

## **Toxicité des fibres cellulose**

Très peu de données expérimentales existent: une étude de toxicité par inhalation subchronique(100, 500 et 2 000 mg) chez le rat (Hadley *et al.* 1992) et une après injection intratrachéale, toujours chez le rat (Adamis *et al.* 1997).

Après l'inhalation subchronique, les animaux montraient une infiltration macrophagique de l'interstitium. Des zones avec alvéolite et hyperplasie épithéliale étaient notées ainsi que des granulomes avec dépôts de collagène.

Après injection intratrachéale, un œdème interstitiel et des signes d'inflammation sont relevés dès le premier jour. Par la suite et jusqu'à 7 jours, la réaction inflammatoire persiste dans les alvéoles et les bronches ainsi que dans le parenchyme.

Il faut noter que la poussière de certains bois est à l'origine d'une maladie professionnelle (cancer de l'ethmoïde). Par ailleurs, une attention particulière doit être portée au problème de la toxicité de l'acide borique, souvent utilisé pour traiter ces fibres (voir Chapitre 1, Physicochimie).

Enfin, ces fibres sont très persistantes chez le rat (Muhle *et al.* 1997) et peuvent être contaminées par des bactéries responsables d'asthmes, d'alvéolites et de réactions de sensibilisation.

### **Devenir des fibres inhalées**

#### **Généralités**

Les particules solides inhalées se déposent dans le poumon selon leur forme et leur dimension et sont alors soumises à des processus d'épuration, de migration et, éventuellement, de dissolution. Ainsi, une certaine proportion de particules peut être éliminée; une autre fraction persiste en rétention dans le poumon. Les fibres peuvent être éliminées du poumon par des mécanismes de clairance qui mettent en jeu principalement les macrophages alvéolaires et le transport muco-ciliaire et par dissolution. Les fibres non éliminées peuvent être transloquées dans l'interstitium et le système lymphatique, comme en témoignent les études sur la localisation des fibres après inhalation.

On trouve également des fibres au niveau de la plèvre, mais les mécanismes de translocation vers l'espace pleural sont mal connus.

La connaissance des mécanismes exacts d'épuration pulmonaire des fibres et de l'importance relative des facteurs qui la conditionnent est difficile en raison de la multiplicité des paramètres mis en jeu. De plus, un aérosol de fibres est généralement constitué de particules hétérogènes au plan des caractéristiques géométriques et dimensionnelles. Le diamètre aérodynamique conditionne le dépôt des particules dans le poumon. En général, chez le rat, des particules d'un diamètre aérodynamique moyen supérieur à 3,µm ne peuvent pas pénétrer dans le poumon profond; une faible partie peut toutefois être déposée, entre 3 et 6,µm (Morgan *et al.* 1980). Chez l'homme, cette limite est supérieure (de l'ordre de 9,µm). Des fibres de grande longueur, pouvant atteindre quelques dizaines de microns, peuvent se déposer dans les alvéoles et sur les bronchioles. Ceci est dû à la géométrie des fibres qui permet une pénétration en raison de leur faible diamètre, comparativement à la longueur. Le dépôt des fibres se fait principalement par impaction et interception. Une fois déposées dans le poumon, toutes les fibres n'ont pas la même probabilité d'être éliminées. En effet, d'après les données obtenues avec les fibres d'amianté, leurs caractéristiques physiques, essentiellement dimensionnelles, interviennent car les fibres les plus courtes sont plus facilement épurées par les macrophages alvéolaires, qui les phagocytent, que les fibres longues. Cela a pour conséquence un enrichissement du poumon en fibres longues, relativement aux fibres plus courtes. Il semblerait que les données obtenues avec les fibres MMVF sont différentes de celles acquises avec les fibres d'amianté, puisqu'il est rapporté que les fibres « longues » disparaissent rapidement. Ces différences résultent vraisemblablement des dimensions relatives des deux types de fibres, les fibres MMVF étant considérablement plus longues que les fibres d'amianté (en moyenne 10 fois plus longues; voir p. 349).

La rétention des fibres dans le poumon est également modulée par les propriétés physicochimiques et chimiques des fibres, plus particulièrement leur instabilité chimique dans le milieu biologique qui peut conduire à une dissolution plus ou moins complète des fibres. On associe ces phénomènes à la biodurabilité. Les observations morphologiques faites en microscopie électronique montrent que les fibres vitreuses ont une surface et parfois une forme altérée après un séjour dans le poumon (voir Bellman *et al.* 1987 par exemple). La dissolution peut faire passer en solution seulement certains éléments chimiques (lixiviation) ou intéresser la totalité des éléments. Ces altérations ont pour conséquences une modification de la géométrie des fibres (réduction du diamètre) et une possible fragilisation de la structure. Il en résulte que certaines fibres de MMVF peuvent se casser dans le sens transversal.

## Notion de biopersistance

Récemment a été introduite la notion de biopersistance, qui englobe les notions d'épuration et de dissolution. Il a été suggéré que la biopersistance était un paramètre important de la toxicité. Etant donné l'importance que prend la notion de biopersistance dans l'étude des effets biologiques des fibres et dans les décisions en matière de réglementation de l'utilisation de ces matériaux, il est important de bien définir ce terme, de décrire brièvement les méthodes permettant de mesurer ce paramètre et de discuter les faits expérimentaux qui ont abouti à cette notion. Il y a en effet parfois une certaine confusion dans la terminologie utilisée dans les différents articles.

Le concept de biopersistance repose sur un certain nombre d'hypothèses dont certaines, mais pas toutes, n'ont pas été vérifiées par l'expérience. Ainsi, il est considéré que pour être fibrosantes et carcinogènes, les fibres doivent pouvoir pénétrer le poumon, qu'elles doivent avoir des dimensions correspondant à celles qui produisent un effet délétère et qu'elles doivent être biopersistantes.

Du fait de la rétention pulmonaire, des fibres de dimensions spécifiques sont maintenues au niveau des cellules pendant des années et produisent des effets cumulés qui permettent d'aboutir à un effet pathogène (Musselman *et al.* 1994). Si cette proposition paraît logique, elle ne peut être acceptée que si l'évidence expérimentale démontre un accord avec la théorie. S'il est vrai que les fibres doivent pénétrer dans le poumon et que leur potentiel toxique dépend de leurs caractéristiques dimensionnelles, l'importance relative de leur persistance dans le milieu biologique reste à démontrer. De plus, dans le domaine de la carcinogenèse, il est discutable de considérer, a priori, que l'intégration dans le temps d'effets liés à un agent donné, est nécessaire à l'expression tumorale. C'est le cas, par exemple, des radiations ionisantes, du benzène. La dose cumulée est certes un élément important mais le rôle de la durée de contact reste à démontrer. Le niveau des altérations moléculaires résultant de l'action de carcinogènes dépend de la dose; comment la durée module-t-elle la dose ? D'après les connaissances actuelles de l'oncogenèse, on peut considérer que la pérennité de l'anomalie de gènes critiques est capitale pour l'évolution de la tumeur.

La biopersistance pulmonaire, ou persistance dans le milieu biologique pulmonaire, peut être définie comme la rétention des fibres dans le poumon, dans le temps. Elle dépend, d'une part des mécanismes de défense naturels du poumon qui permettent d'éliminer une partie des particules déposées, d'autre part, des caractéristiques physiques et physicochimiques des fibres (McClellan & Hesterberg 1994). La biopersistance est donc un concept dynamique qui est fondé sur des phénomènes physiques et chimiques.

Ainsi, la biopersistance est évaluée par la rétention des fibres dans le poumon, au cours du temps, en termes de nombre, dimensions, composition chimique, aire de surface ou autres caractéristiques physiques.

La biopersistance est alors la résultante de processus physiques et chimiques. Le taux de clairance total ( $k_{\text{tot}}$ ) est la somme du taux de solubilité ( $k_{\text{sol}}$ ) et du taux de translocation ( $k_{\text{trans}}$ ) :

$$k_{\text{tot}} = k_{\text{sol}} + k_{\text{trans}} \text{ (Oberdörster } et al. 1994)$$

Pour résumer, la biopersistance pulmonaire dépend, sur le plan théorique, de processus physiques et mécaniques, qui ne sont d'ailleurs pas applicables à tous les types de fibres (translocation, séparation longitudinale des fibres [amiantes], cassures) et de processus chimiques (dissolution, lixiviation). Il en résulte qu'une quantité de fibres différente de celle déposée dans le poumon reste en rétention et que cette quantité évolue au cours du temps. La quantité de fibres retenues, à un instant donné, sera donc égale à la différence entre la quantité déposée et celle éliminée par clairance.

A priori, il n'y a pas de raison pour considérer que l'un des processus physiques et mécaniques ou chimiques d'élimination des fibres est le plus pertinent pour évaluer la portée du risque toxique.

Il sera nécessaire, pour rendre compte de la biopersistance, de déterminer l'évolution de la quantité de fibres en rétention dans le poumon, de même que de leurs dimensions. Différents paramètres mesurant les fibres en rétention dans le poumon ont été ou peuvent être employées:

- masse de fibres,
- nombre total de fibres,
- nombre de fibres dans différentes tranches granulométriques,
- dimensions (longueur, diamètre) moyennes (ou médianes) des fibres,
- diamètre moyen (ou médian) dans différentes tranches de longueur,
- longueur moyenne (ou médiane) dans différentes tranches de diamètre,

De plus, tous ces paramètres peuvent être mesurés en cinétique, ce qui permet de déterminer:

- la forme de la relation liant la rétention pulmonaire en fibres et le temps après l'exposition,
- le cas échéant, une demi-vie des fibres.

### **Moyens d'étude du devenir des fibres inhalées**

La biopersistance peut être mesurée par différentes méthodes. Pour rendre compte de la biopersistance des fibres dans le poumon, deux voies d'exposition ont été retenues: l'inhalation et l'instillation intratrachéale (car elles représentent les voies d'entrée naturelle des fibres dans le poumon). Dans certains travaux, des animaux sont exposés par inhalation, pendant une durée de 30 à 60 heures selon les auteurs. Dans d'autres études, les animaux reçoivent une unique instillation intratrachéale d'une suspension de fibres.

A ce propos, on notera que les études de biopersistance portant sur la mesure de la rétention après une durée d'exposition de quelques jours (généralement

5) pendant une à deux semaines (par inhalation) ou par instillation intratrachéale sont des modèles d'exposition transitoire sur quelques jours et non sur plusieurs années, donc différents de celui qui est rencontré chez l'homme. On peut se demander dans quelle mesure les conclusions sur la biopersistance en conditions « transitoires » sont extrapolables à celles obtenues suite à des expositions chroniques.

## **Exposition**

La méthode d'instillation intratrachéale a fait l'objet de quelques critiques (voir aussi p. 283 et suivantes). Pour Hamilton *et al.* (1994), les suspensions de fibres, comme celles réalisées pour les instillations intratrachéales, sont rarement homogènes par rapport à la taille et à la masse des fibres en suspension. Quand les concentrations sont élevées (non définies dans cet article), les fibres forment des paquets. Dans cet article, un tableau (3) montre que lorsque l'on part d'une concentration donnée en fibres (1 mg/ml; longueur moyenne = 25,µm), le nombre de fibres par unité de volume montre des variations de plus en plus importantes (augmentation de l'écart-type) quand le volume est augmenté. On notera que dans le cas précis de cette étude, la dispersion est faite par sonication et agitation (*stirring*) dans un liquide contenant du surfactant. Dans leur analyse, les auteurs considèrent également que l'instillation peut provoquer un effet « bolus » et provoquer des lésions granulomateuses dans les voies aériennes supérieures. Ils récuse cette méthode comme moyen de déposer une dose reproductible dans le poumon profond.

Les méthodes d'inhalation sont difficiles à mettre en œuvre et l'homogénéité de l'aérosol est aussi un travail difficile à réaliser. Pour l'inhalation, il est nécessaire d'avoir des procédés de mise en suspension (*lifting*) des fibres qui produisent des aérosols stables et bien caractérisés. Le monitoring est délicat, et le procédé de mise en suspension peut changer la distribution de taille des fibres, par rapport à l'aérosol (Hamilton *et al.* 1994). Récemment, un procédé d'exposition nez seul a été développé et largement utilisé pour les études par inhalation de MMVF (RCC, Genève). On pourra rappeler ici les données mentionnées plus haut indiquant que, par inhalation, un faible pourcentage de particules inhalées est effectivement déposé dans le poumon, contrairement à ce qui est observé par instillation intratrachéale.

Un autre point concerne les particules non fibreuses. Ces dernières, comme cela a été mentionné à plusieurs reprises précédemment, peuvent atteindre 60 % en poids, tout en ne représentant qu'une faible fraction en nombre; leur présence peut rendre caduque toute mesure pondérale d'exposition. Des rapports élevés en nombre de particules ont cependant été mesurés (Tableau 7-1). Enfin, lorsqu'il s'agit de produits commerciaux, les fibres utilisées dans les études expérimentales sont généralement débarrassées des agents de surface qui leur sont souvent associés au cours des procédés de fabrication.

## Mesure et expression de la rétention

La teneur en fibres du poumon est ensuite déterminée après destruction de la matière organique et les fibres sont comptées, pour ce qui concerne les MMVF, mesurées en microscopie optique à contraste de phase ou en microscopie électronique à balayage. Hamilton *et al.* (1994) ont discuté la méthode d'analyse des fibres en rétention dans le poumon. En raison de leur solubilité, les MMVF seraient solubles dans les fixateurs classiques (formaldéhyde). La congélation à -20 °C serait souhaitable pour conserver les tissus, suivie d'une destruction de la matière organique par incinération dans un four à plasma d'oxygène. Cependant, le poids des cendres retrouvées est très variable d'un animal à l'autre. Les fibres sont comptées et mesurées (L, Ø élongation), analysées chimiquement; les particules non fibreuses sont également comptées.

Morgan *et al.* (1982) ont démontré, en utilisant des fibres marquées au  $^{24}\text{Na}$  par irradiation, que le traitement de fibres de verre à l'hypochlorite de sodium pendant 5 heures ne modifiait pas le diamètre des fibres, ce qui autorisait l'utilisation de cette méthode sous réserve qu'une dissolution ne se soit pas produite *in vivo*. Dans ce cas en effet, une réduction de diamètre pouvait être provoquée par le traitement chimique. Les auteurs préconisent alors d'utiliser la méthode d'incinération à basse température, dans un four à plasma d'oxygène.

Pour quantifier la biopersistance, on mesure la demi-vie des fibres, soit globalement, soit selon des tranches granulométriques. La mesure de la demi-vie consiste à déterminer la durée nécessaire pour que le nombre de fibres présentes à la fin de l'exposition diminue de moitié, après des expositions allant de quelques jours à plusieurs mois. Cependant le temps zéro (= 100 %) peut varier d'un auteur à l'autre et le 100 % n'est donc pas toujours comparable entre les études. Le calcul de la demi-vie ( $t_{1/2}$ ) va donc dépendre de la forme de la cinétique d'évolution du nombre de fibres (n). Pour une relation exponentielle:  $e^{at+b}$ . on aura:  $t_{1/2} = (\text{Log}2)/a$ . Pour une évolution logarithmique, la demi-vie dépendra de la quantité en fibres et ne sera donc pas constante en fonction de la durée.

## Interprétation des données

Un certain nombre d'hypothèses sont formulées pour interpréter les données concernant la clairance des fibres. Concernant l'épuration mécanique, on considère généralement que seules les fibres d'une longueur inférieure à 10,µm peuvent être phagocytées par les macrophages et de ce fait être épurées par translocation via les macrophages. Il est, par réciproque, considéré que les fibres > 20,µm peuvent disparaître dans le poumon seulement par dissolution ou par cassure (Bellman *et al.* 1994). Pour estimer la contribution de chacun de ces processus, certains auteurs réalisent une analyse de l'évolution du nombre de fibres dans différentes fractions de longueur et fractions de diamètre (par exemple < 5 µm; 5-10,µm; 10-20,µm; > 20,µm pour la longueur).

La cassure seule des fibres va donc résulter en un déplacement vers les courtes longueurs, dans une fraction de diamètre donné, sans changement de la longueur cumulée (augmentation du nombre). La dissolution seule des fibres va conduire à un déplacement vers des diamètres plus petits dans une fraction de longueur donnée sans changement de la distribution de longueur, sans variation de nombre. La clairance mécanique seule des fibres réduisant une fraction de longueur donnée du même ordre pour toutes les fractions de diamètre, cette réduction devrait donc être plus élevée pour des longueurs inférieures à 5,µm ou 10,µm, comparativement à la fraction supérieure à 20,µm de longueur (Bellman et al. 1994).

On constate donc, d'après les données de la littérature, que les moyens d'étude du devenir des fibres inhalées présentent des différences:

- par la nature du procédé d'exposition,
- par la nature de l'échantillon, plus particulièrement son contenu en impuretés non fibreuses,
- par les méthodes d'analyse de la charge pulmonaire (fixation, récupération, analyse),
- par la nature des paramètres mesurés.

Par ailleurs, la signification de la mesure est très dépendante:

- de la qualité de l'aérosol,
- de la méthode de conservation des tissus biologiques,
- de la méthode de récupération des particules,
- de la précision de la méthode de mesure des paramètres analysés,
- du mode d'expression des résultats.

A notre connaissance, aucune évaluation quantitative de ces paramètres sur le résultat final de la mesure de la biopersistance n'a été effectuée.

### **Dissolution des fibres**

En raison d'observations sur les modifications chimiques de fibres inhalées, il a été considéré que la stabilité chimique (dissolution) des fibres devait être prise en considération. On peut noter que si certains auteurs considèrent que des fibres solubles présentent un risque moindre qu'une fibre durable (supposition discutable, cela a été argumenté plus haut), ils ne semblent pas se poser la question de la toxicité éventuelle des produits de solubilité<sup>6</sup>.

La notion de Ki qui prend en compte la composition chimique des fibres a été élaborée, comme cela est discuté dans le chapitre 1.

6. Il a été rapporté, dans le domaine des biomatériaux, une toxicité proportionnelle au contenu en silice (Nagase *et al.* 1991 ) mais très peu d'informations sont disponibles sur ce sujet.

Le taux de dissolution,  $v$ , peut être déterminé par la diminution du rayon de la fibre par rapport au temps,  $dr/dt$ . Dans ce cas, il s'exprime de différentes manières: soit en nm/jour pour les premiers 25 jours, soit jusqu'à ce que 75 % de la masse totale de la fibre disparaisse, soit jusqu'à ce que 95 % des composants individuels soient dissous si cela se produit avant 25 jours (Guldberg *et al.* 1995). En général, les auteurs qui étudient la durabilité des fibres *in vitro*, dans des milieux acellulaires, utilisent deux pH différents, l'un voisin de la neutralité, l'autre 4,5 pour être proche du pH intralysosomal qui règne dans les macrophages. Il est parfois difficile de savoir quel est le pH le plus pertinent: par exemple, la faible biopersistance des fibres de roche HT, chez le rat, serait due à leur taux de dissolution à pH acide (Guldberg *et al.* 1995), alors que Bernstein *et al.* (1996) interprètent la biopersistance des fibres de roche comme étant dépendante de leur taux de dissolution à pH neutre.

### **Clairance des fibres en fonction des dimensions**

#### **Etudes réalisées avec des fibres calibrées**

Une clairance différentielle selon les dimensions a été rapportée par Morgan *et al.* (1982). Après une exposition, par voie intratrachéale, de fibres calibrées, et une durée post-exposition de 1 an, Morgan *et al.* (1982) avaient démontré, post exposition, une clairance d'environ 90 % pour des fibres de verre de  $5 \times 1,5, \mu\text{m}$  (L x Ø), et une demi-vie d'environ 60 jours (ce qui était comparable aux amiantes). La clairance était de 80 % pour des fibres de  $10 \times 1,5, \mu\text{m}$ , ce qui aboutissait à une demi vie, dans les temps précoces, d'environ 90 jours. En revanche, aucune élimination importante des fibres de 30 et  $60, \mu\text{m}$  de longueur n'a pu être mise en évidence durant cette période. La méthode utilisée pour le recueil des fibres était l'incinération à basse température, reconnue aujourd'hui comme valable pour l'étude de la biopersistance. Les résultats de ces travaux sont en accord avec l'hypothèse d'une plus longue rétention pour les fibres plus longues. Les auteurs ont par ailleurs observé une diminution du diamètre des fibres, quel que soit leur longueur, mais avec un effet beaucoup plus marqué pour les fibres longues (diminution de 7 % et 57 %;  $5, \mu\text{m}$  versus  $60, \mu\text{m}$  de longueur). Ces changements n' affectaient pas toutes les fibres et une augmentation de l'écart-type correspondant au diamètre moyen était observée. Concernant les variations de longueur, il y avait une réduction de la longueur des fibres de  $60, \mu\text{m}$  jusqu'à  $25, \mu\text{m}$  en 18 mois. Cette modification résultait de la fragmentation des fibres de cette catégorie de longueur, qui suivait la dissolution partielle: après un an, il y avait une évidente dissolution de ces fibres, caractérisée par une diminution de diamètre (75 % et 48 % pour les fibres de  $60, \mu\text{m}$  et  $30, \mu\text{m}$ , respectivement, sans modification de la longueur); au-delà, jusqu'à 18 mois, le diamètre variait peu mais la longueur diminuait).

## Comparaison entre MMVF et amiante

Davis (1994) a fait une revue sur la clairance et la dissolution dans la détermination de la durabilité ou de la biopersistance des fibres minérales. En se référant à des résultats rapportés il y a plusieurs années par Le Bouffant *et al.* (1987), il rappelle que, sur la base du nombre de fibres, des fibres de verre et de roche étaient éliminées plus rapidement que le chrysotile, chez le rat, après inhalation, mais qu'un échantillon de microfibres (JM Code 100) était plus persistant que le chrysotile (évaluation après 1 an d'exposition). Les échantillons de fibres de verre et de roche différaient de l'échantillon de microfibres par leurs dimensions<sup>7</sup>, les premiers étant plus longs et plus épais que les microfibres. Une rétention plus élevée des fibres JM 104-475 était aussi décrite dans une autre étude (Muble *et al.* 1987) qui montrait que la demi-vie des fibres de verre, après inhalation ou instillation intratrachéale, était plus élevée que pour le crocidolite (environ 600 jours versus 200 jours). Soixante pour cent des fibres JM104-475 déposées dans le poumon après une exposition par inhalation d'une durée de 1 an étaient retrouvées dans le poumon après un délai post-exposition de 12 mois. Ce pourcentage n'était que de 45 % pour le crocidolite (64 % pour le chrysotile mais il y a séparation longitudinale des fibres au cours du temps, ce qui rend la comparaison plus difficile). Cependant, lorsque la fraction de longueur supérieure à 5,µm était prise en considération, ces proportions étaient inversées: 35 % de ces fibres JM 104 475 étaient retenus dans le poumon, contre 92 % pour le crocidolite. On voit ainsi l'importance du paramètre dimensionnel dans la biopersistance des fibres dans le poumon.

Bellman *et al.* (1987), en exposant des animaux par voie intratrachéale, ont trouvé à l'inverse que la demi-vie des fibres > 5,µm d'échantillons de MMVF (verres 104, céramique) et de crocidolite était plus élevée que celle des fibres inférieures à 5,µm. Il s'agissait d'échantillons non calibrés avec une longueur médiane de l'ordre de 2,µm pour les verres 104 et 1,µm pour le crocidolite. L'échantillon de céramique était plus long (13,µm). Les demi-vies respectives: JM104/475, 104/753, crocidolite étaient de 430,120 et 160 jours pour les fibres < 5,µm de long et de 3 500, 165 et 1 000 jours pour celles supérieures à 5,µm. L'hypothèse, dans ce cas, est une épuration, par les macrophages, des fibres courtes conduisant à un enrichissement en fibres longues.

Ces résultats montrent que la biopersistance relative des MMVF et des amiantes peut changer au cours du temps, et que des fibres longues peuvent résider longtemps dans le poumon. Ils indiquent également que, sur la base du nombre de fibres, les fibres « longues », pour certains échantillons de MMVF, sont moins bien retenues que les fibres plus courtes.

7. Les dimensions des fibres étaient les suivantes: verre, roche = 89 %, 87 % > 5,µm; JM100 = 5,9 % > 5 µm de longueur. Ø = verre, roche: 81 %, 77 % > 1 µm; JM100: 43 % > 0, 1 µm

Toutefois, d'après d'autres études, il y a une meilleure rétention des fibres longues. La contradiction qui apparaît ces résultats reflète vraisemblablement la grande variété des méthodes utilisées: mesure de la rétention à un délai variable après la fin de l'exposition; utilisation d'échantillons dispersés sur le plan des dimensions ou calibrés; sens relatif du terme fibres « longues » avec des coupures à différentes longueurs, selon les études. Les résultats précédemment discutés indiquaient aussi que certaines fibres MMVF présentaient une rétention élevée par rapport à l'amiante. Si les fibres JM104-475 sont réputées comme étant durables, ce qui peut expliquer leur rétention, les caractéristiques dimensionnelles des fibres sont aussi repérées comme étant un paramètre important modulant cette rétention. Dans l'étude de Le Bouffant *et al.* (1987) mentionnée ci-dessus, les rats étaient exposés dans une chambre d'inhalation et la rétention mesurée après une exposition d'une durée de 1 an, immédiatement après exposition. Quelle que soit la nature des fibres, verre, roche, JM100 et chrysotile, les auteurs ont observé, dans le poumon, une majorité de fibres inférieures à 5,µm de long, mais une absence ou une très petite proportion de fibres > 20,µm. Pour les MMVF (verre et roche), il y avait une grande différence dans le spectre granulométrique des fibres dans les poumons, comparativement à l'aérosol, alors que pour les microfibrilles et le chrysotile, les proportions ne différaient que par la proportion des fibres supérieures à 10 et 20,µm de longueurs, (pourcentage de fibres inférieures à 5,µm de long, aérosol versus poumon: verre = 10,1/83; roche = 12,5/80,3; JM100 = 94,1/94,4; chrysotile = 89,8/86,3). Les auteurs concluent à un enrichissement considérable en fibres < 5,µm de long pour les échantillons « roche et verre ». Les différences de rétention des fibres semblent dépendre de la pénétration en raison des différences de diamètre, les fibres les plus épaisses ayant une pénétration plus faible. Le diamètre des fibres paraît donc être un paramètre important, modulant la biopersistance.

### **Etudes réalisées après exposition de courte durée**

Des études plus récentes ont abordé l'analyse de la rétention des fibres selon leurs dimensions. Une disparition plus rapide des fibres « longues » de MMVF, comparativement à celles de crocidolite, a été obtenue plus récemment par Hesterberg *et al.* (1996b) qui ont trouvé que le pourcentage de fibres WHO (c'est-à-dire:  $L > 5, \mu m$ ,  $\emptyset < 3, \mu m$ ,  $L/\emptyset \geq 3$ ) de crocidolite retenues dans le poumon de rat, après inhalation, était plus élevé que celui des fibres MMVF 10, 11, 21 et 22 (55 % et de 0 à 11 % respectivement pour 365 jours de post-exposition; 100 % de rétention étant pris à J 1, un jour après la cessation de l'exposition).

8. Dans l'aérosol, le pourcentage de ces fibres était de l'ordre de quelques % pour les différents échantillons. On notera que 9 tumeurs pulmonaires pour le chrysotile, une tumeur pour l'échantillon de laine de verre (sur environ 45 animaux par lot).

La différence était encore plus importante pour les fibres  $> 10, \mu\text{m}$  de long, ainsi que pour celles  $> 20, \mu\text{m}$  puisque les auteurs observaient respectivement 61 % versus 0,2 % et 83 % versus 0,2 % (comparaison crocidolite versus MMVF11). On notera que la moins grande rétention du crocidolite par rapport au MMVF, en nombre total de fibres, constatée par Muhle *et al.* (1987) ne semble pas retrouvée par ces auteurs. Cette différence pourrait être due aux différentes conditions expérimentales (durée d'exposition de 5 jours versus 1 an et délai post-exposition long). Hesterberg *et al.* (1996b) suggèrent d'après leurs résultats que les fibres longues de MMVF se dissolvent ou se cassent, ce qui expliquerait leur disparition rapide. Cette hypothèse ne s'applique toutefois pas à tous les échantillons de fibres MMVF et des données parfois contradictoires sont observées dans la littérature.

Berastein *et al.* (1996) ont étudié des échantillons, dont une fibre « Fibre L » qui possède une composition proche de celle de MMVF21 (*stone wool*), par inhalation chez le rat (nez seul). La figure 11 de cet article montre que, contrairement aux 8 autres échantillons testés, les fibres de type L de longueur supérieure à  $20, \mu\text{m}$  disparaissent moins rapidement que les fibres des autres tranches granulométriques étudiées ( $5-20, \mu\text{m}$  et  $< 5, \mu\text{m}$ ) (voir aussi texte, p 367 de cet article). Des observations différentes sont rapportées par Bellman *et al.* (1994) qui, étudiant la biopersistance de fibres MMVF21, trouvent que les fibres de longueur supérieure à  $20, \mu\text{m}$  sont éliminées plus rapidement que des fibres de plus petite longueur. Des fibres de longueur  $> 20, \mu\text{m}$  avaient une demi-vie comprise entre 100 et 200 jours, alors que l'on obtient des durées s'échelonnant entre 300 et 400 jours pour les fibres de longueur entre 5 et  $10, \mu\text{m}$ . Cette dernière étude est réalisée par inoculation intratrachéale chez le rat. On peut se demander quelle est l'origine de ces différences. Il semblerait, mais cela reste à confirmer, que les échantillons utilisés dans les deux études aient un diamètre médian comparable ( $0,5$  versus  $0,6$ ) mais que la longueur médiane des fibres de l'aérosol dans le travail de Bernstein *et al.* (1996) soit supérieure à celle de l'échantillon utilisé par Bellman *et al.* (1994) ( $15,0$  versus  $6,7, \mu\text{m}$ ).

### **Questions sur la dissolution des fibres "longues"**

Un certain nombre d'auteurs considèrent que les fibres longues se dissolvent ou se cassent, sur la base de l'observation que les MMVF les plus longues disparaissent plus rapidement que les MMVF « courtes ». Ici, le terme « long » se réfère généralement aux fibres  $> 20, \mu\text{m}$ . Ainsi, comme cela été mentionné ci-dessus, Hesterberg *et al.* (1996b) ont étudié les fibres MMVF 10, 11, 21 et 22 (Longueur géométrique moyenne, LGM= 10 à  $15, \mu\text{m}$ ) et crocidolite (LGM =  $4,2, \mu\text{m}$ ). Ils considèrent que l'élimination des fibres longues peut être due à une dissolution extracellulaire ou à une cassure suivie de clairance par les macrophages ou à une combinaison des deux. Cependant, des fibres peu solubles (MMVF21), au vu des mesures par analyse chimique ponctuelle des fibres intrapulmonaires, subissent aussi une réduction de leur longueur moyenne au cours du temps.

L'interprétation est alors que des cassures se produisent à des sites exposés aux pH intracellulaires acides des macrophages. Les auteurs opposent à cela le crocidolite de la longueur moyenne augmente et qui est considéré comme stable.

Si des auteurs attribuent la disparition rapide des fibres longues à leur dissolution, cette hypothèse doit être considérée, semble-t-il, avec une grande prudence. En effet, un schéma similaire d'élimination préférentielle des fibres longues était obtenu avec des fibres longues (LGM = 4,8,µm) de crocidolite administré en une dose intratrachéale chez le rat (Bellman *et al.* 1994). Pour cet échantillon, la vitesse de disparition était la plus rapide pour les fibres > 40,µm. Les fibres entre 20 et 40,µm avaient, à leur tour, une disparition plus rapide que celles de longueur inférieure. On ne peut donc attribuer de manière univoque la disparition des fibres longues, par rapport à des fibres plus courtes, comme résultant de leur dissolution, étant donné que le crocidolite n'est pas considéré, jusqu'à ce jour, comme étant soluble. Les mécanismes de cassure des fibres longues de crocidolite restent à démontrer. Lors de l'analyse de ces données, on note que le nombre total de fibres diminue considérablement en 18 mois, de manière exponentielle. Si les fibres longues sont cassées et si la demi-vie des fibres courtes est longue, on peut se demander pourquoi on n'observe pas d'augmentation du nombre de fibres à un moment donné.

Une autre hypothèse pourrait être la « réjection » ou la pénétration réduite des fibres « très » longues qui pourraient être déposées sans être à proprement parler retenues. Ainsi, Hesterberg *et al.* (1996b) en étudiant les fibres MMVF 10, 11, 21 et 22, observent que la plus grande décroissance en longueur moyenne se produit durant les 5 premiers jours, observation qui rend compte de la disparition préférentielle des fibres de catégorie > 20,µm et > 10,µm, comparativement aux fibres > 5,µm (fibres WHO). Les différences observées entre les MMVF et le crocidolite pourraient résulter des différences dans la granulométrie des fibres, en plus de la dissolution, puisque les premières sont toujours beaucoup plus longues et épaisses que les secondes. Au cours du temps, la longueur moyenne des fibres MMVF mesurées dans le poumon évolue à partir d'une valeur d'environ 10 à 7,µm et tend vers une longueur inférieure, de l'ordre de 6 à 4,µm (selon la longueur moyenne au départ). A l'inverse la longueur moyenne du crocidolite passe d'environ 3,µm à 4,5,µm.

Pour d'autres auteurs, la solubilité agit sur le diamètre des fibres. Yamato *et al.* (1992, 1994a et b) étudiant les fibres de céramique n'ont pas observé de modification statistiquement significative de la longueur moyenne des fibres au cours de la rétention dans le poumon, et considèrent que le facteur critique de clairance des fibres de céramique est la diminution du diamètre des fibres, et que cela dépend de la solubilité des fibres. Pour ces auteurs, une diminution exponentielle du nombre de fibres de céramique est observée dans le poumon de rat après inhalation de courte durée. La longueur des fibres n'est pas significativement modifiée, au plan statistique, mais le diamètre diminue,

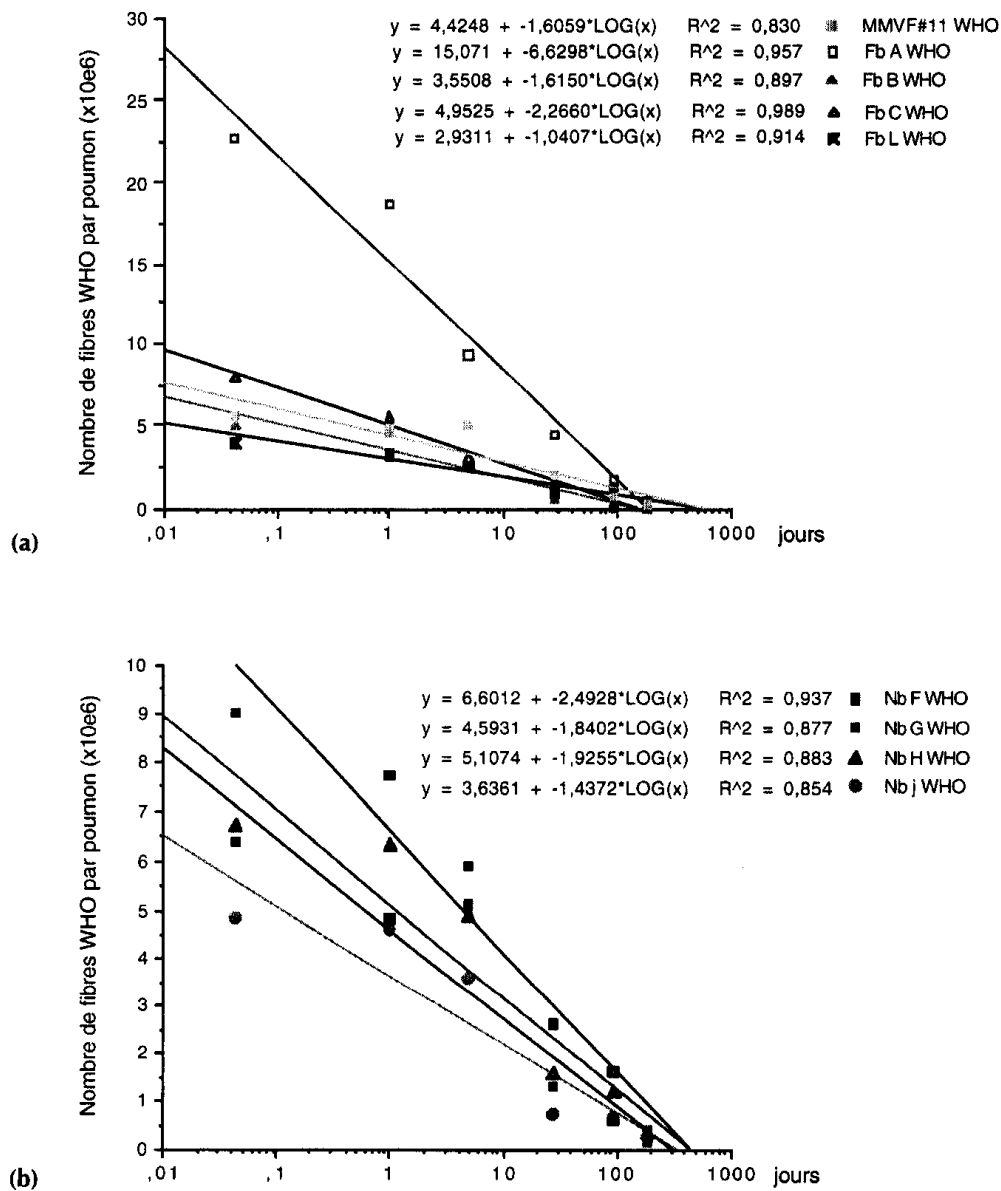
selon une loi approximativement linéaire. Les hypothèses sur le mode de dissolution (attaque sur les surfaces sans modification de la longueur) ont donné des équations théoriques en accord avec l'observation. Pour ces auteurs, la biopersistance des fibres est donc fonction des modifications du diamètre. Le temps de demi-vie, calculé d'après la droite de régression linéaire  $\text{Log } n = f(t)$  ou  $n$  est le nombre de fibres par poumon et  $t$  le temps post exposition, est de l'ordre de 80 jours (Yamato *et al.* 1994a et b).

Dans une autre étude utilisant des fibres de dimension voisine, Hammad et Atieh (1995) trouvent une valeur voisine (74 jours) par inhalation chez le cobaye. Il est à noter que ces derniers auteurs observent, outre une diminution du diamètre des fibres, une diminution de la longueur au cours du temps. Ce résultat semble en totale contradiction avec ceux des auteurs précédents (Yamato *et al.* 1994a et b) qui concluaient à une absence de modification de la longueur, sur la base d'une analyse statistique, alors que Hammad et Atieh (1995) n'ont pas étudié statistiquement les variations de longueur. Notons que la théorie sur la biopersistance, développée par Yamato *et al.* et vérifiée par l'expérience, repose sur l'hypothèse d'une stabilité de la longueur des fibres. On doit donc considérer qu'il n'y a pas de variation de la longueur moyenne.

### **Relations entre biopersistance et solubilité in vitro**

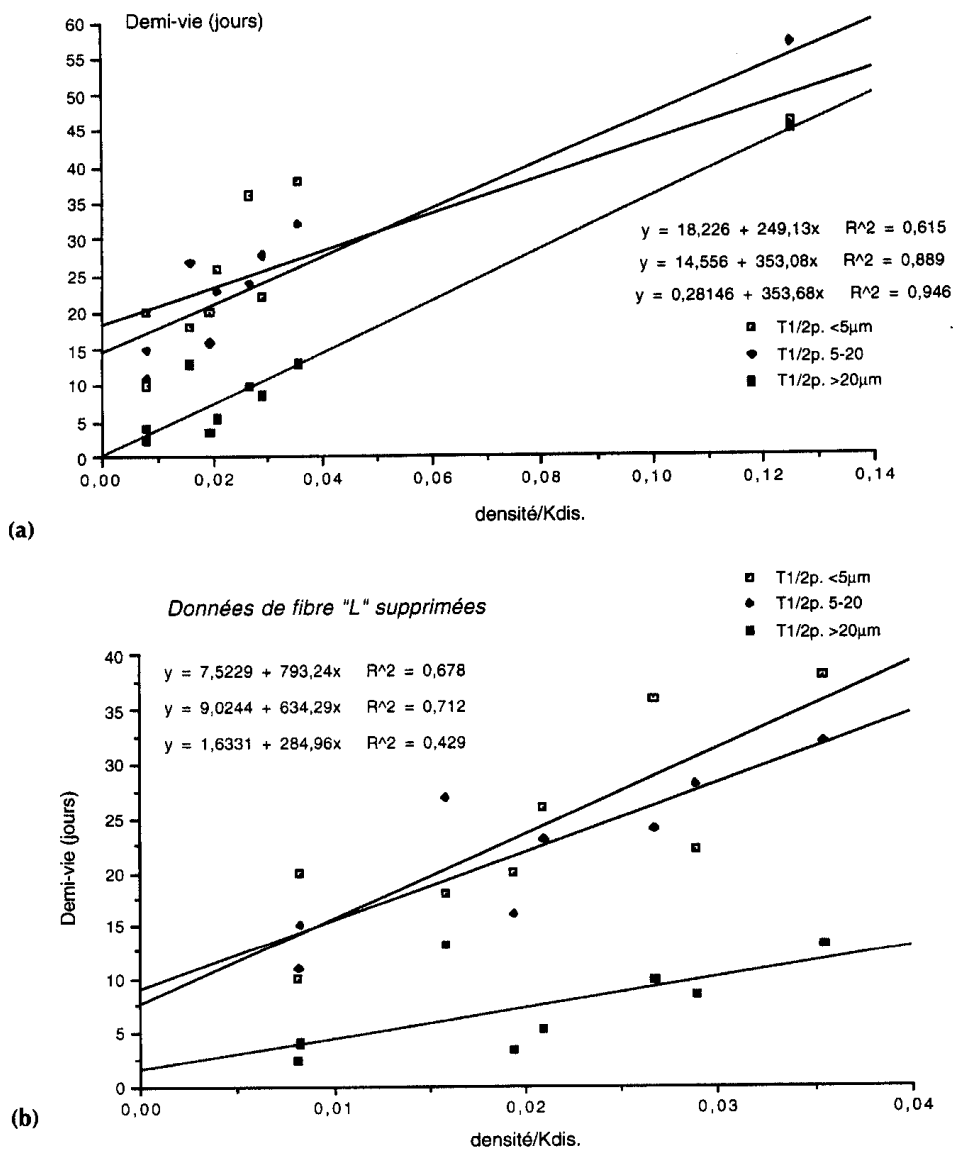
Les relations entre biopersistance et dissolution ne sont pas établies avec certitude. Jusqu'ici, peu d'études ont porté sur les relations entre biopersistance et dissolution des fibres. Certains auteurs ont cependant tenté de relier ces deux paramètres. Bernstein *et al.* (1996) ont, pour 8 échantillons différents, étudié la corrélation entre les paramètres: demi vie et densité/ $K_{dis}$  pour un taux de dissolution calculé à pH 7,4 (voir Chapitre 1). Les conclusions indiquent l'existence d'une corrélation pour les fibres ayant une longueur supérieure à 20, $\mu\text{m}$ . Toutefois, ces conclusions suggèrent quelques commentaires.

- Le calcul de la demi-vie a été effectué selon un ajustement par double exponentielle qui est une approximation de la courbe obtenue. Une relation logarithmique entre le nombre de fibres dans le poumon et le temps de rétention aurait également donné un bon ajustement (Fig. 7-3).
- La corrélation montre un ensemble de 8 points, dans la partie basse de la courbe, et un point isolé dans la partie haute, dont le poids est important dans la corrélation. Si ce point était supprimé, la corrélation n'est plus observée ( $r^2$ : 0,429, ns) pour les fibres  $> 20, \mu\text{m}$  de long. En revanche, peu de modifications seraient apportées pour les fibres des autres tranches granulométriques (Fig. 7-4).



**Fig. 7-3 Ajustement logarithmique des données sur la demi-vie de différents échantillons de fibres. D'après Bernstein *et al.* 1996**

Dans une publication récente, Bignon *et al.* (1997) ont réalisé une analyse statistique (régression non linéaire) afin de comparer: les différentes méthodes in vitro de mesure de la solubilité des MMVF; la solubilité et les différentes méthodes d'évaluation de la biopersistance in vivo; la solubilité et le potentiel tumorigène de différents échantillons de MMVF. La solubilité in vitro était déterminée par la mesure du Ki, du Kdis; la biopersistance in vivo par la demi-vie après exposition de rats pendant quelques jours par inhalation ou par instillation intratrachéale; le potentiel tumorigène par la dose TD<sub>25</sub>,



**Fig. 7-4 Relation entre demi-vie et dissolution. D'après les données de Bernstein *et al.* (1996)**

c'est-à dire la dose nécessaire à l'obtention de 25 % de tumeurs par inoculation intrapéritonéale chez le rat. Les auteurs concluent:

- à une excellente relation entre les paramètres  $K_i$  et  $K_{dis}$ . On remarquera que cette corrélation ne concerne pas de fibres avec un  $K_i > 40$  car les valeurs du  $K_i$  s'échelonnaient entre 25 et 40;
- à une corrélation entre  $K_i$  et biopersistance des fibres, mesurée par la demi-vie par inhalation, pour les fibres WHO et pour les fibres  $> 20, \mu m$ ;

- à une corrélation pas très bonne (*variance explained: 60 %*) entre la biopersistance, mesurée par instillation intratrachéale et le Ki mais les auteurs indiquent que d'autres études sont en cours.

La corrélation entre la solubilité des fibres *in vitro* et le TD<sub>25</sub> (données de Pott) a été étudiée sur 14 échantillons (dont un seul présentait un Ki > 40). Les auteurs indiquent qu'il s'agit de résultats préliminaires qui ne sont pas en contradiction avec les conclusions suivantes: TD<sub>25</sub> augmente avec le diamètre pour les fibres durables; TD<sub>25</sub> diminue avec la longueur pour toutes les fibres; TD augmente avec le Ki; cependant l'étude statistique entre TD<sub>25</sub> et Ki ne montre pas de corrélation entre ces 2 paramètres.

En conclusion, actuellement, la notion de biopersistance reste floue, en raison de la grande diversité des méthodes et moyens d'analyse utilisés pour sa détermination. Aucun argument scientifique solide ne permet à ce jour d'attribuer à la dissolution un rôle prépondérant dans les mécanismes qui régissent la rétention des particules.

On peut considérer qu'aujourd'hui, l'utilisation de la solubilité *in vitro* comme paramètre prédictif de la toxicité des fibres est tout à fait prématurée et ne repose pas sur des bases scientifiques solides. Au contraire, on peut remarquer, d'une part, que la limite Ki <sup>3</sup> 40 n'est pas justifiée puisque les études de corrélations disponibles dans la littérature n'ont pas été effectuées avec des fibres présentant des valeurs de Ki au-delà de 40 [Bignon *et al.* ( 1997 ) mentionnent même que des fibres avec un Ki négatif ont une biosolubilité *in vivo* équivalente à celle de fibres ayant un Ki de + 30]; et, d'autre part, qu'une absence de relation statistique entre solubilité *in vitro* et potentiel tumorigène *in vivo* a même été montrée.

### **Conclusions sur les études expérimentales chez l'animal**

Les études expérimentales réalisées chez l'animal sont assez hétérogènes, tant par le type de fibres utilisées au sein d'un même groupe de fibres (verre, roche, laitier ou céramiques) que par les caractéristiques dimensionnelles, les méthodes de préparation des échantillons ou les protocoles expérimentaux. La puissance statistique des études n'est pas toujours très élevée, souvent en raison du petit nombre d'animaux utilisés (surtout dans les études anciennes). Toutefois, un certain nombre de conclusions peuvent être dégagées.

Les résultats montrent que les fibres de verre et de céramique induisent des tumeurs par inoculation intracavitaire (pleurale et péritonéale). Les laines de roche provoquent également des tumeurs mais cette constatation ne repose que sur un petit nombre d'études.

Il n'est pas possible de donner de réponse pour les laines de laitiers ou les filaments continus en raison de l'absence de données. Des résultats similaires étaient obtenus par instillation intratrachéale pour les fibres de roche, de laitier et les filaments continus. En revanche, aucune effet tumorigène n'était détecté par instillation intratrachéale avec les fibres de verre (excepté avec les microfibrilles) ou pour les céramiques. Dans ce dernier cas, la puissance des études répertoriées était faible, en raison du petit nombre d'animaux. Les études par inhalation n'ont montré une augmentation statistiquement significative du nombre de tumeurs qu'avec les fibres de céramique mais pas avec les fibres de verre ou de roche (3 et 2 études répertoriées respectivement pour ces deux derniers types de fibres). Cependant, des augmentations non significatives de la fréquence de tumeurs étaient trouvées chez les animaux exposés aux fibres de verre; il est vraisemblable qu'un effet significatif aurait été obtenu avec une augmentation de la puissance des études. Bien qu'il soit difficile, en raison des différences de structure et de dimensions entre les fibres de substitution à l'amiante et l'amiante, de comparer ces deux sortes de fibres, on a constaté que, d'une manière générale, les animaux ont été exposés à un nombre de fibres de substitution très inférieur à ce qui était pratiqué lors des expositions expérimentales à l'amiante. Il est vraisemblable que des concentrations similaires en fibres d'amiante auraient donné des résultats peu ou pas significatifs.