

# Sarcoïdose et empoussièriment pulmonaire : l'analyse minéralogique (AM) en microscopie optique (MO).

C. Chemarin<sup>a</sup>, M. Catinon<sup>a,b</sup>, E. Villar<sup>a</sup>, A.-S. Blanchet<sup>a</sup>, S. Vuillermoz<sup>a</sup>, S. Assaad<sup>a</sup>, C. Cavalin<sup>b</sup>, P.-A. Rosental<sup>b</sup>, M. Vincent<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> CH St Joseph et St Luc, 20 Quai Claude Bernard, Lyon 69007, France - <sup>b</sup> Centre d'études européennes de Sciences Po, 28, rue des Saints-Pères 75007 Paris

CONGRES DE PNEUMOLOGIE DE LANGUE FRANCAISE (CPLF) 2014, MARSEILLE France, 31 janvier – 2 février

## I. Introduction

L'entité de la sarcoïdose ou maladie de Besnier-Boeck-Schaumann s'est constituée entre 1888 et 1915 pour aboutir à la notion d'une maladie granulomateuse systémique affectant principalement le poumon et le système lymphatique dont la cause reste inconnue depuis environ un siècle. Parmi les facteurs étiologiques possibles de la maladie (Newman et Newman, 2012), celui de l'exposition aux poussières minérales inorganiques en particulier la silice, les silicates et les métaux est envisagé depuis une quinzaine d'années. Dans cette hypothèse, le développement de méthodes évaluant les surcharges en particules inorganiques dans les prélèvements biologiques permet d'éclaircir leur rôle dans la survenue de la sarcoïdose. Nous présentons le potentiel de l'analyse numérique d'image pour décrire la charge en particules du liquide de Lavage Broncho-Alvéolaire (LBA). Il s'agit d'une étude rétrospective testant le lien entre l'empoussièriment pulmonaire et la sarcoïdose.

## II. Matériel et méthodes

### Population de sujets sarcoïdoses

23 sujets, pris en charge au Centre Hospitalier St Joseph St Luc ayant une sarcoïdose de stades 1 à 4 pour laquelle :  
- un syndrome de Löfgren est décrit (2 cas) ou une preuve histologique (21 cas) a été obtenue,  
- et une analyse minéralogique du LBA a été demandée au laboratoire de Minéralo-Pathologie du Centre Hospitalier St Joseph St Luc de Lyon entre 2005 et 2013.

### Population de sujets-« contrôles »

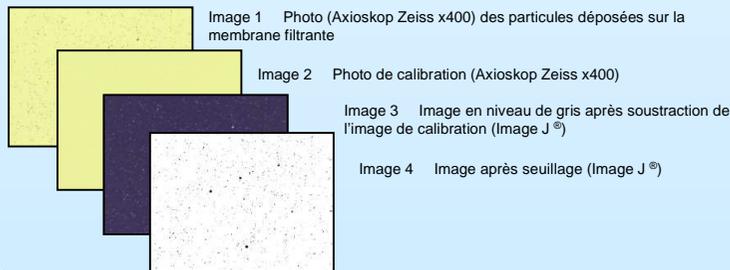
6 sujets pour lesquels une analyse minéralogique du LBA a été demandée au laboratoire de Minéralo-Pathologie du Centre Hospitalier St Joseph - St Luc de Lyon entre 2005 et 2013 et pour lesquels la maladie a été identifiée (1 BOOP post radique, 1 tuberculose, 2 varicelles, 1 micro-nodule métastatique, 1 pneumopathie à la bleomycine) et n'est pas liée à une exposition à des poussières minérales.

### Préparation des LBA

Les LBA ont été préparés selon la méthode de digestion-filtration : le prélèvement est digéré par de l'hypochlorite de sodium en solution aqueuse puis, après centrifugation et rinçage, la solution est filtrée sur une membrane MF-Millipore de diamètre de pores 0,45 µm. Déposée sur une lame, la membrane est rendue transparente dans des vapeurs d'acétone puis observée avec un microscope optique Zeiss Axioskop 40 couplée à une caméra AxioCam IC3.

### Analyse numérique d'images issues de la filtration du LBA

Au grossissement x400, trois champs sont choisis au hasard après vérification de l'homogénéité de l'ensemble du filtre, puis ils sont photographiés en lumière naturelle. Les images sont analysées par le logiciel ImageJ® (Abramoff, 2004). Après soustraction d'une image de calibration, l'image en niveau de gris est segmentée par seuillage afin de différencier les éléments d'intérêt du fond. Les particules de taille inférieure à 3 pixels et les particules en contact avec le bord de l'image sont ignorées. Pour chaque particule identifiée, les paramètres d'aire à 2 dimensions et de diamètre de Feret sont déterminés. Les valeurs moyennes du nombre total de particules, du nombre de particules dont la taille est inférieure à 1 µm, et de la taille des particules sont reportées. Le taux de particules est exprimé en nombre de particules par ml de LBA. Un filtre « blanc » réalisé à partir de la digestion-filtration de 20 ml de sérum physiologique à la place du LBA, présente un taux de particules de  $6.9 \cdot 10^2 \text{ ml}^{-1}$  dont  $6.0 \cdot 10^2 \text{ ml}^{-1}$  ont un diamètre inférieur à 1 µm.



## III. Résultats

Les figures 1, 2 et 3 représentent, en échelle logarithmique, sous forme de boîtes à moustaches la répartition du nombre total de particules par ml de LBA, du nombre de particules dont la taille est inférieure à 1 µm, et de la taille des particules pour chaque groupe. Les moyennes géométriques sont les suivantes :

	23 sarcoïdoses	6 contrôles
nombre total de particules par ml de LBA	$1.3 \cdot 10^5$	$5.9 \cdot 10^4$
nombre de particules dont la taille est inférieure à 1 µm	$8.6 \cdot 10^4$	$4.5 \cdot 10^4$
Diamètre de Feret des particules (µm)	0.98	0.93

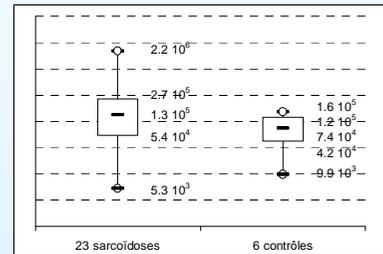


Figure 1

Boîte à moustaches représentant la répartition des nombres totaux de particules par ml de LBA mesurés par analyse d'image pour les groupes de sujets malades et de sujets-contrôles.

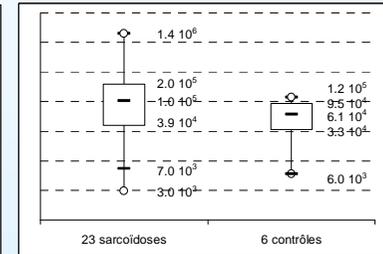


Figure 2

Boîte à moustaches représentant la répartition des nombres de particules dont la taille est inférieure à 1 µm, par ml de LBA mesurés par analyse d'image pour les groupes de sujets malades et de sujets-contrôles.

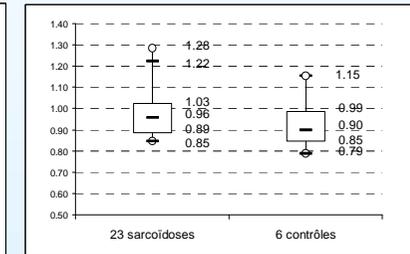


Figure 3

Boîte à moustaches représentant la répartition des diamètres moyens de Feret (µm) des particules mesurés par analyse d'image pour les groupes de sujets malades et de sujets-contrôles.

Les valeurs d'empoussièriment subissent une transformation logarithmique avant comparaison. Après avoir vérifié l'égalité des variances par un test de Fischer, le test de Student est réalisé dans les trois cas (Excel®). Les différences entre les deux groupes (sarcoïdoses / contrôles) ne sont pas significatives :

Nombre total de particules par ml de LBA :  $t^* = 1.28$  (ddl=27)  $p = 0.21$

Nombre de particules dont la taille est inférieure à 1 µm :  $t^* = 1.10$  (ddl=27)  $p = 0.29$

Taille des particules :  $t^* = 0.87$  (ddl=22)  $p = 0.41$

## IV. Discussion

L'AM permet de décrire la charge minérale déposée sur un filtre et issue de la digestion des LBA à partir des paramètres suivants : nombre total de particules par ml de LBA, nombre de particules dont le diamètre est inférieur à 1 µm, diamètre des particules. Les valeurs mesurées ont une grande étendue et l'impossibilité de mettre en évidence une différence entre le groupe des 23 sarcoïdoses et celui des 6 contrôles peut être attribuée à la part de variabilité induite par le processus d'échantillonnage. Les groupes ont en effet des effectifs insuffisants particulièrement celui des 6 sujets-contrôles. De plus le fait qu'il ne s'agisse pas de témoins sains peut induire une augmentation des valeurs mesurées, même si leurs pathologies, d'étiologie a priori non liée à un empoussièriment pulmonaire, permettent d'assimiler ces personnes à des « témoins ».

Les patients n'ont pas été soumis à un questionnaire environnemental et professionnel systématique. A l'interrogatoire, on note cependant plusieurs activités empoussiérées : balayeur en fonderie, chaudronnier, électricien (2), jardinier, mécanicien, femme de ménage (3), ouvrier du bâtiment, menuisier, hobby empoussiéré. Les grandes enquêtes santé et professionnelle semblent sous estimer les risques poussières en particulier le risque « silice » (Cavalin et al., 2013). Un questionnaire spécifique « vie entière » est souhaitable.

## V. Conclusion

L'AM avec quantification des particules non fibreuses par traitement d'image numérique est une méthode novatrice pour la description et le dépistage de surcharges minérales. La faiblesse des effectifs des différents groupes et le caractère imparfait des sujets contrôles de cette étude pilote montre qu'il est nécessaire d'envisager une étude prospective avec sujets malades et sains. MINASARC01, étude conçue et réalisée par un groupe de travail multidisciplinaire réunissant pneumologues, médecins du travail, anatomopathologistes, sociologues, historiens des sciences et minéralogistes, débute cette année 2014. Elle comparera en aveugle les données de l'analyse minéralogique du LBA et celles obtenues à partir d'un questionnaire environnemental et professionnel pour 20 sujets sains et 20 patients atteints de sarcoïdose. Certains travaux (comme ceux du poster CPLF 2014 M. Catinon et al. à propos de 3 cas cliniques) montrent par ailleurs que l'AM par microscopie optique est utile mais non suffisante pour décrire les surcharges minérales. MINASARC01 fera donc appel à la microscopie électronique afin de déterminer la nature des particules observées sur filtre et in-situ dans le granulome sarcoïdosisique.