Dix cas groupés de pneumopathies d'hypersensibilité liées à l'exposition à des huiles de coupe contaminées par *Mycobacterium immunogenum*

G. Reboux[1], F. Grenouillet[1], B. Chouraki[2], I, C. Lorthois[2], Vieille[1], F. Skana[1], L. Millon[1], I. Tillie-Leblond[3]

[1] Mycologie, CHU Besançon

[2] Médecine du Travail, Douvrin

[3] Pneumologie, CHRU Lille

Généralités 1/3

Pneumopathie d'hypersensibilité

Définition : pneumopathie interstitielle et alvéolaire de mécanisme immunoallergique consécutive à une exposition antigénique chez des sujets ayant une susceptibilité individuelle.

Nature de l'exposition :

- Particules antigéniques de petites tailles (<4 µm)
- Bactéries (actinomycètes, mycobactéries…) moisissures, protéines animales, produits chimiques
- Exposition importante irrégulière, ou chronique à des concentrations plus faibles

Généralités 2/3

Aspects cliniques

Forme aiguë :

- syndrome pseudo grippal d'apparition semi retardée (4-6H)
- toux sèche, dyspnée et fièvre

Forme subaiguë :

- toux et dyspnée modérée, atteinte de l'état général

Forme chronique :

- évolution vers l'insuffisance respiratoire chronique par fibrose interstitielle diffuse
- amaigrissement, asthénie

Généralités 3/3

Critères diagnostiques

Critères majeurs :

- preuve de l'exposition antigénique
- dyspnée à l'effort
- râles crépitants à l'inspiration
- alvéolite lymphocytaire (LBA)

Critères mineurs :

- épisodes fébriles récurrents
- infiltrats à la radiologie
- diminution de la DLCO
- présence de précipitines vis-à-vis d'antigènes responsables
- présence de granulomes à la biopsie
- amélioration pendant les périodes de soustraction à la source antigénique

Revue de la littérature 1/3

Les PHS des mécaniciens

[Muilenberg 1993; Bernstein 1995] Premiers cas
Responsabilité de l'aérosol d' huiles de coupe
Agents étiologiques : bactéries? moisissures?

[Kreiss 1997] workshop NIOSH & UAW
95 cas entre 1992 et 1997 *Mycobacterium chelonae*, (aussi 12 bactéries et actinomycètes, 7 moisissures)
ELISA+ *M. chelonae* associée aux PHS et exposés

[Fox 1999] Précipitines « extrait d'huile » associées aux PHS, mais Mycobactéries nég. et *Fusarium* +

Revue de la littérature 2/3

[Bukowski 2003] Problèmes avec d'autres métiers: marins, imprimeurs, câbleurs..
Huiles minérales: pas de contamination
Huiles synthétiques : contamination ++
Huiles émulsionnées : contamination ++++

[Falkinham 2003] *M. avium* jamais retrouvé (écologie différente -amibe et biofilm-)

[Trout 2003] *M. immunogenum* retrouvé dans l'environnement
ELISA + exposés/ non exposés p=0.03 ; PHS/ non PHS p=0.001

[Selvaraju 2005] 4 biocides / *M. immunogenum* : efficacité faible *in vitro*, inefficacité en situation réelle.
Pour *Pseudomonas fluorescens* : assez efficace

Revue de la littérature 3/3

[KHAN 2005] Plusieurs génotypes de *M. chelonae* et de *M. immunogenum* sont isolés; contredit **[Wallace 2002]** qui ne trouvait qu'un seul génotype de *M. immunogenum* dans 10 usines / 6 états.

[Gupta 2006] Cas de PHS dans des envir^{ts} conformes à la réglementation américaine (particules / air)
USA : 1,2 millions de personnes exposées,
100 cas de PHS liés aux aérosols de fluides de coupes.

[Fischwick 2005] Europe: nombre d'exposés? un seul cas en G-B

Contexte 1/3

10 cas de PHS liés à une exposition aux fluides de coupe, d'une même entreprise (secteur automobile), diagnostiqués au CHU de Lille entre 2001 et 2005.

Les médecins du travail de l'entreprise ont demandé:

- une enquête environnementale sur les huiles de coupes (n=43) et des eaux : osmosées (n=5), ultrafiltrées (n=2), industrielles (n=2)
- des recherches de précipitines « à la carte » pour 9/10 PHS

Matériels et méthodes 1/7

Cultures des huiles et eaux osmosées:

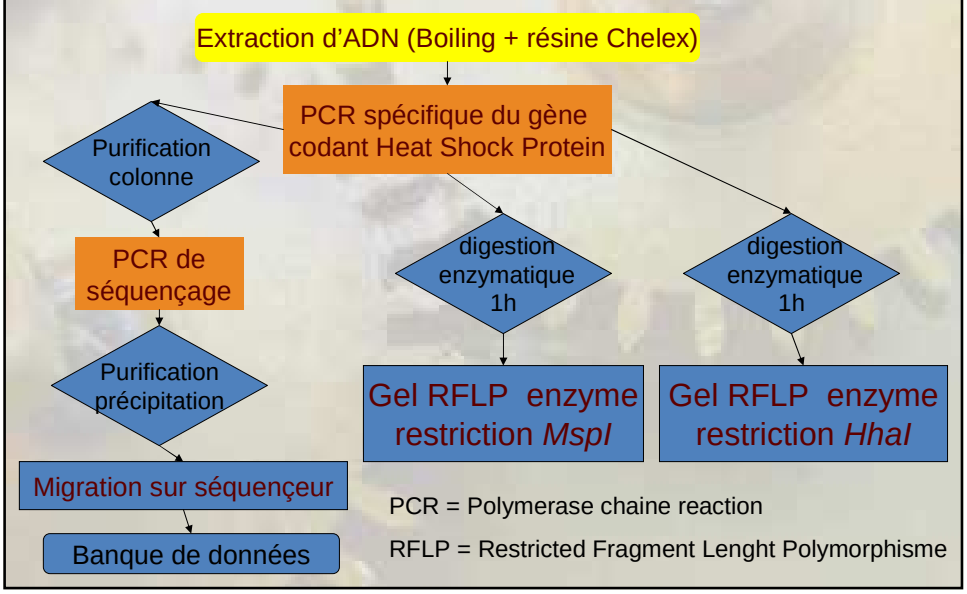
Milieux Difco et R8 pour actinomycètes (30 et 42℃)
DG18 et Malt 10% NaCl pour moisissures (30 et 20℃)
Mueller Hinton pour bactéries (30℃)

Identifications des bactéries:

Colorations de Ziehl, Gram; galeries API
Séquençage ADN du gène codant HSP (Heat Shock Protein)
RFLP avec 2 enzymes de restriction *MspI & HhaI*

Matériels et méthodes 2/7

Identifications moléculaires:



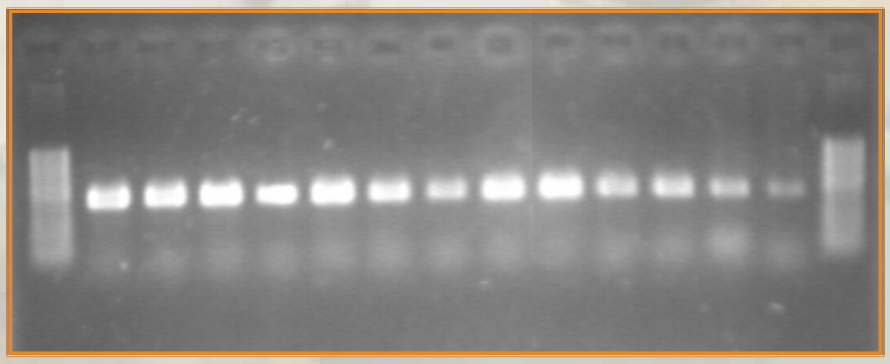
PCR = Polymerase chaine reaction

RFLP = Restricted Fragment Lenght Polymorphisme

Matériels et méthodes 3/7

PCR – hsp

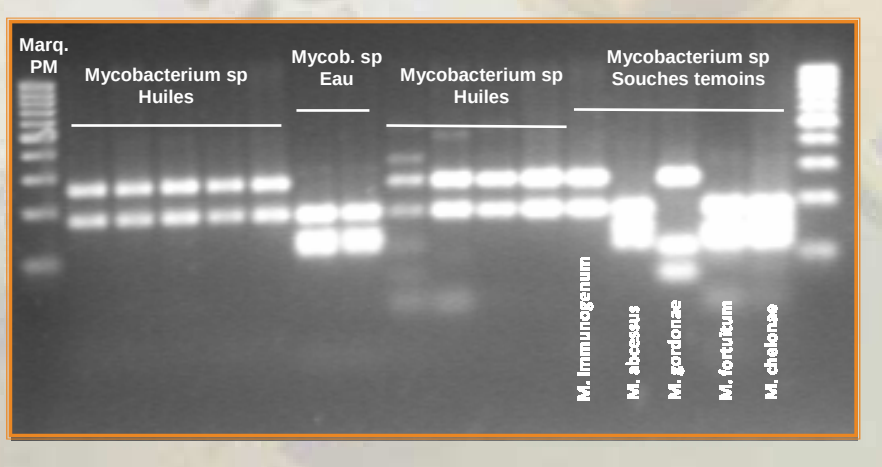
(gène codant pour Heat Shock Protein 65)
avant « digestion » par enzymes de restriction



Matériels et méthodes 4/7

PCR hsp + RFLP avec l'enzyme *MspI*

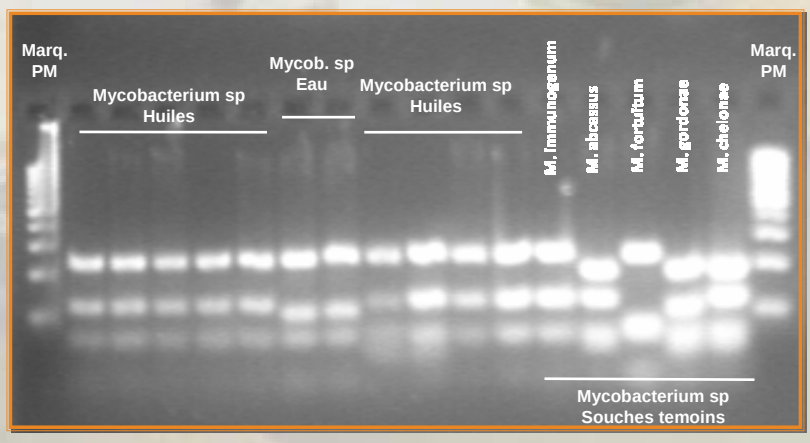
Digestion du fragment hsp par l'enzyme *MspI*



Matériels et méthodes 5/7

PCR hsp + RFLP avec l'enzyme *HhaI*

Digestion du fragment hsp par l'enzyme *HhaI*



Matériels et méthodes 6/7

Antigènes

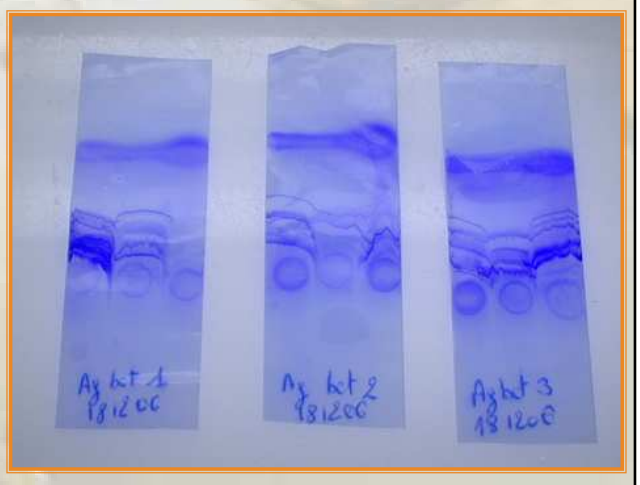
« à la carte »

7 «extraits totaux d'huile usagée»,

1 «extrait d'huile neuve»

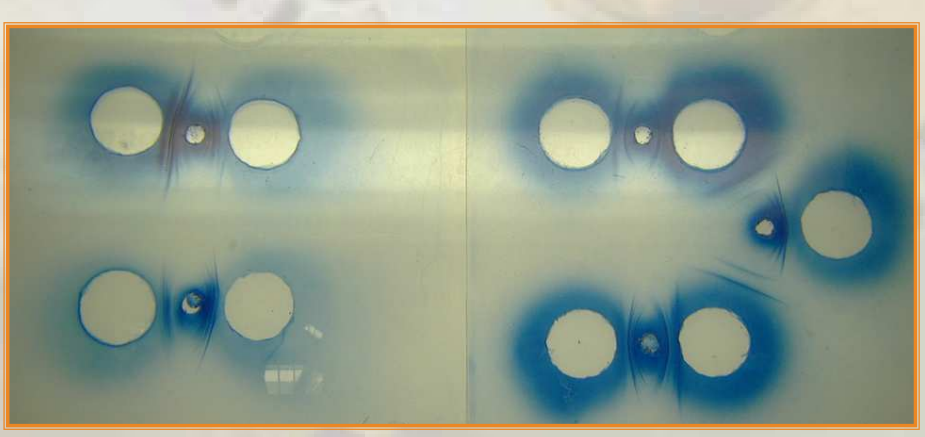
2 antigènes somatiques *M. immunogenum*

Electrosynérèse
sur acétate de cellulose



Matériels et méthodes 7/7

Double diffusion en gel d'agar



Résultats 1/2

***M. immunogenum* (*Mi*) isolé de:**

22 des 42 huiles usagées (ni de l'huile neuve, ni des eaux), isolement également d'*Aspergillus fumigatus* (1), *A. flavus* (1), *Fusarium solani* (2), *Bacillus* sp. (12), stérile (3).

1/9 eaux (osmosée): isolement d'un *Mycobacterium* sp., et 1/9 d'un *Acremonium*. Une flore bactérienne abondante et variée contamine toutes les eaux.

Concentrations dans les huiles: *Mi (170 ufc/100 µL)*

Moisissures 12 ufc /100 µL, Bacillus sp. *25 ufc /100 µL*

Résultats 2/2

Sérologies

«extrait total d'huile usagée» et Ag *Mi*

9 cas de PHS comparés au 18 témoins non exposés

Avec **«extrait total d'huile usagée»,**
en moyenne 3,9 arcs en ES *vs* 1,4 arc « témoins »

Avec Ag *M. immunogenum* :
9 arcs [bornes : 4-12] *vs* 0,3 [0-1] en ES
7,1 arcs [4-10] *vs* 0,3 [0-1] en DD.

Résultats 3/4

Sérologies avec Ag *M. immunogenum*

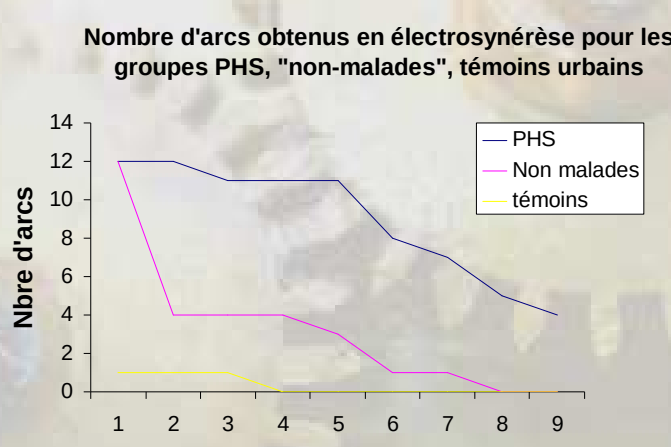
9 cas de PHS comparés au 9 témoins «non malades»

9 arcs [bornes : 4-12] *vs* 3,2 [0-12] en ES
7,1 arcs [4-10] *vs* 2,4 [0-11] en DD

Mais un des 9 témoins; 12 arcs en ES et 11 en DD
Besoin +++ d'évaluation clinique des « non malades »

Hors L… 27 ans:
9 arcs [bornes : 4-12] *vs* 2,1 [0-4] en ES
7,1 arcs [4-10] *vs* 1,4 [0-6] en DD

Résultats 4/4



Conclusions

M. immunogenum est présent dans plus la moitié des huiles usagées, mais pas dans l'eau osmosée. Origine de cette bactérie?

La sérologie semble efficace pour distinguer les cas, des témoins exposés et non exposés

L'identification à l'espèce par séquençage du gène de l'HSP65 est possible

La RFLP est une technique peu coûteuse, utilisable pour réaliser de nombreux contrôles dans le cadre d'identifications bien ciblées.

Perspectives

La décontamination des cuves (plusieurs cuves de 100 m^3 par atelier) est un véritable défi.

Choix métrologiques : cultures? RFLP ? PCR-rt

L'ampleur de l'exposition aux huiles dans l'industrie française et l'incidence du nombre de cas de PHS des mécaniciens sont méconnues.

Une étude multicentrique couvrant différentes activités (automobile, micromécanique, décolletage…) serait nécessaire.