
7

Physiopathologie expérimentale

Introduction	281
Moyens d'étude	283
Études sur animal entier	283
Études sur cellules isolées	288
Études acellulaires	288
Échantillons étudiés	289
Type de fibres	289
Caractéristiques des échantillons utilisés	289
Pathologies résultant d'études expérimentales in vivo avec des laines d'isolation	289
Laines de verre et fibres de verre	289
Études par inhalation	296
Études par instillation intratrachéale	299
Études par inoculation intrapleurale	299
Études par inoculation intrapéritonéale	304
Étude de la charge pulmonaire dans les expérimentations par inhala- tion	304
Études réalisées avec des fibres « microfibres »	305
Laine de roche	307
Études par inhalation et instillation intratrachéale	307
Inoculation intracavitaire	311
Laine de laitier	311
Études par inhalation et installation intratrachéale	311
Études réalisées par inoculation intracavitaire	315
Filaments de verre	315

Pathologies résultant d'études expérimentales in vivo avec des fibres de céramique	318
Études réalisées par inhalation	318
Études réalisées par instillation intratrachéale	327
Études réalisées par inoculation intracavitaire	328
Conclusions sur les résultats obtenus avec les laines d'isolation et les céramiques	330
Laines de verre et fibres de verre	331
Laine de roche et laine de laitier	332
Fibres de céramique	332
Commentaires sur les études réalisées par inhalation	334
Commentaires sur la rétention des fibres dans le poumon, après inhala- tion	336
Pathologies résultant d'études expérimentales in vivo avec d'autres fibres	341
Toxicité des fibres de para-aramide	341
Déposition et rétention	341
Toxicité par inhalation	342
Instillation intratrachéale	342
Injection péritonéale	342
Toxicité des fibres de cellulose	343
Devenir des fibres inhalées	343
Généralités	343
Notion de biopersistance	345
Moyens d'étude du devenir des fibres inhalées	346
Exposition	347
Mesure et expression de la rétention	348
Interprétation des données	348
Dissolution des fibres	349
Clairance des fibres en fonction des dimensions	350
Études réalisées avec des fibres calibrées	350
Comparaison entre MMVF et amiante	351
Études réalisées après exposition de courte durée	352

Questions sur la dissolution des fibres « longues »	353
Relations entre biopersistance et solubilité in vitro	355
Conclusions sur les études expérimentales chez l'animal	358
Études sur les mécanismes d'action au niveau cellulaire	359
Évaluation des effets génotoxiques et carcinogènes des FMA in vitro et in vivo	359
Systèmes in vitro utilisés pour étudier l'endommagement de l'ADN dans les cellules de mammifères ou les procaryotes (mis à part la mutagenèse)	360
Analyse des mutations géniques	360
Systèmes cellulaires étudiant le potentiel clastogène par analyse des anomalies chromosomiques	361
Études de l'aneuploidie et de la polyploidie	361
Résultats obtenus avec les FMA : génotoxicité	361
Endommagement de l'ADN cellulaire et mutations géniques	361
Anomalies chromosomiques	362
Mitoses anormales et aneuploidie	363
Transformation cellulaire provoquée par les FMA	363
Discussion	364
Références	365
Annexes	381
Echelles de gradation des anomalies pathologiques	381
Réactions inflammatoires et fibres	381
Introduction	381
Développement expérimental d'une réaction inflammatoire	383
Production ex vivo et in vitro de molécules inflammatoires	384
Réactions inflammatoires nocives	388

Introduction

Un certain nombre de maladies inflammatoires, fibrogéniques ou cancéreuses, sont induites par l'exposition de l'homme ou de l'animal à des fibres d'amiante. Les mécanismes par lesquels les fibres induisent ces maladies ne sont pas complètement élucidés. Les résultats de nombreux travaux font penser que la structure « fibre » de l'amiante est un élément pathogénique important, au même titre que certaines de ses caractéristiques chimiques (Everitt 1994 ; Davis & Donaldson 1993 ; Gilmour *et al.* 1995). En conséquence, toute nouvelle fibre proposée comme substitut à l'amiante ou pour tout autre usage, doit être soupçonnée, a priori, d'être pathogène en raison de sa structure, ce qui n'empêche pas d'analyser les possibles conséquences de ses caractéristiques physicochimiques. La reconnaissance de cette pathogénicité sur l'homme est difficile, car une caractéristique des maladies induites par les fibres (reconnue dans le cas de l'amiante) est la longue période de latence qui précéderait leur apparition. Ainsi, pour renforcer ou atténuer les soupçons portés sur les fibres dans le cadre de leur danger pour la santé de l'homme, il a semblé utile de comparer les caractéristiques physicochimiques et les effets expérimentaux des fibres (anciennes ou nouvelles) utilisées en remplacement de l'amiante (MMVF : *man made vitreous fibres* et fibres organiques telles que le Kevlar®), aux fibres d'amiante ; la comparaison a porté sur les effets observés chez l'animal, et in vitro sur des cellules et des molécules isolées.

Les méthodes développées ont visé à étudier le risque associé aux expositions par inhalation. Par référence à ce qui avait été observé avec les fibres d'amiante, le risque de fibrose pulmonaire, de cancer du poumon et de la plèvre a été particulièrement exploré. Cette approche est un peu restrictive, en ce sens qu'elle ne concerne, a priori, que les pathologies respiratoires. On peut suggérer qu'il y aura intérêt à recommander de ne pas limiter les études sur la physiopathologie des fibres de remplacement au système respiratoire, surtout en raison du développement de fibres vitreuses solubles en milieu biologique. En effet, les produits solubilisés peuvent, le cas échéant, atteindre d'autres organes.

Les expérimentations animales ont essentiellement porté sur le potentiel carcinogène des fibres après exposition par inhalation, inoculation intrapleurale ou intrapéritonéale pour étudier plus spécifiquement le mésothéliome, ou par instillation intratrachéale. Les études par inhalation ont, dans certains cas, évalué le potentiel fibrosant. Afin de réduire les études chez l'animal et de comprendre les mécanismes d'action aux niveaux cellulaire et moléculaire, de nombreux modèles alternatifs in vitro ont été développés. Ces systèmes sont, soit aspécifiques, utilisant des bactéries ou des types cellulaires eucaryotes

préalablement exploités pour étudier la carcinogenèse chimique ou physique (radiations), soit plus directement représentatifs de la carcinogenèse respiratoire (cellules trachéales, épithéliales pulmonaires, et cellules mésothéliales pleurales).

Les échantillons utilisés dans les expérimentations provenaient de sources diverses. Ils ont fait l'objet de traitements (broyage, sélection de taille) destinés à sélectionner le mieux possible des fibres de dimensions compatibles avec un dépôt dans l'appareil respiratoire. Les échantillons de MMVF comportent des particules non fibreuses en nombre parfois élevé. Le plus souvent, des fibres d'amiante étaient utilisées comme référence positive, les contrôles étant des animaux exposés selon les mêmes conditions, mais en l'absence de fibres. Il est recommandé, pour des études de carcinogenèse de pratiquer, en plus des contrôles non traités, des contrôles « négatifs » exposés à des agents chimiques non carcinogènes, les plus proches possibles des agents à tester. Cependant, dans le cas des fibres, ces contrôles ne sont pas identifiés. Parfois, surtout pour les études par inoculation intrapéritonéale où des tumeurs spontanées peuvent être observées, on utilise une particule non fibreuse, le dioxyde de titane (TiO_2).

Les mécanismes qui conduisent aux maladies induites par les fibres, bien qu'ils ne soient pas complètement définis, ont été très étudiés avec les fibres d'amiante et un certain consensus existe ; cette compréhension mécanistique repose sur de nombreuses données résultant d'expériences faites in vivo et in vitro avec divers types de fibres. Les effets cellulaires et moléculaires induits par des fibres sur un organisme humain ou animal sont sous la dépendance du nombre de fibres déposées dans les poumons et les voies aériennes, et des caractéristiques physicochimiques des fibres ; ces caractéristiques, taille, durabilité, propriétés de surface, biopersistance, etc (Davis & Donaldson 1993), conditionnent, non seulement les effets des fibres, mais aussi la quantité de fibres qui atteignent les tissus, la concentration tissulaire qui en résulte, et son devenir.

Dans la mesure où notre exposé des résultats expérimentaux obtenus avec les fibres aura en filigrane ceux observés avec les fibres d'amiante, nous soulignerons, pour chaque modèle expérimental utilisé, l'analogie recherchée avec un mécanisme reconnu ou fortement suggéré dans la pathogénicité de l'amiante. Un point important dans l'interprétation des résultats, souvent souligné pour l'amiante, est la distinction entre évaluation d'effets expérimentaux (*hazard assessment* des Anglo-Saxons) et évaluation de risques (*risk assessment*) ; dans le premier cas, il n'est pas tenu compte des conditions environnementales qui accompagnent l'exposition de l'homme aux fibres (par exemple injection intrapéritonéale de fibres à un animal ou mise en contact de cellules isolées avec des fibres) ; dans le second cas, en revanche, le modèle animal tente de se rapprocher le plus possible des conditions d'expositions humaines aux fibres.

Moyens d'étude

Études sur animal entier

Les études expérimentales ont été réalisées principalement chez le rat et, à une bien moindre échelle, chez le hamster, occasionnellement chez le singe ; de même à notre connaissance, très peu d'études ont porté sur la souris. Les animaux ont été exposés aux fibres selon différentes méthodologies : inhalation, instillation intratrachéale ou inoculation dans la cavité pleurale ou péritonéale. Deux méthodes sont employées pour l'exposition par inhalation : en chambre d'empoussérage (corps entier)¹ ou par voie nasale² (nez seul). La première méthode, qui représente la situation la plus proche de celle connue par l'homme, a fait l'objet de critiques en raison de l'imprécision sur la dose de particules réellement inhalée par les animaux. Toutefois, elle pourrait permettre de détecter des effets associés non pulmonaires (irritation oculaire par exemple). La seconde méthode, dans laquelle les animaux sont immobilisés pendant la période d'exposition et respirent l'aérosol de fibres canalisées, permet de connaître avec une meilleure précision la quantité de fibres inhalée par les animaux. Si l'exposition par inhalation a l'avantage d'être similaire à la situation que l'on rencontre chez l'homme, il faut constater que la fréquence des tumeurs observée chez l'animal reste faible, surtout pour le mésothéliome pleural, comme cela sera montré plus loin. Pour observer, le cas échéant, une augmentation statistiquement significative de la survenue de tumeurs chez des animaux traités, par rapport à des groupes contrôles, il est nécessaire d'exposer un assez grand nombre d'animaux. Par exemple, dans une population animale présentant un pourcentage de cancers spontanés de 2 %, ce qui représente une valeur de tumeurs pulmonaires couramment observée chez le rat, une augmentation des cancers d'un facteur 3,5 sera statistiquement significative si le nombre d'animaux est de 100. En deçà de ce nombre, l'étude n'aura pas suffisamment de puissance pour mettre en évidence un excès (voir Signification et puissance statistiques, chapitre 3).

En général, les concentrations en fibres utilisées dans les études par inhalation sont très supérieures à celles qui ont pu être trouvées dans des expositions chez l'homme ; cependant, la quantité de fibres effectivement retenue dans le poumon est très inférieure à celle qui est présente dans l'aérosol en raison des

1. Voir par exemple Gross *et al.* 1970 ; Lee *et al.* 1981 ; Le Bouffant *et al.* 1987 et 1984 ; Moorman *et al.* 1988 ; Wagner *et al.* 1984 ; Davis *et al.* 1984 ; Pigott *et al.* 1981.

2. Voir par exemple Smith *et al.* 1987 ; Hesterberg *et al.* 1993 ; Muhle *et al.* 1987 ; Mast *et al.* 1994.

phénomènes d'épuration (Morgan *et al.* 1975) (voir Annexe au chapitre 2, p.97) et d'ingestion. La fraction retenue varie selon la méthode d'inhalation et la concentration ; elle évolue avec le temps. Bien qu'il soit difficile de chiffrer globalement cette fraction, on peut approximativement considérer qu'elle ne dépasse pas quelques pour cents de ce qui a été inhalé dans un délai de 1 mois après une exposition (Roggli & Brody 1984 ; Roggli *et al.* 1987).

Lors de travaux les plus récents réalisés par inhalation, nez seul, les expérimentateurs se sont préoccupés d'employer des concentrations maximales d'aérosols à des fins de détermination du potentiel carcinogène, qui n'affectent pas l'animal autrement que par des effets carcinogènes. Cette dose correspond à la MTD (*Maximum Tolerated Dose*), terme parfois remplacé, plus récemment, par dose minimale toxique (*Minimally Toxic Dose*) (Hesterberg *et al.* 1996a ; Morrow *et al.* 1996). Actuellement, il n'y a pas consensus pour savoir si cette MTD a une valeur prédictive pour la détermination du risque (McConnell 1995) mais elle permet d'évaluer un potentiel toxique. Hesterberg *et al.* (1996a) et Morrow *et al.* (1996) ont repris les différentes définitions de la MTD au cours du temps (réduction de poids ou de survie de l'animal inférieure à 10 % ; absence de modification des fonctions métaboliques et de clairance dans l'organe cible). Actuellement on considère, selon les critères définis par le National Toxicology Program (États-Unis), que cette dose est la dose maximale qui produit un minimum d'interférences avec les mécanismes de défense pulmonaires, selon des critères fondés sur la clairance des particules (Vu *et al.* 1996). La concentration maximale de l'aérosol est donc en principe déterminée pour atteindre cette dose. Ainsi, la notion de MTD se fonde sur des principes de pharmacocinétique ; elle est assez mal définie pour ce qui concerne les méthodes quantitatives permettant de connaître cette dose. Aucune formulation universelle n'existe aujourd'hui. Ainsi, Mauderly *et al.* (1990) suggèrent qu'une altération de la clairance existe s'il n'y a pas proportionnalité entre la concentration en aérosol et la charge pulmonaire. Dans une étude récente, Hesterberg *et al.* (1996a) ont exposé des rats pendant 13 semaines à des fibres de verre (nez seul, 6 h/jour, 5 j/semaine) à 5 concentrations de fibres de type MMVF10 (3, 16, 30, 45 et 60 mg/m³), et ont étudié différents paramètres dont l'épuration de billes de polystyrène, introduites par inhalation intratrachéale selon la méthode de Oberdorster *et al.* (1993). Les rats étaient sacrifiés 7, 13, 19 et 23 semaines après le début de l'exposition et différentes analyses étaient pratiquées : charge pulmonaire en fibres, clairance des microsphères, analyse cellulaire et biochimique du fluide broncho-alvéolaire et prolifération cellulaire dans les voies aériennes profondes. Les résultats indiquent que la dose de 30 mg/m³ est la dose appropriée la plus élevée pour réaliser des études chroniques par inhalation chez le rat. Pour cette dose, les auteurs ont constaté une diminution des mécanismes de défense pulmonaire, démontrée par une réduction de la clairance des microsphères d'environ 32 % (sur la base de la demi-vie en jours). Une inflammation chronique était observée : afflux de macrophages et fibrose minimale (microgranulomes) 13 semaines après le début de l'exposition, agrégation de

macrophages observée seulement avec des doses élevées (45 et 60 mg/m³), ce qui suggère que la clairance est réduite à ces concentrations. Une toxicité pulmonaire apparaissait dès la dose de 16 mg/m³ par une augmentation des protéines dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire et une stimulation de la prolifération cellulaire après 13 semaines d'exposition. Cependant, ces modifications étaient transitoires puisqu'un retour à des valeurs normales était observé après une période de 10 semaines post-exposition.

En parallèle à l'exposition par inhalation, d'autres méthodes ont été appliquées afin d'exposer les cellules, *in vivo*, à des quantités plus importantes de fibres, sans altérer le temps de survie des animaux. Ainsi, des expérimentations ont été réalisées par instillation intratrachéale ou inoculation intrapleurale³ de fibres, afin de déterminer respectivement la réponse des cellules bronchiques et/ou pulmonaires, et mésothéliales. Ces méthodes ne représentent pas des voies d'exposition physiologiques. Cependant, elles permettent de déterminer la réponse cellulaire dans l'hypothèse où les particules ont atteint les cellules bronchiques ou pleurales. L'inoculation intrapleurale est particulièrement intéressante lorsque l'on veut étudier la réponse des cellules mésothéliales. L'hypothèse d'une translocation des fibres vers la plèvre est valide car des études de biométrie ont montré, dans le cas d'exposition à l'amiante, chez l'homme, le dépôt de fibres au niveau de la plèvre (Sebastien *et al.* 1980 ; Boutin *et al.* 1996) ; dans le cas de fibres MMVF, une migration des fibres dans l'espace interpleural après inhalation chez le rat a été observée (Gelzleichter *et al.* 1996a). Par analogie anatomique, et pour des raisons de faisabilité, l'inoculation intrapéritonéale⁴ a été également pratiquée pour l'évaluation d'un potentiel carcinogène des fibres. On peut regretter que le transfert des fibres inhalées, vers la cavité péritonéale, n'ait pas été étudié, ni les caractéristiques physiologiques et métaboliques respectives des cellules mésothéliales péritonéales et pleurales. Réciproquement, peu d'études ont, à notre connaissance, été effectuées pour déterminer si les fibres inoculées dans la cavité péritonéale (ou pleurale) migraient vers le poumon. On mentionnera toutefois un article de Morgan *et al.* (1993a) qui, après inoculation intrapéritonéale de 1 mg de fibres de verre radiomarquées (²⁴Na) chez le rat Fischer 344, considèrent que les fibres s'attachent très rapidement aux organes de la paroi abdominale. Après 2 heures, 35 % des fibres étaient retrouvées dans le lavage péritonéal, mais à 48 heures seulement 2 % étaient présentes. Peu de macrophages étaient chargés en fibres (0,1 %, 48 heures après injection). Cette dernière observation semble liée à la voie d'inoculation car les auteurs précisent qu'une situation différente est observée quand les mêmes fibres sont instillées par voie intratrachéale où, même à des temps excédant un

3. Voir par exemple Stanton *et al.* 1977, 1981 ; Monchaux *et al.* 1981 ; Wagner *et al.* 1984.

4. Voir par exemple Pott *et al.* 1987 ; Smith *et al.* 1987 ; Davis *et al.* 1984 ; Pigott et Ishmael 1981.

an après administration, des fibres étaient toujours présentes dans les macrophages. Les auteurs ont également étudié l'association des fibres aux autres organes, par comptage de la radioactivité associée ; ils ont constaté que le contenu variait dans l'ordre suivant : tractus gastrointestinal > foie > squelette > tractus uro-génital > rate > reins. Les fibres utilisées étaient des fibres de verre X7779, contenant 4,3 % d'aluminium, d'environ 2 µm de diamètre, calibrées par coupures (enrobage dans un plastic, tronçonnage, élimination du plastic par incinération à basse température dans un plasma à oxygène) aboutissant à des fibres ayant une longueur médiane de 16 µm (*count median length*) et une déviation géométrique standard d'environ 1,8 µm. Les auteurs précisent qu'ils ont tenu compte, dans l'interprétation de leurs résultats, de la solubilité du ^{24}Na (valeur estimée à 2,6 %) et les valeurs données sont corrigées de cette solubilité.

En utilisant la même technique de marquage de fibres de verre X7484, Collier *et al.* (1994a) confirment que pour de faibles doses (< 1,5 mg) les fibres sont principalement localisées dans la cavité péritonéale. Pour des doses plus importantes, une certaine proportion de fibres reste libre dans la cavité péritonéale, dans le délai de 48 heures de l'étude. Ces observations seront discutées plus en détail ultérieurement, dans le cadre de la réflexion sur le devenir des fibres.

L'administration de fibres par voie intratrachéale conduit à un dépôt dans l'appareil respiratoire, ainsi qu'à une excrétion par le tractus gastrointestinal. Dans un essai utilisant les fibres calibrées marquées au ^{24}Na , Morgan *et al.* (1993b) ont instillé une dose de 1 mg, soit 3×10^6 fibres chez le rat. L'administration de fibres était faite au moyen d'une canule au-dessus de la première bifurcation des bronches. La masse de fibres restant après 48 heures dans le poumon était de 0,61 mg, et l'excrétion dans les fèces de 0,22 mg en 24 heures. On constate donc qu'une partie des fibres ainsi administrées est éliminée par voie digestive, selon un mécanisme qui reste à définir (expectoration ?). Une hypothèse similaire a été formulée pour expliquer la phase rapide de clairance observée dans les études d'inhalation chronique (Hesterberg *et al.* 1996a). Morgan *et al.* (1993b) ont en outre noté une grande dispersion dans la quantité de fibres déposées dans chaque animal ; celle-ci variait entre 0,34 et 0,90 mg, soit de $0,79 \times 10^6$ à $1,9 \times 10^6$ fibres par animal. La variabilité de ce paramètre indique que les animaux ne reçoivent pas une dose de fibres strictement équivalente.

Il ne semble pas que cette voie d'élimination des fibres MMVF soit spécifique de l'instillation intratrachéale. En effet, un travail de Morgan *et al.* (1980) montre que, immédiatement après inhalation de fibres de différentes dimensions marquées au ^{24}Na (exposition nez seul pendant environ 2 heures, concentrations < 1 ng/ml), la grande majorité des fibres déposées se retrouve dans le tractus gastro-intestinal (95 %). Dans ce travail, les auteurs montrent à l'inverse qu'une très faible partie des fibres contenues dans l'organisme (de 0,3 à 2 %) se trouve dans le poumon, immédiatement après exposition. Après

48 heures, 99 % des fibres sont retrouvés dans les fèces. La même tendance était décrite par Pitchard *et al.* (1985) qui, exposant des rats à des particules non fibreuses ($^{141}\text{CeO}_2$; 10 mg/m³; diamètre aérodynamique moyen 2,2 µm), obtenaient, 48 heures après la fin de l'exposition, 21 % dans le poumon et 77 % dans les fèces. Des résultats très différents étaient observés par instillation intratrachéale (4 mg/ml) puisque 80 à 90 % des particules étaient retrouvés dans le poumon, contre 5 à 20 % dans les fèces. Dans le travail de Morgan *et al.* (1993b) mentionné ci-dessus, le pourcentage de fibres était de 66 % et 8 %, respectivement, dans le poumon et les fèces. Ainsi, alors que la majorité des fibres instillées se retrouvent dans le poumon, une majorité de fibres inhalées se retrouvent dans le tractus gastro-intestinal.

Actuellement, de nombreux auteurs considèrent que l'exposition par inhalation représente la méthode d'exposition la plus justifiée pour étudier le potentiel toxique des fibres (voir, pour revue, McClellan *et al.* 1992 ; McConnell 1995). La méthode intratrachéale est considérée comme un second choix, alors que les méthodes d'implantation apparaissent comme non pertinentes, sauf dans le cadre d'études mécanistiques spécifiques (McConnell 1995) ; elles sont des voies artificielles, par lesquelles les mécanismes de clairance sont surchargés (*overloaded*) ou ignorés ce qui met en question leur intérêt pour l'évaluation d'un risque (McClellan *et al.* 1992). Les critiques faites ne sont pas toujours pertinentes pour juger de la supériorité d'une méthode par rapport à une autre ; elles concernent parfois des problèmes méthodologiques (manque de standardisation, qualité des études) (McConnell 1995) qui ne peuvent pas faire rejeter ces méthodes sur la base de leur qualité intrinsèque. Davis *et al.* (1996) ont comparé le potentiel fibrosant et carcinogène de fibres d'amosite, de SiC et de microfibrilles JM100/475, par inhalation à long terme et inoculation intrapéritonéale chez le rat. Fibrose pulmonaire et tumeurs étaient observées par inhalation avec amosite et SiC, mais pas avec les fibres de verre, en dépit de la rétention d'un nombre total de fibres beaucoup plus élevé qu'avec les autres fibres. En revanche, par inoculation intrapéritonéale, des tumeurs étaient observées avec les fibres de verre et le pourcentage observé avec les deux autres types de fibres était aussi augmenté (environ $\times 2$). Les auteurs interprètent cette différence comme pouvant être liée à une réaction inflammatoire plus importante dans le péritoine en raison du plus grand nombre de fibres déposées (tout ce qui est injecté est déposé). Toutefois, les études portant sur la réaction inflammatoire provoquée par ce type de fibres étaient réalisées chez des espèces différentes pour l'inhalation (rat) et l'inoculation intrapéritonéale (souris). Si la méthode d'inhalation permet en effet la prise en compte des mécanismes d'épuration, on ne peut ignorer les différences inter-espèces, et l'extrapolation à l'homme des effets observés chez le rat mérite aussi quelques réserves, ne serait-ce que par les différences dans la structure de l'appareil respiratoire qui conditionne, par exemple, la sélection des particules inhalées selon leur dimension. Par ailleurs, on peut se demander s'il n'est pas intéressant de pouvoir déposer, dans le poumon d'animaux exposés, des fibres de dimensions non inhalables par

l'animal mais inhalables par l'homme ; ce point n'est pas forcément négatif. Carthew *et al.* (1992) ont constaté qu'il existait une bonne relation entre les résultats obtenus par l'inoculation intrapleurale et les données de l'épidémiologie ; et ces auteurs considèrent que cette voie d'exposition est tout à fait pertinente pour évaluer un potentiel tumorigène.

Études sur cellules isolées

Les études ont porté sur divers types cellulaires, qu'il s'agisse de modèles aspécifiques (bactéries...) utilisés pour étudier la toxicité de substances chimiques et développés pour comprendre les mécanismes d'action de l'amiante, ou de modèles plus spécifiques : macrophages, cellules mésothéliales, cellules épithéliales pulmonaires ont été employés. Les réponses cellulaires examinées dans la littérature se rapportent à l'analyse de différents mécanismes associés à la cytotoxicité, la réaction inflammatoire ou la génotoxicité.

Études acellulaires

Différentes études ont été réalisées afin de rechercher si les fibres vitreuses produisaient des espèces radicalaires dérivées de l'oxygène. Le plus souvent, la molécule détectée était $\text{OH}^\bullet$. Les moyens de détection ont évolué au cours des dernières années. On peut citer les méthodes récentes de détection directe en résonance paramagnétique électronique, ou indirecte par la mesure de l'hydroxylation des bases d'ADN ou la détermination des cassures occasionnées dans des constructions plasmidiques.

Échantillons étudiés

Types de fibres

Différents échantillons ont été étudiés. On peut signaler qu'une évolution s'est faite au cours du temps, en raison de la mise à disposition de fibres permettant des études comparatives, à l'aide des mêmes échantillons. Schématiquement, jusque vers les années 1992, des échantillons d'origine très diverse étaient utilisés par les expérimentateurs. Les microfibrilles (JM100 et JM104 par exemple) étaient toutefois retrouvées dans plusieurs publications, permettant d'émettre des hypothèses sur les effets et les modes d'action. Ultérieurement, des échantillons MMVF 10, 11, 21 et 22, représentant des laines de verre, de roche et de laitier, et des céramiques ont été mis à disposition par la TIMA (Thermal Insulation Manufacturers Association).

Ce n'est que très récemment que l'on a disposé des résultats des expériences réalisées à l'aide de ces fibres. Il serait intéressant de savoir quelle est la représentativité de ces échantillons par rapport aux fibres commercialisées et pouvant être utilisées en milieu industriel ou par les consommateurs. Il manque, en particulier, l'ensimage par un liant organique, qui n'a été que très exceptionnellement ajouté aux fibres d'expérimentation (Tableau 7-1).

Caractéristiques des échantillons utilisés

Étant donné l'importance des caractéristiques physicochimiques et dimensionnelles des fibres pour l'interprétation des résultats expérimentaux, on résumera les types d'analyse qui ont été faites dans les différentes études expérimentales pour la préparation des échantillons. On trouvera plus loin (pp. 290-295) les correspondances avec les différentes études. Schématiquement, lorsque les échantillons ont été broyés, un broyeur à billes, à lame ou à anneau a été utilisé, lorsque cela était précisé (voir Tableau 7-1 qui résume les études par inhalation) ; le comptage et la mesure des dimensions des fibres MMVF pouvaient être réalisés en microscopie optique (MO) ou en microscopie électronique à balayage (MEB). Parfois, seulement les fibres WHO ($L/d \geq 3$; $L > 5 \mu\text{m}$; $\varnothing < 3 \mu\text{m}$) étaient comptabilisées. On peut noter que, pour les fibres d'amiante, les méthodes de métrologie font appel à l'analyse en microscopie électronique à transmission (MET) ou au MEB. Les longueurs et diamètres des fibres sont exprimées selon les auteurs, soit en dimensions arithmétique moyenne ou médiane, soit en dimension géométrique moyenne ; plus rarement en dimension nominale. Parfois, c'est le pourcentage de fibres dont la longueur (diamètre) est supérieure à une valeur donnée qui est indiquée. Une autre variable entre les études est le type de particules comptées (fibres, ou fibres et particules non fibreuses), fibres totales ou fibres WHO seulement.

Pathologies résultant d'études expérimentales in vivo avec des laines d'isolation

Laines de verre et fibres de verre

Il est souvent difficile de savoir, car cela n'est pas toujours précisé dans les articles, quelle est l'utilisation potentielle des fibres employées dans les expérimentations. Par souci de rigueur on conservera, dans ce chapitre, la dénomination trouvée dans les articles : laines de verre (LV), fibres de verre (FV) et, le cas échéant, microfibrilles.

Les premières études réalisées avec des fibres de verre l'ont surtout été avec des fibres de diverses origines, en utilisant différentes voies d'exposition : inhalation, instillation intratrachéale et inoculation intracavitaire. On trouvera une

Tableau 7-1a Caractéristiques des fibres de verre (FV) et laines de verre (LV) utilisées dans les études par inhalation chez le rongeur

Type de fibre	Méthode PF/GA/SE	Dose			Dimensions des fibres [†]		Référence
		f/ml	mg/m ³	NF	Longueur µm	Diamètre µm	
MMFG	broyeur à billes/- /chambre	nd	135	4,2 mg/m ³	moyenne 10	moyenne 0,5	Gross <i>et al.</i> 1970
LV Saint Gobain	broyage/Timbrell mark II/chambre	94(70)**	21(5)**	-	58 % > 10 ^d 89 % > 5 ^d (34 % > 10 ^d)** 68 % > 5 ^{d**}	-	Le Bouffant <i>et al.</i> 1987, 1984
FV	broyeur à billes/- /chambre	6 540 (424)	-	-	11,2 % > 5 ^d	1,2 ^{a,c} limites : 0,2-6,5	Lee <i>et al.</i> 1981
FG insulation OC	broyeur « ring mill »/- /chambre		13,9	0,4 mg/m ³	> 20	> 3,5	Moorman <i>et al.</i> 1988
FG insulation OC			13,9	0,4 mg/m ³	> 20	< 3,5	
FM series air filter media			14,9	0,4 mg/m ³	> 10	< 3,5	
Insulsafe II,	pas de broyage/Timbrell/ nez seul	100	10	600 p/ml	CML 37±48 ^c ; 99 % > 5 limites : 5-505	3,1 ^{a,c} ; 46 % < 1	Smith <i>et al.</i> 1987
Blowing Bldg insul avec phenol		100	12	3 800 p/ml	CML 31±33 ^c ; 94 % > 5 limites : 5-198	5,4 ^{a,c} ; 46 % < 1	
Owens Corning high temperature		25	9	775 p/ml	CML 114±94 ^c ; 100 % > 5 limites : 5-510	6,1 ^{a,c} ; 20 % < 1	
English LV ±resine	broyage/-chambre	255	-	-	52 % [5/1] ^c	0,87 % [10/0,2]	Wagner <i>et al.</i> 1984
		350	-	-	47 % [5/1] ^c	0,38 % [10/0,2]	
MMVF 10 Manville 901	séparation dans l'eau/RCC/nez seul	287	29	69	LAM 16,8±2,8 ^d LGM 13,1±2,0 ^d 12,5±2,5 ^{b,d} limites : 2,0-95,4	DAM 1,43±0,75 ^c DGM 1,26 ±1,81 ^c 1,33±0,10 ^{b,c} limites : 0,07-4,8	Hesterberg <i>et al.</i> 1993

Tableau 7-1a (suite)

Type de fibre	Méthode	Dose			Dimensions des fibres [†]		Référence
		f/ml	mg/m ³	NF	Longueur µm	Diamètre µm	
MMVF 11 Certain Teed B	séparation dans l'eau/RCC/nez seul	273	29	44	LAM 18,3±14,6 ^d LGM 13,7±2,2 ^d 13,3±3,7 ^{b,d} limites : 0,8-98,2	DAM 0,90±0,73 ^c DGM 0,69±2,10 ^c 0,68±0,06 ^{b,c} limites : 0,09-5,09	Hesterberg <i>et al.</i> 1993
JM 100	broyage/Timbrell mark II/chambre	14 023	10	-	52 % > 10 ^d	43 % < 0,1	Le Bouffant <i>et al.</i> 1987, 1984
104/475, tempstran 104/475	broyeur à anneau/- /chambre		4,8 5,0	0,1mg/m ³ 0,1mg/m ³	> 10 < 10	< 3,5 < 3,5	Moorman <i>et al.</i> 1988
104/475, Denver	broyeur à lame/« Spurny vibra- ting bed »/nez seul	576	-	-	50 % [4,8/0,42] ^c		Muhle <i>et al.</i> 1987
JM 100	pas de broyage/ Timbrell/nez seul	3 000	3	12 000 p/ml	19 % > 10 LGM 4,7	DGM 0,45	Smith <i>et al.</i> 1987
JM 100	broyage/-chambre	1 436	-	-	29 % > 10		Wagner <i>et al.</i> 1984

PF/GA/SE : Préparation des fibres /Génération de l'aérosol/Système d'exposition
CML, LAM, LGM : « count mean length », longueur arithmétique moyenne, longueur géométrique moyenne
CMD, DAM, DGM : « count mean diameter », diamètre arithmétique moyen, diamètre géométrique moyen

FV : Fibre de verre

LV : Laine de verre

MMVF : Fibres vitreuses synthétiques (Man Made Vitreous Fibres)

nd : non déterminé

NF : Particules non fibreuses

OC : Owens Corning

p/ml : nombre de particules non fibreuses par millilitre

^a Moyenne

^b Médiane

^c Mesure au microscopie électronique à balayage

^d Mesure en microscopie optique

* Entre parenthèses : Fibres « respirables » = « alvéolaires »

[†] [L/Ø] ; dimensions des fibres. n % [L/Ø] indique le pourcentage de fibres dont la longueur est supérieure à L et le diamètre inférieur à Ø

Tableau 7-1b Caractéristiques des fibres de laines de roche (LR) et laines de laitier (LL)

Type de fibre	Méthode	Dose			Dimensions des fibres		Référence
		f/ml	mg/m ³	NF	Longueur µm	Diamètre µm	
LR Saint Gobain	broyage/Timbrell mark II/chambre	41	28	-	60 % > 10 ; 87 % > 5 ^d	23 % < 1 ^d	Le Bouffant <i>et al.</i> 1987, 1984
LR Sweden	broyage/-/chambre	240	-	-	63 % > 10	-	Wagner <i>et al.</i> 1984
LR : RW Intl A/S (DK) MMVF21	-/-/nez seul	264 [243] ^e	30,4	29 p/ml	- - -	DAM 1,14±0,64 ^d DGM 0,98±1,74 ^d 1,10 ^{b,d}	McConnell <i>et al.</i> 1994
		185 [150] ^e	16,1	35 p/ml	LAM 21,0 ±16,7 ^d LGM 15,4 ±2,3 ^d 15,5 ^{b,d}	DAM 1,0 ±0,6 ^d DGM 0,9 ±0,7 ^d 0,92 ^{b,d}	
		44 [34] ^e	3,1	12 p/ml	LAM 17,6 ±14,8 ^d LGM 13,0 ±2,2 ^d 12,6 ^{b,d}	DAM 1,1 ±0,6 ^d DGM 0,9 ±1,8 ^d 0,96 ^{b,d}	
LL JV Spinner	pas de broyage/Timbrell/ nez seul	200	10	5 600 p/ml	CLM 40±63° LGM 22° 95 % > 5°	2,7 ^{a,c} 61 % < 1°	Smith <i>et al.</i> 1987

Tableau 7-1b (suite)

Type de fibre	Méthode	Dose			Dimensions des fibres		Référence
		f/ml	mg/m ³	NF	Longueur µm	Diamètre µm	
LL USG interiors (USA) MMVF22	-/-nez seul	245 [213] ^e	29,9	80 p/ml	LAM 20,5 ±15,9 ^d LGM 15,2 ±2,2 ^d 15,5 ^{b,d}	DAM 1,0 ±0,6 ^d DGM 0,87 ±1,7 ^d 0,85 ^{b,d}	McConnell <i>et al.</i> 1994
		158 [131] ^e	16,1	70 p/ml	LAM 17,9±14,8 ^d LGM 13,2 ±2,2 ^d 13,1 ^{b,d}	DAM 0,97 ±0,54 ^d DGM 0,84 ±1,69 0,84 ^{b,d}	
		33 [30] ^e	3,1	29 p/ml	LAM 16,5 ±13,1 ^d LGM 12,3 ±2,1 ^d 12,1 ^{b,d}	DAM 0,96 ±0,5 ^{b,d} DGM 0,84 ±1,70 ^d 0,82 ^{b,d}	

PF/GA/SE : Préparation des fibres /Génération de l'aérosol /Système d'exposition
 CLM,LAM, LGM : « count mean length », longueur arithmétique moyenne, longueur géométrique moyenne
 CMD, DAM, DGM : « count mean diameter », diamètre arithmétique moyen, diamètre géométrique moyen
 LL : Laine de laitier
 LR : Laine de roche
 MMVF : Fibres vitreuses synthétiques (Man Made Vitreous Fibres)
 nd : non déterminé
 NF : Particules non fibreuses
 p/ml : nombre de particules non fibreuses par millilitre
^a Moyenne
^b Médiane
^c Mesure au microscopie électronique à balayage
^d Mesure en microscopie optique
^e Nombre de fibres WHO (L > 5 µm et Ø < 3 µm, L/Ø > 3)

Tableau 7-1c Caractéristiques des fibres de céramique

Type de fibre	Méthode PF/GA/SE	Dose			Dimensions des fibres		Référence
		f/ml	mg/m ³	NF	Longueur µm	Diamètre µm	
Al silicate glass	rouleaux en acier/ Timbrell/chambre	95	10 ^d	380 p/ml	30 % > 10	45 % [5/1]	Davis <i>et al.</i> 1984
High purity		224	29	-	18 ±15	1,0 ±0,72	"
Zirconia		172	29	-	28 ±20	0,86 ±0,68	"
After service		166	30	-	11 ±9	1,39 ±0,75	"
PKT	broyeur à billes/- /chambre	6 530	73	-	5,5 % > 10 ^c 4,2 ^{a,c}	0,2 ^{a,c}	Lee <i>et al.</i> 1981
Titanate, Fybex	broyeur à billes/- /chambre	6 720 à 101 500	39 à 371	-	6,7 ^{a,c} 8,6 % > 10	0,2 ^c	Lee <i>et al.</i> 1981
Saffil®	broyeur à billes/Timbrell/ chambre	-	3	-	15,5 ^b	2,75 ^b	Pigott <i>et al.</i> 1981
Fiberfrax Carborundum	pas de broyage/Timbrell/ nez seul	200	12	6 600 p/ml	CLM = 35±34 ^c 83 % > 10	1,8 ^{b,c}	Smith <i>et al.</i> 1987
RCF 1 « kaolin »	séparation dans l'eau/RCC/ nez seul	234	29	387 p/ml	LAM 22,3±17,0 ^d LGM 15,9 ±2,4 ^d 16,8±3,9 ^{b,d} limites : 1,3-76,6	DAM 0,98±0,61 ^c DGM 0,82 ±1,89 ^c 0,85±0,19 ^{b,c} limites : 0,12-4,53	Hesterberg <i>et al.</i> 1993 Mast <i>et al.</i> 1995a
RCF 2 « aluminium zirconia silica »	-/-/nez seul	268	29	398 p/ml	LAM 18,7±15,5 ^d LGM 12,8±2,5 ^d 13,0±4,1 ^{b,d} limites : 1,5-67,1	DAM 1,07±0,69 ^c DGM 0,88±1,92 ^c 0,89±0,19 ^{b,c} limites : 0,08-4,45	Mast <i>et al.</i> 1995a
RCF 3 « high purity »	-/-/nez seul	213	29	537 p/ml	LAM 24,2±17,9 ^d LGM 17,4±2,4 ^d 18,6±3,0 ^{b,d} limites : 1,9-79,6	DAM 1,05±0,70 ^c DGM 0,85 ±1,99 ^c 0,88±0,21 ^{b,c} limites : 0,09-6,55	Mast <i>et al.</i> 1995a

7

Physiopathologie expérimentale

Introduction	281
Moyens d'étude	283
Études sur animal entier	283
Études sur cellules isolées	288
Études acellulaires	288
Échantillons étudiés	289
Type de fibres	289
Caractéristiques des échantillons utilisés	289
Pathologies résultant d'études expérimentales in vivo avec des laines d'isolation	289
Laines de verre et fibres de verre	289
Études par inhalation	296
Études par instillation intratrachéale	299
Études par inoculation intrapleurale	299
Études par inoculation intrapéritonéale	304
Étude de la charge pulmonaire dans les expérimentations par inhala- tion	304
Études réalisées avec des fibres « microfibres »	305
Laine de roche	307
Études par inhalation et instillation intratrachéale	307
Inoculation intracavitaire	311
Laine de laitier	311
Études par inhalation et installation intratrachéale	311
Études réalisées par inoculation intracavitaire	315
Filaments de verre	315

Pathologies résultant d'études expérimentales in vivo	
avec des fibres de céramique	318
Études réalisées par inhalation	318
Études réalisées par instillation intratrachéale	327
Études réalisées par inoculation intracavitaire	328
Conclusions sur les résultats obtenus avec les laines d'isolation	
et les céramiques	330
Laines de verre et fibres de verre	331
Laine de roche et laine de laitier	332
Fibres de céramique	332
Commentaires sur les études réalisées par inhalation	334
Commentaires sur la rétention des fibres dans le poumon, après inhalation	336
Pathologies résultant d'études expérimentales in vivo	
avec d'autres fibres	341
Toxicité des fibres de para-aramide	341
Déposition et rétention	341
Toxicité par inhalation	342
Instillation intratrachéale	342
Injection péritonéale	342
Toxicité des fibres de cellulose	343
Devenir des fibres inhalées	343
Généralités	343
Notion de biopersistance	345
Moyens d'étude du devenir des fibres inhalées	346
Exposition	347
Mesure et expression de la rétention	348
Interprétation des données	348
Dissolution des fibres	349
Clairance des fibres en fonction des dimensions	350
Études réalisées avec des fibres calibrées	350
Comparaison entre MMVF et amiante	351
Études réalisées après exposition de courte durée	352

Questions sur la dissolution des fibres « longues »	353
Relations entre biopersistance et solubilité in vitro	355
Conclusions sur les études expérimentales chez l'animal	358
Études sur les mécanismes d'action au niveau cellulaire	359
Évaluation des effets génotoxiques et carcinogènes des FMA in vitro et in vivo	359
Systèmes in vitro utilisés pour étudier l'endommagement de l'ADN dans les cellules de mammifères ou les procaryotes (mis à part la mutagenèse)	360
Analyse des mutations géniques	360
Systèmes cellulaires étudiant le potentiel clastogène par analyse des anomalies chromosomiques	361
Études de l'aneuploïdie et de la polyploïdie	361
Résultats obtenus avec les FMA : génotoxicité	361
Endommagement de l'ADN cellulaire et mutations géniques	361
Anomalies chromosomiques	362
Mitoses anormales et aneuploïdie	363
Transformation cellulaire provoquée par les FMA	363
Discussion	364
Références	365
Annexes	381
Echelles de gradation des anomalies pathologiques	381
Réactions inflammatoires et fibres	381
Introduction	381
Développement expérimental d'une réaction inflammatoire	383
Production ex vivo et in vitro de molécules inflammatoires	384
Réactions inflammatoires nocives	388

Introduction

Un certain nombre de maladies inflammatoires, fibrogéniques ou cancéreuses, sont induites par l'exposition de l'homme ou de l'animal à des fibres d'amiante. Les mécanismes par lesquels les fibres induisent ces maladies ne sont pas complètement élucidés. Les résultats de nombreux travaux font penser que la structure « fibre » de l'amiante est un élément pathogénique important, au même titre que certaines de ses caractéristiques chimiques (Everitt 1994 ; Davis & Donaldson 1993 ; Gilmour *et al.* 1995). En conséquence, toute nouvelle fibre proposée comme substitut à l'amiante ou pour tout autre usage, doit être soupçonnée, a priori, d'être pathogène en raison de sa structure, ce qui n'empêche pas d'analyser les possibles conséquences de ses caractéristiques physicochimiques. La reconnaissance de cette pathogénicité sur l'homme est difficile, car une caractéristique des maladies induites par les fibres (reconnue dans le cas de l'amiante) est la longue période de latence qui précéderait leur apparition. Ainsi, pour renforcer ou atténuer les soupçons portés sur les fibres dans le cadre de leur danger pour la santé de l'homme, il a semblé utile de comparer les caractéristiques physicochimiques et les effets expérimentaux des fibres (anciennes ou nouvelles) utilisées en remplacement de l'amiante (MMVF : *man made vitreous fibres* et fibres organiques telles que le Kevlar®), aux fibres d'amiante ; la comparaison a porté sur les effets observés chez l'animal, et in vitro sur des cellules et des molécules isolées.

Les méthodes développées ont visé à étudier le risque associé aux expositions par inhalation. Par référence à ce qui avait été observé avec les fibres d'amiante, le risque de fibrose pulmonaire, de cancer du poumon et de la plèvre a été particulièrement exploré. Cette approche est un peu restrictive, en ce sens qu'elle ne concerne, a priori, que les pathologies respiratoires. On peut suggérer qu'il y aura intérêt à recommander de ne pas limiter les études sur la physiopathologie des fibres de remplacement au système respiratoire, surtout en raison du développement de fibres vitreuses solubles en milieu biologique. En effet, les produits solubilisés peuvent, le cas échéant, atteindre d'autres organes.

Les expérimentations animales ont essentiellement porté sur le potentiel carcinogène des fibres après exposition par inhalation, inoculation intrapleurale ou intrapéritonéale pour étudier plus spécifiquement le mésothéliome, ou par instillation intratrachéale. Les études par inhalation ont, dans certains cas, évalué le potentiel fibrosant. Afin de réduire les études chez l'animal et de comprendre les mécanismes d'action aux niveaux cellulaire et moléculaire, de nombreux modèles alternatifs in vitro ont été développés. Ces systèmes sont, soit aspécifiques, utilisant des bactéries ou des types cellulaires eucaryotes

préalablement exploités pour étudier la carcinogenèse chimique ou physique (radiations), soit plus directement représentatifs de la carcinogenèse respiratoire (cellules trachéales, épithéliales pulmonaires, et cellules mésothéliales pleurales).

Les échantillons utilisés dans les expérimentations provenaient de sources diverses. Ils ont fait l'objet de traitements (broyage, sélection de taille) destinés à sélectionner le mieux possible des fibres de dimensions compatibles avec un dépôt dans l'appareil respiratoire. Les échantillons de MMVF comportent des particules non fibreuses en nombre parfois élevé. Le plus souvent, des fibres d'amiante étaient utilisées comme référence positive, les contrôles étant des animaux exposés selon les mêmes conditions, mais en l'absence de fibres. Il est recommandé, pour des études de carcinogenèse de pratiquer, en plus des contrôles non traités, des contrôles « négatifs » exposés à des agents chimiques non carcinogènes, les plus proches possibles des agents à tester. Cependant, dans le cas des fibres, ces contrôles ne sont pas identifiés. Parfois, surtout pour les études par inoculation intrapéritonéale où des tumeurs spontanées peuvent être observées, on utilise une particule non fibreuse, le dioxyde de titane (TiO_2).

Les mécanismes qui conduisent aux maladies induites par les fibres, bien qu'ils ne soient pas complètement définis, ont été très étudiés avec les fibres d'amiante et un certain consensus existe ; cette compréhension mécanistique repose sur de nombreuses données résultant d'expériences faites *in vivo* et *in vitro* avec divers types de fibres. Les effets cellulaires et moléculaires induits par des fibres sur un organisme humain ou animal sont sous la dépendance du nombre de fibres déposées dans les poumons et les voies aériennes, et des caractéristiques physicochimiques des fibres ; ces caractéristiques, taille, durabilité, propriétés de surface, biopersistance, etc (Davis & Donaldson 1993), conditionnent, non seulement les effets des fibres, mais aussi la quantité de fibres qui atteignent les tissus, la concentration tissulaire qui en résulte, et son devenir.

Dans la mesure où notre exposé des résultats expérimentaux obtenus avec les fibres aura en filigrane ceux observés avec les fibres d'amiante, nous soulignerons, pour chaque modèle expérimental utilisé, l'analogie recherchée avec un mécanisme reconnu ou fortement suggéré dans la pathogénicité de l'amiante. Un point important dans l'interprétation des résultats, souvent souligné pour l'amiante, est la distinction entre évaluation d'effets expérimentaux (*hazard assessment* des Anglo-Saxons) et évaluation de risques (*risk assessment*) ; dans le premier cas, il n'est pas tenu compte des conditions environnementales qui accompagnent l'exposition de l'homme aux fibres (par exemple injection intrapéritonéale de fibres à un animal ou mise en contact de cellules isolées avec des fibres) ; dans le second cas, en revanche, le modèle animal tente de se rapprocher le plus possible des conditions d'expositions humaines aux fibres.

Moyens d'étude

Études sur animal entier

Les études expérimentales ont été réalisées principalement chez le rat et, à une bien moindre échelle, chez le hamster, occasionnellement chez le singe ; de même à notre connaissance, très peu d'études ont porté sur la souris. Les animaux ont été exposés aux fibres selon différentes méthodologies : inhalation, instillation intratrachéale ou inoculation dans la cavité pleurale ou péritonéale. Deux méthodes sont employées pour l'exposition par inhalation : en chambre d'empoussérage (corps entier)¹ ou par voie nasale² (nez seul). La première méthode, qui représente la situation la plus proche de celle connue par l'homme, a fait l'objet de critiques en raison de l'imprécision sur la dose de particules réellement inhalée par les animaux. Toutefois, elle pourrait permettre de détecter des effets associés non pulmonaires (irritation oculaire par exemple). La seconde méthode, dans laquelle les animaux sont immobilisés pendant la période d'exposition et respirent l'aérosol de fibres canalisées, permet de connaître avec une meilleure précision la quantité de fibres inhalée par les animaux. Si l'exposition par inhalation a l'avantage d'être similaire à la situation que l'on rencontre chez l'homme, il faut constater que la fréquence des tumeurs observée chez l'animal reste faible, surtout pour le mésothéliome pleural, comme cela sera montré plus loin. Pour observer, le cas échéant, une augmentation statistiquement significative de la survenue de tumeurs chez des animaux traités, par rapport à des groupes contrôles, il est nécessaire d'exposer un assez grand nombre d'animaux. Par exemple, dans une population animale présentant un pourcentage de cancers spontanés de 2 %, ce qui représente une valeur de tumeurs pulmonaires couramment observée chez le rat, une augmentation des cancers d'un facteur 3,5 sera statistiquement significative si le nombre d'animaux est de 100. En deçà de ce nombre, l'étude n'aura pas suffisamment de puissance pour mettre en évidence un excès (voir Signification et puissance statistiques, chapitre 3).

En général, les concentrations en fibres utilisées dans les études par inhalation sont très supérieures à celles qui ont pu être trouvées dans des expositions chez l'homme ; cependant, la quantité de fibres effectivement retenue dans le poumon est très inférieure à celle qui est présente dans l'aérosol en raison des

1. Voir par exemple Gross *et al.* 1970 ; Lee *et al.* 1981 ; Le Bouffant *et al.* 1987 et 1984 ; Moorman *et al.* 1988 ; Wagner *et al.* 1984 ; Davis *et al.* 1984 ; Pigott *et al.* 1981.

2. Voir par exemple Smith *et al.* 1987 ; Hesterberg *et al.* 1993 ; Muhle *et al.* 1987 ; Mast *et al.* 1994.

phénomènes d'épuration (Morgan *et al.* 1975) (voir Annexe au chapitre 2, p.97) et d'ingestion. La fraction retenue varie selon la méthode d'inhalation et la concentration ; elle évolue avec le temps. Bien qu'il soit difficile de chiffrer globalement cette fraction, on peut approximativement considérer qu'elle ne dépasse pas quelques pour cents de ce qui a été inhalé dans un délai de 1 mois après une exposition (Roggli & Brody 1984 ; Roggli *et al.* 1987).

Lors de travaux les plus récents réalisés par inhalation, nez seul, les expérimentateurs se sont préoccupés d'employer des concentrations maximales d'aérosols à des fins de détermination du potentiel carcinogène, qui n'affectent pas l'animal autrement que par des effets carcinogènes. Cette dose correspond à la MTD (*Maximum Tolerated Dose*), terme parfois remplacé, plus récemment, par dose minimale toxique (*Minimally Toxic Dose*) (Hesterberg *et al.* 1996a ; Morrow *et al.* 1996). Actuellement, il n'y a pas consensus pour savoir si cette MTD a une valeur prédictive pour la détermination du risque (McConnell 1995) mais elle permet d'évaluer un potentiel toxique. Hesterberg *et al.* (1996a) et Morrow *et al.* (1996) ont repris les différentes définitions de la MTD au cours du temps (réduction de poids ou de survie de l'animal inférieure à 10 % ; absence de modification des fonctions métaboliques et de clairance dans l'organe cible). Actuellement on considère, selon les critères définis par le National Toxicology Program (États-Unis), que cette dose est la dose maximale qui produit un minimum d'interférences avec les mécanismes de défense pulmonaires, selon des critères fondés sur la clairance des particules (Vu *et al.* 1996). La concentration maximale de l'aérosol est donc en principe déterminée pour atteindre cette dose. Ainsi, la notion de MTD se fonde sur des principes de pharmacocinétique ; elle est assez mal définie pour ce qui concerne les méthodes quantitatives permettant de connaître cette dose. Aucune formulation universelle n'existe aujourd'hui. Ainsi, Mauderly *et al.* (1990) suggèrent qu'une altération de la clairance existe s'il n'y a pas proportionnalité entre la concentration en aérosol et la charge pulmonaire. Dans une étude récente, Hesterberg *et al.* (1996a) ont exposé des rats pendant 13 semaines à des fibres de verre (nez seul, 6 h/jour, 5 j/semaine) à 5 concentrations de fibres de type MMVF10 (3, 16, 30, 45 et 60 mg/m³), et ont étudié différents paramètres dont l'épuration de billes de polystyrène, introduites par inhalation intratrachéale selon la méthode de Oberdorster *et al.* (1993). Les rats étaient sacrifiés 7, 13, 19 et 23 semaines après le début de l'exposition et différentes analyses étaient pratiquées : charge pulmonaire en fibres, clairance des microsphères, analyse cellulaire et biochimique du fluide broncho-alvéolaire et prolifération cellulaire dans les voies aériennes profondes. Les résultats indiquent que la dose de 30 mg/m³ est la dose appropriée la plus élevée pour réaliser des études chroniques par inhalation chez le rat. Pour cette dose, les auteurs ont constaté une diminution des mécanismes de défense pulmonaire, démontrée par une réduction de la clairance des microsphères d'environ 32 % (sur la base de la demi-vie en jours). Une inflammation chronique était observée : afflux de macrophages et fibrose minimale (microgranulomes) 13 semaines après le début de l'exposition, agrégation de

macrophages observée seulement avec des doses élevées (45 et 60 mg/m³), ce qui suggère que la clairance est réduite à ces concentrations. Une toxicité pulmonaire apparaissait dès la dose de 16 mg/m³ par une augmentation des protéines dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire et une stimulation de la prolifération cellulaire après 13 semaines d'exposition. Cependant, ces modifications étaient transitoires puisqu'un retour à des valeurs normales était observé après une période de 10 semaines post-exposition.

En parallèle à l'exposition par inhalation, d'autres méthodes ont été appliquées afin d'exposer les cellules, *in vivo*, à des quantités plus importantes de fibres, sans altérer le temps de survie des animaux. Ainsi, des expérimentations ont été réalisées par instillation intratrachéale ou inoculation intrapleurale³ de fibres, afin de déterminer respectivement la réponse des cellules bronchiques et/ou pulmonaires, et mésothéliales. Ces méthodes ne représentent pas des voies d'exposition physiologiques. Cependant, elles permettent de déterminer la réponse cellulaire dans l'hypothèse où les particules ont atteint les cellules bronchiques ou pleurales. L'inoculation intrapleurale est particulièrement intéressante lorsque l'on veut étudier la réponse des cellules mésothéliales. L'hypothèse d'une translocation des fibres vers la plèvre est valide car des études de biométrie ont montré, dans le cas d'exposition à l'amiante, chez l'homme, le dépôt de fibres au niveau de la plèvre (Sebastien *et al.* 1980 ; Boutin *et al.* 1996) ; dans le cas de fibres MMVF, une migration des fibres dans l'espace interpleural après inhalation chez le rat a été observée (Gelzleichter *et al.* 1996a). Par analogie anatomique, et pour des raisons de faisabilité, l'inoculation intrapéritonéale⁴ a été également pratiquée pour l'évaluation d'un potentiel carcinogène des fibres. On peut regretter que le transfert des fibres inhalées, vers la cavité péritonéale, n'ait pas été étudié, ni les caractéristiques physiologiques et métaboliques respectives des cellules mésothéliales péritonéales et pleurales. Réciproquement, peu d'études ont, à notre connaissance, été effectuées pour déterminer si les fibres inoculées dans la cavité péritonéale (ou pleurale) migraient vers le poumon. On mentionnera toutefois un article de Morgan *et al.* (1993a) qui, après inoculation intrapéritonéale de 1 mg de fibres de verre radiomarquées (²⁴Na) chez le rat Fischer 344, considèrent que les fibres s'attachent très rapidement aux organes de la paroi abdominale. Après 2 heures, 35 % des fibres étaient retrouvées dans le lavage péritonéal, mais à 48 heures seulement 2 % étaient présentes. Peu de macrophages étaient chargés en fibres (0,1 %, 48 heures après injection). Cette dernière observation semble liée à la voie d'inoculation car les auteurs précisent qu'une situation différente est observée quand les mêmes fibres sont instillées par voie intratrachéale où, même à des temps excédant un

3. Voir par exemple Stanton *et al.* 1977, 1981 ; Monchaux *et al.* 1981 ; Wagner *et al.* 1984.

4. Voir par exemple Pott *et al.* 1987 ; Smith *et al.* 1987 ; Davis *et al.* 1984 ; Pigott et Ishmael 1981.

an après administration, des fibres étaient toujours présentes dans les macrophages. Les auteurs ont également étudié l'association des fibres aux autres organes, par comptage de la radioactivité associée ; ils ont constaté que le contenu variait dans l'ordre suivant : tractus gastrointestinal > foie > squelette > tractus uro-génital > rate > reins. Les fibres utilisées étaient des fibres de verre X7779, contenant 4,3 % d'aluminium, d'environ 2 µm de diamètre, calibrées par coupures (enrobage dans un plastic, tronçonnage, élimination du plastic par incinération à basse température dans un plasma à oxygène) aboutissant à des fibres ayant une longueur médiane de 16 µm (*count median length*) et une déviation géométrique standard d'environ 1,8 µm. Les auteurs précisent qu'ils ont tenu compte, dans l'interprétation de leurs résultats, de la solubilité du ^{24}Na (valeur estimée à 2,6 %) et les valeurs données sont corrigées de cette solubilité.

En utilisant la même technique de marquage de fibres de verre X7484, Collier *et al.* (1994a) confirment que pour de faibles doses (< 1,5 mg) les fibres sont principalement localisées dans la cavité péritonéale. Pour des doses plus importantes, une certaine proportion de fibres reste libre dans la cavité péritonéale, dans le délai de 48 heures de l'étude. Ces observations seront discutées plus en détail ultérieurement, dans le cadre de la réflexion sur le devenir des fibres.

L'administration de fibres par voie intratrachéale conduit à un dépôt dans l'appareil respiratoire, ainsi qu'à une excrétion par le tractus gastrointestinal. Dans un essai utilisant les fibres calibrées marquées au ^{24}Na , Morgan *et al.* (1993b) ont instillé une dose de 1 mg, soit 3×10^6 fibres chez le rat. L'administration de fibres était faite au moyen d'une canule au-dessus de la première bifurcation des bronches. La masse de fibres restant après 48 heures dans le poumon était de 0,61 mg, et l'excrétion dans les fèces de 0,22 mg en 24 heures. On constate donc qu'une partie des fibres ainsi administrées est éliminée par voie digestive, selon un mécanisme qui reste à définir (expectoration ?). Une hypothèse similaire a été formulée pour expliquer la phase rapide de clairance observée dans les études d'inhalation chronique (Hesterberg *et al.* 1996a). Morgan *et al.* (1993b) ont en outre noté une grande dispersion dans la quantité de fibres déposées dans chaque animal ; celle-ci variait entre 0,34 et 0,90 mg, soit de $0,79 \times 10^6$ à $1,9 \times 10^6$ fibres par animal. La variabilité de ce paramètre indique que les animaux ne reçoivent pas une dose de fibres strictement équivalente.

Il ne semble pas que cette voie d'élimination des fibres MMVF soit spécifique de l'instillation intratrachéale. En effet, un travail de Morgan *et al.* (1980) montre que, immédiatement après inhalation de fibres de différentes dimensions marquées au ^{24}Na (exposition nez seul pendant environ 2 heures, concentrations < 1 ng/ml), la grande majorité des fibres déposées se retrouve dans le tractus gastro-intestinal (95 %). Dans ce travail, les auteurs montrent à l'inverse qu'une très faible partie des fibres contenues dans l'organisme (de 0,3 à 2 %) se trouve dans le poumon, immédiatement après exposition. Après

48 heures, 99 % des fibres sont retrouvés dans les fèces. La même tendance était décrite par Pitchard *et al.* (1985) qui, exposant des rats à des particules non fibreuses ($^{141}\text{CeO}_2$; 10 mg/m³; diamètre aérodynamique moyen 2,2 µm), obtenaient, 48 heures après la fin de l'exposition, 21 % dans le poumon et 77 % dans les fèces. Des résultats très différents étaient observés par instillation intratrachéale (4 mg/ml) puisque 80 à 90 % des particules étaient retrouvés dans le poumon, contre 5 à 20 % dans les fèces. Dans le travail de Morgan *et al.* (1993b) mentionné ci-dessus, le pourcentage de fibres était de 66 % et 8 %, respectivement, dans le poumon et les fèces. Ainsi, alors que la majorité des fibres instillées se retrouvent dans le poumon, une majorité de fibres inhalées se retrouvent dans le tractus gastro-intestinal.

Actuellement, de nombreux auteurs considèrent que l'exposition par inhalation représente la méthode d'exposition la plus justifiée pour étudier le potentiel toxique des fibres (voir, pour revue, McClellan *et al.* 1992 ; McConnell 1995). La méthode intratrachéale est considérée comme un second choix, alors que les méthodes d'implantation apparaissent comme non pertinentes, sauf dans le cadre d'études mécanistiques spécifiques (McConnell 1995) ; elles sont des voies artificielles, par lesquelles les mécanismes de clairance sont surchargés (*overloaded*) ou ignorés ce qui met en question leur intérêt pour l'évaluation d'un risque (McClellan *et al.* 1992). Les critiques faites ne sont pas toujours pertinentes pour juger de la supériorité d'une méthode par rapport à une autre ; elles concernent parfois des problèmes méthodologiques (manque de standardisation, qualité des études) (McConnell 1995) qui ne peuvent pas faire rejeter ces méthodes sur la base de leur qualité intrinsèque. Davis *et al.* (1996) ont comparé le potentiel fibrosant et carcinogène de fibres d'amosite, de SiC et de microfibres JM100/475, par inhalation à long terme et inoculation intrapéritonéale chez le rat. Fibrose pulmonaire et tumeurs étaient observées par inhalation avec amosite et SiC, mais pas avec les fibres de verre, en dépit de la rétention d'un nombre total de fibres beaucoup plus élevé qu'avec les autres fibres. En revanche, par inoculation intrapéritonéale, des tumeurs étaient observées avec les fibres de verre et le pourcentage observé avec les deux autres types de fibres était aussi augmenté (environ $\times 2$). Les auteurs interprètent cette différence comme pouvant être liée à une réaction inflammatoire plus importante dans le péritoine en raison du plus grand nombre de fibres déposées (tout ce qui est injecté est déposé). Toutefois, les études portant sur la réaction inflammatoire provoquée par ce type de fibres étaient réalisées chez des espèces différentes pour l'inhalation (rat) et l'inoculation intrapéritonéale (souris). Si la méthode d'inhalation permet en effet la prise en compte des mécanismes d'épuration, on ne peut ignorer les différences inter-espèces, et l'extrapolation à l'homme des effets observés chez le rat mérite aussi quelques réserves, ne serait-ce que par les différences dans la structure de l'appareil respiratoire qui conditionne, par exemple, la sélection des particules inhalées selon leur dimension. Par ailleurs, on peut se demander s'il n'est pas intéressant de pouvoir déposer, dans le poumon d'animaux exposés, des fibres de dimensions non inhalables par

l'animal mais inhalables par l'homme ; ce point n'est pas forcément négatif. Carthew *et al.* (1992) ont constaté qu'il existait une bonne relation entre les résultats obtenus par l'inoculation intrapleurale et les données de l'épidémiologie ; et ces auteurs considèrent que cette voie d'exposition est tout à fait pertinente pour évaluer un potentiel tumorigène.

Études sur cellules isolées

Les études ont porté sur divers types cellulaires, qu'il s'agisse de modèles aspécifiques (bactéries...) utilisés pour étudier la toxicité de substances chimiques et développés pour comprendre les mécanismes d'action de l'amiante, ou de modèles plus spécifiques : macrophages, cellules mésothéliales, cellules épithéliales pulmonaires ont été employés. Les réponses cellulaires examinées dans la littérature se rapportent à l'analyse de différents mécanismes associés à la cytotoxicité, la réaction inflammatoire ou la génotoxicité.

Études acellulaires

Différentes études ont été réalisées afin de rechercher si les fibres vitreuses produisaient des espèces radicalaires dérivées de l'oxygène. Le plus souvent, la molécule détectée était $\text{OH}^\bullet$. Les moyens de détection ont évolué au cours des dernières années. On peut citer les méthodes récentes de détection directe en résonance paramagnétique électronique, ou indirecte par la mesure de l'hydroxylation des bases d'ADN ou la détermination des cassures occasionnées dans des constructions plasmidiques.

Échantillons étudiés

Types de fibres

Différents échantillons ont été étudiés. On peut signaler qu'une évolution s'est faite au cours du temps, en raison de la mise à disposition de fibres permettant des études comparatives, à l'aide des mêmes échantillons. Schématiquement, jusque vers les années 1992, des échantillons d'origine très diverse étaient utilisés par les expérimentateurs. Les microfibrilles (JM100 et JM104 par exemple) étaient toutefois retrouvées dans plusieurs publications, permettant d'émettre des hypothèses sur les effets et les modes d'action. Ultérieurement, des échantillons MMVF 10, 11, 21 et 22, représentant des laines de verre, de roche et de laitier, et des céramiques ont été mis à disposition par la TIMA (Thermal Insulation Manufacturers Association).

Ce n'est que très récemment que l'on a disposé des résultats des expériences réalisées à l'aide de ces fibres. Il serait intéressant de savoir quelle est la représentativité de ces échantillons par rapport aux fibres commercialisées et pouvant être utilisées en milieu industriel ou par les consommateurs. Il manque, en particulier, l'ensimage par un liant organique, qui n'a été que très exceptionnellement ajouté aux fibres d'expérimentation (Tableau 7-1).

Caractéristiques des échantillons utilisés

Étant donné l'importance des caractéristiques physicochimiques et dimensionnelles des fibres pour l'interprétation des résultats expérimentaux, on résumera les types d'analyse qui ont été faites dans les différentes études expérimentales pour la préparation des échantillons. On trouvera plus loin (pp. 290-295) les correspondances avec les différentes études. Schématiquement, lorsque les échantillons ont été broyés, un broyeur à billes, à lame ou à anneau a été utilisé, lorsque cela était précisé (voir Tableau 7-1 qui résume les études par inhalation) ; le comptage et la mesure des dimensions des fibres MMVF pouvaient être réalisés en microscopie optique (MO) ou en microscopie électronique à balayage (MEB). Parfois, seulement les fibres WHO ($L/d \geq 3$; $L > 5 \mu\text{m}$; $\varnothing < 3 \mu\text{m}$) étaient comptabilisées. On peut noter que, pour les fibres d'amiante, les méthodes de métrologie font appel à l'analyse en microscopie électronique à transmission (MET) ou au MEB. Les longueurs et diamètres des fibres sont exprimées selon les auteurs, soit en dimensions arithmétique moyenne ou médiane, soit en dimension géométrique moyenne ; plus rarement en dimension nominale. Parfois, c'est le pourcentage de fibres dont la longueur (diamètre) est supérieure à une valeur donnée qui est indiquée. Une autre variable entre les études est le type de particules comptées (fibres, ou fibres et particules non fibreuses), fibres totales ou fibres WHO seulement.

Pathologies résultant d'études expérimentales in vivo avec des laines d'isolation

Laines de verre et fibres de verre

Il est souvent difficile de savoir, car cela n'est pas toujours précisé dans les articles, quelle est l'utilisation potentielle des fibres employées dans les expérimentations. Par souci de rigueur on conservera, dans ce chapitre, la dénomination trouvée dans les articles : laines de verre (LV), fibres de verre (FV) et, le cas échéant, microfibrilles.

Les premières études réalisées avec des fibres de verre l'ont surtout été avec des fibres de diverses origines, en utilisant différentes voies d'exposition : inhalation, instillation intratrachéale et inoculation intracavitaire. On trouvera une

Tableau 7-1a Caractéristiques des fibres de verre (FV) et laines de verre (LV) utilisées dans les études par inhalation chez le rongeur

Type de fibre	Méthode PF/GA/SE	Dose			Dimensions des fibres [†]		Référence
		f/ml	mg/m ³	NF	Longueur µm	Diamètre µm	
MMFG	broyeur à billes/- /chambre	nd	135	4,2 mg/m ³	moyenne 10	moyenne 0,5	Gross <i>et al.</i> 1970
LV Saint Gobain	broyage/Timbrell mark II/chambre	94(70)**	21(5)**	-	58 % > 10 ^d 89 % > 5 ^d (34 % > 10 ^d)** 68 % > 5 ^{d**}	-	Le Bouffant <i>et al.</i> 1987, 1984
FV	broyeur à billes/- /chambre	6 540 (424)	-	-	11,2 % > 5 ^d	1,2 ^{a,c} limites : 0,2-6,5	Lee <i>et al.</i> 1981
FG insulation OC	broyeur « ring mill »/- /chambre		13,9	0,4 mg/m ³	> 20	> 3,5	Moorman <i>et al.</i> 1988
FG insulation OC			13,9	0,4 mg/m ³	> 20	< 3,5	
FM series air filter media			14,9	0,4 mg/m ³	> 10	< 3,5	
Insulsafe II,	pas de broyage/Timbrell/ nez seul	100	10	600 p/ml	CML 37±48 ^c ; 99 % > 5 limites : 5-505	3,1 ^{a,c} ; 46 % < 1	Smith <i>et al.</i> 1987
Blowing Bldg insul avec phenol		100	12	3 800 p/ml	CML 31±33 ^c ; 94 % > 5 limites : 5-198	5,4 ^{a,c} ; 46 % < 1	
Owens Corning high temperature		25	9	775 p/ml	CML 114±94 ^c ; 100 % > 5 limites : 5-510	6,1 ^{a,c} ; 20 % < 1	
English LV ±resine	broyage/-chambre	255	-	-	52 % [5/1] ^c	0,87 % [10/0,2]	Wagner <i>et al.</i> 1984
		350	-	-	47 % [5/1] ^c	0,38 % [10/0,2]	
MMVF 10 Manville 901	séparation dans l'eau/RCC/nez seul	287	29	69	LAM 16,8±2,8 ^d LGM 13,1±2,0 ^d 12,5±2,5 ^{b,d} limites : 2,0-95,4	DAM 1,43±0,75 ^c DGM 1,26 ±1,81 ^c 1,33±0,10 ^{b,c} limites : 0,07-4,8	Hesterberg <i>et al.</i> 1993

Tableau 7-1a (suite)

Type de fibre	Méthode	Dose			Dimensions des fibres [†]		Référence
		f/ml	mg/m ³	NF	Longueur µm	Diamètre µm	
MMVF 11 Certain Teed B	séparation dans l'eau/RCC/nez seul	273	29	44	LAM 18,3±14,6 ^d LGM 13,7±2,2 ^d 13,3±3,7 ^{b,d} limites : 0,8-98,2	DAM 0,90±0,73 ^c DGM 0,69±2,10 ^c 0,68±0,06 ^{b,c} limites : 0,09-5,09	Hesterberg <i>et al.</i> 1993
JM 100	broyage/Timbrell mark II/chambre	14 023	10	-	52 % > 10 ^d	43 % < 0,1	Le Bouffant <i>et al.</i> 1987, 1984
104/475, tempstran 104/475	broyeur à anneaux/ -chambre		4,8 5,0	0,1mg/m ³ 0,1mg/m ³	> 10 < 10	< 3,5 < 3,5	Moorman <i>et al.</i> 1988
104/475, Denver	broyeur à lame/« Spurny vibra- ting bed »/nez seul	576	-	-	50 % [4,8/0,42] ^c		Muhle <i>et al.</i> 1987
JM 100	pas de broyage/ Timbrell/nez seul	3 000	3	12 000 p/ml	19 % > 10 LGM 4,7	DGM 0,45	Smith <i>et al.</i> 1987
JM 100	broyage/-chambre	1 436	-	-	29 % > 10		Wagner <i>et al.</i> 1984

PF/GA/SE : Préparation des fibres /Génération de l'aérosol/Système d'exposition
CML, LAM, LGM : « count mean length », longueur arithmétique moyenne, longueur géométrique moyenne
CMD, DAM, DGM : « count mean diameter », diamètre arithmétique moyen, diamètre géométrique moyen

FV : Fibre de verre

LV : Laine de verre

MMVF : Fibres vitreuses synthétiques (Man Made Vitreous Fibres)

nd : non déterminé

NF : Particules non fibreuses

OC : Owens Corning

p/ml : nombre de particules non fibreuses par millilitre

^a Moyenne

^b Médiane

^c Mesure au microscopie électronique à balayage

^d Mesure en microscopie optique

* Entre parenthèses : Fibres « respirables » = « alvéolaires »

[†] [L/Ø] ; dimensions des fibres. n % [L/Ø] indique le pourcentage de fibres dont la longueur est supérieure à L et le diamètre inférieur à Ø

Tableau 7-1b Caractéristiques des fibres de laines de roche (LR) et laines de laitier (LL)

Type de fibre	Méthode	Dose			Dimensions des fibres		Référence
		f/ml	mg/m ³	NF	Longueur µm	Diamètre µm	
LR Saint Gobain	broyage/Timbrell mark II/chambre	41	28	-	60 % > 10 ; 87 % > 5 ^d	23 % < 1 ^d	Le Bouffant <i>et al.</i> 1987, 1984
LR Sweden	broyage/-/chambre	240	-	-	63 % > 10	-	Wagner <i>et al.</i> 1984
LR : RW Intl A/S (DK) MMVF21	-/-/nez seul	264 [243] ^e	30,4	29 p/ml	- - -	DAM 1,14±0,64 ^d DGM 0,98±1,74 ^d 1,10 ^{b,d}	McConnell <i>et al.</i> 1994
		185 [150] ^e	16,1	35 p/ml	LAM 21,0 ±16,7 ^d LGM 15,4 ±2,3 ^d 15,5 ^{b,d}	DAM 1,0 ±0,6 ^d DGM 0,9 ±0,7 ^d 0,92 ^{b,d}	
		44 [34] ^e	3,1	12 p/ml	LAM 17,6 ±14,8 ^d LGM 13,0 ±2,2 ^d 12,6 ^{b,d}	DAM 1,1 ±0,6 ^d DGM 0,9 ±1,8 ^d 0,96 ^{b,d}	
LL JV Spinner	pas de broyage/Timbrell/ nez seul	200	10	5 600 p/ml	CLM 40±63° LGM 22° 95 % > 5°	2,7 ^{a,c} 61 % < 1°	Smith <i>et al.</i> 1987

Tableau 7-1b (suite)

Type de fibre	Méthode	Dose			Dimensions des fibres		Référence
		f/ml	mg/m ³	NF	Longueur µm	Diamètre µm	
LL USG interiors (USA) MMVF22	-/-nez seul	245 [213] ^e	29,9	80 p/ml	LAM 20,5 ±15,9 ^d LGM 15,2 ±2,2 ^d 15,5 ^{b,d}	DAM 1,0 ±0,6 ^d DGM 0,87 ±1,7 ^d 0,85 ^{b,d}	McConnell <i>et al.</i> 1994
		158 [131] ^e	16,1	70 p/ml	LAM 17,9±14,8 ^d LGM 13,2 ±2,2 ^d 13,1 ^{b,d}	DAM 0,97 ±0,54 ^d DGM 0,84 ±1,69 0,84 ^{b,d}	
		33 [30] ^e	3,1	29 p/ml	LAM 16,5 ±13,1 ^d LGM 12,3 ±2,1 ^d 12,1 ^{b,d}	DAM 0,96 ±0,5 ^{b,d} DGM 0,84 ±1,70 ^d 0,82 ^{b,d}	

PF/GA/SE : Préparation des fibres /Génération de l'aérosol /Système d'exposition
 CLM,LAM, LGM : « count mean length », longueur arithmétique moyenne, longueur géométrique moyenne
 CMD, DAM, DGM : « count mean diameter », diamètre arithmétique moyen, diamètre géométrique moyen
 LL : Laine de laitier
 LR : Laine de roche
 MMVF : Fibres vitreuses synthétiques (Man Made Vitreous Fibres)
 nd : non déterminé
 NF : Particules non fibreuses
 p/ml : nombre de particules non fibreuses par millilitre
^a Moyenne
^b Médiane
^c Mesure au microscopie électronique à balayage
^d Mesure en microscopie optique
^e Nombre de fibres WHO (L > 5 µm et Ø < 3 µm, L/Ø > 3)

Tableau 7-1c Caractéristiques des fibres de céramique

Type de fibre	Méthode PF/GA/SE	Dose			Dimensions des fibres		Référence
		f/ml	mg/m ³	NF	Longueur µm	Diamètre µm	
Al silicate glass	rouleaux en acier/ Timbrell/chambre	95	10 ^d	380 p/ml	30 % > 10	45 % [5/1]	Davis <i>et al.</i> 1984
High purity		224	29	-	18 ±15	1,0 ±0,72	"
Zirconia		172	29	-	28 ±20	0,86 ±0,68	"
After service		166	30	-	11 ±9	1,39 ±0,75	"
PKT	broyeur à billes/- /chambre	6 530	73	-	5,5 % > 10 ^c 4,2 ^{a,c}	0,2 ^{a,c}	Lee <i>et al.</i> 1981
Titanate, Fybex	broyeur à billes/- /chambre	6 720 à 101 500	39 à 371	-	6,7 ^{a,c} 8,6 % > 10	0,2 ^c	Lee <i>et al.</i> 1981
Saffil®	broyeur à billes/Timbrell/ chambre	-	3	-	15,5 ^b	2,75 ^b	Pigott <i>et al.</i> 1981
Fiberfrax Carborundum	pas de broyage/Timbrell/ nez seul	200	12	6 600 p/ml	CLM = 35±34 ^c 83 % > 10	1,8 ^{b,c}	Smith <i>et al.</i> 1987
RCF 1 « kaolin »	séparation dans l'eau/RCC/ nez seul	234	29	387 p/ml	LAM 22,3±17,0 ^d LGM 15,9 ±2,4 ^d 16,8±3,9 ^{b,d} limites : 1,3-76,6	DAM 0,98±0,61 ^c DGM 0,82 ±1,89 ^c 0,85±0,19 ^{b,c} limites : 0,12-4,53	Hesterberg <i>et al.</i> 1993 Mast <i>et al.</i> 1995a
RCF 2 « aluminium zirconia silica »	-/-/nez seul	268	29	398 p/ml	LAM 18,7±15,5 ^d LGM 12,8±2,5 ^d 13,0±4,1 ^{b,d} limites : 1,5-67,1	DAM 1,07±0,69 ^c DGM 0,88±1,92 ^c 0,89±0,19 ^{b,c} limites : 0,08-4,45	Mast <i>et al.</i> 1995a
RCF 3 « high purity »	-/-/nez seul	213	29	537 p/ml	LAM 24,2±17,9 ^d LGM 17,4±2,4 ^d 18,6±3,0 ^{b,d} limites : 1,9-79,6	DAM 1,05±0,70 ^c DGM 0,85 ±1,99 ^c 0,88±0,21 ^{b,c} limites : 0,09-6,55	Mast <i>et al.</i> 1995a

Tableau 7-1c (suite)

Type de fibre	Méthode PF/GA/SE	Dose			Dimensions des fibres		Référence
		f/ml	mg/m ³	NF	Longueur µm	Diamètre µm	
RCF 4 « after service » (RCF1 2 400°F pendant 24h)	-/-/nez seul	206	30	258 p/ml	LAM 12,7±9,9 ^d	DAM 1,38±0,70 ^c	Mast <i>et al.</i> 1995a
					LGM 9,8±2,0 ^d	DGM 1,22 ±1,68 ^c	
					9,6±3,8 ^{b,d}	1,24±0,15 ^{b,c}	
					limites : 1,6-55,5	limites : 0,19-4,53	
RCF 1 « kaolin »	-/-/nez seul	36	3	69 p/ml	LAM 20,2±18,1 ^d	DAM 1,02±0,73 ^c	Mast <i>et al.</i> 1995b
					LGM 13,5±2,6 ^d	DGM 0,80±2,06 ^c	
					13,4±3,3 ^{b,d}	0,84±0,12 ^{b,c}	
					limites : 0,77-93,4	limites : 0,08-5,32	
RCF 1 « kaolin »	-/-/nez seul	91	8,8	184 p/ml	LAM 20,3±17,1 ^d	DAM 1,02±0,71 ^c	Mast <i>et al.</i> 1995b
					LGM 13,9±2,5 ^d	DGM 0,80±2,03 ^c	
					14,4±4,0 ^{b,d}	0,84±0,17 ^{b,c}	
					limites : 1,09-98,2	limites : 0,08-5,37	
RCF 1 « kaolin »	-/-/nez seul	162	16,5	215 p/ml	LAM 19,6±16,5 ^d	DAM 1,02±1,7 ^c	Mast <i>et al.</i> 1995b
					LGM 13,8±2,4 ^d	DGM 0,82±1,99 ^c	
					13,8±3,2 ^{b,d}	0,87±0,22 ^{b,c}	
					limites : 1,24-97,9	limites : 0,07-4,83	
RCF 1 « kaolin »	-/-/nez seul	256	29,2	485 p/ml	LAM 22,1±16,7	DAM 0,94±0,63	McConnell <i>et al.</i> 1995
					LGM 15,9 ±2,4	DGM 0,78±1,93	
					16,4 ^{b,d}	0,79 ^b	
					limites : 1,1-64,2	limites : 0,11-5,50	

PF/GA/SE : Préparation des fibres/Génération de l'aérosol/Système d'exposition

CLM, LAM, LGM : count, longueur arithmétique moyenne, longueur géométrique moyenne

CMD, DAM, DGM : count, diamètre arithmétique moyen, diamètre géométrique moyen

MMVF : Fibres vitreuses synthétiques (Man Made Vitreous Fibres)

nd : non déterminé

NF : Particules non fibreuses

p/ml : nombre de particules non fibreuses par millilitre

PKT : pigmentary potassium titanate

RCC : Système « Research and Consulting Company, Genève »

RCF : Fibres de céramique réfractaires (Refractory Ceramic Fibres)

^a Moyenne^b Médiane^c Mesure au microscope électronique à balayage^d Mesure en microscopie optique

** Fibres « respirables = alvéolaires »

synthèse de ces études dans la référence Achard-Ellouk et Jaurand (1994). Les travaux les plus récents ont été réalisés par inhalation, utilisant MMVF 10 et 11, chez le rat (Hesterberg *et al.* 1993). Les tableaux 7-1 a, b et c résument les caractéristiques des fibres utilisées dans les expériences d'inhalation, chez le rongeur. Les tableaux 7-2a et b résument les données pathologiques obtenues dans les différentes études.

Études par inhalation

Finalement, trois études réalisées chez le hamster n'ont pas montré de production de tumeur après inhalation. Toutefois, les fibres d'amiante n'induisaient pas non plus de tumeurs après exposition à des doses de 300 mg/m^3 d'amosite ou de 7 mg/m^3 de crocidolite (Lee *et al.* 1981 ; Smith *et al.* 1987). Cependant, on notera que très peu de hamsters étaient exposés à l'amosite (7 animaux) dans l'étude de Lee *et al.* (1981).

Les résultats obtenus chez le rat n'ont pas permis de tirer des conclusions définitives. Dans l'étude de Lee *et al.* (1981), 2 adénomes étaient observés sur 19 animaux exposés (Tableau 7-2a). La dose utilisée dans ce travail était élevée (424 mg/m^3). Wagner *et al.* (1984) n'ont pas observé de taux statistiquement significatifs de tumeurs avec des fibres de verre avec ou sans liant alors qu'un taux de tumeurs de 25 % était observé avec le chrysotile. On peut toutefois noter que la dose cumulée d'exposition au chrysotile était environ 10 fois supérieure (environ 5×10^5 à 6×10^5 versus $70 \times 10^5 \text{ f}$) (ou la dose d'exposition environ 300 f/ml versus $3\,800 \text{ f/ml}$). Les caractéristiques dimensionnelles des fibres indiquent qu'environ 50 % d'entre elles ont un diamètre inférieur à $1 \mu\text{m}$ et une longueur supérieure à $5 \mu\text{m}$ alors que plus de 97 % des fibres de chrysotile présentaient ces caractéristiques.

L'étude de Drew *et al.* (1987) n'a pas été prise en considération ; les animaux étaient exposés pendant une durée de dix semaines puis sacrifiés dans un délai de deux mois après exposition, ce qui ne permet pas d'avoir des données sur le potentiel carcinogène des fibres qui ont été testées. Dans une étude réalisée chez le cobaye (Lee *et al.* 1981), 2/8 animaux exposés présentaient un adénome (le nombre d'animaux est trop petit pour que l'on puisse tirer des conclusions de ce travail).

En 1987, Le Bouffant *et al.* n'ont pas observé de taux significatif de tumeurs dans un groupe de 45 rats exposés à 21 mg/m^3 de LV (58 % $> 10 \mu\text{m}$ de longueur ; 94 f/ml), alors que le chrysotile en produisait 20 % ($168\,000 \text{ f/ml}$; 5 % $> 10 \mu\text{m}$ de longueur). On constate les différences importantes, tant dans la concentration de fibres que dans les dimensions, qui peuvent exister entre les deux types de fibres. Ces remarques s'appliquent également aux études de Smith *et al.* (1987) et Hesterberg *et al.* (1993). Toutefois, dans cette dernière étude, quelques tumeurs étaient observées (Tableau 7-2a) bien que le pourcentage ne soit pas significativement différent de celui observé chez les animaux non traités. On peut remarquer aussi (Tableau 7-1) que les fibres

avaient un diamètre géométrique moyen de 1,26 μm et 0,69 μm , respectivement, pour MMVF 10 et MMVF 11 et que 50 % des fibres avaient des dimensions longueur/diamètre supérieures à 12,5/1,33 et à 13,3/0,68 (en μm), respectivement. Ceci indique que les fibres MMVF11 doivent plus facilement pénétrer dans le poumon que les fibres MMVF10. Les résultats sur la charge pulmonaire en fibres seraient en accord avec cette hypothèse (voir plus loin et tableau 7-3).

Dans l'étude de Smith *et al.* (1987), aucune tumeur n'était observée après exposition à trois sortes de fibres de verre. On peut remarquer que le diamètre moyen des fibres était élevé, respectivement 3,1, 5,4 et 6,1 μm pour les différentes fibres, et le pourcentage de fibres dont le diamètre était inférieur à 1 μm était 46 %, 46 % et 20 %, respectivement. Il est donc vraisemblable que, dans cette étude, une partie importante des fibres ne pouvait être déposée dans le poumon. Les auteurs constatent d'ailleurs que les fibres avec un diamètre plus fin étaient retrouvées en plus grande quantité dans le poumon que les fibres les plus épaisses (des données quantitatives ne sont pas indiquées), et que les fibres retenues avaient généralement de 8 à 10 μm de longueur. La longueur géométrique moyenne des fibres de l'aérosol était respectivement de 24, 20 et 83 μm . Par ailleurs, le crocidolite (longueur moyenne 3,1 $\pm$ 10,2 μm) ne produisait qu'un petit nombre de tumeurs (3/60). Le spectre de longueur de cet échantillon montre une dispersion de 0,2 à > 25 μm , avec 95 % des fibres < 5 μm de longueur.

L'étude réalisée par Moorman *et al.* (1988) est difficile à évaluer étant donné le peu de renseignements sur les caractéristiques granulométriques des fibres. En revanche, l'étude de Hesterberg *et al.* (1993) est bien documentée. Ces auteurs ont obtenu un taux statistiquement non significatif de tumeurs (bénignes et malignes) de 5,9 % et 2,7 % avec MMVF10 et MMVF11, respectivement, pour des expositions à 30 mg/m^3 (Tableau 7-2a). Chez les animaux non traités, une fréquence de 3,3 % de tumeurs était observée. Ces auteurs, qui ont employé 3 doses (3, 16 et 30 mg/m^3), ont toutefois obtenu une augmentation dose-dépendante du pourcentage de tumeurs avec MMVF10 (0 %, 0,8 % et 5,9 %) ; cette relation n'est pas démontrée avec les fibres MMVF11, comme en témoignent les pourcentages observés : 3,4 %, 7,5 %, 2,7 % avec 3, 16, 30 mg/m^3 , respectivement. La chute observée avec la plus forte dose pourrait être due à un problème statistique car l'analyse de la quantité de fibres en rétention dans le poumon montre une grande hétérogénéité d'un animal à l'autre (voir discussion, p. 365). Aucun mésothéliome n'était observé dans ces séries ; en revanche, un seul mésothéliome était détecté chez les animaux exposés au chrysotile (1,4 %). Dans ce groupe, le taux global de tumeur était de 14,6 % et la différence était statistiquement significative ($\chi^2 = 15$; $p < 0,0001$). On peut constater les différences entre les expositions aux échantillons de fibre de verre et de chrysotile (Tableau 7-1a et 7-2a) :

- nombre de fibres par ml 500 fois plus petit,
- longueur moyenne environ 10 fois plus grande (chrysotile : 2,2 $\pm$ 3 μm),

- diamètre moyen environ dix fois plus grand (chrysotile : $0,08 \pm 0,02 \mu\text{m}$),
- limites de longueur également d'un ordre de grandeur plus grand que le chrysotile (bien que plus court, le chrysotile possède néanmoins des fibres potentiellement réactives, au sens de la dimension, puisque la limite supérieure est de $18,9 \mu\text{m}$ (environ $90 \mu\text{m}$ pour les fibres de verre).

Ces remarques suggèrent que l'on peut prévoir, a priori, que le nombre de fibres de verre déposées dans le poumon sera beaucoup plus faible que le nombre de fibres de chrysotile. Les données sur la rétention pulmonaire (Tableau 7-3) sont en accord avec l'hypothèse que nous formulons ici, puisque le nombre de fibres retrouvées dans le poumon est de 30 à 40 fois moindre dans le cas des fibres de verre, comparativement au chrysotile, à l'issue des 24 mois d'exposition.

On notera également, mais cela sera discuté plus loin en détail (voir Devenir des fibres dans le poumon, p. 343), qu'il y a une « uniformisation » de la longueur des fibres retrouvées dans le poumon : alors que les MMVF ont une longueur moyenne d'environ $17 \mu\text{m}$ (limite entre environ 1 et $100 \mu\text{m}$) et le chrysotile $2,2 \mu\text{m}$ (limite $0,2$ - $18,9 \mu\text{m}$), on retrouve dans le poumon, après une exposition de 24 mois (sans délai post-exposition), une longueur moyenne d'environ $7 \mu\text{m}$ pour les MMVF et $2 \mu\text{m}$ pour le chrysotile. Cela peut donc indiquer, respectivement, un enrichissement en fibres dans les plus petites longueurs, pour les MMVF (ou cassure), un dépôt sans enrichissement évident de certaines fractions de longueur, pour le chrysotile. L'observation des valeurs du diamètre moyen des fibres de l'aérosol : $1,26 \pm 1,81 \mu\text{m}$; $0,62 \pm 2,10 \mu\text{m}$ pour les MMVF 10 et 11, respectivement, et $0,08 \pm 1,77$ pour le chrysotile, avec des limites d'environ $0,07$ - $5 \mu\text{m}$ pour les MMVF versus $0,03$ - $0,65 \mu\text{m}$ pour le chrysotile, peut indiquer que les fibres les plus fines seraient préférentiellement retenues dans le cas des MMVF puisque le diamètre moyen des fibres retenues après 24 mois d'exposition est de $0,42 \mu\text{m}$ et $0,47 \mu\text{m}$ (MMVF 10 et 11). Avec le chrysotile, on est plus proche, dans le poumon, des valeurs moyennes déterminées dans l'aérosol d'exposition expérimentale (soit $0,07 \mu\text{m}$ versus $0,08 \mu\text{m}$).

Ces données indiquent que toute comparaison des résultats obtenus avec les fibres de verre et les fibres d'amiante doit être faite avec une extrême prudence. On verra qu'il en sera de même avec les autres fibres de synthèse.

D'autres types de tumeurs n'ont pas été signalés dans les travaux étudiés dans le cadre de cette revue, excepté dans le travail de Moorman *et al.* (1988). Ces auteurs ont en effet observé une augmentation statistiquement significative du nombre de leucémies monocytaires dans des groupes de 50 rats exposés aux fibres de verre ($p < 0,05$ pour les groupes 1 à 3 et $p < 0,01$ pour le groupe 4), comparativement aux animaux contrôles. Le taux de leucémies chez les animaux contrôles non traités était de 21,2 %. Toutefois, Drew *et al.* (1987) ont observé un pourcentage plus élevé de leucémies monocytaires chez les rats témoins que chez les rats traités. Dans les deux études, il s'agissait de rats Fischer 344 provenant du même fournisseur. Ces résultats étant discordants, il

n'est pas possible de conclure sur le potentiel des fibres dans ce domaine. Hesterberg *et al.* (1993) ont observé une réaction cellulaire, sans fibrose, alors que les contrôles chrysotile présentaient une fibrose pulmonaire.⁵

Études par instillation intratrachéale

Plusieurs études ont utilisé l'instillation intratrachéale chez le hamster (Tableau 7-2b). Là encore, aucune augmentation du taux de tumeur n'était observée chez les animaux traités comparativement aux animaux non traités. Chez 20 hamsters inoculés avec 5×2 mg, un seul carcinome était observé (Adachi *et al.* 1991). Les fibres avaient une longueur moyenne de 16 μm et un diamètre moyen de 0,65 μm . Dans ce travail, il n'y avait pas de contrôles « positifs », mais aucun des 20 animaux non traités n'a développé de tumeur. Dans l'autre étude (Gross *et al.* 1970), aucune tumeur n'était observée (63 hamsters inoculés). Ces animaux étaient répartis par groupes de 12 à 15 et traités avec différentes fibres : nues ou enrobées (phénol, amidon).

Chez le rat, 7 tumeurs ont été obtenues sur 339 animaux inoculés avec une dose totale de 5 à 35 mg de fibres selon un protocole utilisant de 1 à 10 inoculations (Gross *et al.* 1970 ; Drew *et al.* 1987) (Tableau 7-2b). La diversité des protocoles, du type de fibres utilisé et le petit nombre d'animaux dans la plupart des groupes ne permettent pas d'interpréter statistiquement les résultats. De plus, les fibres contrôle positif produisaient peu de tumeurs puisqu'un seul adénocarcinome était observé dans l'étude de Drew *et al.* (1987) où 46 rats avaient reçu 5 instillations intratrachéales de 1 mg de fibres de crocidolite.

Études par inoculation intrapleurale

Par implantation intrapleurale, Stanton *et al.* (1977, 1981) ont exposé des rats à 72 échantillons différents dont 22 échantillons de fibre de verre de différentes dimensions. L'implant consistait en un support composé de fibres de verre « coarse » enrobées de liant, à surface plane, puis recouvertes de fibres à tester insérées dans de la gélatine solidifiée à la surface. Les tumeurs observées ont été dénommées sarcome pleural mais les auteurs mentionnent que les mésothéliomes de la plèvre attribués à une exposition chez l'homme sont semblables, et ils les différencient des sarcomes du tissu fibreux, éventuellement observés dans l'épaisseur de la paroi thoracique. Les sarcomes pleuraux obtenus ne pouvaient pas être provoqués par les fibres de verre du support car, sur 1 518 animaux contrôles (488 non traités et 1 030 traités par le support

5. Les groupes 1 et 2 correspondent à une exposition à des fibres d'isolation (Owens Corning) avec liant : $\varnothing > 3,5 \mu\text{m}$, $L > 20 \mu\text{m}$ et $\varnothing < 3,5 \mu\text{m}$, $L > 20 \mu\text{m}$, respectivement. Fibres 100/475 sans liant pour les groupes 3 et 4 : $\varnothing < 3,5 \mu\text{m}$, $L > 10 \mu\text{m}$ et $\varnothing < 3,5 \mu\text{m}$, $L < 10 \mu\text{m}$, respectivement.

Tableau 7-2a Expérimentations effectuées avec des laines de verre (LV) et fibres de verre (FV) chez des hamsters et des rats. Études par inhalation

Espèce animale	Contrôle	LV ou FV			Amiante	Référence
Hamsters*		LV			Amosite ou crocidolite [†]	Gross <i>et al.</i> 1970 Lee <i>et al.</i> 1981 Smith <i>et al.</i> 1987
Tumeurs ^D (%)	1/17 (0,6)	0/257 (0)			0/77 (0)	
Rats		FV ^b			Amosite ^b	Lee <i>et al.</i> 1981
Tumeurs ^D (%)	0/19 (0)	2 Ad/19 (10)			2 Ad, 1 Ca/16 (19)	
dose f/ml	-	6 540			13 250	
Dose cumulée x 10 ⁻⁵	-	35,3			72	
		LV + °	LV – °		Chrysotile ^a	Wagner <i>et al.</i> 1984
Tumeurs ^D (%)	0/48 (0)	1 AdCa (2)	1 Ad (2)		1 Ad, 11 AdCa/48 (25)	
dose f/ml	-	255	350		3 832	
Dose cumulée x 10 ⁻⁵	-	4,6	6,4		69,7	
		LV ^b			Chrysotile ^a	Le Bouffant <i>et al.</i> 1984, 1987
Tumeurs ^D (%)	0/47 (0)	1 Ca/45 (2)			9/45 (20)	
dose f/ml	-	94			167 938	
Dose cumulée x 10 ⁻⁵	-	2,4			4 400	
		Insulsafe II ^a	Bldg Ins ^a	Owens Corning ^a	Crocidolite ^a	Smith <i>et al.</i> 1987
Tumeurs ^D (%)	0/184 (0)	0 (0)	0(0)	0(0)	2 + 1 M/60 (5)	
dose f/ml	0/184 (0)	100	100	25	3 000	
Dose cumulée x 10 ⁻⁵	-	3,12	3,12	0,78	94	

Tableau 7-2a (suite)

Espèce animale	Contrôle		LV ou FV		Amiante	Référence
Tumeurs ^D (%)	0/100 (0)	0/100	0/100	(0)	-	Moorman <i>et al.</i> 1988
dose f/ml	-	13,9	14,9			
		MMVF10 ^b	MMVF11 ^b		Chrysotile	Hesterberg <i>et al.</i> 1993
Tumeurs ^D (%)	4/123 (3)	0 (0)		3 Ad, 1 Ca (3,4)		
dose f/ml ^u	-	29		27	1,02 ±1,4 × 0 ⁵	
Dose cumulée x 10 ⁻⁵	-	0,9		0,8	320	
Tumeurs ^D (%)		1 Ad (0,8)		6 Ad, 3 Ca (7,5)		
dose f/ml ^u	-	54	51			
Dose cumulée x 10 ⁻⁵	-	1,7	1,6			
Tumeurs ^D (%)		6 Ad, 1 Ca (5,9)		3 Ad (2,7)		
dose f/ml	-	287 ±68		273 ±86		
Dose cumulée x 10 ⁻⁵	-					
Fibres		8,9		8,5		
Non fibres		2,1		1,4		

Ad : adénome, AdCa : adénocarcinome, Ca : carcinome, M : mésothéliome, S : sarcome, LV : laine de verre, FV : fibres de verre

^a, ^b Détermination des dimensions, ^a microscopie électronique, ^b microscopie optique

* Pour simplifier le tableau, les résultats obtenus dans les études référencées ont été regroupés

^D Nombre d'animaux avec tumeurs/nombre total d'animaux

Amosite : 300 mg par mètre cube (7 hamsters) et crocidolite : 7 mg par mètre cube (70 hamsters)

^u, + liant, - liant

^u Pour les MMVF, valeurs calculées à partir de la concentration de l'aérosol pour 30 mg/m³

Tableau 7-2b Expérimentations effectuées avec LV et FV chez des hamsters et des rats. Études par instillation ou inoculation

Voie d'exposition (Espèce animale)	Contrôle	LV ou FV	Amiante	Référence
Intratrachéale (hamsters)*				
Tumeurs ^D (%)	0/40 (0)	1/83 (1,5)	-	Gross <i>et al.</i> Adachi <i>et al.</i> 1991
Intratrachéale (rats)*				
Tumeurs ^D (%)	6/171 (3,5)	7/339 (2,1)	1 AdCa/46 (2,2)	Gross <i>et al.</i> 1970 Drew <i>et al.</i> 1987
Intrapleurale (rats)#				
		LV	Chrysotile	
Tumeurs ^D (%)	0/24 (0)	1/83 (1,2)	50 M/116 (43,1)	Wagner <i>et al.</i> 1984 Wagner <i>et al.</i> 1973
Intrapéritonéale (rats)f				
	Saline	FV S + S106	Chrysotile	
Tumeurs ^D (%)	0 (0)	1 M/34 (2,9)	4 M, 2 S/37 (16)	Pott <i>et al.</i> 1976
dose	4 x 2 ml	2 mg	2 mg	
Tumeurs ^D (%)	0 (0)	2 M, 3 S/36 (11,1)	-	
dose	4 x 2 ml	10 mg		
Tumeurs ^D (%)	0 (0)	20 M, 3 S/32 (71,9)	16 M, 2 S/33	
dose	4 x 2 ml	4 x 25 = 75 mg	4 x 25 = 75 mg	
Intrapéritonéale (rats)f				
		FV M + N104		
Tumeurs ^D (%)	0 (0)	17 M, 3 S/73 (27,4)	-	Pott <i>et al.</i> 1976
dose	4 x 2 ml	2 mg		
Tumeurs ^D (%)	0 (0)	36 M, 4 Ca, 1 S/77 (53,2)	-	
dose	4 x 2 ml	10 mg		
Tumeurs ^D (%)	0 (0)	47 M, 8 S/77 (71,4)	-	
dose	4 x 2 ml	2 x 25 = 50 mg		
Intrapéritonéale (rats)f				
		FV M + N112		
Tumeurs ^D (%)	0 (0)	12 M, 1 Ca, 1 S/37 (37,8)	-	Pott <i>et al.</i> 1976
dose	4 x 2 ml	20 mg		

Ad : adénome, AdCa : adénocarcinome, Ca : carcinome, M : mésothéliome, S : sarcome, LV : laine de verre, FV : fibres de verre, f : femelle

* Pour simplifier le tableau, les résultats obtenus dans les études référencées ont été regroupés

^D Nombre d'animaux avec tumeurs/nombre total d'animaux. Entre parenthèses : % avec tumeur

Excepté l'étude de Stanton *et al.* (1981)

Tableau 7-3 Études réalisées avec des fibres de verre : charge pulmonaire après une exposition par inhalation pendant 24 mois

Type de fibre	Fibres/ml Nb total	Dose cumulée*		% tumeurs	Charge pulmonaire par gramme de tissu sec	Référence
		fibreuse	non fibreuse			
Insulsafe II	100 ^e	$3,12 \times 10^5$	$19,1 \times 10^5$	0	28×10^6 F ^e	Smith <i>et al.</i> 1987
Bldg Ins	100 ^e	$3,12 \times 10^5$	$118,6 \times 10^5$	0	1×10^6 F ^e	
Owens Corning	25 ^e	$0,78 \times 10^5$	$24,2 \times 10^5$	0	$0,6 \times 10^6$ F ^e	
Crocidolite	3 000 ^e	$9,4 \times 10^6$		5	$3,9 \times 10^8$ F ^e	
LV	94 ^d	$2,4 \times 10^5$		2	$8,34 \times 10^8$ F ^c	Le Bouffant <i>et al.</i> 1984, 1987
chrysotile	96 271 ^c	$4,34 \times 10^8$		20	$1,77 \times 10^{10}$ F ^c	
LV + resin	240 ^e	$4,4 \times 10^5$		2	0,0005 mg	Wagner <i>et al.</i> 1984
LV - resin	323 ^e	$5,9 \times 10^5$		2	0,0002 mg	
Chrysotile	3 832 ^e	$0,7 \times 10^8$		25	0,0004 mg	
MMVF 10	287 ^e	$8,9 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$	5,9	$4,16 \pm 0,89 \times 10^8$ F ^e	Hesterberg <i>et al.</i> 1993
	54 [†]	$1,7 \times 10^{5†}$	nd	0,8	$2,69 \pm 0,48 \times 10^8$ F	
	29 [†]	$0,9 \times 10^{5†}$	nd	0	$0,37 \pm 0,13 \times 10^8$ F	
MMVF 11	273 ^e	$8,5 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	2,7	$6,42 \pm 3,10 \times 10^8$ F ^e	
	51 [†]	$1,6 \times 10^{5†}$	nd	7,5	$3,46 \pm 0,86 \times 10^8$ F	
	27 [†]	$0,8 \times 10^{5†}$	nd	3,4	$0,62 \pm 0,13 \times 10^8$ F	
chrysotile	102 000 ^e	320×10^5		3	$189 \pm 89,9 \times 10^8$ F	

* : ($F \times ml^{-1} \times h$). Une multiplication par un facteur d'environ $1,4 \times 10^4$ serait nécessaire pour convertir en nombre total de fibres inhalées par le rat (valeur calculée sur la base de 4 ml inhalés par cycle et 60 cycles par minute ; pour un rat de 500 g)

† : Valeurs déduites des données pour la concentration 30 mg/ml (287 f/ml)

^c : Microscopie électronique à transmission

^d : Microscopie optique

^e : Microscopie électronique à balayage

nd : Non déterminé

seul, seulement 29 animaux (1,9 %) développaient des sarcomes pleuraux. La mortalité n'était pas plus élevée que dans des études par inoculation sans implant puisque les auteurs notaient une forte mortalité seulement à partir de 2 ans. Stanton *et al.* (1977, 1981) ont constaté que la plus forte probabilité de développement de tumeurs était associée au nombre de fibres $\geq 8 \mu m$ de long et $< 0,25 \mu m$ de diamètre et des corrélations relativement bonnes ont été trouvées pour des fibres ayant un diamètre $< 1,5 \mu m$ et une longueur $> 4 \mu m$. Une nouvelle analyse des données de Stanton, quelques années plus tard, a confirmé que le nombre de fibres d'une dimension donnée était un bon prédicteur du nombre de tumeurs, mais que l'ajustement est encore meilleur lorsque le type de fibres est pris en considération. Le modèle appuie l'idée que la probabilité de formation de tumeur dépend du nombre (ou de la fraction) de fibres très longues et très fines (Oehlert 1991). Toutefois, il est bon de

rappeler que cette notion relative doit être replacée dans le contexte des caractéristiques dimensionnelles limites des fibres utilisées dans cette étude.

Dans une autre étude, deux échantillons étaient inoculés, avec ou sans liant ; un mésothéliome était observé après inoculation de 20 mg de fibres (Tableau 7-2b). Avec une dose équivalente de chrysotile, 12,5 % et 44 % de mésothéliomes étaient obtenus (Wagner *et al.* 1973, 1984). Comme cela a été évoqué pour les études par inhalation, le nombre de fibres de verre administrées est inférieur à celui des fibres de chrysotile : $5,1 \times 10^8$ et $9,8 \times 10^8$ versus 196×10^8 ; le nombre de fibres plus grandes que $5 \mu\text{m}$ était 196×10^8 pour le chrysotile et $2,2 \times 10^8$ et $4,2 \times 10^8$ pour les fibres de verre. Cela indique que, non seulement le nombre total de fibres, mais également le nombre de fibres $> 5 \mu\text{m}$ de longueur étaient plus élevés dans l'échantillon de fibres de chrysotile que dans l'échantillon de fibres de verre.

Études par inoculation intrapéritonéale

Par inoculation intrapéritonéale, des taux de tumeurs élevés ont été obtenus (Tableau 7-2b). Tous les types de fibres testés ont produit des carcinomes, des mésothéliomes ou des sarcomes. Dans les études réalisées par Pott *et al.* (1976) résumées dans ce tableau, un total de 366 rats était traité avec différentes doses ; 43,4 % d'entre eux ont développé des tumeurs. Chez les animaux traités par le chrysotile ou le crocidolite, on trouve un taux global de 45,7 %. Aucune tumeur n'était observée chez les animaux non traités ou inoculés avec une solution saline.

Étude de la charge pulmonaire dans les expérimentations par inhalation

L'étude de la charge pulmonaire dans les études par inhalation est particulièrement intéressante à considérer puisque cette voie d'exposition représente actuellement le « *gold standard* » (McClellan *et al.* 1992) et que la détermination de la rétention pulmonaire en fibres est utilisée comme marqueur d'exposition dans les études épidémiologiques. Les données de la littérature montrent que la quantité de fibres présentes dans le poumon varie de 10^6 à plus de 10^8 fibres par gramme de poids sec, selon les études (Tableau 7-3). Rappelons qu'il est parfois difficile de comparer les études entre elles, car les méthodes de mesure du nombre et des dimensions ne sont pas strictement identiques. Si l'on compare l'étude de Smith *et al.* (1987) dans laquelle aucune tumeur n'était observée à celle de Hesterberg *et al.* (1993) dans laquelle quelques tumeurs sont observées dans les groupes MMVF10, 287 f/ml (5,9 % de tumeurs) et MMVF11, 51 f/ml (7,5 % de tumeurs), on constate que le nombre de fibres en rétention est plus élevé dans la seconde étude. Rappelons que, dans cette dernière étude, les fréquences de tumeurs observées ne sont toutefois pas significativement augmentées, au plan statistique, par rapport aux

contrôles (3,3 %), et le pourcentage d'animaux avec tumeur pour la dose la plus élevée de MMVF11 est de 2,7 %, ce qui révèle l'absence de relation dose-effet pour cet échantillon. On remarque cependant que la rétention en fibres dans ce dernier groupe est très dispersée, comme en témoigne l'écart-type important de cette mesure (Tableau 7-3). On peut suggérer, mais avec prudence, l'hypothèse d'une tendance vers une augmentation de potentiel tumorigène dépendant de la dose de fibres retenues dans le poumon, et constater que des doses de l'ordre de 5×10^8 f/g de poumon sec ne permettent pas de tirer des conclusions par manque de puissance statistique. Il sera aussi nécessaire de discuter ultérieurement, dans le contexte de cette hypothèse, le rôle des dimensions des fibres retenues dans le poumon.

Études réalisées avec des fibres « microfibres »

Restant dans le domaine des fibres de verre, un certain nombre d'échantillons provenant de Manville Corporation ont été testés en expérimentation animale et in vitro. Ces fibres étaient d'un diamètre dans l'ensemble plus fin que celui des autres fibres puisque le code 100 correspond à un diamètre moyen de $0,32 \mu\text{m}$ et le code 104 à $0,50 \mu\text{m}$ (Man-Made Vitreous Fibers, by the Nomenclature Committee for TIMA Inc.). Chez l'animal, sept articles ont rapporté les résultats de 7 études réalisées par inhalation (Le Bouffant *et al.* 1984, 1987 ; Smith *et al.* 1987 ; Wagner *et al.* 1984 ; Moorman *et al.* 1988 ; McConnell *et al.* 1984 ; Muhle *et al.* 1987) (Tableau 7-4). Aucun taux statistiquement significatif de tumeur n'a été observé chez le rat. Au total, un grand nombre de rats ont été exposés puisqu'un total de 515 rats a reçu différentes sortes de fibres à des concentrations allant de 576 f/ml à 104 023 f/ml. La quantité de fibres en rétention dans le poumon, après 24 mois d'exposition pouvait atteindre des valeurs élevées, jusqu'à plus de 10^{10} fibres par gramme de poumon sec (Tableau 7-4). On constate, sur ce tableau, que la fréquence de tumeurs chez le rat ne dépassait pas 2 % (aucune tumeur n'était observée chez les animaux non traités par les fibres dans ces études). On peut remarquer aussi le petit nombre de tumeurs avec les échantillons de crocidolite.

L'interprétation des résultats est difficile car les méthodes de mesure ne sont pas standardisées. La connaissance des caractéristiques dimensionnelles des fibres en rétention dans le poumon aurait pu être un élément intéressant de la discussion. On peut noter que les aérosols de fibres JM100 comportaient un pourcentage relativement proche de fibres ayant une longueur $> 5 \mu\text{m}$, quel que soit le diamètre : 96 % et 97 % dans les études de Wagner *et al.* (1984) et de Le Bouffant *et al.* (1984, 1987), respectivement. Pour Smith *et al.* (1987), on trouve 54 %, avec des limites à $5 \mu\text{m}/1 \mu\text{m}$ (longueur/diamètre) et pour Muhle *et al.* (1987) 50 %, avec des limites de $6 \mu\text{m}/0,67 \mu\text{m}$. Dans l'ensemble, les études par inhalation ont donc révélé une absence de potentiel tumorigène.

Deux études ont porté sur le singe. Goldstein *et al.* (1983, 1984) ont exposé 10 babouins à des aérosols d'environ 1 000 f/ml pendant 30 mois ; Moorman *et al.* (1988) ont fait porter leur étude sur des groupes de 12 singes *Cynomolgus* exposés pendant 18 mois à des fibres 104/475. Aucune tumeur n'était observée, ni chez les animaux exposés, ni chez les animaux contrôles. Dans ces expérimentations, les animaux étaient sacrifiés à la fin de la période d'exposition ; ainsi, le délai d'observation était vraisemblablement trop court pour que des tumeurs aient pu être observées. Goldstein *et al.* (1983, 1984) notèrent l'existence d'une fibrose péri-bronchiolaire chez les singes exposés à JM102-104 et au crocidolite. Cette dernière étude ne comportait pas d'animaux contrôles non traités.

Des instillations intratrachéales de fibres JM104 et JM100 ont été pratiquées chez le hamster et chez le rat (Tableau 7-5). On constate que des tumeurs sont observées chez le hamster, dans l'étude où la quantité de fibres administrée à chaque traitement est faible (1 mg) (Mohr *et al.* 1984). En revanche, aucune tumeur n'est observée lorsqu'une dose importante est administrée. De la même manière, chez le rat, des tumeurs sont observées après administration de 10 mg sous la forme 20 fois 0,5 mg mais pas (JM100) ou peu (crocidolite) avec 5 fois 2 mg (Tableau 7-5). La différence dans la fréquence de tumeurs selon le protocole d'administration peut être la conséquence d'une aggrégation des fibres avec de fortes concentrations, ce qui provoquerait un rejet des fibres, et est à rapprocher des résultats obtenus précédemment par Morgan *et al.* (1993b) avec des fibres marquées, indiquant que la dose de 1 mg était convenable pour l'administration intratrachéale. Il va de soi que cette remarque a une valeur relative et que l'état d'aggrégation des fibres pour une dose donnée doit varier pour différents types de fibres, en fonction de leur nature.

Ces fibres de verre ont été inoculées par voie intrapleurale et intrapéritonéale chez le rat. Le plus souvent, une augmentation de la fréquence de tumeurs était observée comparativement aux groupes non traités (Tableau 7-6a et b). En comparant toutes les études répertoriées par une analyse statistique (Achard-Ellouk & Jaurand 1994), une augmentation statistiquement significative de l'excès de tumeurs chez les animaux traités était observée. Il est difficile de connaître l'origine de ces différences en raison de la diversité des méthodes analytiques utilisées par les différents auteurs ; par exemple, les caractéristiques dimensionnelles des fibres ne sont pas données sous la même forme ; de plus, les doses inoculées et le schéma d'inoculation varient d'une étude à l'autre. Toutefois, l'analyse globale de toutes les données indique une augmentation statistiquement significative de la fréquence de tumeurs, par inoculation tant intrapleurale qu'intrapéritonéale, alors que l'inhalation donne des résultats non statistiquement significatifs.

Tableau 7-4 Études réalisées par inhalation avec des fibres de verre (Manville Corporation) chez le rat : charge pulmonaire après arrêt de l'exposition

Fibre	Exposition ^a	Dose cumulée de fibres	Tumeurs %	Charge pulmonaire par g de tissu sec	Référence
JM 100	1 436 ^e	$2,6 \times 10^6$	2	2,1 mg	Wagner <i>et al.</i> 1984 [†]
Chrysotile	3 0832 ^e	$7,0 \times 10^6$	25	0,4 mg	
JM 100	14 023 ^{d,e} [9 625] ^u	$3,6 \times 10^7$	0	15,2 mg	Le Bouffant <i>et al.</i> 1984, 1987 [†]
Chrysotile	167 938 ^e [96 271] ^u	$4,3 \times 10^8$	19	1,7 mg	
JM 100	3 000 ^a	$9,4 \times 10^6$	0	$1,9 \times 10^9$ F	Smith <i>et al.</i> 1987 [†]
Crocidolite	3 000 ^a	$9,4 \times 10^6$	5	$3,9 \times 10^8$ F	
JM 104	576 ± 473 ^a 252 (> 5 µm L)	$5,7 \times 10^5$ $2,5 \times 10^5$	0	$(3,1 \pm 1,6) \times 10^8$ F ^e $7,0 \times 10^7$ F (> 5)	Muhle <i>et al.</i> 1987 ^{††}
Crocidolite	2 011 ± 835 ^a 162 (> 5 µm L)	$2,0 \times 10^6$ $1,6 \times 10^5$	2	$(5,6 \pm 2,7) \times 10^8$ F ^e $5,6 \times 10^7$ F (> 5)	

[†] : Exposition : 24 mois

^{††} : Charge pulmonaire exprimée par poumon, exposition : 12 mois

* : ($F \times ml^{-1} \times hrs$). Une multiplication par un facteur d'environ $1,4 \times 10^4$ serait nécessaire pour convertir le nombre total de fibres inhalées par un rat (valeur calculée sur la base de 4 ml inhalés par cycle et 60 cycles par minute ; pour un rat de 500 g)

^a : Fibres totales /ml

^c : Mesure effectuée en microscopie électronique à transmission

^d : Mesure effectuée en microscopie optique

^e : Mesure effectuée en microscopie électronique à balayage

^u : Fibres « respirables », comme indiqué par l'auteur

Laine de roche

Études par inhalation et instillation intratrachéale

Le tableau 7-1b (p. 292) présente les caractéristiques des fibres utilisées par inhalation. Le tableau 7-7 résume les résultats obtenus dans les différentes expérimentations. Trois études à long terme ont été répertoriées (Le Bouffant *et al.* 1984, 1987 ; Wagner *et al.* 1984 ; McConnell *et al.* 1994). Le travail de McConnell *et al.* (1994) se rapportait à une étude multidoses : sur le plan de la fibrose, des changements de score 4 (fibrose limitée aux bronchioles terminales et aux alvéoles proximales) étaient observés avec l'échantillon de laine de roche chez les animaux exposés à la plus forte concentration (30 mg/m^3) pendant une période de 1 an et conservés pendant une durée post-exposition de 12 mois, de même que chez ceux exposés pendant 2 ans. Le score de 4 était également obtenu avec les animaux exposés au crocidolite (10 mg/m^3) pendant une durée de 10 mois (délai maximum d'exposition pour cette étude).

Tableau 7-5 Études réalisées par instillation intratrachéale avec des fibres de verre (Manville corporation)

Espèce animale	Type de fibre	Longueur des fibres	Doses*	Tumeurs		Référence
				N/T†	%	
Hamster	JM104	-	1 x 26	0/64	0	Feron <i>et al.</i> 1985
Hamster	Crocidolite	-	1 x 26	0/64	0	
Hamster	JM104	50 % > 7 µm	8 x 1	48/136	35	Mohr <i>et al.</i> 1984
Hamster	JM104	50 % > 4,2 µm	8 x 1	38/138	27	
Hamster	Crocidolite	50 % > 2,1 µm	8 x 1	18/42	13	
Hamster	TiO ₂	-	8 x 1	2/135	15	
Rat	104/475	-	20 x 0,5	5/34	15	Pott <i>et al.</i> 1987
Rat	Crocidolite	-	20 x 0,5	15/35	43	
Rat	Solution saline	-	20 x 0,3ml	0/40	0	
Rat	JM100	19 % > 10 µm	5 x 2	0/22	0	Smith <i>et al.</i> 1987
Rat	Crocidolite	3 % > 10 µm	5 x 2	2/25	8	
Rat	Contrôles	-	-	0/150	0	

* Nombre d'instillations x quantité administrée par instillation (mg)

† : Nombre d'animaux avec tumeur/Nombre d'animaux exposés

Tableau 7-6a Pourcentage de tumeurs obtenues par inoculation intrapleurale de fibres JM104 et JM100, chez le rat

Type de fibre	Dose inoculée			Tumeurs		Référence
	mg	fibres x 10 ⁻⁵	fibres [L/Ø] x 10 ^{-5†}	N/T*	%	
JM104	20	188	21 [8/0, 25]	6 M/45	13	Monchaux <i>et al.</i> 1981
Chrysotile	20	1 600	150 [8/0, 25]	1 Ca, 14 M/33	45	
Crocidolite	20	47	0,9 [8/0, 25]	21 M/39	54	
Solution saline	2 ml	-	-	0/32	0	
JM100	20	252	6,5 [10/0,2]	4 M/48	8,3	Wagner <i>et al.</i> 1984
Chrysotile	20	196	4,7 [10/0,2]	6 M/48	12,5	
Solution saline	0,2 ml	-	-	0/24	0	

Ca : carcinome, M : mésothéliome

† n [L/Ø] Nombre de fibres dont la longueur est supérieure à L µm et le diamètre inférieur à Ø µm

* Nombre d'animaux avec tumeur/Nombre d'animaux exposés

Tableau 7-6b Pourcentages de tumeurs obtenues par inoculation intrapéritonéale de fibres JM 106-104 chez le rat^o

Type de fibre	Dose inoculée (mg)	L/Ø médiane µm [†]	Tumeurs (%)	Référence
106 « coarser »	20	30/-	12 M + 1 S + 1 Ca/37 (37,8)	Pott <i>et al.</i> 1976
106 « finer »	2	10/0,2	17 M + 3 S (27,4)	
	10		36 M + 4 S + 1 Ca/77 (53,2)	
	2 x 25		47 M + 8 S/77 (71,4)	
106 « very finer »	2	3/0,4	1 M/34 (2,9)	
	10		2 M + 2 S/36 (11,0)	
	4 x 25		20 M + 3 S/32 (72)	
Chrysotile	2	-/-	4 M + 2 S/37 (16,2)	
	6,25		24 M + 3 S/35 (77,1)	
	25		21 M + 3 S + 1 Ca (80,7)	
106	10	2,2/0,47	2/39 (5,1)	Pott <i>et al.</i> 1987
104/1974	10	3,5/0,3	31/59 (52,5)	
104/475	2	3,2/0,18	8/31 (26)	
TiO ₂	5	na	2/99 (2)	
	10		0/33 (0)	
	6 x 18		6/113 (5,3)	
104/475	0,5	3,2/0,18	5/30 (17)	
Crocidolite	0,5	2,1/0,20	18/32 (55)	
Chrysotile	0,5	1,2/0,03	2/32 (6)	
Chrysotile B	1,0	0,9/0,11	27/32 (84)	
TiO ₂	10,0	na	0/32 (0)	
Solution saline	1 ml	na	2/32 (6)	

Ad : adénome, AdCa : adénocarcinome, Ca : carcinome, M : mésothéliome, S : sarcome

^o Plusieurs expériences ont pu être faites dans chaque étude : toutes les valeurs ne sont pas reportées ici. On trouvera les données complémentaires dans les articles référencés

[†] [L/Ø] c'est-à-dire 50 % des fibres ont une longueur supérieure à L (µm) et 50 % ont un diamètre inférieur à Ø (µm)
na : non applicable

Dans l'étude de Wagner *et al.* (1984), le score n'atteignait pas la valeur de 4 dans les conditions d'exposition de 1 an et de post-exposition de 12 mois, ce qui n'indiquait donc pas de potentiel fibrosant pour cet échantillon. Dans les mêmes conditions, l'exposition aux fibres de chrysotile canadien de l'UICC aboutissait à un score de 4, ne démontrant pas de signe évident de fibrose. Une légère progression (score 4,7 maximum) était observée chez les animaux exposés au chrysotile, morts spontanément dans des délais dépassant 500 jours après le début de l'exposition. Cette légère progression n'était pas observée chez les animaux exposés aux laines de roche.

Peu ou pas de tumeurs étaient observées dans ces séries et la fréquence n'était jamais supérieure, au plan statistique, à celle des animaux non exposés. Dans ces trois études, les animaux exposés aux fibres d'amiante (chrysotile ou crocidolite) développaient des tumeurs pulmonaires, et 1 mésothéliome a été détecté (Tableau 7-7). Lorsque l'on compare les concentrations en fibres de l'aérosol et les dimensions des fibres, on constate, là encore, comme cela a été discuté dans le paragraphe se rapportant aux fibres de verre, la grande différence entre les MMVF et les amiantes. Ainsi, les doses cumulées à la fin de la période d'exposition diffèrent d'un facteur d'environ 7 (pour la plus forte dose de laine de roche) entre les deux types de fibres (Tableau 7-7) pour l'étude de McConnell *et al.* (1994). De plus, le nombre de fibres de crocidolite étant mesuré par microscopie optique, le nombre réel est vraisemblablement sous-estimé. Concernant les caractéristiques dimensionnelles des fibres, on observe que la majorité des fibres de laine de roche a une longueur supérieure à 5 µm puisque les fibres WHO ($L > 5 \mu\text{m}$, $\varnothing < 3 \mu\text{m}$) représentent d'environ 80 % des fibres totales. En revanche, les fibres de crocidolite présentent moins de 30 % de fibres WHO (1 610 f/ml), ce qui indique que 70 % des fibres ont une longueur $< 5 \mu\text{m}$, l'exclusion de la catégorie WHO ne pouvant pas se faire sur la base du diamètre, de toute évidence inférieure à 3 µm. Les caractéristiques dimensionnelles des fibres de l'aérosol sont indiquées dans le tableau 7-1b. Les valeurs moyennes des dimensions confirment que les fibres de crocidolite sont beaucoup plus courtes et plus fines que les fibres LR, le crocidolite ayant des dimensions (en µm) longueur/diamètre arithmétiques moyennes, géométriques moyennes et médianes respectives de 6,1/0,31 ; 4,1/0,28 et 3,8/0,30. La différence entre les deux échantillons repose aussi sur la proportion de fibres très longues. Le classement selon la limite $> 20 \mu\text{m}$ donne respectivement environ 40 % et 5 % pour les fibres LR et crocidolite. Le nombre maximum de fibres auxquelles les animaux ont été exposés est de $8,2 \times 10^5 \text{ f} \times \text{ml}^{-1} \times \text{h}$ (de laine de roche) versus $55 \times 10^5 \text{ f} \times \text{ml}^{-1} \times \text{h}$ (crocidolite) ; pour ces doses cumulées, la rétention était respectivement pour ces 2 types de fibres, par gramme de poumon sec : $1,3 \times 10^8$ et $4,0 \times 10^8$ (fibres $> 10 \mu\text{m}$) et 4×10^7 et $5,5 \times 10^7$ (fibres $> 20 \mu\text{m}$) (Tableau 7-8). Ces résultats suggèrent que des fibres de LR potentiellement tumorigènes sont présentes dans le poumon de rat, sur la base de la longueur des fibres. Cependant, le diamètre de ces fibres dans l'aérosol est de l'ordre de 1 µm, ce qui est supérieur aux limites définies par Stanton *et al.* (1977). Les fibres de crocidolite ont un diamètre beaucoup plus fin, évalué à 0,3 µm sur la base d'une observation au microscope électronique à balayage et sont donc davantage proches des critères définis par Stanton *et al.* ($\varnothing < 0,25 \mu\text{m}$).

Une étude a porté sur le hamster, dans laquelle les fibres étaient inoculées par une série d'instillations (5 fois 2 mg) (Adachi *et al.* 1991). Aucune tumeur n'était observée sur un groupe de 20 hamsters. Ces fibres, d'une origine non précisée, étaient toutefois extrêmement longues et épaisses, d'une longueur et diamètre moyens de 296 µm et 6 µm, respectivement.

Inoculation intracavitaire

Les résultats de l'inoculation intrapleurale de fibres de roche chez le rat ont montré un faible potentiel tumorigène des échantillons testés (Tableau 7-7). Wagner *et al.* (1984) ont observé, dans des groupes de 48 rats traités avec 20 mg de fibres, avec ou sans liant, de l'ordre de 5 % de mésothéliomes. Le nombre de fibres inoculées était de l'ordre de 5×10^8 et 9×10^8 fibres, ce qui correspondait à $1,6 \times 10^8$ et $2,6 \times 10^8$ fibres d'une longueur supérieure à 5 μm . Dans cette même étude, une quantité d'environ 2×10^{10} fibres de chrysotile provoquait 6 mésothéliomes. Bien que des comparaisons entre laine de roche et amiante doivent être faites avec une extrême prudence en raison des différences entre les deux types de fibres (chimie, distribution de taille...), comme cela a déjà été mentionné, on constate que, sur la base du nombre de fibres, un rapport de l'ordre de 1 à 100 existe entre les deux types de fibres.

Les études par inoculation intrapéritonéale ont montré la survenue d'un pourcentage élevé de tumeurs (Tableau 7-7).

En résumé, les fibres de laine de roche ont été essentiellement testées chez le rat. Un potentiel fibrosant a été montré avec un échantillon par inhalation ; un potentiel tumorigène n'a pu être détecté par inhalation. Les études par instillations intratrachéales sont insuffisantes et ne permettent pas de tirer des conclusions. En revanche, un taux élevé de tumeurs a été obtenu lorsque les fibres étaient administrées par voie intracavitaire.

Laine de laitier

Études par inhalation et installation intratrachéale

Trois études ont été répertoriées : deux réalisées chez le rat (Smith *et al.* 1987 ; McConnell *et al.* 1994), une chez le hamster (Smith *et al.* 1987) (Tableau 7-9). Les conclusions sont voisines de celles obtenues avec les laines de roche. Dans une étude par inhalation réalisée chez le rat et le hamster, l'échantillon comportait des fibres assez épaisses (voir Tableau 7-1b) et la longueur géométrique moyenne était de 22 μm (Smith *et al.* 1987). L'absence d'effets est difficile à interpréter en l'absence de la connaissance du nombre de fibres pouvant entrer en contact avec les cellules pulmonaires car une partie des fibres inhalées ne pouvait pas pénétrer dans le poumon, en raison de leurs dimensions. Selon Vu *et al.* (1996), chez le rat, les fibres « alvéolaires » ont un diamètre aérodynamique moyen inférieur à 3 μm , ce qui représente un diamètre réel d'environ 1 μm . Pour McConnell (1994), ces fibres ont un diamètre réel < 1,5 μm (et une longueur < 80 μm). Les données sur la rétention des fibres ont indiqué que le nombre de fibres de LL retenues dans le poumon était plus petit que le nombre de fibres LR (Tableau 7-8). Le diamètre des fibres LL retenues dans le poumon était assez proche de celui des LR, mais la longueur moyenne était un peu plus élevée, de l'ordre de 10 μm contre 15 μm pour LR.

Tableau 7-7 Expérimentations effectuées avec des fibres de laine de roche (LR) chez le rat

Voie d'exposition	Contrôle	LR	Amiante	Référence
Inhalation	Aucune	LR ^d	Chrysotile ^d	Le Bouffant <i>et al.</i> 1984, 1987
Tumeurs ^D (%)	0/47 (0)	0/47 (0)	9/47 (19)	
Dose f/ml (mg/m ³)		41 (28)	167 938 (15)	
Dose cumulée × 10 ⁻⁵				
Fibres totales	-	1,1	4 400	
Fibres > 10 µmL	-	0,66	216	
Inhalation	Aucune	LR ^c	Chrysotile ^c	Wagner <i>et al.</i> 1984
Tumeurs ^D	0/48 (0)	2 Ad/48 (4)	1 Ad, 11 AdCa/48 (25)	
Dose f/ml (mg/m ³)	-	240	3 832	
Dose cumulée × 10 ⁻⁵				
Fibres totales	-	4,4	69,7	
Fibres > [10/0,2]	-	0,09	1,7	
Inhalation	Aucune	MMVF21	Crocidolite	McConnell <i>et al.</i> 1994
Tumeurs ^D (%)	2 Ad/126 (1,6)	4 Ad, 1 Ca/114 (4,4)	10 Ad, 5 Ca, 1 M/106 (14)	
Dose f/ml (mg/m ³)	-	44 ^a (3,1)	4 214 ^a	
Dose cumulée × 10 ⁻⁵				
Fibres totales	-	1,4	55	
Fibres > 10 µmL	-	0,8	8,9	
Tumeurs ^D (%)		2 Ad, 1 Ca/115 (2,6)		
Dose f/ml (mg/m ³)		264 ^a (30,4)		
Dose cumulée × 10 ⁻⁵				
Fibres totales		8,2		
Fibres > 10 µm		2,8		

Tableau 7-7 (suite)

Voie d'exposition	Contrôle	LR		Amiante	Référence
Intrapleurale (rats)	Saline	LR + °	LR – °	Chrysotile	
Tumeurs ^D (%)	0/24 (0)	3 M/48 (6,2)	2 M/48 (4,2)	6 M/48 (12,5)	Wagner <i>et al.</i> 1984
Dose	0,5 ml	20 mg	20 mg	20 mg	
Dose cumulée x 10 ⁻⁸	-	5,3	8,6	-	
Dimension des fibres [5/tout d]*	-	1,6	2,6	196	
[5/1]*	-	0,6	1,4	-	
Intrapéritonéale (rats)					
Tumeurs ^D (%)	5/256 (1,9)	125/349 (35,8)		86/166 (51,8)	Pott <i>et al.</i> 1984, 1989

Dose cumulée : Nombre de fibres x ml⁻¹ x h

^a Nombre de fibres [L > µm / Ø < µm]

[°] + liant ; – liant

^a Microscopie optique

[°] Mesure effectuée en microscopie électronique à transmission

^a Mesure effectuée en microscopie optique

^D Nombre d'animaux avec tumeur/nombre d'animaux exposés

Tableau 7-8 Dose cumulée d'exposition et rétention des fibres dans les poumons de rats exposés, par inhalation, à des échantillons LR, LL

Type de fibre	LR	LL	Amiante	Référence
	LR		Chrysotile	
<i>Dose cumulée à la fin de l'exposition** x 10⁵</i>				
Nb fibres totales	1,1	-	44 400	Le Bouffant <i>et al.</i> 1987
Nb fibres > 10 µmL	0,66	-	216	
<i>Nb fibres/g poumon sec x 10⁻⁸</i>				
Fibres totales	0,54		177	
		LL	Crocidolite	
<i>Dose cumulée à la fin de l'exposition** x 10⁻⁵</i>				
Nb fibres totales	-	6,2	94	Smith <i>et al.</i> 1987
Nb fibres > 10 µmL		4,3	2,8	
<i>Nb fibres/g poumon sec x 10⁻⁸</i>				
Fibres totales	-		3,9	
	MMVF21	MMVF22	Crocidolite	
Sacrifice/exposition*	104/104	104/104	44/44	McConnell <i>et al.</i> 1994
LGM/DGM	15,4/0,90 ^a	13,2/0,84 ^a	4,1/0,28 ^b	
<i>Dose cumulée à la fin de l'exposition** x 10⁻⁵</i>				
Nb fibres totales	8,2	7,6	55	
Nb fibres > 10 µmL	3,5	5,1	8,9	
Nb fibres > 20 µmL	3,5	3,1	3,1	
<i>Nb fibres/g poumon sec x 10⁻⁸</i>				
Fibres totales	2,4	1,8	12,5	
Fibres > 10 µmL	1,3	0,6	4,0	
Fibres > 20 µmL	0,4	0,1	0,55	
<i>Dose cumulée à la fin de l'exposition** x 10⁻⁵</i>				
Nb fibres totales	5,8	4,9	-	
Nb fibres > 10 µmL	2,3	3,0	-	
Nb fibres > 20 µmL	2,3	1,5	-	
<i>Nb fibres/g poumon sec x 10⁻⁸</i>				
Fibres totales	2,2	0,97	-	
Fibres > 10 µmL	1,1	0,30	-	
Fibres > 20 µmL	0,26	0,04	-	
<i>Dose cumulée à la fin de l'exposition** x 10⁻⁵</i>				
Nb fibres totales	1,4	1,0	-	
Nb fibres > 10 µmL	0,8	0,62	-	
Nb fibres > 20 µmL	0,4	0,30	-	
<i>Nb fibres/g poumon sec x 10⁻⁸</i>				
Fibres totales	0,56	0,44	-	
Fibres > 10 µmL	0,30	0,14	-	
Fibres > 20 µmL	0,09	0,02	-	

* Délai depuis le début de l'exposition/durée d'exposition (en semaines)

** Fibres x ml⁻¹ x h. Il faudrait multiplier cette valeur par le volume total d'air inhalé par le rat par heure pour connaître la valeur de la quantité de fibres pouvant théoriquement être déposée dans le poumonLGM/DGM : Longueur/diamètre géométrique moyen (valeurs pour 16 mg/m³, LR et LL)^a : Longueur ; microscopie optique ; diamètre ; microscopie électronique à balayage^b : Longueur et diamètre ; microscopie électronique à balayage

A partir de ces résultats, on peut considérer que des valeurs de rétention, en fin d'exposition, de l'ordre de $2,5 \times 10^8$ fibres totales/g de poumon sec ne permettent pas de mettre en évidence, le cas échéant, un potentiel tumorigène, par inhalation. Pour un poumon total, on peut considérer très approximativement (selon le degré de fibrose) que son poids est de 1,5 g en moyenne, soit une quantité totale par poumon de l'ordre de $3,7 \times 10^8$ fibres. Parallèlement, la quantité de fibres ayant une longueur supérieure à $10 \mu\text{m}$ serait environ de 10^8 .

Un facteur important qui peut influencer la réponse biologique concerne le nombre de particules non fibreuses présentes dans un échantillon. Ces données ne sont pas toujours fournies dans la littérature. Dans le travail de McConnell *et al.* (1994), la proportion de particules non fibreuses était élevée (NF/F = 28) ; un rapport similaire était déterminé dans l'échantillon utilisé par Smith *et al.* (1987). L'échantillon de LR dont les effets ont été décrits ci-dessus possédait aussi une certaine proportion, quoique moindre, de particules non fibreuses (NF/F = 0,7).

Études réalisées par inoculation intracavitaire

A notre connaissance, une seule étude utilisant l'inoculation intrapleurale a été effectuée (Wagner *et al.* 1984) ; aucune tumeur n'a été observée après inoculation de LL, avec ou sans résine, avec des doses de 20 mg ($3,6 \times 10^8$ et $6,5 \times 10^8$ fibres respectivement) (Tableau 7-9). Chaque série comprenait un groupe de 48 rats. Par inoculation intrapéritonéale, Pott *et al.* (1987) ont observé 2 rats présentant des tumeurs sur 41 animaux inoculés avec 5 mg de LL. Dans cette étude, les animaux contrôles étaient inoculés avec 5 mg de TiO_2 . Aucune tumeur n'est survenue chez 50 animaux.

En résumé, les données obtenues avec les fibres de laine de laitier ne permettent pas de conclure sur le potentiel toxique de ces fibres car les études ont une faible puissance et/ou sont peu valides, essentiellement en raison des restrictions mentionnées sur la qualité des échantillons de fibres utilisés.

Filaments de verre

Deux études anciennes ont rapporté les résultats obtenus par administration de filaments de verre. Le travail de Stanton *et al.* (1981) mentionné ci-dessus faisait état de l'utilisation de 2 échantillons (G-21 et G-22) pour lesquels aucune augmentation du taux de tumeur n'était observée chez le rat. Toutefois, il s'agissait de fibres épaisses dont le diamètre ne correspondait pas aux critères de potentiel tumorigène définis dans cet article (diamètre $> 1,5 \mu\text{m}$). Dans l'étude de Pott *et al.* (1987) où les fibres étaient administrées par voie intrapéritonéale, des résultats similaires étaient obtenus. Là encore, il s'agissait de fibres épaisses (plus de 50 % $> 3 \mu\text{m}$ de diamètre). Les doses administrées dans cette dernière étude allaient de 10 à 250 mg.

Tableau 7-9 Expérimentations effectuées avec des fibres laines de laitier (LL) chez des hamsters et des rats : quantité de fibres (dose cumulée d'exposition) et pourcentage de tumeurs

Voie d'exposition (espèces animales)	Contrôle	LL	Amiante	Référence
Inhalation (hamsters)				
Tumeurs ^D (%)	1/170 (0,6)	0/69 (0)	Crocidolite 0/70 (0)	Smith <i>et al.</i> 1987
Dose cumulée x 10 ⁻⁵				
Fibres totales		6,2	9,4	
Inhalation (rats)				
Tumeurs ^D (%)	0/184 (0)	0/55 (0)	Crocidolite 2 + 1 M/60 (5)	Smith <i>et al.</i> 1987
Dose f/ml (mg/m³)		200 (10)	3 000 (7)	
Dose cumulée x 10 ⁻⁵				
Fibres totales		6,2	94	
Fibres > 5 µmL		5,9	6,5	
Inhalation (rats)				
Tumeurs ^D (%)	2 Ad/126 (1,6)	1 Ad, 1 Ca/116 (1,7)	Crocidolite 10 Ad, 5 Ca, 1 M/106 (14)	McConnell <i>et al.</i> 1994
Dose f/ml (mg/m³)		33 (3,1)	4 214 (10)	
Dose cumulée x 10 ⁻⁵				
Fibres totales		1,02	55	
Fibres > 10 µmL		0,62	8,9	
Inhalation (rats)				
Tumeurs ^D (%)		0 (0)		
Dose f/ml (mg/m³)		158 (16,1)		
Dose cumulée x 10 ⁻⁵				
Fibres totales		4,9		
Fibres > 10 µmL		3,0		

Tableau 7-9 (suite)

Voie d'exposition (espèces animales)	Contrôle	LL			Amiante			Référence
Inhalation (rats)					Crocidolite			
Tumeurs ^D (%)		2 Ad, 1 Ca/115 (2,6)						Mc Connell <i>et al.</i> 1994
Dose f/ml (mg/m ³)		245 (29,9)						
Dose cumulée x 10 ⁻⁵								
Fibres totales		7,6						
Fibres > 10 µmL		5,1						
Intrapleurale (rats)	Saline	LL +	LL –		Chrysotile			
Tumeurs ^D (%)	0/24 (0)	0/48 (0)	0/48 (0)		6 M/48			
Dose	0,5 ml	20 mg	20 mg		20 mg			Wagner <i>et al.</i> 1984
Dose cumulée x 10 ⁻⁸								
Total des fibres	-	3,6	6,5		196			
Dimension des fibres [5/1]*	-	0,36	0,52		nd			
Intrapéritonéale (rats)					Chrysotile			
Tumeurs ^D	0/48	2/41	6/99	2/96	9/44	26/44	35/44	Pott <i>et al.</i> 1984, 1987
(%)	(0)	(5)	(6)	(2)	(21)	(59)	(80)	
Dose	2 x 2 ml	5 mg	40 mg	40 mg	0,4 mg	2 mg	10 mg	

Légende : voir Tableau 7-2

* : nombre de fibres [L > µm/Ø < µm]

nd : non déterminé

Pathologies résultant d'études expérimentales in vivo avec des fibres de céramique

Études réalisées par inhalation

Des études par inhalation ont été pratiquées chez le rat et chez le hamster. Certains échantillons ont révélé un potentiel fibrosant et tumorigène, d'autres pas. De plus, des différences importantes de réponse ont été observées entre les différentes espèces pour un échantillon (RCF1).

Le tableau 7-1c (p. 294) résume les caractéristiques des échantillons utilisés Fybex, Saffil[®], kaolin, high purity, zirconia, after service (correspondant à l'échantillon kaolin chauffé à 2 400 °F pendant 24 h) pigmentary potassium titanate, fiberfrax carborundum. La composition chimique de ces fibres est reportée dans le tableau 7-10. Il est difficile de résumer en quelques mots les caractéristiques des fibres. Schématiquement, on peut dire que, sur le plan des dimensions, les fibres employées avaient une longueur moyenne de l'ordre de 10 à 20 µm et un diamètre aux environs de 1 µm, sauf PKT et Fybex, beaucoup plus fins que les autres fibres, et Fiberfrax au contraire, plus épais.

Un potentiel fibrosant a été observé chez les animaux exposés aux fibres de céramique. Lemaire *et al.* (1989) avaient montré que les fibres Fiberfrax en instillation intratrachéale (1 mg par rat) produisaient une réaction granulomateuse et l'apparition d'une fibrose précoce 1 mois après instillation. Dans les mêmes conditions, le chrysotile induisait des lésions de fibrose plus sévères. McConnell *et al.* (1995) ont observé des changements cellulaires pulmonaires et une fibrose minimale de grade 4 (voir Annexe, p. 381) après 6 mois d'exposition par inhalation à l'échantillon RCF-1, sans progression jusqu'au terme de 18 mois. Le chrysotile produisait également des anomalies de grade 4, mais après 3 mois d'exposition, et une progression était observée au-delà, jusqu'au grade 5 après 18 mois d'exposition. Ces différences peuvent être dues au type de fibres mais aussi à la différence de dose d'exposition, plus élevée pour le chrysotile que pour RCF-1. De manière similaire, Mast *et al.* (1995a et b) ont observé une fibrose de grade 4 chez le rat exposé aux échantillons RCF-1, RCF-2, RCF-3 et RCF-4 après 12 mois d'exposition. Une fibrose interstitielle était détectée dès 3 mois d'exposition, sauf avec l'échantillon RCF-4 pour lequel il fallait attendre 12 mois. Après 24 mois d'exposition, les lésions avaient peu ou pas progressé ; une progression était observée lorsque les animaux exposés 24 mois étaient maintenus pour une période de 6 mois sans exposition. Ainsi, à 30 mois, les scores étaient de 4,3, 4,2, 4,6 et 4,3 pour les quatre échantillons RCF. Un score de 4 était obtenu avec le chrysotile au

Tableau 7-10 Composition chimique des échantillons de fibres de céramique utilisés dans les différentes études

Dénomination de la fibre	Oxydes (% en poids)														Références
	SiO ₂	Fe ₂ O ₃	CaO	MgO	Al ₂ O ₃	V ₂ O ₅	MoO ₃	Cr ₂ O ₃	Na ₂ O	TiO ₂	ZrO ₂	K ₂ O	B ₂ O ₃	P ₂ O ₅	
Kaolin (RCF 1)	47,7	0,97	0,07	0,08	48,0	0,05	0,02	0,03	0,54	2,05	0,11	0,16	0,01	0,105	Mast <i>et al.</i> 1995b
High purity (RCF 3)	50,8	0,16	0,04	< 0,01	48,5	-	-	-	0,19	0,02	0,23	< 0,01	-	-	Mast <i>et al.</i> 1995a
Zirconia (RCF 2)	50,0	< 0,05	0,05	0,01	35,0	-	-	-	< 0,30	0,04	15,0	< 0,01	-	-	Mast <i>et al.</i> 1995a
Kaolin after service (RCF4)	47,7	0,97	0,07	0,08	48,0	-	-	-	0,54	2,05	0,11	0,16	-	-	Mast <i>et al.</i> 1995a
Kaolin (RCF 1)*	47,7	0,97	0,07	0,98	48,0	-	-	-	0,54	2,05	0,11	0,16	-	-	Mast <i>et al.</i> 1995a
Kaolin (RCF 1)	47,7	0,97	0,07	0,08	48,0	0,05	0,02	0,03	0,54	2,05	0,11	0,16	0,01	0,105	McConnell <i>et al.</i> 1995

* Les pourcentages donnés pour les RCF 1 sont différents dans les 2 références Mast *et al.* 1995a et b

délai maximum pour lequel il y a des données (15 mois). Ces résultats confirmaient les observations préalables de Smith *et al.* (1987) chez le rat puisque 22 % des animaux exposés présentaient des signes de fibrose (grade non précisé) contre 10 % et 14 % chez les hamsters contrôles, respectivement en chambre et air propre ou non manipulés. En revanche, seulement 1 % des hamsters exposés présentaient une fibrose, la fréquence était de 7 % et 3 % chez les hamsters contrôles.

Chez le rat, après inhalation, les fibres de céramique ont produit des tumeurs pulmonaires (Lee *et al.* 1981 ; Davis *et al.* 1984 ; Mast *et al.* 1995 a et b) et des mésothéliomes (Tableau 7-11). Le taux le plus élevé de tumeurs était obtenu dans la série rapportée par Mast *et al.* (1995 a et b). Dans ces études, les fréquences les plus élevées de tumeurs étaient observées avec les échantillons RCF-1 et RCF-3 et approchaient celle obtenue après exposition aux fibres de chrysotile. Pour l'échantillon RCF-1, une augmentation statistiquement significative de la fréquence des tumeurs n'étaient atteinte qu'avec la dose la plus élevée. Nous devons faire remarquer que les aérosols de fibres de céramique comportent une certaine proportion de particules non fibreuses et, dans tous les cas où cela a été mesuré, la concentration en ces particules excède la concentration en fibres de céramique (voir Tableau 7-1c). Dans l'étude de Mast *et al.* 1995a et b, le rapport du nombre de particules non fibreuses à celui des fibres peut atteindre 2,5. Dans l'étude de Davis *et al.* (1984), il est de 4. Étant donné que les particules non fibreuses ont une dimension qui les rend phagocytiques par les macrophages, puisque la majorité a une dimension inférieure à 3 µm, on peut se demander si ces particules modifient les mécanismes de clairance passant par des processus physiques ou/et la réaction inflammatoire qui se développe localement.

D'après les études expérimentales réalisées chez le rat et chez le hamster, cette dernière espèce semble plus sensible que le rat pour développer des mésothéliomes après exposition à des fibres de céramique. Toutefois, il est vraisemblable que le type d'échantillon joue un rôle important. On cite souvent, pour illustrer la grande sensibilité du hamster, une étude de McConnell *et al.* (1995) dans laquelle un taux de 41 % de mésothéliomes était observé après exposition à une dose de 256 f/ml de RCF-1 (6 h/jour, 5 jours/semaine pendant 18 mois) (Tableau 7-12). Cependant, Smith *et al.* (1987), utilisant des concentrations comparables (200 f/ml) et une durée d'exposition plus longue (24 mois) n'ont observé qu'un seul mésothéliome dans un groupe de 70 hamsters. En parallèle, aucune tumeur pulmonaire ou pleurale n'était observée chez le rat, dans cette étude. Ce travail est à rapprocher d'une autre étude où les auteurs ont utilisé des fibres PKT (1 expérience) et Fybex (4 expériences) (Lee *et al.* 1981). Sur trois groupes de 12 à 18 hamsters exposés au Fybex, un seul mésothéliome était observé dans chaque groupe, ce qui représente une fréquence de 6 et 8 %. Chez le rat, aucun mésothéliome n'était observé et le nombre de tumeurs pulmonaires était de 0 (1 groupe), 1 (2 groupes) et 3 (1 groupe) (Tableau 7-11). Ainsi, on ne peut affirmer aujourd'hui que le

Tableau 7-11 Expérimentations effectuées avec des fibres de céramiques, chez le rat, par inhalation

Type de fibres	Tumeurs ^D	p°	(%)	Aérosol		Dose cumulée ^A (Nombre de fibres) × 10 ⁻⁵				Référence
				f/ml*	p/ml†	Total	L > 5 µm	L > 10 µm	Ø < 0,5 µm	
Contrôle	0/39	-	(0)	-	-	-	-	-	-	Davis <i>et al.</i> 1984
Céramique	1 Ad, 3 Ca/48	ns	(8,3)	95	380	1,5	1,47	0,44	-	
Chrysotile	15/48	< 10 ⁻⁴	(31)	500	-	7,8	-	-	-	
Crocidolite	1/48	ns	(2)	500	-	7,8	-	-	-	
Contrôle	0/42	-	(0)	-	-	-	-	-	-	Lee <i>et al.</i> 1981
PKT	0/20	ns	(0)	6 530	-	35	-	1,9	-	
Fybex	0/21	ns	(0)	6 720	-	36	20,5	3,9	-	
Fybex	1 Ad/21	ns	(4,8)	8 530	-	46	26,3	5,9	-	
Fybex	2 Ad, 1 AdCa/25	< 0,05	(12)	36 100	-	195	111,3	21,6	-	
Fybex	1 Ca/19	ns	(5,3)	101 500	-	548	312,9	99	-	
Amosite	2 Ad, 1 Ca/16	< 0,02	(18,8)	13 250	-	72	-	5,9	-	
Contrôle	1 Ad/129	-	(0,77)	-	-	-	-	-	-	Mast <i>et al.</i> 1995b
RCF 1	2 Ad/123	ns	(1,6)	36	69	1,12	0,92	0,67	0,30	
RCF 1	4 Ad, 1 Ca, 1 M/127	ns	(4,7)	91	184	2,8	2,64	2,0	0,79	
RCF 1	1 Ad, 1 Ca/124	ns	(1,6)	162	215	5,05	4,32	3,05	1,34	
RCF 1	8 Ad, 8 Ca, 2 M/123	< 10 ⁻⁴	(14,6)	234	387	7,3	6,30	4,9	1,89	

Tableau 7-11 (suite)

Type de fibres	Tumeurs ^D	p°	(%)	Aérosol		Dose cumulée ^Δ (Nombre de fibres) × 10 ⁻⁵				Référence
				f/ml*	p/ml†	Total	L > 5 µm	L > 10 µm	Ø < 0,5 µm	
RCF 2	4 Ad, 5 Ca, 3 M/121	< 10 ⁻³	(9,9)	268	398	8,4	6,7	4,7	1,8	Mast <i>et al.</i> 1995a
RCF 3	10 Ad, 9 Ca, 2 M/121	< 10 ⁻⁴	(17,3)	213	537	6,6	6,1	4,7	1,7	
RCF 4	2 Ad, 2 Ca, 1 M/118	ns	(4,2)	206	258	6,4	5,1	2,9	0,38	
Chrysotile	7 Ad, 6 Ca, 1 M/69	< 0,015	(20,2)	102 000	-	3 182	395	124	3 151	
Contrôle	0/34	-	(0)	-	-	-	-	-	-	Pigott <i>et al.</i> 1981
Saffil	0/32	ns	(0)	-	-	-	-	-	-	
Chrysotile	5 Ad, 1 AdCa, 3 Ca/38	< 0,03	(23)	-	-	-	-	-	-	
Contrôle	0/184	-	(0)	-	-	-	-	-	-	Smith <i>et al.</i> 1987
Fiberfrax	0/70	ns	(0)	200	6 600	6,2	6,0	5,1	0,95	
Crocidolite	2 tumeurs, 1 M/60	< 0,015	(5)	3 000	-	94	6,5	2,8	-	

^D Nombre d'animaux avec tumeur/Nombre d'animaux exposés

° Seuil de probabilité, sur la base d'un test exact de Fisher, comparativement au contrôle ; ns : non significatif

* Nombre total de fibres/ml

† Nombre de particules/ml

^Δ F × ml⁻¹ × h pour une exposition de 24 mois

Ad : adénome ; AdCa : adénocarcinome ; Ca : carcinome ; M : mésothéliome

L, Ø : longueur, diamètre

Tableau 7-12 Nombre de tumeurs obtenues chez le hamster exposé, par inhalation, à des fibres de céramique

Type de fibres	Dose cumulée (Nb x ml ⁻¹ x h) x 10 ⁻⁵ (durée maximale d'exposition)			Dimensions (µm) fibres aérosol		Nombre d'animaux avec tumeur		Nb total	Référence
	Fibres totales	> 10 µm L	non fibreuses	L	Ø	TP	Tpl		
PKT	35	1,9	nd	4,2 ^a	0,2	0	0	13	Lee <i>et al.</i> 1981
Fybex	36	3,9	nd	6,7 ^a	0,2	0	0	18	"
"	46	5,9	nd	"	"	0	1 M	12	"
"	195	21,6	nd	"	"	0	1 M	13	"
"	548	99	nd	"	"	1 Ad	1 M	16	"
Fiberfrax®	6,2	5,10	200	25 ^b	1,8 ^c	0	1 M	70	Smith <i>et al.</i> 1987
RCF 1	3,9	2,79	7,56	15,9 ^b	0,78 ^c	0	42 M	102	McConnell <i>et al.</i> 1995

^a : moyenne

^b : moyenne géométrique

^c : médiane

nd : non déterminé

Ad : Adénome ; M : mésothéliome

L, Ø : Longueur, diamètre

Tp : Tumeur pulmonaire ; Tpl : tumeur pleurale

Nb tot : Nombre d'animaux exposés

hamster développe une fréquence élevée de mésothéliomes, suite à une exposition aux fibres de céramique. En revanche, on peut remarquer que l'échantillon RCF-1 a provoqué un taux élevé de mésothéliomes (41 %) sans tumeur pulmonaire chez le hamster, alors que le rat exposé au même type de fibres développait une faible fréquence de mésothéliomes, au maximum dans 1,6 % des cas, et une fréquence statistiquement significative de cancers du poumon (Tableau 7-13). De plus, on relève que dans les autres études portant sur le hamster, un mésothéliome était détecté dans 4 groupes d'exposition sur 6, alors qu'aucun mésothéliome n'était observé chez les animaux non traités, ce qui peut suggérer une tendance au développement de mésothéliome, bien que cela n'apparaisse pas sur le plan statistique. L'hypothèse d'une plus grande sensibilité du hamster, comparativement au rat, reste donc à démontrer et les données ne permettent pas une généralisation à tous les types de fibres. Les raisons expliquant, d'une part, le taux élevé de mésothéliomes dans l'étude de McConnell *et al.* (1995), d'autre part, les différences entre les localisations tumorales poumon/plèvre chez le hamster et le rat sont difficiles à interpréter. Les résultats obtenus par McConnell *et al.* (1995) chez le hamster, ne résultent pas de différences de doses cumulées maximales, à la fin de l'exposition, puisqu'une dose voisine de fibres RCF-1 a été administrée aux rats ($5 \times 10^5 \text{ f} \times \text{ml}^{-1} \times \text{h}$) sans que des mésothéliomes soient détectés (Tableau 7-11) et un petit nombre de mésothéliomes est obtenu avec une dose plus élevée ($7,3 \times 10^5 \text{ f} \times \text{ml}^{-1} \times \text{h}$). Il est possible que l'aptitude des fibres à migrer vers la plèvre soit plus facile chez le hamster que chez le rat. Everitt *et al.* (1994), dans une étude comparative sur les lésions pleurales chez le hamster et le rat après instillation intrapleurale transthoracique, ont constaté que les hamsters développaient une plus grande prolifération mésothéliale de la partie basale de la plèvre viscérale dans les zones d'épaississement pleural. Les auteurs suggèrent l'hypothèse d'une réponse proliférative plus intense de la plèvre de hamster comme étant un paramètre à prendre en considération pour l'oncogénèse ; ils notent également qu'il est très difficile de comparer les effets des fibres entre elles car chaque échantillon contient une distribution de taille unique, avec de plus des teneurs en particules non fibreuses différentes. Si l'on compare les études de Smith *et al.* (1987) et McConnell *et al.* (1995) pour lesquelles les concentrations en fibres de l'aérosol étaient voisines, les dimensions des fibres étaient un peu différentes (Tableau 7-1c), les fibres utilisées dans la première étude étaient plus épaisses que celles utilisées dans la seconde (médiane des diamètres : $1,8 \mu\text{m}$ versus $0,79 \mu\text{m}$), ce qui pourrait justifier des différences de fréquence de mésothéliomes observées dans les 2 études puisque la pénétration des fibres contenues dans le second échantillon aura été plus facile, comparativement au premier. Les différences de rétention des deux échantillons peuvent appuyer cette hypothèse (voir ci-dessous).

Lorsque l'on compare les conditions expérimentales réalisées avec un échantillon donné, RCF-1, chez le hamster et chez le rat, en exposition par inhalation, on peut souligner quelques différences. La dose cumulée maximale à laquelle les animaux ont été exposés est différente entre les 2 espèces, plus

Tableau 7-13 Comparaison de la fréquence de tumeurs obtenues, chez le rat et chez le hamster, après exposition à des fibres de céramique

Échantillon	Pourcentage et type de tumeurs				Dose cumulée x 10 ⁻⁵ F x ml ⁻¹ x h	Référence
	Rat		Hamster			
	poumon	plèvre	poumon	plèvre		
PKT	0	0	0	0	35	Lee <i>et al.</i> 1981
Fybex	0	0	0	0	36	Lee <i>et al.</i> 1981
Fybex	4,8 (1 Ad)	0	0	8 (1 M)	46	"
Fybex	12 (1 Ad,1 AdCa)	0	0	7,7 (1 M)	195	"
Fybex	5,3 (1 Ca)	0	6,2 (1 Ad)	6,2 (1 M)	548	"
Fiberfrax®	0	0	0	1 (1 M)	6,2	Smith <i>et al.</i> 1987
RCF-1	1,6 (2 Ad)	0	-	-	1,1	Mast <i>et al.</i> 1995b
RCF-1	3,9 (4 Ad, 1 Ca)	0,8 (1 M)	-	-	2,8	"
RCF-1	1,6 (1 Ad,1 Ca)	0	-	-	5,0	"
RCF-1	13 (8 Ad,8 Ca)	1,6 (2 M)	-	-	7,3	"
RCF-1	-	-	0	41 (42 M)	4,0	McConnell <i>et al.</i> 1995

Ad : adénome ; M : mésothéliome ; AdCa : adénocarcinome ; Ca : carcinome

faible chez le hamster que chez le rat (Tableau 7-12 et 7-13), respectivement $3,9 \times 10^5$ et $7,3 \times 10^5 \text{ f} \times \text{ml}^{-1} \times \text{h}$. Il est à noter que la différence dans la quantité de fibres qui peut théoriquement être déposée dans le poumon de chaque espèce animale n'est pas nécessairement proportionnelle à ces valeurs car elle dépend de la quantité d'air inhalée, elle-même fonction de la capacité vitale des animaux. Les différences de doses maximales d'exposition calculées viennent de la durée maximum d'exposition, respectivement de 18 mois et 24 mois chez le hamster et le rat ; parallèlement, les durées maximum de survie des animaux étaient de 80 semaines et 130 semaines. En conséquence, la quantité maximale de fibres en rétention dans le poumon est plus faible chez le hamster que chez le rat ($2,4 \times 10^8 \text{ f/g}$ vs $3,7 \times 10^8 \text{ f/g}$) (Tableau 7-14). Des quantités de fibres en rétention dans le poumon de rat, proches de celles

Tableau 7-14 Résumé des données obtenues chez le rat et le hamster, avec le même échantillon de fibres de céramique et la même méthode d'exposition

Paramètre	Études RCF-1*		Études Fiberfrax**	
	Rat	Hamster	Rat	Hamster
Aérosol				
mg/m ³	29	16,5	12	12
fibres/ml	234	162	200	200
non fibres/ml	387	215	6 600	6 600
Dose cumulée ($\text{f} \times \text{ml}^{-1} \times \text{h} \times 10^{-5}$)				
fibres totales	7,3	5,0	6,2	6,2
fibres > 5 µmL	6,3	4,3	6,1	6,1
fibres ≤ 0,5 µm Ø	1,9	1,3	0,9	0,9
non fibreux	12,1	6,7	200	200
Rétention (f/g poumon sec × 10⁸)				
fibres totales	3,7	2,7	0,22	0,086
fibres > 5 µmL	2,7	2,2	-	-
fibres ≤ 0,5 µm Ø	1,6	1,1	-	-
Dimensions (µm)				
LGM	7,28	8,6	-	-
DGM	0,44	0,58	-	-
Tumeurs (%)				
<i>Animaux traités</i>				
pulmonaires	8 Ad/8 Ca (13)	0 (0)	0	0
pleurales	2 M (1,6)	42 (M) (41)	0	1 M (1,4)
<i>Animaux contrôles</i>				
	1 Ad (0,77)	0 (0)	0	0

Ad : adénome, Ca : carcinome, M : mésothéliome

DGM, LGM : diamètre géométrique moyen, longueur géométrique moyenne

* Mast *et al.* 1995b ; McConnell *et al.* 1995

** Smith *et al.* 1987

déterminées chez le hamster ($2,4 \times 10^8$ f/g de poumon sec) sont observées après exposition à une concentration de 16 mg/m^3 : $2,6 \times 10^8$ et $2,7 \times 10^8$ f/g de poumon sec respectivement pour des durées d'exposition de 18 ou 24 mois. Pour cette dose d'exposition, 1 seul carcinome est observé chez le rat (exposition 24 mois), non observé dans les séries non traitées. Cela indique que chez le rat, sur la base de cette expérience, il n'a pas été mis en évidence un excès statistiquement significatif de cancers du poumon : seule l'étude dose-effet employant une dose de 30 mg/m^3 a permis de détecter un excès statistiquement significatif de cancers du poumon.

Les commentaires faits ci-dessus appellent quelques remarques complémentaires concernant les études de rétention pulmonaire. Lorsque l'on regarde la teneur du poumon en fibres, après exposition, afin de comparer ces valeurs aux taux de tumeurs obtenues, dans les études à long terme, on peut tenir compte de la dose à la fin de l'exposition, mais aussi prendre en considération d'autres données. Dans les différents travaux expérimentaux, plusieurs situations sont rencontrées :

- le sacrifice des animaux a lieu immédiatement après la fin de l'exposition. Celles-ci sont de durées variables : 3, 6, 12, 18 et/ou 24 mois. Dans ce cas, seules les études portant sur des durées de 24 mois peuvent être considérées pour des études de carcinogénèse ;
- le sacrifice des animaux a lieu après une durée post-exposition. Dans ce cas, l'exposition peut être par exemple de 12 mois et le sacrifice 12 mois plus tard.

Dans l'ensemble, les expositions d'une durée inférieure à la durée de vie moyenne d'un animal sont effectuées à des fins de détermination de la rétention pulmonaire en fibres ou d'étude de l'évolution de la fibrose. D'après les enseignements tirés de la situation observée chez l'homme, on sait que le délai de formation des tumeurs respiratoires est long, plus particulièrement pour le mésothéliome. Ainsi, la teneur en fibres, dans le poumon, au moment de l'observation des tumeurs, ne rend pas forcément compte du nombre et de la qualité des fibres qui ont provoqué, initié ou favorisé le développement des tumeurs. Il en est de même pour la fibrose qui, on le sait, évolue longtemps après la cessation de l'exposition. Dans le paragraphe consacré au devenir des fibres dans le poumon et au rôle de la biopersistance comme paramètre du potentiel carcinogène des fibres, cette remarque sera prise en considération, et la fréquence de tumeurs sera comparée aux teneurs du poumon en fibres, au cours de l'exposition (voir p. 343).

Études réalisées par instillation intratrachéale

Dans deux études où des fibres de céramique ont été instillées, d'une part, chez le hamster, d'autre part, chez le rat, aucune tumeur n'était observée, contrairement aux fibres d'amiante (Tableau 7-15) (Smith *et al.* 1987 ; Adachi *et al.*

1991). Les groupes inoculés avec des fibres de céramique comportaient respectivement 42 hamsters et 22 rats. Le taux de tumeurs obtenues avec les fibres d'amiante étaient 74 % chez le hamster et 8 % chez le rat.

Tableau 7-15 Études réalisées avec des fibres de céramique par instillation intratrachéale chez le rat et le hamster

Type de fibres	Dose*	Nb Fibres totales	Tumeurs [†]	Référence
Fiberfrax®	5 × 2	1,7 × 10 ⁵	R : 0/22 H : 0/22	Smith <i>et al.</i> 1987
Crocidolite	5 × 2	25 × 10 ⁵	R : 2/25 H : 20/27	
Contrôles	-	-	R : 0/150 H : 0/169	
Titanate de potassium	2 × 5	-	H : 0/20	Adachi <i>et al.</i> 1991
Contrôles	-	-	H : 0/20	

* Nombre d'instillations × quantité (mg) par instillation

† Nombre d'animaux avec tumeur/nombre d'animaux exposés. R : rat ; H : hamster

Études réalisées par inoculation intracavitaire

Plusieurs auteurs ont rapporté un taux élevé de tumeurs, que l'inoculation soit intrapleurale ou intrapéritonéale (Tableau 7-16). Dans le travail de Stanton *et al.* (1981), 2 échantillons d'octotitanate de potassium produisaient un taux très élevé de sarcomes de la plèvre, autour de 70 %, alors qu'un échantillon de titanate de nickel non fibreux en produisait 5 % (chez les animaux contrôles, le taux de tumeurs pleurales était de l'ordre de 2 % ; voir p. 299). Ces échantillons fibreux comportaient une forte proportion de fibres dont les caractéristiques dimensionnelles correspondaient aux critères de définition des fibres induisant la plus forte probabilité de tumeurs ($L > 8\mu\text{m}$; $\varnothing \leq 0,25\mu\text{m}$). D'autres échantillons fibreux d'oxyde d'aluminium étaient employés ; leur potentiel tumorigène était fonction du nombre de ces fibres critiques présentes dans l'échantillon (Tableau 7-16).

Piggott et Ismaehl (1992) ont, observé des tumeurs, également trouvées chez les animaux contrôles. Des mésothéliomes n'étaient toutefois présents que dans les groupes exposés à l'aluminosilicate B et au chrysotile (Tableau 7-16).

Par inoculation intrapéritonéale, des taux élevés de tumeurs étaient le plus souvent observés. En général, les fibres étaient administrées en une seule fois, mais les protocoles expérimentaux différaient dans l'étude de Pott *et al.* (1989) où plusieurs injections étaient pratiquées (Tableau 7-16). Dans l'étude

Tableau 7-16 Études réalisées avec des fibres de céramique, par administration intracavitaire, chez le rat

Type de fibres	Dose (mg)	Nb fibres totales	Tumeurs		Référence
			T/N [†]	(%)	
Administration intrapleurale					
Céramique	20	-	3/31	(9,7)	Wagner <i>et al.</i> 1973
Chrysotile	20	-	23/36	(64)	
Oxyde d'aluminium (non fibreux)	20	-	1/35	(2)	
Octotitanate de potassium Oxyde d'aluminium	40	-	Fonction du nombre de fibres L > 8µm ; Ø ≤ 0,25 µm		Stanton <i>et al.</i> 1981
Saffil®	20	-	0/48	(0)	Piggott <i>et al.</i> 1982
Chrysotile	20	-	7/48	(15)	
Contrôles	sol. saline	-	0/48	(0)	
Saffil®agé*	20	-	16/48[0M]*	(33)	Piggott et Ismaehl 1992
Saffil®	20	-	13/48[0M]	(27)	
Aluminosilicate A	20	-	9/48[0M]	(19,5)	
Aluminosilicate B	20	-	18/46[3M]	(39)	
Chrysotile	20	-	25/48[7M]	(52)	
Contrôles	-	-	16/48[0M]	(33)	
Administration intrapéritonéale					
Céramique	25	2,4 × 10 ⁸	3/32	(9)	Davis <i>et al.</i> 1984
Chrysotile	25	13 × 10 ⁸	31/32	(97)	
Crocidolite	25	13 × 10 ⁸	39/32	(90)	
Contrôles	-	-	0/39	(0)	
Fiberfrax®	1	-	0/40	(0)	Maltoni <i>et al.</i> 1989
"	5	-	0/40	(0)	
"	10	-	5/40	(12,5)	
Chrysotile	1	-	0/40	(0)	
"	5	-	11/40	(27)	
"	10	-	14/40	(35)	
Contrôles	eau	-	0/40	(0)	Pott <i>et al.</i> 1989
Fiberfrax®	5x9 mg	-	33/47	(70)	
MAN	5 × 15 mg	-	12/54	(22)	
Chrysotile	1 mg	-	45/54	(83)	
TiO ₂ (particules)	5 × 20 mg	-	2/53	(3,8)	
Contrôles	sol. saline	-	2/102	(2)	
Fiberfrax®	25	4,2 × 10 ⁸	19/23	(83)	Smith <i>et al.</i> 1987
Crocidolite	25	107 × 10 ⁸	20/25	(80)	
Contrôles	-	-	0/150	(0)	

[†] Nombre d'animaux avec tumeur/nombre d'animaux exposés

^{*} à plus de 1 200°C pendant plus de 1 000 heures

^{*} Tumeurs tous sites ; M : mésothéliome

de Smith *et al.* (1987), le pourcentage de tumeurs obtenues avec des doses équivalentes de fibres, administrées chez le hamster, était respectivement 20 et 40 % de tumeurs pour les fibres fiberfrax et crocidolite (contrôles = 0 %).

On constate donc un potentiel tumorigène de la plupart des échantillons testés par voie intracavitaire avec une dépendance selon les dimensions des fibres, démontrée dans l'étude de Stanton *et al.* (1981). Si l'on considère les études n'ayant pas démontré de potentiel tumorigène par instillation intratrachéale ou par inoculation intracavitaire, on constate que les échantillons céramiques fiberfrax et titanate de potassium utilisés dans les expériences par instillation avaient un diamètre géométrique moyen de 0,9 μm (fiberfrax) et un diamètre moyen de 0,36 μm (titanate de potassium). L'absence d'effet peut être dû à un dépôt trop faible des fibres dans le poumon puisque une certaine proportion de fibres est éliminée par le tractus gastro-intestinal. De plus, l'échantillon fiberfrax comporte seulement environ 10 % de fibres potentiellement tumorigènes sur la base des dimensions définies dans l'article de Stanton *et al.* (1981).

L'échantillon Saffil[®], pour sa part, est constitué de fibres de diamètre supérieur à 2 μm . L'aluminosilicate B utilisé par Piggott et Ismaehl (1992) a également un diamètre médian aux environs de 2 μm mais cet échantillon comporte 13,4 % de fibres > 10 μm de long et < 1 μm de diamètre, contre 1 à 2 % pour les autres céramiques testées dans ce travail. Ainsi, dans cette étude, c'est l'échantillon qui comportait des fibres fines qui produisait des mésothéliomes.

Conclusions sur les résultats obtenus avec les laines d'isolation et les céramiques

Les études par inhalation ont été, dans leur grande majorité, réalisées chez le rat. Dans l'ensemble, le nombre de tumeurs obtenues avec les laines de verre, de roche ou de laitier est faible, et n'est pas statistiquement augmenté par rapport aux groupes d'animaux non traités, alors que certains échantillons de céramiques produisaient un taux plus important de tumeurs. Il faut remarquer que, dans plusieurs études, les dimensions des fibres, particulièrement leur diamètre élevé, les rendaient difficilement inhalables.

Dans toutes ces études, on constate que les doses de fibres auxquelles les animaux ont été exposés sont beaucoup plus faibles que celles utilisées dans les cas d'exposition aux fibres d'amiante (100 à 1 000 fois plus faible lorsque le nombre total de fibres est considéré en dose cumulée). Dans les études récentes, par exemple, celles réalisées autour du programme RCC (Hesterberg *et al.* 1993 ; McConnell *et al.* 1995 ; Mast *et al.* 1995 a et b), les auteurs ont utilisé la dose MTD, ce qui indiquerait que les fibres MMVF provoquent, à dose beaucoup plus faible que les amiantes, des réactions pulmonaires.

Laines de verre et fibres de verre

En résumé, des études par inhalation réalisées chez le rat n'ont pas montré, par rapport aux contrôles respectifs, une augmentation statistiquement significative du nombre de tumeurs chez les animaux exposés aux laines de verre ou aux fibres de verre. Toutefois, les résultats ne permettent pas de conclure de manière ferme à l'absence de potentiel tumorigène des fibres. On relève en effet quelques interrogations sur la méthodologie. Dans certaines études, le diamètre des fibres était tel que peu d'entre elles étaient vraisemblablement inhalables (Tableau 7-1a). Il est clair que des échantillons de diamètre supérieur à 3,5 μm (Moorman *et al.* 1988) ou de 3 à 5 μm de diamètre (Smith *et al.* 1987) comportent des fibres qui ont peu de chances d'être déposées dans le poumon de rat. Des échantillons de plus petit diamètre moyen tels que ceux utilisés par Lee *et al.* (1981) sont en fait constitués de fibres présentant une large distribution de diamètres, par exemple de 0,2 à 6,5 μm pour les fibres de verre. Pour certaines études, une ou quelques tumeurs en excès par rapport à ce qui est observé chez les animaux contrôles non traités étaient observées. Cette différence n'a pas de signification statistique, par manque de puissance, même si les contrôles « amiante » donnent un excès statistiquement significatif de cancers (Wagner *et al.* 1984 ; Le Bouffant *et al.* 1984 ; Hesterberg *et al.* 1993). On constate que, dans toutes ces études, le nombre de fibres MMVF auxquelles les animaux ont été exposés était considérablement moindre que celui des fibres d'amiante (Tableau 7-2a). On note également (Tableau 7-1a) que, lorsque cela était déterminé, le nombre de particules non fibreuses excédait celui des fibres, sans que l'on connaisse l'effet de cette association.

Les résultats des études par inhalation effectuées avec des fibres JM100 et JM104 de faible diamètre, plus inhalables que les fibres mentionnées ci-dessus, ont permis toutefois d'obtenir des dépôts de fibres intrapulmonaires importants, voisins, voire supérieurs à ceux obtenus avec des fibres d'amiante utilisées comme contrôle positif (Le Bouffant *et al.* 1984, 1987 ; Smith *et al.* 1987) (Tableau 7-4). Dans ces études, cela n'est pas associé à une augmentation du taux de tumeurs. Mais on ignore quelles sont les dimensions (longueur, diamètre) des fibres retenues dans le poumon et on ne dispose pas de données permettant de connaître la précision sur la mesure des concentrations intrapulmonaires en fibres. Ces observations suggèrent toutefois que la connaissance du nombre de fibres déposées dans le poumon ne permet pas de préjuger du nombre de tumeurs observables. On peut par ailleurs faire remarquer que le nombre de fibres présentes dans le poumon après deux ans d'exposition chez le rat n'est peut être pas le meilleur paramètre à prendre en considération, étant donné le délai nécessaire à l'évolution tumorale.

Les études réalisées par inhalation chez le hamster ne permettent pas de mieux préciser le potentiel carcinogène des laines de verre ou fibres de verre

puisque les mêmes réserves quant à la pertinence des fibres employées s'appliquent ici et que, de plus, les fibres d'amiante ne démontreraient aucun potentiel tumorigène (Tableau 7-2a).

En revanche, les études réalisées par instillation intratrachéale ou par inoculation intracavitaire ont clairement démontré un potentiel tumorigène, pour certains échantillons (Tableaux 7-2b, 7-5 et 7-6). Selon Stanton *et al.* (1981), comme cela a été mentionné à plusieurs reprises, la probabilité de formation de tumeurs au niveau pleural est fonction du nombre de fibres longues et fines, avec une coupure : $L > 8 \mu\text{m}$, $\varnothing \leq 0,25 \mu\text{m}$, permettant de définir le meilleur ajustement de la courbe dose-réponse. Pour Roller *et al.* (1996), un effet carcinogène est observé si un nombre suffisant de fibres longues, fines et durables est inoculé. On reviendra plus loin sur la notion de durabilité.

Laine de roche et laine de laitier

Contrairement aux études épidémiologiques chez l'homme où il est difficile de différencier entre exposition aux laines de roche et aux laines de laitier (voir chapitre 3), les études réalisées chez l'animal ont distingué les deux types de fibres. En résumé, l'analyse des résultats par inhalation est voisine de celle faite pour les fibres de verre (dose cumulée moins élevée que pour les amiantes ; fibres plus épaisses parfois non respirables, excès du nombre de particules non fibreuses par rapport aux fibres). Avec ces fibres, on ne relève pas d'augmentation de fréquence de tumeurs pulmonaires ou pleurales par inhalation. Quelques tumeurs sont observées en utilisant l'inoculation intrapleurale de laine de roche mais non de laine de laitier (Wagner *et al.* 1984). Après inoculation intrapéritonéale, des taux élevés de tumeurs sont obtenus avec les laines de roche. Il faut noter que le nombre d'études effectuées avec ces fibres est plus petit qu'avec les fibres de verre ou laine de verre. En effet, nous avons rapporté ici seulement deux études par inhalation chez le rat avec LL et trois études avec LR. Il n'a pas été rapporté d'étude utilisant la voie intratrachéale. Par administration intrapleurale, une seule étude est indiquée ; le travail de Stanton *et al.* (1981) ne mentionne pas précisément l'utilisation de LL et LR. Dans les tableaux, les résultats obtenus par Pott *et al.* (1984, 1989) ont été regroupés.

Fibres de céramique

L'effet des fibres de céramiques a été largement étudié par inhalation (6 études), instillation intratrachéale chez le rat et le hamster et inoculation intracavitaire (huit études ont été répertoriées). À l'inverse, des résultats obtenus avec LV, FV, LL et LR, les conclusions des études utilisant des fibres de céramique ont clairement montré un potentiel tumorigène pour certains échantillons. Bien que des analyses statistiques soient rarement effectuées

dans les différentes études publiées, nous avons réalisé un test de Fisher pour comparer les nombres de tumeurs dans les séries traitées, par rapport aux contrôles. Sur la base de cette analyse, des augmentations statistiquement significatives du nombre de tumeurs sont obtenues pour des doses cumulées, en nombre total de fibres, élevées dans l'étude de Lee *et al.* (1981) (Tableau 7-11). Une telle dose est atteinte dans l'étude de Le Bouffant *et al.* (1984, 1987) seulement avec des fibres JM100, alors que les autres études effectuées avec des FV, LV, FR ou LL utilisaient des doses d'un ou deux ordres de grandeur inférieurs. Des doses cumulées plus faibles (environ 30 fois) ont été cependant utilisées dans des études « positives » avec RCF-1, RCF-2, RCF-3, ce qui indique que la dose cumulée, en fibres totales n'est pas le seul paramètre qui doit conditionner la réponse tumorale. Là encore, les caractéristiques individuelles des fibres doivent être prises en considération si l'on veut pouvoir effectuer des comparaisons entre les différentes études. On voit en effet que, bien que des échantillons puissent présenter des dimensions moyennes comparables, ils montrent, pour les différentes fibres, des caractéristiques qualitatives et quantitatives différentes. Si l'on compare par exemple les conditions d'exposition aux quatre échantillons RCF, on constate que, pour une dose cumulée voisine (correspondant à la dose maximale de 30 mg/m^3), alors le nombre total de fibres est voisin pour les 4 échantillons, de l'ordre de $7 \times 10^5 \text{ F} \times \text{ml}^{-1} \times \text{h}$, le nombre de fibres « longues » : $> 10 \mu\text{m}$ de longueur et « fines » : $< 0,5 \mu\text{m} \varnothing$, est 2 et 4 fois plus petit pour l'échantillon RCF4 que pour les trois autres échantillons (Tableau 7-11). On peut se demander le sens de cette différence en regard du plus petit nombre de tumeurs (statistiquement non significatif) produit par cet échantillon, comparativement aux trois autres. En effet, puisqu'il a été démontré par ailleurs que le potentiel tumorigène est dépendant du nombre de fibres « longues » et « fines », on peut suggérer que les différences de tumorigénicité sont dépendantes de ce paramètre.

Il est intéressant de considérer ici les réserves faites précédemment, qui nous ont amenés à refuser de conclure définitivement sur un potentiel carcinogène de LV, FV, LL et LR, et de voir si cela s'applique aux fibres de céramique, ce qui, dans l'hypothèse d'une réponse positive, affaiblirait les réserves faites précédemment.

- Avec les fibres de céramique, tout comme avec les autres fibres, la dose cumulée d'exposition est le plus souvent inférieure à celle des amiantes (Tableau 7-11) et la valeur relative de ce paramètre vient d'être discutée.
- Les diamètres des fibres de céramique sont aussi supérieurs à ceux des fibres d'amiante. Toutefois, les dimensions moyennes sont assez proches de celles de certains échantillons de verre, de roche ou de laitier pour lesquels il n'était pas observé d'augmentation statistiquement significative de la fréquence des tumeurs. Sur la base du nombre de fibres supérieures à $10 \mu\text{m}$ de long, la comparaison des tableaux 7-7, 7-9 et 7-11 indique une valeur plus petite pour l'échantillon de laine de roche utilisé par McConnell *et al.* (1994) et voisine

pour la plus forte dose de l'échantillon de laine de laitier employé dans ce même travail. Le manque de données sur la distribution des diamètres ne permet toutefois pas d'aller au-delà de cette comparaison.

Les résultats des études par administration intracavitaire de fibres de céramique ont confirmé que des tumeurs pouvaient être observées après injection de fibres, avec des fréquences qui n'étaient pas nécessairement globalement plus élevées qu'avec les autres types de MMVF.

Commentaires sur les études réalisées par inhalation

Bien que, incontestablement, l'exposition par inhalation représente la voie d'exposition naturelle pour étudier les effets des fibres sur le système respiratoire de l'homme, **un certain nombre de questions doivent être posées, qui suggèrent que les conclusions sur l'absence d'effet statistiquement significatif, en général, des fibres LR, LL et LV par inhalation, doivent jusqu'ici, être considérées avec une extrême prudence** (certaines de ces remarques peuvent aussi être prises en considération pour les autres voies d'exposition. Notamment, outre les interrogations formulées ci-dessus :

- Quelle est la représentativité des échantillons de fibres aérosolisées, par rapport à ce qui est utilisé dans l'industrie et commercialisé, auxquels les travailleurs et les utilisateurs pourraient être exposés ? En dehors de l'absence de liant qui a été souvent mentionnée et qui éloigne semble-t-il les échantillons « expérimentaux » des échantillons « naturels », la méthode de préparation des fibres sélectionne une très petite fraction des produits de départ. McConnell *et al.* (1994) mentionnent que, partant de 4 tonnes de produit brut de fibres LR et LL, ils obtiennent 10 kg de fibres stock ayant des dimensions convenables pour des études par inhalation chez le rat, soit un rendement de 0,25 %. Dans le cas des fibres de céramique, le rendement serait de 1 % (McConnell *et al.* 1995). Un échantillon de fibres de crocidolite brut de 50 kg donnait, pour sa part, 10 kg de fibres aux dimensions requises, soit un rendement de 20 %. Cela illustre les différences entre les caractéristiques des MMVF, comparativement aux amiantes.

- Une autre interrogation concerne le rôle éventuel des particules non fibreuses. Comme cela a été noté également lors de la description des travaux répertoriés dans les chapitres précédents, il est remarquable que les échantillons MMVF comportent un grand nombre de particules non fibreuses et le rapport non-fibreux/fibreux excède très souvent 1, plus particulièrement pour les fibres de céramique où un rapport de 30 a pu être observé. Ainsi, dans la plupart des cas, les animaux ont été en fait exposés à un mélange de particules, fibreuses et non fibreuses. Étant donné que ces dernières ont une dimension telle qu'elles peuvent être phagocytées par les macrophages, il est évident que ce phénomène doit intervenir dans la clairance des macrophages et le développement de la réaction inflammatoire, mais son influence sur les effets des fibres n'a pas été étudiée en soi. On peut cependant mentionner un article de

Davis *et al.* (1991) qui ont étudié la fréquence des tumeurs chez des rats soumis à une exposition de fibres et de particules non fibreuses. Il s'agissait de chrysotile et d'amosite, couplé à du quartz ou à de l'oxyde de titane. Les résultats ont montré que la fréquence de tumeurs pulmonaires, incluant le mésothéliome, observée en présence de particules était plus élevée qu'en l'absence de particules (il n'y a pas d'étude statistique mais les groupes « amiante seule » proviennent de séries antérieures ; les animaux non traités présentaient un taux de tumeurs pulmonaires de 4,5 % sans aucun mésothéliome) (Tableau 7-17).

Tableau 7-17 Influence de la présence de particules sur la fréquence de tumeurs observées chez le rat

Exposition	% Tumeurs pulmonaires (% méso)	Exposition	% Tumeurs pulmonaires (% méso)
Chrysotile	35 (0)	Amosite	35 (5)
+ TiO ₂	63 (4,8)	+ TiO ₂	50 (5)
+ quartz	58 (15,8)	+ quartz	67 (20)

Cette augmentation n'était pas liée à une augmentation de la charge en fibres. En effet, pour l'amosite cette quantité était équivalente quel que soit le type d'exposition ; pour le chrysotile, elle était augmentée en présence de TiO₂ mais diminuée en présence de quartz (mesure faite 6 mois après la fin de l'exposition d'une année). Ce dernier résultat est intéressant à double titre, d'une part, parce qu'il suggère que l'exposition à des poussières mixtes peut moduler dans un sens ou dans l'autre le nombre de fibres en rétention dans le poumon ; d'autre part, parce qu'il pose la question du rôle de la solubilité et des relations entre rétention pulmonaire et rétention pleurale. En effet, les auteurs interprètent les résultats en formulant plusieurs hypothèses : l'exposition à certaines particules (ici quartz) peut entraîner une dissolution plus rapide du chrysotile et/ou favoriser le passage des fibres vers la plèvre (les auteurs constatent une augmentation des fibres pleurales en cas d'exposition mixte, par rapport à l'amiante seule). On se pose alors les questions suivantes : selon la première hypothèse, cela remet en cause le principe selon lequel la dissolution des fibres favorise leur innocuité puisqu'on observerait l'inverse. Sous cette hypothèse, on est bien obligé de penser que la biopersistance n'est pas un paramètre majeur de la carcinogénicité. Selon la seconde hypothèse d'une translocation vers la plèvre favorisée, on s'interroge sur la pertinence de la mesure de la rétention pulmonaire comme facteur de risque pour le mésothéliome. On constate que ces résultats soulèvent des questions fondamentales mais on manque de données pour formuler des réponses objectives.

Ainsi, certaines questions se posent pour lesquelles il n'y a pas aujourd'hui de réponse claire : les particules non fibreuses associées aux échantillons de fibres

MMVF sont-elles présentes dans les aérosols respirés par l'homme ? Est-ce que les particules non fibreuses modifient la réponse pulmonaire aux fibres ? Si oui, en quoi ? A priori, il semble que ces particules non fibreuses n'aient pas de potentiel tumorigène propre, du moins pour certaines qui ont été administrées seules (Smith *et al.* 1987).

- On peut aussi se demander comment interpréter un excès de tumeurs de l'appareil respiratoire survenant chez le rat, après inhalation. Les résultats obtenus avec les fibres RCF montrent bien que quelques tumeurs supplémentaires peuvent alerter quant à un potentiel tumorigène possible : l'excès de 1 à 4 tumeurs dont 1 mésothéliome après exposition aux plus faibles doses de RCF-1 peut faire considérer ces changements comme n'étant pas seulement le fait du hasard, au regard des résultats obtenus avec la plus forte dose. Dans ce cas, on peut suggérer l'hypothèse d'un potentiel tumorigène de RCF-4, sans pouvoir l'affirmer. Un raisonnement similaire peut s'appliquer à l'échantillon Fybex. On peut alors s'interroger sur le potentiel réel d'autres fibres telles que MMVF 11 pour laquelle une tendance à un excès de tumeurs pulmonaires est observé. Pour avoir une réponse plus sûre, il faudrait augmenter considérablement le nombre d'animaux par lot et le nombre de points pour établir une relation dose-effet.

- Enfin, on peut se demander si les études par inhalation ont apporté davantage d'informations que ne l'on fait les études par d'autres voies d'administration. Le potentiel tumorigène des fibres d'amiante, surtout le crocidolite, non détectable ou à peine détectable dans les études par inhalation, apparaissait évident par administration intrapleurale ou intrapéritonéale.

- Sur le plan des mécanismes d'action des fibres, les différences de réponses en terme de pourcentage de tumeurs d'une étude à l'autre, avec un même type de fibres, ou d'un type de fibres à l'autre, pour une même étude, sont souvent très difficiles à interpréter étant donné la grande hétérogénéité d'analyse des paramètres dimensionnels des fibres (méthode d'analyse et type de mesure). On regrette de ne pouvoir disposer d'une analyse bivariée (longueur/diamètre) des fibres en rétention dans le poumon, ce qui pourrait permettre de déterminer s'il existe une relation entre la quantité de fibres à dimensions « critiques », comme défini par administration intrapleurale, et le potentiel tumorigène. Ces données, si elles existaient, auraient l'avantage de permettre de comparer les résultats des études par administration intrapleurale et par inhalation.

Commentaires sur la rétention des fibres dans le poumon, après inhalation

La notion de biopersistance qui a été introduite au cours des dernières années tente d'apporter un paramètre différentiel supplémentaire entre les types de fibres, comme cela sera discuté plus loin, en distinguant les fibres selon leur capacité à persister physiquement et chimiquement dans le poumon. Avant

d'aborder cette question, on peut tenter de tirer des enseignements sur la connaissance de la quantité et des caractéristiques de fibres en rétention dans le poumon, après inhalation.

Il est logique de penser que, pour des fibres d'un potentiel tumorigène donné, l'effet tumorigène sera fonction du nombre de fibres présentes dans le poumon, avec un recul, dans le temps, assez long pour permettre l'expression tumorale. Si toutes les fibres n'ont pas le même potentiel, par exemple selon leurs dimensions et/ou leur durabilité, il faudra tenir compte de leur proportion pour établir les relations dose-réponse. Dans le tableau 7-18 ont été résumées les données sur la rétention de différents types de fibres de verre, roche, laitier et céramique provenant de différentes études où le même système d'exposition *nose-only* a été employé et où des analyses similaires des caractéristiques des fibres ont été effectuées (Hesterberg *et al.* 1993 ; McConnell *et al.* 1994 ; Mast *et al.* 1995a et b). A titre de référence, les données obtenues avec les amiantes ont été aussi reportées. Lorsqu'elles étaient connues, les valeurs trouvées après 12 mois d'exposition ont été mentionnées pour tenter d'avoir une idée de la teneur du poumon en fibres, en amont de l'expression tumorale. La figure 7-1 rassemble les résultats concernant le nombre total de fibres WHO en fonction du pourcentage de tumeurs observées à la fin de l'étude. Sur la figure 7-1a, on trouve les valeurs 12 mois après le début de l'exposition et sur la figure 7-1b, les valeurs à 24 mois. On constate qu'il n'y a aucune corrélation entre ces deux paramètres et donc que la connaissance du nombre total de fibres ne renseigne pas sur le nombre de tumeurs attendues après inhalation, même pour un type donné de fibres telles que les céramiques.

En effet, les figures 7-1a et 7-b montrent qu'il n'y a pas de corrélation entre le nombre de fibres WHO en rétention après 12 mois ou 24 mois d'exposition et le pourcentage d'excès de tumeurs après 24 mois d'exposition (la durée maximale de vie des animaux, dans ces études, est d'environ 30 mois). Si l'on considère la figure 7-1a, on peut estimer que des excès statistiquement significatifs de tumeurs ne sont observés que si le nombre de fibres en rétention est de l'ordre de 2×10^5 fibres WHO par gramme de poumon sec. Toutefois, cette condition n'apparaît pas suffisante puisque certains échantillons (RW, MMVF11) présentent, pour certaines doses, des rétentions supérieures, en tenant compte des écarts inter-animal (voir flèches). Cependant, si l'on regarde les valeurs de rétention pulmonaire après 24 mois d'exposition, on observe que pour l'échantillon RW, le nombre de fibres déposées n'est pas augmenté ; par ailleurs, pour les fibres MMVF11, on constate une augmentation nette de la quantité de fibres déposées, en moyenne, chez des animaux exposés à ce type de fibres, mais aussi une énorme variation d'un animal à l'autre. Ainsi, pour ces deux types de fibres, aux doses considérées, on peut suggérer que, d'une part, il n'y a pas eu accumulation de fibres après 12 mois d'exposition et que, d'autre part, les animaux ont été exposés ou ont répondu à l'exposition de manière très hétérogène. Après 24 mois d'exposition

Tableau 7-18 Rétention des fibres MMVF dans le poumon après inhalation pour des durées exposition/sacrifice de 12/12 mois et 24/24 ^Δ mois. Pour simplifier, seules les valeurs moyennes sans les écarts-types ont été indiquées

Type de fibres	Nombre de fibres en rétention par gramme de poumon sec x 10 ⁻⁸				% Tumeurs traités vs (contrôles)		Dimensions			
							12/12		24/24	
	WHO* > 10 µmL		WHO > 10 µmL				DGM	LGM	DGM	LGM
MMVF 10 (rat)	1,71	0,62 [†]	2,90	2,06 [†]	6,03	(3,2)	0,55	7,25	0,42	6,78
"	0,87	-	1,85	-	0,80	(3,2)	-	-	-	-
"	0,19	-	0,24	-	0,0	(3,2)	-	-	-	-
MMVF 11 (rat)	2,80	1,27 [†]	5,00	1,82 [†]	2,67	(3,2)	0,43	8,47	0,47	7,34
"	1,83	-	2,35	-	7,50	(3,2)	-	-	-	-
"	0,29	-	0,48	-	3,4	(3,2)	-	-	-	-
RW	0,55	0,28	0,56	0,30	4,4	(1,6)	-	-	-	-
"	2,10	1,19	2,17	1,12	0,0	(1,6)	-	-	-	-
"	3,19	1,74	2,42	1,34	2,6	(1,6)	-	-	-	-
SW (rat)	0,23	0,07	0,44	0,14	1,7	(1,6)	-	-	-	-
"	1,44	0,45	0,97	0,29	0,0	(1,6)	-	-	-	-
"	2,25	0,54	1,77	0,63	2,6	(1,6)	-	-	-	-
RCF-1 (rat)	0,29	0,14	0,43	0,22	1,6	(0,77)	0,57	8,17	0,46	8,86
"	0,90	0,46	1,56	0,82	4,7	(0,77)	0,58	8,48	0,53	9,53
"	1,22	0,62	2,21	1,06	1,6	(0,77)	0,54	7,82	0,53	9,23
"	2,72	1,46	2,75	1,35	14,6	(1,5)	0,53	9,23	0,50	8,36
RCF-2 (rat)	4,02	-	6,93	3,02	9,9	(1,5)	0,54	9,7	0,54	8,80
RCF-3 (rat)	2,12	-	1,76	0,82	17,3	(1,5)	0,60	9,76	0,60	7,73
RCF-4 (rat)	1,48	-	3,48	0,52	4,2	(1,5)	0,90	5,81	0,90	5,56
Chrysotile (rat)	23,9	-	28,1	3,96	20,3	(3,2)	0,07	1,71	0,07	1,91
Crocidolite (rat)	6,28	1,59	12,5	4,02	14,0	(1,6)	-	-	-	-
RCF-1 [#] (hamster)	1,92	-	1,59	0,82	41,0	(0)	0,58	8,54	0,45	7,91
Chrysotile [#] (hamster)	15,5	-	16,5	1,02	0	(0)	0,07	1,34	0,06	1,73

^Δ 53 semaines pour RW et SW ; 13 et 44 semaines pour crocidolite (McConnell *et al.* 1994)

* Dans le cas des MMVF, le nombre de fibres totales est très approximativement 1,5 fois celui des fibres WHO (lorsque ces valeurs sont connues), pour les fibres de chrysotile, il est d'environ 10 fois plus ; pour le crocidolite, ces valeurs ne peuvent être calculées (nombre de fibres totales non indiqué)

[†] déduit de la figure 7-1 (Hesterberg *et al.* 1993)

[#] Exposition/sacrifice : 18/18 (mois)

(Figure 7-1b), on constate que les échantillons MMVF10 et RCF4, aux doses correspondantes (flèche noire), provoquent un dépôt de fibres WHO de l'ordre de 3×10^5 fibres par gramme de poumon sec, ce qui est assez proche de ce qui est observé avec RCF1 à la plus forte dose. Comme cela a déjà été mentionné, il est possible que la teneur du poumon en fibres, quelques mois avant la fin de l'expérimentation, ne soit pas le meilleur paramètre à prendre en considération pour rendre compte de la quantité de fibres susceptibles de produire un effet. En conséquence, on peut conclure que la détermination du

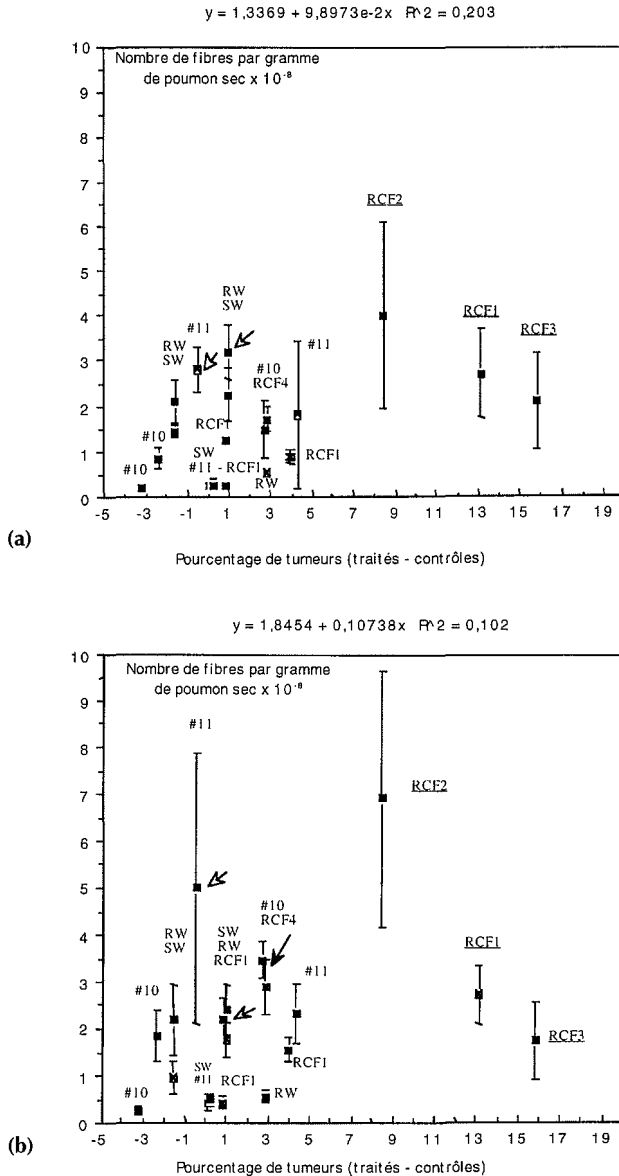


Fig. 7-1 Relation entre le nombre de fibres WHO comptées dans le poumon après 12 mois (a) et 24 mois (b) d'exposition et le pourcentage de tumeurs comptabilisées à la fin de l'étude (durée maximum d'exposition : 24 mois)

nombre total de fibres WHO ne permet pas de relier la survenue de tumeurs à la présence de fibres. Cette remarque doit être discutée à propos de la prise en considération de ce paramètre, chez l'homme, pour identifier certaines fibres

comme agent causal de tumeurs pulmonaires ou pleurales, même si les conditions d'analyse sont différentes en raison de l'existence, chez l'homme, d'un délai post-exposition. La figure 7-2 regroupe les données obtenues avec les fibres MMVF ainsi qu'avec les fibres d'amiante. On doit noter ici que, dans le cas des MMVF, le nombre de fibres WHO n'est pas très différent de celui des fibres totales (cela dépend toutefois du type de fibres). En revanche, il y a une différence importante pour les fibres d'amiante.

L'absence de relation entre le nombre de fibres déposées dans le poumon et le pourcentage de tumeur est compatible avec l'hypothèse que toutes les fibres n'ont pas le même potentiel et que leurs caractéristiques dimensionnelles sont un autre paramètre qui doit être pris en considération pour interpréter les résultats. Malheureusement, les dimensions ne sont pas toujours déterminées de la même manière dans les différentes études, et les comparaisons précises ne peuvent être effectuées. L'examen du tableau 7-18 montre que les dimensions moyennes des fibres en rétention dans le poumon ne sont pas très différentes entre les différents échantillons. Cependant, on ne connaît pas la distribution exacte, en particulier par une analyse longueur/diamètre fibre par fibre. On peut toutefois constater, si l'on considère seulement les RCF pour lesquelles quatre échantillons différents ont été testés, que pour l'échantillon RCF-4 qui produit le plus petit nombre de tumeurs, comparativement aux autres RCF utilisées aux mêmes doses, les fibres en rétention dans le poumon sont à la fois plus courtes et plus épaisses que celles des autres échantillons. De

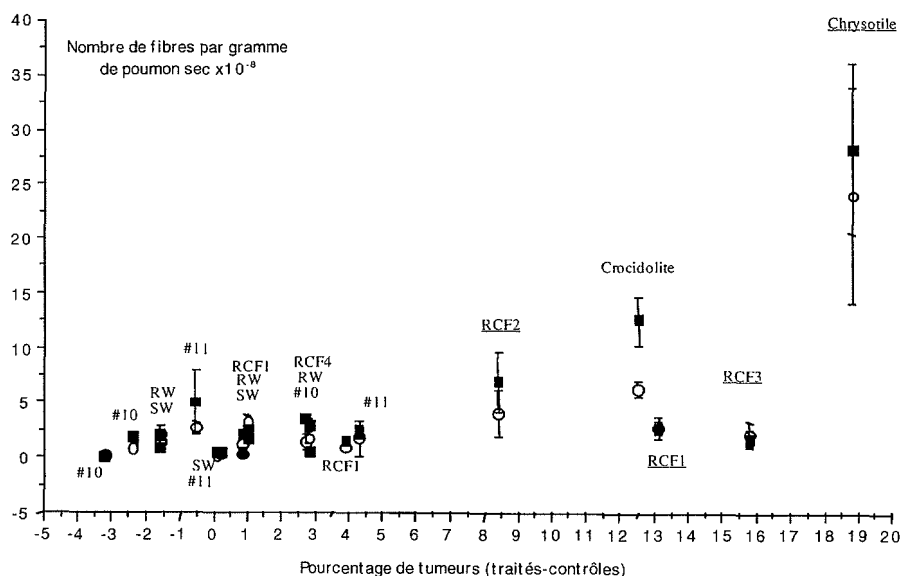


Fig. 7-2 Relation entre le nombre de fibres WHO comptées dans le poumon après 12 (○) et 24 (■) mois d'exposition et le pourcentage de tumeurs comptabilisées à la fin de l'étude (durée maximum d'exposition : 24 mois)

plus, la quantité de fibres présentes à 12 mois est inférieure à celle des autres échantillons RCF. Ainsi, le potentiel tumorigène plus faible de RCF-4 peut être dû à la fois au dépôt de fibres potentiellement moins tumorigènes et à une quantité déposée un peu limitée. Cela n'exclut pas que RCF-4 pourrait avoir un potentiel tumorigène intrinsèque moindre que celui des autres fibres, mais les résultats obtenus ne permettent pas d'affirmer cette hypothèse.

Pathologies résultant d'études expérimentales in vivo avec d'autres fibres

Toxicité des fibres de para-aramide

Déposition et rétention

Quelques travaux ont utilisé le rat et le hamster comme modèle pour évaluer ces paramètres. Les travaux de Lee *et al.* (1988) et de Kelly *et al.* (1993) montrent l'évolution dans le temps (2 ans) des fibrilles de para-aramide. Un an après la fin de l'exposition de rats à des doses de 2,5, 25 ou 100 fibrilles par ml, la longueur moyenne de celles-ci était proche de 4 µm alors qu'elle était de 12 µm à l'origine. La diminution de la longueur était d'autant plus rapide que la dose d'exposition était faible.

Warheit *et al.* (1994) ont évalué la biopersistence pulmonaire de fibrilles de para-aramide (de 877 à 1 344 fibrilles/ml) par comparaison à celle de la wollastonite (835 f/ml) après administration à des rats pendant 5 jours. La wollastonite était éliminée rapidement (demi-vie de rétention moins d'une semaine). Le nombre de fibres de para-aramide augmentait pendant les premières semaines après l'administration puis déclinait rapidement (demi-vie de 30 jours). Pendant les 6 mois suivants, le pourcentage de fibres longues (> 15 µm) passait de 30 à 5 % alors que celui des plus courtes (de 4 à 7 µm) passaient de 25 à 55 %. Ces résultats étaient interprétés par les auteurs comme montrant une biodurabilité faible pour ces deux produits.

Searl (1997) a montré, chez le rat, qu'après 10 jours d'inhalation de fibres de para-aramide (700 fibrilles/ml), la diminution du nombre de fibres dans le poumon était rapide, les fibres les plus longues disparaissaient en moins d'un mois. Ce qui est expliqué par une capacité des fibres les plus longues à se briser en fibres plus courtes qui sont alors plus facilement éliminées.

Ces conclusions ont été retrouvées chez le hamster (Warheit *et al.* 1996b).

Toxicité par inhalation

Lee *et al.* (1988) ont exposé des rats (mâles et femelles) à des doses variant de 2,5 f/ml à 400 f/ml. A la dose de 2,5 f/ml, aucune altération n'a été rapportée. Pour les doses de 25 et 100, une augmentation du poids du poumon et une hyperplasie des pneumocytes de type II ont été observées ainsi qu'une très discrète fibrose dans les régions des canaux alvéolaires. A la dose de 100 f/ml, des kystes kératinisés proliférants ont été notés dans 4 rats femelles (6 %) mais pas chez les mâles. Pour la dose de 400 f/ml, l'exposition a été arrêtée au bout d'un mois en raison d'une forte mortalité. Chez les animaux qui ont été examinés pendant 1 an après la fin de l'exposition, on a retrouvé une fibrose légère, un carcinome chez un rat mâle et des kystes kératinisés proliférants chez 6 femelles. Des structures de même type obtenues chez des rats traités par du noir de carbone ou des émanations de diesel n'ont pas provoqué de tumeurs avoir été implantées chez des souris athymiques (Mauderly *et al.* 1994).

Warheit *et al.* (1995-1996a) ont mené une étude par inhalation chez des rats exposés à 400 ou 750 f/ml pendant 2 semaines puis suivis pendant 1 an. Ils ont rapporté une réponse inflammatoire locale modérée et transitoire avec un pic à 1 mois et une réversibilité quasi totale à 1 an. De la même façon, l'exposition à la dose la plus forte a induit une augmentation transitoire immédiatement après l'exposition de la prolifération (incorporation de BrdU) des cellules des bronchioles terminales et des cellules pleurales et sous-pleurales de la plèvre viscérale.

Dans le cas du témoin positif (chrysotile B), l'effet sur la prolifération cellulaire persistait jusqu'à 3 mois après le traitement. Des résultats comparables ont été rapportés chez le hamster (Warheit *et al.* 1996b).

Instillation intratrachéale

Une seule étude (Reinhardt 1980) peu conclusive (échantillon mal caractérisé) a montré une réaction inflammatoire « non spécifique » précoce et transitoire.

Injection péritonéale

Une seule étude par Brinkmann et Müller (1989) portant sur des rats injectés par 5 mg de fibres a montré une réaction inflammatoire initiale, des granulomes avec centre nécrotique, une activation mésenchymateuse avec une légère fibrose mésothéliale et une prolifération de cellules mésothéliales sur l'omentum. Aucune tumeur n'a été relevée. Ces résultats ne sont pas utilisables en raison de l'absence de caractérisation de l'échantillon.

A signaler que les para-aramides peuvent générer des produits toxiques (cyanides, isocyanates) lors de leur combustion. Le Centre international de recherche sur le cancer (IARC 1997) a proposé une classification en catégorie 3.

Toxicité des fibres de 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'amiante, 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'amiante, 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'amiante (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. Étant 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_{tot}) est la somme du taux de solubilité (k_{sol}) et du taux de translocation (k_{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 μ m), 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 récusent 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 (*lofting*) 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}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 $10\text{ }\mu\text{m}$ 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 $> 20\text{ }\mu\text{m}$ 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 $< 5 \mu\text{m}$; $5-10 \mu\text{m}$; $10-20 \mu\text{m}$; $> 20 \mu\text{m}$ 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 $5 \mu\text{m}$ ou $10 \mu\text{m}$, comparativement à la fraction supérieure à $20 \mu\text{m}$ 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 solubilité⁶. La notion de K_i qui prend en compte la composition chimique des fibres a été élaborée, comme cela est discuté dans le chapitre 1. Le taux de dissolution, v , peut être

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.

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 (Guldborg *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 (Guldborg *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

Études 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 $5 \times 1,5 \mu\text{m}$ ($L \times \varnothing$), 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 μm 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 μm versus 60 μm 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 μm jusqu'à 25 μm 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 μm et 30 μm , 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 microfibrilles (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 microfibrilles par leurs dimensions⁷, les premiers étant plus longs et plus épais que les microfibrilles. Une rétention plus élevée des fibres JM 104-475 était aussi décrite dans une autre étude (Muhle *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. Toutefois, d'après d'autres

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

études, il y a une meilleure rétention des fibres longues. La contradiction qui apparaît entre 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 microfibres et le chrysotile, les proportions ne différaient que par la proportion des fibres supérieures à 10 et 20 µm de longueur⁸, (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.

Études 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 : $L > 5 \mu\text{m}$, $\varnothing < 3 \mu\text{m}$, $L/\varnothing \geq 3$) 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 J1, un jour après la cessation de l'exposition). La différence était encore plus importante pour les

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).

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.

Bernstein *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 ($5\text{-}20 \mu\text{m}$ 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). À 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 μm . 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 μm de long. En revanche, peu de modifications seraient apportées pour les fibres des autres tranches granulométriques (Fig. 7-4).

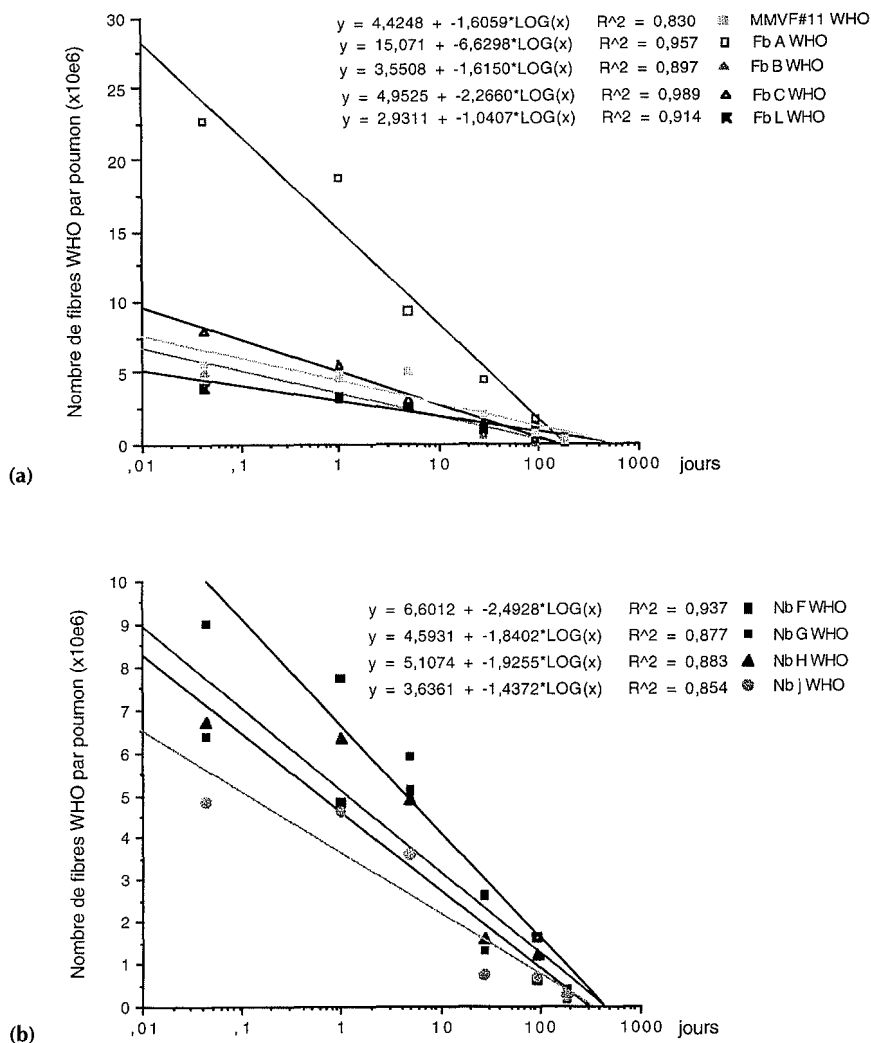


Fig. 7-3 Ajustement logarithmique des données sur la demi-vie de différents échantillons de fibres. D'après Bernstein *et al.* 1996

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 K_i , du K_{dis} ; 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_{25} ,

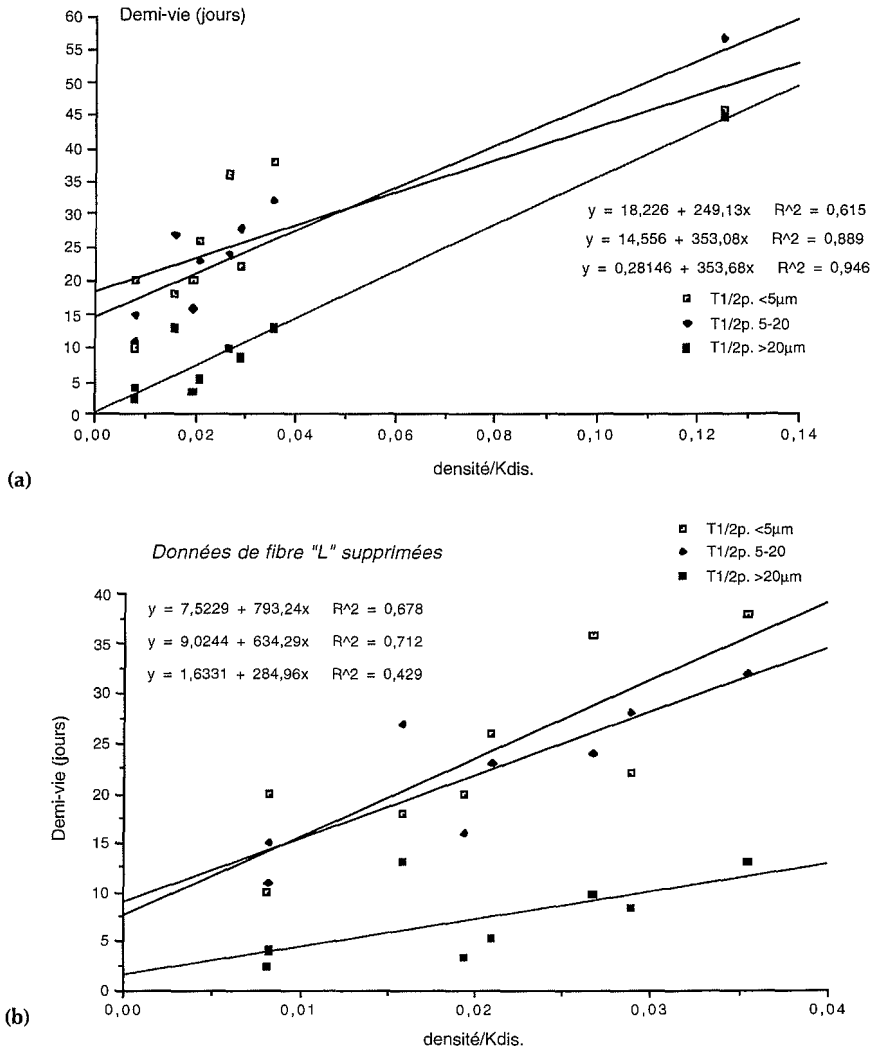


Fig. 7-4 Relation entre demi-vie et dissolution. D'après les données de Bernstein *et al.* (1996)

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 TD₂₅ (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 : TD₂₅ augmente avec le diamètre pour les fibres durables ; TD₂₅ diminue avec la longueur pour toutes les fibres ; TD₂₅ augmente avec le Ki ; cependant l'étude statistique entre TD₂₅ 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 ≥ 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, aucun 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.

Études sur les mécanismes d'action au niveau cellulaire

Évaluation des effets génotoxiques et carcinogènes des FMA in vitro et in vivo

Différentes méthodes ont été développées pour étudier les effets génotoxiques et le potentiel carcinogène de composés chimiques in vitro ou in vivo. Nous n'avons pas répertorié d'études effectuées in vivo avec des FMA, excepté un travail portant sur la recherche de mutations chez la drosophile (Osgood 1994). En général, les tests in vitro consistent en la détection de mutations géniques ponctuelles chez les procaryotes et les eucaryotes (Kier *et al.* 1986) et en des études cytogénétiques mettant en évidence des aberrations chromosomiques structurales et ou numériques (aneuploidie) dans les cellules en métaphase et la formation de micronoyaux (Heddle *et al.* 1983 ; Oshimura & Barrett 1986 ; Galloway *et al.* 1994 ; Dulout & Olivero 1984). La plupart de ces tests ont été développés pour étudier les effets de composés chimiques ; quelques tests plus spécifiques ont été élaborés afin de mieux étudier les effets génotoxiques potentiels des fibres.

L'étude de modifications phénotypiques associées à la transformation néoplasique est un moyen d'évaluation du potentiel carcinogène. Il est possible de déterminer in vitro si les cellules traitées ont acquis certaines caractéristiques

observées dans les cellules tumorales : perte de l'inhibition de contact ou acquisition de la propriété de pousser en milieu semi-solide.

Différents systèmes *in vitro* ont été employés, utilisant des types cellulaires conventionnels (cellules ovariennes de hamster chinois, fibroblastes embryonnaires de hamster ou de souris, fibroblastes pulmonaires, cellules épithéliales) ou à l'aide de modèles plus spécifiques tels que ceux utilisant les cellules mésothéliales pleurales de différentes espèces.

Systèmes *in vitro* utilisés pour étudier l'endommagement de l'ADN dans les cellules de mammifères ou les procaryotes (mis à part la mutagenèse)

Sur le plan technique, les cellules sont incubées avec les fibres pendant différentes durées, à des concentrations qui varient d'une étude à l'autre. Lorsqu'elle est précisée, la préparation des fibres n'est pas identique entre les différents travaux (dispersion par sonication légère par exemple ou par passage dans une seringue munie d'une fine aiguille). Des altérations de bases de l'ADN telle l'hydroxylation de la guanine (8-OHdG) ont été étudiées après extraction de l'ADN et détection par des méthodes appropriées. Les cassures d'ADN peuvent être déterminées par des méthodes directes (élution alcaline, déroulement de l'ADN, comètes) ou indirectes telles que le marquage *in situ* des cellules. Selon cette dernière méthode, si des cassures sont provoquées dans l'ADN, elles permettent l'élongation du brin d'ADN en présence d'ADN polymérase. L'utilisation d'un nucléotide marqué permet une quantification. D'autres systèmes étudient la réparation de l'ADN qui peut être considérée comme un témoin de lésions s'étant produites préalablement dans l'ADN. Finalement, certains auteurs ont étudié l'interaction entre les molécules dérivées de lipides et l'ADN, en raison de données antérieures ayant montré que les fibres d'amiante produisaient une peroxydation des lipides (Gulumian *et al.* 1983). Des composés fluorescents sont par exemple formés suite à la réaction entre le malonaldéhyde et l'acide arachidonique avec l'ADN (Reiss *et al.* 1972).

Analyse des mutations géniques

Les tests pour la détection de mutations géniques les plus largement développés *in vitro* sont fondés sur la détection de revertants chez *Salmonella typhimurium* (Kier *et al.* 1986) et *Escherichia coli* ; ils ont été appliqués à l'étude du potentiel mutagène des fibres. Par définition, ces méthodes ne permettent pas l'étude des interactions entre chromosomes et fibres, en raison de l'absence d'internalisation des fibres par les cellules bactériennes. A notre connaissance, aucune étude n'a porté sur la recherche de mutations éventuellement produites par les FMA dans des cellules de mammifères.

Systèmes cellulaires étudiant le potentiel clastogène par analyse des anomalies chromosomiques

Les études cytogénétiques *in vitro* analysant les aberrations chromosomiques fournissent des informations sur le potentiel clastogène de l'agent testé. Des aberrations chromosomiques structurales (cassures, fragments, échanges entre segments de chromosomes) peuvent être observées dans les cellules en métaphase. A la fin de la division cellulaire, des fragments de chromosomes ou des chromosomes entiers peuvent être entourés d'une membrane nucléaire et former des micronoyaux qui témoignent de cassures de chromosomes. Le type d'aberrations dépend du type d'endommagement, de la position dans le cycle cellulaire et des procédés de réparation (Natarajan 1993). Différentes sortes de cellules de mammifères peuvent être utilisées pour étudier ce type de dommages aux chromosomes. Les translocations, inversions, délétions peuvent être la conséquence de réarrangements consécutifs à des cassures. Des échanges entre chromatides sœurs peuvent être produits par recombinaisons. Des mutations chromosomiques mettant en jeu de larges parties du génome peuvent être visualisées par des méthodes cytogénétiques (technique des bandes) ; de plus petits remaniements sont éventuellement détectables par analyse Southern et hybridation *in situ* en utilisant des sondes spécifiques.

Études de l'aneuploïdie et de la polyploïdie

Lors de la division cellulaire, le nombre de chromosomes est maintenu dans les cellules filles par une ségrégation appropriée des chromosomes. Si le mécanisme de ségrégation est altéré, les cellules filles contiennent un nombre anormal de chromosomes. Le phénomène de non-disjonction présente un risque important de perte ou de gain de matériel génétique pour les cellules concernées (Barrett *et al.* 1985 ; Epstein *et al.* 1988). Une aneuploïdie est déterminée par la quantification du nombre de chromosomes dans les cellules en métaphase. L'aneuploïdie et la polyploïdie résultant de l'exposition à des fibres ont été étudiées à l'aide de différents types de cellules de mammifères. D'autres protocoles ont été développés pour déterminer les effets de fibres sur la ségrégation des chromosomes ; l'étude de l'anaphase et de la télophase de la mitose est particulièrement informative. La polyploïdie peut résulter d'une altération de la cytokinèse.

Résultats obtenus avec les FMA : génotoxicité

Endommagement de l'ADN cellulaire et mutations géniques

Peu d'études ont été réalisées avec des FMA. Des cassures d'ADN ont été démontrées de manière indirecte par la méthode d'élongation à partir de

cassures dans des cellules embryonnaires de rats traitées par des fibres de verre, de même que par des fibres de crocidolite (Libbus *et al.* 1989).

Une augmentation de la réparation de l'ADN a été mise en évidence dans ces cellules mésothéliales pleurales de rat exposées à des fibres d'aramide, RCF-1, RCF-4 et MMVF 11, mais les mécanismes n'ont pas été étudiés (Jaurand *et al.* 1994).

Des études destinées à mettre en évidence des mutations géniques, à l'aide de tests classiques utilisant des bactéries, ont été réalisées de longue date, en utilisant différents types de fibres, dont des fibres de verre. Dans la plupart des études anciennes, les fibres n'ont pas produit de mutations (Chamberlain & Tarmy 1977). Récemment, des auteurs ont étudié la formation d'adduits à l'ADN et l'hydroxylation de la guanine (formation de 8-OHdG) dans l'ADN cellulaire. Des adduits de malondialdéhyde ont été observés dans l'ADN de *Salmonella thyphimurium* (souche TA104) et dans des fibroblastes RFL-6 incubés avec du crocidolite ou des échantillons de FMA (laine de verre, MMVF 21) (Howden & Faux 1996). Dans les études portant sur les bactéries, de l'eau oxygénée était ajoutée au milieu réactionnel afin d'augmenter la sensibilité de la réaction. La présence de H_2O_2 augmente l'activité des fibres en favorisant les réactions d'oxydo-réduction. Les conclusions rapportées par les auteurs sur l'existence d'une relation entre la quantité de fer mobilisable et l'activité de formation d'adduits à l'ADN doivent prendre en considération les conditions expérimentales.

Anomalies chromosomiques

L'induction d'anomalies chromosomiques par les fibres a fait l'objet d'une revue récente (Jaurand 1997). Cette revue a pris en considération les travaux réalisés avec les fibres de verre code 100 et 110 et les échantillons MMVF et RCF utilisés dans les expérimentations animales par inhalation. Une augmentation des anomalies chromosomiques a été observée dans les cellules SHE (Oshimura *et al.* 1984), CHO (Sincock *et al.* 1982). Les fibres de verre broyées de code 110 ou 100 n'induisaient pas d'augmentation des anomalies chromosomiques, sauf si la fraction alvéolaire était sélectionnée (Brown *et al.* 1979). Hart *et al.* (1992) ont observé des anomalies structurales et numériques des cellules CHO traitées par des fibres RCF 1 à 4 et ces auteurs ont conclu à une bonne corrélation entre le potentiel tumorigène chez l'animal et les effets sur les cellules CHO. Dans un article ultérieur où un plus grand nombre de FMA était utilisé, Hart *et al.* (1994) ont constaté que la fréquence des micronoyaux était fonction de la longueur des fibres, jusqu'à 20 μm , avec peu d'influence du diamètre. Dans une étude portant sur la détermination d'échanges de chromatides sœurs, aucune augmentation n'était observée sur des lignées humaines lymphoblastoïdes (Casey 1983).

Mitoses anormales et aneuploïdie

Des mitoses anormales ont été observées après traitement de différents types de cellules de mammifères par des fibres naturelles ou synthétiques. Yegles *et al.* (1995) ont étudié 18 échantillons différents de fibres, minérales ou synthétiques. Ces auteurs ont constaté que le crocidolite et différents échantillons de chrysotile produisaient une augmentation statistiquement significative du nombre d'anaphases anormales mais que l'amosite et des FMA (RCF, FV, LR, LL) n'avaient pas d'effet détectable. Dans une étude statistique comparant différents paramètres des échantillons (nombre de fibres totales ou ayant certaines dimensions), les auteurs ont suggéré que l'absence d'effet pouvait être due aux limites de détection de l'essai. Sur la base des critères dimensionnels définis dans les travaux de Stanton *et al.* (1977, 1981) ($L > 8 \mu\text{m}$; $\varnothing \leq 0,25 \mu\text{m}$), le nombre de fibres nécessaire à l'obtention d'un effet statistiquement significatif dans les conditions de ce test était de $2,5 \times 10^5$ fibres/cm². Ces valeurs n'étaient pas atteintes avec les fibres « négatives » et il n'était pas possible d'augmenter la concentration en fibres, ce qui aurait été trop toxique. Ces résultats mettent en exergue l'importance des dimensions des fibres ; ils sont en accord avec d'autres données sur les analyses des mitoses dans des cellules ayant phagocyté les fibres d'amiante. Dans ces travaux, il est montré que les mouvements de chromosomes sont entravés pendant leur migration vers les pôles cellulaires, en raison de l'interaction entre les fibres et la cage de kératine des cellules épithéliales (Ault *et al.* 1995 ; Cole *et al.* 1991). Durant ces processus, les fibres courtes suivent les mouvements cellulaires et n'entravent pas la migration des chromosomes. La plupart des études répertoriées ont montré que les FMA produisaient une augmentation statistiquement significative de l'aneuploïdie et/ou de la polyploïdie (Hart *et al.* 1992 ; Pelin *et al.* 1995). Lorsque cela était testé, le broyage des fibres diminuait fortement ou abolissait leur activité (Pelin *et al.* 1995). Une étude *in vivo* a été réalisée chez la drosophile nourrie avec des fibres RCF1, 2, 3, 4 et des fibres d'amiante (Osgood 1994). Les mutations observées dans la descendance ont témoigné d'une aneuploïdie dans les cellules germinales parentales. Toutes les catégories de fibres ont produit une aneuploïdie.

Transformation cellulaire provoquée par les FMA

Hesterberg et Barret (1984) ont étudié les effets cytotoxiques et transformants des fibres JM100 et JM110 sur les cellules embryonnaires de hamster. Les fibres fines JM100 (diamètre moyen $0,13 \mu\text{m}$) étaient plus cytotoxiques et transformantes que les fibres JM100 ($0,8 \mu\text{m}$), lorsque les échantillons étaient comparés poids à poids. Cependant, sur la base du nombre de fibres, les fibres JM110 se révélaient être les plus cytotoxiques. Dans ce travail, la cytotoxicité était déterminée par la mesure de l'inhibition de la prolifération cellulaire et la transformation par l'étude des anomalies morphologiques des colonies. Ces

mêmes types de fibres ont été testés par Mikalsen *et al.* (1988). Ces auteurs ont retrouvé une activité plus importante des fibres JM100 par rapport à JM110, sur la base d'une comparaison pondérale.

Le potentiel transformant des fibres s'est ainsi révélé être dépendant de leurs dimensions. Dans une autre étude où les auteurs ont comparé le potentiel transformant de fibres JM100, avant et après broyage (le broyage réduit la longueur des fibres, mais non le diamètre), une augmentation de la fréquence de transformation des cellules SHE (fibroblastes de hamster) n'était observée qu'avec les fibres non broyées (Hesterberg *et al.* 1986).

La transformation de fibroblastes de souris a été également étudiée (Gao *et al.* 1995) après traitement par des fibres de verre AAA-10, JM100 et ISL (Owens Corning, General Building Insulation) à des doses allant de 1 à 150 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Toutes les fibres produisaient des foyers de transformation de manière dose-dépendante. La transformation était également déterminée par l'étude de la formation de colonies en milieu semi-solide. Tous les types de fibres ont provoqué une augmentation significative du nombre de colonies. De plus, le potentiel transformant de l'ADN des foyers de transformation produits par les fibres AAA-10 a été confirmé par transfection de l'ADN extrait dans des cellules NIH 3T3. La comparaison des résultats obtenus avec ces différents types de fibres a montré que les fibres ISL étaient les moins actives, sur une base pondérale. Ces fibres différaient des deux autres échantillons par leur spectre dimensionnel : longueur allant de 20 à 300 μm , diamètre de 3 à 10 μm versus 0,2 μm à 20 μm et 0,05 μm à 0,6, respectivement, pour la longueur et le diamètre des autres échantillons.

L'ensemble de ces résultats suggère un potentiel carcinogène des échantillons testés, avec une activité prépondérante des fibres longues, en accord avec les conclusions obtenues avec les fibres d'amiante dans d'autres études antérieures.

Discussion

Les fibres ont été longtemps considérées comme non carcinogènes sur la base d'études anciennes montrant l'absence de mutagénicité dans les tests classiques de mutagenèse. Cependant, au cours des dernières années, un certain nombre d'études ont indiqué que des fibres, amiante ou FMA, pouvaient exercer un potentiel génotoxique. Toutefois, une majorité des données ont été obtenues avec des fibres d'amiante et le nombre de travaux réalisés sur modèles cellulaires reste aujourd'hui assez limité. Un certain nombre de résultats indiquent un potentiel clastogène des FMA et une capacité à produire des anomalies chromosomiques ; il y a cependant trop peu de données pour permettre d'établir un type d'activité des fibres, selon leur nature. On peut remarquer que, comme dans le cas des fibres d'amiante, plusieurs auteurs ont démontré que les effets clastogènes, d'endommagement des chromosomes et

transformants, dépendaient des dimensions des fibres, avec une bonne convergence pour constater que les fibres longues, dans la limite de dimensions compatibles avec une internalisation des fibres par les cellules, étaient plus toxiques que les fibres courtes (comparaison entre échantillons de différentes longueurs, effet du broyage). La production d'espèces actives de l'oxygène (EAO) est probablement l'une des étapes permettant aux fibres un endommagement de l'ADN ; ces EAO peuvent provenir du métabolisme cellulaire et/ou des fibres elles-mêmes, comme cela est suggéré par les travaux réalisés en milieu acellulaire.

Les études sur les mécanismes d'action des FMA, aux niveaux cellulaire et moléculaire, mériteraient d'être développées, afin de mieux définir les paramètres des fibres et les propriétés des cellules qui sont impliquées dans les effets physiopathologiques des fibres.

RÉFÉRENCES

- ACHARD ELLOUK S, JAURAND MC. Review of animal/*in vitro* data on biological effects of man-made fibers. *Environ Health Perspect* 1994 102 (Suppl 2) : 47-61
- ADACHI S, KAWAMURA K, KIMURA K, TAKEMOTO K. Tumor incidence was not related to the thickness of visceral pleura in female Syrian hamsters intratracheally administered amphibole asbestos or man made fibers. *Environ Res* 1992 58 : 55-65
- ADACHI S, KAWAMURA K, YOSHIDA S, TAKEMOTO K. Oxidative damage on DNA induced by asbestos and man-made fibers *in vitro*. *Int Arch Occup Environ Health* 1992 63 : 553-557
- ADACHI S, TAKEMOTO K, KIMURA K. Tumorigenicity of fine man-made fibers after intratracheal administrations to hamsters. *Environ Res* 1991 54 : 52-73
- ADAMIS Z, TATRAI F, HONMA K, UNGVARY G. *In vitro* and *in vivo* assessment of the pulmonary toxicity of cellulose. *J Appl Toxicol* 1997 17: 137-141
- ADAMSON IYR, PRIEDITIS H, HEDGECOCK C. Pulmonary response of mice to fiberglass : cytokinetic and biochemical studies. *J Toxicol Environ Health* 1995 46 : 411-425
- Anonymous. Classification of refractory ceramic fibres. The European Ceramic Fibres Industry Association. 3, rue du Colonel Moll. 75017 Paris
- ASLAM M, ASHQUN M, RAHMAN Q. *In vitro* cytotoxic effects of wollastonites on rat hepatocytes : II Lipid peroxidation and glutathione depletion. *Bull Environ Contam Toxicol* 1992 49 : 547-554
- AUFDERHEIDE M, KNEBEL JW, SCHULTE P. Differences in the sensitivity of hamster and rat lung cells exposed *in vitro* to natural and man-made fibres. *Exp Toxicol Pathol* 1996 48 : 505-507
- AUFDERHEIDE M, RIEBE-IMRE M, STRAUB M, PERAUD A. Differences in the biological effects of crocidolite asbestos and two glass fibres on epithelial lung cells. *Exp Toxicol Pathol* 1994 45: 467-472

AULT JG, COLE RW, JENSEN CG, JENSEN LCW, BACHERT LA, RIEDER CL. Behavior of crocidolite asbestos during mitosis in living vertebrate lung epithelial cells. *Cancer Res* 1995 **55** : 792-798

BARRETT JC. Cellular and molecular mechanisms of asbestos carcinogenicity : implications for biopersistence. *Environ Health Perspect* 1994 **102** (Suppl 5) : 19-23

BARRETT JC, OSHIMURA M, TANAKA N, TSUTSUI T. Role of aneuploidy in early and late stages of neoplastic progression of Syrian hamster embryo cells in culture. In : *Aneuploidy*. Plenum Publishing Corporation, 1985 pp. 523-538

BELLMAN B, MUHLE H, KAMSTRUP O, DRAEGER UF. Investigation on the durability of man-made vitreous fibers in rat lungs. *Environ Health Perspect* 1994 **102** (Suppl 5) : 185-189

BELLMAN B, MUHLE H, POTT F. Investigation of the biodurability and carcinogenicity of different man-made mineral fibres. In JMG Davis, MC Jaurand (Eds) : *Cellular and Molecular Effects of Mineral and Synthetic Dusts and Fibres*. NATO ASI Series, Vol H85, Springer-Verlag, Berlin, 1994, pp. 299-304

BELLMANN B, MUHLE H, POTT F, KÖNIG H, KLÖPPEL H, SPURNY K. Persistence of man-made mineral fibres (MMMF) and asbestos in rat lungs. *Ann Occup Hyg* 1987 **31** : 693-709

BERNSTEIN DM, MAST R, ANDERSON R, HESTERBERG TW, MUSSELMAN R, KAMSTRUP O, HADLEY J. An experimental approach to the evaluation of the biopersistence of respirable synthetic fibers and minerals. *Environ Health Perspect* 1994 **102** (Suppl 5) : 15-18

BERNSTEIN DM, MORSCHIEDT C, GRIMM HG, THÉNEVAZ P, TEICHERT U. Evaluation of soluble fibers using the inhalation biopersistence model, a nine-fiber comparison. *Inhal Toxicol* 1996 **8** : 345-385

BERNSTEIN DM, THEVENAZ Ph, FLEISSNER H, ANDERSON R, HESTERBERG TW, MAST R. Evaluation of the oncogenic potential of man-made vitreous fibres : the inhalation model. *Ann Occup Hyg* 1995 **39** : 661-672

BIGNON J, BERNSTEIN DM, BROCHARD P, MORSCHIEDT C. The relationship between four methods of assessing clearance or toxicity of synthetic mineral fibres with chemical composition. *Ann Occup Hyg* 1997 **41** (Suppl 1) : 304-311

BORM PJA, DRISCOLL K. Particles, inflammation and respiratory tract carcinogenesis. *Toxicol Lett* 1996 **88** : 109-113

BOUTIN C, DUMORTIER P, REY F, VIALLAT JR, De VUYST P. Black spots concentrate oncogenic asbestos fibers in the parietal pleura : thorascopic and mineralogic study. *Am J Respir Crit Care Med* 1996 **153** : 444-449

BRINKMANN OA, MÜLLER KM. What's new in intraperitoneal test on Kevlar (asbestos substitute) ? *Pathol Res Pract* 1989 **185** : 412-417

BROWN RC, CHAMBERLAIN M, DAVIES R, GAFFEN J, SKIDMORE JW. *In vitro* biological effects of glass fibers. *J Environ Pathol Toxicol* 1979 **2** : 1369-1383

BROWN RC, HOSKINS, J. A. L'amiante et les fibres minérales artificielles. *Pollution Atmosphérique* 1992 avril-juin : 10-15

BROWN RC, HOSKINS JA, MILLER K, MOSSMAN BT. Pathogenic mechanisms of asbestos and other mineral fibres. *Mol Aspects Med* 1990 11 : 35-349

BRUCH J, REHN B. Correlation of in vitro and in vivo studies on the bioeffects of mineral particles. In JMG Davis, MC Jaurand (Eds.) : *Cellular and Molecular Effects of Mineral and Synthetic Dusts and Fibres*. NATO ASI Series, Vol H85, Springer-Verlag, Berlin, 1994, pp. 263-272

BRUCH J, REHN B. Relevant differences in pathogenicity of nuisance dusts : model investigations on samples of silicon carbide dusts. *Exp Toxicol Pathol* 1996 48 : 477-480

BUNN WB, BENDER JR, HESTERBERG TW, CHASE GR, KONZEN JL. Recent studies of man-made vitreous fibers. Chronic animal inhalation studies. *J Occup Med* 1993 35 :101-113

CARTHEW P, HILL Rj, EDWARDS RE, LEE PN. Intrapleural administration of fibres induces mesothelioma in rats in the same relative order of hazard as occurs in man after exposure. *Hum Exp Toxicol* 1992 11 : 530-534

CASEY G. Sister-chromatid exchange and cell kinetics in CHO-K1 cells, human fibroblasts and lymphoblastoid cells exposed in vitro to asbestos and glass fibre. *Mutat Res* 1983 116 : 193-377

CASTRANOVA V, PAILES W, JUDY D, BLAKE T, SCHWEGLER-BERRY D, JONES W. In vitro effects of large and small glass fibers on rat alveolar macrophages. *J Toxicol Environ Health* 1996 49 : 357-369

CHAMBERLAIN M, TARMY EM. Asbestos and glass fibres in bacterial mutation tests. *Mutat Res* 1977 43 : 159-164

CHANG MJW, JOSEPH LB, STEPHENS RE, HART RW. Modulation of biological processes by mineral fiber adsorption of macromolecules in vitro. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1990 10 : 89-93

CHERRIE JW, GIBSON H, MCINTOSH C, MACLAREN WM, LYNCH G. Exposure to fine airborne fibrous dust amongst processors of para-aramid. *Ann Occup Hyg* 1995 39 : 403-425

CLAYSON DB, IVERSON F. Cancer risk assessment at the crossroads : the need to turn to a biological approach. *Regul Toxicol Pharmacol* 1996 24 : 45-59

CLOUTER A, HOUGHTON CE, BOWSKILL CA, HOSKINS JA, BROWN RC. An in vitro/in vivo study into the short term effects of exposure to mineral fibres. *Exp Toxicol Pathol* 1996 48 : 484-486

COFFIN DL, COOK PM, CREASON JP. Relative mesothelioma induction in rats by mineral fibers : Comparison with residual pulmonary mineral fiber number and epidemiology. *Inhal Toxicol* 1992 4 : 273-300

COLE RW, AULT JG, HAYDEN JH, RIEDER CL. Crocidolite asbestos fibers undergo size-dependent microtubule-mediated transport after endocytosis in vertebrate lung epithelial cells. *Cancer Res* 1991 51 : 4942-4947

COLLIER CG, MORRIS KJ, LAUNDER KA, HUMPHREYS JA, MORGAN A, EASTES W, TOWNSEND S. The behavior of glass fibers in the rat following intraperitoneal injection. *Regul Toxicol Pharmacol* 1994 20 : S89-S103

DAVIS JMG. A review of experimental evidence for the carcinogenicity of man-made vitreous fibers. *Scand J Work Environ Health* 1986 **12** (Suppl 1) : 12-17

DAVIS JMG. The role of clearance and dissolution determining the durability or biopersistence of mineral fibers. *Environ Health Perspect* 1994 **102** (Suppl 5) : 113-117

DAVIS JMG, DONALDSON K. Respirable industrial fibres : pathology in animal models. *Ann Occup Hyg* 1993 **37** : 227-236

DAVIS JMG, ADDISON J, BOLTON RE, DONALDSON K, JONES AD, WRIGHT A. The pathogenic effects of fibrous ceramic aluminium silicate glass administered to rats by inhalation or intraperitoneal injection. In: *Biological Effects of Man-made Mineral fibres*. World Health Organization 1984 **2** : 303-320

DAVIS JMG, BROWN DM, CULLEN RT, DONALDSON K, JONES AD, MILLER BG, McINTOSH C, SEARL A. A comparison of methods of determining and predicting the pathogenicity of mineral fibers. *Inhal Toxicol* 1996 **8** : 747-770

DONALDSON K. Biological activity of respirable industrial fibres treated to mimic residence in the lung. *Toxicol Lett* 1994 **72** : 299-305

DONALDSON K, BESWICK PH, GILMOUR PS. Free radical activity associated with the surface of particles : a unifying factor in determining biological activity ? *Toxicol Lett* 1996 **88** : 293-298

DONALDSON K, BROWN DM, MILLER BG, BRODY AR. Bromo-deoxyuridine (BRDU) uptake in the lungs of rats inhaling amosite asbestos or vitreous fibres at equal airborne fibre concentrations. *Exp Toxicol Pathol* 1995 **47** : 207-211

DONALDSON K, BROWN RC, BROWN GM. Respirable industrial fibres : mechanisms of pathogenicity. *Thorax* 1993 **48** : 390-395

DONALDSON K, GILMOUR PS, BESWICK PH. Supercoiled plasmid DNA as a model target for assessing the generation of free radicals at the surface of fibres. *Exp Toxicol Pathol* 1995 **47** : 235-237

DONALDSON K, HILL IM, BESWICK PH. Superoxide anion release by alveolar macrophages exposed to respirable industrial fibres : modifying effect of fibre opsonisation. *Exp Toxicol Pathol* 1995 **47** : 229-231

DONALDSON K, MILLER BG. A comparison of alveolar macrophage cytotoxicity and ability to cause inflammation in the mouse peritoneal cavity for a range of different fibre types at equal fibre number. In JMG Davis, MC Jaurand (Eds.) : *Cellular and Molecular Effects of Mineral and Synthetic Dusts and Fibres*. NATO ASI Series, Vol H85, Springer-Verlag, Berlin, 1994, pp. 255-261

DOPP E, NEBE B, HAHNEL C, PAPP T, ALONSO B, SIMKO M, SCHIFFMANN D. Mineral fibers induce apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Pathobiology* 1995 **63** : 213-221

DREW RT, KUSCHNER M, BERNSTEIN DM. The chronic effects of exposure of rats to sized glass fibres. *Ann Occup Hyg* 1987 **31** : 711-729

DRISCOLL KE, HASSENBEIN DG, CARTER JM, KUNKEL SL, QUINLAN TR, MOSSMAN BT. TNF α and increased chemokine expression in rat lung after particle exposure. *Toxicol Lett* 1995 **82/83** : 483-489

DULOUT FN, OLIVERO OA. Anaphase-telophase analysis of chromosomal damage induced by chemicals. *Environ Mutagenesis* 1984 **6** : 299-310

EASTES W, HADLEY JG. A mathematical model of fiber carcinogenicity and fibrosis in inhalation and intraperitoneal experiments in rats. *Inhal Toxicol*. 1996 **8** : 323-343

EASTES W, HADLEY JG. Role of fiber dissolution in biological activity in rats. *Regul Toxicol Pharmacol* 1994 **20** : S104-S112

EPA-560/3-80-001 ; PB81-176778, Washington DC, United States Environmental Protection Agency, 1980, pp. 443-449

EPSTEIN CJ. Mechanisms of the effects of aneuploidy in mammals. *Ann Rev Genet* 1988 **22** : 51-75

EVERITT JL. Mechanisms of fiber-induced diseases : implications for the safety evaluation of synthetic vitreous fibers. *Regul Toxicol Pharmacol* 1994 **20** : S68-S75

EVERITT JL, BERMUDEZ E, MANGUM JB, WONG B, MOSS OR, JANSZEN D, RUTTEN AAA-JJL. Pleural lesions in Syrian golden hamsters and Fischer-344 rats following intrapleural instillation of man-made ceramic or glass fibers. *Toxicol Pathol* 1994 **22** : 229-236

FEIGIN DS. Misconceptions regarding the pathogenicity of silicas and silicates. *J Thorac Imag* 1989 **4** : 68-80

FERON VJ, SCHERRENBURG PM, IMMEL HR, SPIT BJ. Pulmonary response of hamsters to fibrous glass : chronic effects of repeated intratracheal instillation with or without benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis* 1985 **6** : 1495-1499

FORGET G, LACROIX MJ, BROWN RC, EVANS PH, SIROIS P. Response of perfused alveolar macrophages to glass fibers : effect of exposure duration and fiber length. *Environ Res* 1986 **39** : 124-135

FÖRSTER H. Contribution to comparability of in vitro and in vivo man-made mineral fibre (MMMF) durability experiments. *Glastech Ber* 1993 **66** : 255-266

FRAME SR, BROCKMANN M, HAHN FF, SLONE TW, WARHEIT DB. Microscopic review of para-aramid-induced cystic keratinizing squamous lesions in the lungs of rats. *Inhal Toxicol* 1997 **9** : 189-198

FREEDMAN DA, GOLD LS, LIN TH. Concordance between rats and mice in bioassays for carcinogenesis. *Regul Toxicol Pharmacol* 1996 **23** : 225-232

FUNG H, KOW YW, VAN HOUTEN B, MOSSMAN BT. Patterns of 8-hydroxy-deoxyguanosine formation in DNA and indications of oxidative stress in rat and human pleural mesothelial cells after exposure to crocidolite asbestos. *Carcinogenesis* 1997 **18** : 825-832

GALLOWAY SM, AARDEMA MJ, ISHIDATE M, IVETT JL, KIRKLAND DJ, MORITA T, MOSESSO P, SOFUNI T. Report from working group on in vitro tests for chromosomal aberrations. *Mutation Res* 1994 **312** : 241-261

GAO H, BRICK J, ONG SH, MILLER M, WHONG WZ, ONG TM. Selective hyperexpression of c-jun oncoprotein by glass fiber- and silica-transformed BALB/c 3T3 cells. *Cancer Lett* 1997 **112** : 65-69

GAO HG, WHONG WZ, JONES WG, WALLACE WE, ONG T. Morphological transformation induced by glass fibers in BALB/c-3T3 cells. *Teratog Carcinog Mutagen* 1995 **15** : 63-71

GELZLEICHTER TR, BERMUDEZ E, MANGUM JB, WONG BA, EVERITT JI, MOSS OR. Pulmonary and pleural responses in fischer 344 rats following short-term inhalation of a synthetic vitreous fiber.I. Quantitation of lung and pleural fiber burdens. *Fund Appl Toxicol* 1996 **30** : 31-38

GELZLEICHTER TR, BERMUDEZ E, MANGUM JB, WONG BA, MOSS OR, EVERITT JI. Pulmonary and pleural responses in fischer 344 rats following short-term inhalation of a synthetic vitreous fiber.II. Pathobiologic responses. *Fund Appl Toxicol* 1996 **30** : 39-46

GERRITY TR. Regional deposition of gases and particles in the lung : implications for mixtures. *Toxicology* 1995 **105** : 327-334

GHIO AJ, PRITCHARD RJ, LEHMANN JR, WINSETT DW, HATCH GE. Lung inflammation after exposure to non fibrous silicates increases with chelatable [Fe3+]. *J Toxicol Environ Health* 1996 **49** : 11-28

GIBBS AR, POOLEY FD. Analysis and interpretation of inorganic mineral particles in "lung" tissues. *Thorax* 1996 **51** : 327-334

GILMOUR PS, BESWICK PH, BROWN DM, DONALDSON K. Detection of surface free radical activity of respirable industrial fibres using supercoiled FX174 RF1 plasmid DNA. *Carcinogenesis* 1995 **16** : 2973-2979

GOLDSTEIN B, RENDALL REG, WEBSTER I. A comparison of the effects of exposure of baboons to crocidolite and fibrous-glass dusts. *Environ Res* 1983 **32** : 344-359

GOLDSTEIN B, WEBSTER I, RENDALL REG. Changes produced by the inhalation of glass fibre in non-human primates. *WHO/IARC conference*. World Health Organization 1984 **2** : 273-285

GOVERNA M, VALENTINO M, LO MARTIRE N. Biological reactivity of continuous glass fibres :in vitro and in vivo studies. *Med Lav* 1987 **78** : 190-198

GOVERNA M, VALENTINO M, VISONA I, MONACO F, AMATI M, SCANCARELLO G, SCANSETTI G. In vitro biological effects of clay minerals advised as substitutes for asbestos. *Cell Biol Toxicol* 1995 **11** : 237-249

GROSS P, KASCHAK M,TOLKER EB, BABYAK MA, DE TREVILLE RTP. The pulmonary reaction to high concentrations of fibrous glass dust. A preliminary report. *Arch Environ Health* 1970 **20** : 696-704

GRUENERT DC, FINKBEINER WE, WIDDICOMBE JH. Culture and transformation of human airway epithelial cells. *Am J Physiol* 1995 **268** : L347-L360

GUILIANELLI C, BAEZA-SQUIBAN A, LAPART E, MARANO F. Cultured airway epithelium responses to mineral particles : role of the oxidative stress. *Toxicol Lett* 1996 **88** : 39-44

GULDBERG M, CHRISTENSEN VR, KROIS W. Method for determining *in-vitro* dissolution rates of man-made vitreous fibres. *Glastech Ber Sci Technol* 1995 **68** : 181-187

GULUMIAN M, SARDIANOS F, KILROE-SMITH T, OCKERSE G. Lipid peroxidation in microsomes induced by crocidolite fibres. *Chem Biol Interactions* 1983 **44** : 111-118

HADLEY JG, KOTIN P, BERNSTEIN DM. Subacute (28 days) repeated dust inhalation of cellulose building insulation in the rat. *Toxicologist* 1992 **12** : 225 (abstract)

HAMILTON RD, MILLER WC, CHRISTENSEN DR, ANDERSON R, HESTERBERG TW. Characterization of exposure and dose of man made vitreous fiber in experimental studies. *Environ Health Perspect* 1994 **102** (Suppl 5) : 109-112

HAMMAD YY, ATIEH B. Long-term clearance of ceramic fibers from guinea-pig lungs. *Exp Toxicol Pathol* 1995 **47** : 192-194

HAMMAD YY, ATIEH B. Pulmonary deposition of MMMF. *J Aerosol Sci* 1989 **20** : 1329-1332

HART GA, KATHMAN LM, HESTERBERG TW. *In vitro* cytotoxicity of asbestos and man-made vitreous fibers: Roles of fiber length, diameter and composition. *Carcinogenesis* 1994 **15** : 971-977

HART GA, NEWMEN MM, BUNN WB, HESTERBERG TW. Cytotoxicity of refractory ceramic fibres to chinese hamster ovary cells in culture. *Toxicol In Vitro* 1992 **6** : 317-326

HEDDLE JA, HITE M, KIRKHART B, MAVOURNIN K, MACGREGOR JT, NEWEL GW, SALAMONE MF. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* 1983 **123** : 61-118

HESTERBERG TW, BARRETT JC. Dependence of asbestos- and mineral dust-induced transformation of mammalian cells in culture on fiber dimension. *Cancer Res* 1984 **44** : 2170-2180

HESTERBERG TW, BUTTERICK CJ, OSHIMURA M, BRODY AR, BARRETT JC. Role of phagocytosis in syrian hamster cell transformation and cytogenetic effects induced by asbestos and short and long glass fibers. *Cancer Res* 1986 **46** : 5795-5802

HESTERBERG TW, McCONNELL EE, MILLER WC, CHEVALIER J, EVERITT J, THEVENAZ P, FLEISSNER H, OBERDORSTER G. Use of lung toxicity and lung particle clearance to estimate the maximum tolerated dose (MTD) for a fiber glass chronic inhalation study in the rat. *Fundam Appl Toxicol* 1996a **32** : 31-44

HESTERBERG TW, MILLER WC, MUSSELMAN RP, KAMSTRUP O, HAMILTON RD, THEVENAZ P. Biopersistence of man-made vitreous fibers and crocidolite asbestos in the rat lung following inhalation. *Fund Appl Toxicol* 1996b **29** : 267-279

HESTERBERG TW, MILLER WC, McCONNELL EE, CHEVALIER J, HADLEY JG, BERNSTEIN DM, THEVENAZ P, ANDERSON R. Chronic inhalation toxicity of size-separated glass fibers in Fischer-344 rats. *Fund Appl Toxicol* 1993 **20** : 464-476

HILL IM, BESWICK PH, DONALDSON K. Enhancement of the macrophage oxidative burst by immunoglobulin coating of respirable fibres : fiber-specific differences between asbestos and man-made fibers. *Exp Lung Res* 1996 **22** : 133-148

HOSKINS JA, BROWN RC, CAIN K, CLOUTER A, HOUGHTON CE, BOWSKILL CA, HIBBS LR. The construction and validation of a high containment nose-only rodent inhalation facility. *Ann Occup Hyg* 1997 **41** : 51-61

HOSKINS JA, BROWN RC, HOUGHTON CE, BROWN GM. The second messenger system in diseases caused by mineral dusts. In JMG Davis, MC Jaurand (Eds.) : *Cellular and*

Molecular Effects of Mineral and Synthetic Dusts and Fibres. NATO ASI Series, Vol H85, Springer-Verlag, Berlin, 1994, pp.91-108

HOWDEN PJ, FAUX SP. Fibre-induced lipid peroxidation leads to DNA adduct formation in *Salmonella typhimurium* TA104 and rat lung fibroblasts. *Carcinogenesis* 1996a **17** : 413-419

HOWDEN PJ, FAUX SP. Glutathione modulates the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in isolated DNA and mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA100 induced by mineral fibres. *Carcinogenesis* 1996b **17** : 2275-2277

IARC. Monographie n°68, 1997, pp. 409-439

JANSSEN YMW, HEINTZ NH, MARSH JP, BORM PJA, MOSSMAN BT. Induction of c-fos and c-jun proto-oncogenes in target cells of the lung and pleura by carcinogenic fibers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994 **11** : 522-530

JANSSEN YMW, VAN HOUTEN B, BORM PJA, MOSSMAN BT. Biology of disease. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab Invest* 1993 **69** : 261-274

JAU RAND MC. *In vitro* assessment of biopersistence using mammalian cell systems. *Environ Health Perspect* 1994 **102** (Suppl. 5) : 55-59

JAU RAND MC. Mechanisms of fiber-induced genotoxicity. *Environ Health Perspect* 1997 **105** : 1073-1088

JAU RAND MC, YEGLES M, DONG HY, RENIER A, SAINT-ETIENNE L, KHEUANG L, JANSON X, BIGNON J. *In vitro* DNA and chromosome damage produced by some minerals and man-made particles on rat pleural mesothelial cells (RPMC). Mechanisms and relationship with *in vivo* experimental findings. In JMG Davis, MC Jaurand (Eds.) : *Cellular and Molecular Effects of Mineral and Synthetic Dusts and Fibres*. NATO ASI Series, Vol H85, Springer-Verlag, Berlin, 1994, pp. 183-188

JOHNSON NF. The utility of animal inhalation studies to assess the risk of mineral fiber-induced pulmonary cancer. *Prog Clin Biol Res* 1992 **374** : 19-36

JOHNSON NF, HAHN FF. Induction of mesothelioma after intrapleural inoculation of F344 rats with silicon carbide whiskers or continuous ceramic filaments. *Occup Environ Med* 1996 **53** : 813-813

KANE AB. Animal models of mesothelioma induced by mineral fibers : implications for human risk assessment. *Prog Clin Biol Res* 1992 **374** : 37-50

KEELING B, HOBSON J, CHURG A. Effects of cigarette smoke on epithelial uptake of non-asbestos mineral particles in tracheal organ culture. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993 **9** : 335-340

KELLY DP, MERRIMAN EA, KENNEDY GL Jr, LEE KP. Deposition, clearance and shortening of Kevlar para-aramid fibrils in acute, subchronic and chronic inhalation studies in rats. *Appl Toxicol* 1993 **21** : 345-354

KIER LD, BRUSICK DJ, AULETTA AE, VON HALLE ES, BROWN MM, SIMMON VF, DUNKEL V, MCCANN J, MORTELMANS K, PRIVAL M, RAO TK, RAY V. The *Salmonella typhimurium*/mammalian microsomal assay. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox program. *Mutat Res* 1986 **168** : 69-240

KOSHI K, KOHYAMA N, MYOJO T, FUKUDA K. Cell toxicity, hemolytic action and clastogenic activity of asbestos and its substitutes. *Ind Health* 1991 **29** : 37-56

LAMBRÉ CR, AUFDERHEIDE M, BOLTON RE, FUBINI B, HAAGSMAN HP, HEXT PM, JORISSEN M, LANDRY Y, MORIN JP, NEMERY B, NETTESHEIM P, PAULUHN J, RICHARDS YJ, VICKERS AEM, WU R. *In vitro* tests for respiratory toxicity. The report and recommendations of ECVAM workshop 18. *ATLA* 1996 **24** : 671-681

LE BOUFFANT L, DANIEL H, HENIN JP, MARTIN JC, NORMAND C, TICHOUX G, TROLARD F. Experimental study on long-term effects of inhaled MMMF on the lungs of rats. *Ann Occup Hyg* 1987 **31** : 765-790

LE BOUFFANT L, HENIN JP, MARTIN JC, NORMAND C, TICHOUX G, TROLARD F. Distribution of inhaled MMMF in the rat lung - long-term effects. *Effects of Man-made Mineral Fibres*. World Health Organization 1984 **2** : 143-167

LEANDERSON P, SÖDERKVIST P, TAGESSON C. Hydroxyl radical mediated DNA base modification by manmade mineral fibres. *Br J Ind Med* 1989 **46** : 435-438

LEANDERSON P, SÖDERKVIST P, TAGESSON C, AXELSON O. Formation of 8-hydroxy-deoxyguanosine by asbestos and man made mineral fibers. *Br J Ind Med* 1988 **45** : 309-311

LEANDERSON P, TAGESSON C. Cigarette smoke potentiates the DNA-damaging effect of man-made mineral fibers. *Am J Ind Med* 1989 **16** : 697-706

LEANDERSON P, TAGESSON C. Hydrogen peroxide release and hydroxyl radical formation in mixtures containing mineral fibres and human neutrophils. *Br J Ind Med* 1992 **49** : 745-749

LEE KP, BARRAS CE, GRIFFITH FD, WARITZ RS, LAPIN CA. Comparative pulmonary responses to inhaled inorganic fibers with asbestos and fiberglass. *Environ Res* 1981 **24** : 167-191

LEE KP, KELLY DP, O'NEAL FO, STADLER JC, KENNEDY GL Jr. Lung response to ultrafine Kevlar aramid synthetic fibrils following 2-year inhalation exposure in rats. *Appl Toxicol* 1988 **11** : 1-20

LEIKAUF GD, FINK SP, MILLER ML, LOCKEY JE, DRISCOLL KE. Refractory ceramic fibers activate alveolar macrophage eicosanoid and cytokine release. *J Appl Physiol* 1995 **78** : 164-171

LEMAIRE I, DIONNE PG, NADEAU D, DUNNIGAN J. Rat lung reactivity to natural and man-made fibrous silicates following short-term exposure. *Environ Res* 1989 **48** : 193-210

LIBBUS BL, ILLENYE SA, CRAIGHEAD JE. Induction of DNA strand breaks in cultured rat embryo cells by crocidolite asbestos as assessed by nick translation. *Cancer Res* 1989 **49** : 5713-5718

LINNAINMAA K, PELIN K, VANHALA E, TUOMI T, PICCOLI C, FITZGERALD DJ, YAMASAKI H. Gap junctional intercellular communication of primary and asbestos-associated malignant human mesothelial cells. *Carcinogenesis* 1993 **14** : 1597-1602

LJUNGMAN AG, LINDAHL M, TAGESSON C. Asbestos fibres and man made mineral fibres : induction and release of tumour necrosis factor-alpha from rat alveolar macrophages. *Occup Environ Med* 1994 **51** : 777-783

LUCHTEL DL, MARTIN TR, BOATMAN ES. Response of the rat lung to respirable fractions of composite fiber-epoxy dusts. *Environ Res* 1989 **48** : 57-69

LUOTO K, HOLOPAINEN M, KANGAS J, KALLIOKOSKI P, SAVOLAINEN K. The effect of fiber length on the dissolution by macrophages of rockwool and glasswool fibres. *Environ Res* 1995 **70** : 51-61

LUOTO K, HOLOPAINEN M, SARATAHO M, SAVOLAINEN K. Comparison of cytotoxicity of man-made vitreous fibres. *Am Occup Hyg* 1997 **41** : 37-50

LUOTO K, HOLOPAINEN M, SAVOLAINEN K. Scanning electron microscopic study on the changes in the cell surface morphology of rat alveolar macrophages after their exposure to man-made vitreous fibers. *Environ Res* 1994 **66** : 198-207

MALTONI C, MINARDI F, SOFFRITTI M, LEFEMINE G. Long-term carcinogenicity bioassays on industrial chemicals and man-made mineral fibers, at the Bentivoglio(BT) laboratories of the Bologna Institute of Oncology : premises, programs, and results. *Toxicol Ind Health* 1991 **7** : 63-94

MAPLES KR, JOHNSON NF. Fiber-induced hydroxyl radical formation - correlation with mesothelioma induction in rats and humans. *Carcinogenesis* 1992 **13** : 2035-2039

MARSH JP, MOSSMAN BT, DRISCOLL KE, SCHINS RF, BORM PJA. Effects of aramid, a high strength synthetic fiber, on respiratory cells in vitro. *Drug Chem Toxicol* 1994 **17** : 75-92

MAST RW, HESTERBERG TW, GLASS LR, McCONNELL EE, ANDERSON R, BERNSTEIN DM. Chronic inhalation and biopersistence of refractory ceramic fiber in rats and hamsters. *Environ Health Perspect* 1994 **102** : 207-209

MAST RW, McCONNELL EE, ANDERSON R, CHEVALIER J, KOTIN P, BERNSTEIN DM, GLASS LR, MILLER WC, HESTERBERG TW. Studies on the chronic toxicity (inhalation) of four types of refractory ceramic fiber in male fischer 344 rats. *Inhal Toxicol* 1995a **7** : 425-467

MAST RW, McCONNELL EE, HESTERBERG TW, CHEVALIER J, KOTIN P, THEVENAZ P, BERNSTEIN DM, GLASS LR, MILLER W, ANDERSON R. Multiple-dose chronic inhalation toxicity study of size-separated kaolin refractory ceramic fiber in male fisher 344 rats. *Inhal Toxicol* 1995b **7** : 469-502

MAUDERLY JL, CHANG YS, SLIPES MB. Particle overload in toxicological studies. Friend or foe ? *J Aerosol Med* 1990 **3** : 169-187

MAUDERLY JL, SNIPES MB, BARR EB, BELINSKY SA, BOND JA. Pulmonary toxicity of inhaled diesel exhaust and carbon black in chronically exposed rats. Part I : Neoplastic and nonneoplastic lungs lesions. Research Report No. 68, Cambridge, MA, Health Effects Institute, 1994

McCLELLAN RO, HESTERBERG TW. Role of biopersistence in the pathogenicity of man-made fibers and methods for evaluating biopersistence : A summary of two round-table discussions. *Environ Health Perspect* 1994 **102** : 277-283

McCLELLAN RO, MILLER FJ, HESTERBERG TW, WARHEIT DB, BUNN WB, KANE AB, LIPPMANN M, MAST RW, McCONNELL EE, REINHARDT CF. Approaches to evaluating the toxicity and carcinogenicity of man-made fibers : summary of a workshop held november 11-13, 1991, Durham, North Carolina. *Regul Toxicol Pharmacol* 1992 **16** : 321-364

McCONNELL EE. Advantages and limits of *in vivo* screening test. *Ann Ocup Hyg* 1995 **39** : 727-735

McCONNELL EE. Historical review of the rodent bioassay and future directions. *Regul Toxicol Pharmacol* 1995 **21** : 38-43

McCONNELL EE. Synthetic vitreous fibers - Inhalation studies. *Regul Toxicol Pharmacol* 1994 **20** : S22-S34

McCONNELL EE, KAMSTRUP O, MUSSELMAN R, HESTERBERG TW, CHEVALIER J, MILLER WC, THEVENAZ P. Chronic inhalation study of size-separated rock and slag wool insulation fibers in fischer 344/N rats. *Inhal Toxicol* 1994 **6** : 571-614

McCONNELL EE, MAST RW, HESTERBERG TW, CHEVALIER J, KOTIN P, BERSTEIN DM, THEVENAZ P, GLASS LR, ANDERSON R. Chronic inhalation toxicity of a kaolin-based refractory ceramic fiber in Syrian golden hamsters. *Inhal Toxicol* 1995 **7** : 503-532

McCONNELL EE, WAGNER JC, SKIDMORE JW, MOORE JA. A comparative study of the fibrogenic and carcinogenic effects of UICC Canadian chrysotile B asbestos and glass microfibre (JM 100). WHO/IARC Conference ; Copenhagen. *World Health Organization* 1984 **2** : 235-251

MIKALSEN SO, RIVEDAL E, SANNER T. Morphological transformation of Syrian hamster embryo cells induced by mineral fibres and the alleged enhancement of benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis* 1988 **9** : 891-899

MILLER K, HUDSPITH BN, MEREDITH C. The effect of MMMF on the kinetics of cytokine expression in murine lung populations : role in fibre-induced disease. In JMG Davis, MC Jaurand (Eds.) : *Cellular and Molecular Effects of Mineral and Synthetic Dusts and Fibres*. NATO ASI Series, Vol H85 Springer-Verlag, Berlin. 1994, pp. 79-90

MISHRA A, LIU JY, BRODY AR, MORRIS GF. Inhaled asbestos fibers induce p53 expression in the rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997 **16** : 479-485

MOHR U, POTT F, VONNAHME EJ. Morphological aspects of mesotheliomas after intratracheal instillations of fibrous dusts in Syrian golden hamsters. *Exp Path* 1984 **26** : 179-183

MONCHAUX G, BIGNON J, JAURAND MC, LAFUMA J, SEBASTIEN P, MASSE R, HIRSCH A, GONI J. Mesotheliomas in rats following inoculation with acid-leached chrysotile asbestos and other mineral fibres. *Carcinogenesis* 1981 **2** : 229-236

MOORMAN WJ, MITCHELL RT, MOSBERG AT, DONOFRIO DJ. Chronic inhalation toxicology of fibrous glass in rats and monkeys. *Ann Occup Hyg* 1988 **32** (Supp 1) : 757-767

MORGAN A. Deposition of inhaled asbestos and man-made mineral fibres in the respiratory tract. *Ann Occup Hyg* 1995 **39** : 747-758

MORGAN A. *In vivo* evaluation of chemical biopersistence of man-made mineral fibers. *Env Health Perspect* 1994 **102** (Suppl 5) : 127-131

MORGAN A, BLACK A, EVANS N, HOLMES A, PRITCHARD JN. Deposition of sized glass fibres in the respiratory tract of the rat. *Ann Occup Hyg* 1980 **23** : 353-366

MORGAN A, COLLIER CG, KELLINGTON JP. Distribution of glass fibers in the peritoneal cavity of the rat following administration by intraperitoneal injection. *J Toxicol Environ Health* 1993a **38** : 245-256

MORGAN A, COLLIER CG, MORRIS KJ, LAUNDER KA. A radioactive tracer technique to determine *in vivo* the number of fibers in the lungs of rats following their administration by intratracheal instillation. *Environ Res* 1993b **63** : 182-190

MORGAN A, HOLMES A. Solubility of rockwool fibres *in vivo* and the formation of pseudo-asbestos bodies. *Ann Occup Hyg* 1984 **28** : 307-314

MORGAN A, HOLMES A, DAVISON W. Clearance of sized glass fibres from the rat lung and their solubility *in vivo*. *Ann Occup Hyg* 1982 **25** : 317-331

MORGAN I, EVANS JC, EVANS RJ, HOUNAM RF, HOLMES A, DOYLE SG. Studies on the deposition of inhaled fibrous material in the respiratory tract of the rat and its subsequent clearance using radioactive tracer techniques. II. Deposition of the UICC standard reference samples of asbestos. *Environ Res* 1975 **10** : 196-207

MORRIS KJ, COLLIER CG, EASTES W, LAUNDER KA. Comparison of biopersistence of experimental glass fibres in the lung and peritoneal cavity. *Exp Toxicol Pathol* 1996 **48** : 490-493

MORROW PE, HASEMAN JK, HOBBS CH, DRISCOLL KE, VU V, OBERDORSTER G. The maximum tolerated dose for inhalation bioassays : toxicity vs overload. *Fundam Appl Toxicol* 1996 **29** : 155-167

MOSSMAN BT. In vitro studies on the biologic effects of fibers : correlation with in vivo bioassays. *Environ Health Perspect* 1990 **88** : 319-322

MOSSMAN BT, SESKO AM. In vitro assays to predict the pathogenicity of mineral fibers. *Toxicology* 1990 **60** : 53-61

MUHLE H, BELLMAN B. Biopersistence of man-made vitreous fibres. *Ann Occup Hyg* 1995 **19** : 655-660

MUHLE H, BELLMANN B, POTT F. Comparative investigations of the biodurability of mineral fibers in the rat lung. *Environ Health Perspect* 1994 **102** (Suppl 5) : 163-138

MUHLE H, POTT F, BELLMANN B, TAKENAKA S, ZIEM U. Inhalation and injection experiments in rats to test the carcinogenicity of MMMF. *Ann Occup Hyg* 1987 **31** : 755-764

MUHLE U, ERNST U, BELLMANN B. Investigation of the durability of cellulose fibres in rat lungs. *Ann Occup Hyg* 1997 **41** (Suppl 1) : 184 -188

MUSSELMAN RP, MILLER WC, EASTES W, HADLEY JG, KAMSTRUP O, THEVENAZ P, HESTERBERG T. Biopersistence of man-made vitreous fibers and crocidolite fibers in rat lungs following short-term exposures. *Environ Health Perspect* 1994 **102** (Suppl.5) : 139-143

NAGASE M, ABE Y. Toxicity of silica-containing calcium phosphate glasses. *Biomaterials* 1992 **14** : 1039

NATARAJAN AT. Mechanisms for induction of mutations and chromosome alterations. *Environ Health Perspect* 1993 **101** : 225-229

OBERDORSTER G, COS C, GELEIN R, FERIN J, CORSON N, MERCER P, NGYEN K. Intratracheal instillation vs.intratracheal inhalation of particles for measuring effects on particulate lung retention. *J Aerosol Med* 1993 **8** : 49

OBERDÖRSTER G, FERIN J, LEHNERT BE. Correlation between particle size, *in vivo* particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect* 1994 **102** (Suppl 5) : 173-179

- OEHLERT GW. A reanalysis of the Stanton *et al.* pleural sarcoma data. *Environ Res* 1991 **54** : 194-205
- OGURA H, TAKEUCHI T, MORIMOTO K. A comparison of the 8-hydroxydeoxyguanosine, chromosome aberrations and micronucleus techniques for the assessment of the genotoxicity of mercury compounds in human blood lymphocytes. *Mutat Res* 1996 **340** : 175-182
- OKABE K, KRISHNA-MURTHY GG, VALLARINO JA, SKORNIK WA, HATCH VC, KATLER MR, TSUDA A, GODELSKI JJ. Deposition efficiency of inhaled fibers in the hamster lung. *Inhal Toxicol* 1997 **9** : 85-98
- ONG T, LIU Y, ZHONG BZ, JONES WG, WHONG WZ. Induction of micronucleated and multinucleated cells by man-made fibers in vitro in mammalian cells. *J Toxicol Environ Health* 1997 **50** : 409-414
- OSGOOD CJ. Refractory ceramic fibers (RCFs) induce germline aneuploidy in *Drosophila* oocytes. *Mutat Res* 1994 **324** : 23-27
- OSHIMURA M, BARRETT JC. Chemically induced aneuploidy in mammalian cells : mechanisms and biological significance in cancer. *Environ Mutagenesis* 1986 **8** : 129-59
- OSHIMURA M, HESTERBERG TM, TSUTSUI T, BARRETT JC. Correlation of asbestos-induced cytogenetic effects with cell transformation of Syrian embryo cells in culture. *Cancer Res* 1984 **44** : 5017-5022
- PAULUHN J, BURY D, FÖST U, GAMER A, HOERNICKE E, HOFMANN T, KUNDE M, NEUSTADT T, SCHLEDE E, SCHIERLE H, WETTIG K, WESTPHAL D. Acute inhalation toxicity testing : considerations of technical and regulatory aspects. *Arch Toxicol* 1996 **71** : 1-10
- PELIN K, HUSGAFVEL-PURSIAINEN K, VALLAS M, VANHALA E, LINNAINMAA K. Cytotoxicity and anaphase aberrations induced by mineral fibres in cultured human mesothelial cells. *Toxicol In Vitro* 1992 **6** : 445-450
- PELIN K, KIVIPENSAS P, LINNAINMAA K. Effects of asbestos and man-made vitreous fibers on cell division in cultured human mesothelial cells in comparison to rodent cells. *Environ Mol Mutag* 1995 **25** : 118-125
- PEPELKO WE. Effect of exposure route on potency of carcinogens. *Regul Toxicol Pharmacol* 1991 **13** : 3-17
- PEPELKO WE. Evaluation of the carcinogenic risk of biochemically inert insoluble particles by the EPA using rat inhalation data. *Particulate Sci Tech* 1996 **14** : 123-134
- PIGOTT GH, GASKELL BA, ISHMAEL J. Effects of long term inhalation of alumina fibres in rats. *Br J Exp Pathol* 1981 **62** : 323-331
- PIGOTT GH, ISHMAEL J. An assessment of the fibrogenesis potential of two refractory fibres by intraperitoneal injection in rats. *Toxicol Lett* 1981 **8** : 153-163
- PIGOTT GH, ISHMAEL J. The effects of intrapleural injections of alumina and aluminosilicate (ceramic) fibres. *Int J Exp Pathol* 1992 **73** : 137-146
- POTT F. Neoplastic findings in experimental asbestos studies and conclusions for fiber carcinogenesis in human. *Ann NY Acad Sci* 1991 **643** : 205-218

POTT F. Results of animal experiments on the carcinogenic effect of fibrous dusts and their interpretation with regard to carcinogenesis in human. *Zbl Bakt Hyg J Abt Org B* 1976 **162** : 467-505

POTT F, ROLLER M. Carcinogenicity of synthetic fibres in experimental animals : its significance for workers. *J Occup Health Safety* 1996 **12** : 333-339

POTT F, ROLLER M, ZIEM U, REIFFER FJ, BELMANN B, ROSENBRUCH M, HUTH F. Carcinogenicity studies on natural and man-made fibres with the intraperitoneal test. In J Bignon, J Peto, R Saracci (Eds.): *Non-occupational Exposure to Mineral fibres*. IARC Scientific Publications, Lyon, 1989 **90** : 173-179

POTT F, SCHLIPKÖTER HW, ZIEM U, SPURNY K, HUTH F. New results from implantation experiments with mineral fibres. *Biological Effects of Man-made Mineral Fibres*. World Health Organization 1984 **2** : 286-302

POTT F, ZIEM U, REIFFER F, HUTH F, ERNST H, MOHR U. Carcinogenicity studies of fibres, metal compounds and some other dusts in rats. *Exp Path* 1987 **32** : 129-152

PRITCHARD JN, HOLMES A, EVANS JC, EVANS N, EVANS RJ, MORGAN A. The distribution of dust in the rat lung following administration by inhalation and by single intratracheal instillation. *Environ Res* 1985 **36** : 268-297

REINHARDT CF. Toxicology of aramid fibers. *Proceedings of the National Workshop on substitutes for asbestos*, Arlington, VA, July 14-16, 1980

REISS U, TAPPEL AL, CHIO KS. DNA-malonaldehyde reaction : formation of fluorescent products. *Biochem Biophys Res Commun* 1972 **48** : 921-926

RENIER A, LEVY F, PILLIERE F, JAURAND MC. Unscheduled DNA synthesis in rat pleural mesothelial cells treated with mineral fibres or benzo[a]pyrene. *Mutat Res* 1990 **241** : 361-367

RIEBE-IMRE M, AUFDERHEIDE M, EMURA M, STRAUB M, ROLLER M, MOHR U, POTT F. Comparative studies with natural and man-made mineral fibres in vitro and in vivo. In JMG Davis, MC Jaurand (Eds.): *Cellular and Molecular Effects of Mineral and Synthetic Dusts and Fibres*. NATO ASI Series, Vol H85, Springer-Verlag, Berlin 1994, pp. 273-284

ROGGLI VL, BRODY AR. Changes in numbers and dimensions of chrysotile asbestos fibers in lungs of rats following short-term exposure. *Exp Lung Res* 1984 **7** : 133-147

ROGGLI VL, GEORGE MH, BRODY AR. Clearance and dimensional changes of crocidolite asbestos fibers isolated from lungs of rats following short-term exposure. *Env Res* 1987 **42**

ROLLER M, POTT F, KAMINO K, ALTHOFF GH, BELLMANN B. Results of current intraperitoneal carcinogenicity studies with mineral and vitreous fibres. *Exp Toxicol Pathol* 1996 **48** : 3-12

ROSSITER CE, CHASE JR. Statistical analysis of results of carcinogenicity studies of synthetic vitreous fibres at Research and Consulting Company, Geneva. *Ann Occup Hyg* 1995 **39** : 759-769

SCHULTZ M. Comparative pathology of dust-induced pulmonary lesions : significance of animal studies to humans. *Inhal Toxicol* 1996 **8** : 433-456

- SEARL A. A comparative study of the clearance of respirable para-aramid, chrysotile and glass fibres from rat lungs. *Ann Occup Hyg* 1997 **41** : 217-233
- SEBASTIEN P, JANSON X, GAUDICHET A, HIRSCH A, BIGNON J. Asbestos retention in human respiratory tissues : comparative measurements in lung parenchyma and in patients pleura. In JC Wagner (Ed.) : *Biological Effects of Mineral fibers*. IARC Scientific Publications 1980 pp. 237-246
- SESKO AM, MOSSMAN BT. Sensitivity of hamster tracheal epithelial cells to asbestiform minerals modulated by serum and by transforming growth factor. *Cancer Res* 1989 **49** : 2743-2749
- SHAW G. An evaluation of molecular biological and cytogenetic testing for determination of human risk from exposure to chemicals present in contaminated sites. *Environ Carcin Ecotox Rev* 1995 **C13** : 75-103
- SINCOCK AM, DELHANTY JDA, CASEY G. A comparison of the cytogenetic response to asbestos and glass fibre in Chinese hamster and human cell lines - Demonstration of growth inhibition in primary human fibroblasts. *Mutat Res* 1982 **101** : 257-268
- SMITH DM, ORTIZ LW, ARCHULETA RF, JOHNSON NF. Long-term health effects in hamsters and rats exposed chronically to man-made vitreous fibres. *Ann Occup Hyg* 1987 **31** : 731-754
- STALLARD N, WHITEHEAD A. An alternative approach to the analysis of animal carcinogenicity studies. *Regul Toxicol Pharmacol* 1996 **23** : 244-248
- STANTON F, LAYARD M, TEGERIS A, MILLER E, MAY M, KENT E. Tumorigenicity of fibrous glass : Pleural response in the rat in relation to fiber dimension. *J Natl Cancer Inst* 1977 **58** : 587-603
- STANTON MF, LAYARD M, TEGERIS A, MILLER E, MAY M, MORGAN E, SMITH A. Relation of particle dimension to carcinogenicity in amphibole asbestoses and other fibrous minerals. *J Natl Cancer Inst* 1981 **67** : 965-975
- STRÜBEL G, FRAIJ B, RÖDELSPERGER K, WOITOWITZ HJ. Letter to the Editor. *Am J Ind Med* 1986 **10** : 101-102
- TANAKA I, OYABU T, ISHIMATSU S, HORI H, HIGASHI T, YAMATO H. Pulmonary deposition and clearance of glass fiber in rat lungs after long-term inhalation. *Environ Health Perspect* 1994 **102** (Suppl 5) : 215-216
- VAUGHAN GL, TRENTLY SA. The toxicity of silicon carbide whiskers, a review. *J Environ Sci Health* 1996 **31** : 2033-2054
- VU V, BARRETT JC, ROY-CROFT J, SCHUMAN L, DANKOVIC D, BARON P, MARTONEN T, PEPELKO W, LAI D. Chronic inhalation toxicity and carcinogenicity testing of respirable fibrous particles. *Regul Toxicol Pharmacol* 1996 **24** : 202-212
- VU VT, DEARFIELD KL. Biological effects of fibrous materials in experimental studies and related regulatory aspects. Effects of fibers in experimental studies. In : *Fiber Toxicology*. Academic. Press Inc 1993, pp. 449-492
- WAGNER JC, BERRY G, TIMBRELL V. Mesothelioma in rats after inoculation with asbestos and other materials. *Br J Cancer* 1973 **28** : 173-185

WAGNER JC, BERRY GB, HILL RJ, MUNDAY DE, SKIDMORE JW. Animal experiments with MMM(V)F - effects of inhalation and intrapleural inoculation in rats. WHO/IARC Conference. World Health Organization 1984 2 : 209-233

WARHEIT DB, GAVETT SH, YUEN IS, HARTSKY MA. Comparisons of in vitro cytotoxicity results with in vivo pulmonary effects following inhalation exposures to a variety of mineral dusts : how well do they compare ? In JMG Davis, MC Jaurand (Eds.) : *Cellular and Molecular Effects of Mineral and Synthetic Dusts and Fibres*. NATO ASI Series, Vol H85, Springer-Verlag, Berlin 1994, pp. 325-336

WARHEIT DB, HARTSKY MA, BUTTERICK CJ, FRAME SR. Pulmonary toxicity studies with man-made organic fibres : preparation and comparisons of size-separated para-aramid with chrysotile asbestos fibres. In H Thomas, R Hess, F Wachter (Eds.) : *Toxicology of industrial Compounds*. Taylor and Francis, London 1995, pp. 119-130

WARHEIT DB, HARTSKY MA, FRAME SR. Pulmonary effects in rats inhaling size-separated chrysotile asbestos fibres or p-aramid fibrils : differences in cellular proliferative responses. *Toxicol Lett* 1996a 88 : 287-292

WARHEIT DB, HARTSKY MA, FRAME SR, BUTTERICK CJ. Comparison of pulmonary effects in rats exposed to size-separated preparations of para-aramid or chrysotile asbestos fibers after 2-week inhalation exposures. In JMG Davis, MC Jaurand (Eds.) : *Cellular and Molecular Effects of Mineral and Synthetic Dusts and Fibres*. NATO ASI Series, Vol H85, Springer-Verlag, Berlin 1994, pp : 285-298

WARHEIT DB, HARTSKY MA, McHUGH TA, KELLAR KA. Biopersistence of inhaled organic and inorganic fibers in the lung of rat. *Environ Health Perspect* 1994 102 (Suppl 5) : 151-157

WARHEIT DB, OVERBY LH, GEORGE G, BRODY AR. Pulmonary macrophages are attracted to inhaled particles through complement activation. *Exp Lung Res* 1998 14 : 51-66

WARHEIT DB, SNAJDR SI, HARTSKY MA, FRAME SR. Pulmonary responses to inhaled para-aramid fibrils in hamsters : evidence of biodegradability in the lungs of a second rodent species. *Inhal Toxicol* 1996b 110 : 1-6

YAMATO H, HORI H, TANAKA I, HIGASHI T, MORIMOTO Y, KIDO M. Retention and clearance of inhaled ceramic fibres in rat lungs and development of a dissolution model. *Occup Env Med* 1994 51 : 275-280

YAMATO H, TANAKA I, HIGASHI T, KIDO M. Clearance of inhaled ceramic fibers from rat lungs. *Environ Health Perspect* 1994 102 (Suppl 5) : 169-171

YAMATO H, TANAKA I, HIGASHI T, KIDO M. Determinant factor for clearance of ceramic fibres from rat lung. *Br J Ind Med* 1992 49 : 182-185

YEGLES M, JANSON X, DONG HY, RENIER A, JAURAND MC. Role of fibre characteristics on cytotoxicity and induction of anaphase/telophase aberrations in rat pleural mesothelial cells *in vitro*. Correlations with *in vivo* animal findings. *Carcinogenesis* 1995 16 : 2751-2758

Yu CP, DING YJ, OBERDORSTER G, MAST RM, MAXIM LD, UTELL MJ. Retention modeling of refractory ceramic fibers (RCF) in humans. *Regul Toxicol Pharmacol* 1997 25 : 18-25

Annexes

Échelle de gradation des anomalies pathologiques

Pathologie		Grade	Description
Changement cellulaire	Normal	1	Pas de lésion détectée
	Minimal	2	Quelques macrophages dans la lumière des bronchioles terminales et les alvéoles
	Faible	3	Présence d'un épithélium cuboïdal bordant les alvéoles proximaux. Pas de collagène mais des fibres de réticuline peuvent être présentes dans l'interstitium, à la jonction bronchiolo-alvéolaire. Les macrophages sont bien évidents ; des cellules mononucléées peuvent être présentes dans l'interstitium.
Fibrose	Minimale	4	Dépôt de collagène minimum à la jonction bronchiolo-alvéolaire ; bronchiolisation augmentée ; débris mucoïdes associés évoquant un aspect glandulaire
	Faible	5	Lésions décrites dans le grade 4 étendues par des liens interlobulaires
	Modérée	6	Consolidation précoce ; diminution du parenchyme
	Sévère	7	Fibrose marquée et consolidation
	Sévère	8	Obstruction complète de la plupart des voies aériennes

Cette échelle a été établie selon les recommandations présentées à la conférence WHO « Biologic effects of man-made mineral fibers » (McConnell *et al.* 1984)

Réactions inflammatoires et fibres

La pathogénicité des fibres, de manière générale et plus particulièrement dans le cadre de leur potentiel fibrosant et de la cancérogenèse pleuro-broncho-pulmonaire, a été reliée à des effets cellulaires directs des fibres et à des effets indirects tels que ceux résultant d'une réaction inflammatoire aux fibres (Brody 1993 ; Weitzman & Graceffa 1984 ; Zalma *et al.* 1988). Ces derniers sont l'objet de cette annexe.

Introduction

Les réactions inflammatoires, depuis la plus haute Antiquité, sont connues pour s'exprimer par une symptomatologie comportant douleur, rougeur, chaleur, œdème et, souvent, insuffisance fonctionnelle de l'organe enflammé

(Russo-Marie *et al.* 1998). Il est clair, actuellement, que les éléments de cette symptomatologie sont souvent si faiblement exprimés qu'ils peuvent passer cliniquement inaperçus, et ce, d'autant qu'ils se développent dans un organe profond tel que le tractus broncho-pulmonaire. L'installation d'une réaction inflammatoire associe deux processus : l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux capillaires et la transmigration des leucocytes du sang vers les tissus, sièges de l'inflammation. Ces deux réponses sont déclenchées par les médiateurs moléculaires, dits de l'inflammation, eux-mêmes induits par des stimulus, le plus souvent d'origine exogène, tels que des fibres de substitution à l'amiante, objet de cette analyse.

Le processus inflammatoire déclenché par des stimulus pathogènes est bénéfique dans la grande majorité des cas. Ce processus, en effet, par l'augmentation de la perméabilité vasculaire et de l'œdème qui en découle, conduit à la dilution locale des stimulus pathogènes ; l'ensemble, œdème et stimulus, est secondairement drainé par le système lymphatique (Gerrity 1995). Parallèlement à l'exsudation liquidienne à partir du sang, on observe une transmigration des leucocytes et notamment des cellules phagocytaires. Pour atteindre ce résultat, les leucocytes du sang circulant adhèrent, dans un premier temps, à l'endothélium des capillaires veineux, puis le traversent (diapédèse) et gagnent enfin, par un déplacement bien orienté (chimiotactisme), l'agresseur pathogène. Les cellules phagocytaires (monocytes, macrophages et granulocytes) englobent ensuite les particules, dégradent et solubilisent celles qui sont sensibles à leurs systèmes enzymatiques et transportent les particules non dégradables ou les produits de dégradation dans des zones d'élimination telles que le tube digestif et les voies aériennes (Brain *et al.* 1994 ; Okabe *et al.* 1997). Kane (1991) a montré que le blocage de la clairance lymphatique rend très inflammatoires et cancérogènes des fibres courtes normalement inoffensives lors de leur injection intrapéritonéale chez la souris. Cette donnée souligne le fait, bien établi par ailleurs, que dans certaines conditions une réaction inflammatoire peut devenir nocive quand elle persiste ou se manifeste de manière inappropriée. Dans ces situations, il a donc été suggéré que la réaction inflammatoire déclenchée par les fibres ne se limitait pas à leur épuration mais induisait fibrose, mésothéliome et cancer broncho-pulmonaire (Brody 1993 ; Weitzman & Graceffa 1984 ; Zalma *et al.* 1988). L'inflammation chronique, en effet, a été incriminée dans de nombreux processus pathogènes tels que les fibroses induites par des particules (silice) ou des fibres d'amiante (Craighead & Mossman 1982) et dans les cancers qui se développent au cours de maladies telles que les colites ulcéreuses (Deuroede *et al.* 1971), les shistozomiasés (Kantor *et al.* 1988) et les cholécystites chroniques (Diehl 1983). De plus, les cellules phagocytaires, qui sont toujours présentes dans les foyers inflammatoires, ont des effets génotoxiques sur les cellules de mammifères et sur les bactéries (Jaurand 1991). Des particules peu solubles, mises en contact avec de l'épithélium pulmonaire de rat, qu'elles soient toxiques (silice) ou non (noir de charbon), induisent une réaction inflammatoire (nombre élevé de leucocytes dans le lavage broncho-alvéolaire). Le degré d'inflammation est

corrélé au nombre de mutations observées sur le gène HPRT* des cellules épithéliales (Born 1994 ; Driscoll *et al.* 1994 ; Driscoll *et al.* 1995).

Il a donc été suggéré que la réaction inflammatoire est cruciale dans la séquence des événements qui, de l'interaction initiale des fibres inhalées avec les cellules épithéliales et les macrophages, conduit au développement de la fibrose (Gauldie *et al.* 1993) et du cancer (Dungworth *et al.* 1994).

Les questions posées ici sont au nombre de deux. La première, dont la réponse est clairement oui, concerne la capacité des fibres à induire une réaction inflammatoire broncho-pulmonaire et pleurale. Deuxièmement, la réaction inflammatoire, induite par les fibres, est-elle uniquement bénéfique ou peut-elle devenir nocive ? Cette seconde question est importante si on accepte l'hypothèse que les fibres qui n'induisent pas une réaction inflammatoire importante et/ou une fibrose par agression chronique, ne seront pas responsables du développement de cancer (Born & Driscoll 1996). La réponse à la première question a été donnée par les résultats d'expériences faites sur des animaux traités par différentes fibres, dans des conditions variées, et chez lesquels la réponse inflammatoire a été quantifiée.

Développement expérimental d'une réaction inflammatoire

Chez l'animal, après inhalation de MMMF, une réaction inflammatoire pulmonaire est observée (Lehnert *et al.* 1985 ; Oberdoerster *et al.* 1983). L'inhalation, 6 heures par jour pendant 5 jours, conduit à l'accumulation de nombreuses cellules inflammatoires (neutrophiles, éosinophiles et mastocytes) dans la cavité pleurale (Miller *et al.* 1991). L'inhalation de fibres de type silicon carbide whiskers (type 1 et Z) durant 13 semaines induit chez le rat une infiltration du tissu pulmonaire par des cellules inflammatoires (Lapin *et al.* 1991). Après 12 mois d'inhalation, la réaction inflammatoire est très forte, de type 4 de Wagner (Davis *et al.* 1996). Une réaction inflammatoire modérée et éphémère des poumons est observée après exposition à de la wollastonite (123-83,5 f/ml) ou à des fibres de para-aramide (613-1340 f/ml) (Warheit 1993).

Les whiskers en carbure de silicium induisent, après administration intratrachéale, une inflammation pulmonaire chronique (Vaughan *et al.* 1993). L'insufflation intratrachéale de microfibrilles de verre (JM100) induit des modifications locales importantes telles que adhérences, nodules, réactions inflammatoires aiguës et chroniques, hyperplasies et dysplasies (Fraire *et al.* 1994). Ces modifications ont été suivies dans certaines expériences par un cancer du poumon ou un mésothéliome (Mohr *et al.* 1984 ; Fraire *et al.* 1994), alors que, dans d'autres, il n'a pas été observé de mésothéliome (Pott *et al.* 1987). Il est difficile de savoir si ces complications sont dues à une insuffisance

* Hypoxanthine-guanine phosphoryl transférase

d'élimination des fibres par la réaction inflammatoire ou à la persistance du processus inflammatoire.

L'administration intrapleurale de RCF-1 induit chez le rat et le hamster une réaction inflammatoire (Rutten *et al.* 1994).

La cavité péritonéale de souris a aussi été utilisée pour analyser le potentiel inflammatoire des fibres (Donaldson *et al.* 1989). Des souris C57 B16 reçoivent 0,5 ml contenant $8,2 \times 10^7$ fibres (en grande majorité plus longues que 8-10 μm). Quatre jours après, le liquide péritonéal est analysé. Les résultats montrent que la réaction inflammatoire, estimée sur le nombre de phagocytes (granulocytes et macrophages), est similaire pour les différentes fibres étudiées (MMVF 10, 11, 21, 22, code 100/475, code 104/E, RCF 1, RCF 2 et silicium carbide A et T). Seuls RCF 4 (fibres courtes) et RCF 3 ont été moins inflammatoires (Donaldson & Miller 1994).

Il est donc clairement établi que les fibres intériorisées chez un animal induisent une inflammation incluant une activation des macrophages alvéolaires qui sont les principales cellules inflammatoires responsables de l'élimination des fibres ayant atteint les alvéoles pulmonaires (Camner 1980 ; Brain 1985). Les macrophages éliminent les fibres non seulement par phagocytose mais aussi en les dissolvant (Brain *et al.* 1994 ; Johnson 1994 ; Luoto *et al.* 1994 ; Luoto *et al.* 1995). Les macrophages et les autres cellules phagocytaires, une fois stimulés, développent cependant d'autres activités que celles d'éboueur. Ils produisent et libèrent dans leur environnement, d'une part, des molécules tueuses et dégradatives et, d'autre part, des cytokines et des facteurs de croissance. Nombre de ces derniers, en plus de leurs effets sur les cellules environnantes, amplifient les réponses tueuses et dégradatives des cellules phagocytaires. Cette notion a conduit à analyser *in vitro* les réponses des cellules phagocytaires aux fibres pour apprécier leur potentiel fonctionnel.

Production *ex vivo* et *in vitro* de molécules inflammatoires

L'analyse de la réaction inflammatoire *in vitro* a été évidemment indirecte. Elle a reposé, d'une part, sur la mesure de la capacité des fibres à faire produire par des éléments du milieu extracellulaire (sérum par exemple) et par divers types cellulaires des molécules capables d'attirer les cellules phagocytaires et de les stimuler ; elle a, d'autre part, porté sur l'analyse des effets stimulants directs des fibres sur les cellules inflammatoires, en présence et en l'absence de molécules pouvant moduler ces effets.

Sachant que les fibres d'asbeste activent le complément, et qu'elles seraient, par ce mécanisme, responsables *in vivo* de fibrose pulmonaire (Wilson *et al.* 1977 ; Saint-Rémy & Cole 1980 ; Yano *et al.* 1984), et, d'autre part, que certaines fibres de verre induisent une fibrose pulmonaire chez l'animal (Wright & Kuschner 1977 ; Johnson & Wagner 1980), la capacité des fibres à activer le complément a été analysée. En fait, les fibres de verre et les fibres de

wollastonite induisent, au contact du sérum, la production de facteurs chimiotactiques à partir de l'activation du complément (Warheit *et al.* 1988). Quand les fibres de verre sont enrobées d'agents organiques, leur effet sur le complément est moindre et reste dépendant de la dose (de 75 à 1 250 µg/ml). La génération de facteurs chimiotactiques (C5a) sur les neutrophiles s'accompagne de celle de facteurs stimulant la production de formes réactives de l'oxygène par ces cellules (Governa *et al.* 1992.). Il est connu que les protéines du système du complément sont présentes normalement, non seulement dans le sérum, mais aussi dans le liquide bronchoalvéolaire (Robertson *et al.* 1976 ; Kolb *et al.* 1981). L'activité chimiotactique induite par les fibres a été mise en évidence non seulement in vitro mais aussi in vivo dans les poumons de rat (Warheit *et al.* 1988). Ainsi, par ce mécanisme, les fibres peuvent attirer les cellules phagocytaires et seraient responsables de la formation de granulomes (Saint-Rémy & Cole 1980). Les fibres de céramiques (RCF) et les fibres de verre induisent une libération, par les macrophages alvéolaires de rat, de prostaglandines, de leucotriène B₄ (LTB₄), d'enzymes granulaires (β-glucuronidase) (Forget *et al.* 1986) et de cytokines (TNF-α) (Ljungman *et al.* 1994 ; Leikauf *et al.* 1995).

Les chimiokines sont des facteurs chimiotactiques pour les neutrophiles et les monocytes-macrophages. Un certain nombre de particules (α-quartz) et de fibres d'amiante (crocidolite) induisent au niveau pulmonaire une synthèse cellulaire de chimiokines (Driscoll *et al.* 1993, 1996) ; cela n'a pas été le cas avec la laine de verre MMVF-10 (Driscoll *et al.* 1996), qui n'induit qu'une faible inflammation pulmonaire chez le rat après inhalation (Hesterberg *et al.* 1993). La production de cytokines par les cellules épithéliales, bien que discutée (Kelley 1990), semble exister. Par la production et la libération de *monocyte chemotactic polypeptide-1* (MCP-1), les cellules épithéliales déclencheraient l'arrivée et le maintien de cellules inflammatoires dans les poumons (Paine *et al.* 1993). La libération de MCP-1 se ferait au pôle apical (alvéolaire) des cellules (Paine *et al.* 1994). Le TNF-α proviendrait des pneumocytes de type II (Arias-Diaz *et al.* 1994). Ces cellules contiennent aussi du TGF-β, puissant facteur chimiotactique des monocytes et inducteur de cytokines (Khalil *et al.* 1991 ; Leho & Keski-Oja 1992 ; Border & Noble 1994), et du TGF-α (Madtes *et al.* 1994).

En conclusion, il semble bien établi que les fibres sont capables d'induire la production de facteurs qui attirent les cellules phagocytaires à l'endroit où elles se trouvent, endroit qui sera le siège du développement de la réaction inflammatoire.

La réaction inflammatoire peut devenir nocive par la production excessive de facteurs de croissance (ou, plus largement, de cytokines) qui induiraient, de manière paracrine ou à distance, une prolifération cellulaire inappropriée (Brody 1993). Les cytokines peuvent être générées sous l'action des fibres par des cellules du poumon, et surtout par les cellules phagocytaires (macrophages principalement mais aussi polynucléaires neutrophiles). Les cytokines, IL-1 et

TNF- α (Miller *et al.* 1989), et les facteurs de croissance (Brody 1993) résultent d'une stimulation directe des phagocytes par des fibres. La majorité des fibres (amiante, MMVF21 et 22, céramiques, carbure de silicium, whiskers...) induisent la production de TNF- α par les macrophages alvéolaires (Ljungman 1994 ; Leikauf *et al.* 1995). La synthèse du TNF- α induite par MMVF21 et des fibres whisker en silicium carbide est plus importante que celle résultant des MMVF22 (Ljungman 1994). Ces effets sont similaires à ceux obtenus avec du crocidolite de dimension (longueur et épaisseur) équivalente (longue et fine) et sont moindres que ceux obtenus avec de la silice (Leikauf *et al.* 1995). In vitro, des MMMF (10 $\mu\text{g/ml}$) induisent la production de TNF- α et d'IL-1 par les macrophages pulmonaires et pleuraux de souris (Miller *et al.* 1994). L'induction par RCF-1 est persistante alors que celle par les fibres de verre est éphémère. Les macrophages pleuraux synthétisent les cytokines en plus grande quantité que les macrophages pulmonaires. Les cellules phagocytaires et les molécules pro-inflammatoires qui s'accumulent aux endroits où les fibres se sont déposées produisent des facteurs de croissance actifs sur les cellules épithéliales et mésenchymateuses (Brody 1993). Le PDGF (*platelet-derived growth factor*), notamment, est un facteur de croissance important associé à des lésions chroniques et aux cancers induits par des fibres (Antoniades 1992 ; Gerwin *et al.* 1987).

La production de cytokines et de facteurs de croissance par des macrophages alvéolaires, des cellules épithéliales pulmonaires et aussi par les cellules endothéliales, en réponse à l'amiante (Driscoll *et al.* 1993 ; Bonner *et al.* 1993 ; Li *et al.* 1993 ; Perkins *et al.* 1993 ; Rosenthal *et al.* 1994 ; Simeonova & Luster 1996), semble être largement en rapport avec la capacité des fibres à produire des formes réactives de l'oxygène (Jansen *et al.* 1995 ; Simeonova & Luster 1995, 1996 ; Simeonova *et al.* 1997).

Les fibres de céramiques (RCF 1 à 4), les laines de verre (MMVF10 et 11), une laine de roche (MMVF21) et une laine de laitier (MMVF22) stimulent toutes, in vitro, de manière dose-dépendante entre 25 et 500 $\mu\text{g/ml}$, la production de formes réactives de l'oxygène par les macrophages alvéolaires de rat (Luoto *et al.* 1997). Les oxydants générés, au cours d'une inflammation par les cellules phagocytaires stimulées par des fibres (MMVF-1 par exemple) (Leanderson & Tagesson 1992 ; Roney & Holian 1989) pourraient être impliqués dans la cancérogenèse et d'autres maladies pulmonaires (Leanderson *et al.* 1989 ; Garcia *et al.* 1989 ; Weitzman 1990 ; Kamp *et al.* 1992 ; Vallyathan *et al.* 1992). Cette implication pourrait être due à la capacité des formes réactives de l'oxygène d'induire la synthèse de cytokines et de facteurs de croissance et aussi à leurs effets toxiques directs sur les cellules et les molécules. Les formes réactives de l'oxygène, radicaux hydroxyles inclus, sont des médiateurs importants de la toxicité pulmonaire de l'amiante (Weitzman & Graceffa 1984 ; Zalma *et al.* 1988 ; Ghio *et al.* 1992). Les macrophages alvéolaires de rat incubés avec des MMVF produisent des quantités de formes réactives de l'oxygène qui dépendent de la nature des fibres et surtout de leur éventuelle

opsonisation (Nyberg & Klokars 1990 ; Hill *et al.* 1994 ; Donaldson *et al.* 1995). Ainsi, MMVF21 et RCF 1, qui ont une grande affinité pour les immunoglobulines, stimulent fortement quand elles sont opsonisées et faiblement quand elles ne le sont pas, la production de formes réactives de l'oxygène par les macrophages alvéolaires (Donaldson *et al.* 1995). Les micro-fibres de verre (code 100/475) et whiskers en silicure carbide sont peu actives et peu opsonisables (Mossman & Sesko 1990 ; Donaldson *et al.* 1995).

De nombreuses fibres induisent la production de formes réactives de l'oxygène par les neutrophiles de manière dose-dépendante entre 25 et 500 pg/ml. Les laines de laitier, MMVF22, sont plus stimulantes que MMVF21 > MMVF10 > MMVF11. RCF 1 et 3 ont été plus stimulants que RCF 2, lui-même plus que RCF 4, et entre MMVF22 et 21 (Luoto *et al.* 1997). MMVF21 (comme le crocidolite) à la concentration de 0,4 et 0,8/10ml, en présence de H_2O_2 pour sensibiliser la réaction (Howden & Faux 1996a), augmente chez les bactéries (*Salmonella typhimurium*, TA104) et les cellules en culture (*rat lung fibroblast* ou RFL-6) la fluorescence de l'ADN. Les auteurs rattachent cette fluorescence à la liaison de lipides peroxydés à l'ADN et suggèrent que ceci constitue un mécanisme de carcinogénicité. RCF-1 (comme le chrysotile) à la concentration de 0,4 mg/ml n'induit pas de fluorescence de l'ADN dans les mêmes conditions. Howden et Faux (1996a) attribuent cette différence à la forte quantité de fer ferreux contenue dans MMVF21 et à sa capacité de peroxydation lipidique en présence de H_2O_2 . Ainsi, la carcinogénicité des formes réactives de l'oxygène produites par les phagocytes serait potentialisée par celle des fibres à haute teneur en fer.

Dans le même esprit, les mêmes auteurs (Howden & Faux 1996b) montrent que le glutathion réduit (GSH), puissant protecteur des cellules contre les peroxydations lipidiques, inhibe la production de 8-OHdésoxyguanosine (marqueur lésionnel de l'ADN) par *Salmonella typhimurium* (ou par ADN isolé) mis en présence de MMVF21 (ou de crocidolite) et d' H_2O_2 .

Les formes réactives de l'oxygène produites par des fibres ou par les phagocytes stimulés par des fibres pourraient être cancérogènes par une activation de proto-oncogènes (Jansen *et al.* 1994), cet effet des formes réactives de l'oxygène étant un mécanisme général connu de la cancérogenèse (Kehrer *et al.* 1988 ; Toyokuni 1996).

La fibrose pulmonaire ou alvéolite fibrosante est caractérisée par la fibrose et l'inflammation des interstitiums pulmonaires, avec pour conséquence finale la destruction de l'architecture alvéolaire (Kasper *et al.* 1996). Le déclenchement de ce processus est lié à des lésions épithéliales et/ou endothéliales. Les fibres pourraient être responsables de telles lésions par de nombreux mécanismes liés à une inflammation tels que la production de cytokines, la génération de formes réactives de l'oxygène et la libération d'enzymes protéolytiques.

Le rôle des cytokines pro-inflammatoires dans la pathogénie des fibroses pulmonaires est largement reconnu (Gauldie *et al.* 1993 ; Piguet *et al.* 1993 ;

Zhang *et al.* 1993). Les cellules inflammatoires et les cellules endothéliales participent à ce processus en libérant dans le milieu extracellulaire des cytokines [TNF- α , MCP-1, TGFA, TGFN, PDGF, GM-CSF et autres interleukines et facteurs de croissance (Gauldie *et al.* 1993)]. Il a été démontré que des macrophages alvéolaires exposés, *in vivo* ou *in vitro*, à des fibres (MMMf) libéraient des cytokines telles que IL-1a, IL-1b, TNF- α et PDGF, et des prostaglandines (Elias *et al.* 1990). Ces médiateurs entraînent à leur tour la libération de nouvelles cytokines par d'autres cellules pulmonaires, et cette cascade de médiateurs peut participer aux modifications pleurales induites par diverses MMMf (Miller *et al.* 1991). De plus, les fibres de céramiques (RCF) et les fibres de verre induisent une libération, par les macrophages alvéolaires de rat, de prostaglandines, de leucotriène B4 (LTB4) et d'enzymes granulaires (β -glucuronidase et protéases) (Forget *et al.* 1986 ; Leikauf *et al.* 1995).

La fibronectine, en promouvant la migration et la prolifération des fibroblastes et en orientant les dépôts de collagène, a été considérée comme un acteur important des processus fibro-prolifératifs. Or les macrophages participent à une production localisée de fibronectine, en réponse à des toxiques pulmonaires (Postlethwaite *et al.* 1981 ; Driscoll *et al.* 1990). L'inhalation de RCF-1, qui induit chez les murins une inflammation pulmonaire et pleurale et une fibrose, entraîne une production accrue de fibronectine par les macrophages pulmonaires (alvéolaires et pleuraux) des rats. La production basale de fibronectine est plus importante dans l'espace pleural que dans les voies aériennes des poumons (Gelzleichter *et al.* 1996).

Au total, il apparaît clairement que toutes les fibres sont capables d'induire, *in vitro* et *in vivo*, la production de molécules ayant un potentiel délétère.

Réactions inflammatoires nocives

Des résultats expérimentaux obtenus sur les tissus du poumon et sur les séreuses d'animaux de laboratoire ont fait suggérer que l'inflammation asbestosique, la prolifération fibreuse et les cancers étaient liés (Kane & McDonald 1993 ; Mossman 1993). Il a été montré que la réaction inflammatoire induite par inhalation de RCF-1, chez le rat et le hamster, était suivie de l'installation d'une fibrose pulmonaire et d'une prolifération des cellules mésothéliales pleurales (Rutten *et al.* 1994 ; Everitt *et al.* 1994). La réaction inflammatoire reconnue à la périphérie de fibres biopersistantes représenterait une agression chronique qui pourrait conduire à la rupture de mécanismes de contrôle de certains proto-oncogènes impliqués dans la croissance cellulaire (Kane & McDonald 1993 ; Antoniadis 1992 ; Gerwin *et al.* 1987). Ces lésions ressemblent à celles induites par des fibres d'érionite que l'on sait être capables d'induire un mésothéliome (Hill *et al.* 1990 ; Wagner *et al.* 1985).

Adamson *et al.* (1994) ont montré qu'une inflammation aiguë du parenchyme pulmonaire pouvait conduire à une prolifération mésothéliale de la plèvre viscérale. Cet effet n'est pas associé à un déplacement des fibres qui auraient

gagné la plèvre, mais à une stimulation des macrophages du poumon (Adamson *et al.* 1993). Cet effet nocif de l'inflammation pourrait être sous-tendu par la production de cytokines et de formes réactives de l'oxygène par des macrophages et polynucléaires stimulés par MMVF, par exemple (Roney & Holian 1981 ; Leanderson & Tagesson 1992).

Au total, toutes les fibres, quand elles ont pénétré dans un organisme animal, induisent une réaction inflammatoire. Cette réaction est bénéfique, dans la grande majorité des cas, car elle permet à l'animal de se débarrasser des fibres. In vitro et in vivo chez l'animal (dans certains modèles expérimentaux), les fibres sont cependant, capables d'induire une production cellulaire de molécules ayant un potentiel fibrosant et cancérogène. L'extrapolation à l'homme de ces données semble prématurée.

RÉFÉRENCES

- ADAMSON IYR, BOKOWSKA J, BOWDEN JH. Mesothelial cell proliferation after instillation of long or short asbestos fibers into mouse lung. *Am J Pathol* 1993 **142** : 1209-1216
- ADAMSON IYR, BOKOWSKA J, BOWDEN JH. Mesothelial cell proliferation : a non specific response to lung injury associated with fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994 **10** : 253-258
- ANTONIADES HN. Linking cellular injury to gene expression and human proliferative disorders. Examples with the PDGF genes. *Mol Cell* 1992 **6** : 175-181
- ARIAS-DIAZ J, VARA E, GARCIA C, BALIBREA JL. Tumor necrosis factor alpha-induced inhibition of phosphatidylcholine synthesis by human type II pneumocytes is partially mediated by prostaglandins. *J Clin Invest* 1994 **94** : 244-250
- BONNER J, GOODELL AL, COIN PG, BRODY AR. Chrysotile asbestos upregulates gene expression and production of α -receptors for platelet derived growth factor (PDGF-AA) on rat lung fibroblasts. *J Clin Invest* 1993 **92** : 425-430
- BORDER WA, NOBLE NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994 **331** : 1286-1292
- BORM PJA. Biological markers and occupational lung disease : mineral dust induced disorders. *Exp Lung Res* 1994 **20** : 457-470
- BORM PJA, DRISCOLL K. Particles, inflammation and respiratory tract carcinogenesis. *Toxicol Lett* 1996 **88** : 109-113
- BRAIN JD, GODLESKI J, KREYLING W. In vivo evaluation of chemical persistence of nonfibrous inorganic particles. *Environ Health Perspect* 1994 **102** : 119-125
- BRAIN JD. Macrophages in the respiratory tract. In AP Fishman (Ed) : *Handbook of physiology*. Section 3 : *Respiratory System*. Am Physiol Soc Bethesda MD, 1985, vol. 1, pp. 474-471
- BRODY AR. Asbestos-induced lung disease. *Environ Health Perspect* 1993 **100** : 21-30

- CAMNER P. Alveolar clearance. *Europ J Resp Dis* 1980 **61** (Suppl. 107) : 5974
- CRAIGHEAD JE, MOSSMAN BT. The pathogenesis of asbestos-associated diseases. *N Engl J Med* 1982 **306** : 1446-1455
- DAVIS JMG, BROWN DM, CULLEN RT, DONALDSON K, JONES AD, MILLER BG, McINTOSH C, SEARL A. A comparison of methods of determining and predicting the pathogenicity of mineral fibers. *Inhal Toxicol* 1996 **8** : 747-770
- DEUOEDE GJ, TAYLOR WF, SUAER WG, JACKMAN RJ, STICKIER GB. Cancer risk and life expectancy of children with ulcerative colitis. *N Engl J Med* 1971 **285** : 17-21
- DIEHL AK. Gallstone size and risk of gallbladder cancer. *JAMA* 1983 **250** : 2323-2328
- DONALDSON K, BROWN GM, BROWN DM, BOLTON RE, DAVIS JMG. The inflammation-generating potential of long and short fibre amosite asbestos samples. *Br J Ind Med* 1989 **46** : 271-276
- DONALDSON K, HILL IM, BESWICK PH. Superoxide anion release by alveolar macrophages exposed to respirable industrial fibres : modifying effect of fibre opsonisation. *Exp Toxicol Pathol* 1995 **47** : 229-231
- DONALDSON K, MILLER BG. A comparison of alveolar macrophage cytotoxicity and ability to cause inflammation in the mouse peritoneal cavity for a range of different fiber types of equal fiber number. In JMG Davis, MC Jaurand (Eds) : *Cellular and molecular effects of mineral and synthetic dusts and fibers*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1994, pp. 255-261
- DRISCOLL KE, CARTER JM, HOWARD BW, HASSENBEIN DG, PEPELKO W, OBERDORSTER G. Pulmonary response of rats to subchronic inhalation of carbon black. *Am J Respir Crit Care Med* 1995 **151** : A569
- DRISCOLL KE, CARTER JM, HOWARD BW, HASSENBEIN DG. Mutagenesis in rat lung epithelial cells after in vivo silica exposure or ex vivo exposure to inflammatory cells. *Am J Respir Crit Care Med* 1994 **149** : A553
- DRISCOLL KE, HASSENBEIN DG, CARTER J, POYNTER J, ASQUITH TN, GRANT RA, VAITTEN J, PURDON MP, TAKIGIKU R. Macrophage inflammatory proteins 1 and 2 : expression by rat alveolar macrophages, fibroblasts and epithelial cells and in rat lung after mineral dust exposure. *Am J Respir Cell Biol* 1993 **8** : 311-319
- DRISCOLL KE, HOWARD BW, CARTER JM, ASQUITH T, JOHNSTON C, DETILLEUX P, KUNKEL SL, ISFORT RJ. α -quartz-induced chemokine expression by rat lung epithelial cells. Effects of in vivo and in vitro particle exposure. *Am J Pathol* 1996 **149** : 1627-1637
- DRISCOLL KE, MAURER JK, LINDENSCHMIDT RC. Respiratory tract responses to dust : relationship between dust burden lung injury, alveolar macrophage fibronectin release and the development of pulmonary fibrosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990 **106** : 88-101
- DUNGWORTH DL, MOHR U, HEINRICH U, ERNST H, KITTEL B. Pathologic effects of inhaled particles in rat lungs : associations between inflammatory and neoplastic processes. Toxic and carcinogenic effects of solid particles in the respiratory tract. U Mohr (Ed). ILSI Press, Washington, 1994, pp. 75-98
- ELIAS JA, FREUNDLICH B, KEM JA, ROSENBLUM J. Cytokine networks in the regulation of inflammatory fibrosis in the lung. *Chest* 1990 **97** : 1439-1445

EVERITT JL, BERMUDEZ E, MANGUM JB, WONG B, MOSS OR, JANZEN D, RUTTEN AAAJL. Pleural lesions in syrian golden hamsters and Fisher-344 rats following intrapleural instillation of man-made ceramic and glass fibers. *Toxicol Pathol* 1994 **22** : 229-236

FORGET G, LACROIX MJ, BROWN RC, EVANS PH, SIROIS P. Response perfused alveolar macrophages to glass fibers : effect of exposure duration and fiber lenght. *Environ Res* 1986 **39** : 124-135

FRAIRE AE, GREENBERG SD, SPJUT HJ, ROGGLI VL, DODSON RF, CARTWRIGHT J, WILLIAMS G, BAKER S. Effect of fibrous glass on rat pleural mesothelium. Histologic observation. *Am J Respir Crit Care Med* 1994 **150** : 521-527

GARCIA JGN, DODSON RF, CALLAHAN KS. Effect of environmental particulates on cultured human and bovine endothelium. Cellular injury via an oxidant-dependant pathway. *Lab Invest* 1989 **61** : 53-61

GAULDIE J, JORDANA M, COX G. Cytokines and pulmonary fibrosis. *Thorax* 1993 **48** : 931-935

GELZLEICHTER TR, MANGUM JB, BENNUDEZ E, WONG BA, MOSS OR, EVERITT JL. Pulmonary and pleural leukocytes from F344 rats produce elevated levels of fibronectin following inhalation of refractory ceramic fibers. *Exp Toxicol Pathol* 1996 **48** : 487-489

GERRITY TR. Regional deposition of gases and particles in the lung : implications for mixtures. *Toxicology* 1995 **105** : 327-334

GERWIN BI, LECHNER JF, REDDEL RR, ROBERTS AB, ROBBINS KC, GABRIELSON EW, HARRIS CC. Comparison of production of transforming growth factors and platelet-derived growth factor by normal human mesothelial cells and mesothelioma cells lines. *Cancer Res* 1987 **47** : 6180-6184

GHIO AJ, ZHANG J, PIANTADOSI CA. Generation of hydroxyl radical by crocidolite asbestos is proportional to surface $[Fe^{3+}]$. *Arch Biochem Biophys* 1992 **298** : 646-650

GOODGLICK LA, KANE AB. The role of reactive oxygen metabolites in crocidolite asbestos toxicity to macrophages. *Cancer Res* 1986 **46** : 5558-5566

GOVERNA M, VALENTINO M, VISONA I, MARCHISEPPE I, LO MARTIRE N. Activation of the alternative complement pathway and generation of stimulating factors for granulocytes by glass fibers. *Cell Biol Toxicol* 1988 **4** : 187-197

HESTERBERG TW, MILLER WC, MCCONNELL EE, CHEVALIER J, HADLEY JG, BERNSTEIN DM, THEVENAZ P, ANDERSON R. Chronic inhalation toxicity of size separated glass fibers in Fisher 344 rats. *Fundam Appl Toxicol* 1993 **20** : 454-476

HILL IM, BESWICK PH, DONALDSON K. Enhancement of the macrophage oxidative burst by immunoglobulin coating of respirable fibers : fiber-specific differences between asbestos and man-made fibers. *Exp Lung Res* 1996 **22** : 133-148

HILL RJ, EDWARDS RE, CARTHEW P. Early changes in the pleural mesothelium following intrapleural inoculation of the mineral fibre erionite and subsequent development of mesotheliomas. *Int J Exp Pathol* 1990 **71** : 105-118

HOWDEN PJ, FAUX SP. Fibre-induced lipid peroxidation leads to DNA adduct formation in *Salmonella Typhimurium* TA 104 and rat lung fibroblasts. *Carcinogenesis* 1996(a) **17** : 413-419

HOWDEN PJ, FAUX SP. Glutathione modulates the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in isolated DNA and mutagenicity in *Salmonella Typhimurium* TA 100 induced by mineral fibres. *Carcinogenesis* 1996(b) **17** : 2275-2277

JANSSEN YMW, BARCHOSKY A, TREADWELL M, DRISCOLL KE, MOSSMAN B. Asbestos induces nuclear factor kB (NF-kB) DNA-binding activity and NF-kB-dependent gene expression in tracheal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 **92** : 8458-8462

JANSSEN YMW, HEINTZ NH, MARSH JP, BORM PJA, MOSSMAN BT. Induction of c-fos and c-jun proto-oncogenes in target cells of the lung and pleura by carcinogenic fibers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994 **11** : 522-530

JOURAND MC. Mechanisms of fibre genotoxicity. In RC Brown, JA Hoskins, NF Johnson (Eds) : *Mechanisms in fibre carcinogenesis*. Plenum Press, New York, 1991, pp. 287-306

JOHNSON HF, WAGNER JC. A study by electron microscopy of effects of chrysotile and man-made fibers on rat lungs. In JC Wagner (Ed) : *Biological effects of mineral fibers*. IARC, Lyon, 1980, pp. 293-304

JOHNSON NF. Phagosomal pH and glass fiber dissolution in cultured nasal epithelial cells and alveolar macrophages : a preliminary study. *Environ Health Perspect* 1994 **102** (Suppl. 5) : 97-102

KAMP DW, GRACEFFA P, PRYOR WA, WEITZMAN SA. The role of free radicals in asbestos-induced diseases. *Free Rad Biol Med* 1992 **12** : 293-315

KANE AB, McDONALD JL. Mechanisms of mesothelial cell injury, proliferation and neoplasia induced by asbestos fibers. In DB Warheit (Ed) : *Fiber Toxicology*. Academic Press, San Diego, CA, 1993, pp. 323-347

KANE AB. Fiber dimensions and mesothelioma : a reappraisal of the Stanton hypothesis. In RC Brown, JA Hoskins, NF Johnson (Eds) : *Mechanisms in fibre carcinogenesis*. Plenum Press, New York, 1991, pp. 131-141

KANTOR AF, HARTGE P, HOOVER RN, FRAUMENI JF. Epidemiological characteristics of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the bladder. *Cancer Res* 1988 **48** : 3853-3860

KASPER M, HAROSKE G. Alterations in the alveolar epithelium after injury leading to pulmonary fibrosis. *Histol Histopathol* 1996 **11** : 463-483

KEHRER JP, MOSSMAN BT, SEVANIAN A, TRUSH MA, SMITH MT. Free radical mechanisms in chemical pathogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988 **95** : 349-362

KELLEY J. Cytokines of the lung. *Am Rev Respir Dis* 1990 **141** : 765-788

KHALIL N, O'CONNOR RN, UNRUCH HW, WARREN PW, FANDERS HC, KEMP A, BEREZNAV OM, GREENDBERG AH. Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991 **5** : 155-162

KOLB WP, KOLB LM, WETSEL RA, ROGERS WR, SHAW JO. Quantitation and stability of the fifth component of complement (C5) in bronchoalveolar lavage fluids obtained from non human primates. *Am Rev Respir Dis* 1981 **123** : 226-231

- LAIHO M, KESKI-OJA J. Transforming growth factors-beta as regulators of cellular growth and phenotype. *Crit Rev Oncog* 1992 **31** : 1-26
- LAPIN CA, GRAIG DK, VALERLOM G, MCCANDLESS JB, BOGOROCH RA. Subchronic inhalation study in rats exposed to silicon carbide whiskers. *Fundam Appl Toxicol* 1991 **16** : 128-146
- LEANDERSON P, SODERKVIST P, TAGESSON C. Hydroxyl radical mediated DNA base modification by man-made mineral fibres. *Br J Ind Med* 1989 **46** : 435-438
- LEANDERSON P, TAGESSON C. Hydrogen peroxide release and hydroxyl radical formation in mixtures containing mineral fibres and human neutrophils. *Br J Ind Med* 1992 **49** : 745-749
- LEHNERT BE, VALDEZ YE, BOMALASKI SH. Lung and pleural cell response to the intrapulmonary deposition of particles in the rat. *J Toxicol Environ Health* 1985 **16** : 823-839
- LEIKAUF GD, FINK SP, MILLER ML, LOCKEY JE, DRISCOLL KE. Refractory ceramic fibers activate alveolar macrophage eicosanoid and cytokine release. *J Appl Physiol* 1995 **78** : 164-171
- LJUNGMAN AG, LINDAHL M, TAGESSON C. Asbestos fibers and man made mineral fibers : induction and release of tumor necrosis- α from rat alveolar macrophages. *Occup Environ Med* 1994 **51** : 777-783
- LI XY, LAMB D, DONALDSON K. The production of TNF alpha and IL-1 like activity by broncho-alveolar leucocytes after intratracheal instillation of crocidolite asbestos. *Int J Exp Pathol* 1993 **74** : 403-409
- LUOTO K, HOLOPAINEN M, KANGAS J, KALLIOKOSKI P, SAVOLAINEN K. The effect of fiber length on the dissolution by macrophages of rockwool and glasswool fibers. *Environ Res* 1995 **70** : 51-61
- LUOTO K, HOLOPAINEN M, KARPINEN M, PERANDER M, SAVOLAINEN K. Dissolution of man-made vitreous fibres in rat alveolar macrophages culture and Gamble saline solution. Influence of different media and chemical composition of fibres. *Environ Health Perspect* 1994 **102** : 103-107
- LUOTO K, HOLOPAINEN M, SARATAHO M, SAVOLAINEN K. Comparison of cytotoxicity of man made vitreous fibres. *Am Occup Hyg* 1997 **41** : 37-50
- MADTES DK, BUSBY K, STRADJORD TP, CLARK JG. Expression of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor is increased following bleomycin-induced lung injury in the rat. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994 **11** : 540-551
- MILLER K, HUDSPITH BN, MEREDITH C. Rat pleural cell populations effects of inhalation on cytokine in RNA expression and population characteristics. In RC Brown, JA Hoskins, NF Johnson (Eds) : *Mechanisms in fibre carcinogenesis*. Phenium Press, New York, 1991, pp. 367-376
- MILLER K, HUDSPITH BN, MEREDITH C. The effect of on the kinetics of cytokine expression in murine lung populations. Role in fibre-induced disease. In JMG Davis, MC Jaurand (Eds) : *Cellular and molecular effects of mineral and synthetic dusts and fibres*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1994

MILLER K, LAWRENCE F, RILEY RA. Consequences of inhalation on lung and pleural cavity cells. In BT Mossman, RO Begin (Eds) : *Effect of mineral dusts on cells*. NATO ASI-Series 30, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1989, pp. 321-328

MOHR U, POTT F, VONNAHME FJ. Morphological aspects of mesotheliomas after intratracheal instillations of fibrous dusts in syrian golden hamsters. *Exp Pathol* 1984 **26** : 179-183

MOSSMAN BT, SESKO AM. In vitro assay to predict the pathogenicity of mineral fibers. *Toxicology* 1990 **60** : 53-61

MOSSMAN BT. Mechanisms of asbestos carcinogenesis and toxicity. The amphibole hypothesis revisited. *Br J Ind Med* 1993 **50** : 673-676

NYBERG P, KLOCKARS M. Measurement of reactive oxygen metabolites produced by human monocyte-derived macrophages exposed to mineral dusts. *J Exp Pathol* 1990 **71** : 537-544

OBERDOERSTER G, FERIN J, MARCELLO NL, MELNHOLD SH. Effects of intra-bronchially instilled amosite of lavagable lung and pleural cells. *Environ Health Perspect* 1983 **51** : 41-48

OKABE K, KRISHNAMURTHY GG, VALLARINO JA, SKORNIK WA, HATCH VC, KATLER MR, TSUDA A, GODLESKI JJ. Deposition efficiency of inhaled fibers in the hamster lung. *Inhal Toxicol* 1997 **9** : 85-98

PAINE R 3rd, CHRISTENSEN P, TOEWS GB, SIMON RM. Regulation of alveolar epithelial II-cell ICAM-1 expression by cell shape and cell-cell interactions. *Am J Physiol* 1994 **266** : L476-L484

PAINE R 3rd, ROLFE MW, STANDIFORD TJ, BURDICK MD, ROLLINS BJ, STRIETER RM. MCP-1 expression by rat type II alveolar epithelial cells in primary culture. *J Immunol* 1993 **150** : 4561-4570

PERKINS RC, SCHEULE RK, HAMILTON R, GOMES G, FREIDMAN G, HOLIAN A. Human alveolar macrophage cytokine release in response to in vitro and in vivo asbestos exposure. *Exp Lung Res* 1993 **19** : 53-63

PIGUET PF, RIBAUX C, KARPUZ V, GRAU GE, KAPANCI Y. Expression and localization of tumor necrosis-alpha and its mRNA in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 1993 **143** : 651-655

POSTLETHWAITE AE, KESKI-OJA J, BALLAN G. Induction of fibroblast chemotaxis by fibronectin : localization of the chemotactic region to 140,000 molecular weight non-gelatin binding fragment. *J Exp Med* 1981 **153** : 494-499

POTT F, ZIEM U, REIFFER FJ, HUTH F, ERNST H, MOHR U. Carcinogenicity studies on fibres, metal compounds and some other dusts in rats. *Exp Pathol* 1987 **32** : 129-152

ROBERSTON J, CALDWELL JR, CASTLE JR, WALDMAN RM. Evidence for the presence of components of the alternative (properdin) pathway of complement activation in respiratory secretions. *J Immunol* 1976 **117** : 900-903

RONEY PL, HOLIAN A. Possible mechanism of chrysotile asbestos stimulated superoxide production in guinea pig macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989 **100** : 132-144

- ROSENTHAL GJ, GERMOLEE DR, BLAZKA ME, CORSINI E, SIMEONOVA P, POLLOCK P, KONG LY, KWON J, LUSTER MT. Asbestos-stimulated IL-8 production from human lung epithelial cells. *J Immunol* 1994 153 : 32-37
- RUSSO-MARIE F, PELTIER A, POLLA B. *L'Inflammation*. John Libbey Eurotext, Paris, 1998, 560 p.
- RUTTEN AAJJL, BERMUDEZ E, MANGUM JB, WONG BA, MOSS OR, EVERITT JL. Mesothelial cell proliferation induced by intrapleural instillation of man-made fibers in rats and hamsters. *Fundam Appl Toxicol* 1994 23 : 107-116
- SAINT-RÉMY JMR, COLE P. Interactions of chrysotile asbestos with the complement system. *Immunology* 1980 41 : 431-437
- SIMEONOVA PP, LUSTER ML. Asbestos induction of nuclear transcription factors and IL-8 gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996 15 : 787-789
- SIMEONOVA PP, LUSTER ML. Iron and reactive oxygen species in the asbestos-induced tumor necrosis- α response from alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995 12 : 676-683
- SIMEONOVA PP, TORIUMI W, KOMMINENI C, ERKAN M, MUNSON AE, ROM WN, LUSTER ML. Molecular regulation of IL-6 activation by asbestos in lung epithelial cells. Role of reactive oxygen species. *J Immunol* 1997 159 : 3921-3928
- TOYOKUNI S. Iron-induced carcinogenesis : the rôle of redox regulation. *Free Rad Biol Med* 1996 20 : 553-566
- VALLYATHAN V, MEGA JF, XLANGLIN S, DALAL NS. Enhanced generation of free radicals from phagocytes induced by mineral dusts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992 6 : 404-413
- VAUGHAN GL, TRENTLY SA, WILSON RB. Pulmonary response, in vivo, to silicon carbide whiskers. *Environ Res* 1993 63 : 191-201
- WAGNER JC, SKIDMORE JH, HILL RJ, GRIFFITHS DM. Erionite exposure and mesotheliomas in rats. *Br J Cancer* 1985 51 : 727-730
- WARHEIT DB, OVERBY LH, GEORGE G, BRODY AR. Pulmonary macrophages are attracted to inhaled particles through complement activation. *Exp Lung Res* 1988 14 : 51-66
- WARHEIT DB. Assessment of pulmonary toxicity following short-term exposure to inhaled fibrous materials. In DB Warheit (Ed) : *Fibre Toxicology*. Academic Press, New York, 1993, pp. 207-228
- WEITZMAN SA, GRACEFFA P. Asbestos catalyses hydroxyl and superoxide radical release from hydrogen peroxide. *Arch Biochem Biophys* 1984 228 : 373-376
- WEITZMAN AS. Inflammation and cancer. Role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood* 1990 76 : 655-663
- WILSON MR, GAUMER HR, SALVAGGIO JE. Activation of the alternative complement pathway and generation of chemotactic factors by asbestos. *J Allergy Clin Immunol* 1997 60 : 218-22
- WRIGHT G, KUSCHNER M. The influence of varying lengths of glass and asbestos fibers on tissue response in pigs. In WH Walton (Ed) : *Inhaled particles (V)*. Pergamon Press, Oxford, 1977, pp. 455-474

YANO E, TAKEUCHI A, YUKIYAMO Y, BROWN CR. Chemotactic factor generation by asbestos. Fibre type differences and the effects of leaching. *Br J Exp Pathol* 1984 **65** : 223-229

ZALMA R, BONNEAUD L, JAURAND MC, GUIGNARD J, PEZERAT H. Formation of oxyradicals by oxygen reduction arising from the surface of asbestos. *Can J Chem* 1988 **65** : 2338-2345

ZHANG Y, LEE TC, GUILLEMIN B, YU M-C. Enhanced IL-10 and tumor necrosis factor- α release and messenger-RNA expression in macrophages from idiopathic pulmonary fibrosis or after asbestos exposure. *J Immunol* 1993 **150** : 4188-4196