralogiques, granulométrie, propriétés de surface, etc.) de manière à acquérir une meilleure connaissance de la relation entre l'empoussiérement et l'apparition de troubles respiratoires. Les interactions et/ou synergies possibles de ces poussières respirables silicogènes devraient être recherchées.

D'une manière générale, tous les thèmes de recherche de ce paragraphe seront étroitement coordonnés avec le cinquième programme de recherches médicales de la CECA (JO n° C47 du 19.2. 1988, p. 6.), en raison des deux différentes approches des problèmes et des résultats: l'une physico-chimique et hygiéniste et l'autre médicale.

Littérature

- AALTO M. and KULONEN E. (1979): Fractionation of connective-tissue-activating factors from the culture medium of silica-treated macrophages, *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Section C*, 87, 241-250.
- ABRAHAM J.L. (1978): Recent advances in pneumoconiosis: the pathologist's role in etiologic diagnosis, in: *The Lung*, The Williams & Williams Co. (Eds.), IAP Monograph (Baltimore), 19, 96-137.
- ADAMIS Z. and TIMAR M. (1980): Investigations of the effects of quartz, aluminium silicates and colliery dusts on peritoneal macrophages in vitro, in: *In vitro Effects of Mineral Dusts*, Brown R.C., Chamberlain M. and Davies R. (Eds.), Academic Press (London), 13-18.
- ADDISON J., MILLER B.G., PORTEOUS R.H., DODGSON J. and ROBERTSON A. (1990): Shape, size and composition of coalmine dusts in relation to pneumoconiosis in British coalmines, in: *IOM-Report No. TM/90/10*, Institute of Occupational Medicine (Edinburgh).
- AMOUDRU C. (1978): Les pneumoconioses du houilleur, données épidémiologiques, *Ann. Med. France*, 184, 59-62.
- AMOUDRU C. (1987): Les pneumoconioses - Dimension actuelle des Problèmes, in: *Silicose et Pneumoconioses à Poussières Mixtes*, Le Bouffant L. (Ed.), Colloque INSERM, Editions INSERM (Paris), Vol. 155, 3-40.
- ATTFIELD M.D. and MORRING K. (1992): An investigation into the relationship between coal workers' pneumoconiosis and dust exposure in US coal miners, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 53, 486-492.
- ATTYGALLE D. KING E. J., HARRISON C.V. and NAGELSCHMIDT G. (1956): The action of variable amounts of tridymite combined with coal, on the lungs of rats, *Br. J. of Ind. Med.*, 13, 41-50.
- ATUHAIRE L.K., CAMPBELL M.J., COCHRANE A.L., JONES M. and MOORE F. (1985): Mortality of men in the Rhondda Fach 1950-80, *Brit. J. Ind. Med.*, 42, 741-745.
- BALMES J.D. (1990): Silica exposure and tuberculosis: An old problem with some new twists, *J. Occup. Med.* 32, 114-115.
- BARTHS G. and SCHMITZ G. (1985): Die Charakterisierung grubenechter Feinstäube mittels Laser Mikrosonden Massenanalysator (LAMMA) in Korrelation zu ihren zytotoxischen und histotoxischen Potenzen, *Dissertation*, Universität Düsseldorf.
- BAUER H.-D., BRUCKMANN E. und REICHEL G. (1976): Das Fehlen pathologischer Staublungenveränderungen im Bergbau des Salzgittergebietes, *Kompass*, 86, 1-5.
- BÉGIN R., CANTIN A. and MASSÉ S. (1989): Recent advances in the pathogenesis and clinical assessment of mineral dust pneumoconioses: asbestosis, silicosis and coal pneumoconiosis, *Eur. Respir. J.*, 2, 988-1001.
- BEHRENDT H. and HILSCHER W. (1989): Ultrastructural peculiarities in the rat lung following intratracheal administration of muscovite, *Silicosis Report North-Rhine Westphalia* (Essen), 17, 209-212.
- BELT T. H. and KING E.J. (1945): Tissue reaction produced experimentally by selected dusts from South Wales coalminers, in: *Medical Research Council, Chronic pulmonary disease in South Wales coalmines III, Experimental studies*, HM Stationery Office London, 29-68.

BENNETT J.G., DICK J.A., KAPLAN Y.S., SHAND P.A., SHENNAN D.H., THOMAS D.J. and WASHINGTON J.S. (1979): The relationship between coal rank and the prevalence of pneumoconiosis, *Brit. J. Ind. Med.*, 36, 206-210.

BERGMANN I. and CASSWELL C. (1972): Lung dust and lung iron contents of coal workers in different coalfields in Great Britain, *Brit. J. Ind. Med.*, 29, 160-168.

BERRY J.P., HENOC P. and GALLE P. (1978): Phagocytosis by cells of the pulmonary alveoli, *Am. J. Pathol.*, 93, 27-44.

BITTERMANN P.B., RENNARD S.I. and HUNNINGHAKE G.W. (1982): Human alveolar macrophage growth factor for fibroblasts, *J. Clin. Invest.*, 70, 806-822.

BORM P.J.A., MEIJERS J.M.M. and SWAEN G.M.H. (1990): Molecular epidemiology of coal worker's pneumoconiosis: application to risk assessment of oxidant and monokine generation by mineral dusts, *Exp. Lung Res.*, 16, 57-71.

BOYD J.E., COLLINGS P., CROFTON P.M., BLUNDELLI G. and DAVIS J.M.G. (1984): Alpha-1 antitrypsin and lung function in British coalminers, *Brit. J. Ind. Med.*, 41, 455-458.

BRAMMERTZ A., BREINING H., ROSMANITH J. and SCHYMA S.B. (1992): The different effect of natural anhydrite administered intratracheally separately or in dust mixtures in rats, in: *Abstracts Book of the 8th International Conf. on Occup. Lung Diseases*, Prag 14-17. 09.1992, 28.

BRODY A. (1987): Initial fiber interaction with bronchiolar-alveolar epithelium, macrophages and fibroblasts, in: *Silicose et Pneumoconioses à Poussières Mixtes*, Le Bouffant L. (Ed.), Colloque INSERM, Editions INSERM (Paris), 155, 81-92.

BRODY A.R. and HILL L.H. (1982): Interstitial accumulation of inhaled chrysotile asbestos fibers and consequent formation of microcalcifications, *Am. J. Pathol.*, 109, 107-114.

BROWN G.M. and DONALDSON K. (1988): Degradation of connective tissue components by lung derived leucocytes in vitro: role of proteases and oxidants, *Thorax*, 43, 132-139.

BROWN G.M. and DONALDSON K. (1989): Inflammatory responses in lungs of rats inhaling coalmine dust: enhanced proteolysis of fibronectin by bronchoalveolar leukocytes, *Brit. J. Ind. Med.*, 46, 866-872.

BRUCH J. (1985): Korngrößenverteilung und Mineralzusammensetzung von Grubenstäuben als pathogene Faktoren in der Staublungenerkrankung, *Silikosebericht Nordrhein-Westfalen*, Steinkohlenbergbauverein (Essen), 15, 281-299.

BRUCH J. (1987): Value of in vivo and in vitro tests in regard to the evaluation of mixed mine dusts, in: *Silicose et Pneumoconioses à Poussières Mixtes*, Le Bouffant L. (Ed.), Colloque INSERM, Editions INSERM (Paris), 155, 213-226.

BRUCH J., JOOS M.R., REISNER M.T.R. and ROSMANITH J. (1983a): Untersuchungen zur spezifischen Schädlichkeit von Feinstäuben des Steinkohlenbergbaus. XVII. Vergleich der Ergebnisse von Tier- und Zellversuchen, *Silikosebericht Nordrhein-Westfalen*, Steinkohlenbergbauverein (Essen), 14, 241-255.

BRUCH J., SCHARMANN A. und SCHLIPKÖTER H.W. (1983b): Untersuchungen zur spezifischen Schädlichkeit von Feinstäuben des Steinkohlenbergbaus, XIX: Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlußfolgerungen, *Silikosebericht Nordrhein-Westfalen*, Steinkohlenbergbauverein (Essen), 14, 265-279.

- BRUCH J. and HILSCHER W. (1988): Effects of particle size of coal mine dusts in experimental anthracosilicosis. III. Tissue reactions in lymph nodes, *Ann. Occup. Hyg.*, 32, 603-610.
- BRUYET B. (1987): Analyse statistique comparée de différents tests de nocivité effectués sur des poussières de mine de charbon, in: *Silicose et Pneumoconioses à Poussières Mixtes*, Le Bouffant L. (Ed.), Colloque INSERM, Editions INSERM (Paris), 155, 227-240.
- BURREL R. (1972): Immunological aspects of coalworkers' pneumoconiosis, *Ann. NY. Acad. Sci.*, 200, 93-105.
- CAPLAN A. (1953): Certain unusual radiological appearances in the chest of coal-miners suffering from rheumatoid arthritis, *Thorax*, 8, 29-37.
- CARLBERG J.R., CRABLE J.W., LIMTIACA L.P., NORRIS H.B., HOLTZ J.L., MAUER P. and WOLOWICZ F.R. (1971): Total dust, coal, free silica, and trace metal concentrations in bituminous coal miners' lungs, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 32, 432-440.
- CARPENTER R.G., COCHRANE A.L., GILSON J.C., HIGGINS I.T.T. (1956): The relationship between ventilatory capacity and simple pneumoconiosis in coalworkers: the effects of population selection. *Brit. J. Ind. Med.*, 13, 166-176.
- CHRÉTIEN J. (1980): *Pneumologie*, Georg Thieme Verlag (Stuttgart, NY).
- CLARKE N.S. (1989): Laser microprobe mass spectrometry, *Chemistry in Britain, May 1989*, 484-488.
- COCHRANE A.L. (1962): The attack rate of progressive massive fibrosis, *Brit. J. Ind. Med.*, 19, 52-64.
- COCKCROFT A.E., WAGNER J.C., SEAL E.M.E., LYONS J.P. and CAMPBELL M.J. (1982): Irregular opacities in coalworkers' pneumoconiosis: Correlation with pulmonary function and pathology, *Ann. Occup. Hyg.*, 26, 767-787.
- COLLINS H.P.R., DICK J.A., BENNETT J.G., PERN P.O., RICKARDS M.A., THOMAS D.J., WASHINGTON J.S. and JACOBSEN M. (1988): Irregularly shaped small shadows on chest radiographs, dust exposure, and lung function in coalworkers' pneumoconiosis, *Brit. J. Ind. Med.*, 45, 43-55.
- COLLIS E.L. and GILCHRIST J.C. (1928): Effects of dust upon coal trimmers, *J. Industr. Hyg.*, 10, 101-110.
- CORDIER J.F., GRIMAUD J.A., PEYROL S., MOMEX J.F. et BRUNE J. (1987): Aspects généraux des fibroses pulmonaires in: *Silicose et Pneumoconioses à Poussières Mixtes*, Le Bouffant L. (Ed.), Colloque INSERM, Editions INSERM (Paris), 155, 347-359.
- CONZEMIUS R.J. and CAPELLEN J.M. (1980): A review of the applications to solids of the laser ion source in mass spectrometry, *Int. J. of Mass Spectrom. Ion Phys.*, 34, 197-271.
- COSTA D. (1989): Propriétés redox de surface des poussières inorganiques en milieu aqueux. Relations avec leur propriétés cancérogènes et/ou fibrosantes, *Thèse de Doctorat*, Univ. P. et M. Curie, Paris.
- COSTA D., GUIGNARD J. and PÉZERAT H. (1989a): Production of free radicals by non-fibrous materials in a cell-free buffer medium, *Effects of Mineral Dusts on Cells*, Mossman B.T. and Begin R.O. (Eds.), NATO ASI Series H, Springer-Verlag (Berlin, Heidelberg), 30, 189-196.
- COSTA D., GUIGNARD J., ZALMA R. and PÉZERAT H. (1989b): Production of radical arising from the surface activity of minerals and oxygen. Part I. Iron mine ores, *Toxicol. Ind. Health*, 5, 1061-1078.

CHRISTIAN R.T., NELSON J.B., CODY T.E., LARSON E. and BINGHAM E. (1979): Coal workers' pneumoconiosis: in vitro study of the chemical composition and particle size as causes of the toxic effects of coal, *Environ. Res.*, 20, 358-365.

DALAL N.S., SURYAN, M.M., VALLYATHAN V., GREEN F.H.Y., JAFARI B. and WHEELER R. (1989): Detection of reactive free radicals in fresh coal mine dust and their implication for pulmonary injury, *Ann. occup. Hyg.*, 33 (1), 79-84.

DAVIS J.M.G. (1970): Asbestos dust as a nucleation center in the calcification of old fibrous tissue lesions, and the possible association of this process to the formation of asbestos bodies, *Exp. Mol. Pathol.*, 12, 133-147.

DAVIS J.M.G., CHAPMAN J., COLLINGS P., DOUGLAS A.N., FERNIE J., LAMB D., OTTERY J. and RUCKLEY V.A. (1979): Autopsy studies of coalminers' lungs, in: *IOM-Report No. TM/79/9*, Inst. of Occup. Med. (Edinburgh).

DAVIS J.M.G., ADDISON J., BRUCH J., BRUYÈRE S., DANIEL H., DEGUELDRE G., DODGSON J., GADE M., GORMLEY I.P., LE BOUFFANT L., MARTIN J.-C., REISNER M., ROBOCK K. and SCHLIEPHAKE R.W. (1982): Variations in cytotoxicity and mineral content between respirable mine dusts from the Belgian, British, French and German coalfields, *Ann. Occup. Hyg.*, 26 (1-4), 541-549.

DAVIS J.M.G., CHAPMAN J., COLLINGS P., DOUGLAS A.N., FERNIE J., LAMB D. and RUCKLEY V.A. (1983): Variations in the histological patterns of the lesions of coal workers' pneumoconiosis in Britain and their relationship to lung dust content, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 128, 118-124.

DAVIS J.M.G., ADDISON J., BROWN G.M., JONES A.D., MAC INTOSH C., MILLER B.G. and WHITTINGTON M. (1991): Further studies on the importance of quartz in the development of coalworkers' pneumoconiosis, in: *IOM-Report No. TM/91/05*, Inst. of Occup. Med. (Edinburgh).

DEVULDER B., MARTIN J.C., PLOUVIER B., LE BOUFFANT L. et TACQUET A. (1977): Conceptions physiopathologiques actuelles des fibroses pulmonaires progressives. Recherches expérimentales, *Acta Tuberc. Pneumol. Belg.*, 68, 413-428.

DE WAELE J.K.E. and ADAMS F.C. (1986): Laser-microprobe mass analysis of fibrous dusts, in: *Physical and Chemical Characterization of Individual Airborne Particles*, Spurny K.R. (Ed.), Ellis Horwood Limited (Chichester), 271-297.

DOLGNER R., EINBRODT H.J., HOER P.W., KLOSTERKÖTTER W., LEITERITZ H. und SCHLIPKÖTER H.W. (1967): Untersuchungen zur Festlegung von Staubgrenzwerten, *Fortschritte der Staublungen-Forschung*, 2, 361-371.

- DONALDSON K., DAVIS J.M.G. and JAMES K. (1984): Asbestos-activated peritoneal macrophages release a factor(s) which inhibits lymphocyte mitogenesis, *Environ. Res.*, 35, 104-114.

DOUGHTY D.A. and DWIGGINS C.W. Jr. (1973): Characterization of the valence state of iron in coal dust, in: *Rep. Invest.*, 7726, US. Bureau of Mines.

DOUGLAS A.N., ROBERTSON A., CHAPMAN J.S. and RUCKLEY V.A. (1986): Dust exposure, dust recovered from the lung, and associated pathology in a group of British coalminers, *Br. J. Ind. Med.*, 43, 795-801.

DUBOIS C., BISSONETTE E. and ROLA-PLESZCZYNSKI M. (1989): Leukotriene and Tumor Necrosis Factor production after in vitro exposure of rat alveolar macrophages to mineral dust: a potential role in fibrogenesis, in: *Effects of Mineral Dusts on Cells*, Mossman B.T. and Begin R.O. (Eds.), NATO ASI Series H, Springer-Verlag (Berlin, Heidelberg), 30, 359-366.

- DZWIGAJ S., PÉZERAT H., WASTIAUX A., SÉBASTIEN P. and HONNONS S. (1993): Silica and silicosis mechanism. The role of surface properties of particles and of the silica-supported iron, in: *Proc. 8th International Conference on Occupational Lung Diseases*, Hurych J., Lesage M., David A. (Eds.), ILO (GENEVA), III, 1186-1197.
- EINBRODT H.J. (1967): Der Eisengehalt der Lungenstäube von Steinkohlenbergleuten, *Silikosebericht Nordrhein-Westfalen*, Verlag Glückauf GmbH (Essen), 6, 93-94.
- ELIAS J.A. (1988): Tumor necrosis factor interacts with interleukin-1 and interferons to inhibit fibroblast proliferation via fibroblast prostaglandin-dependent and independent mechanisms, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 138, 652-658.
- FAULDS J.S., KING E.J. and NAGELSCHMIDT G. (1959): The dust content of the lungs of coal workers from Cumberland, *Brit. J. Ind. Med.*, 16, 43-50.
- FREEMAN B.A. and CRAPO J.D. (1982): Biology of disease. Free radicals and tissue injury, *Lab. Invest.*, 47 (5), 412-426.
- FUBINI B. (1993): The possible role of surface chemistry in the toxicity of inhaled fibers, in: *Fiber Toxicity*, D. Warheit (Ed.), Academic Press.
- FUBINI B., BOLIS V., GIAMELLO E., PUGLIESE L. and VOLANTE M. (1989): The formation of oxygen reactive radicals at the surface of the crushed quartz dusts as a possible cause of silica pathogenicity, in: *Effects of mineral Dusts on Cells*, B.T. Mossman, Bégin R.O. (Eds.), Springer-Verlag (Berlin, Heidelberg), NATO ASI Series, Vol H30, 205-214.
- FUBINI B., VOLANTE M., GIAMELLO E. and BOLIS V. (1992): The role of surface in the pathogenicity of mineral dusts and fibres: some open questions, in: *Proc. 8th Int. Conf. on Occup. Lung Diseases*, Hurych J., Lesage M. and David A. (Eds.), ILO (Geneva), III, 1180-1185.
- GERNEZ-RIEUX C., TACQUET A., VOISIN C. et DEVULDER B. (1965): Le rôle des infections dans la pathogénie des fibroses massives progressives des mineurs de charbon, *Med. Lav.*, 56, 500-516.
- GORMLEY I.P., COLLINGS P., DAVIS J.M. and OTTERY J. (1979): An investigation into the cytotoxicity of respirable dusts from British collieries, *Br. J. Exp. Pathol.*, 60, 526-536.
- GORMLEY I.P. and ADDISON J. (1983): The in vitro cytotoxicity of some standard clay mineral dusts of respirable size, *Clay Miner.*, 18, 153-163.
- GGOSSELIN B. et LE BOUFFANT L. (1987): Les fibroses à poussières mixtes. Aspects anatomo-pathologiques in: *Silicose et Pneumoconioses à Poussières Mixtes*, Le Bouffant L. (Ed.), Colloque INSERM, Editions INSERM (Paris), 155, 361-369.
- GOSSET P., LASSALLE P., VANHÉE D., WALLERT B., AERTS C., VOISIN C. and TONNEL A.B. (1991): Production of tumor necrosis Factor- α and Interleukin-6 by human alveolar macrophages exposed in vitro to coal mine dust, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 5, 431-436.
- GRITTER H.L., ADAMSON Y.R. and KING G.M. (1986): Modulation of fibroblast activity by normal and silica exposed alveolar macrophages, *J. Pathol.*, 148, 263-271.
- GUEST L. (1978): The endogeneous iron content, by Mössbauer spectroscopy, of human lungs-II. Lungs from various occupational groups, *Ann. Occup. Hyg.*, 21, 151-157.
- GUIGNARD J., NEJJARI A., ZALMA R., FOURNIER J. and PEZERAT H. (1993a): Divalent iron containing dust, oxidative stress and relation with etiopathogenesis of some occupational lung cancers, in: *Proc. 8th International Conf. on Occup. Lung Diseases*, Hurych J., Lesage M., David A. (Eds.), ILO (Geneva), III, 1325-1330.

GUIGNARD J., PÉZERAT H., VOLANTE M. and FUBINI B. (1993b): Synthetic mineral fibers may trigger an oxidative stress. Possible relationship with the risk of lung cancer, in: *Proc. 8th International Conf. on Occup. Lung Diseases*, Hurych J., Lesage M., David A. (Eds.), ILO (Geneva), 1, 497-502.

HACHIMI A., POITEVIN E., KRIER G., MULLER J.F., PIRONON J. and KLEIN F. (1993): Extensive study of oxidation states of chromium in particles by LAMMA and Raman microprobes: application to industrial hygiene, *Analisis*, 21, 77-82.

HALLIWELL B. (1984): Oxygen radicals: a commonsense look at their nature and medical importance, *Med. Biol.*, 62, 71-77.

HALLIWELL B. and GUTTERIDGE J.M.C. (1989): The role of iron in free radical reactions, in: *Medical, Biochemical and Chemical Aspects of Free Radicals*, Hayaishi O., Niki E., Kondo M., Yoshikawa T. (Eds.), Elsevier (Amsterdam, NY), 21-32.

HEPPLESTON A.G. (1951): Coal workers' pneumoconiosis, *Arch. Ind. Hyg. and Occup. Med.*, 4, 270-288.

HEPPLESTON A.G. (1991): Minerals, fibrosis, and the lung, *Environ. Health Perspec.*, 94, 149-168.

HEPPLESTON A.G. and STYLES J.A. (1967): Activity of macrophage factor in collagen formation by silica, *Nature*, 214, 521-522.

HILLENKAMP F. (1985): Laser desorption mass spectrometry: A review, in: *SIMS V*, Benninghoven A. (Ed.), Springer Series in Chemical Physics, 44, 471-475.

HILLENKAMP F. and KARAS M. (1990): Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization, in: *Methods in Enzymology*, Academic Press, 193, 280-295.

HILLENKAMP F., KARAS M., BEAVIS R.C. and CHAIT B.T. (1993): Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers, *Anal. Chem.*, 63, 1193A-1203A.

HINZ K.P., KAUFMANN R. and SPENGLER B. (1993): Laser induced mass analysis of single particles in the airborne state (LAMPAS), *Anal. Chem.* (submitted).

HOLM R. and HOLTKAMP D. (1989): Industrial applications of LAMMA, *Microbeam Analysis 1989*, Russell P.E. (Ed.), San Francisco Press, 325-329.

HOLMES A. and MORGAN A. (1967): Leaching of constituents of chrysotile asbestos in vivo, *Nature*, 215, 441-442.

HOLT P.F. (1987): *Inhaled Dust and Disease*, John Wiley & Sons Ltd. (Chichester, NY).

HUANG X. (1991): Propriétés des charbons susceptibles de jouer un rôle dans les mécanismes de l'emphysème, du cancer de l'estomac et de la pneumoconiose, *Thèse de Doctorat*, Univ. P. et M. Curie, Paris.

HUANG X., ZALMA R., et PÉZERAT H. (1991): Radicaux libre et réactivité rédox des charbons. Relation possible avec leur toxicité, in: *Mécanismes des pneumopathies professionnelles*, (Ed. Sébastien P.), Colloque INSERM, Editions INSERM, 203, 169-174.

HUBBARD A.K. (1989): Role of T lymphocytes in silica-induced pulmonary inflammation, *Lab. Invest.*, 61, (1), 46-52.

HUBERT M., KIRSCH D., KAUFMANN R. and SPENGLER B. (1992): Development of a UV-laser microprobe with coaxial optics for laser desorption, sample observation and ion extraction, *Proc. 40th ASMS Conf. on Mass Spectrom. and Allied Topics*, Washington, DC, May 31-June 5 1992, 324-325.

- HÜBNER K. and SEEMAYER N.H. (1992): Quartz and coal mine dust treated human monocyte-derived macrophages release a proliferation factor for human lung fibroblasts (WI 38), in: *Environmental Hygiene III*, Seemayer N. H. and Hagdany W. (Eds.) Springer Verlag, (Berlin), 227-230.
- HUFFMAN G.P. and HUGGINS F.E. (1978): Mössbauer studies of coal and coke: quantitative phase identification and direct determination of pyritic and iron sulphide sulphur content, *Fuel*, 57, 592-604.
- HUNNINGHAKE G.W., GARRETT K.C., RICHERSON H.B., FANTONE J.C., WARD P.A., RENNARD S.I., BITTERMAN P.B. and CRYSTAL R.G. (1984): Pathogenesis of the granulomatous lung diseases, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 130, 476-496.
- HURLEY J.F., BURNS J., COPLAND L., DODGSON J. and JACOBSEN M. (1982): Coalworkers' simple pneumoconiosis and exposure to dust at 10 British coalmines, *Brit. J. Ind. Med.*, 39, 120-127.
- HURLEY J.F., ALEXANDER W.P., HAZLEDINE D.J., JACOBSEN M. and MAC LAREN W.M. (1987): Exposure to respirable coalmine dust and incidence of progressive massive fibrosis, *Brit. J. Ind. Med.*, 44, 661-672.
- ILER R.K. (1979): in: *The chemistry of silica. solubility, polymerization, colloid and surface properties, and biochemistry*, John Wiley & Sons, (N Y ,Chichester).
- ILO (1980): International Labor Office: *Classification of Radiographs of the Pneumoconioses*. ILO Publications, (Geneva).
- JACOBSEN M., RAE S., WALTON W.H. and ROGAN J.M. (1971): The relation between pneumoconiosis and dust exposure in British coalmines, in: *Inhaled particles III*, Walton W.H. (Ed.), Old Woking (Unwin Bros), 2, 903-919.
- JACOBSEN M. and MAC LAREN W.M. (1982): Unusual pulmonary observations and exposure to coalmine dusts: a case-control study, in: *Ann. Occup. Hyg.*, 26, (1-4), 753-765.
- JAFARI D., DALAL N.S., VALLYATHAN A.V. and GREEN F.Y.H. (1988): Detection of organic free radicals in coal-dust exposed lung tissue and correlations with their histopathological parameters, in: *Respirable Dust in the Mineral Industries Health Effects*, Frantz R.L. and Ramani R.V. (Eds.), 223-225.
- JAMES W.R.L. (1954): The relationship of tuberculosis to the development of massive pneumoconiosis in coal workers, *Br. J. Tuberc.*, 48, 89-101.
- JANSSEN Y.M.W. (1992): Serum type III procollagen N-terminal peptide in coal miners, *Exp. Lung Res.*, 18, 1-8.
- JANSSEN Y.M.W. (1993): Molecular stress responses to mineral dusts, *PhD. Thesis*, Univ. Maastricht.
- JAURAND M.C., GAUDICHET A., HALPERN S. and BIGON J. (1984): In vitro biodegradation of chrysotile fibers by alveolar macrophages and mesothelial cells in culture: comparison with a pH effect, *Br. J. Ind. Med.*, 41, 389-395.
- JOHNSTON M.V., NEUBAUER K.R., MANSOORI B.A., CARSON P.G. and WEXLER A.S. (1993): On-line analysis of single microparticles by laser desorption, in: *Proc. of the 41th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, San Francisco, May 30-June 4, 223.
- KAINKA-STÄNICKE E. (1992): Veränderung von mineralischer Zusammensetzung und Morphologie der Einzelpartikel bei Lungenstäuben, in: *Silikosekleinkonferenz am 23.03.1992*, Med. Inst. Umwelthygiene, Düsseldorf.

- KAUFMANN R. (1982 a): Laser microprobe mass analysis (LAMMA): Current state of the art with special emphasis on biomedical applications, *Microbeam Analysis-1982*, Heinrich K.F.J. (Ed.), San Francisco Press, 341-358.
- KAUFMANN R. (1986): Laser microprobe mass spectroscopy (LAMMA) of particulate matter, in: *Physical and Chemical Characterization of Individual Airborne Particles*, Spurny K.R. (Ed.), Ellis Horwood Limited (Chichester), 226-250.
- KAUFMANN R., HILLENKAMP F., NITSCHKE R., SCHÜRMAN M., WECHSUNG R. (1978): The laser microprobe mass analyser (LAMMA): Biomedical applications, in: *Microprobe Analysis in Biology and Medicine*, Echlin P. and Kaufmann R. (Eds.), Microscopica Acta, S. Hirzel Verlag (Stuttgart), Suppl. 2, 297-306.
- KAUFMANN R., HILLENKAMP F., WECHSUNG R. (1979): The laser microprobe mass analyser (LAMMA): A new instrument for biomedical microprobe analysis, *Med. Progr. Technol.*, 6, 109-121.
- KAUFMANN R., BARTHS G., SCHMITZ G., SPURNY K. and BRUCH J. (1982 b): LAMMA-studies in mineral fibers and coal mine dust particles, in: *Proc. 12th Ann. Symp. on the Anal. Chem. of Pollutants*, April 14-16, Amsterdam.
- KAUFMANN R., RECHMANN P., TOURMANN J.L., SCHNATZ H. (1989): LAMMS in biomedical research: achievements, shortcomings, promises, *Microbeam Analysis-1989*, Russell P.E. (Ed.), San Francisco Press, 35-42.
- KAUTZ K., PICKHARDT W., RIEPE W., SCHAAF R. SCHOLZ A. und ZIMMERMAYER G. (1984): Spurenelemente in der Steinkohle, ihre Verteilung bei der Verbrennung und ihre biologische Wirkung, *Glückauf-Forschungshefte*, 45, H.5, 228-237.
- KEOGH B.A. and CRYSTAL R.G. (1982): Alveolitis: the key to the interstitial lung disorders, *Thorax*, 37, 1-10.
- KEENAN R.G., CRABLE J.V., SMALLWOOD A.W. and CARLBERG J.R. (1971): Chemical composition of the coal miner's lung, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 32, 392-397.
- KIEVIT O., MARIJNISSEN J.C.M., VERHEIJEN P.J.T. and SCARLETT, B. (1992): On-line measurement of particle size and composition, *J. Aerosol Sci.*, 23 (Suppl 1), 301-304.
- KING E.J. and NAGELSCHMIDT G. (1945): The mineral content of the lungs of workers from the South Wales coalfield, in: *Medical Research Council. Chronic pulmonary disease in south Wales coalminers. III. Experimental studies*, HM Stationery Office, (London), 1-20.
- KING E.J., MAGUIRE B.A. and NAGELSCHMIDT G. (1956): Further studies of the dusts in lungs of coal-miners, *Brit. J. Industr. Med.*, 13, 9-23.
- KLOSTERKÖTTER W., LEITERITZ, H., MACKOWSKI M.T., SCHILLER E., SCHLIPKÖTER H.W. und THAER A. (1963): Tierversuche über die Wirkung verschiedener Bestandteile des Ruhrkarbons. Ein Beitrag zur Ermittlung von Staubgrenz-werten, *Fortschritte der Staublungen-Forschung*, 4, 517-525.
- KLOSTERKÖTTER W. und ROBOCK K. (1967): Zur Bestimmung der Dehydrogenase-Aktivität als Maß für die cytopathogene Wirkung von Stäuben, *Silikosebericht Nordrhein-Westfalen*, Verlag H. Bösmann GmbH (Detmold), 6, 51-54.
- KOBER T.E., SORENSON J.R.J., MENDEN E.E. and PETERING H.G. (1976): Some natural products from two soft coals, *Arch. Environ. Health*, 3, 182-188.
- KOVALEV I.D., MASKIMOV G.A., SUCHKOV A.I. and LARIN N.V. (1978): Analytical capabilities of laser-probe mass spectrometry, *Int. J. of Mass Spectrom. Ion Phys.*, 27, 101-137.

- KRIEGSEIS W., SCHARMANN A. und SERAFIN J. (1979a): Grundüberlegungen und vergleichende Infrarot- und ESCA-Untersuchungen zur Deutung der unterschiedlichen Schädlichkeit von SiO₂-Stäuben, *Silikosebericht Nordrhein-Westfalen*, Verlag Glückauf GmbH (Essen), 12, 149-157.
- KRIEGSEIS W., SCHARMANN A. und JOSHI A. (1979b): Raster-Auger-Testuntersuchungen an Quarz- und Grubenstäuben, *Silikosebericht Nordrhein-Westfalen*, Verlag Glückauf GmbH (Essen), 12, 159-163.
- KRIEGSEIS W. and SCHARMANN A. (1982): Specific harmfulness of respirable dusts from German coal mines V: Influence of mineral surface properties, *Ann. Occup. Hyg.*, 26, 511-525.
- KRIEGSEIS W., SCHARMANN A., SERAFIN J., BECK E.G., TILKES F. und BRUCH J. (1983): Die Abhängigkeit der Zytotoxizität SiO₂-haltiger Stäube von ihrer Oberflächenreinheit, *Silikosebericht Nordrhein-Westfalen*, Steinkohlenbergbauverein (Essen), 14, 281-299.
- KRIEGSEIS W., SCHARMANN A. and SERAFIN J. (1987): Investigations of surface properties of silica dusts with regard to their cytotoxicity, *Ann. Occup. Hyg.*, 31, 417-427.
- KRIER G., VERDUN F. and MULLER J.F. (1985): Coupling a tunable dye laser to a LAMMA 500 microprobe, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 322, 379-382.
- KUHN D.C., STANLEY C.F., EL-AYOUBY N. and DEMERS L.M. (1990): Effect of in vivo coal dust exposure on arachidonic acid metabolism in the rat alveolar macrophage, *J. Toxicol. Environ. Health*, 29, 157-168.
- KÜHN L. (1987): Mineral substances in lungs and lymph nodes of coalminers, *Silicosis Report North-Rhine Westphalia*, 16, 355-357.
- KÜHN L., FRIGGE J., PLOGMANN H. und SCHLIPHAKE R.-W. (1985): Zur Mineralsubstanz von Steinkohlen, *Silikosebericht Nordrhein-Westfalen*, Steinkohlenbergbauverein (Essen), 15, 151-165.
- LAINHART W.S. (1969): Roentgenographic evidence of coal workers' pneumoconiosis in three geographic areas in the United States, *J. Occup. Med.*, 11, 399-408.
- LAUFHÜTTE D.-W., ROBOCK K. und KLOSTERKÖTTER W. (1971): Untersuchungen über die zytotoxische Wirkung von Grubenstäuben aus dem Saarkarbon, *Silikosebericht Nordrhein-Westfalen*, Verlag Glückauf GmbH (Essen), 8, 131-138.
- LE BOUFFANT L. (1987a): Gemeinschaftsforschung: Untersuchungen der Beziehungen zwischen den epidemiologischen Ergebnissen und der Schädlichkeit der Feinstäube im Kohlenbergbau, *Synthesebericht EUR 10872*, Kommission der Europäischen Gemeinschaften (Luxembourg).
- LE BOUFFANT L. (1990): Présentation du rapport de synthèse de l'ensemble du 5ème programme de recherche "Hygiène Industrielle dans les mines" (1983-1989), in: *Hygiène Industrielle dans les Mines: Journées d'information 12-13 November 1990*, Commission des Communautés Européennes (Luxembourg).
- LE BOUFFANT L., DANIEL H. and MARTIN J.-C. (1977): Rôle du quartz dans la formation des lésions pneumoconiotiques du mineur de charbon, *Rapport CECA*, Convention 6244.00/3/053 (Luxembourg).
- LE BOUFFANT L., DANIEL H., MARTIN J.-C. and BRUYERE S. (1982): Effect of impurities and associated minerals on quartz toxicity, *Ann. Occup. Hyg.*, 26, (1-4), 625-634.
- LE BOUFFANT L., DANIEL H., BRUYET B. (1987b): Facteurs influencant la nocivité des poussières de mine de charbon, in: *Silicose et Pneumoconioses à Poussières Mixtes*, Le Bouffant L. (Ed.), Colloque INSERM, Edition INSERM (Paris), 155, 243-264.

LE BOUFFANT L., DANIEL H. et MARTIN J.-C. (1987c): Bases expérimentales du traitement de la silicose par les sels d'aluminium, in: *Silicose et Pneumoconioses à Poussières Mixtes*, Le Bouffant L. (Ed.), Colloque INSERM, Edition INSERM (Paris), 155, 481-492.

LE BOUFFANT L., ADDISON J., BOLTON R.E., BRUCH J., BRUYET B., DANIEL H., DAVIS J.M.G., DEGUELDRE G., DEMAREZ J., DODGSON J., GORMLEY I.P., HADDEN G.G., KOVACS M.P., MARTIN J.C., REISNER M.T.R., ROBERTSON A. and ROSMANITH J. (1988): Compared in vitro and in vivo toxicity of coalmine dusts. Relationship with mineralogical composition, *Ann. Occup. Hyg.*, 32, 611-622.

LEE R.J., HUGGINS F.E. and HUFFMAN G.P. (1978): Correlated Mössbauer-SEM studies of coal mineralogy, *SEM-1978* 1, 561-568.

LEFELHORZ J.F., FRIEDEL R.A. and KOHMAN T.P. (1967): Mössbauer spectroscopy of iron in coal, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 31, 2261-2265.

LEVINSON L.M. and JACOBS I.S. (1977): Mössbauer spectroscopic measurement of pyrite in coal, *Fuel*, 56, 453-454.

LESLIE C.C., MUSSON R.A. and HENSON P.M. (1984): Production of growth factor activity for fibroblasts by human monocyte-derived macrophages, *J. Leukocyte Biol.*, 36, 143-159.

LUGANO E.M., DAUBER J.H., ELIAS J.A., BASHEY R.J., JIMENEZ S.A. and DANIELE R.P. (1984): The regulation of lung fibroblast proliferation by alveolar macrophages in experimental silicosis, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 129, 767-771.

• LUND L.G. and AUST A.E. (1990): Iron mobilization from asbestos by chelators and ascorbic acid, *Arch. of Biochem. and Biophys.*, 278 (1), 60-64.

• LUND L.G. and AUST A.E. (1991): Iron-catalyzed reactions may be responsible for the biochemical and biological effects of asbestos, *BioFactors*, 3, (2), 83-89.

• LUND L.G. and AUST A.E. (1991a): Mobilization of iron from crocidolite asbestos by certain chelators results in enhanced crocidolite-dependent oxygen consumption, *Arch. of Biochem. and Biophys.*, 287 (1), 91-96.

MAC LAREN W.M., HURLEY J.F., COLLINS H.P.R. and COWIE A.J. (1989): Factors associated with the development of progressive massive fibrosis in British coalminers: a case-control study, *Brit. J. Ind. Med.*, 46, 597-607.

MACKEOWN P.J., JOHNSTON, M.V. and MURPHY D.M. (1991): On-line single-particle analysis by laser desorption mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 63, 2069-2073.

MAHIEU B. (1990): L'évolution de la pneumoconiose en France au cours des 20 dernières années, in: *Hygiène Industrielle dans les Mines: Journées d'information 12-13 novembre 1990*, Commission des Communautés Européennes, (Luxembourg).

MALY E., SEEMAYER N.H., BEHRENDT H., MANOJLOVIC N., BRAUMANN A. and MALY F.E. (1988): Strong effects of cytokines from quartz dust exposed human mononuclear cells on human mesenchymal cells and polymorphonuclear leucocytes, in: *Environ. Hyg. II*, Seemayer N.H. and Hagdany W. (Eds.) Springer Verlag, (Berlin), 83-86.

MILLER B.G. and JACOBSEN M. (1985): Dust exposure, pneumoconiosis, and mortality of coalminers, *Brit. J. Ind. Med.*, 42, 723-733.

- MOLIK B. und HILSCHER B. (1989): Comparative presentation of the results of animal experiments on the specific harmfulness of dry filter dusts, *Silicosis Report North-Rhine Westphalia* (Essen), 17, 233-242.
- MONTANO P.A. (1977): Mössbauer spectroscopy of iron compounds found in Virginia coals, *Fuel*, 56, 397-400.
- MORGAN W.K.C. (1971): Coal workers' pneumoconiosis, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 32, 29-34.
- MORGAN W.K.C., REGER R., BURGESS D.B. and SHOUB E. (1972): A comparison of the prevalence of coal workers' pneumoconiosis and respiratory impairment in Pennsylvania bituminous and anthracite miners, *Ann. NY Acad. Sci.*, 200, 252-259.
- MORGAN A. and HOLMES A. (1986): Solubility of asbestos and man-made mineral fibers in vitro and in vivo: its significance in lung disease, *Environ. Res.*, 39, 475-484.
 - MORROW P.E., GIBB F.R., BEITER H., AMATO F., YUILE C. and KILPPER R.W. (1982): Pulmonary retention of coal dusts, *Ann. Occup. Hyg.*, 26 (1-4), 291-307.
- MULLER J.F. (1982): La microsonde à impact laser LAMMA et ses applications en chimie du solide, *Mémoires et Etudes Scientifiques Revue de Metalurgie* - Septembre 1982, 482.
- MULLER J.F., PELLETIER M., KRIER G., WEIL D. and CAMPANA J. (1989): A new generation of microprobe: laser ionization and FT/ICR mass spectrometry, *Microbeam Analysis-1989*, Russell P.E. (Ed.), San Francisco Press, 311-316.
- MULLER J.F., KRIER G. and MILLON E., Analytical tools using laser ablation (1992): in: *Laser Ablation of Electronic Materials. Basic Mechanisms and Applications*, Fogarassy E. and Lazare S. (Eds.), Elsevier Science Publishers B.V., 167-186.
- NAEYE R.L., MAHON J.K. and DELLINGER W.S. (1971): Rank of coal and coal workers' pneumoconiosis, *Am. Rev. Resp. Dis.*, 103, 350-355.
- NAEYE R.L. and DELLINGER W.S. (1972): Coal Workers' Pneumoconiosis. Correlation of Roentgenographic and postmortem findings, *JAMA*, 220, 223-227.
- NAGELSCHMIDT G., RIVERS D., KING E.J. and TREVELLA W. (1963): Dust and collagen content of lungs of coal-workers with progressive massive fibrosis, *Brit. J. Ind. Med.*, 20, 181-191.
- NATHAN C.F. (1987a): Secretory production of macrophages, *J. Clin. Invest.*, 79, 319-326.
- NATHAN C.F. (1987b): Neutrophil activation on biological surface. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes, *J. Clin. Invest.*, 80, 1550-1560.
- NEBE U. and STRÜBEL G. (1981): Untersuchungen zur spezifischen Schädlichkeit von Feinstäuben des Steinkohlenbergbaus, *Silikosebericht Nordrhein-Westfalen*, Steinkohlenbergbauverein (Essen), 13, 187-193.
- NORD P.J. and BINGHAM E. (1973): Biological availability of certain metals in coal, in: *Trace Elements in Environ. Health*, VII Symposium Hemphill D.D. (Ed.), 341-343.
- OTTO H. and WINZER H. (1957): Das Verhalten von Kohlen bei Formamidbehandlung und ihre Identifizierung, *Frankfurter Z. Path.*, 68, 613-640.
- PARRY W.T. (1985): Calculated solubility of chrysotile asbestos in physiological systems, *Environ. Res.*, 37, 410-418.

- PERNIS B. and VIGLIANI E.G. (1982): The role of macrophages and immunocytes in the pathogenesis of pulmonary diseases due to mineral dusts, *Am. J. of Ind. Med.*, 3, 133-137.
- PÉZERAT H. (1991): Réactivité de surface des particules en relation avec leurs propriétés en milieu biologique, in: *Mécanismes des pneumopathies professionnelles*, Sébastien P. (Ed.), Colloque INSERM, Edition INSERM (Paris), 203, 71-88.
- PIGUET P.F., COLLART M.A., GRAU G.E., SAPPINO A.P. and VASSALLI P. (1990): Requirement of tumor necrosis factor for development of silica-induced pulmonary fibrosis, *Nature*, 344, 245-247.
- POITEVIN E., MULLER J.F., KLEIN F. et DÉCHELETTE O. (1989): Application de la détermination des degrés d'oxydation du chrome à l'hygiène industrielle par microsonde à impact laser (LAMMA), *Analisis*, 17 (9), 47-57.
- PRATT P.C. (1968): Role of silica in progressive massive fibrosis in coal workers' pneumoconiosis, *Arch. Environ. Health.*, 16, 734-737.
- PRÉAT B. (1990): Minutes of the meeting of the working party on specific fibrogenicity of coalmine dust, in: CEC (Luxembourg), *Doc. No. 2924/90 EN*.
- PRÉAT B. (1993): Research on pneumoconiosis factors supported by the European coal and Steel Community, in: *Coal Workers' Occupational Diseases Project*, Medical Workshop, Hasselt, 1-10 September.
- RASCHE B., REISNER M.T.R., ISLAM M.S., THIEL H., ZIMMERMANN I., BAUMANN H. and ULMER W.T. (1982): Individual factors in the development of coal miners' pneumoconiosis, *Ann. Occup. Hyg.*, 26, 713-722.
- REISNER M.T.R. (1971): Results of epidemiological studies of pneumoconiosis in West German coalmines, in: *Inhaled Particles III*, Walton W.H. (Ed.), Old Woking (Unwin Bros), 2, 921-931.
- REISNER M.T.R. (1975): Pneumokoniose und Staubexposition - Epidemiologische Untersuchungen im Ruhrbergbau über einen Zeitraum von 14 Jahren, *Silikosebericht Nordrhein-Westfalen*, Verlag Glückauf (Essen), 10, 209-231.
- REISNER M.T.R. und ROBOCK K. (1975): Untersuchungen über die spezifische Schädlichkeit von Feinstäuben aus dem Ruhrbergbau, *Silikosebericht Nordrhein-Westfalen*, Verlag Glückauf (Essen), 10, 145-154.
- REISNER M.T.R. and ROBOCK K. (1977): Result of epidemiological, mineralogical and cytotoxicological studies on the pathogenicity of coalmine dusts, in: *Inhaled Particles IV*, Walton W.H. (Ed.), Pergamon Press (Oxford), 2, 703-715.
- REISNER M.T.R., BRUCH J., HILSCHER W., KRIEGSEIS W., PRAJSNAR D., ROBOCK K., ROSMANITH J., SCHARMANN A., SCHLIPKÖTER H.-W., STRÜBEL G. and WELLER W. (1982): Specific harmfulness of respirable dusts from West German coalmines. VI: Comparison of experimental and epidemiological results, *Ann. Occup. Hyg.*, 26, (1-4), 527-539.
- REISNER M.T.R., ROSMANITH J. und GADE M. (1983): Untersuchungen zur spezifischen Schädlichkeit von Feinstäuben des Steinkohlenbergbaus. XIV: Die Zusammensetzung des Staubes in den Lungen und Lymphknoten der Ratte beim Intratrachealtest, *Silikosebericht Nordrhein-Westfalen*, Steinkohlenbergbauverein (Essen), 14, 195-211.
- REISNER M.T.R., KOTITSCHKE G. and NIESERT E. (1985a): Pneumokoniose und Staubexposition. Epidemiologische Untersuchungen im Steinkohlenbergbau an der Ruhr über einen Zeitraum von 20 Jahren, *Silikosebericht Nordrhein-Westfalen*, Steinkohlenbergbauverein (Essen), 15, 445-492.

- REISNER M.T.R., ARMBRUSTER L. und KÜHN L. (1985b): Untersuchungen zum Einfluss der Korngröße und des Mineralgehaltes auf die spezifische Schädlichkeit von Feinstäuben des Steinkohlenbergbaus. I: Herstellung und Analyse der Staubfraktionen, *Silikosebericht Nordrhein-Westfalen*, Steinkohlenbergbauverein (Essen), 15, 169-184.
- REISNER M.T.R., KÜHN L., KRIEGSEIS W., SCHARMANN A., STRÜBEL G. and RINN G. (1988): Effects of particle size of coal mine dusts in experimental anthracosilicosis: I. Influence of size of mineral composition and surface properties of dusts from same origin, *Ann. Occup. Hyg.*, 32, 585-592.
- RO C.U., MUSSELMAN I.H. and LINTON R.W. (1991): Molecular speciation of microparticles: application of pattern recognition techniques to laser microprobe mass spectrometric data, *Anal. Chem. Acta.*, 243, 139-147.
- ROBERTSON A., BOLTON R.E., CHAPMAN J., DAVIS J.M.G., DODGSON J., GORMLEY I.P., JONES A.D. and MILLER B. (1984): Animal inhalation experiments to investigate the significance of high and low percentage concentrations of quartz in coalmine dusts in relation to epidemiology and other biological tests, in: *IOM Report TM/84/5*, Institute of Occupational Medicine (Edinburg).
- ROBERTSON A., BOLTON R.E., MILLER B.G., CHAPMAN J.S., DODGSON J., JONES A.D., NIVEN K.J. and DAVIS J.M.G. (1988): The effect of quartz content on the pathogenicity of coal mine dusts, *Ann. Occup. Hyg.*, 32, 621-633.
- ROBOCK K. (1974): Die Wirkung mechanischer, thermischer und chemischer Behandlungen von Siliciumdioxid- und Asbest-Stäuben auf Zytotoxizität und Elektronenstruktur, *Beitr. Silikose-Forschung (Pneumokoniose)*, 26, 111-262.
- ROBOCK K. (1991): Projet de recherche communautaire. Caractérisation des poussières de mine en fonction de leur nocivité spécifique (Phase 1), in: *Doc. No. 4935/91*, Commission des Communautés Européennes (Luxembourg).
- ROBOCK K. und KLOSTERKÖTTER W. (1975): Untersuchung über die Zytotoxizität von SiO₂-Stäuben, *Silikosebericht Nordrhein-Westfalen*, Verlag Glückauf (Essen), 10, 159-162.
- ROBOCK K. and REISNER M.T.R. (1982): Specific harmfulness of respirable dusts from West German coal mines. I: Results of cell tests, *Ann. Occup. Hyg.*, 26, (1-4), 473-479.
- ROGAN J.M., ATTIFELD M.D., JACOBSEN M., RAE S., WALKER D.D. and WALTON W.H. (1973): Role of dust in the working environment in development of chronic bronchitis in British coalminers. *Brit. J. Ind. Med.*, 30, 217-226.
- ROM W.N., BITTERMAN P.B., RENNARD S.I., CANTIN A. and CRYSTAL R.G. (1987): Characterization of the lower respiratory tract inflammation of non-smoking individuals with interstitial lung disease associated with chronic inhalation of inorganic dusts, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 136, 1429-1434.
- ROSMANITH J., REISNER M.T.R., PRAJSNAR D., BREINING H. und EHM W. (1981): Untersuchungen zur spezifischen Schädlichkeit von Feinstäuben des Steinkohlenbergbaus. VIII: Die Beziehungen zwischen der Zusammensetzung des Feinstaubes, der retinierten Staubmasse und der fibrotischen Reaktion in Lungen und Lymphknoten der Ratte beim Intratrachealtests, *Silikosebericht Nordrhein-Westfalen*, Verlag Glückauf (Essen), 13, 241-249.
- ROSMANITH J., REISNER M.T.R., HILSCHER W., PRAJSNAR D. und EHM W. (1985): Untersuchungen zum Einfluss der Korngröße und des Mineralgehaltes auf die spezifische Schädlichkeit von Feinstäuben des Steinkohlenbergbaus. II: Retention des Staubes in der Rattenlunge und dessen Penetration in die Lymphknoten beim Intratrachealversuch, *Silikosebericht Nordrhein-Westfalen*, Steinkohlenbergbauverein (Essen), 15, 185-204.

- ROSMANITH J., BREINING H. and BUCHOLZ H. (1987): The different biological effects of dusts administered intratracheally separately or in mixtures in rats, *Silicosis Report North-Rhine Westphalia* (Essen), 16, 305-309.
- ROSMANITH J., WELLER W., REISNER M.T.R., KÜHN L. and STRÜBEL G. (1988): Effects of particle size of coalmine dusts in experimental anthraco-silicosis: II. Retention and penetration of the dust, *Ann. Occup. Hyg.*, 32, 593-601.
- ROSMANITH J., HILSCHER W., HEBLING B., SCHYMA S.B. and EHM W. (1989): The fibrogenetic action of kaolinite, muscovite and feldspar, *Silicosis Report North-Rhine Westphalia* (Essen), 17, 305-311.
- ROSMANITH J. and WELLER W. (1991): Effect of new pack materials in animal trials on rats, *Silicosis Report North-Rhine Westphalia* (Essen), 18, 253-263.
- RUCKLEY V.A., CHAPMAN J.S., COLLINGS P., DOUGLAS A.N., FERNIE J.M., LAMB D. and DAVIS J.M.G. (1981): Autopsy studies of coalminers lungs. Phase III, in: *IOM Report TM/81/18*, Institute of Occupational Medicine (Edinburgh).
- RUHRKOHLENHANDBUCH (1987): *Anhaltzahlen, Erfahrungswerte und praktische Hinweise für industrielle Verbraucher*, 7. Auflage, Verlag Glückhauf (Essen).
- RYDER R., LYONS J.P., CAMPBELL H. and GOUGH J. (1970): Emphysema in coal workers' pneumoconiosis, *Brit. Med. J.*, 3, 481-487.
- SABLONNIÈRE B., SCHARFMANN A., LAFITTE J.J., LAINE A., AERTS C. and HAYEM A. (1983): Enzymatic activities of broncho-alveolar lavages in coal workers pneumoconiosis, *Lung*, 161, 219-228.
- SCHLIPKÖTER H.W. (1958): Tierversuche über die Wirkung verschiedener Bestandteile in den Stäuben des Ruhrkohlenbergbaus, in: *Die Staublungenerkrankungen*, Steinkopff-Verlag (Darmstadt), 3, 312-326.
- SCHLIPKÖTER H.W., HILSCHER W., POTT F. and BECK E.G. (1971): Investigations on the etiology of coalworkers pneumoconiosis with the use of PVN-oxide, in: *Inhaled Particles III*, Walton W. H. (Ed.), Old Woking (Unwin Bros), 2, 379-390.
- SCHLIPKÖTER H.W., MOLIK B., HILSCHER W. und BRUCH J. (1982): Spezifische Schädlichkeit von Feinstäuben des Steinkohlenbergbaus, in: *Umwelthygiene*, Medizinische Institut für Umwelthygiene, Düsseldorf, Jahresbericht 1981, W. Girardet Buchverlag (Essen), 14, 149-168.
- SCHMIDT J.A., OLIVER C.N., LEPE-ZUNIGA J.L., GREEN I. and GERY I. (1984): Silica-stimulated monocytes release fibroblast proliferation factors identical to interleukin-1. A possible role for interleukin 1 in the pathogenesis of silicosis, *J. Clin. Invest.*, 73, 1462-1472.
- SEATON A., DICK J.A., DODGSON J. and JACOBSEN M. (1981): Quartz and pneumoconiosis in coalminers, *Lancet*, Dec. 5, 1272-1275.
- SEEMAYER N.H., MANOJLOVIC N. und DE RUITER N. (1977): Untersuchungen über die biologische Wirkung von Gruben-stäuben auf alveolare Makrophagen des Meerschweinchens in-vivo, *Silikosebericht Nordrhein-Westfalen*, Verlag Glückauf (Essen), 11, 153-157.
- SERAFIN J. (1984): Untersuchungen von Oberflächeneigenschaften SiO₂-haltiger Stäube im Hinblick auf ihre Zytotoxizität, *Dissertation*, Justus Liebig-Universität Giessen,
- SHENAN D.H., WASHINGTON J.S., THOMAS D.J., DICK J.A., KAPLAN Y.S. and BENNETT J.G. (1981): Factors predisposing to the development of progressive massive fibrosis, *Brit. J. Ind. Med.*, 38, 321-326.

- SMITH G.V., LIU J.-H. and SAPOROSCHENKO M. (1978): Mössbauer spectroscopic investigation of iron species in coal, *Fuel*, 57, 41-45.
- SIES H. (1985): *Oxidative Stress*, Sies H. (Ed.), Academic Press (London).
- SORENSEN J.R.J., KOBER T.E. and PETERING H.G. (1974): The concentration of Cd, Cu, Fe, Ni, Pb and Zn in bituminous coals from mines with differing incidences of coal workers' pneumoconiosis, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 35, 93-98.
- SOUTAR C.A. (1987): Update on lung disease in coalminers, *Brit. J. Ind. Med.*, 44, 145-148.
- SPENGLER B. and KAUFMANN R. (1992): Gentle probe for tough molecules: matrix-assisted laser desorption mass spectrometry, *Analisis*, 20, 91-101.
- SPINK R. and NAGELSCHMIDT G. (1963): Dust and fibrosis in the lungs of coal-workers from the Wigan area of Lancashire, *Brit. J. Ind. Med.*, 20, 118-123.
- STACHE E. (1975): *Coal petrology*, Gebrüder Borntraeger (Berlin, Stuttgart).
- STAHLHOFEN W., GEBHART J. and HEIDER J. (1980): Experimental determination of the regional deposition of aerosol particles in the human respiratory tract, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 41, 385-398.
- SURKYN P. and ADAMS F. (1982): Laser microprobe mass analysis of glass microparticles, *J. Trace and Microprobe Techniques*, 1, 79-114.
- SWEET D. V. CROUSE W. E., CRABLE J. V. CARLBERG J. R. and LAINHART W. S. (1974): The relationship of total dust, free silica, and trace metal concentrations to the occupational respiratory disease of bituminous coal miners, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 35, 479-488.
- THOMAS K. and STEGEMANN H. (1954): Darstellung der Fremdstäube aus Lungen und ihre Eigenschaften, *Beiträge Silikose-Forsch.*, 28, 3-30.
- THOMSON D.S. and MURPHY D.M. (1983): Laser-induced ion formation thresholds of aerosol particles in vacuum, *Appl. Optics* (in press).
- TOURMANN J.L. and KAUFMANN R. (1992): Towards a toxicology of particulate airborne matter, *Analisis Magazine*, 20 (3), M40-M43.
- TOURMANN J.L., RECHMANN P. and KAUFMANN R. (1992): Laser microprobe mass spectrometry (LAMMS) in dental science, *Innov. Tech. Biol. Med.*, 11 (spécial 1), 40-50.
- TOURMANN J.L. and KAUFMANN R. (1993): Laser microprobe mass spectrometry (LAMMS) of coal mine dusts: single particle analysis and toxicity correlation, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 52, 215-227.
- VALKOVIC V. (1983): *Trace Elements in Coal, Vol. I*, CRC Press Inc. (Boca Raton).
- VAN GRIEKEN R. and XHOFFER C. (1992): Microanalysis of individual environmental particles, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 7, 81-88.
- VAN VAECK L. and GIJBELS R. (1989): Overview of laser microprobe mass spectrometry techniques, in: *Microbeam Analysis-1989*, Russell P.E. (Ed.), San Francisco Press, 17-25.
- VASSAMILLET L.F. (1972): Examination of medium rank coals by SEM, in: *Proc. 7th National Conference on Electron Probe Analysis*, San Francisco, California, July 1972, Electron Probe Analysis Society of America, 55A-55B.

- VERDUN F.R., KRIER G. and MULLER J.F. (1987): Increased sensitivity in Laser Microprobe Mass Analysis by using resonant two-photon ionization processes, *Anal. Chem.*, 59, 1383-1387.
- VERBUEKEN A.H., BRUYNSEELS F.J. and VAN GRIEKEN R.E. (1985): Laser Microprobe Mass Analysis: A review of applications in the life sciences, *Biomed. Mass Spectrom.*, 12, (9), 438-462.
- VERBUEKEN A.H., BRUYNSEELS F.J., VAN GRIEKEN R. and ADAMS F. (1988): Laser Microprobe Mass Spectrometry, in: *Inorganic Mass Spectrometry, Chemical Analysis*, Adams F., Gijbels R. and Van Grieken R. (Eds.), John Wiley and Sons (N.Y.), 95, 173-255.
- VIGLIANI E.C. and PERNIS B. (1958): Immunological factors in the pathogenesis of the hyaline tissue of silicosis, *Brit. J. Ind. Med.*, 15, 8-14.
- VIGLIANI E.C. and PERNIS B. (1963): Immunological aspects of silicosis, *Adv. Tuberc. Res.*, 12, 230-279.
- VINCENT J.H. and ARMBRUSTER L. (1981): On the quantitative definition of the inhalability of airborne dust, *Ann. Occup. Hyg.*, 24, 245-248.
- VINCENT J. H., JONES A.D., JOHNSTON A.M., MACMILLAN C., BOLTON R.E. and COWIE H. (1987): Accumulation of inhaled mineral dust in the lung and associated lymph nodes: implication for exposure and dose in occupational lung disease, *Ann. Occup. Hyg.*, 31 (3), 375-393.
- VINCENT J.H. and DONALDSON K. (1990): A dosimetric approach for relating the biological response of the lung to the accumulation of inhaled mineral dust, *Br. J. Ind. Med.*, 47, 302-307.
- VINCENT J.H. (1991): Joint investigation of new generations of sampler for airborne dust in mines, in: *EUR 3414* Commission of the European Communities (Luxemburg).
- VOGT H., HEINEN H.J., MEIER S., WECHSUNG R. (1981): LAMMA 500: Principle and technical description of the instrument, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 308, 195-200.
- VOISIN C., WALLERT B., AERTS C. and GROSBOIS J.M. (1985): Bronchoalveolar lavage in coalworkers' pneumoconiosis: oxidant and antioxidant activities of alveolar macrophages, in: *In vitro Effects of Mineral Dusts*, Beck E.G. and Bignon J. (Eds.), Springer-Verlag (Berlin), 13, 93-100.
- VOISIN C., WALLERT B. et AERTS C. (1987): Caractéristiques cellulaires du lavage broncho-alvéolaire dans la pneumoconiose du mineur de charbon. Apport à la connaissance physiopathologique de la maladie, in: *Silicose et Pneumoconioses à Poussières Mixtes*, Le Bouffant L. (Ed.), Colloque INSERM, Edition INSERM (Paris), 155, 43-60.
- VILCEK J., PALOMBELLA V.J, HENRIKSEN-DESTEFANO D. SWENSON C., FEINMAN R., HIRAI M. and TSUJIMOTO M.(1986): Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors, *J Exp. Med.*, 163, 632-643.
- VYSKOCYL J., TUMA J. and MACEK M. (1970): Relationships between morphological changes and content of silica and hydroxyproline in bronchi and lungs of coal miners, *Int. Arch. Arbeitsmed.*, 26, 157-166.
- WAHL S.M. (1985): The role of lymphokines and monokines in fibrosis, *Ann. NY Acad. Sci.*, 460, 224-231.
- WALLACE W.E., HARRISON J., KEANE M.J., BOLSAITIS P., EPPELSHEIMER D., POSTON J. and PAGE S.J. (1990): Clay occlusion of respirable quartz particles detected by low voltage scanning electron microscopy-X-ray analysis, *Ann. Occup. Hyg.*, 34, 195-204.

WALLAERT B., BART F., AERTS C., OUAISSI M.A., NEYRINCK J. L. et VOISIN C (1987): Secréation spontanée d'anion superoxyde, de facteurs chimiotactiques des polynucléaires neutrophiles et de fibronectine par les macrophages alvéolaires de patients pneumoconiotiques, in: *Silicose et Pneumoconioses à Poussières Mixtes*, Le Bouffant L. (Ed.), Colloque INSERM, Edition INSERM (Paris), 155, 115-122.

WALLAERT B., LASSALLE P., FORTIN F., AERTS C., BART F., FOURNIER E. and VOISIN C. (1990): Superoxide anion generation by alveolar inflammatory cells in simple pneumoconiosis and in progressive massive fibrosis of no-smoking coal workers, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 141, 129-133.

WALTON W.H., DODGSON J., HADDEN G.G. and JACOBSEN M. (1977): The effect of quartz and other noncoal dusts in coalworkers-pneumoconiosis, in: *Inhaled Particles IV*, Walton W.H. (Ed.), Pergamon Press (Oxford), 2, 669-690.

WECHSUNG R., HILLENKAMP F., KAUFMANN R., NITSCHKE R., UNSÖLD E., VOGT H. (1978): LAMMA- A new laser-microprobe-mass-analyser in: *Microprobe Analysis in Biology and Medicine*, Echlin P. and Kaufmann R. (Eds.), Microscopica Acta, S. Hirzel Verlag (Stuttgart), Suppl. 2, 281-296.

WEISS A. (1975): Isolation and characterisation of a characteristic phosphato-silicate from human lungs with silicosis, in: *Biochemistry of Silicon and Related Problems*, G. Bendz and I. Lindqvist (Eds.), Plenum Press (NY, London), 297-307.

WELLER W., ROSMANITH J., HIRSEKORN A. and KAMMERMEIER V. (1987): The fibrogen effect of dam building materials, *Silicosis Report North-Rhine Westphalia* (Essen), 16, 325-329.

WIESER P. and WURSTER R. (1986): Application of laser-microprobe mass analysis to particle collections, in: *Physical and Chemical Characterization of Individual Airborne Particles*, Spurny K.R. (Ed.), Ellis Horwood Limited (Chichester), 251-270.

WORTH G., MUYSERS K. and EINBRODT H.J. (1968): Über die Korrelation von röntgenologischen, pathologisch-anatomischen und staubanalytischen Befunden bei der Kohlenbergarbeiterpneumokoniose, *Beiträge Silikose-Forsch.*, 96, 1-42.

• WOUTERS L.C., VAN GRIEKEN R.E., LINTON R.W. and BAUER C.F. (1988): Discrimination between coprecipitated and adsorbed lead on individual calcite particles using laser microprobe mass analysis, *Anal. Chem.*, 60 (20), 2218-2220.

• ZALMA R., BONNEAU L., JAURAND M.C., GUIGNARD J. and PEZERAT H. (1987a): Production of hydroxyl radicals by iron solid compounds, *Toxicol. Environ. Chem.*, 13, 171-188.

• ZALMA R., BONNEAU L., JAURAND M.C., GUIGNARD J. and PEZERAT H. (1987b): Formation of oxy-radicals by oxygen reduction arising from the surface activity of asbestos, *Can. J. Chem.*, 65, 2338-2341.

OOOOOOOO

Résumé

Les connaissances étiopathogéniques actuelles sur la pneumoconiose du houilleur (improprement dénommée "silicose") sont fragmentaires. Le concept de "nocivité spécifique" des poussières de mine (ou nocivité expérimentale en accord avec les données épidémiologiques) doit permettre, en hygiène industrielle, de reconnaître et de classer les poussières de mines dangereuses afin d'établir, sur des bases scientifiques, des valeurs limites d'empoussiérage.

Les études de nocivité sont basées sur deux éléments indispensables pour évaluer l'aptitude des poussières à induire une fibrose pulmonaire: les résultats des tests toxicologiques *in vitro* et *in vivo* et, d'autre part, la caractérisation physico-chimique des poussières (composition minéralogique et granulométrique, propriétés de surface...).

Il existe de nombreuses incertitudes relatives au concept de nocivité spécifique. Elles se traduisent par des divergences, voire des contradictions flagrantes, entre les données épidémiologiques, les données de nocivité expérimentale et les données physico-chimiques des poussières. Les discordances les plus frappantes portent sur la teneur en quartz des poussières, minéral pourtant bien connu pour ses propriétés cytotoxiques et fibrogènes.

Le présent travail concerne la caractérisation par microsonde laser LAMMA de la fraction respirable de poussières de mine prélevées dans différentes mines européennes associées à des risques de pneumoconiose connus et très diversifiés. Les propriétés toxicologiques et les données minéralogiques de ces poussières sont connues.

L'approche méthodologique est fondée sur une caractérisation au niveau de la particule individuelle permettant d'établir des "histogrammes chimiques". Ceux-ci dévoileront les éléments (ou combinaisons d'éléments) dont "l'incidence" sur la population de particules analysées permet d'expliquer les données épidémiologiques ou de nocivité expérimentale.

Une première étude de poussières de silice de référence a permis d'établir un schéma de classification des particules individuelles contenant du quartz. L'utilisation de ce schéma sur certaines poussières de mines riches en quartz a permis d'identifier le degré de contamination de la surface du quartz comme un paramètre de modulation de la nocivité du quartz des poussières de mine. Ce résultat, en accord avec ceux d'autres auteurs qui avaient déjà émis cette hypothèse, permet d'entrevoir l'effet de modulation en tant que paramètre de nocivité spécifique.

Mais l'ensemble de l'étude propose d'attribuer un rôle plus déterminant au fer (et/ou métaux lourds) associé à la fraction minérale des poussières de mines. Cette conclusion est étayée par des corrélations avec les données de nocivité expérimentale ou certaines données épidémiologiques. De plus, elle converge avec les connaissances récentes tirées de la littérature scientifique permettant d'envisager un principe toxique pour les poussières de mine. Ce dernier se rapporte aux propriétés oxydo-réductrices de la surface des particules. Une validation toxicologique et physico-chimique de cette hypothèse permettrait d'acquérir des connaissances d'ordre étiopathogénique et devrait ouvrir de nombreuses perspectives d'applications en hygiène industrielle.