Analyse minéralogique par microscopie électronique et par Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) chez deux patients atteints de sarcoïdose issus de l'étude MINASARC

M Catinon[1], B Busser[2-4], F Thivolet[5], M Kambouchner[6], JF Bernaudin[6], O Freynet[7], D Valeyre[7], C Cavalin[8], PA Rosental[8], AM Trunfio-Sfarghiu[9], F Arbib[10], C Pison[10], V Bonneterre[11], V Motto-Ros[2], M Vincent[1]

1. Minapath Developpement, Villeurbanne, France ; 2. Institut Lumière Matière, UMR 5306, Univ. Lyon 1 - CNRS, Villeurbanne, France ; 3. Université Grenoble Alpes, Institute of Advanced Biosciences, IAB INSERM U1209 CNRS UMR5309, Grenoble, France ; 4. CHU de Grenoble, Grenoble, France ; 5. Cytologie et Pathologie. Pole Est Hospices Civils de Lyon, Bron, France ; 6. Cytologie et Pathologie, APHP Hôpital Avicenne, Bobigny, France ; 7. Service de Pneumologie, APHP Hôpital Avicenne, Bobigny, France ; 8. Centre d'études européennes, SILICOSIS (ERC Advanced Grant), Sciences Po Paris, France ; 9. Laboratoire LaMCoS, Univ Lyon, INSA-Lyon, CNRS UMR5259, LaMCoS, F-69621, France ; 10. Service Hospitalier Universitaire de Pneumologie, CHU Grenoble Alpes ; Université Grenoble Alpes, France ; 11. Département Médecine et Santé au Travail, CHU Grenoble Alpes, France

CONGRES DE PNEUMOLOGIE DE LANGUE FRANCAISE (CPLF) 2018, LYON France, 26-28 janvier

I. Introduction

L'étude MINASARC est une étude cas-témoins (20 cas de sarcoïdose et 20 volontaires sains) conçue pour évaluer l'"exposome" inorganique par un questionnaire professionnel et environnemental en concomitance avec une analyse minéralogique (AM) sur lavage broncho-alvéolaire (LBA) en microscopie électronique à transmission (MET) et biopsies incluses en paraffine par microscopie optique (MO) et microscopie électronique à balayage (MEB). Cette étude a montré que 8 cas de sarcoïdoses et 5 volontaires sains présentaient des charges élevées en particules minérales, mais sans différence significative entre les deux groupes sauf pour la charge en aciers (p=0,029). Par ailleurs, le questionnaire montrait que l'activité de construction et démolition était significativement plus élevée chez les patients porteurs de sarcoïdose (p=0,018) [1]. Nous rapportons, dans ce poster, les résultats de l'analyse en microscopie électronique obtenus sur deux des cas de sarcoïdose, comparés à une analyse en LIBS (Laser Induced Breakdown spectroscopy) [2] réalisée sur les biopsies.

II. Patients et méthodes

A. Cas cliniques

Cas n°1 : Mme P. M, 29 ans, non fumeuse, a travaillé pendant 4 ans comme esthéticienne, puis 4 ans manucure avec poses d'ongles artificiels, tableau de sarcoïdose stade 1, dyspnée sans atteinte fonctionnelle respiratoire, adénomégalie sous-carénaire. Granulome sarcoïdosique à la biopsie transbronchique par EBUS.

Cas n°2 : Mr L. P , 39 ans, d'origine angolaise, ex-fumeur à 4 PA, agent de sécurité incendie, ancien travailleur BTP, dyspnée, toux, asthénie, baisse de l'état général, adénopathies cervicales, papules érythémateuses sur la racine des bras dont une sur tatouage, trouble restrictif sévère à l'EFR avec CVF et DLCO à 38% et 29% théorique, scanner thorax : micronodules parenchymateux lymphatiques diffus associés à des adénopathies médiastinales. Biopsies bronchiques, glandes salivaires et cutanée avec aspect de granulome. Sarcoïdose Stade IV.

B. Analyse MET (Fig.1)

Suite à une étape de digestion/filtration, le LBA a été analysé en MET (JEOL JEM-1400). Une microanalyse sur 100 particules aléatoires a permis un classement de différentes familles de particules en fonction de leur composition chimique. L'expression des résultats en nombre de particules par ml de LBA a permis d'établir un classement des 40 sujets inclus dans l'étude pour chaque famille de particules.

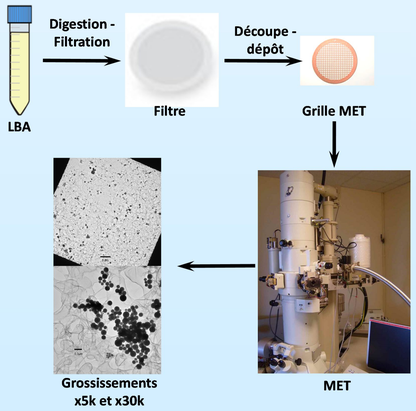

Figure 1 : analyse minéralogique du LBA en MET

C. Analyse MEB (Fig. 2)

Pour chaque patient, une coupe histologique (5µm d'épaisseur) issue de la biopsie en paraffine a été observée en microscopie optique, puis une seconde coupe (5µm d'épaisseur) adjacente à la première a été analysée en MEB (Fig.2).

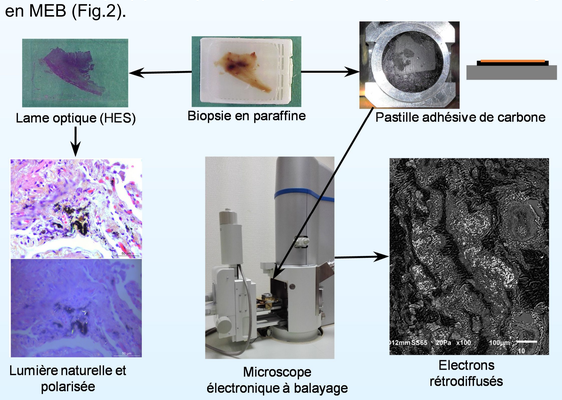

Figure 2 analyse minéralogique *in situ* MEB à partir d'une biopsie inclue en paraffine.

D. Analyse LIBS (Fig.3)

La surface du bloc en paraffine à partir duquel ont été réalisées les coupes histologiques a été analysée en LIBS sur une profondeur de 40µm (Fig.3).

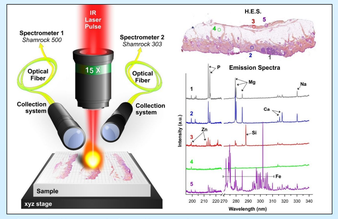

Figure 3 : Représentation schématique des principaux composants de l'instrument d'imagerie LIBS : un objectif de microscope pour focaliser l'impulsion laser, une plateforme d'échantillonnage motorisée et un système de détection optique couplé à des spectromètres Czerny-Turner.

Histologie du tissu cutané (HES) et spectres d'émission correspondants aux différentes zones analysées par LIBS [2].

III. Résultats

A. Analyse MET (Fig.4)

L'analyse MET du LBA de la patiente n°1 a mis en évidence la présence de particules de silice (5ème /40), de titane (4ème /40) et d'aluminium (3ème /40). De nombreuses billes ont également été observées (2ème /40), principalement composées de silice amorphe.

Le patient n°2 est le patient présentant le plus grand nombre de particules de titane (principalement des oxydes de titane) et d'acier. Les rares billes observées sont des oxydes de titane.

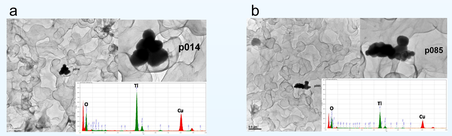

Figure 4 : Observation de particules en MET et spectre EDX correspondant. Le cuivre provient de la grille de cuivre qui supporte le filtre. a : patient n°1 ; b : patient n°2.

B. Analyse MEB (Fig.5)

L'analyse MEB de la biopsie de la patiente n°1 a mis en évidence la présence des particules suivantes : 87 titane-nickel ; 55 oxyde de silicium ; 45 aluminosilicate ; 43 acier ; 9 composé titane ; 3 phosphate de calcium ; 2 talc ; 2 oxyde de titane.

Chez le patient n°2, les particules suivantes ont été analysées : 24 acier ; 22 phosphate de calcium : 11 oxyde de calcium ; 7 oxyde de fer ; 2 oxyde de silicium ; 1 composé nickel ; 1 CuZn et 1 phosphate de sodium.

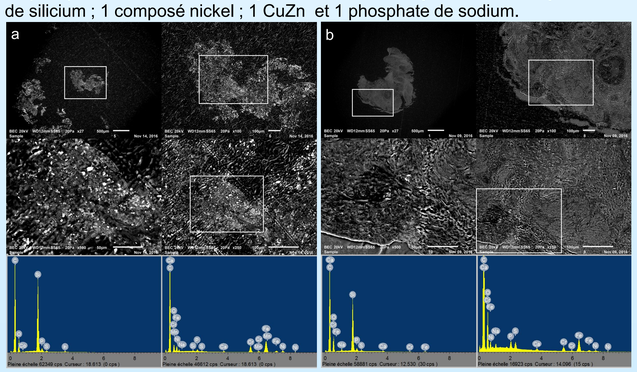

Figure 5 : analyse MEB sur les coupes de biopsies incluses en paraffine. a : patient n°1 ; b : patient n°2.

C. Analyse LIBS (Fig.6)

La figure 6 illustre les résultats de l'analyse multi-élémentaire par LIBS sur les biopsies des deux patients. L'échelle colorimétrique utilisée correspond à l'intensité du signal optique mesuré. Elle renseigne sur le niveau de concentration des éléments étudiés.

L'analyse de la biopsie ganglionnaire de la patiente n°1 montre la présence de phosphore, calcium, fer, silicium, titane, chrome et manganèse en quantités importantes.

L'analyse de la biopsie bronchique du patient n°2 montre la présence de phosphore, magnésium, sodium, calcium, fer, cuivre, aluminium et chrome.

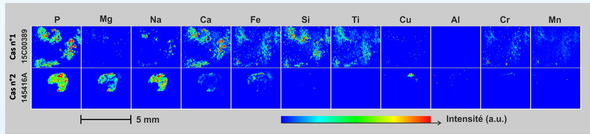

Figure 6 : Analyse multi-élémentaire par LIBS sur les biopsies incluses en paraffine des patients n°1 et 2.

D. Synthèse des résultats de l'AM (Tableau 1)

Le tableau 1 synthétise les résultats de l'AM réalisée sur les deux cas de sarcoïdoses issus de l'étude MINASARC.

Chez la patiente n°1, les éléments titane et silicium sont retrouvés en quantités importantes dans les trois types d'analyses.

Chez le patient n°2, les éléments fer et chrome sont en quantité élevée sur chaque analyse.

On peut noter que le nickel, qui entre dans la composition des particules d'acier détectées en MET et MEB, n'a pas été analysé en LIBS.

Tableau 1 : résumé des résultats de l'analyse minéralogique réalisée sur deux patients atteints de sarcoïdose issus de l'étude MINASARC

N° Patient	1	2
Age	29	39
Sexe	F	M
Statut tabagique	0	0
Profession	Manucure	Employé en sécurité incendie
Stade de la maladie	1	4
Type d'échantillonnage	EBUS/TBNA	Biopsie bronchique
Analyse minéralogique du LBA	4ème Ti ; 5ème SiO ; 3ème Al	1er FeCrNi ; 1er Ti
Empoussièrement de la biopsie	++++	+++
Distribution chimique des particules en MEB	35% TiNi ; 22% SiO ; 18% SiAl ; 17% FeCrNi	35% FeCrNi ; 32% PCa ; 16% CaO ; 10% FeO
Résultats LIBS	P ; Ca ; Fe ; Si ; Ti ; Cr	P ; Mg ; Na ; Ca ; Fe ; Cu ; Al ; Cr

IV. Discussion et conclusion

Les particules de silice observées chez la patiente n°1 pourraient provenir de poudres utilisées lors du polissage des ongles [3]. Avant d'être employé comme agent dans le domaine de la sécurité incendie, le patient n°2 a travaillé moins d'un an comme plombier et effectué de la soudure sur charpente métallique qui a pu l'exposer à des particules d'acier.

Il est proposé de corréler l'analyse minéralogique aux données de l'interrogatoire professionnel et environnemental qui est actuellement insuffisamment réalisé lors de pathologies infiltratives [1]. L'analyse MEB in situ et l'analyse LIBS sont complémentaires : le MEB in situ permet l'observation et l'identification de la composition chimique des particules permettant de la classer en différentes familles (Silicates, silice, acier…). Toutefois, l'analyse au grossissement x500 rend difficile l'identification de nanoparticules isolées et ne permet pas une mesure précise de la quantité de particules sur l'ensemble de la coupe. Le LIBS, qui balaye l'ensemble de la coupe, donne une indication du nombre de spots par centimètre carré et permet la détection de faibles concentrations en éléments pouvant correspondre à des nanoparticules non identifiables en MEB.

Le rôle d'un facteur d'empoussièrement inorganique dans le déclenchement de la sarcoïdose est discuté. Les techniques d'analyses *in situ* en MEB et en LIBS sur la biopsie incluse en paraffine sont complémentaires et doivent être associées à un interrogatoire professionnel et environnemental du patient pour constituer un faisceau d'indices multiples. La mise en évidence d'un profil minéralogique anormal associé aux données de l'interrogatoire peut permettre de rediscuter le diagnostic de sarcoïdose vers celui d'une pathologie d'empoussièrement minéral confirmant les frontières floues entre sarcoïdoses et pneumoconioses [4].

Références : [1] Catinon M, et al. Lung (submitted). [2] S Moncayo et al., Spectrochimica Acta Part B : Atomic spectroscopy, 2017. [3] Maxfield R. and Howe HL. Epidemiol Report Series 97:8. Springfield, Il: Illinois Department of Public Health, November 1997. [4] Vincent M et al., Am J Ind Med 2015;58:S31-S38

Absence de liens d'intérêts