

Retentissement systémique et toxicité du  
relargage des particules métalliques par les  
Dispositifs Médicaux Implantables. Études in  
vitro et in vivo

*Systemic impact and toxicity of metal particles  
release from Implantable Medical Devices. In vitro  
and in vivo studies*

**Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay**

École doctorale n°577 : Structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)

Spécialité de doctorat : Sciences de la Vie et de la Santé

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm, Infection et inflammation,  
78180, Montigny-Le-Bretonneux, France

Référent : Université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines

**Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,**

**le 19/11/2021, par**

**Marie BELLOUARD**

**Composition du Jury**

**Thomas BAUER**

Professeur, Université de Versailles-Saint Quentin

Président

**Jean-Pierre GOULLÉ**

Professeur, Université de Rouen

Rapporteur & Examineur

**Pascal KINTZ**

Professeur, Université de Strasbourg

Rapporteur & Examineur

**Marc AUGSBURGER**

Docteur, Université de Genève

Examineur

**Direction de la thèse**

**Jean-Claude ALVAREZ**

Professeur, Université de Versailles-Saint Quentin

Directeur de thèse



## REMERCIEMENTS

### **A monsieur le professeur Jean-Claude Alvarez,**

Après tous ces rebondissements, nous voyons enfin le bout de ces 5 années de thèse ! Merci de votre disponibilité, de votre recul bienveillant sur mon travail, de votre coaching dans les moments de découragements, de vos solutions à tous les problèmes et de votre expertise. Au-delà de ce projet, vous me permettez de progresser au quotidien et me transmettez votre passion pour la toxicologie. Merci d'avoir fait de la toute jeune interne que j'étais, une biologiste engagée !

### **A monsieur le professeur Thomas Bauer,**

Merci d'avoir accueilli l'étude Prometox au sein de votre service et de vous être rendu disponible. J'espère que vous apprécierez ce regard de toxicologue sur votre domaine chirurgical. Je tiens à vous remercier de faire partie de mon jury et de consacrer du temps à ce travail.

### **A monsieur le professeur Jean-Pierre Goullé,**

En me plongeant dans la littérature au début de ma thèse, votre nom est vite apparu de manière récurrente. J'ai beaucoup d'admiration pour votre travail. Merci de nous avoir partagé votre expertise en inorganique et de vos encouragements. Je suis très honorée de vous compter parmi les membres de mon jury et que vous ayez accepté d'en être le rapporteur.

### **A monsieur le professeur Pascal Kintz,**

Votre expertise dans tous les domaines de la toxicologie n'est plus à démontrer. Merci d'avoir accepté de siéger parmi mon jury et d'être rapporteur de cette thèse. Votre regard sur ce travail a une réelle importance pour moi.

### **A monsieur le docteur Marc Augsburgers,**

Mes séjours en Suisse ont été mémorables, tant par le travail accompli, que par la richesse humaine que j'y ai découvert. Merci pour toutes ces aventures et pour votre accueil avec Fabienne. Je ne taris pas d'éloge quant à l'hospitalité suisse ! Merci de m'avoir ouvert les portes du CURML et pour ce travail réalisé ensemble. Je suis très heureuse de te compter parmi les membres de mon jury.

**A monsieur le docteur Jean-Luc Marmorat et ses collaborateurs,**

Merci pour votre grand investissement dans l'étude Prometox, pour l'accueil qui m'a été fait au sein de votre service et pour votre disponibilité. J'ai grandement apprécié la qualité de nos échanges et votre volonté de mener à bien ce projet.

**A l'équipe de chirurgie orthopédique de l'hôpital Raymond Poincaré,**

Des consultations, à l'hospitalisation en passant par les entrants et le bloc, l'étude Prometox et moi-même avons toujours été agréablement reçues, malgré un léger harcèlement par moment. Je suis ravie d'avoir pu découvrir la chirurgie orthopédique de l'intérieur. J'imagine que mes appels doivent vous manquer !

**A monsieur le professeur Lorin de la Grandmaison et ses collaborateurs,**

Premier partenaire de l'étude Prometox, l'IML a largement contribué à la réussite de ce projet. Merci d'avoir inclus le plus grand nombre de patients possible et pour les prélèvements laborieux effectués avec attention. Merci de votre disponibilité et votre réactivité à chacun de mes mails.

**A mes collègues et amis biologistes du laboratoire de toxicologie,**

Merci pour votre aide très précieuse tant par nos discussions enrichissantes que par votre soutien et le temps que vous m'avez permis de consacrer à ma thèse pendant ces 5 années. J'aime notre équipe et l'investissement que nous avons pour faire progresser le labo. Merci du partage de vos connaissances. Merci Emuri d'être toujours là pour me conseiller et pour m'aider dans les manip et pour tes talents de tricoteuse. Merci Paméla d'être mon binôme depuis notre arrivée, de ta présence rassurante et pour tes tiroirs remplis de délices ! Merci Adeline de ta disponibilité à mon égard, de tes grandes connaissances et de partager nos galères de vélo. Merci Charlotte pour ta douceur, ton écoute... et les futurs babysittings ! Merci Amine de ton expertise, ton investissement dans les projets du labo et ta patience face à mes questions « thèse ».

**A la fine équipe de techniciens du laboratoire de toxicologie et en particulier madame Isabelle Etting,**

Merci de mettre du cœur à l'ouvrage et de rendre mes journées agréables. Merci Isabelle de m'avoir aidé à dompter l'ICP.

**A Marie Gasser,**

J'ai beaucoup aimé notre aventure commune au service de la métabolomique. Merci de ton expertise, de ton investissement et de nos échanges rassurants. J'espère que le 19 novembre sera l'occasion de se rencontrer enfin !

**A Aurélien Thomas et l'équipe du CURML à Genève et Lausanne,**

Passer ces deux séjours chez vous m'a non seulement convaincue que la vie suisse est fort agréable, mais aussi que l'accueil y est très chaleureux. Merci tout spécialement à Sébastien, Federica, Timothée et Nasim de vous être rendus disponibles et d'avoir permis la mise en place et l'aboutissement de ce travail.

**A madame Julie Massonneau, au professeur Martin Rottmann et à l'équipe de la plateforme des biomarqueurs innovants,**

Notre collaboration m'a permis de découvrir une nouvelle facette de la biologie et d'enrichir ce travail. Merci pour votre réactivité et pour le soin apporté à mes expérimentations. Ce fut un plaisir de travailler ensemble. Je serai ravie de renouveler cette expérience !

**A Elodie Lamy et le professeur Stanislas Grassin-Delyle, team MasSpecLab**

Stan, merci de m'avoir transmis tes connaissances sur l'ICP et d'avoir mis la main à la pâte à plusieurs reprises. Merci de tes précieux conseils et de ton recul. Elodie, merci de t'être mise à l'ICP, pour qu'on puisse galérer ensemble !

**A mes parents,**

Vous m'avez permis d'être là aujourd'hui. Quelle chance j'ai de vous avoir ! Merci pour tout. Merci d'avoir fait des kms de balades en poussette pour me laisser le temps de finir mon manuscrit.

**A Théophile et Ambroise,**

Mes deux grands amours. Deo gratias ! Nous allons enfin pouvoir évincer le mot « thèse » de notre quotidien ! Merci infini.

**A Pierre-Emmanuel, Isabelle et Alban, Armand et Jean-Vincent,**

**A Arnaud et Virginie, à Godefroi, Apolline et Adélaïde,**

**A tous mes précieux amis,**



# Table des matières

<i>Liste des tableaux</i> .....	3
<i>Liste des figures</i> .....	4
<i>Liste des annexes</i> .....	4
<i>Liste des abréviations</i> .....	5
<b>Première partie : État de la littérature</b> .....	<b>7</b>
<b>I. Les dispositifs médicaux implantables</b> .....	<b>8</b>
<i>I.1 Les différentes prothèses</i> .....	9
<i>I.2 La composition des prothèses</i> .....	11
I.2.1 Bref historique.....	12
I.2.2 Couple de frottement Métal-Métal (MoM).....	13
I.2.3 Couple de frottement polyéthylène-métal (PE/Me).....	14
I.2.4 Couple de frottement céramique-céramique (CoC).....	15
<b>II. Les métaux</b> .....	<b>17</b>
<i>II.1 L'analyse élémentaire</i> .....	17
<i>II.2 Les métaux composants les prothèses et leur toxicité</i> .....	20
II.2.1 Chrome .....	20
II.2.2 Cobalt.....	22
II.2.3 Nickel.....	23
II.2.4 Titane .....	24
II.2.5 Molybdène .....	25
II.2.6 Vanadium.....	26
II.2.7 Tungstène.....	26
II.2.8 Autres métaux.....	27
<i>II.3 Toxicité des prothèses</i> .....	29
II.3.1 Les ET décrits .....	30
II.3.2 Suivi de l'évolution des prothèses .....	34
III.3.3 Toxicité locale .....	34
III.3.4 Toxicité systémique.....	35
<b>III. L'inflammation</b> .....	<b>37</b>
<b>IV. Objectif</b> .....	<b>39</b>
<b>Deuxième partie : Travaux personnels</b> .....	<b>41</b>
<i>Partie 1 - A high-resolution ICP-MS method for the determination of 38 inorganic elements in human whole blood, urine, hair and tissues after microwave digestion</i> .....	43
<i>Partie 2 - Applications à des sujets porteurs de prothèse</i> .....	55
<b>Partie 2A : Évaluation de la toxicité des prothèses - Analyse des éléments traces -</b> .....	<b>57</b>
<b>I. Introduction</b> .....	<b>59</b>
<b>II. Matériel et méthodes</b> .....	<b>61</b>
<i>II.1 Protocole Prometox</i> .....	61
<i>II.2 Analyse en ICP-MS</i> .....	63
<i>II.3 Analyse statistique</i> .....	64
<b>III. Résultats</b> .....	<b>65</b>
<i>III.1 Population d'étude</i> .....	65
<i>III.2 Analyse en ICP-MS des ET</i> .....	66
<b>IV. Discussion</b> .....	<b>79</b>
<i>IV.1 Population générale</i> .....	79

IV.1.1 Valeurs de référence.....	79
IV.1.2 Répartition tissulaire .....	81
IV.1.3 Comparaison des morts et vivants.....	84
IV.2 <i>Etude Prometox</i> .....	84
IV.2.1 Sujets vivants .....	85
IV.2.2 Sujets autopsiés et comparaison.....	87
<b>V. Conclusion .....</b>	<b>90</b>
<b>Partie 2 B : Évaluation de l'impact pro-inflammatoire des prothèses - Analyse des cytokines- .....</b>	<b>91</b>
<b>I. Introduction .....</b>	<b>93</b>
<b>II. Matériel et méthodes .....</b>	<b>95</b>
II.1 Réactifs, standards et solutions de travail.....	95
II.2 Préparation d'échantillon .....	95
II.3 Instrumentation.....	95
II.4 Analyse des données .....	96
<b>III. Résultats.....</b>	<b>96</b>
<b>IV. Discussion.....</b>	<b>98</b>
<b>V. Conclusion .....</b>	<b>102</b>
<b><i>Partie 3 - Toxicity and metabolomic impact of Cobalt, Chromium and Nickel exposure on HepaRG hepatocytes.....</i></b>	<b><i>105</i></b>
<b><i>Conclusion générale .....</i></b>	<b><i>139</i></b>
<b><i>Bibliographie.....</i></b>	<b><i>141</i></b>
<b><i>Annexes .....</i></b>	<b><i>169</i></b>



# Liste des tableaux

Tableau 1 - Comparaison des différents couples de frottement utilisés dans les prothèses (MoM, Coc et PE/Me) en fonction de leur composition. ....	16
Tableau 2 - Comparatif des techniques d'analyse élémentaire (SAA, ICP-AES, ICP-MS)....	19
Tableau 3 - Concentrations de Cr, Co, Ni, Ti et Mo moyennes ou médianes (*) en µg/L retrouvées dans les études et cas rapportés dans la littérature, selon le type de prothèse, le nombre de cas, la matrice analysée et la durée d'exposition (mois).....	31
Tableau 4 - Caractéristiques de la population de l'étude Prometox .....	66
Tableau 5 - Comparaison des concentrations (médianes, écarts interquartiles) des 39 ET dans le sang, les urines et les cheveux de la population témoin vivante (n=51) et autopsiée (n=20) de l'étude Prometox .....	68
Tableau 6 - Concentrations des 39 ET (médianes, écarts interquartiles) dans le sang, les urines, les cheveux et les organes (cerveau, cœur, foie, poumons, rate, reins) de la population témoin autopsiée (n=20) de l'étude Prometox .....	71
Tableau 7- Comparaison des concentrations (médianes, écarts interquartiles) des ET significativement différents (p-value < 0,05), entre les témoins vivants et les patients porteurs de prothèse dans le sang et les urines à l'entrée et à la sortie d'hospitalisation, les cheveux, le tissu péri-prothétique, le liquide synovial : Sb, Ba, Be, Cs, Cr, Co, Fe, La, Mn, Mo, Ni, Ru, Te, Ti, W, V, Zr. ....	74
Tableau 8 - Comparaison des concentrations (médianes, écarts interquartiles) des ET significativement différents (p-value < 0,05), entre les témoins morts et les porteurs de prothèse autopsiés dans le sang, les urines, les cheveux, le cerveau, le cœur, le foie, les poumons, la rate, les reins et le tissu péri-prothétique : Be, Cr, Co, Fe, La, Mo, Ni, Te, Ti. ..	76
Tableau 9 - Variations des concentrations d'ET significativement impactés par la présence de prothèse, dans les matrices (sang et urines à l'entrée et à la sortie d'hospitalisation ou recueillis pendant l'autopsie, cheveux, tissu péri-prothétique, liquide synovial et viscères) des patients porteurs de prothèse de l'étude Prometox .....	78
Tableau 10 - Proposition de valeurs de référence de 13 ET dans le sang, le sérum et les urines, de l'INSPQ, en µg/L .....	81
Tableau 11 - Comparaison des taux de cytokines (médianes, écarts interquartiles) dans le sang total pré-opératoire des témoins et des sujets vivants porteurs de prothèse de l'étude Prometox .....	97

## Liste des figures

Figure 1 – Illustration des différentes parties d’une prothèse totale de hanche (PTH) : cupule, insert cotyloïdien, tête et tige fémorale .....	9
Figure 2 - Illustration des différentes parties d’une prothèse totale de genou (PTG): composant fémoral, insert et embase tibiaux .....	10
Figure 3 – Illustration des différentes parties d’une prothèse totale de cheville (PTC) : composant tibial, patin, composant talien.....	11
Figure 4 - Schéma d'un ICP-MS .....	20
Figure 5 – Répartition de la population de l’étude Prometox : sujets vivants et morts, porteurs de prothèse et témoins, selon le type de prothèse (PTH, PTG, PTC) .....	65

## Liste des annexes

Annexe 1 : Supplementary data (Grassin-Delyle et al., Talanta, 2019)	
Annexe 2 : Protocole Prometox	
Annexe 3 : Avis favorable CPP Est II	
Annexe 4 : Note d’information au patient et formulaire de consentement	

# Liste des abréviations

ATSDR : Agency for Toxic Substances and Disease Registry  
CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer  
CoC : Couple de frottement céramique-céramique  
CrCoMo : alliage chrome-cobalt-molybdène  
DM : Dispositifs médicaux  
DMI : Dispositifs médicaux implantables  
ET : Éléments traces  
HR : Haute résolution  
ICP-AES : Spectrométrie d'émission atomique en plasma couplé par induction  
ICP-MS : Spectrométrie de masse en plasma couplé par induction  
IL : Interleukine  
MoM : Couple de frottement métal-métal  
MRL : Minimum Risk Level ou niveau de risque minimum  
NA : non applicable (valeurs manquantes)  
NR : non renseigné  
PE/Me : Couple de frottement polyéthylène/métal  
PTC : Prothèse totale de cheville  
PTFE : Polytétrafluoroéthylène  
PTG : Prothèse totale de genou  
PTH : Prothèse totale de hanche  
RfC : Concentration de référence  
RfD : Dose de référence  
UHMWPE : Polyéthylène à très haute masse moléculaire  
VTR : Valeurs toxiques de référence



---

## **Première partie**

### **État de la littérature**

---

## **I. Les dispositifs médicaux implantables**

Le code de la Santé Publique définit les dispositifs médicaux (DM) comme tout instrument, appareil, équipement, matière ou produit, destiné à être utilisé chez l'homme à des fins médicales et dont l'action principale voulue n'est pas obtenue par des moyens pharmacologiques ou immunologiques, ni par métabolisme. Les dispositifs médicaux implantables (DMI) sont conçus pour être implantés en totalité ou en partie dans le corps humain (1). Les dispositifs médicaux sont classés en quatre catégories, selon leur risque pour la santé. La classe I (à risque faible) comportent les lunettes correctrices, les béquilles, etc. Les DM de classe IIa (à risque potentiel mesuré) couvrent entre autres les lentilles de contact, les couronnes dentaires et les appareils d'échographie et ceux de classe IIb (à risque potentiel élevé) comprennent les préservatifs ou les produits de désinfection des lentilles. Les prothèses, implants mammaires et stents font partie des dispositifs médicaux de classe III (les plus à risque) (2,3).

Les prothèses sont des dispositifs médicaux implantables visant à remplacer une articulation usée et douloureuse, après épuisement des traitements non opératoires (4). La pose de prothèse permet de soulager la douleur et d'améliorer la mobilité. La hanche est l'articulation la plus fréquemment touchée. 400 000 prothèses totales de hanche (PTH) sont posées chaque année en France (5). Le genou, la cheville, l'épaule et le poignet sont aussi concernés par les prothèses. 80 000 prothèses totales de genou (PTG) ont été posées en 2016 (données du CHU de Brest) et 4 029 prothèses totales de chevilles (PTC) ont été posées entre juin 2012 et 2019 (données de l'Association Française de la Chirurgie du pied, AFCP). De nombreux types de prothèses existent, avec différents modes de fixation (avec ou sans ciment), couples de frottement (dur-dur : métal-métal (MoM), céramique-céramique (CoC) ou dur-mou : polyéthylène-métal (PE/Me)) (6), matériaux et formes. Les principales indications de pose de prothèse en France, sont l'arthrose et les fractures. L'arthrose correspond à une maladie articulaire entraînant une destruction du cartilage (7). Elle touche 10 millions de Français, soit 17 % de la population, majoritairement des femmes de plus de 65 ans, d'après l'Agence Française de lutte Antirhumatismale (AFSAR).

Les principaux risques suite à la pose de prothèse sont la luxation, la fracture osseuse, l'infection de l'articulation, une lésion nerveuse locale, la rupture de l'implant, une perte osseuse et des réactions locales ou systémiques liées aux particules contenues dans la prothèse (8).

## I.1 Les différentes prothèses

Dans le cas des PTH, les principales causes de remplacement de l'articulation sont la coxarthrose (destruction du cartilage au niveau de la tête fémorale et du cotyle) et les fractures du col du fémur. D'autres pathologies telles que la luxation congénitale de la hanche, la nécrose de la tête fémorale due à une altération de la circulation sanguine ou des maladies inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde peuvent nécessiter la pose de prothèse (4). La prothèse est constituée d'une cupule en métal, céramique ou polyéthylène et d'une pièce fémorale en métal, illustré en *Figure 1*. Le couple de frottement PE/Me fait à ce jour référence et présente un taux de survie de 80 % à 30 ans (9). L'émergence de cupule à double mobilité, brevetée en 1976 par le Pr Bousquet, a permis de diminuer significativement le risque de luxation prothétique post opératoire (10). Dans ce cas, la tête mobile est fixée dans un cotyle en polyéthylène lui-même mobile, inséré dans la cupule, fixée dans l'acétabulum.



*Figure 1 – Illustration des différentes parties d'une prothèse totale de hanche (PTH) : cupule, insert cotyloïdien, tête et tige fémorale (11)*

L'articulation du genou permet la liaison entre le fémur et le tibia. Cette articulation complexe repose sur l'interaction entre des structures musculaires, osseuses, ligamentaires et méniscales. Différents modèles de PTG existent, en fonction du degré d'atteinte de l'articulation, du mode de fixation, de la mobilité des composants et des caractéristiques du patient (4). Les PTG sont aujourd'hui composées d'un insert tibial en polyéthylène de grande résistance et d'un composant fémoral en métal, alliage de chrome, cobalt et nickel, présentant

une bonne résistance à la rupture, peu de déformabilité et un glissement adapté (*Figure 2*). La forme complexe de l'articulation et un plus grand risque de rupture n'ont pas permis, à ce jour, le développement de prothèses en céramique.



*Figure 2 - Illustration des différentes parties d'une prothèse totale de genou (PTG): composant fémoral, insert et embase tibiaux (12)*

La prothèse totale de cheville (PTC) a, quant à elle, une apparition plus récente, dans les années 1970. Elle permet de remplacer l'articulation reliant tibia, fibula et talus, en cas d'arthrose souvent post-traumatique, entraînant une disparition du cartilage. Sa pertinence face à l'arthrodèse (fixation d'une vis ou d'une plaque pour relier les deux parties osseuses) est encore en discussion à ce jour, suite à des problèmes de survie de la prothèse et de géodes (cavités pathologiques induites par une perte osseuse au sein de l'articulation) (13). La prothèse permet néanmoins une meilleure préservation du mouvement et de la fonction et une amélioration de la marche. La PTC est composée de deux parties métalliques (tibiale et talienne) et d'un patin en polyéthylène (*Figure 3*). Les complications les plus fréquentes des arthroplasties totales de cheville incluent les fractures des malléoles (6-10 %), les nécroses cutanées (2 %-14 %), les descellements (2-14 %), les douleurs et rigidités résiduelles (3-5 %) et les infections (4-5 %) (14).





Figure 3 – Illustration des différentes parties d'une prothèse totale de cheville (PTC) : composant tibial, patin, composant talien (15)

L'épaule est l'articulation la plus mobile du corps humain, composée de trois os : l'humérus, la scapula et la clavicule. En cas d'usure invalidante du cartilage (arthrose) liée bien souvent à l'âge et d'épuisement des traitements médicamenteux, l'articulation peut être remplacée partiellement (hémiarthroplastie de la partie endommagée de la tête de l'humérus) ou totalement. Les prothèses totales sont composées d'une tête humérale métallique et d'une cupule en polyéthylène qui remplace la glène (surface de la scapula où s'articule la tête humérale). On trouve des prothèses anatomiques, avec une fixation entre l'humérus et la glène, ou inversées, utilisées quand les tendons de la coiffe des rotateurs sont abîmés, entre la scapula et l'humérus (4,16).

## I.2 La composition des prothèses

Les prothèses sont composées d'au moins deux parties, fixées de part et d'autre de l'articulation, de composition identique ou non. Cela constitue un couple de frottement ou couple de friction. Ces derniers doivent avoir un faible coefficient de friction, une dureté de surface élevée avec une faible ductilité et une résistance aux rayures et à la corrosion, et générer un faible volume de particules d'usure. En outre, les surfaces exposées aux tissus doivent être non cytotoxiques, biocompatibles, bio-inertes et de fabrication facile (17,18).

Le *Tableau 1* résume les avantages et inconvénients des principaux couples de frottement utilisés.

Les couples de frottement peuvent être dur-dur : MoM, CoC ou dur-mou : PE/Me ou PE/Céramique. Il n’y a, à ce jour, pas de consensus dans le choix du couple de frottement utilisé, qui diffère selon les pratiques entre les pays. De nombreux facteurs influencent le choix du matériau, comme le coût de l’implant, l’âge et le niveau d’activité du patient, les complications pendant l’opération, etc. Ainsi, dans le cas des PTH par exemple, les États-Unis utilisent des polyéthylènes très hautement réticulés à 62 % associés à une tête métallique (87 %). En Corée, 70 % des couples de frottement sont en CoC. En France, le polyéthylène conventionnel est majoritairement utilisé (65 %) (6).

### *1.2.1 Bref historique*

De nombreux matériaux ont été expérimentés depuis l’apparition du terme ‘prothèse’ dans le langage chirurgical, au XVIIème siècle (19). Les premières prothèses font leur apparition en 1890, au Congrès international de Berlin, où Themistoklès Gluck expose ses prothèses articulaires de hanche, de genou, d’épaule en ivoire, fixées par un ciment composé de plâtre et de pierre ponce (20). Le caoutchouc, le verre, le bois, le cuivre, l’or et l’argent ont aussi été testés en vain, essayant de combiner biocompatibilité et résistance à la fatigue, rigidité, ténacité, résistance aux charges statiques et dynamiques, et haute résistance à l’usure. En 1946, les frères Robert et Jean Judet mettent au point une prothèse de tête fémorale en métacrylate de méthyle (plexiglass), finalement abandonnée à cause des débris d’acrylique (21). L’utilisation des métaux semble faire consensus. Moore met ainsi au point un tête fémorale en vitallium en 1950, qui reste encore utilisée au début des années 2000 comme prothèse de sauvetage rapidement placée (22).

C’est en 1951, en Angleterre, que Mac Kee met au point et implante pour la première fois, une PTH MoM fonctionnelle (23). L’alliage utilisé est en chrome-cobalt. Jusque dans les années 1960, la grande majorité des prothèses ont un couplage MoM, à l’origine de frictions et d’une usure précoce des différents éléments prothétiques. De plus, les prothèses MoM font l’objet d’une ostéointégration limitée. Afin de résoudre ces problèmes, Sir John Charnley met au point le couplage PE/Me en 1962, dont les composants sont fixés grâce à un ciment acrylique osseux déjà utilisé à l’époque pour les implants dentaires (24). Il associe une partie fémorale en métal et un cotyle en polyéthylène de haut poids moléculaire, avec une tête de 22 mm. Afin de réduire l’usure et d’éviter l’ostéolyse périprothétique (résorption de l’os autour de l’implant), induite par les débris de polyéthylène, Boutin développe le couple de frottement CoC (alumine-alumine) dans les années 70 (25).

### *1.2.2 Couple de frottement Métal-Métal (MoM)*

Les prothèses MoM ont longtemps fait référence. L'acier inoxydable, composé de fer (Fe), carbone (C), chrome (Cr), nickel (Ni) et de manganèse (Mn), phosphore (P), soufre (S) et silice (Si) à l'état de trace (26), a d'abord été utilisé pour sa résistance à l'oxydation et sa fabrication simple (17,27). Il ne convient néanmoins pas aux 10 % de la population allergique au nickel. Des alliages en chrome-cobalt ou chrome-cobalt-molybdène (CrCoMo) ont été développés, plus coûteux à fabriquer mais avec de bonnes propriétés d'usure, une résistance élevée à la corrosion et à la traction et une grande dureté (350 HV). Les alliages CrCoMo, largement majoritaires, sont composés de 58,9 à 69,5 % de Co, 27 à 30 % de Cr, 5 à 7 % de Mo, et de petites quantités d'autres éléments (Mn, Si, Ni, Fe, W et C). Ces alliages métalliques peuvent être divisés en deux catégories : les alliages à haute teneur en carbone (teneur en carbone > 0,20 %) et les alliages à faible teneur en carbone (teneur en carbone < 0,08 %) (28,29). Le Co et le Cr, oligo-éléments essentiels, sont aussi toxiques. L'usure de la prothèse est responsable d'un relargage des ions métalliques, source de toxicité (30).

Les alliages en titane (Ti) sont aussi retrouvés ( $TiAl_6V_4$ ), mais moins résistants malgré une bonne biocompatibilité. Le vanadium (V) étant un métal relativement toxique, cet alliage  $TiAl_6V_4$  a été remplacé par du fer (Fe) ou du niobium (Nb), réalisant ainsi les alliages améliorés  $TiAl_5Fe_{2,5}$  et  $TiAl_6Nb_7$ . Ces alliages présentent une plus grande dureté dynamique et un module élastique plus faible, permettant une meilleure répartition des contraintes entre l'implant et l'os (31). D'autres alliages de Ti avec du zirconium (Zr), du tantale (Ta), de l'hafnium (Hf), de la silice (Si) ou de l'oxygène (O) ont été développés par la suite (26). Une nouvelle classe d'alliages de Ti introduite dans le domaine orthopédique utilise du Mo en concentration supérieure à 10 % (32). Le Ti peut être recouvert d'hydroxyapatite, favorisant la reconstruction osseuse (33).

Les particules de la prothèse peuvent entraîner une réaction inflammatoire locale, appelée métallose. Elle se produit majoritairement dans la période postopératoire précoce, au cours des premières années, et peut provoquer une fibrose, une ostéonécrose, des pseudotumeurs ou un descellement de l'implant. Les risques d'accumulation d'ions métalliques sont plus élevés en cas d'insuffisance rénale chronique (34), ce qui constitue donc une contre-indication à la pose de prothèse MoM.

Au début des années 2000, ces implants étaient utilisés dans plus d'un cas sur cinq au Royaume-Uni. Aujourd'hui, ils sont utilisés dans moins de 1 % des opérations chirurgicales (35). Les prothèses MoM représentaient 35 % des arthroplasties de la hanche aux États-Unis en 2006 et est minoritaire aujourd'hui (36). Ils sont réservés principalement aux sujets masculins jeunes souhaitant conserver une activité sportive (6).

### *1.2.3 Couple de frottement polyéthylène-métal (PE/Me)*

Différents polymères tels que le polytétrafluoroéthylène (PTFE), le polyéthylène à très haute masse moléculaire (UHMWPE pour Ultra High Molecular Weight Polyethylene) ou le polyéthercétone (PEEK) sont utilisés dans les prothèses PE/Me, avec d'excellentes propriétés mécaniques et une grande résistance à l'usure, mais générant des débris, à l'origine d'une réaction immunitaire. Le PTFE ou polyéthylène conventionnel de poids moléculaire élevé (2 à 6 000 000 g/mol), en particulier, entraîne une perte osseuse et ainsi, un relâchement de la tige de l'implant conduisant à la révision de la prothèse (32).

Plusieurs types d'usure peuvent entraîner une reprise de prothèse : l'usure par adhérence (ou friction), l'usure par fatigue (liées à des fortes contraintes) et l'usure par abrasion (de l'état de surface) (6).

L'utilisation de l'UHMWPE est prometteur, avec une survie initiale à 25 ans de 77 à 81 % (37). Ce polymère se caractérise par sa faible friction et sa grande résistance aux chocs, grâce à une meilleure cristallisation du polymère. L'usure et l'ostéolyse restent néanmoins élevées. De nouvelles techniques de fabrication de l'UHMWPE, telles que l'irradiation gamma des prothèses et l'imprégnation des prothèses avec de la vitamine E (un antioxydant naturel connu) ont permis de réduire le taux d'usure des prothèses (38). Un autre inconvénient est l'épaisseur minimale d'UHMWPE pouvant être utilisée (39), réduisant le diamètre maximal de la tête, et ainsi la stabilité et l'amplitude des mouvements.

Le polyétheréthercétone (PEEK) est un polymère biocompatible, un thermoplastique haute performance semi-cristallin, considéré comme un matériau alternatif pour les arthroplasties articulaires en raison de ses propriétés mécaniques favorables (inertie, stabilité thermique) et de la biocompatibilité de ses débris d'usure. Après des débuts prometteurs, il semble cependant, peu résistant aux fortes contraintes de contact (40).

Jusqu'au milieu des années 1990, la prothèse de hanche la plus répandue était le couple PE/Me, surtout chez les patients plus âgés et moins actifs (41), mais avec de nombreux descellements aseptiques résultant d'une fixation initiale inadéquate et des luxations.

#### *1.2.4 Couple de frottement céramique-céramique (CoC)*

Les céramiques utilisées en chirurgie orthopédique sont bio-inertes, limitant ainsi l'inflammation systémique et l'activation des cytokines (42). Elles sont obtenues par frittage et présentent une très grande résistance à l'usure. L'alumine (oxyde d'aluminium  $Al_2O_3$ ), la zirconie (oxyde de zirconium  $ZrO_2$ ) et les composites alumine-zirconie sont utilisés.

Très prometteuse, l'alumine a été initialement choisie en raison de son extrême dureté ( $> 2000$  HV), quatre fois plus dure que ses équivalents métalliques (43). Elle est également hydrophile par nature. Cette mouillabilité permet une meilleure lubrification de l'articulation tout en maintenant un espace articulaire étroit et donc stable. Les premières utilisations des céramiques d'alumine ont cependant donné des résultats cliniques mitigés, avec un taux élevé de fracture (13,4 %) (42) et de desserrage de la tige, du fait d'un défaut de standardisation industrielle (44,45). Comparé au UHMWPE, le taux d'usure est deux fois moins élevé (46) et un taux de reprise moins important que pour les prothèses totales de hanche MoM a été décrit (47). La survie est globalement de plus de 91 % chez les patients de moins de 40 ans et de 96 % chez les patients de plus de 40 ans après 80 mois (48). Les facteurs favorisant la rupture de l'implant sont la surcharge pondérale, le faible diamètre de la tête fémorale, une contrainte excessive. L'adjonction de zirconie à l'alumine, entre 17 et 80 % selon les fabricants, a pour but d'améliorer les caractéristiques mécaniques du matériau (en particulier sa ténacité et sa résistance à la fracture), tout en conservant les propriétés spécifiques de l'alumine (dureté, stabilité, mouillabilité, résistance à l'usure) (49). En effet, la zirconie permet de limiter la propagation des microfissures dans les grains d'alumine. Néanmoins, au début des années 2000, de nombreux descellements dus à un matériel défectueux (Prozyr®) ont remis en cause l'utilisation de la zirconie et fait chuter de 90 % son utilisation entre 2001 et 2002 (50). Une des limites majeures de ce type d'implant est les grincements, dans 0,6 à 1 % des cas (51).

Récemment, de nouveaux matériaux céramométalliques ou cermets (incorporation de particules métalliques dans la matrice céramique dans le but d'augmenter la ténacité), et des métaux céramisés de type Oxinium™ (Smith & Nephew) (alliage métallique zirconium-

niobium avec oxyde de zirconium en surface) ont fait leur apparition (49). Ils présentent une meilleure mouillabilité, de très bonnes propriétés mécaniques et une résistance à l'abrasion (52). Le nitrure de silicium ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) a fait son apparition en 2008 dans le domaine médical. Biocompatible, d'une dureté modérée, hautement résistant à la rupture et à la flexion, ce nouveau matériau est une piste de choix dans l'avenir des prothèses de hanche (53).

*Tableau 1 - Comparaison des différents couples de frottement utilisés dans les prothèses (MoM, CoC et PE/Me) en fonction de leur composition.*

<b>Couple de frottement</b>	<b>MoM</b>	<b>CoC</b>	<b>PE/Me</b>
<b>Composition</b>	Acier inoxydable (Fe, Cr, Ni, Mn) CrCoMo (Cr, Co, Mo, Mn, Si, Ni, Fe, W) Titane (Ti, V, Al, Nb, Fe)	Alumine Zircone Oxyde d'Yttrium ou de Strontium Niobium Nitrure de silicium	PTFE UHMWPE PEEK alliages métalliques
<b>Avantages</b>	-Peu de luxation (large diamètre de tête fémorale) -Faible usure -Bonne amplitude de mouvement	-Faible usure -Inerte (peu d'ostéolyse) -Peu de luxation (large diamètre de tête fémorale) -Mouillabilité (lubrification) -Résistance à la corrosion	-Faible friction -Grande résistance -Stabilité thermique
<b>Limites</b>	-Accumulation d'ions métalliques -Métallose -Allergie aux métaux -Nécrose locale des tissus mous (pseudo-tumeurs) -Lésions aseptiques vasculaires laminées	-Fracture -Usure par bandes -Bruits articulaires, grincements -Mauvais positionnement de la prothèse -Abrasion (rayures de surface)	-Usure -Descellement -Ostéolyse -Abrasion (Rayures de surface)
<b>Références</b>	(17,34)	(6,17)	(6,42,51,54,55)

## **II. Les métaux**

### **II.1 L'analyse élémentaire**

La notion d'élément trace (ET), définie par l'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) en 1997 (56), correspond à tout élément ayant une concentration moyenne inférieure à environ 100 ppm ou moins de 100 mg/kg. Dans la seconde moitié du XXème siècle, avec l'amélioration des capacités de détection des techniques analytiques, un nouveau terme d'éléments ultratrace est apparu, concernant les éléments dont la fraction massique est inférieure à 1 ppm (57).

De nombreuses méthodes d'analyse des métaux existent : colorimétrie, polarographie, chromatographie, spectroscopie, spectrométrie. Les faibles teneurs des éléments traces nécessitent des méthodes très sensibles. A ce jour, les méthodes spectroscopiques et spectrométriques, rapides, sensibles et permettant une analyse multi élémentaire, font référence. Les méthodes analytiques peuvent être distinguées selon qu'elles sont non destructives (analyse directe du support de collecte) ou destructives (nécessitant la mise en solution des éléments à doser). Ainsi les méthodes par fluorescence X à dispersion d'énergie, de longueur d'onde ou à réflexion totale sont sensibles et ne nécessitent pas de préparation préalable. Les techniques PIXE (Proton Induced X-ray Emission) et INAA (Instrumental Neutron Activation Analysis) présentent également des caractéristiques intéressantes (rapidité d'analyse, sensibilité importante, large gamme d'éléments) mais nécessitent la présence d'un accélérateur et d'un réacteur nucléaire pour générer protons et neutrons (58).

Les méthodes spectroscopiques classiques (spectroscopie d'Absorption Atomique Flamme ou à Four Graphite (SAAF ou SAA-FG)) sont encore largement utilisées. La spectroscopie se base sur l'analyse des rayonnements électromagnétiques se traduisant par un spectre d'absorption du gaz dans des longueurs d'onde spécifiques. La SAA se base sur le principe que chaque atome et donc chaque élément, absorbe la lumière d'une longueur d'onde spécifique. Les échantillons doivent être à l'état gazeux. La chaleur nécessaire pour faire passer l'échantillon à l'état gazeux est générée par une flamme (nébuliseur convertissant l'échantillon en aérosol, atomisation par de l'acétylène ou du protoxyde d'azote) ou un four de graphite (atomisation rapide de l'échantillon en présence d'argon). Toutes deux simples, fiables mais monoélémentaires, la SAAF permet de détecter les éléments à forte concentration

tandis que la SAA-FG atteint une détection inférieure au ppb. Tous les métaux sauf le soufre, le carbone, les halogènes et certains gaz peuvent être détectés en SAA (59).

La capacité d'analyse multiélémentaire de l'ICP-AES (Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry) tend à les remplacer. L'ICP correspond à une source d'ions formée d'une torche à plasma, entretenue par couplage inductif avec un générateur électromagnétique à haute fréquence. Le plasma est généré par l'argon, gaz rare, inerte, avec une énergie d'ionisation très élevée. Les atomes stimulés par cette source à haute température, retournent à un niveau d'énergie plus bas en émettant des radiations, cette émission optique est mesurée quantitativement (59).

La spectrométrie de masse en plasma couplé par induction (ICP-MS) est basée sur le même principe, avec comme détecteur un spectromètre de masse, qui différencie les atomes ionisés selon leur rapport masse sur charge  $m/z$ . Les couplages ICP et MS les plus fréquents associent des spectromètres de masse quadripolaires, sensibles et économiques, ou des secteurs magnétiques, atteignant une haute résolution (jusqu'au centième d'unité de masse atomique) avec une grande précision (60). Cette technique présente des atouts majeurs en termes de limite de détection, d'analyse multi-élémentaire et pour un coût d'analyse un peu plus élevé mais raisonnable, permettant l'analyse d'éléments ultra-traces ou de très faibles quantités de matière. Les interférences isobariques ou poly-atomiques sont les principaux inconvénients associés à cette technique (notamment pour certains éléments : As, V, Cr, Ti, Ge...) et de nombreux développements dans le domaine ont permis d'en réduire l'impact (corrections mathématiques, choix des isotopes, optimisation des matrices, utilisation de chambres dynamiques réactionnelles ou de collision, ICP-MS Haute Résolution...) (58).

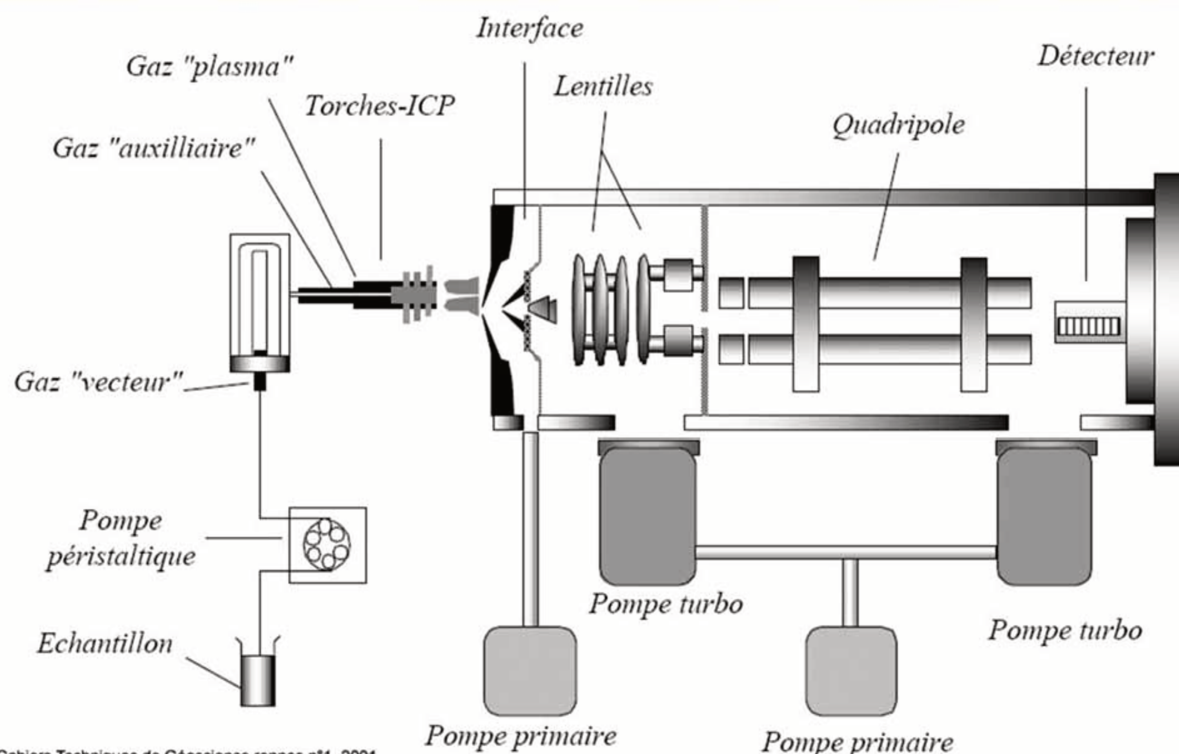
Le *Tableau 2* résume les avantages et inconvénients des trois grandes techniques d'analyse élémentaire : SAA, ICP-AES et ICP-MS.



Tableau 2 - Comparatif des techniques d'analyse élémentaire (SAA, ICP-AES, ICP-MS) (60,61)

	SAA	ICP-AES	ICP-MS
<b>Avantages</b>	-Faible coût -Robuste -Simple	-Multiélémentaire -Large gamme de concentrations -Sensible -Rapide	-Multiélémentaire -Analyse isotopique -Large gamme de concentrations -Très sensible -Spécifique -Rapide -Reproductible
<b>Limites</b>	-Monoélémentaire -Lourde préparation d'échantillon -Peu sensible -Volume d'échantillon	-Lourde préparation d'échantillon -Peu sensible sur certains éléments -Volume d'échantillon	-Coût élevé -Difficulté de mise en oeuvre -Lourde préparation d'échantillon -Interférences

Dans le cas de l'ICP-MS (*Figure 4*), l'échantillon liquide est prélevé puis introduit dans une chambre de nébulisation à l'aide d'une pompe péristaltique, où il est transformé en aérosol, par collision avec le flot de gaz argon. Seules les gouttes inférieures à 10 µm sont introduites dans la torche. Les atomes de l'échantillon sont ensuite excités en ions, dans une torche à plasma d'argon à très haute température (5000 à 10000 K). Les ions sont focalisés au niveau de l'interface, comportant deux cônes en nickel ou en platine, avec un orifice central de diamètre décroissant, l'un « échantillonneur » et l'autre « écrémeur », puis des lentilles. Le quadripôle ou un secteur magnétique permet la séparation des ions, selon leur rapport  $m/z$ . Le secteur magnétique permet une haute résolution, pour s'affranchir des interférences isobariques (isotopes d'éléments différents avec la même masse atomique) ou polyatomiques (combinaison de deux ions), provenant de la préparation d'échantillon ou de la matrice. Après séparation, les ions sont détectés et comptés par un multiplicateur d'électrons (62,63).



Cahiers Techniques de Géoscience rennes n°1, 2001  
 Figure 4 - Schéma d'un ICP-MS (62)

## II.2 Les métaux composants les prothèses et leur toxicité

### II.2.1 Chrome

Le chrome (Cr) est un métal gris, brillant utilisé dans des alliages métalliques tels que l'acier inoxydable, en pigments, pour le tannage du cuir, etc (64,65). Il existe dans plusieurs états d'oxydation, ses états les plus stables sont le chrome trivalent (CrIII) et le chrome hexavalent (CrVI). Le CrIII est naturellement présent dans les sols et les roches, c'est un oligo-élément essentiel jouant un rôle dans le métabolisme des glucides et des lipides, via une potentialisation de l'action de l'insuline (66). Le CrVI est irritant et corrosif, à l'origine d'une toxicité importante.

Le Cr peut être inhalé ou ingéré mais moins de 10 % de la dose est absorbée par voie orale, dans la partie supérieure de l'intestin grêle. En cas d'inhalation, les particules supérieures à 2  $\mu\text{m}$  se déposent dans les voies aériennes supérieures tandis que les particules plus petites se déposent dans les voies aériennes inférieures. Ces particules sont sujettes à plusieurs mécanismes de clairance : la clairance mucociliaire dans le tractus gastro-intestinal, la phagocytose par les macrophages alvéolaires et une absorption dans le sang et la lymphe. Le Cr semble principalement distribué dans les ganglions lymphatiques, les poumons, les reins et le foie et est excrété dans l'urine (67). La demi-vie biologique du CrVI est de 40 heures alors

qu'elle n'est que de 10 heures pour le CrIII (68).

Une exposition cutanée au CrVI peut entraîner une irritation pouvant aller de la dermite eczématiforme à la nécrose. La toxicité aiguë du Cr se traduit par des vertiges, des douleurs abdominales, des vomissements, des diarrhées hémorragiques, une hémolyse intravasculaire et dans les cas les plus graves, des troubles rénaux et hépatiques, un coma voire la mort. Des autopsies après décès par arrêt cardiaque suite à l'ingestion de CrVI ont montré des épanchements pleuraux, des œdèmes pulmonaires, des bronchites et des bronchopneumonies aiguës. Des nécroses du foie, des tubules rénaux ainsi que du tractus digestif, avec hémorragies digestives sont également décrites. Aucun effet cardiovasculaire n'a été décrit chez l'homme en cas d'ingestion de chrome en dehors des doses létales. Dans les observations de décès, les autopsies ont montré une hypoxie myocardique, et des hémorragies au niveau du ventricule gauche (64).

Lors d'une exposition chronique au Cr, des lésions cutanées, des signes gastro-intestinaux (vomissements, douleurs abdominales, diarrhées, ulcérations), respiratoires (atrophie de la muqueuse nasale, perforations, pharyngites, épistaxis, asthme, pneumoconiose, cancer du poumon), hépatiques, rénaux, peuvent être observés (64,69). D'un point de vue immunotoxicologique, des cas d'asthme aux sels de chrome, médié par les IgE ont été décrits (70). Les dermatites allergiques au Cr concernent entre 1 et 3 % de la population générale (71).

Le CrVI est génotoxique, tératogène, cancérigène et mutagène. Il est responsable de stress oxydant et d'altérations de l'ADN (72,73). Il a ainsi été classé comme cancérigène de groupe 1 par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a déterminé une limite d'exposition de 50 µg de Cr/L dans l'eau potable (74).

Peu de valeurs toxiques de référence (VTR) sont disponibles pour les métaux. Quelques organisations nationales ou internationales ont émis des recommandations, basées sur des études antérieures. Un niveau de risque minimum (Minimum Risk Level ou MRL) est défini comme une estimation de l'exposition humaine journalière à une substance, sans risque d'effets néfastes pendant une durée d'exposition spécifiée. Pour le Cr, l'agence du registre des substances toxiques et des maladies (Agency for Toxic Substances and Disease Registry ou ATSDR) propose un MRL de  $5 \cdot 10^{-6}$  mg de Cr/m<sup>3</sup> pour une exposition subchronique par inhalation au CrVI sous forme d'acide chromique et un MRL de  $1 \cdot 10^{-3}$  mg de Cr/m<sup>3</sup> sous forme particulaire, selon une étude de Linberg (75). La base de données IRIS de l'Agence de protection de l'environnement des États-Unis (EPA) propose, elle, une concentration de

référence (RfC) de  $8.10^{-6}$  mg de Cr/m<sup>3</sup> (1998) pour l'acide chromique et de  $1.10^{-4}$  mg de Cr/m<sup>3</sup> sous forme particulaire ainsi qu'une dose de référence (RfD) de  $3.10^{-3}$  mg de Cr/kg/j pour une exposition chronique par voie orale (76).

### *II.2.2 Cobalt*

Le cobalt (Co) est un métal solide gris argenté naturellement présent dans l'environnement. Le Co et ses composés minéraux ont de nombreuses applications dans l'industrie chimique et pétrolière comme catalyseur, pour la fabrication d'alliages, comme pigment pour le verre et les céramiques, comme agent séchant des peintures, dans la fabrication de prothèses de hanche ou de genou, dans le domaine militaire et aéronautique, etc (77). Il est également utilisé en tant qu'additif dans les aliments pour animaux, pour les espèces capables de synthétiser la vitamine B12. Le Co est en effet un élément essentiel en tant qu'atome central de liaison de cette vitamine (aussi appelée cobalamine), indispensable au métabolisme des folates et acides gras et à l'érythropoïèse (78).

L'apport principal en Co est alimentaire, de l'ordre de 5-40 µg de Co/jour, sans qu'aucune carence en Co n'ait été décrite chez l'homme (79,80). Le Co peut être ingéré ou inhalé. L'absorption gastro-intestinale du cobalt varie entre 18 et 97 % de la dose administrée et est augmentée chez les personnes déficientes en fer (81,82). Par inhalation, les grosses particules (> 2 µm) se déposent dans les voies aériennes supérieures où elles peuvent se retrouver par clairance mucociliaire ou par déglutition dans le tractus gastro-intestinal. Les particules plus petites se déposent dans les voies aériennes inférieures où elles peuvent être absorbées par diffusion (83). Le Co est rapidement absorbé par les tissus, le foie et les reins en particulier (84), et est éliminé dans les urines en plusieurs phases. La majorité disparaît en moins de 24 heures, mais une fraction persiste pendant plusieurs jours, voire plusieurs années (81). L'élimination par les fèces est la première voie d'élimination du Co après une exposition par voie orale.

Peu de données sur la toxicité aiguë du Co sont disponibles, mais sa toxicité chronique est bien décrite. Les sels solubles de Co sont irritants, responsables de dermites de contact. Des signes irritatifs respiratoires (de type rhinite, toux), voire des asthmes, ont été décrits lors d'inhalation de poussières ou d'aérosols contenant du Co. La glande thyroïde (goitre), la peau (dermatite), le système immunitaire, le cœur (cardiomyopathie) et le cerveau (neuropathie, pertes de mémoire, déclin cognitif, vertige...) peuvent être particulièrement affectés par

l'exposition au Co (85–89). L'allergie au Co semble toucher 5 % de la population (90) et des hypersensibilités à l'origine d'asthme ont été rapportées (91). Les sels de Co-tungstène et de Co-sulfate ont été respectivement classés dans les groupes 2A (probablement cancérigène pour l'homme) et 2B (peut-être cancérigène pour l'homme) par le CIRC, en 2006 (92). Certaines hypothèses mécanistiques ont été avancées pour expliquer cette toxicité. Le Co induit un stress oxydant et cause ainsi des dommages à l'ADN, aux lipides et aux protéines (93).

L'ATSDR propose un MRL de  $1.10^{-4}$  mg de Co/m<sup>3</sup> par voie inhalée et  $1.10^{-2}$  mg de Co/kg/j par administration orale, basée sur deux études antérieures (94,95). L'Occupational Safety and Health Administration (OSHA) a défini une limite d'exposition recommandée (PEL) de 0,1 mg de Co/m<sup>3</sup> (96). Finley et al. ont proposé en 2012, une valeur de RfD de 0.03 mg de Co/kg/j (97).

### *II.2.3 Nickel*

Le nickel (Ni) est un métal dur, brillant et argenté, ubiquitaire dans l'environnement, utilisé pour sa solidité et sa résistance à la corrosion. On distingue les formes solubles dans l'eau (chlorure de nickel, sulfate de nickel, nitrate de nickel et sulfate de nickel et d'ammonium) et les formes insolubles (sous-sulfure de nickel, sulfure de nickel et les oxydes de nickel vert et noir). Le nickel est utilisé dans la production d'acier inoxydable et est souvent retrouvé en alliage avec d'autres métaux, dans la composition des bijoux, pièces de monnaie, clés, matériel électrique, armement, industries métallurgiques et alimentaires, pigments et catalyseurs (98–100). La population est exposée à environ 300 µg de Ni par jour, par la consommation de nourriture et d'eau. Ni peut être inhalé, ingéré ou absorbé par voie cutanée. 50 % de la dose inhalée sont absorbés et déposés dans les voies respiratoires (101). Les plus petites particules (< 1 µm) se déposent dans la région alvéolaire des poumons et sont absorbées par diffusion. Les plus grosses (5-30 µm) se déposent au niveau nasopharyngé (102). Ni est principalement distribué dans les poumons, les glandes thyroïde et surrénales et les reins (103). La demi-vie plasmatique du Ni s'étend de 11 à 39 heures (104) et son élimination se fait principalement dans les urines, avec une demi-vie d'élimination urinaire de 17 à 48 heures (105). La toxicité aiguë du Ni est responsable de nausées, diarrhées, maux de tête, dyspnée, lésions cutanées, nécrose tubulaire rénale, irritation des voies respiratoires voire d'une fibrose pulmonaire (106). L'accumulation de Ni dans l'organisme peut provoquer une fibrose pulmonaire, des maladies rénales et cardiovasculaires, une dermatite allergique, de

l'asthme ou un cancer des voies respiratoires (107). C'est pourquoi le CIRC a classé les composés de Ni comme cancérogènes du groupe 1 et les alliages de Ni dans le groupe 2B (peut-être cancérogène) (108). Ni peut en effet, être responsables de dommages chromosomiques, d'inhibition de la réparation de l'ADN, d'une mutagenèse et ainsi d'une promotion tumorale en se liant à l'ADN et aux protéines nucléaires (109). Comme Co et Cr, Ni participe au stress oxydant (110). Enfin, Ni est l'allergène de contact le plus fréquent en Europe et dans les pays industrialisés. En Europe, la prévalence de l'allergie cutanée au nickel dans la population générale varie de 10 à 15 % chez les femmes et 2 à 5 % chez les hommes (111).

L'ATSDR s'est basée sur une étude préalable du National Toxicology Program, pour définir des MRL à 0,2 µg de Ni/m<sup>3</sup> et 0,09 µg de Ni/m<sup>3</sup> pour des expositions respectives de moins d'un an et de plus d'un an, aux composés inorganiques du Ni, par voie respiratoire (112). Aucun MRL n'a été défini pour une exposition par voie orale. L'International Conference on Harmonisation (ICH) recommande une dose orale journalière autorisée de 4,4 µg de Ni/kg/j (113).

#### *II.2.4 Titane*

Le titane (Ti) est un métal blanc, résistant et léger, non essentiel pour l'homme, présent dans la croûte terrestre à une concentration d'environ 0,6 %. Sa résistance à la corrosion, sa biocompatibilité et ses propriétés mécaniques ont rendu possible son usage dans les avions et les implants chirurgicaux ou comme agent blanchissant sous forme de dioxyde de titane TiO<sub>2</sub> (peinture, plastique, additif alimentaire, cosmétiques) (114,115). L'exposition au Ti est majoritairement alimentaire, environ 0,3 à 0,5 mg/j, contribuant à plus de 99 % de l'apport quotidien en Ti. Le tétrachlorure de Ti est le composé le plus toxique des composés du titane, très corrosif et instable (116). Il est utilisé comme intermédiaire dans la production de titane métallique et de TiO<sub>2</sub> (117). Le Ti peut être inhalé ou absorbé par voie cutanée. Environ 3 % de la dose ingérée est absorbée. Les organes cibles sont principalement les poumons, les reins, le foie et les tissus adipeux. Le Ti traverse la barrière hémato-encéphalique et placentaire et est excrété dans l'urine (114,118). La demi-vie du Ti est longue, de l'ordre de 320 jours, du fait de sa faible solubilité et de la formation de biocomplexes avec les composants cellulaires (115). L'inhalation de Ti peut être à l'origine d'une irritation des voies respiratoires et de l'œil, d'une fibrose pulmonaire. Des dermatites et des allergies au Ti ont aussi été rapportées (119). En cas d'intoxication aiguë, aux nanoparticules de TiO<sub>2</sub> notamment, des lésions

hépatiques et rénales ainsi que des troubles hématologiques, peuvent apparaître. Des réactions allergiques au titane ont été rapportées, provoquant érythème, urticaire, eczéma, douleur voire nécrose (118). Le syndrome des ongles jaunes, associant dystrophies unguéales, atteintes respiratoire et lymphœdème, a été attribué au  $\text{TiO}_2$  (120). Le CIRC a classé le  $\text{TiO}_2$  dans le groupe 2B (possiblement cancérigène) (121).

L'ATSDR a proposé un MRL à 0,01 mg de  $\text{Ti}/\text{m}^3$  et à 0,0001 mg de  $\text{Ti}/\text{m}^3$  pour des expositions intermédiaires (<1 an) et chroniques (>1 an) par inhalation aux produits d'hydrolyse du tétrachlorure de Ti. Aucun MRL n'a été défini par voie orale (117). Aucune RfD ou RfC pour le Ti ne figure dans la base de données IRIS de l'EPA (122).

### *II.2.5 Molybdène*

Le molybdène (Mo) est un métal qui existe sous forme de poudre gris foncé ou noir avec un éclat métallique ou sous forme de masse blanc argenté. Il n'est pas présent à l'état naturel sous forme métallique pure, mais principalement sous forme d'oxyde ou de sulfure (123). Il est utilisé comme agent d'alliage dans l'acier et la fonte, dans l'industrie de l'armement, de l'automobile et en aéronautique. Dans l'industrie chimique, les composés de Mo sont utilisés comme catalyseurs, réactifs chimiques et pigments. Du fait de sa forte résistance à la corrosion, on le retrouve aussi dans les implants chirurgicaux. Le Mo est un oligo-élément essentiel, à l'apport quotidien moyen de 45  $\mu\text{g}$ . Le Mo est majoritairement absorbé dans le tractus gastro-intestinal, jusqu'à 93 %, en fonction de la solubilité dans l'eau du composé concerné (124). Le corps humain contient environ 0,07 mg de Mo/kg, les organes cibles du Mo sont le foie, les reins et les os. Sa demi-vie varie de quelques heures à plusieurs jours. L'élimination du Mo est principalement urinaire (125). Chez l'animal, une alimentation trop riche en Mo provoque une carence en cuivre, à l'origine de la « maladie de la larme », dont les symptômes sont une anémie, des perturbations gastro-intestinales, des troubles osseux et un retard de croissance. Chez l'homme, une exposition excessive au Mo peut entraîner des troubles respiratoires (dyspnée, toux, inflammation) après inhalation de trioxyde de Mo, une diminution du poids corporel, des lésions rénales, une diminution du nombre de spermatozoïdes et une anémie après une exposition par voie orale (123). Quelques cas de pneumoconioses et des symptômes de goutte ont été signalés chez des travailleurs exposés au Mo métallique et au trioxyde de Mo ( $\text{MoO}_3$ ) (125). Le Mo serait, de plus, responsable de stress oxydant (126). En 2018, le CIRC a classé le  $\text{MoO}_3$  comme possiblement cancérigène pour l'homme (groupe 2B) (127).

L'ATSDR a établi des valeurs de MRL à 0,002 mg de Mo/m<sup>3</sup> pour une exposition chronique au Mo par voie inhalée et à 0,06 mg de Mo/m<sup>3</sup> pour une exposition intermédiaire (de 15 jours à 1 an) par voie orale (123). L'EPA évoque une dose de référence à 0,005 mg de Mo/kg/j pour une exposition orale chronique (128).

### *II.2.6 Vanadium*

Le Vanadium (V) est un métal blanc, brillant, rare, naturellement présent dans la croûte terrestre (129). Le V est utilisé dans la production d'alliages et d'aciers, dans l'industrie du nucléaire, de l'aéronautique et de la chimie, comme catalyseurs et pigments notamment, ou encore dans les dispositifs médicaux, du fait de sa résistance à la corrosion (130). L'apport alimentaire, source d'exposition principale au V, est d'environ 6-30 µg/jour (OMS, 2016). Moins de 2 % de la dose ingérée est absorbée dans le tractus gastro-intestinal (131). Le V est majoritairement distribué dans les poumons, les os, les reins, le foie et la rate. Son élimination est urinaire, en trois phases, avec des demi-vies de 1,2 heures, 26 heures et 10-12 jours (132). Une toxicité respiratoire, notamment des bronchites et des pneumonies, a été rapportée chez l'animal, ainsi que des effets systémiques sur le foie, les reins, le système nerveux, le système cardiovasculaire et les organes hématopoïétiques. Le V semble impacter le métabolisme des lipides, des acides aminés et de l'insuline, principalement. Il se substituerait au phosphate, empêchant ainsi le fonctionnement d'enzymes (ATPases, phosphatases...) (133). En cas d'exposition professionnelle par voie inhalée, des irritations des voies respiratoires (toux, respiration sifflante, bronchospasme, trachéobronchite) et des yeux, ainsi que des troubles neurologiques, des diarrhées et des palpitations cardiaques ont été rapportés (129,130). Le CIRC a classé le pentoxyde de V en groupe 2B (possiblement cancérigène) (92).

L'ATSDR a évalué un MRL à 0,0008 mg de V/m<sup>3</sup> et à 0,0001 mg de V/m<sup>3</sup> en exposition aiguë (<15 jours) et chronique à la poussière de pentoxyde de V, par inhalation. Par voie orale, un MRL à 0,01 mg de V/m<sup>3</sup> pour une exposition intermédiaire (de 15 jours à 1 an) a été établie (129). L'EPA a défini des doses de référence (RfD) pour une exposition orale chronique au V et au pentoxyde de V à 0,007 et 0,009 mg/kg/jour, respectivement (134).

### *II.2.7 Tungstène*

Le tungstène (W) est un métal précieux blanc-gris, qui possède le point de fusion le plus élevé de tous les métaux, une grande résistance à haute température et une bonne conductivité



électrique et thermique. Il est utilisé pour augmenter la dureté et la résistance à la traction de l'acier. Le W est utilisé en alliage avec d'autres métaux (Co, Cr, Ni, Ti, tantale), dans la fabrication d'outils, les lampes, l'industrie nucléaire et spatiale, l'armement ou même la microélectronique (135,136). L'exposition au W est majoritairement professionnelle. Il est aussi présent en petites quantités dans les aliments et l'eau (137). Après inhalation, 60 % de la dose est déposée dans le tractus respiratoire tandis que 2 % est absorbé dans les tissus après ingestion. Le W est distribué majoritairement dans la rate, les os, la thyroïde, les poumons et les reins puis rapidement éliminé dans les urines, avec une demi-vie d'environ 10 heures, excepté dans la rate où le W peut persister jusqu'à 44 jours (135).

Après une exposition professionnelle à la poussière de carbure de W par inhalation, des cas de fibroses pulmonaires, accompagnées de toux, d'essoufflements et d'oppression thoracique, ont été signalés (138). Des études ont montré un risque d'induction de cancer du poumon après une exposition à des alliages de W à métaux lourds, sans pouvoir être spécifiquement imputés au W, du fait de l'utilisation simultanée d'autres métaux, tels que le Co (139). Il en va de même pour l'observation d'effets génotoxiques (cassures de l'ADN, aberrations chromosomiques) (140). Le CIRC a ainsi classé les composés du Co contenant du carbure de W en groupe 2A, probablement cancérigène pour l'homme (92).

L'ATSDR et aucun organisme national ou international n'a émis, à ce jour, de VTR pour le W. En 2009, Schell et Pardus ont proposé une VTR de 93  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ , issue de la modélisation des relations dose-effet dans deux études (141). Jackson et al. en 2013, ont proposé une VTR pour la voie respiratoire, applicable en milieu professionnel de 1,7 mg de W/ $\text{m}^3$  et de 5,8 mg de W/ $\text{m}^3$ , pour tous les dérivés solubles et peu solubles du W, respectivement (142).

### *II.2.8 Autres métaux*

L'**antimoine** (Sb), présent naturellement dans l'environnement, est utilisé en alliage dans les batteries, les câbles, les peintures, le verre, etc. Rapidement absorbé et éliminé dans les urines, il est majoritairement distribué dans les poumons, la thyroïde, les surrénales, le foie et les reins. Une exposition professionnelle peut être à l'origine d'une irritation des voies respiratoires et d'effets cardiovasculaires (143).

Le **Baryum** (Ba) est majoritairement exploité comme agent de pondération dans les puits de pétrole et de gaz. Il est aussi utilisé en alliages en industrie. Le Ba s'accumule dans les os après absorption par inhalation ou ingestion. En cas d'intoxication aiguë, il provoque une

stimulation puis une paralysie des tissus, avec des troubles gastro-intestinaux et des dysfonctionnements cardiaques. Il peut engendrer une toxicité rénale, une hypertension, des pneumoconioses et troubles respiratoires en cas d'exposition chronique (144).

Le **Béryllium** (Be) est utilisé dans de nombreuses industries. Il est plus toxique par inhalation que par voie orale, où il est faiblement absorbé. Il est stocké dans les poumons et les os, principalement. L'exposition au Be peut provoquer des dermatites, des nécroses, une inflammation pulmonaire voire une béryllose chronique (toux, fatigue, douleurs thoraciques, dyspnée...) et des cancers des poumons. Le CIRC a classé le Be en groupe 1, carcinogène (145).

Le **Césium** (Cs) est utilisé comme catalyseur en industrie et en radiothérapie (radioisotope). Le Cs s'accumule dans tous les tissus, notamment les tissus mous, avant d'être éliminé majoritairement dans les urines. Une intoxication aux sels de Cs peut provoquer des paresthésies et spasmes musculaires, des arythmies et troubles cardiaques (146).

Le **Fer** (Fe) est un oligo-élément essentiel, largement présent dans l'environnement et composant de l'acier. Faiblement absorbé, le Fe est stocké dans le foie, la rate et les os avant d'être éliminé dans les fèces et les urines. Une carence comme un excès de Fe peuvent être nocifs. Nécessaire à la formation de l'hémoglobine, la carence en Fe est la première cause d'anémie. L'inhalation de particules de Fe peut être à l'origine de pneumoconioses et d'irritations pulmonaires. Des cirrhoses, hépatites, diabètes et troubles cardiaques peuvent aussi apparaître en cas d'hypersidérémie (147).

Le **Lanthane** (La) entre dans la composition d'alliages en métallurgie, de céramiques, de verres et de certaines lampes. Le carbonate de La est utilisé dans le traitement des hyperphosphatémies. Faiblement absorbé par voie orale, il semble se déposer dans le foie et les os (ou dans les poumons après inhalation), et est éliminé dans les fèces. Sa toxicité, bien que peu décrite, semble se traduire par des troubles gastro-intestinaux (nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales) (148,149).

Le **Manganèse** (Mn) est un oligo-élément essentiel, ubiquitaire dans l'environnement. La population y est majoritairement exposée par l'alimentation mais le Mn est aussi utilisé en métallurgie, pouvant ainsi être inhalé, lors d'exposition professionnelle. Le Mn ingéré passe rapidement dans les tissus parenchymateux, le cerveau et dans le foie où il est conjugué avec la bile et excrété dans les fèces. Des troubles neurologiques tels qu'une agitation, des

céphalées, des troubles du comportement voire un syndrome parkinsonien ainsi que des atteintes pulmonaires ont été observés en cas d'intoxication au Mn (150).

Le **Ruthénium** (Ru), métal rare, résistant à la corrosion, est utilisé en industrie électronique et chimique. Peu de données de pharmacologie et toxicologie sont disponibles pour le Ru. Il semble peu absorbé par voie orale et ne semble pas s'accumuler dans les organes, avant d'être éliminé dans les fèces. La toxicité de certains composés du Ru a été évaluée chez l'animal, provoquant convulsions, troubles cardiaques et respiratoires (151).

Le **Tellure** (Te) est présent dans l'alimentation et peut aussi être inhalé en milieu professionnel de par son usage comme catalyseur ou pigment. Il semble stocké majoritairement dans les reins et les os et est excrété dans les fèces. Les effets d'une intoxication aiguë comprennent une irritation respiratoire, des troubles gastro-intestinaux et des lésions cutanées. En cas d'exposition chronique, des troubles neurologiques (neuropathies), des atteintes hépatiques, rénales et cardiaques peuvent apparaître (152).

Le **Thallium** (Tl), utilisé en industrie et dans les rodenticides, est rapidement absorbé dans le tractus gastro-intestinal avant d'être largement distribué dans l'organisme, avec une accumulation dans les reins. L'élimination est à la fois urinaire et dans les fèces. Une gastro-entérite, un collapsus, une alopécie et des neuropathies périphériques sont les principaux symptômes d'une intoxication aiguë au Tl, tandis que les intoxications chroniques se traduisent par une dégradation de l'état général et des paresthésies (153).

Le **Zirconium** (Zr) est employé sous forme d'alliage dans l'industrie nucléaire, chimique ou aéronautique. Il est stocké dans les tissus mous puis les os et traverse la barrière hémato-encéphalique. Les nanoparticules de  $ZrO_2$  sont utilisées en prothèses dentaires et orthopédiques, car résistantes à la corrosion et biocompatibles. Leur sécurité d'emploi a été évaluée. Peu de données de toxicité sont disponibles : des hypersensibilités, des atteintes pulmonaires (granulomes) en cas d'inhalation ont été rapportées (154).

### II.3 Toxicité des prothèses

La toxicité des métaux est une problématique importante de santé publique, surtout dans le domaine environnemental et d'exposition professionnelle. La toxicité des DMI métalliques est aussi décrite dans la littérature (155–157). Les prothèses MoM peuvent être responsables de relargage d'ET suite à l'usure, au descellement ou à la corrosion de la prothèse (158). Des

facteurs liés à l'implant (couple de frottement, taille, positionnement, contamination...) et au patient (âge, activité, sexe, état nutritionnel, fonction rénale) influencent l'évolution de la prothèse (159).

### *II.3.1 Les ET décrits*

Les prothèses MoM sont majoritairement composées d'alliages de CrCoMo ou de Ti. De ce fait, les ET décrits dans la littérature sont majoritairement le Cr et le Co (*Tableau 3*) ; et dans une moindre mesure, le Ni, le Ti et le Mo (160–164). Quelques publications font référence au V ou au Mn (161,164,165).

Le relargage de Co, Ti, Al, Fe, Ni, Cr et V à partir d'implants métalliques, a été étudié *in vitro* par Okazaki et Gotoh, dans différentes solutions (166). Les concentrations de Ti, Ni, Fe et Al semblent impactées par le pH, avec un relargage plus important en milieu acide.

Peu de données sont disponibles pour corrélérer la concentration de métaux et l'apparition de symptômes systémiques liés à la pose de prothèse et les conclusions divergent selon les études. Une étude récente sur 498 patients porteurs de PTH MoM a montré une élévation de la cobaltémie ( $> 4 \mu\text{g/L}$ ) chez un tiers des patients, avec des complications croissantes en fonction de l'augmentation du taux de Co : troubles du sommeil, problèmes cognitifs et d'équilibre, neuropathies, fatigue, plus sévères et fréquents chez les patients pour lesquels  $\text{Co} > 20 \mu\text{g/L}$  (167). La cobaltémie des patients ayant reçu une prothèse MoM avec une tête à large diamètre est supérieure à celle des patients opérés avec une tête à petit diamètre, corrélée avec davantage de RIDM (réactions indésirables aux débris métalliques) et donc de ruptures de l'implant (168).

Nicolli et al. ont mesuré les concentrations de 15 ET (As, Be, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, Tl, V, Zn) 6 et 9 ans après la pose de PTH MoM. Seuls Co et Cr sont significativement augmentés (165). Des concentrations sériques de Ti à 72 et 30  $\mu\text{g/L}$  ont été rapportées pour deux cas de PTH et de PTG très usées (169).

Les prothèses PE/Me, moins résistantes que les prothèses MoM, peuvent aussi entraîner une augmentation des concentrations d'ET (170–173). Doorn et al. ont démontré que l'usure des prothèses PE/Me est environ 20 fois supérieure aux MoM, avec des particules de plus grand diamètre (174). Enfin, les prothèses CoC, bien qu'*a priori* inertes, peuvent aussi être responsables de métalloses et de relargage d'ET (175–177). En effet, un patient de 55 ans possédant une prothèse en céramique-polyéthylène défectueuse, a présenté une hypothyroïdie,

une neuropathie et une cardiomyopathie, en lien avec une cobaltémie augmentée (625 µg/L), se normalisant après la reprise (178).

Une étude de 2013 a suivi pendant 10 ans 40 patients porteurs de PTH PE/Me. Les concentrations de Cr et de Co continuent à augmenter tout au long des 120 mois, tandis que celles du Ti atteignent un pic à 36 mois puis diminuent progressivement, en restant 9 fois supérieures aux concentrations des témoins, au bout des 120 mois (179). Une autre étude de suivi sur 24 mois de porteurs de PTH MoM donne des résultats contradictoires, avec une augmentation initiale jusqu'à un niveau maximal à 6 mois de la cobaltémie, suivie d'une diminution progressive au cours des 15 mois suivants. De même pour le Cr sérique, avec un pic, légèrement plus tard, à 9 mois (180).

Le *Tableau 3* répertorie les concentrations d'ET (Cr, Co, Ni, Ti, Mo) sanguines et sériques des patients porteurs de PTH et PTG, retrouvées dans la littérature.

Des concentrations de métaux dans le liquide synovial de l'articulation de la hanche plus élevées que les concentrations sériques ont été décrites (181), atteignant jusqu'à 158 µg/L pour le Co et 230 µg/L pour le Cr chez les implants fonctionnels (182). En cas de prothèses défailtantes ou mal positionnées, ces concentrations synoviales peuvent être beaucoup plus élevées, allant jusqu'à 24 000 µg/L et 263 000 µg/L, respectivement, et des concentrations systémiques de métaux pouvant atteindre plusieurs mg/L (183).

*Tableau 3 - Concentrations de Cr, Co, Ni, Ti et Mo moyennes ou médianes (\*) en µg/L retrouvées dans les études et cas rapportés dans la littérature, selon le type de prothèse, le nombre de cas, la matrice analysée et la durée d'exposition (mois). (RH : prothèse de resurfaçage, PTH : prothèse totale de hanche, PTG : prothèse totale de genou, NR : non renseigné)*

Auteur	Type de prothèse	Effectif	Durée (mois)	Matrice	Cr (µg/L)	Co (µg/L)	Ni (µg/L)	Ti (µg/L)	Mo (µg/L)
Langton 2009	MoM, RH	90	26		3,6* (1,5-70)	2,1* (0,4-271)			
	MoM, RH	70	47	sang	4,0* (2,4-40)	1,4* (0,6-147)			
Yang 2011	MoM, RH	25	24	sérum	0,7 (0,4-0,8)	0,4 (0,3-0,5)			
Isaac 2009	MoM, RH	77	24	sang	1,5* (NR)	1,5* (NR)			
Heisel 2008	MoM, RH	15	12	sérum	2,7* (0,5-20)	2,5* (0,4-15)			
Hasegawa 2012	MoM, PTH	75	24	sérum	2,1* (NR)	2,3* (NR)			
Kim 2011	MoM, RH	97	24	sérum	2,7 (0,5-11)	1,8 (0,5-7,1)			
Lavigne 2011	MoM, PTH				1,1* (0,4-14)	0,7* (0,3-13)		1,7* (0,8-3,8)	
	MoM, PTH				1,3* (0,4-6,1)	2,7* (0,4-8,3)		3,1* (0,6-7,1)	
	MoM, PTH	144	24	sang	1,3* (0,2-6,2)	1,3* (0,3-7,6)		1,0* (0,5-6,6)	
	MoM, PTH				1,9* (0,1-21)	1,9* (0,4-5,3)		0,9* (0,2-6,5)	

Savarino 2006	MoM, PTH	42	53	sérum	2,1 (0,1–8,6)	1,6 (0,1–7,3)		3,7 (2,9–11,6)
	CoC, PTH	23	53	sérum	0,3 (0,06–0,96)	0,18 (0,1–0,5)		3,4 (2,9–9,7)
Moroni 2008	MoM, PTH	20	24	sérum	2,3 (0,7–7,2)	1,4 (0,1–9)	0,7 (0,1–1,3)	0,9 (0,8–1,3)
	MoM, PTH	26	25	sérum	1,7 (0,2–6,6)	1,3 (0,3–5,3)		1,0 (0,8–1,7)
Langton 2010	MoM, RH	418	35	sang	4,2* (1,5–70)	2,7* (0,4–271)		
	MoM, RH	155	63	sang	4,2* (2,4–40)	1,8* (0,6–147)		
	MoM, PTH	87	41	sang	3,7* (2,4–22)	3,3* (1,1–32)		
Dahlstrand 2009	MoM, PTH	28	24	sérum	1,2 (NR)	1,0 (NR)	2,2 (NR)	
Dahlstrand 2017	PE/Me, PTH	16	180	sérum	1,0 (NA)	0,4 (NA)		
Witzleb 2006	MoM, PTH	60			1,6* (NR)	1,7* (NR)		
	MoM, RH	111	24	sérum	5,1* (NR)	4,3* (NR)		
Bernstein 2011	MoM, PTH	56	12	sang	0,5* (NR)	2,2* (NR)		
Back 2005	MoM, RH	16	24	sérum	1,5 (0,2–3,7)	0,7 (0,3–1,9)		
Savarino 2002	MoM, PTH	26	26	sérum	1,7 (0,2–6,7)	1,3 (0,3–5,3)		0,6 (0,3–1,7)
	PE/Me, PTH		26	sérum	0,6 (0,1–2)	0,6 (0,2–1,5)		0,6 (0,3–1,8)
Clarke 2003	MoM, RH	16	16	sérum	2,6* (1,5–8,6)	2,1* (0,8–8,5)		
	MoM, RH	6	16	sérum	4,2* (1,3–6,7)	3,0* (1,2–6,9)		
	MoM, PTH	22	20	sérum	1,0* (0,1–3,0)	1,3* (0,9–5,1)		
Smolders 2011a	MoM, RH	60			1,1* (0,1–8,4)	1,4* (0,6–12)		
	MoM, PTH	32	24	sang	0,6* (0,1–2,1)	1,1* (0,1–2,2)		
Smolders 2011b	MoM, RH	38			1,2* (0,1–10)	1,3* (0,6–8,3)		
	MoM, PTH	33	24	sang	0,5* (0,1–2,1)	1,0* (0,1–4,2)		
Antoniu 2008	MoM, PTH	28			0,6* (NR)	2,6* (NR)		1,6* (NR)
	MoM, PTH	58	12	sang	0,4* (NR)	2,3* (NR)		1,6* (NR)
	MoM, RH	70			0,5* (NR)	2,4* (NR)		1,6* (NR)
Vendittoli 2010	MoM, PTH	24			1,6 (0,8–5,7)	0,9 (0,2–4,9)		1,3 (0,4–2,4)
	MoM, RH	48	24	sang	1,6 (0,4–3,7)	0,7 (0,2–2,9)		1,9 (0,4–4,9)
Vendittoli 2011	MoM, PTH	29	12	sang	1,3 (0,6–3,1)	2,2 (0,3–5,6)		2,7 (1–4,9)
Lardanchet 2012	MoM, PTH	24			1,6* (1,0–2,4)	2,8* (1,3–6,6)		
	MoM, PTH	23	12	sérum	2,5* (1,9–3,8)	2,2* (1,4–3,1)		
	MoM, PTH	20			4,4* (1,4–6,3)	7,5* (3,6–10)		
Williams 2011	MoM, PTH	31			2,8* (0,7–50)	4,5* (0,5–59)		
	MoM, RH	20	24	sérum	1,1* (0,5–143)	0,8* (0,4–196)		
Skipor 2002	MoM, RH	25	12	sérum	1,8 (0,6–4,3)	1,1 (0,4–2,8)		1,1 (0,4–2,8)
Savarino 2008	MoM, PTH	16	121	sérum	0,9 (0,3–2,2)	0,7 (0,3–1,6)		3,4 (2,9–7,3)
	CoC, PTH	32	124	sérum	0,2 (0,1–0,5)	0,2 (0,1–0,7)		3,2 (2,9–6,7)
Imanishi 2010	MoM, PTH	33	12	sérum	0,8* (NR)	1,1* (NR)		
Daniel 2009	MoM, RH	26	72	sang	2,4 (0,7–3,8)	1,3 (0,4–3,8)		
Langton 2008	MoM, RH	76	26	sang	3,4* (1,5–70)	2,0* (0,4–271)		
Daniel 2006	MoM, RH	26			2,4 (NR)	1,3 (NR)		
	MoM, PTH	28	12	sang	1,7 (NR)	1,7 (NR)		
Garbuz 2010	MoM, RH	48	13	sérum	0,8 (NR)	0,5 (NR)		
Pattyn 2011	MoM, RH	20			1,5 (0,5–2,7)	2,1 (0,5–6,5)		

	MoM, RH	22	24	sang	1,0 (0,5–6,4)	1,1 (0,5–3,3)			
	MoM, PTH	10			1,8 (0,5–4,8)	2,0 (0,7–5,2)			
Lhotka 2003	MoM, PTH	128	42–48	sang	1,8 (NR)	3,4 (NR)			
Allan 2007	MoM, RH	35	28	sérum	5,1 (NR)	4,3 (NR)			
Iavicoli 2006	MoM, RH	14	15	sérum	2,9 (0,5–5,0)	14 (3,7–43)			
Beaulé 2011	MoM, RH				3,1 (0,6–11)	2,0 (0,4–7,1)			
	MoM, PTH	26	24	sérum	3,0 (0,9–6,7)	5,1 (0,8–13)			
Daniel 2007	MoM, RH	26	48	sang	2,4 (0,7–3,8)	1,3 (0,4–3,8)			
Mauer-Erti 2012	MoM, RH	8			2,1* (0,8–9,7)	1,4* (0–3,9)			
	MoM, PTH	28	24	sérum	4,6* (0,7–52)	3,6* (0,3–78)			
Milošev 2005	MoM, PTH	25	60	sérum	1,3 (0,3–6,5)	0,3 (0,1–0,9)			
Desy 2011	MoM, RH	91	37	sang	0,7* (NR)	2,1* (NR)			1,7* (NR)
Daniel 2008	MoM, PTH	20			1,7 (NR)	1,7 (NR)			
	MoM, PTH	28	12	sang	1,4 (NR)	2,3 (NR)			
Lazennec 2009	MoM, PTH	109	108	sérum	2,1* (1,0–3,0)	1,7* (1,0–2,5)			
Holland 2012	MoM, RH	90	115	sang	1,7* (0,4–15)	1,7* (0,5–20)			
Brodner 1997	MoM, PTH	27				1,1 (0,65–2,6)			
	CoP, PTH	28	12	sérum		0,2			
Brodner 2003	MoM, PTH	50	48	sérum		0,9* (0,4–1,7)			
Engh 2009	MoM, PTH	57				0,8* (0,5–2)			0,8* (0,7–1,1)
	PE/Me, PTH	34	24	sérum		0,1* (0,1–0,19)			0,7* (0,6–1)
Grübl 2006	MoM, PTH	13				1,4* (0,5–10,5)			
	CoC, PTH	15	12	sérum		0,4 * (0,2–0,7)			
Macdonald 2003	MoM, PTH	223	24	érythrocytes	2,5 (1,2–2,8)	1,1 (0,66–2,43)			1,8 (1,2–2,8)
	PE/Me, PTH	18			1,3 (1–1,8)	0,2 (0,1–0,2)			1,5 (1,2–2,1)
Zijlstra 2009	MoM, PTH	24	120	sérum		1,1 * (0,5–11)			
Bisseling 2011	MoM, PTH	21	12	sérum		0,8 * (0,1–1,9)			
Hallows 2011	MoM PTH	10	48	sérum	2,1* (0,3–27,1)	1 * (0,3–14)			
Hart 2006	MoM, PTH	34	48	sang	0,3* (NR)	2,5 * (NR)			
Karamat 2005	MoM, PTH		25		0,5 * (0,2–6,4)	0,7 * (0,2–3,7)			0,5* (0,2–0,9)
	CoC, PTH	25	27	sang	0,2 * (0,2–2,9)	0,2 * (0,2–0,4)			0,4* (0,2–0,8)
	PE/Me, PTH		28		0,2 * (0,2–1,4)	0,2 * (0,2–1,1)			0,5* (0,2–1,6)
Rasquinha 2006	MoM, PTH				2,8 * (0,8–9,1)	1,6 * (0,6–7,9)			1,9 * (1,1–6)
	PE/Me, PTH	10	48	sérum	0,8 * (0,1–2,4)	0,3 * (0,2–3,9)			1,8 * (1,1–5,7)
	CoP, PTH				0,1 * (0–0,3)	0,2 * (0,2–0,4)			2,9 * (1,1–8,4)
Newton 2012	MoM, PTH			sérum	2,8 * (0,1–116)	2,3 * (0,1–158)	2,4* (0,5–21)		
	MoM, PTH	205	72	sang	2,1* (0,6–68)	2,7 * (0,2–145)	3* (0–34)		
de la Flor 2013	MoM, PTH	45	60	sérum	2,3* (0,5–101)	0,7 * (0,5–111)			
Lass 2014	MoM, PTH	37	216	sérum	1,4* (0,2–30,3)	1,1 * (0,4–8)			
Sarmiento 2008	PE/Me, PTG	11	24		0,36 (NR)	0,31 (NR)	0,92 (NR)	1,28 (NR)	0,49 (NR)
	PE/Me, PTG	10	81		0,22 (NR)	0,97 (NR)	1,16 (NR)	1,23 (NR)	0,48 (NR)
	MoM, PTH	11	19	sang	0,21 (NR)	0,22 (NR)	0,06 (NR)	2,3 (NR)	0,41 (NR)
	MoM, PTH	11	78		0,42 (NR)	0,5 (NR)	0,5 (NR)	1,52 (NR)	0,45 (NR)

### *II.3.2 Suivi de l'évolution des prothèses*

Le suivi des concentrations d'ET pourrait être utilisé dans le suivi de l'évolution de la prothèse (184). A ce jour, seuls les patients possédant une prothèse MoM ont un suivi : une imagerie de surveillance et une cobaltémie tous les 3 ans. Le SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks) a émis des recommandations concernant la cobaltémie: sécurité d'emploi pour une cobaltémie inférieure à 2 µg/L, un suivi rapproché si la cobaltémie est supérieure à 7 µg/L ou si Co entre 2 et 7 µg/L, lorsque des signes cliniques ou radiologiques sont présents. Une révision de la prothèse doit être envisagée si la cobaltémie est supérieure à 10 µg/L (185,186). Ces recommandations et seuils sont remis en cause (187). Hart et al. recommandent notamment un seuil de surveillance plus faible de 4,97 µg de Co/L (188).

### *III.3.3 Toxicité locale*

L'usure de l'implant est responsable d'un relargage de particules. Les nanoparticules de faible diamètre (< 150 nm) sont endocytées par les cellules (156), tandis que les particules supérieures à 150 nm sont phagocytées par des cellules spécialisées, telles que les macrophages (157). La taille des particules influence leur toxicité. Une fois internalisées, les particules métalliques peuvent être à l'origine d'une cytotoxicité, de stress oxydant et d'altérations chromosomiques (158). Co et V semblent les plus cytotoxiques (nécrose, apoptose) (159,160) et Cr est le plus mutagène en formant des adduits à l'ADN (161). Cr, Co, Ni, Ti peuvent générer un stress oxydant via la formation d'espèces réactives à l'oxygène (radicaux superoxyde et hydroxyl ou peroxyde d'hydrogène) (162).

Ces éléments sont responsables de manifestations locales, connues sous le terme général de RIDM, pour décrire les réponses biologiques au relargage de particules métalliques dans le tissu péri-prothétique. En plus, d'être à l'origine d'une usure prématurée des biomatériaux, les particules métalliques peuvent être source d'infections. Des nécroses, une ostéolyse, des pseudo-tumeurs (masses aseptiques dans le tissu péri-prothétique, associées à une inflammation), des paralysies, une métallose, peuvent induire une rupture précoce de l'implant et finalement, sa révision (156,189). La métallose est une nécrose locale due à l'érosion métallique et à la libération d'ET qui induit un recrutement des lymphocytes et une libération locale massive de cytokines pro-inflammatoires (158,185). Park et al. ont rapporté



un taux d'incidence d'ostéolyse de 6 %, à deux ans post-opératoires, principalement chez des patients présentant une hypersensibilité aux métaux (190).

### *III.3.4 Toxicité systémique*

Case et al. et Urban et al. ont comparé la dissémination des ET dans l'organisme de patients avec prothèses usées ou non. Des concentrations élevées d'ET ont été retrouvées dans les ganglions lymphatiques, la moelle osseuse, le foie et la rate, à des niveaux plus élevés en cas d'usure de la prothèse (191,192). Une augmentation des concentrations de Mo dans le foie et les reins et de Cr et Mn dans le foie uniquement, neuf mois après pose d'un implant CrCoMo, chez le rat a été décrite (193). Le relargage d'ET induit donc une augmentation de leurs concentrations locales mais aussi des concentrations sanguines et urinaires, avec une dissémination dans tout l'organisme, responsable d'une toxicité systémique (cardiomyopathie, polycythémie, hypothyroïdie, troubles neurologiques) (88,158). Peu de données sont disponibles concernant la toxicité systémique des implants métalliques.

Gessner et al. ont répertorié 25 cas de « cobaltisme arthroprothétique » (manifestations systémiques de la toxicité du Co liée aux prothèses), entre 2001 et 2014 (194). Les symptômes concernaient la hanche (84 %), les systèmes cardiovasculaire (60 %), audiovestibulaire (52 %), sensorimoteur périphérique (48 %), la thyroïde (48 %), le fonctionnement psychologique (32 %), le système visuel (32 %) et le système hématologique, oncologique ou immunitaire (20 %). Le délai moyen entre l'implantation et l'apparition de symptômes est de 41 mois, avec une cobaltémie moyenne de 324 µg/L, avec une forte association entre cobaltémie et gravité globale des symptômes. Ces derniers étant plus élevés chez les patients ayant subi des révisions de prothèses CoC que chez ceux ayant subi des prothèses primaires MoM. Ces données viennent compléter celles de Tower, présentant deux cas de toxicité neurologique et cardiaque associés à un cobaltisme arthroprothétique (195,196).

Bradberry et al. ont publié une revue des cas de toxicité systémique liée aux implants MoM entre 1980 et 2014 (157). Une toxicité neuro-oculaire (neuropathie, perte auditive et neurosensorielle, déclin cognitif, déficience visuelle) (14 patients), une cardiotoxicité (11 patients) et une toxicité thyroïdienne (9 patients) ont été rapportées. Les cobaltémie et chromémie moyennes étaient de 398 et 48 µg/L, respectivement.

Au niveau immunitaire, une altération des lymphocytes et de la libération de cytokines a été observée (197,198). Les atteintes respiratoires dues aux métaux sont largement décrites dans un cadre d'exposition professionnelle (199) mais pas dans un contexte d'implant ; de même pour l'aluminium et sa toxicité neurodégénérative, impliqué dans la maladie d'Alzheimer (200). Un cas d'intoxication au Co (398 µg/L) suite à une rupture d'implant, a présenté une perte de vision et d'audition, une dermatite et un engourdissement des pieds (201). Une rétinopathie a été décrite chez un homme de 65 ans présentant une prothèse défailante avec des concentrations sanguines élevées de Cr et Co. Suite à l'opération de reprise de prothèse, les concentrations se sont normalisées et la vision s'est améliorée (202). Des atteintes de la vue et de l'audition dues aux prothèses, avaient déjà été évoquées en 2009 (203). Un homme et une femme de 56 ans, ayant une métallose suite à la pose d'une prothèse MoM, ont présenté des troubles sensoriels, une perte auditive, une axonopathie et une hypothyroïdie, symptômes qui se sont améliorés, de même que les concentrations de Cr et de Co, après reprise de la prothèse (204,205). Plusieurs cas de cardiomyopathies suite à la pose de prothèse de hanche MoM ont aussi été rapportés (206,207).

Ensuite, une « allergie aux métaux » ou hypersensibilité peut survenir suite à la pose d'implant MoM. Relativement rare (0,3 %), cette hypersensibilité de type IV est marquée par une infiltration lymphocytaire et éosinophile péri-prothétique ainsi qu'une nécrose (208,209). Elle peut être à l'origine de la rupture de l'implant et donc de la nécessité d'une opération de reprise.

L'incidence des réactions cutanées aux Co, Ni et Cr chez les patients ayant subi une arthroplastie totale, avec des prothèses stables et défailantes augmente respectivement de 15 % et 50 %, par rapport à la population générale (210).

Les nanoparticules métalliques, source de stress oxydant, ont un effet génotoxique. Des études *in vitro* ont montré des cassures et adduits à l'ADN, des aneuploïdies, une altération des systèmes de réparation de l'ADN, etc. liées principalement au Cr et au Co, dans une moindre mesure (158,211).

### **III. L'inflammation**

Les procédures chirurgicales orthopédiques induisent une inflammation aiguë qui se résorbe au bout de quelques jours, avec une biocompatibilité et une stabilité de la construction implant-tissu. Néanmoins, cette réaction peut persister et évoluer vers un état inflammatoire chronique et une fibrose. Le descellement aseptique des prothèses est la première cause d'échec de l'implant. Son étiologie semble multifactorielle avec comme cause majeure, cette réaction inflammatoire (fibrose) induite par les macrophages, activés par les particules métalliques (212). Cette réaction tissulaire du système immunitaire peut conduire à une ostéolyse (induction des ostéoclastes et inhibition des ostéoblastes) et ainsi au descellement de l'implant (213,214). Les cytokines sont de petites protéines qui coordonnent la réponse immunitaire en régulant l'inflammation et qui dirigent les interactions entre les cellules. Elles peuvent agir sur les cellules qui les sécrètent (action autocrine), sur les cellules voisines (action paracrine) ou sur les cellules éloignées (action endocrine). Il existe des cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires (215). Les médiateurs clés de l'ostéolyse ont été identifiés comme des cytokines pro-inflammatoires telles que les interleukines IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 et le facteur de nécrose tumorale TNF- $\alpha$ , sécrétés par les macrophages activés. À leur tour, ces cytokines sont capables d'induire la différenciation des cellules précurseurs des ostéoclastes en ostéoclastes matures, capables de résorber l'os (216–221). Christiansen et al. ont rapporté une augmentation significative des IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  dans l'environnement péri-prothétique, en cas de descellement aseptique. Ces cytokines n'étaient néanmoins pas significativement augmentées dans le sérum (222). Dans cette étude, les concentrations d'Al, de Ti et de Ni étaient augmentées dans le tissu et seule une élévation du Cr était significative dans le sérum. Plusieurs autres études montrent une augmentation d'IL-1, IL-6, IL-8 et TNF- $\alpha$  en présence de particules métalliques provenant d'implants défectueux (216,220,223–227). Ces résultats restent toutefois controversés puisqu'une augmentation des concentrations circulantes n'est pas toujours observée (228).

Les chimiokines sont une famille de cytokines chimiotactiques, ayant un rôle principalement dans l'activation et la migration des leucocytes. Elles interagissent avec des récepteurs transmembranaires liés aux protéines G à la surface des cellules. Elles sont ainsi impliquées dans les réponses inflammatoires et immunitaires, l'angiogenèse, la cicatrisation et la réparation tissulaire. La protéine inflammatoire des monocytes, MIP-1 $\alpha$  a notamment été

décrite dans l'inflammation induite par les implants (214,218), à la fois dans l'analyse de tissus péri-prothétiques et *in vitro* en contact avec des particules de Ti (229). L'IL-8 et MCP-1 ont aussi été retrouvées augmentées dans le tissu péri-prothétique d'implants descellés (229–231).

Des macrophages primaires humains ont été exposés à des particules de UHMWPE, d'alliage TiAlV, CoCr et d'alumine *in vitro* (231). Les particules de TiAlV étaient les plus stimulantes (expression de cytokines 5 à 900 fois supérieure à celle des cellules non stimulées), le CoCr et l'alumine étaient légèrement stimulants (niveaux 2 à 5 fois supérieurs à ceux des cellules non stimulées), et les particules d'UHMWPE étaient les moins stimulantes. Les macrophages ont sécrété des niveaux détectables d'IL-1 $\alpha$ , de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$ , de MCP-1, d'IL-8, d'IL-6, de GM-CSF, d'IL-10 et d'IL-12p40. GM-CSF (granulocyte-monocyte colony-stimulating factor) est une cytokine du groupe des facteurs de croissance hématopoïétiques, ayant pour rôle de stimuler la prolifération des cellules myéloïdes. Il a été décrit dans le descellement d'implants : les particules métalliques sont phagocytées par les macrophages, qui produisent ainsi du TNF, stimulant la production de GM-CSF et d'autres IL par les ostéoblastes. Cela entraîne le recrutement des macrophages et des ostéoclastes dans la zone péri-prothétique, induisant une résorption osseuse et finalement, le descellement de l'implant (232,233). De même, G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor), un autre facteur de croissance de la lignée granulocytaire, libéré par les macrophages et les fibroblastes, favorise l'ostéolyse en inhibant la différenciation ostéoblastique (234,235).

Les macrophages sont des médiateurs importants de l'ostéolyse, de même que les lymphocytes T. En particulier, les lymphocytes T helper (Th) régulent la réponse immunitaire adaptative et sont responsables de l'hypersensibilité aux métaux, illustrée par une dermatite allergique de contact aux ions métalliques (222). Il a été montré une prévalence accrue d'allergie aux métaux en cas de niveaux élevés de particules métalliques, lors d'implants défaillants (210,236).

## **IV. Objectif**

De nombreuses interrogations sur l'effet des métaux sur l'organisme perdurent, notamment au niveau systémique et inflammatoire. Par ailleurs, peu de données sont disponibles sur les mécanismes de toxicité de ces ET et leur distribution dans les organes. Nous avons donc mis au point et validé une méthode de dosage multiélémentaire (38 ET) en ICP-MS Haute Résolution, appliquée à une étude clinique chez des patients vivants et des sujets décédés, élaborée, rédigée par mes soins avant dépôt au Comité de Protection des Personnes. Cette étude dénommée « Prometox » s'intéresse en effet au comportement et à la toxicité systémique des ET contenus dans les dispositifs médicaux implantables, leur répartition dans l'organisme et leur impact sur l'inflammation. Nous avons par ailleurs tenté de mettre en évidence un biomarqueur précoce de l'inflammation induite par les prothèses, par le dosage des cytokines pro-inflammatoires. Dans une dernière partie, nous avons réalisé une étude fondamentale sur trois ET majeurs des prothèses (Co, Cr, Ni) sur un modèle hépatocytaire (HépaRG) afin d'évaluer la toxicité cellulaire. Dans un premier temps, nous avons déterminé la concentration considérée comme toxique pour les cellules ( $IC_{50}$ ) puis avons étudié l'impact de ces métaux sur le métabolisme cellulaire évalué à des concentrations proches de celles observées chez les porteurs de prothèse, au cours d'une étude métabolomique.



---

## **Deuxième partie**

### **Travaux personnels**

---





# Partie 1

## **A high-resolution ICP-MS method for the determination of 38 inorganic elements in human whole blood, urine, hair and tissues after microwave digestion**

Stanislas GRASSIN-DELYLE, Marie MARTIN, Ons HAMZAOU, Elodie LAMY,  
Christophe JAYLE, Edouard SAGE, Isabelle ETTING, Philippe DEVILLIER, Jean-Claude  
ALVAREZ

Publié en 2019 dans Talanta, Volume 199 pages 228-237.





ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/talanta](http://www.elsevier.com/locate/talanta)

## A high-resolution ICP-MS method for the determination of 38 inorganic elements in human whole blood, urine, hair and tissues after microwave digestion

Stanislas Grassin-Delyle<sup>a,b,\*</sup>, Marie Martin<sup>a,c</sup>, Ons Hamzaoui<sup>a</sup>, Elodie Lamy<sup>a</sup>, Christophe Jayle<sup>e</sup>, Edouard Sage<sup>f</sup>, Isabelle Etting<sup>a,c</sup>, Philippe Devillier<sup>b,d</sup>, Jean-Claude Alvarez<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Plateforme de spectrométrie de masse MasSpecLab, INSERM UMR 1173, UFR Simone Veil - Santé, Université Versailles Saint Quentin, Université Paris Saclay, Montigny le Bretonneux, France

<sup>b</sup> Département des maladies respiratoires, Hôpital Foch, Suresnes, France

<sup>c</sup> Laboratoire de toxicologie, Hôpital Raymond Potin, AP-HP, Garches, France

<sup>d</sup> Laboratoire de pharmacologie UPRES EA220, Université Versailles Saint Quentin, Université Paris Saclay, Hôpital Foch, Suresnes, France

<sup>e</sup> Chirurgie thoracique et cardiaque, CHU de Poitiers, INSERM 1082, Université de Poitiers, Poitiers, France

<sup>f</sup> Service de chirurgie thoracique, Hôpital Foch, Suresnes, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Inductively coupled plasma-sector field mass spectrometry  
Human blood  
Human hair  
Human urine  
Human tissue  
Microwave digestion  
Elements

### ABSTRACT

Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) is currently the reference method for the determination of inorganic elements, and has many applications in healthcare and the environmental field. The objective of the present study was to develop and validate a high-resolution ICP-MS method for the simultaneous quantification of 38 elements in samples of human whole blood, urine, hair and tissues after microwave mineralization. The samples were incubated with nitric acid, hydrogen peroxide and internal standards prior to microwave mineralization for 25 min. The analysis was performed with an Element XR ICP-MS and validated using commercial reference standards (whole blood, urine, and hair) and in-house quality control samples. The 38 elements were detected in low-, medium- or high-resolution mode, depending on interferences and sensitivity. The lower and upper limits of quantification were adjusted for each element. The method was linear for all elements (correlation coefficient > 0.996), and the inter- and intraday precision values (coefficient of variation) were below 15%. Samples from a clinical trial were used to confirm the high-resolution ICP-MS method's suitability for the assessment of patient samples.

### 1. Introduction

Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) is used widely to analyze trace and ultra-trace elements in biological matrices. Human exposure to elements released from toxics, drugs and implanted medical devices is conventionally monitored by assaying serum, blood, and urine. However, tissue or hair samples often provide additional useful information. For instance, toxic elements can enter the lungs through the inhalation of smoke or contaminated air. Furthermore, elements absorbed by the digestive and/or pulmonary tract can find their way into the bloodstream and become distributed throughout and incorporated into the body's various tissues - including the hair. Hence, measurements in hair can reflect the body's cumulative exposure to the various elements. Lastly, some elements may be deposited directly on

the hair by external contamination [1–4].

The limits of detection (LOD) associated with conventional quadrupole ICP-MS mean that the technique is not ideal for the simultaneous quantification of several trace elements in human blood or serum samples [5]. Inductively coupled plasma - sector field mass spectrometry (ICP-SFMS) has greater sensitivity and resolving power; this produces LOD in the pM range [6] and enables useful performance over a broad concentration range. The use of ICP-MS to assay trace elements in human samples (with or without prior mineralization) has already been reported. For example, ICP-MS with an octopole-based collision/reaction cell has been used to quantify 37 trace elements in human blood [7]. After acid sample dilution, high-resolution ICP-MS has been applied to the determination of 20–42 elements in human urine and serum; the concentrations were similar to those observed in non-

\* Correspondence to: Stanislas GRASSIN-DELYLE, INSERM UMR 1173, UFR Simone Veil - Santé, 2 avenue de la source de la Bièvre, 78180 Montigny le Bretonneux, France.

E-mail address: [stanislas.grassin-delyle@uvsq.fr](mailto:stanislas.grassin-delyle@uvsq.fr) (S. Grassin-Delyle).

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.02.068>

Received 8 November 2018; Received in revised form 14 February 2019; Accepted 19 February 2019

Available online 20 February 2019

0039-9140/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Table 1**Limits of quantification and characteristics of the calibration curve for each element ( $n = 6$ , values are quoted as the mean  $\pm$  standard deviation).

Element	LLOQ ( $\mu\text{M}$ )	ULOQ ( $\mu\text{M}$ )	Range of the calibration curve (Log)	Number of calibration standards	Slope of the calibration curve	y-intercept of the calibration curve	Correlation coefficient for the calibration curve
Ag	0.015	10	2.8	10	$0.92 \pm 0.09$	$0.010 \pm 0.015$	$0.9994 \pm 0.0007$
As	0.01	1	2.0	7	$0.09 \pm 0.01$	$-0.0015 \pm 0.0033$	$0.9987 \pm 0.0016$
Au	0.01	1	2.0	10	$0.72 \pm 0.05$	$0.0014 \pm 0.0034$	$0.9972 \pm 0.0028$
Ba	0.002	5	3.4	8	$0.47 \pm 0.03$	$-0.0032 \pm 0.0103$	$0.9987 \pm 0.0009$
Be	0.01	0.5	1.7	7	$0.01 \pm 0.0008$	$-0.000005 \pm 0.00001$	$0.9990 \pm 0.0013$
Bi	0.004	1	2.4	8	$4.2 \pm 0.5$	$0.0016 \pm 0.017$	$0.9988 \pm 0.0023$
Cd	0.005	10	3.3	11	$0.17 \pm 0.01$	$-0.0036 \pm 0.0026$	$0.9995 \pm 0.0005$
Ce	0.0002	1	3.7	9	$3.1 \pm 0.3$	$0.00035 \pm 0.0009$	$0.9998 \pm 0.0003$
Co	0.001	20	4.3	12	$3.0 \pm 1.0$	$0.12 \pm 0.11$	$0.9993 \pm 0.0005$
Cr	0.02	10	2.7	8	$2.3 \pm 0.8$	$0.025 \pm 0.023$	$0.9999 \pm 0.0002$
Cs	0.002	1	2.7	8	$3.16 \pm 0.17$	$0.0052 \pm 0.0081$	$0.9996 \pm 0.0005$
Cu	5	200	1.6	15	$2.0 \pm 0.7$	$0.058 \pm 1.89$	$0.9986 \pm 0.0011$
Fe	1	500	2.7	15	$3.1 \pm 1.1$	$3.1 \pm 2.0$	$0.9997 \pm 0.0002$
Ge	0.01	1	2.0	7	$0.21 \pm 0.02$	$-0.0011 \pm 0.0012$	$0.9991 \pm 0.0005$
Hf	0.0000001	1	7.0	15	$1.0 \pm 0.1$	$-0.0052 \pm 0.0032$	$0.9983 \pm 0.0012$
Hg	0.025	10	2.6	11	$0.2 \pm 0.01$	$0.0020 \pm 0.0026$	$0.9996 \pm 0.0003$
La	0.00005	1	4.3	11	$32.5 \pm 3.0$	$-0.0089 \pm 0.0030$	$0.9998 \pm 0.0002$
Mn	0.05	2	1.6	10	$3.5 \pm 1.2$	$0.0041 \pm 0.018$	$0.9996 \pm 0.0002$
Mo	0.005	1.5	2.5	11	$0.24 \pm 0.02$	$-0.0007 \pm 0.0002$	$0.9994 \pm 0.0002$
Ni	0.05	50	3.0	15	$0.76 \pm 0.27$	$0.041 \pm 0.041$	$0.9998 \pm 0.0001$
Pb	0.025	5	2.3	7	$3.0 \pm 0.7$	$-0.038 \pm 0.096$	$0.9991 \pm 0.0010$
Pd	0.005	0.5	2.0	7	$0.25 \pm 0.04$	$-0.00062 \pm 0.00053$	$0.9963 \pm 0.0029$
Pt	0.001	0.1	2.0	10	$0.76 \pm 0.02$	$-0.00006 \pm 0.0002$	$0.9997 \pm 0.0002$
Rb	0.1	50	2.7	10	$1.2 \pm 0.1$	$0.85 \pm 0.42$	$0.9996 \pm 0.0018$
Ru	0.000001	0.01	4.0	13	$0.40 \pm 0.03$	$0.00002 \pm 0.000007$	$0.9994 \pm 0.0010$
Sb	0.00001	0.1	4.0	10	$0.52 \pm 0.05$	$-0.0001 \pm 0.0005$	$0.9975 \pm 0.0011$
Se	0.1	10	2.0	11	$0.02 \pm 0.003$	$-0.021 \pm 0.029$	$0.9989 \pm 0.0010$
Sn	0.005	1	2.3	11	$0.70 \pm 0.04$	$-0.0019 \pm 0.0005$	$0.9994 \pm 0.0004$
Sr	0.1	10	2.0	7	$1.79 \pm 0.11$	$0.012 \pm 0.046$	$0.9997 \pm 0.0002$
Te	0.001	0.05	1.7	7	$0.03 \pm 0.003$	$-0.000004 \pm 0.000009$	$0.9991 \pm 0.0008$
Th	0.00025	0.01	1.6	7	$3.9 \pm 0.3$	$-0.00004 \pm 0.0001$	$0.9981 \pm 0.0012$
Ti	0.038	10	2.4	7	$0.17 \pm 0.003$	$0.0013 \pm 0.0038$	$0.9998 \pm 0.0002$
Tl	0.00025	0.05	2.3	7	Quadratic regression		
U	0.000001	0.001	3.0	15	$49.6 \pm 3.3$	$-0.00002 \pm 0.00008$	$0.9995 \pm 0.0003$
V	0.02	1.5	1.9	9	$2.2 \pm 0.8$	$-0.026 \pm 0.097$	$0.9996 \pm 0.0003$
W	0.0004	1	3.4	8	$1.0 \pm 0.2$	$-0.00007 \pm 0.0019$	$0.9999 \pm 0.0001$
Zn	10	200	1.3	7	$0.27 \pm 0.10$	$0.066 \pm 0.20$	$0.9990 \pm 0.0007$
Zr	0.00001	0.1	4.0	15	$0.90 \pm 0.06$	$-0.0013 \pm 0.0019$	$0.9968 \pm 0.0019$

occupationally exposed populations [6,8]. Methods for the ICP-SFMS quantification of 4–8 abundant elements in human blood and/or serum after microwave digestion have also been reported [9,10]. Microwave digestion was shown to enhance the recovery of elements and to be more reproducible and accurate than wet or dry digestion procedures [11,12]. However, all the methods reported to date have various shortcomings: (i) they can only detect a small number of elements simultaneously; (ii) for some elements, the LOD is above the concentration found in clinical samples; (iii) analyses are restricted to blood and serum samples (i.e. hair and other human tissues could not be assessed); and (iv) microwave digestion is not applied.

The objective of the present study was to develop and validate a method for the simultaneous quantitation of 38 trace elements in human tissues, urine and whole blood samples, following microwave mineralization. The method's suitability for the analysis of clinical samples was also demonstrated.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and reagents

Analytical and internal standards were purchased from LGC Standards (Molsheim, France). ICP-MS-grade nitric acid, hydrochloric acid, hydrogen peroxide and Triton X100 were obtained from Fisher Scientific (Illkirch, France). Whole blood, urine and hair quality control (QC) samples were supplied by Centre de Toxicologie du Québec (Québec, Canada). Ultrapure deionized water (18 m $\Omega$ ) was obtained

from a water station (Purelab Flex, Elga Labwater, Antony, France). Argon 5.0 was purchased from Messer (Puteaux, France).

### 2.2. Working and calibration standard solutions

Working and calibration standard solutions were prepared by diluting 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  or (for Cu, Fe, Rb, and Zn) 10000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  single-element standard solutions. Three sets of 15 calibration standards were prepared: the first set contained all the elements (except those detailed thereafter) in 5% HNO<sub>3</sub> in metal-free plastic tubes, the second contained Sb, Hf, Au, Pt, and Ru in 20% HCl in metal-free plastic tubes, and the third contained Hg only in borosilicate tubes. The chosen standard concentrations were based on those published previously for human samples. Hence, the calibration range differed from one element to another: Gouille et al. and Cesbron et al. reported elemental concentrations in whole blood, plasma, urine and hair samples from a population of healthy volunteers in France [3,13]; Heitland and Koster reported on the concentrations of 37 trace elements in blood samples from inhabitants of northern Germany [7]; Schultze et al. described whole blood and serum concentrations of metals in a Swedish population-based sample [14]; Alimonti et al. and Minoia et al. reported concentrations of metals in blood, serum or urine samples from healthy adults living in Rome [15] or Lombardy [16]. To prepare the calibration curve, 10  $\mu\text{L}$  of each calibration standard solution were added to 190  $\mu\text{L}$  of deionized water. Quality control samples were stored at  $-20^\circ\text{C}$ , whereas calibration standard stock and working solutions were stored at room temperature.

**Table 2**

Validation data for whole blood QC samples. Measured concentrations are presented for three different days as the median [range] ( $\mu\text{M}$ ) from six replicate samples. The values of the CVs correspond to the intraday, interday and total CVs, respectively.

	Blood level 1: QM-B-Q1505			Blood level 2: QM-B-Q1506		
	Theoretical concentration	Measured concentration	CV (%)	Theoretical concentration	Measured concentration	CV (%)
Ag	0.022	0.023 [0.022–0.024]	5.1	0.061	0.062 [0.057–0.065]	6.9
		0.024 [0.023–0.025]	14.9		0.063 [0.062–0.078]	7.9
		0.022 [0.019–0.023]	7.1		0.063 [0.058–0.066]	7.0
As	0.036	0.044 [0.037–0.047]	8.8	0.21	0.24 [0.20–0.29]	12.2
		0.044 [0.037–0.050]	7.4		0.23 [0.21–0.25]	7.9
		0.041 [0.038–0.042]	8.7		0.24 [0.21–0.27]	11.8
Ba	0.026	0.048 [0.046–0.049]	6.5	0.058	0.076 [0.075–0.079]	2.6
		0.042 [0.040–0.048]	13.6		0.082 [0.078–0.085]	9.4
		0.043 [0.041–0.049]	7.7		0.078 [0.077–0.080]	4.1
Be	0.30	0.45 [0.44–0.48]	4.6	1.9	2.8 [2.7–2.9]	4.2
		0.42 [0.38–0.45]	13.0		2.8 [2.6–2.8]	7.2
		0.42 [0.39–0.43]	6.3		2.7 [2.3–2.8]	4.6
Bi	0.013	0.013 [0.011–0.016]	9.3	0.034	0.035 [0.026–0.039]	14.4
		0.014 [0.014–0.015]	14.2		0.038 [0.035–0.044]	14.5
		0.013 [0.012–0.014]	10.0		0.035 [0.030–0.047]	14.4
Cd	0.053	0.061 [0.057–0.066]	5.7	0.12	0.13 [0.13–0.14]	4.8
		0.061 [0.052–0.066]	9.3		0.13 [0.12–0.14]	4.5
		0.057 [0.055–0.058]	6.3		0.13 [0.12–0.14]	4.8
Co	0.019	0.018 [0.017–0.019]	6.9	0.035	0.035 [0.033–0.037]	6.3
		0.021 [0.018–0.022]	14.6		0.032 [0.031–0.034]	11.0
		0.020 [0.017–0.022]	8.3		0.034 [0.030–0.039]	7.0
Cr	0.096	0.090 [0.066–0.102]	14.4	0.11	0.10 [0.09–0.10]	7.8
		0.094 [0.076–0.106]	12.0		0.11 [0.10–0.12]	14.2
		0.086 [0.079–0.108]	14.1		0.10 [0.10–0.12]	8.9
Cu	12.8	12.2 [11.8–12.7]	9.5	47.8	40.0 [38.2–40.9]	2.6
		13.1 [8.7–13.8]	15.0		39.3 [38.1–39.8]	2.6
		11.0 [10.8–11.3]	10.3		40.2 [38.2–41.3]	2.6
Hg	0.030	0.038 [0.036–0.041]	3.7	0.008	0.010 [0.009–0.011]	12.1
		0.036 [0.035–0.037]	9.3		0.010 [0.009–0.011]	0.9
		0.039 [0.038–0.039]	4.8		0.010 [0.008–0.012]	11.0
Mn	0.28	0.28 [0.26–0.30]	6.5	0.41	0.40 [0.38–0.43]	4.5
		0.27 [0.26–0.30]	6.0		0.39 [0.37–0.41]	6.4
		0.26 [0.25–0.31]	6.4		0.41 [0.37–0.44]	4.8
Mo	0.031	0.075 [0.056–0.086]	12.3	0.051	0.090 [0.071–0.093]	12.6
		0.076 [0.067–0.079]	14.7		0.077 [0.062–0.093]	13.8
		0.063 [0.056–0.082]	12.7		0.086 [0.065–0.089]	12.8
Ni	< LLOQ	NA	NA	0.18	0.15 [0.14–0.22]	11.9
					0.16 [0.13–0.17]	10.5
					0.17 [0.17–0.18]	11.7
Pb	1.1	1.0 [0.9–1.1]	6.3	2.4	2.1 [1.9–2.3]	4.8
		1.0 [1.0–1.0]	3.6		2.1 [2.0–2.2]	3.2
		1.0 [0.9–1.0]	6.1		2.0 [1.9–2.2]	4.6
Pt	0.0021	0.0022 [0.0019–0.0023]	9.4	0.012	0.014 [0.013–0.015]	3.6
		0.0020 [0.0019–0.0026]	12.7		0.014 [0.013–0.014]	5.2
		0.0020 [0.0018–0.0020]	9.9		0.013 [0.013–0.014]	3.9
Sb	0.029	0.033 [0.031–0.036]	9.7	0.11	0.13 [0.12–0.13]	2.0
		0.035 [0.023–0.037]	6.5		0.12 [0.12–0.13]	6.8
		0.032 [0.031–0.033]	9.3		0.13 [0.12–0.13]	3.0
Se	2.2	2.2 [2.1–2.5]	10.2	2.9	3.1 [2.7–3.5]	11.3
		2.5 [2.1–2.7]	12.5		2.7 [2.5–3.4]	13.6
		2.7 [2.2–2.8]	10.5		3.1 [2.7–3.5]	11.6
Sn	0.029	0.032 [0.027–0.037]	14.9	0.17	0.15 [0.14–0.16]	6.3
		0.032 [0.021–0.038]	6.9		0.16 [0.13–0.18]	4.5
		0.032 [0.029–0.038]	14.2		0.16 [0.15–0.17]	6.1
Sr	1.0	1.2 [1.1–1.2]	3.0	3.2	3.6 [3.4–3.8]	3.2
		1.1 [1.1–1.2]	4.1		3.5 [3.4–3.6]	5.0
		1.2 [1.1–1.2]	3.2		3.5 [3.3–3.6]	3.5
Te	0.020	0.021 [0.020–0.022]	6.4	0.062	0.064 [0.059–0.066]	3.8
		0.021 [0.020–0.022]	6.3		0.066 [0.064–0.069]	11.5
		0.019 [0.019–0.023]	6.4		0.069 [0.066–0.073]	5.3
Th	0.0029	0.0032 [0.0030–0.0035]	3.7	0.0086	0.0101 [0.0091–0.0103]	3.4
		0.0033 [0.0032–0.0033]	1.6		0.0100 [0.0098–0.0102]	2.3
		0.0033 [0.0032–0.0033]	3.5		0.0100 [0.0096–0.0102]	3.3
Tl	0.017	0.016 [0.016–0.017]	2.7	0.038	0.034 [0.031–0.036]	3.9
		0.015 [0.015–0.016]	8.3		0.036 [0.035–0.038]	7.8
		0.017 [0.016–0.017]	3.8		0.036 [0.034–0.036]	4.5
U	0.0020	0.0020 [0.0019–0.0021]	5.8	0.0035	0.0035 [0.0034–0.0039]	4.7
		0.0018 [0.0017–0.0018]	12.8		0.0038 [0.0035–0.0039]	13.9
		0.0019 [0.0018–0.0023]	7.0		0.0034 [0.0033–0.0035]	6.6

(continued on next page)

Table 2 (continued)

	Blood level 1: QM-B-Q1505			Blood level 2: QM-B-Q1506		
	Theoretical concentration	Measured concentration	CV (%)	Theoretical concentration	Measured concentration	CV (%)
V	0.024	0.036 [0.030–0.040] 0.038 [0.037–0.041] 0.039 [0.036–0.040]	6.4 10.4 7.0	0.052	0.059 [0.055–0.064] 0.058 [0.054–0.060] 0.060 [0.055–0.064]	5.3 4.9 5.3
Zn	97	112 [106–117] 113 [101–118] 101 [99–107]	4.8 11.5 6.1	166	176 [156–182] 178 [170–189] 186 [165–193]	5.2 7.8 5.6

### 2.3. Sample preparation

Whole blood, urine and tissue samples were processed directly, whereas hair samples were washed first to eliminate any external contamination (using the method developed by the International Atomic Energy Agency, with some modifications [17–19]). The strand of hairs was washed once with 0.1% Triton X100, three times with deionized water and then once with acetone, prior to drying in an oven at 40 °C.

Next, 200 µL of urine, whole blood or plasma, 15 mg of lung tissue, or 10 mg of hair were added to quartz tubes containing 10 µL of the internal standard solution (10 µg/mL gallium and iridium, and 100 µg/mL indium and scandium). Two hundred microliters of nitric acid and 200 µL of hydrogen peroxide were then added. The tubes were capped, transferred to the microwave reaction chamber (Ultrawave, Milestone, Sorisole, Italy) and then microwaved at 1500 W (heating from ambient temperature to 220 °C over 15 min, followed maintenance at 220 °C for 10 min) at a pressure of 110 bar. After the samples had cooled, they were transferred to 15 mL polypropylene tubes and made up to a volume of 6 mL with deionized water.

### 2.4. Instrumentation and the analytical procedure

The samples were handled using an ASX-520 autosampler (CETAC technologies, Omaha, NE, USA), a PFA-ST microflow nebulizer, and a PC<sup>3</sup> Peltier-cooled cyclonic quartz chamber (both from Elemental Scientific Instruments, Ltd, Birmingham, UK) maintained at + 2 °C. A demountable quartz torch with a quartz injector (internal diameter: 1.75 mm), a platinum sampler, and skimmer cones were used (Elemental Scientific Instruments, Ltd). The ICP-MS instrument was an Element XR (ThermoFisher, Les Ulis, France) controlled with Element ICP-MS software (v3.1.2.242). The operating conditions (torch position, lenses, gas flows and detector voltage) were optimized daily in low-, medium- and high-resolution modes, using a 100 ppt tuning solution (ThermoFisher). This yielded oxide levels ( $^{238}\text{U}^{16}\text{O}/^{238}\text{U}$ ) below 10%, and a resolution of around 4000 and 10000 in the medium- and high-resolution modes, respectively. Mass calibration was performed as required. The main ICP-MS detection parameters are shown in Supplementary Table 1. The parameters used to detect the elements of interest and their internal standards are summarized in Supplementary Table 2.

### 2.5. Validation of the ICP-MS method

The ICP-MS method was validated using reference standards (at two different concentrations) for whole blood, urine, and hair. Since theoretical concentrations were not available for all 38 elements in the matrix, a set of in-house QC samples at three concentrations (containing the elements spiked into blank water) were also analysed. To assess intra- and interday performance levels, all QC samples were analysed on three different days as six replicates. Calibration curves included a sample blank, a zero sample, and 7–15 calibration standards (depending on the element) over a preselected concentration range for each element (based on the literature data for the different matrices

[3,7,13–16]). The intensity of each element in the sample blank was subtracted from the intensity measured in each sample.

For each element, the ratio between the peak area and the peak area of the corresponding internal standard was plotted against the concentration; the relationship was then probed in a regression analysis. The correlation coefficient was analysed for each calibration curve. The precision was defined as the coefficient of variation (CV), which was determined for each QC and had to be less than  $\pm 15\%$ . The lower limit of quantification (LLOQ) was defined as the calibration standard that gave a signal intensity of at least ten times the standard deviation recorded for sample blanks.

### 2.6. Analysis of clinical trial samples

To confirm its suitability for clinical samples, the method developed here was used to measure elements in whole blood, hair and lung samples from 25 patients participating in a clinical trial (designed to assess the role of trace elements in lung cancer; NCT01949181).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Sample preparation

A variety of vessels and reagent mixtures were tested for microwave mineralization. Disposable borosilicate glassware contaminated samples with several elements, whereas quartz tubes provided reproducible results and low levels of contamination (results not shown). The composition of the mineralization mixture was also optimized by comparing 100, 200 or 400 µL HNO<sub>3</sub> in the presence of absence of 100 or 200 µL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for the mineralization of 200 µL of sample matrix. The composition with 200 µL HNO<sub>3</sub> and 200 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yielded the most complete digestion (with the absence of particulate matter and a sufficient amount of sample) and so was used for the subsequent experiments. This digestion method was found to be appropriate for all samples: whole blood, urine, hair, or lung tissue. In contrast to conventional dilution methods, the microwave mineralization method destroys organic molecules in the matrix; this avoids the formation of deposits on the cones, reduces fouling of the instrument, and therefore increases the sensitivity.

### 3.2. ICP-MS analysis

Most elements were detected in low-resolution mode. However, polyatomic or isobaric interferences (due to the environment or the sample preparation) occurred for some other elements. Hence, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn and Tl had to be detected in medium-resolution mode, and Ge, As, Se and Pd had to be detected in high-resolution mode [6]. Although a higher resolution improved the method's specificity, the transmission was about 10% in medium-resolution mode and 1.5% in high-resolution; this decreased the sensitivity. However, our method was sensitive enough to detect all the elements at the required concentrations.

We also optimized the number of runs and passes, which therefore modified the sample volume and the sensitivity. With our final

**Table 3**

Validation data for urine QC samples. The measured concentrations are presented for the three different days as the median [range] ( $\mu\text{M}$ ) from 6 replicate samples. The values of the CVs correspond to the intraday, interday and total CVs, respectively.

	Urine level 1: QM-U-Q1503			Urine level 2: QM-U-Q1504		
	Theoretical concentration	Measured concentration	CV (%)	Theoretical concentration	Measured concentration	CV (%)
Ag	0.051	0.045 [0.040–0.047] 0.049 [0.047–0.051] 0.047 [0.040–0.049]	5.8 12.8 7.1	< LLOQ	NA	NA
As	1.3	1.4 [1.2–1.5] 1.5 [1.4–1.5] 1.4 [1.3–1.6]	7.7 8.8 7.8	0.67	0.77 [0.72–0.81] 0.74 [0.64–0.84] 0.67 [0.63–0.76]	9.0 14.5 9.9
Ba	0.031	0.047 [0.045–0.051] 0.046 [0.042–0.048] 0.053 [0.046–0.054]	6.3 12.6 7.4	0.012	0.038 [0.037–0.039] 0.033 [0.029–0.039] 0.031 [0.030–0.046]	13.8 14.6 13.9
Be	0.30	0.40 [0.39–0.41] 0.40 [0.39–0.41] 0.39 [0.37–0.44]	4.9 4.5 4.8	1.4	2.0 [1.8–2.0] 2.0 [1.8–2.1] 1.9 [1.7–2.0]	4.6 9.2 5.4
Bi	0.12	0.11 [0.10–0.13] 0.12 [0.09–0.13] 0.10 [0.09–0.14]	14.7 11.8 14.3	0.025	0.031 [0.027–0.031] 0.026 [0.025–0.036] 0.031 [0.024–0.031]	11.4 5.7 10.9
Cd	0.14	0.16 [0.15–0.16] 0.15 [0.15–0.16] 0.15 [0.15–0.16]	2.4 2.7 2.5	0.026	0.022 [0.021–0.028] 0.023 [0.022–0.031] 0.027 [0.019–0.029]	14.9 10.8 14.4
Co	0.14	0.15 [0.13–0.16] 0.14 [0.13–0.15] 0.15 [0.15–0.16]	5.0 11.4 6.1	0.035	0.035 [0.034–0.042] 0.039 [0.038–0.043] 0.039 [0.035–0.040]	6.2 10.3 6.8
Cr	0.093	0.095 [0.081–0.106] 0.087 [0.083–0.126] 0.105 [0.079–0.118]	14.6 13.8 14.5	0.41	0.46 [0.44–0.47] 0.44 [0.38–0.49] 0.41 [0.39–0.43]	6.5 14.7 8.0
Cu	0.14	0.13 [0.13–0.14] 0.14 [0.13–0.17] 0.15 [0.14–0.18]	8.0 14.9 9.3	17.0	16.3 [16.1–16.6] 17.6 [16.2–18.9] 16.2 [15.9–17.3]	3.7 10.6 5.1
Hg	0.066	0.039 [0.031–0.040] 0.030 [0.027–0.042] 0.034 [0.028–0.041]	14.9 14.7 14.9	0.17	0.15 [0.15–0.17] 0.15 [0.14–0.16] 0.15 [0.15–0.17]	4.6 6.4 4.9
Mn	0.099	0.098 [0.084–0.110] 0.096 [0.093–0.103] 0.089 [0.085–0.093]	6.8 12.9 7.8	0.049	0.049 [0.045–0.054] 0.054 [0.045–0.059] 0.053 [0.051–0.054]	7.1 10.0 7.5
Mo	0.63	0.72 [0.67–0.76] 0.70 [0.63–0.73] 0.68 [0.67–0.71]	4.8 6.2 5.0	2.9	3.3 [3.2–3.4] 3.3 [3.1–3.5] 3.1 [2.9–3.3]	3.8 9.3 4.8
Ni	0.27	0.27 [0.23–0.36] 0.29 [0.26–0.37] 0.31 [0.29–0.32]	12.2 9.5 11.9	0.18	0.14 [0.13–0.20] 0.16 [0.13–0.17] 0.16 [0.15–0.16]	11.5 3.7 10.8
Pb	0.34	0.31 [0.30–0.32] 0.30 [0.24–0.33] 0.30 [0.29–0.34]	7.0 5.0 6.8	0.80	0.64 [0.61–0.68] 0.67 [0.65–0.71] 0.63 [0.60–0.65]	3.6 9.3 4.6
Pt	0.0056	0.0051 [0.0050–0.0054] 0.0056 [0.0050–0.0057] 0.0055 [0.0053–0.0060]	4.9 10.2 5.8	0.010	0.009 [0.008–0.009] 0.010 [0.009–0.010] 0.010 [0.010–0.011]	4.3 14.9 6.5
Sb	0.015	0.016 [0.014–0.016] 0.017 [0.016–0.019] 0.017 [0.016–0.019]	6.5 14.3 7.8	0.056	0.063 [0.060–0.066] 0.057 [0.050–0.060] 0.057 [0.056–0.065]	6.5 14.9 8.0
Se	3.9	4.6 [4.1–5.3] 4.2 [3.9–4.5] 4.2 [4.0–4.6]	9.0 13.3 9.6	1.5	1.8 [1.6–2.0] 1.8 [1.2–2.1] 1.6 [1.5–1.8]	13.4 14.8 13.6
Sn	0.21	0.22 [0.20–0.24] 0.24 [0.24–0.25] 0.25 [0.24–0.25]	3.5 13.7 5.9	0.020	0.018 [0.016–0.020] 0.017 [0.016–0.019] 0.017 [0.016–0.020]	9.0 5.2 8.7
Te	0.21	0.21 [0.19–0.22] 0.22 [0.21–0.24] 0.21 [0.20–0.22]	4.5 9.7 5.4	0.032	0.032 [0.031–0.034] 0.032 [0.029–0.035] 0.029 [0.028–0.033]	6.1 9.8 6.6
Th	0.00040	0.00038 [0.00036–0.00042] 0.00042 [0.0004–0.00043] 0.00037 [0.00033–0.00042]	6.5 14 7.9	0.0013	0.0015 [0.0015–0.0016] 0.0015 [0.0014–0.0017] 0.00145 [0.0014–0.0015]	4.8 6.9 5.1
Tl	0.12	0.11 [0.10–0.11] 0.11 [0.10–0.12] 0.11 [0.11–0.12]	5.6 8.3 6.0	0.048	0.041 [0.040–0.042] 0.044 [0.041–0.046] 0.041 [0.040–0.044]	3.6 7.5 4.2
U	0.0044	0.0037 [0.0036–0.0038] 0.0039 [0.0036–0.0042] 0.0037 [0.0036–0.0038]	4.1 6.5 4.4	0.0020	0.0017 [0.0016–0.0020] 0.0018 [0.0016–0.0019] 0.0017 [0.0016–0.0019]	7.3 4.2 7.0
V	0.35	0.41 [0.37–0.42] 0.37 [0.37–0.39] 0.36 [0.35–0.37]	3.4 12.5 5.5	0.12	0.13 [0.13–0.14] 0.13 [0.12–0.15] 0.13 [0.12–0.14]	6.4 3.6 6.1
Zn	8.8	8.9 [8.5–11.2] 9.2 [8.0–10.0] 9.4 [8.3–10.9]	11.8 6.4 11.3	16.8	18.8 [15.6–22.0] 19.3 [17.4–23.0] 18.9 [17.2–20.0]	12.5 4.0 11.8

**Table 4**

Validation data for hair QC samples. The measured concentrations are presented for the three different days as the median [range] ( $\mu\text{mol/g}$ ) from 6 replicate samples. The values of the CVs correspond to the intraday, interday and total CVs, respectively.

	Hair level 1: QM-H-Q1315			Hair level 2: QM-H-Q1406		
	Theoretical concentration	Measured concentration	CV (%)	Theoretical concentration	Measured concentration	CV (%)
Ag	0.014	0.016 [0.016–0.017]	5.0	0.0029	0.0032 [0.0032–0.0033]	1.9
		0.016 [0.014–0.017]	5.2		0.0033 [0.0032–0.0034]	11.3
		0.016 [0.015–0.016]	5.1		0.0030 [0.0030–0.0031]	4.3
As	0.0081	0.0088 [0.0085–0.0098]	7.0	0.0080	0.0090 [0.0084–0.0091]	2.9
		0.0089 [0.0085–0.0106]	8.0		0.0080 [0.0076–0.0084]	14.6
		0.0085 [0.0082–0.0093]	7.1		0.0080 [0.0078–0.0082]	5.7
Ba	0.13	0.14 [0.14–0.14]	4.3	0.020	0.020 [0.019–0.021]	3.6
		0.13 [0.12–0.14]	14.5		0.019 [0.019–0.02]	5.2
		0.12 [0.12–0.13]	6.4		0.002 [0.019–0.021]	3.8
Be	0.045	0.054 [0.043–0.056]	8.7	0.027	0.031 [0.029–0.033]	3.6
		0.049 [0.047–0.055]	9.8		0.027 [0.027–0.028]	13.8
		0.047 [0.044–0.049]	8.8		0.029 [0.028–0.031]	5.9
Bi	0.0078	0.0087 [0.0086–0.0090]	3.1	0.0029	0.0032 [0.0031–0.0035]	4.2
		0.0080 [0.0077–0.0084]	14.6		0.0029 [0.0028–0.0031]	12.0
		0.0078 [0.0076–0.0082]	6.0		0.0031 [0.0030–0.0032]	5.7
Cd	0.018	0.019 [0.019–0.020]	3.9	0.014	0.014 [0.014–0.015]	3.0
		0.018 [0.017–0.002]	11.9		0.014 [0.014–0.015]	3.5
		0.017 [0.017–0.019]	5.5		0.014 [0.014–0.015]	3.1
Co	0.046	0.039 [0.038–0.041]	4.9	0.042	0.037 [0.036–0.038]	2.1
		0.040 [0.039–0.040]	1.5		0.037 [0.036–0.038]	0.8
		0.039 [0.036–0.045]	4.6		0.037 [0.035–0.038]	2.0
Cr	0.0087	0.0095 [0.0077–0.0096]	7.1	0.037	0.035 [0.034–0.036]	4.9
		0.0089 [0.0085–0.0094]	13.0		0.034 [0.029–0.035]	10.9
		0.0097 [0.0090–0.0104]	8.0		0.035 [0.035–0.036]	6.0
Cu	0.29	0.25 [0.24–0.26]	3.2	0.94	0.80 [0.79–0.82]	1.1
		0.25 [0.24–0.26]	3.1		0.80 [0.79–0.80]	0.9
		0.26 [0.24–0.26]	3.2		0.79 [0.79–0.81]	1.1
Hg	0.010	0.012 [0.011–0.013]	4.3	0.019	0.020 [0.020–0.021]	2.5
		0.011 [0.010–0.011]	13.8		0.020 [0.020–0.021]	3.8
		0.010 [0.010–0.011]	6.2		0.021 [0.020–0.022]	2.7
Mn	0.084	0.072 [0.069–0.073]	4.3	0.10	0.085 [0.084–0.086]	1.2
		0.074 [0.071–0.078]	5.6		0.085 [0.083–0.086]	1.3
		0.070 [0.067–0.078]	4.4		0.085 [0.085–0.087]	1.2
Mo	0.0087	0.0100 [0.0100–0.0110]	5.3	0.0038	0.0037 [0.0035–0.0039]	8.4
		0.0093 [0.0085–0.0099]	13.9		0.0036 [0.0043–0.0041]	13.8
		0.0091 [0.0084–0.0094]	6.9		0.0041 [0.0035–0.0046]	9.2
Ni	0.022	0.020 [0.018–0.02]	3.1	0.12	0.111 [0.109–0.114]	2.0
		0.018 [0.018–0.02]	4.0		0.111 [0.108–0.112]	1.9
		0.019 [0.019–0.02]	3.2		0.111 [0.105–0.112]	2.0
Pb	0.0074	0.0080 [0.0079–0.0082]	3.5	0.015	0.015 [0.014–0.015]	2.5
		0.0075 [0.0071–0.0080]	9.2		0.014 [0.013–0.014]	7.0
		0.0076 [0.0074–0.0082]	4.6		0.015 [0.014–0.015]	3.3
Pt	0.000087	0.000096 [0.000094–0.000098]	4.9	0.0012	0.0012 [0.0011–0.0012]	2.0
		0.000087 [0.000080–0.000093]	14.6		0.0011 [0.0011–0.0012]	8.6
		0.000087 [0.000082–0.000091]	6.8		0.0012 [0.0012–0.0013]	3.5
Sb	0.0076	0.0089 [0.0079–0.0092]	5.9	0.010	0.011 [0.010–0.011]	5.1
		0.0085 [0.0078–0.0093]	7.0		0.010 [0.010–0.011]	7.8
		0.0081 [0.0080–0.0088]	6.0		0.010 [0.010–0.011]	5.5
Se	0.038	0.041 [0.039–0.045]	5.6	0.013	0.012 [0.012–0.015]	5.7
		0.041 [0.039–0.046]	5.5		0.012 [0.012–0.012]	14.8
		0.044 [0.043–0.046]	5.6		0.014 [0.013–0.014]	7.5
Sn	0.050	0.069 [0.067–0.072]	4.7	0.052	0.073 [0.069–0.077]	3.2
		0.066 [0.062–0.069]	11.8		0.071 [0.070–0.073]	5.9
		0.063 [0.059–0.068]	6.0		0.074 [0.072–0.078]	3.6
Te	0.0042	0.0048 [0.0047–0.0048]	4.9	0.0055	0.0062 [0.0061–0.0063]	2.3
		0.0045 [0.0040–0.0048]	14.4		0.0058 [0.0056–0.0061]	10.5
		0.0041 [0.0041–0.0046]	6.7		0.0057 [0.0056–0.0060]	4.2
Th	0.011	0.017 [0.016–0.018]	5.4	0.023	0.029 [0.027–0.031]	2.8
		0.016 [0.015–0.017]	13.6		0.030 [0.030–0.031]	7.8
		0.016 [0.015–0.017]	6.9		0.029 [0.028–0.029]	3.7
Tl	0.0011	0.0012 [0.0011–0.0012]	4.4	0.00045	0.00049 [0.00047–0.00049]	1.9
		0.0011 [0.0010–0.0012]	13.6		0.00047 [0.00046–0.00048]	5.1
		0.0011 [0.0010–0.0011]	6.4		0.00047 [0.00046–0.00047]	2.5
U	0.0021	0.0025 [0.0023–0.0025]	5.0	0.0015	0.0016 [0.0016–0.0017]	2.3
		0.0024 [0.0023–0.0026]	9.0		0.0016 [0.0016–0.0017]	0.3
		0.0023 [0.0021–0.0025]	5.6		0.0016 [0.0016–0.0017]	2.1
V	0.024	0.020 [0.020–0.021]	4.5	0.014	0.012 [0.012–0.013]	5.4
		0.020 [0.020–0.022]	1.6		0.012 [0.011–0.014]	1.1
		0.019 [0.019–0.022]	4.2		0.012 [0.012–0.012]	5.1
Zn	3.4	3.7 [3.6–3.9]	2.8	4.9	5.0 [4.9–5.1]	3.3
		3.8 [3.6–4.0]	3.5		4.9 [4.8–5.2]	5.5
		3.7 [3.6–3.7]	2.9		5.2 [4.8–5.4]	3.6



**Table 5**

Validation data for internal QC samples. The measured concentrations are presented for the three different days as the median [range] ( $\mu\text{M}$ ) from 6 replicate samples. The values of the CVs correspond to the intraday, interday and total CVs, respectively.

	Internal QC level 1			Internal QC level 2			Internal QC level 3		
	Theoretical concentration	Measured concentration	CV (%)	Theoretical concentration	Measured concentration	CV (%)	Theoretical concentration	Measured concentration	CV (%)
Ag	0.75	0.47 [0.47–0.48]	1.7	2.5	2.4 [2.3–2.4]	2.0	7.5	7.8 [7.3–8.8]	10.9
		0.45 [0.44–0.47]	6.1		2.6 [2.5–2.6]	14		7.9 [6.2–8.2]	10.7
		0.46 [0.45–0.47]	2.7		2.7 [2.6–2.7]	5.3		7.1 [6.0–7.9]	10.9
As	0.075	0.083 [0.077–0.095]	7.8	0.25	0.29 [0.26–0.30]	11.5	0.75	0.86 [0.79–0.93]	9.9
		0.086 [0.078–0.092]	14.6		0.31 [0.22–0.33]	1.8		0.90 [0.71–1.00]	1.1
		0.075 [0.069–0.087]	9.0		0.29 [0.25–0.31]	10.8		0.87 [0.76–0.91]	9.2
Au	0.075	0.073 [0.068–0.075]	4.0	0.25	0.23 [0.20–0.30]	9.9	0.75	0.80 [0.78–0.84]	3.9
		0.068 [0.067–0.071]	10.5		0.25 [0.24–0.26]	8.3		0.79 [0.77–0.80]	11.5
		0.069 [0.060–0.070]	5.2		0.26 [0.22–0.26]	9.7		0.72 [0.68–0.80]	5.5
Ba	0.38	0.40 [0.38–0.41]	2.8	1.3	1.3 [1.2–1.3]	3.2	3.8	3.9 [3.8–4.0]	4.0
		0.41 [0.40–0.42]	5.3		1.3 [1.2–1.3]	4.0		3.9 [3.6–4.2]	5.6
		0.40 [0.39–0.40]	3.2		1.3 [1.2–1.3]	3.3		4.0 [3.9–4.3]	4.2
Be	0.038	0.039 [0.036–0.041]	4.7	0.13	0.12 [0.11–0.13]	4.2	0.38	0.41 [0.38–0.44]	4.9
		0.041 [0.037–0.043]	12.5		0.12 [0.12–0.13]	14.0		0.39 [0.38–0.40]	9.8
		0.042 [0.042–0.046]	6.2		0.13 [0.13–0.13]	6.2		0.37 [0.35–0.40]	5.7
Bi	0.075	0.080 [0.079–0.083]	1.5	0.25	0.27 [0.26–0.27]	2.6	0.75	0.73 [0.72–0.75]	3.0
		0.078 [0.076–0.079]	6.6		0.26 [0.25–0.26]	9.6		0.73 [0.69–0.76]	8.4
		0.076 [0.075–0.078]	2.7		0.25 [0.23–0.25]	4.1		0.77 [0.76–0.80]	4.0
Cd	0.75	0.75 [0.72–0.77]	1.9	2.5	2.5 [2.3–2.5]	2.9	7.5	7.0 [6.8–7.2]	3.8
		0.74 [0.72–0.76]	5.5		2.4 [2.3–2.4]	5.0		7.0 [6.6–7.4]	4.6
		0.72 [0.71–0.73]	2.6		2.4 [2.2–2.4]	3.2		7.2 [6.9–7.5]	3.9
Ce	0.075	0.075 [0.074–0.077]	1.5	0.25	0.26 [0.25–0.27]	4.2	0.75	0.78 [0.73–0.83]	3.7
		0.077 [0.075–0.078]	2.1		0.26 [0.26–0.29]	8.1		0.79 [0.78–0.81]	3.1
		0.075 [0.074–0.077]	1.6		0.26 [0.24–0.26]	4.8		0.79 [0.76–0.83]	3.6
Co	1.5	1.6 [1.6–1.7]	1.8	5.0	5.6 [5.4–5.7]	2.4	15.0	16.3 [15.0–17.4]	4.2
		1.7 [1.7–1.8]	8.4		5.6 [5.6–5.8]	1.9		16.1 [15.5–16.9]	6.2
		1.7 [1.7–1.8]	3.3		5.7 [5.5–5.9]	2.3		16.9 [16.4–17.4]	4.5
Cr	0.75	0.72 [0.71–0.74]	2.1	2.5	2.4 [2.4–2.5]	2.4	7.5	7.3 [7.1–7.6]	4.1
		0.76 [0.73–0.78]	11.1		2.5 [2.5–2.6]	5.0		7.5 [6.9–8.0]	3.2
		0.78 [0.76–0.82]	4.3		2.6 [2.5–2.6]	2.8		7.4 [7.1–7.5]	4.0
Cs	0.075	0.087 [0.080–0.088]	3.7	0.25	0.29 [0.26–0.30]	3.4	0.75	0.82 [0.79–0.88]	3.1
		0.088 [0.080–0.090]	1.3		0.28 [0.28–0.29]	5.5		0.85 [0.84–0.87]	5.0
		0.085 [0.084–0.086]	3.5		0.28 [0.26–0.28]	3.7		0.86 [0.81–0.90]	3.4
Cu	15.0	15.8 [15.4–15.9]	1.9	50	53 [53–56]	2.3	150	158 [150–163]	4.0
		16.9 [16.4–17.6]	11.7		53 [52–55]	2.6		157 [143–165]	4.3
		17.1 [16.9–17.6]	4.4		53 [51–54]	2.4		160 [156–165]	4.1
Fe	37.5	39.0 [37.2–40.1]	2.2	125	130 [128–135]	2.2	375	366 [329–391]	5.2
		40.1 [39.1–41.8]	6.8		131 [130–138]	2.7		342 [316–360]	10.2
		41.1 [40.3–41.7]	3.1		133 [130–139]	2.2		365 [357–386]	6.1
Ge	0.075	0.082 [0.070–0.095]	7.6	0.25	0.27 [0.26–0.29]	4.3	0.75	0.84 [0.69–1.00]	9.9
		0.086 [0.080–0.090]	5.1		0.29 [0.28–0.29]	9.1		0.87 [0.69–0.97]	3.0
		0.082 [0.078–0.088]	7.2		0.29 [0.26–0.30]	5.1		0.86 [0.75–0.89]	9.3
Hf	0.075	0.092 [0.062–0.096]	9.5	0.25	0.29 [0.23–0.33]	12.8	0.75	0.82 [0.74–0.90]	5.4
		0.086 [0.080–0.091]	3.7		0.29 [0.22–0.29]	5.0		0.84 [0.75–0.86]	4.2
		0.084 [0.077–0.088]	9.0		0.29 [0.22–0.29]	12.2		0.85 [0.82–0.90]	5.3
Hg	0.75	0.87 [0.83–0.87]	1.6	2.5	2.9 [2.8–2.9]	1.2	7.5	7.4 [7.0–7.4]	4
		0.84 [0.82–0.85]	3.6		2.9 [2.8–2.9]	14.9		7.6 [7.0–8.0]	5.5
		0.85 [0.83–0.86]	2.0		2.6 [2.5–2.6]	5.2		7.5 [7.3–7.9]	4.2
La	0.075	0.069 [0.068–0.072]	1.6	0.25	0.24 [0.23–0.25]	3.1	0.75	0.73 [0.71–0.74]	4.1
		0.071 [0.068–0.072]	1.9		0.25 [0.24–0.26]	6.4		0.71 [0.67–0.76]	5.2
		0.070 [0.068–0.071]	1.7		0.24 [0.22–0.24]	3.7		0.75 [0.70–0.78]	4.2
Mn	0.15	0.17 [0.15–0.18]	6.1	0.50	0.58 [0.52–0.60]	4.5	1.5	1.7 [1.6–1.8]	2.7
		0.17 [0.16–0.18]	5.1		0.58 [0.52–0.60]	2.1		1.7 [1.7–1.8]	1.9
		0.17 [0.16–0.18]	6.0		0.57 [0.56–0.60]	4.3		1.7 [1.7–1.8]	2.6
Mo	0.11	0.11 [0.10–0.11]	3.7	0.38	0.35 [0.32–0.37]	3.7	1.1	1.1 [1.0–1.2]	4.5
		0.11 [0.11–0.12]	7.7		0.35 [0.34–0.36]	0.9		1.1 [1.0–1.1]	1.8
		0.11 [0.11–0.11]	4.4		0.35 [0.34–0.36]	3.5		1.1 [1.0–1.2]	4.3
Ni	3.8	3.7 [3.7–3.8]	1.6	12.5	12.6 [12.4–13.1]	2.5	37.5	36.4 [35.7–38.0]	3.9
		3.8 [3.7–3.9]	7.7		12.3 [12.2–12.9]	6.5		39.2 [36.1–41.4]	7.2
		4.0 [3.9–4.0]	3.0		13.1 [12.5–13.6]	3.2		38.5 [37.4–39.5]	4.4
Pb	0.38	0.38 [0.38–0.39]	1.5	1.3	1.2 [1.1–1.2]	2.6	3.8	3.4 [3.3–3.5]	3.5
		0.35 [0.34–0.36]	13.3		1.2 [1.1–1.2]	2.3		3.5 [3.3–3.7]	10.3
		0.35 [0.34–0.36]	4.8		1.2 [1.1–1.2]	2.5		3.2 [3.1–3.4]	4.8
Pd	0.033	0.028 [0.026–0.031]	6.7	0.11	0.10 [0.09–0.10]	6.0	0.38	0.32 [0.30–0.37]	9.6
		0.028 [0.026–0.030]	10.1		0.10 [0.09–0.10]	5.7		0.34 [0.29–0.38]	5.1
		0.030 [0.028–0.034]	7.2		0.10 [0.09–0.11]	6.0		0.31 [0.29–0.39]	9.2
Pt	0.0075	0.0085 [0.0082–0.0086]	1.8	0.025	0.029 [0.028–0.029]	2.2	0.075	0.083 [0.079–0.089]	3.5
		0.0086 [0.0083–0.0088]	2.5		0.029 [0.028–0.029]	3.5		0.083 [0.082–0.083]	1.3
		0.0086 [0.0085–0.0088]	1.9		0.028 [0.027–0.029]	2.4		0.083 [0.081–0.087]	3.3

(continued on next page)

Table 5 (continued)

	Internal QC level 1			Internal QC level 2			Internal QC level 3		
	Theoretical concentration	Measured concentration	CV (%)	Theoretical concentration	Measured concentration	CV (%)	Theoretical concentration	Measured concentration	CV (%)
Rb	3.8	4.0 [3.8–4.2] 4.0 [3.8–4.1] 4.2 [4.1–4.3]	2.7 6.0 3.3	12.5	14.3 [13.7–14.4] 12.8 [12.5–13.4] 14.5 [13.5–14.7]	2.9 14.0 5.5	37.5	35.0 [32.0–36.9] 33.5 [32.3–34.4] 33.8 [30.0–35.1]	4.9 5.1 4.9
Ru	0.00075	0.00082 [0.00081–0.00085] 0.00076 [0.00072–0.00077] 0.00073 [0.00071–0.00076]	2.3 14.8 5.5	0.0025	0.0024 [0.0024–0.0025] 0.0025 [0.0025–0.0026] 0.0025 [0.0023–0.0026]	3.2 5.6 3.6	0.0075	0.0077 [0.0073–0.0084] 0.0080 [0.0077–0.008] 0.0077 [0.0074–0.0081]	4.0 2.8 3.9
Se	0.75	0.94 [0.86–1.00] 0.97 [0.92–1.01] 0.93 [0.88–0.98]	4.2 5.9 4.4	2.5	2.9 [2.7–3.1] 3.1 [2.8–3.1] 2.9 [2.7–3.1]	4.4 7.4 4.9	7.5	9.1 [8.1–9.7] 8.9 [8.6–9.6] 8.4 [7.9–8.7]	5.5 10.1 6.3
Sr	0.75	0.78 [0.77–0.81] 0.81 [0.79–0.83] 0.81 [0.80–0.83]	1.7 4.6 2.2	2.5	2.7 [2.6–2.8] 2.8 [2.7–2.9] 2.8 [2.6–2.8]	3.5 4.6 3.6	7.5	8.4 [7.8–8.9] 8.4 [8.3–8.6] 8.1 [7.8–8.7]	4.0 3.8 3.9
Te	0.0038	0.0043 [0.0038–0.0047] 0.0044 [0.0037–0.0045] 0.0041 [0.0038–0.0049]	8.6 0.7 8.1	0.013	0.014 [0.013–0.016] 0.014 [0.013–0.015] 0.014 [0.013–0.015]	6.2 1.1 5.8	0.038	0.046 [0.038–0.047] 0.043 [0.037–0.045] 0.042 [0.041–0.045]	7.7 3.3 7.3
Th	0.00075	0.00081 [0.00077–0.00085] 0.00074 [0.00073–0.00076] 0.00073 [0.0007–0.00076]	2.9 14.3 5.6	0.0025	0.0029 [0.0025–0.0029] 0.0027 [0.0026–0.0027] 0.0026 [0.0024–0.0028]	5.4 8.8 5.9	0.0075	0.0078 [0.0077–0.0078] 0.0080 [0.0075–0.0086] 0.0076 [0.0075–0.0082]	3.6 5.3 3.9
Tl	0.75	0.74 [0.73–0.75] 0.74 [0.73–0.76] 0.72 [0.71–0.75]	2.0 3.2 2.1	2.5	2.5 [2.4–2.6] 2.5 [2.4–2.5] 2.4 [2.3–2.5]	3.0 5.0 3.3	7.5	7.3 [7.2–7.4] 7.3 [6.8–7.8] 7.4 [7.4–7.6]	3.5 2.8 3.4
Tl	0.0038	0.0038 [0.0036–0.0040] 0.0043 [0.0042–0.0043] 0.0042 [0.0039–0.0044]	3.4 15 6.2	0.013	0.013 [0.013–0.014] 0.015 [0.013–0.015] 0.014 [0.014–0.015]	3.8 9.1 4.8	0.038	0.042 [0.040–0.045] 0.043 [0.042–0.044] 0.043 [0.039–0.045]	4.3 2.8 4.1
U	0.000075	0.000073 [0.000066–0.000079] 0.000070 [0.000066–0.000072] 0.000076 [0.000068–0.000085]	6.5 9.9 7.0	0.00025	0.00027 [0.00027–0.00031] 0.00026 [0.00025–0.00028] 0.00026 [0.00025–0.00027]	5.2 12.3 6.4	0.00075	0.00078 [0.00073–0.00082] 0.00078 [0.00078–0.00080] 0.00085 [0.00081–0.00089]	3.8 11.8 5.4
V	0.11	0.12 [0.12–0.13] 0.13 [0.12–0.13] 0.13 [0.12–0.13]	4.1 6.3 4.4	0.38	0.38 [0.37–0.43] 0.40 [0.39–0.41] 0.41 [0.39–0.42]	4.2 3.9 4.2	1.1	1.2 [1.1–1.2] 1.2 [1.1–1.3] 1.1 [1.1–1.2]	4.2 6.3 4.5
W	0.075	0.078 [0.076–0.079] 0.076 [0.075–0.078] 0.075 [0.073–0.076]	1.6 4.9 2.2	0.25	0.26 [0.25–0.27] 0.25 [0.24–0.25] 0.25 [0.24–0.25]	2.1 7.8 3.3	0.75	0.71 [0.71–0.72] 0.73 [0.68–0.76] 0.76 [0.74–0.79]	3.2 7.5 3.9
Zn	15.0	13.6 [13.0–13.9] 15.0 [14.7–15.6] 15.0 [14.5–15.2]	2.3 14.8 5.5	50	47 [46–50] 48 [48–51] 48 [46–50]	3.1 3.4 3.2	150	144 [132–153] 147 [137–153] 147 [145–155]	4.4 5.9 4.6
Zr	0.0075	0.0085 [0.0079–0.0090] 0.0091 [0.0071–0.0097] 0.0090 [0.0075–0.0093]	10.0 1.7 9.4	0.025	0.038 [0.037–0.04] 0.038 [0.038–0.041] 0.039 [0.036–0.04]	3.3 2.0 3.2	0.075	0.076 [0.07–0.079] 0.078 [0.069–0.085] 0.080 [0.076–0.086]	7.0 8.6 7.2

acquisition parameters (2 runs, 2 passes, and the sample parameters described in Supplementary Table 2), the total run time was 3.8 min per sample, and the sample volume was 2 mL.

### 3.3. Validation of the method

The LLOQ and calibration curve were selected to cover the range of concentrations described in human whole blood, urine or hair samples [3,7,13–16]. The LLOQ and ULOQ for each element are given in Table 1. Some of the elements analysed here (such as U, Ru and Hf) are not at all abundant in human samples (i.e. pM concentrations), while others (such as Cu and Zn) are quite abundant ( $\mu\text{M}$  concentrations). Hence, the dynamic range was different for each element (from 1.3- to 7.0-log), with LLOQ ranging from 0.1 pM (Hf) to 10  $\mu\text{M}$  (Zn). The regression was linear for all elements other than  $^{205}\text{Tl}$ , for which quadratic regression was used. The correlation coefficient for calibration curves (analysed on 6 different days) ranged from 0.9963 to 0.9999. For each element, the LLOQ, ULOQ, number of calibration standards, and the calibration curve's slope, y-intercept and correlation coefficient are shown in Table 1.

The measured concentrations and precision for the intraday and interday analysis of external QC samples (whole blood, urine and hair) and internal QC samples are detailed in Tables 2–5. The intraday,

interday or total precision was always below 15%. The method developed here was therefore highly precise for the determination of all 38 tested elements over a wide range of concentrations and in all matrices.

### 3.4. Analysis of clinical trial samples

The results for samples from 25 clinical trial participants are shown in the Figure. The method was suitable for the analysis of clinical samples of whole blood, hair or lung tissue (Fig. 1).

## 4. Conclusion

Here, we describe a method for the quantification of metals and metalloids in human samples of whole blood, urine, hair and tissues. The method has a number of advantages over previously described methods: the simultaneous analysis of 38 elements, microwave mineralization, high sensitivity, high precision, and a broad dynamic range that can be customized for each element. Furthermore, the method was found to be suitable for the analysis of human samples from clinical trial participants over the whole concentration range reported in these matrices.

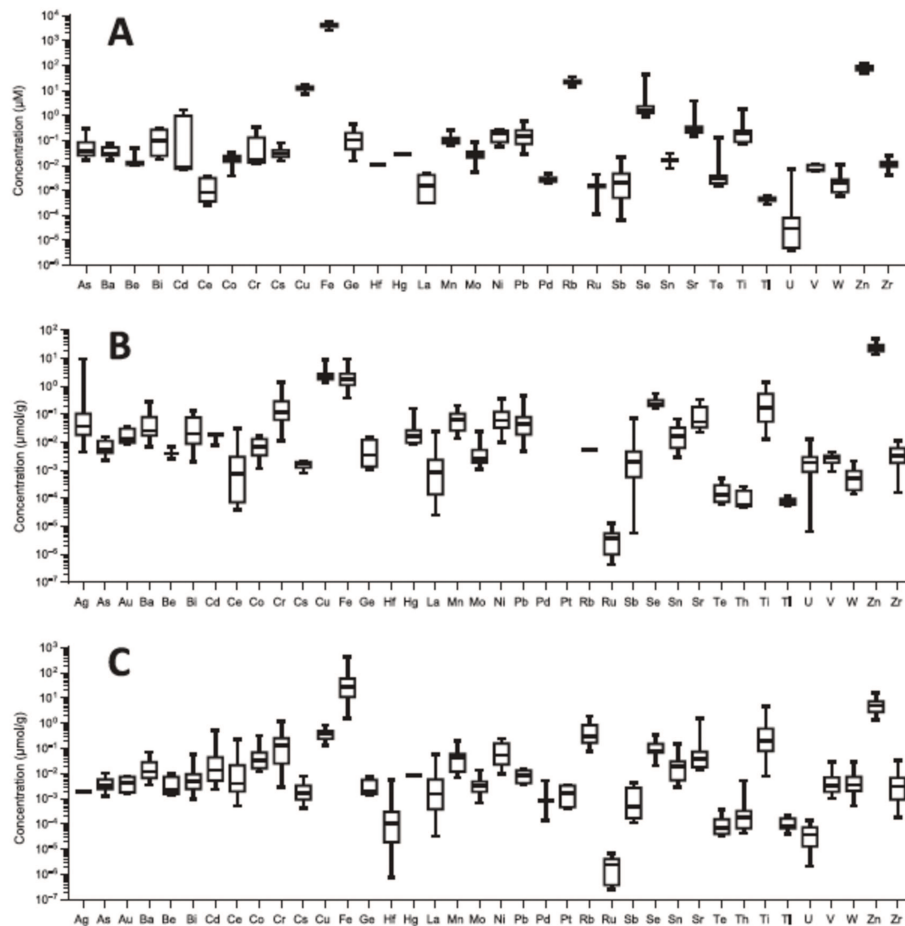


Fig. 1. Concentrations of elements in (A) whole blood ( $\mu\text{M}$ ), (B) hair ( $\mu\text{mol/g}$ ) and (C) lung tissue ( $\mu\text{mol/g}$ ) samples from 25 participants in a lung cancer clinical trial. The whiskers indicate the range of values, and the horizontal line indicates the mean.

#### Acknowledgements

None.

#### Disclosure of conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

#### Funding sources

This research did not receive any specific grant from commercial or not-for-profit sectors. The Region Île de France and Communauté d'Agglomérations Versailles Saint Quentin provided a grant for the purchase of the mass spectrometer (SESAME 2010, 2010-INVES projet n°3 IDF- Universud Paris).

#### Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.talanta.2019.02.068.

#### References

- [1] E.J. Cone, Mechanisms of drug incorporation into hair, *Ther. Drug Monit.* 18 (4) (1996) 438–443.
- [2] H.I. Afridi, T.G. Kazi, M.K. Jamali, G.H. Kazi, M.B. Arain, N. Jalbani, G.Q. Shar, R.A. Sarfaraz, Evaluation of toxic metals in biological samples (scalp hair, blood and urine) of steel mill workers by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Toxicol. Ind. Health* 22 (9) (2006) 381–393.
- [3] J.P. Gouille, L. Mahleu, J. Castermant, N. Neveu, L. Bonneau, G. Laine, D. Boujge, C. Lacroix, Metal and metalloids multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair. Reference values, *For. Sci. Int.* 153 (1) (2005) 39–44.
- [4] F. Shah, T.G. Kazi, H.I. Afridi, N. Kazi, J.A. Baig, A.Q. Shah, S. Khan, N.F. Kolachi, S.K. Wadhwa, Evaluation of status of trace and toxic metals in biological samples (scalp hair, blood, and urine) of normal and anemic children of two age groups, *Biol. Trace Elem. Res.* (2010).
- [5] M. Krachler, K.J. Irgolic, The potential of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the simultaneous determination of trace elements in whole blood, plasma and serum, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 13 (3) (1999) 157–169.
- [6] I. Rodushkin, E. Engstrom, A. Stenberg, D.C. Baxter, Determination of low-abundance elements at ultra-trace levels in urine and serum by inductively coupled plasma-sector field mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 380 (2) (2004) 247–257.
- [7] P. Heitland, H.D. Koster, Biomonitoring of 37 trace elements in blood samples from inhabitants of northern Germany by ICP-MS, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 20 (4) (2006) 253–262.
- [8] I. Rodushkin, F. Odman, Application of inductively coupled plasma sector field mass spectrometry for elemental analysis of urine, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 14 (4) (2001) 241–247.
- [9] B. Bocca, R. Madeddu, Y. Asara, P. Tolu, J.A. Marchal, G. Forte, Assessment of reference ranges for blood Cu, Mn, Se and Zn in a selected Italian population, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 25 (1) (2011) 19–26.
- [10] J.M. Harrington, D.J. Young, A.S. Essader, S.J. Sumner, K.E. Levine, Analysis of human serum and whole blood for mineral content by ICP-MS and ICP-OES: development of a mineralomics method, *Biol. Trace Elem. Res.* 160 (1) (2014) 132–142.
- [11] H. Altundag, M. Tuzen, Comparison of dry, wet and microwave digestion methods for the multi element determination in some dried fruit samples by ICP-OES, *Food Chem. Toxicol.* 49 (11) (2011) 2800–2807.
- [12] L. Schweltzer, C. Cornett, Determination of heavy metals in whole blood using inductively-coupled plasma mass spectrometry: a comparison of microwave and dilution techniques, *Btg M IV* (2008).
- [13] A. Cesbron, E. Saussereau, L. Mahleu, I. Couland, M. Guerbet, J.P. Gouille, *Metallic*

- profile of whole blood and plasma in a series of 106 healthy volunteers, *J. Anal. Toxicol.* 37 (7) (2013) 401–405.
- [14] B. Schultze, P.M. Lind, A. Larsson, L. Lind, Whole blood and serum concentrations of metals in a Swedish population-based sample, *Scand. J. Clin. Lab Invest.* 74 (2) (2014) 143–148.
- [15] A. Alimonti, B. Bocca, E. Mannella, F. Petrucci, F. Zennaro, R. Cotichini, C. D'Ippolito, A. Agresti, S. Calmi, G. Forte, Assessment of reference values for selected elements in a healthy urban population, *Ann. Ist. Super. Sanita* 41 (2) (2005) 181–187.
- [16] C. Minola, E. Sabbioni, P. Apostoli, R. Pietra, L. Pozzoli, M. Gallorini, G. Nicolaou, L. Alessio, E. Capodaglio, Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European community. I. A study of 46 elements in urine, blood and serum of Italian subjects, *Sci. Total Environ.* 95 (1990) 89–105.
- [17] B.L. Batista, J.L. Rodrigues, J.A. Nunes, L. Tormen, A.J. Curtius, F. Barbosa Jr., Simultaneous determination of Cd, Cu, Mn, Ni, Pb and Zn in nail samples by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature: comparison with ETAAS, *Talanta* 76 (3) (2008) 575–579.
- [18] N. Miekeley, M.T. Dias Carneiro, C.L. da Silveira, How reliable are human hair reference intervals for trace elements? *Sci. Total Environ.* 218 (1) (1998) 9–17.
- [19] Y.S. Ryabukhin, Activation Analysis of Hair as an Indicator of Contamination of Man by Environmental Trace Element Pollutants, IAEA, 1976 (Report IAEA/RL/50) 35(31).

## Partie 2

**Applications à des sujets porteurs de prothèse**

**- Protocole PROMETOX -**

(code projet : APHP180539, n°IDRCB : 2018-A02780-55)



# **Partie 2A**

**Évaluation de la toxicité des prothèses**

**- Analyse des éléments traces -**





## **I. Introduction**

Le dosage des métaux dans le sang et les urines par différentes techniques analytiques permet de rechercher une exposition à ces éléments, à la fois professionnelle, environnementale ou médicale. De nombreuses techniques spectrométriques ont, en ce sens, été développées pour l'analyse des éléments traces (ET). La spectrométrie d'absorption atomique de flamme (SAAF), simple et peu coûteuse, permet la détection de nombreux ET, mais avec une sensibilité limitée et par des analyses monoélémentaires. La spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-AES), plus sensible et multiélémentaire, tend à la remplacer. L'intensité du rayonnement des atomes excités par le plasma d'argon à une longueur d'onde particulière à chaque élément permet d'en déterminer la concentration. La spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) est basée sur le même principe, avec une détection par le rapport masse sur charge ( $m/z$ ), grâce à un spectromètre de masse. En raison de l'excellente sensibilité, des faibles limites de détection, de la possibilité de détermination isotopique et du petit volume d'échantillon, l'ICP-MS, à large gamme dynamique, est largement utilisée (57,59). L'utilisation d'un secteur magnétique permet de s'affranchir des interférences isobariques ou polyatomiques liées à la préparation de l'échantillon ou à l'environnement. On parle alors d'ICP-MS haute résolution (ICP-HRMS) (58).

D'autres matrices biologiques que le sang et les urines peuvent être analysées pour le dosage des ET. Les cheveux et les ongles sont des matrices alternatives, qui reflètent l'exposition au long cours aux xénobiotiques (237). En post-mortem, les organes peuvent être analysés lorsque le sang et les urines ne sont pas disponibles ou pour déterminer les cibles des ET et les organes d'accumulation. Il est à noter que chez les sujets décédés, la concentration sanguine de nombreux paramètres biologiques (dont les métaux) peut être modifiée par la libération du contenu cellulaire dans les liquides biologiques, induite par le processus de mort cellulaire (238).

L'analyse directe de ces d'échantillons présente de nombreuses difficultés au niveau de l'introduction de l'échantillon et des interférences dans les mesures. Par conséquent, les échantillons doivent être minéralisés avant l'analyse pour détruire la matière organique (57).

Sans valeurs de référence précises ni consensus établi officiellement chez l'homme, des concentrations usuelles sanguines pour certains ET ont été proposées suite à différentes études

(239,240). Goullé et al. et Cesbron et al. ont rapporté des concentrations d'éléments dans des échantillons de sang total, de plasma, d'urine et de cheveux provenant d'une population de volontaires sains en France (241,242). Heitland et Koster ont rapporté des concentrations de 37 oligo-éléments dans des échantillons de sang provenant d'habitants du nord de l'Allemagne (243) et Schultze et al. ont décrit les concentrations de métaux dans le sang total et le sérum d'individus suédois (244). D'autres auteurs ont publié des concentrations de métaux dans des échantillons de sang, de sérum ou d'urine d'adultes sains vivant à Rome (245) et en Lombardie (246). La définition de valeurs de référence pour les ET est particulièrement délicate car les expositions aux métaux toxiques sont extrêmement variables selon les populations voire au sein d'une même population, et il peut être difficile de définir une population de référence et une stratégie d'échantillonnage adaptée. L'établissement de seuils de toxicité ou de limite supérieure de concentrations semble davantage approprié (247). De plus, quelques données existent concernant les concentrations des métaux dans les tissus et leur répartition dans l'organisme (248–256), mais peu sont récentes et il existe une variabilité selon le sexe, l'âge et l'environnement (257).

Au-delà de l'exposition environnementale, alimentaire ou professionnelle, les ET sont aussi présents dans les dispositifs médicaux implantables utilisés en chirurgie orthopédique. Différents couples de frottement, dur-dur : métallique (MoM) ou en céramique (CoC), ou dur-mou : polyéthylène-métal (PE/Me) peuvent être utilisés. Ils sont composés d'acier inoxydable, d'alliages métalliques en titane (Ti), contenant aussi du vanadium (V), de l'aluminium (Al), du fer (Fe), du niobium (Nb), voire du zirconium (Zr), du tantale (Ta) et de l'hafnium (Hf) ou alors d'alliages de chrome (Cr), cobalt (Co) et nickel (Ni), avec du molybdène (Mo), manganèse (Mn), tungstène (W), fer (Fe) à l'état de trace (26). Les céramiques contiennent des particules d'oxyde d'aluminium et de zirconium  $Al_2O_3$  et  $ZrO_2$ . De nouveaux matériaux céramométalliques, plus résistants, ont fait leur apparition récemment (49).

L'usure, le descellement, la corrosion de la prothèse provoque un relargage des éléments entrant dans sa composition, sous forme de particules (de polyéthylène ou métalliques). Ces ET sont responsables d'une toxicité à l'échelle locale, dans l'environnement péri-prothétique et à l'échelle systémique, par la migration des ET relargués dans le sang circulant (158). C'est pourquoi, le suivi des prothèses MoM est réalisé par le dosage du cobalt sanguin (186). Le suivi des autres types de prothèses : PE/Me et CoC n'est pas indiqué à ce jour, et leur toxicité est très peu évaluée. Quelques publications ont étudié l'élévation des concentrations

sanguines de Cr, Co, Ni, Ti ou Mo chez des sujets porteurs de prothèse PE/Me (161,258–260). Plusieurs cas de révision des prothèses CoC par des implants en PE/Me à l'origine d'une usure abrasive et d'intoxications aux métaux ont été décrits (261–265). Des cardiomyopathies, des hypothyroïdies, une neurotoxicité et des troubles sensori-moteurs ont été rapportés en lien avec l'augmentation de la cobaltémie chez ces cas (178,262,266,267). Il est ainsi déconseillé de réviser une prothèse CoC par une prothèse PE/Me. A notre connaissance, la toxicité systémique et les organes cibles des particules relarguées par les implants PE/Me ont été très peu évalués. Seules quelques revues de littérature répertorient les cas d'intoxication aux métaux suite à une défaillance de prothèse MoM (157,159,268).

Le but de cette étude est d'évaluer la toxicité systémique des prothèses par le dosage des ET dans différentes matrices chez des sujets vivants et morts porteurs de prothèse, en comparaison avec des témoins. Le dosage d'ET chez ces témoins nous a permis de déterminer des valeurs usuelles dans la population générale et les organes cibles des métaux.

## **II. Matériel et méthodes**

### **II.1 Protocole Prometox**

L'étude Prometox visant à « évaluer le retentissement systémique du relargage des éléments traces par les dispositifs médicaux implantables. Identification de biomarqueurs d'inflammation systémique », a pour promoteur l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (code projet : APHP180539, n°IDRCB : 2018-A02780-55). Le protocole est présenté en *Annexe 2*. La recherche a reçu un avis favorable du CPP Est-II le 02/05/2019 (*Annexe 3*).

Les patients hospitalisés pour reprise aseptique de prothèse totale de hanche, de genou, d'épaule et de cheville au sein du service de chirurgie orthopédique des hôpitaux Raymond Poincaré et Ambroise Paré ont été inclus dans l'étude après information éclairée et recueil du consentement (*Annexe 4*). Les prélèvements des sujets autopsiés à l'institut médico-légal de l'hôpital Raymond Poincaré et porteurs de prothèse ont été recueillis dans un cadre médico-légal, sur réquisition judiciaire.

**L'objectif principal** de cette étude est d'évaluer le retentissement systémique du relargage des ET par les DMI métalliques et non métalliques et notamment la réaction immune de l'organisme vis-à-vis de ces ET, leurs organes cibles, et d'identifier des biomarqueurs protéiques circulants susceptibles d'indiquer une évolution inflammatoire d'un DMI.

Les objectifs secondaires sont les suivants :

- Établir les paramètres (moyennes, médianes, écart-type, quantiles) de la distribution des concentrations d'ET chez les sujets non porteurs de DMI (non porteurs de prothèse) dans différentes matrices (sang, cheveux, urine, viscères)
- Établir les paramètres (moyennes, médianes, écart-type, quantiles) de la distribution des concentrations de ces métaux dans ces matrices chez des sujets porteurs de DMI sains et inflammatoires.

**Les critères d'inclusion** sont :

- Patients majeurs hospitalisés pour reprise de : prothèse de hanche à couple de frottement en CoC, MoM ou PE/Me, prothèse de genou, de cheville et d'épaule (PE/Me)
- Patients majeurs autopsiés porteurs et non porteurs de DMI
- Affiliation à un régime d'Assurance-Maladie ou ayant-droit.

Les critères de non-inclusion sont :

- Infection à l'origine de la reprise de prothèse
- Exposition professionnelle aux métaux
- Patient sous tutelle, sous curatelle, sous sauvegarde de justice, mineur.

Des échantillons d'urine (monovette 10 mL), de sang (tube hépariné à bouchon bleu marine 5 mL et tube Ficoll de 5 mL) et de cheveux (une mèche de diamètre environ égale à 0,5 cm, orientée, de toute la longueur) ont été prélevés en début d'hospitalisation. Le tissu péri-prothétique (environ 1 cm<sup>3</sup>) et liquide synovial (1 mL) ont été prélevés lors de l'intervention chirurgicale dans des tubes spécifiques à l'analyse élémentaire (tubes metal free®, Labcon (Petaluma, Californie)). Des échantillons d'urine (monovette 10 mL) et de sang (tube hépariné à bouchon bleu marine 5 mL) ont été prélevés en fin d'hospitalisation (3 jours post opératoires). Un questionnaire a été remis aux patients hospitalisés lors de l'inclusion, afin de recueillir les données concernant la prothèse (date de pose, opérations de reprise, présence d'autres prothèses), la présence d'implant dentaire, le statut tabagique et l'exposition aux métaux.

Chez les sujets décédés, ont également été utilisés les résultats des examens réalisés sur les prélèvements des 6 viscères (cerveau, cœur, foie, poumon, rate et rein) effectués dans un cadre médico-légal, dans des tubes spécifiques à l'analyse élémentaire. L'analyse toxicologique a été effectuée en plasma induit couplé à un spectromètre de masse (ICP-MS)

haute résolution. Un prélèvement de sang sur Ficoll a été réalisé chez tous les patients vivants afin d'isoler les cellules mononucléées circulantes (macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes T et B) en cytométrie de flux. L'analyse du sang préopératoire en Elisa multiplex (Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Screening Panel, 27-plex) a permis de déterminer la présence de protéines circulantes dirigées contre les ET, afin de définir un (des) biomarqueur(s) d'une hyper-activation cellulaire liée à la libération de particules de la prothèse (TNF, IFN, cytokines, chémokines, métalloprotéines...).

## II.2 Analyse en ICP-MS

Les échantillons de sang, urine, cheveux (segment proximal de 3 cm), viscères et prélèvements péri prothétiques (tissu et liquide synovial) des sujets de l'étude Prometox ont été analysés en suivant la méthode mise au point et validée pour 38 ET, décrite dans la partie 1 de ce manuscrit (269). Le dosage de l'aluminium a été ajouté *a posteriori*. Les cheveux ont été lavés au TritonX100 0,1 %, suivi de trois rinçages à l'eau désionisée et d'un lavage à l'acétone, pour éliminer les contaminations externes. 10 mg de cheveux lavés, 30 mg de tissu frais (cerveau, cœur, foie, poumon, rate, rein, tissu péri-prothétique) ainsi que 200 µL de sang, d'urine et de liquide synovial ont été minéralisés au four à micro-ondes UltraWave® (Milestone, Sorisole, Italy). Les échantillons minéralisés ont ensuite été analysés en ICP-MS Element XR (ThermoFisher, Les Ulis, France). 39 éléments traces ont été dosés : aluminium (Al), antimoine (Sb), argent (Ag), arsenic (As), baryum (Ba), béryllium (Be), bismuth (Bi), cadmium (Cd), cérium (Ce), césium (Cs), chrome (Cr), cobalt (Co), cuivre (Cu), étain (Sn), fer (Fe), germanium (Ge), hafnium (Hf), lanthane (La), manganèse (Mn), mercure (Hg), molybdène (Mo), nickel (Ni), or (Au), palladium (Pd), platine (Pt), plomb (Pb), rubidium (Rb), ruthénium (Ru), sélénium (Se), strontium (Sr), tellure (Te), thallium (Tl), thorium (Th), titane (Ti), tungstène (W), uranium (U), vanadium (V), zinc (Zn), zirconium (Zr).

Les analyses ont été effectuées avec des contrôles de qualité (CQ) sang, urines et cheveux du Centre de Toxicologie du Québec (Québec, Canada) pour les éléments disponibles. Trois niveaux de CQ internes ont été réalisés pour les ET manquants. De plus, le programme de contrôles de qualité (EEQ) de l'Occupational and Environmental Laboratory Medicine (OELM) a été suivi mensuellement.

### II.3 Analyse statistique

L'analyse statistique a été effectuée au sein de l'Unité de Recherche Clinique Paris Saclay Ouest, Hôpital Ambroise Paré en utilisant le logiciel R (R version 3.4.4 (2018-03-15)), au terme de la période de suivi de l'ensemble des patients et après gel de la base de données. Le rapport a été généré en utilisant les logiciels R et LATEX. Les tables et figures sont générées automatiquement avec Sweave 1 en utilisant les données extraites de l'e-CRF (cahier d'observation électronique). Le statut des patients et le statut vital ont été présentés à l'aide d'un diagramme de flux.

Les données quantitatives ont été décrites par leurs paramètres de position centrale (moyenne, médiane) et de dispersion (écart-type et écart interquartile) tandis que les données qualitatives ont été décrites par leur distribution de fréquence (proportion, intervalle de confiance à 95 %).

Les données d'inclusion et les résultats d'analyse d'ET ont été décrits et comparés par groupe (prothèse et absence de prothèse). Chez tous les sujets (vivants et autopsiés), la concentration des ET a été comparée selon les différents groupes (patient versus témoin) et les différentes matrices. Chez les sujets vivants, les concentrations de cytokines ont aussi été comparées par population d'étude (patient versus témoin).

La comparaison des variables qualitatives a été faite en utilisant le test de chi-2 (ou de Fischer si les conditions nécessaires pour le test de chi-2 n'étaient pas respectées), tandis que les variables quantitatives ont été comparées en utilisant le test t de Student (ou le test de Wilcoxon si les conditions de normalité et/ou d'égalité de variance n'étaient pas respectées). Les p-values inférieures à 0,05 sont considérées comme significatives.

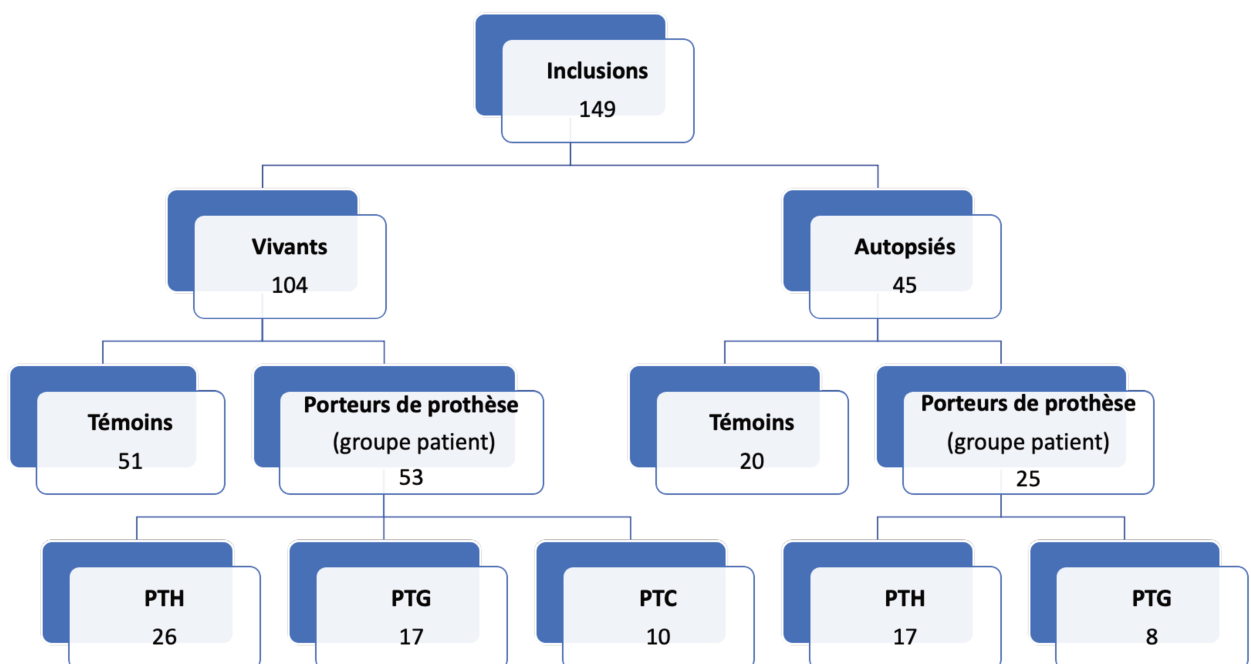
L'influence des covariables (sexe, tabac, implant dentaire et présence d'autre prothèse) sur le taux d'ET a été réalisée par moyen de modèles linéaires. Si nécessaire, une transformation (log ou autre) des concentrations a été faite afin d'améliorer le respect des hypothèses des modèles statistiques utilisés. Les variables d'ajustement : sexe, tabac et implant dentaire pour lesquelles la p-value était inférieure à 0,2 en analyse bivariée, ont été retenues pour les modèles multivariés. Le modèle final a été établi suite à une sélection de variables de manière ascendante, commençant par la variable avec la plus petite p-value.

### III. Résultats

#### III.1 Population d'étude

Au total, 149 individus ont participé à l'étude Prometox, 75 hommes et 74 femmes, avec une moyenne d'âge de 65 ans. 53 patients vivants et 25 patients morts ont été inclus sur 17 mois. 51 témoins vivants et 20 témoins morts ont été prélevés. Parmi les 51 témoins vivants, 23 possèdent une autre prothèse (non inflammée), et ont été analysés différemment des autres témoins dans un second temps. Aucune différence n'a été constatée entre ces deux groupes. Nous avons donc finalement décidé arbitrairement de les rassembler pour former un groupe plus important. Le détail de la répartition de la population des patients vivants et morts est présenté dans la *Figure 5*. Les PTG et PTC sont toutes à couple de frottement PE/Me. Les PTH des sujets vivants sont majoritairement PE/Me. Quatre sujets porteurs de PTH CoC et un sujet porteur de PTH MoM ont été inclus, nombre insuffisant pour constituer un groupe significatif. L'information concernant la composition des PTH des sujets autopsiés n'a pas été obtenue.

Parmi les vivants, 9 patients et 12 témoins possèdent au moins un implant dentaire, 8 patients et 7 témoins sont fumeurs et 13 patients et 14 témoins ex-fumeurs (> 10 ans majoritairement). Le *Tableau 4* résume les caractéristiques des populations d'étude.



*Figure 5 – Répartition de la population de l'étude Prometox : sujets vivants et morts, porteurs de prothèse et témoins, selon le type de prothèse (PTH, PTG, PTC)*

Tableau 4 - Caractéristiques de la population de l'étude Prometox

Caractéristiques		Population globale	Vivants	Autopsiés
Âge (ans)	moyenne	65,6	66,8	62,5
	min-max	18-96	27-87	18-96
Nombre d'hommes		75	49	26
Taille (cm)	moyenne	169	169	169
	min-max	147-191	147-191	151-189
Poids (kg)	moyenne	78	79	76
	min-max	36-130	46-130	36-122
Fumeur		23	15 (et 27 ex-fumeurs)	8
Implant dentaire		31	21	10

### III.2 Analyse en ICP-MS des ET

Les concentrations de 39 ET ont été mesurées dans diverses matrices (sang, urine, cerveau, cheveux, cœur, foie, poumons, rate, reins) de la population générale et dans une population de porteurs de prothèse. Ainsi, il a été possible de comparer ces deux populations, d'émettre des valeurs de concentrations d'ET dans la population française dans les années 2020 (non exposée aux métaux) et d'étudier le relargage des ET par les DMI. L'impact du tabagisme, de la présence d'implant dentaire et d'autre(s) prothèse(s), du sexe et de l'exposition professionnelle a été évalué.

Les médianes des concentrations sanguines, urinaires et capillaires des sujets non porteurs de prothèse (vivants et morts) sont rapportées dans le *Tableau 5*, afin d'établir des valeurs de référence des ET et de comparer les résultats des vivants et des morts. Beaucoup d'ET sont significativement différents dans les matrices étudiées (sang, urine, cheveux). Certains ET sont augmentés (Ba, Cd, Cs, Co, La, Mn, Hg, Ni, Tl, V), d'autres diminués (Al, Sb, As, Be, Cu, Sn, Ge, Ru, Se, Te, Zr) dans le sang des individus morts. Ces résultats sont confirmés pour le Be, Cd, Ge, Mn, Ni, Ru, Se, Te, V et Zr dans les cheveux et pour le Sb, As, Be, Ge, Mn, Ru, Se, Te, V, Zr dans les urines.



Il a aussi été possible d'étudier la répartition des ET dans les organes (cerveau, cœur, foie, poumons, rate, reins) de 20 individus autopsiés non porteurs de prothèse (*Tableau 6*). L'Al, Cr, Sb, La, Ni, Sr, Ti, V et Zr semblent s'accumuler dans les poumons. Les concentrations de Co, Fe, La, Mn, Mo, Pb et Zn sont plus élevées dans le foie. Le Fe est aussi particulièrement présent dans la rate. Les concentrations de Cd, Hg, Mo, Se et Tl sont plus élevées dans les reins que dans les autres organes analysés. Plusieurs éléments sont proches ou inférieurs à la limite de quantification de notre méthode : Sb, Ag, As, Be, Pd, Pt, Ru, Te, Tl, Th, U.

Les concentrations d'ET significativement différentes ( $p$ -value < 0,05) pour au moins une des matrices des patients vivants porteurs de prothèse et des témoins de l'étude Prometox figurent dans le *Tableau 7*. Celles des patients décédés sont rapportées dans le *Tableau 8*. Chez les vivants, le Sb, Ba, Be, Cs, Cr, Co, Fe, La, Mn, Mo, Ni, Ru, Te, Ti, V, W et Zr sont significativement impactés dans au moins une matrice des porteurs de prothèse. Chez les morts, on retrouve le Be, Cr, Co, Fe, La, Mo, Ni, Te et Ti. Le *Tableau 9* permet de visualiser les différences significatives d'ET entre les deux populations (témoins et porteurs de prothèse) chez les vivants et les sujets décédés.

L'analyse de la covariable « présence d'une autre prothèse » ne donne pas de résultats significativement différents du groupe témoin sans autre DMI. L'impact des autres covariables (sexe, tabagisme, implant dentaire) a été étudié pour les ET significativement différents entre les deux groupes. La présence d'implant dentaire est responsable d'une augmentation de Ti dans les urines à l'entrée d'hospitalisation. Les cheveux sont la seule matrice impactée par le sexe, pour le Cs, Be, Ru (plus élevé chez les hommes) et le Ni et Ba (moins élevé chez les hommes).

Tableau 5 - Comparaison des concentrations (médianes, écarts interquartiles) des 39 ET ( $\mu\text{g/L}$ ) dans le sang, les urines et les cheveux de la population témoin vivante ( $n=51$ ) et autopsiée ( $n=20$ ) de l'étude Prometox

« +/- » signifie augmentation/diminution significative ( $p\text{-value} < 0,05$ ) dans la population autopsiée porteuse de prothèse par rapport à la population vivante.

ND= non détecté

ET	Sang			Urines			Cheveux		
	Morts	Vivants	p-value	Morts	Vivants	p-value	Morts	Vivants	p-value
<b>Al</b>	ND	3,20 [0,0;16,07]	0,002 -	ND	3,61 [0,0;11,91]	0,094	3,38 [2,12;4,16]	2,15 [0,87;4,77]	0,197
<b>Sb</b>	ND	6,11 [4,94;7,02]	<0,0001 -	ND	4,31 [3,42;4,97]	<0,0001 -	0,028 [0,012;0,07]	0,012 [0,006;0,022]	0,01 +
<b>Ag</b>	ND	ND		ND	ND		0,030 [0,006;0,13]	0,037 [0,010;0,092]	1,000
<b>As</b>	ND	3,42 [0,84;7,37]	<0,0001 -	0,31 [0,005; 4,54]	17,39 [8,15;90,66]	<0,0001 -	ND	ND	
<b>Ba</b>	2,41 [0,68;2,99]	ND	<0,0001 +	3,27 [0,00;5,54]	0,89 [0,037;3,02]	0,303	0,39 [0,25;0,60]	0,18 [0,05;0,51]	0,094
<b>Be</b>	0,046 [0,020;0,062]	0,18 [0,12;0,28]	<0,0001 -	0,034 [0,000;0,054]	0,31 [0,22;0,43]	<0,0001 -	0,001 [0,001;0,001]	0,004 [0,003;0,009]	<0,0001 -
<b>Bi</b>	0,47 [0,00;1,01]	0,44 [0,0;0,78]	0,618	0,20 [0,0;0,46]	0,28 [0,0;0,90]	0,574	0,016 [0,007;0,039]	0,018 [0,005;0,032]	0,637
<b>Cd</b>	30,11 [3,12;85,88]	0,88 [0,00; 1,77]	<0,0001 +	2,96 [0,074;7,11]	0,71 [0,00;2,55]	0,068	0,020 [0,01;0,063]	0,004 [0,00;0,016]	<0,0001 +
<b>Ce</b>	0,62 [0,54;0,73]	0,62 [0,59;0,65]	0,974	0,56 [0,13;0,65]	0,63 [0,61;0,65]	0,137	0,016 [0,012;0,022]	0,014 [0,010;0,020]	0,331
<b>Cs</b>	9,02 [7,52;11,43]	6,64 [5,53; 8,21]	0,015 +	12,65 [0,72;13,78]	10,54 [6,58;13,23]	0,835	0,038 [0,029;0,045]	0,058 [0,042;0,083]	<0,0001 -
<b>Cr</b>	0,003 [0,0;1,60]	0,24 [0,0;1,39]	0,918	0,024 [0,002;1,75]	0,60 [0,00;1,49]	0,525	0,12 [0,086;0,18]	0,073 [0,010;0,39]	0,404

<b>Co</b>	0,42 [0,27;0,68]	0,23 [0,12;0,43]	0,049 +	0,45 [0,014;0,61]	0,31 [0,11;1,00]	0,992	0,024 [0,012;0,034]	0,032 [0,009;0,074]	0,510
<b>Cu</b>	736,84 [618,74;799,79]	815,65 [764,85;916,08]	0,006 -	0,038 [0,0;58,64]	ND	0,004 +	12,16 [9,77;15,38]	10,28 [8,22;14,44]	0,171
<b>Sn</b>	0,22 [0,00;0,67]	0,86 [0,41;1,19]	0,006 -	0,26 [0,024;0,65]	0,69 [0,32;1,17]	0,099	0,069 [0,032;0,19]	0,088 [0,051;0,29]	0,164
<b>Fe</b>	153881 [69878;189280]	165781 [142885;182188]	0,320	483,35 [29,65;725]	564,40 [0,00;766,10]	0,575	9,29 [5,81;15,71]	13,55 [7,05;20,93]	0,271
<b>Ge</b>	15,97 [12,79;22,72]	23,42 [13,34;39,53]	0,021 -	0,73 [0,001; 2,79]	22,72 [8,43;34,38]	<0,0001 -	0,027 [0,01;0,06]	0,36 [0,12;0,77]	<0,0001 -
<b>Hf</b>	0,81 [0,0;0,85]	0,84 [0,0;0,93]	0,115	0,40 [0,0;0,82]	0,83 [0,0;1,68]	0,059	0,009 [0,0;0,013]	0,012 [0,0;0,022]	0,106
<b>La</b>	0,24 [0,077;0,42]	0,092 [0,016;0,20]	0,044 +	0,11 [0,0;0,21]	0,088 [0,005;0,17]	1,000	0,007 [0,004;0,010]	0,008 [0,005;0,016]	0,239
<b>Mn</b>	26,39 [10,29;45,35]	5,27 [ 3,02; 7,67]	<0,0001 +	5,20 [0,006;10,68]	ND	<0,0001 +	0,23 [0,099;0,42]	0,059 [0,00;0,18]	0,02 +
<b>Hg</b>	2,61 [0,66;5,77]	0,95 [0,00;2,63]	0,024 +	0,46 [0,001;1,23]	ND	0,083	0,60 [0,30;0,89]	0,55 [0,33;1,00]	0,994
<b>Mo</b>	15,37 [6,83;22,90]	10,81 [5,89;15,64]	0,255	11,58 [0,50;19,33]	42,07 [25,36;66,25]	<0,0001 -	0,058 [0,048;0,099]	0,20 [0,074;0,38]	0,009 -
<b>Ni</b>	1,16 [0,19;2,82]	0,001 [0,00;1,63]	0,027 +	0,87 [0,0;2,41]	0,00 [0,0;3,250]	0,813	0,16 [0,081;0,29]	0,084 [0,00;0,16]	0,033 +
<b>Au</b>	0,56 [0,44;0,77]	ND	0,531	0,50 [0,10;0,75]	0,51 [0,031;2,38]	0,349	0,012 [0,008;0,016]	0,038 [0,007;0,054]	0,022 -
<b>Pd</b>	ND	ND		ND	ND		ND	ND	
<b>Pt</b>	ND	ND		ND	ND		ND	ND	
<b>Pb</b>	16,95 [4,34;32,60]	26,57 [16,07;38,21]	0,095	ND	4,84 [3,90;6,85]	<0,0001 -	0,41 [0,22;1,62]	0,44 [0,24;0,96]	0,885
<b>Rb</b>	1440,69 [974,18;1818,43]	1626,34 [1381,1;1919,34]	0,07	1400,70 [4,45;1679,67]	1497,00 [910,59;2057,79]	0,157	0,092 [0,045;0,23]	0,22 [0,16;0,35]	0,004 -
<b>Ru</b>	0,023 [0,014;0,032]	0,40 [0,25;0,65]	0 -	0,042 [0,006;0,06]	0,81 [0,57;1,25]	<0,0001 -	0,001 [0,00;0,001]	0,014 [0,01;0,024]	<0,0001 -

<b>Se</b>	113,97 [90,18;144,41]	193,23 [170,88;228,11]	<0,0001 -	0,078 [0,019;22,51]	45,59 [25,73;66,41]	0,001 -	0,21 [0,007;0,39]	0,52 [0,22;0,99]	0,014 -
<b>Sr</b>	24,21 [8,84;52,39]	29,40 [19,76;44,65]	0,353	61,24 [0,67;110,26]	139,30 [88,77;370,16]	0,003 -	1,70 [1,09;4,29]	1,60 [0,60;3,30]	0,442
<b>Te</b>	0,29 [0,20;0,54]	2,05 [1,35;3,078]	<0,0001 -	0,30 [0,004;0,48]	1,78 [1,29;2,79]	<0,0001 -	0,001 [0,001;0,002]	0,022 [0,014;0,036]	<0,0001 -
<b>Tl</b>	0,084 [0,068;0,095]	0,004 [0,000;0,020]	<0,0001 +	0,044 [0,002;0,09]	0,13 [0,076;0,19]	0,032 -	ND	ND	
<b>Th</b>	ND	ND		ND	ND		ND	ND	
<b>Ti</b>	1,15 [0,001;3,71]	1,84 [0,82;4,85]	0,306	2,67 [0,58;3,93]	2,20 [0,86;4,71]	0,895	0,99 [0,43;1,68]	0,57 [0,35;0,94]	0,182
<b>W</b>	0,16 [0,15;0,18]	0,17 [0,13;0,23]	0,37	0,20 [0,036;0,25]	0,23 [0,17;0,29]	0,135	0,006 [0,003;0,007]	0,006 [0,003;0,009]	0,435
<b>U</b>	0,001 [0,0;0,032]	0,005 [0,0;0,007]	0,534	ND	0,037 [0,028;0,044]	<0,0001 -	0,012 [0,006;0,024]	0,018 [0,011;0,028]	0,207
<b>V</b>	0,003 [0,0;0,21]	ND	0,021 +	0,27 [0,001;0,65]	ND	0,001 +	0,010 [0,006;0,019]	0,002 [0,000;0,009]	<0,0001 +
<b>Zn</b>	6901,76 [4814,2;11638,8]	6327,40 [5911,3; 7234,4]	0,269	107,47 [1,43;5302,29]	215,92 [78,62; 463,47]	0,769	150,38 [132,72;158,41]	171,39 [149,65;192,22]	0,011 -
<b>Zr</b>	0,026 [0,000;0,10]	0,54 [0,14;1,82]	<0,0001 -	0,008 [0,000;0,054]	0,55 [0,19;1,95]	<0,0001 -	0,005 [0,003;0,011]	0,042 [0,013;0,13]	<0,0001 -

Tableau 6 - Concentrations des 39 ET (médianes, écarts interquartiles) (en µg/L) dans le sang, les urines, les cheveux et les organes (cerveau, cœur, foie, poumons, rate, reins) de la population témoin autopsiée (n=20) de l'étude Prometox

ET	Sang	Urines	Cheveux	Cerveau	Cœur	Foie	Poumons	Rate	Reins
Al	ND	ND	3,38 [2,12;4,16]	ND	0,074 [0,02;0,13]	0,086 [0,015;0,14]	4,00 [1,99;8,26]	0,11 [0,044;0,20]	0,046 [0,007;0,21]
Sb	ND	ND	0,028 [0,012;0,07]	ND	ND	ND	0,003 [0,001;0,004]	ND	ND
Ag	ND	ND	0,030 [0,006;0,13]	0,001 [0,0;0,002]	ND	0,001 [0,0;0,003]	ND	ND	ND
As	ND	0,31 [0,005; 4,54]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ba	2,41 [0,68;2,99]	3,27 [0,00;5,54]	0,39 [0,25;0,60]	0,003 [0,0;0,008]	0,012 [0,001;0,017]	0,007 [0,0;0,012]	0,046 [0,035;0,091]	0,014 [0,003;0,022]	0,01 [0,001;0,016]
Be	0,046 [0,020;0,062]	0,034 [0,000;0,054]	0,001 [0,001;0,001]	ND	ND	0,001 [0,000;0,001]	0,001 [0,000;0,001]	ND	ND
Bi	0,47 [0,00;1,01]	0,20 [0,0;0,46]	0,016 [0,007;0,039]	0,003 [0,002;0,010]	0,003 [0,003;0,005]	0,003 [0,003;0,008]	0,004 [0,003;0,009]	0,004 [0,003;0,006]	0,004 [0,002;0,006]
Cd	30,11 [3,12;85,88]	2,96 [0,074;7,11]	0,020 [0,01;0,063]	0,023 [0,011;0,035]	0,020 [0,011;0,031]	0,82 [0,35;1,34]	0,065 [0,02;0,20]	0,076 [0,053;0,13]	9,83 [6,50;15,31]
Ce	0,62 [0,54;0,73]	0,56 [0,13;0,65]	0,016 [0,012;0,022]	0,004 [0,004;0,005]	0,005 [0,004;0,005]	0,029 [0,017;0,054]	0,032 [0,018;0,055]	0,005 [0,004;0,006]	0,005 [0,004;0,007]
Cs	9,02 [7,52;11,43]	12,65 [0,72;13,78]	0,038 [0,029;0,045]	0,025 [0,024;0,028]	0,028 [0,027;0,031]	0,028 [0,027;0,031]	0,025 [0,023;0,027]	0,027 [0,025;0,031]	0,031 [0,026;0,034]
Cr	0,003 [0,0;1,60]	0,024 [0,002;1,75]	0,12 [0,086;0,18]	0,006 [0,0;0,017]	0,009 [0,002;0,018]	0,010 [0,0;0,019]	0,055 [0,024;0,12]	0,012 [0,002;0,020]	0,005 [0,0;0,015]
Co	0,42 [0,27;0,68]	0,45 [0,014;0,61]	0,024 [0,012;0,034]	0,004 [0,003;0,005]	0,013 [0,012;0,017]	0,041 [0,035;0,051]	0,025 [0,011;0,033]	0,009 [0,006;0,012]	0,012 [0,010;0,014]
Cu	736,84 [618,74;799,79]	0,038 [0,0;58,64]	12,16 [9,77;15,38]	3,75 [2,52;4,51]	3,43 [3,15;3,78]	5,71 [3,70;7,96]	0,76 [0,38;0,95]	0,79 [0,55;0,92]	1,76 [1,56;2,08]
Sn	0,22 [0,00;0,67]	0,26 [0,024;0,65]	0,069 [0,032;0,19]	0,007 [0,003;0,025]	ND	0,053 [0,018;0,095]	0,089 [0,036;0,20]	0,089 [0,024;0,24]	0,026 [0,013;0,048]
Fe	153881 [ 69877,5;189280]	483,35 [29,65;725]	9,29 [5,81;15,71]	45,60 [26,61;66,10]	39,51 [32,38;45,38]	103,00 [88,94;132,39]	94,16 [82,74;105,95]	133,09 [104,88;146,75]	61,45 [45,60;84,14]

<b>ET</b>	<b>Sang</b>	<b>Urines</b>	<b>Cheveux</b>	<b>Cerveau</b>	<b>Cœur</b>	<b>Foie</b>	<b>Poumons</b>	<b>Rate</b>	<b>Reins</b>
<b>Ge</b>	15,97 [12,79;22,72]	0,73 [0,001; 2,79]	0,027 [0,01;0,06]	0,014 [0,007;0,018]	0,012 [0,008;0,026]	0,024 [0,012;0,030]	0,022 [0,011;0,024]	0,025 [0,019;0,031]	0,02 [0,008;0,028]
<b>Hf</b>	0,81 [0,0;0,85]	0,40 [0,0;0,82]	0,009 [0,0;0,013]	0,005 [0,0;0,006]	0,005 [0,0;0,005]	0,005 [0,0;0,006]	0,005 [0,0;0,005]	0,005 [0,0;0,005]	0,005 [0,0;0,005]
<b>La</b>	0,24 [0,077;0,42]	0,11 [0,0;0,21]	0,007 [0,004;0,010]	0,001 [0,0;0,001]	0,001 [0,001;0,002]	0,016 [0,011;0,032]	0,015 [0,007;0,025]	0,001 [0,000;0,002]	0,001 [0,001;0,002]
<b>Mn</b>	26,39 [10,29;45,35]	5,20 [0,006;10,68]	0,23 [0,099;0,42]	0,29 [0,17;0,38]	0,21 [0,15;0,23]	1,40 [0,95;1,84]	0,097 [0,075;0,13]	0,13 [0,12;0,18]	0,88 [0,69;1,14]
<b>Hg</b>	2,61 [0,66;5,77]	0,46 [0,001;1,23]	0,60 [0,30;0,89]	0,007 [0,004;0,011]	0,009 [0,006;0,015]	0,069 [0,024;0,12]	0,003 [0,002;0,006]	0,004 [0,002;0,008]	0,11 [0,05;0,16]
<b>Mo</b>	15,37 [6,83;22,90]	11,58 [0,50;19,33]	0,058 [0,048;0,099]	0,045 [0,036;0,095]	0,042 [0,038;0,055]	0,75 [0,60;1,04]	0,031 [0,025;0,061]	0,034 [0,029;0,040]	0,28 [0,25;0,36]
<b>Ni</b>	1,16 [0,19;2,82]	0,87 [0,0;2,41]	0,16 [0,081;0,29]	0,009 [0,001;0,021]	0,002 [0,000;0,01]	0,005 [0,000;0,017]	0,017 [0,008;0,039]	0,006 [0,002;0,017]	0,006 [0,002;0,014]
<b>Au</b>	0,56 [0,44;0,77]	0,50 [0,10;0,75]	0,012 [0,008;0,016]	0,003 [0,003;0,005]	0,004 [0,003;0,005]	0,003 [0,003;0,005]	0,004 [0,003;0,005]	0,003 [0,002;0,004]	0,004 [0,003;0,005]
<b>Pd</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Pt</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Pb</b>	16,95 [4,34;32,60]	ND	0,41 [0,22;1,62]	ND	ND	0,036 [0,01;0,10]	ND	ND	ND
<b>Rb</b>	1440,69 [974,18;1818,43]	1400,70 [4,45;1679,67]	0,092 [0,045;0,23]	2,01 [1,75;2,71]	2,03 [1,70;2,83]	3,50 [2,68;4,88]	1,50 [1,04;1,88]	2,59 [2,17;3,35]	2,03 [1,85;2,47]
<b>Ru</b>	0,023 [0,014;0,032]	0,042 [0,006;0,06]	0,001 [0,00;0,001]	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Se</b>	113,97 [90,18;144,41]	0,078 [0,019;22,51]	0,21 [0,007;0,39]	ND	0,031 [0,0;0,18]	0,23 [0,15;0,37]	ND	0,11 [0,0;0,24]	0,82 [0,63;0,93]
<b>Sr</b>	24,21 [8,84;52,39]	61,24 [0,67;110,26]	1,70 [1,09;4,29]	0,042 [0,023;0,087]	0,16 [0,11;0,20]	0,07 [0,033;0,13]	0,33 [0,23;0,49]	0,14 [0,11;0,18]	0,15 [0,11;0,22]
<b>Te</b>	0,29 [0,20;0,54]	0,30 [0,004;0,48]	0,001 [0,001;0,002]	ND	ND	ND	ND	ND	ND

<b>ET</b>	<b>Sang</b>	<b>Urines</b>	<b>Cheveux</b>	<b>Cerveau</b>	<b>Cœur</b>	<b>Foie</b>	<b>Poumons</b>	<b>Rate</b>	<b>Reins</b>
<b>Tl</b>	0,084 [0,068;0,095]	0,044 [0,002;0,09]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,001 [0,001;0,001]
<b>Th</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Ti</b>	1,15 [0,001;3,71]	2,67 [0,58;3,93]	0,99 [0,43;1,68]	0,018 [0,013;0,093]	0,025 [0,011;0,049]	0,027 [0,014;0,046]	0,46 [0,23;0,85]	0,049 [0,022;0,073]	0,017 [0,011;0,048]
<b>W</b>	0,16 [0,15;0,18]	0,20 [0,036;0,25]	0,006 [0,003;0,007]	0,001 [0,001;0,002]	0,001 [0,001;0,001]	0,001 [0,001;0,002]	0,003 [0,001;0,004]	0,001 [0,001;0,003]	0,001 [0,001;0,002]
<b>U</b>	0,001 [0,0;0,032]	ND	0,012 [0,006;0,024]	ND	ND	ND	0,001 [0,000;0,001]	ND	0,001 [0,0;0,001]
<b>V</b>	0,003 [0,0;0,21]	0,27 [0,001;0,65]	0,010 [0,006;0,019]	0,001 [0,0;0,004]	0,001 [0,0;0,004]	0,004 [0,002;0,006]	0,008 [0,004;0,013]	0,001 [0,0;0,003]	0,002 [0,001;0,005]
<b>Zn</b>	6901,76 [4814,18;11638,77]	107,47 [1,43;5302,29]	150,38 [132,72;158,41]	9,05 [8,26;10,33]	20,43 [18,64;24,90]	45,46 [36,11;54,92]	8,45 [4,61;10,32]	12,79 [11,84;14,40]	30,64 [23,98;32,04]
<b>Zr</b>	0,026 [0,000;0,100]	0,008 [0,000;0,054]	0,005 [0,003;0,011]	ND	ND	ND	0,005 [0,002;0,009]	0,002 [0,0;0,003]	0,001 [0,0;0,001]

ND= non détecté

Tableau 7- Comparaison des concentrations (médianes, écarts interquartiles) des ET ( $\mu\text{g/L}$ ) significativement différents ( $p\text{-value} < 0,05$ ), entre les témoins vivants et les patients porteurs de prothèse dans le sang et les urines à l'entrée et à la sortie d'hospitalisation, les cheveux, le tissu péri-prothétique, le liquide synovial : Sb, Ba, Be, Cs, Cr, Co, Fe, La, Mn, Mo, Ni, Ru, Te, Ti, W, V, Zr.

ET	Sang entrée			Sang sortie			Urines entrée			Urines sortie		
	Témoins	Patients	p-value	Témoins	Patients	p-value	Témoins	Patients	p-value	Témoins	Patients	p-value
<b>Sb</b>	6,11 [4,94;7,02]	5,40 [4,69;7,31]	0,383	6,99 [5,43;9,01]	6,59 [5,47;9,95]	0,814	4,31 [3,42;4,97]	3,82 [2,66;4,83]	0,114	4,74 [3,80;5,72]	3,91 [3,09;5,42]	0,086
<b>Ba</b>	ND	1,15 [0,013;1,90]	0,006	0,52 [0,0;0,98]	1,32 [0,0;2,54]	0,034	0,89 [0,037;3,02]	3,22 [1,11;5,29]	<0,0001	0,69 [0,0;2,18]	2,61 [1,45;4,75]	<0,0001
<b>Be</b>	0,18 [0,12;0,28]	0,084 [0,055;0,13]	<0,0001	0,26 [0,20;0,38]	0,11 [0,08;0,19]	<0,0001	0,31 [0,22;0,43]	0,13 [0,084;0,22]	<0,0001	0,28 [0,22;0,40]	0,13 [0,081;0,24]	<0,0001
<b>Cs</b>	6,64 [5,53;8,21]	5,27 [4,45;6,12]	<0,0001	5,99 [5,04;7,43]	4,86 [4,28;6,22]	0,003	10,54 [6,58;13,23]	8,51 [5,84;11,27]	0,093	11,62 [8,59;18,97]	9,58 [6,57;11,47]	0,008
<b>Cr</b>	0,24 [0,0;1,39]	ND	0,773	0,69 [0,0;1,92]	0,71 [0,0;4,03]	0,399	0,60 [0,0;1,49]	ND	0,977	0,14 [0,0;1,74]	0,36 [0,0;3,24]	0,631
<b>Co</b>	0,23 [0,12;0,43]	0,57 [0,18;1,52]	0,005	0,26 [0,12;0,61]	0,59 [0,31;1,50]	0,002	0,31 [0,11;1,00]	1,11 [0,38;2,77]	<0,0001	0,62 [0,27;1,68]	1,46 [0,44;2,45]	0,022
<b>Fe</b>	165781 [142885;182188]	152867 [133745;229176]	0,766	136440 [121047;155860]	133898 [121193;177082]	0,772	564,4 [0,0;766,10]	927,0 [59,93;1071,68]	0,004	415,30 [13,30;836,10]	923,55 [48,83;1077,0]	0,023
<b>La</b>	0,092 [0,016;0,20]	0,025 [0,0;0,21]	0,091	0,097 [0,003;0,19]	0,001 [0,000;0,205]	0,198	0,088 [0,005;0,17]	0,039 [0,0;0,15]	0,176	0,089 [0,014;0,19]	ND	0,083
<b>Mn</b>	5,27 [3,02;7,67]	6,66 [5,27;7,70]	0,038	5,05 [2,56;7,14]	5,23 [3,78;7,78]	0,254	ND	ND		ND	0,008 [0,0;1,05]	0,239
<b>Mo</b>	10,81 [5,89;15,64]	5,65 [0,0;11,86]	0,003	16,74 [12,03;21,61]	11,11 [3,82;18,44]	0,016	42,07 [25,36;66,25]	26,50 [10,65;72,22]	0,13	19,50 [13,69;29,02]	16,86 [3,40;25,36]	0,141
<b>Ni</b>	0,001 [0,0;1,63]	1,63 [0,0;3,87]	0,025	0,001 [0,0;1,61]	1,54 [0,0;4,15]	0,043	0,001 [0,0;3,25]	2,0 [0,0;4,06]	0,009	0,50 [0,0;3,73]	2,69 [0,59;5,08]	0,005
<b>Ru</b>	0,40 [0,25;0,65]	0,21 [0,085;0,41]	<0,0001	1,19 [0,73;1,66]	0,59 [0,31;1,07]	0,001	0,81 [0,57;1,25]	0,46 [0,26;0,99]	0,002	1,21 [0,76;1,76]	0,65 [0,29;1,07]	<0,0001
<b>Te</b>	2,05 [1,35;3,08]	0,76 [0,30;1,98]	<0,0001	3,23 [1,71;4,23]	1,59 [1,07;2,59]	0,009	1,78 [1,29;2,79]	1,54 [0,70;2,76]	0,212	2,27 [1,64;3,36]	1,44 [0,70;2,55]	0,007
<b>Ti</b>	1,84 [0,82;4,85]	3,30 [2,40;6,08]	0,028	2,53 [1,20;5,75]	4,33 [2,86;10,54]	0,017	2,20 [0,86;4,71]	3,28 [1,54;5,78]	0,315	2,97 [1,31;4,17]	3,62 [2,23;6,75]	0,049
<b>W</b>	0,17 [0,13;0,23]	0,16 [0,094;0,21]	0,166	0,17 [0,15;0,26]	0,20 [0,12;0,27]	0,57	0,23 [0,17;0,29]	0,25 [0,17;0,35]	0,564	0,32 [0,26;0,50]	0,44 [0,28;0,62]	0,136
<b>V</b>	ND	0,023 [0,0;0,65]	0,005	ND	0,13 [0,0;0,68]	0,063	ND	0,073 [0,0;0,74]	0,003	ND	0,13 [0,0;0,68]	0,015
<b>Zr</b>	0,54 [0,14;1,82]	0,42 [0,14;0,90]	0,385	0,29 [0,030;1,08]	0,43 [0,034;2,26]	0,51	0,55 [0,19;1,95]	0,45 [0,24;1,23]	0,46	0,61 [0,20;4,44]	0,69 [0,084;2,52]	0,644



ET	Cheveux			Tissu périprothétique			Liquide synovial		
	Témoins	Patients	p-value	Témoins	Patients	p-value	Témoins	Patients	p-value
<b>Sb</b>	0,011 [0,006;0,022]	0,020 [0,010;0,041]	0,013	ND	0,001 [0,0;0,002]	0,034	0,056 [0,0;0,26]	0,054 [0,0;0,24]	0,743
<b>Ba</b>	0,18 [0,05;0,51]	0,34 [0,15;0,92]	0,029	0,022 [0,005;0,047]	0,094 [0,028;0,82]	<0,0001	2,60 [0,73; 6,47]	3,54 [1,65;32,03]	0,076
<b>Be</b>	0,004 [0,003;0,009]	0,002 [0,001;0,005]	<0,0001	0,001 [0,001;0,002]	0,001 [0,0;0,001]	<0,0001	0,25 [0,19;0,35]	0,12 [0,068;0,15]	<0,0001
<b>Cs</b>	0,058 [0,042;0,083]	0,046 [0,034;0,070]	0,114	0,025 [0,022;0,034]	0,021 [0,018;0,026]	<0,0001	4,77 [3,60;5,81]	3,70 [3,35;4,90]	0,012
<b>Cr</b>	0,073 [0,010;0,39]	0,39 [0,006;1,84]	0,07	0,24 [0,088;0,95]	2,14 [0,66;5,83]	<0,0001	11,76 [0,0; 35,46]	22,82 [3,91;155,13]	0,024
<b>Co</b>	0,032 [0,009;0,074]	0,031 [0,016;0,087]	0,406	0,012 [0,005;0,022]	0,28 [0,056;2,35]	<0,0001	0,73 [0,23; 2,04]	14,81 [3,14;34,26]	<0,0001
<b>Fe</b>	13,55 [7,05;20,93]	21,70 [10,83;47,70]	0,073	33,1 [23,00;42,15]	49,4 [23,65;83,95]	0,011	5539,1 [3219,95;13383,0]	6772,1 [3038,1;21504]	0,71
<b>La</b>	0,008 [0,005;0,016]	0,008 [0,002;0,030]	0,725	0,002 [0,001;0,003]	0,003 [0,0;0,015]	0,401	0,11 [0,053;0,18]	0,019 [0,000;0,15]	0,033
<b>Mn</b>	0,059 [0,0;0,18]	0,13 [0,054;0,41]	0,017	0,087 [0,032;0,14]	0,13 [0,062;0,29]	0,006	4,03 [0,74; 8,13]	3,76 [0,99;14,88]	0,526
<b>Mo</b>	0,20 [0,074;0,38]	0,078 [0,0;0,22]	0,013	0,037 [0,0;0,060]	0,080 [0,02;0,84]	0,003	15,16 [7,96;27,22]	11,22 [3,53;23,11]	0,263
<b>Ni</b>	0,084 [0,0;0,16]	0,17 [0,065;0,31]	0,005	0,11 [0,056;0,29]	0,36 [0,072;1,34]	0,004	9,15 [0,0;30,42]	10,33 [2,34;72,68]	0,37
<b>Ru</b>	0,014 [0,010;0,024]	0,005 [0,002;0,012]	<0,0001	0,006 [0,004;0,008]	0,003 [0,001;0,006]	0,001	1,32 [0,86;1,92]	0,39 [0,25;0,93]	<0,0001
<b>Te</b>	0,021 [0,014;0,036]	0,008 [0,003;0,028]	0,001	0,011 [0,006;0,014]	0,005 [0,002;0,012]	0,007	2,24 [1,46;3,04]	0,58 [0,35;1,72]	<0,0001
<b>Ti</b>	0,57 [0,35;0,94]	0,75 [0,42;1,35]	0,198	0,034 [0,017;0,072]	0,32 [0,066;6,10]	<0,0001	3,03 [2,23; 5,28]	6,81 [3,20;42,12]	<0,0001
<b>W</b>	0,006 [0,003;0,009]	0,005 [0,003;0,009]	0,631	0,003 [0,002;0,009]	0,007 [0,003;0,023]	0,025	0,24 [0,17;0,36]	0,28 [0,17;0,73]	0,441
<b>V</b>	0,002 [0,000;0,010]	0,012 [0,007;0,025]	<0,0001	0,003 [0,0;0,006]	0,013 [0,007;0,038]	<0,0001	0,58 [0,001;1,18]	1,01 [0,20;2,16]	0,192
<b>Zr</b>	0,043 [0,013;0,13]	0,020 [0,009;0,042]	0,072	0,002 [0,001;0,006]	0,011 [0,003;0,062]	<0,0001	0,40 [0,10;1,81]	0,73 [0,22;6,79]	0,102

ND= non détecté

Tableau 8 - Comparaison des concentrations (médianes, écarts interquartiles) des ET ( $\mu\text{g/L}$ ) significativement différents ( $p\text{-value} < 0,05$ ), entre les témoins morts et les porteurs de prothèse autopsiés dans le sang, les urines, les cheveux, le cerveau, le cœur, le foie, les poumons, la rate, les reins et le tissu péri-prothétique : Be, Cr, Co, Fe, La, Mo, Ni, Te, Ti.

ET	Sang			Urines			Cheveux			Cerveau		
	Témoins	Patients	p-value	Témoins	Patients	p-value	Témoins	Patients	p-value	Témoins	Patients	p-value
<b>Be</b>	0,046 [0,020;0,062]	0,15 [0,12;0,16]	<0,0001*	0,034 [0,0;0,054]	0,15 [0,15;0,17]	<0,0001*	0,001 [0,001;0,001]	0,002 [0,002;0,003]	<0,0001*	ND	0,001 [0,001;0,001]	<0,0001
<b>Cr</b>	0,003 [0,0;1,60]	1,41 [0,0;3,22]	0,109*	0,024 [0,002;1,75]	0,31 [0,0;1,07]	0,7*	0,12 [0,086;0,18]	0,097 [0,066;0,22]	0,916*	0,006 [0,0;0,017]	0,004 [0,0;0,010]	0,5
<b>Co</b>	0,42 [0,27;0,68]	0,86 [0,48;2,24]	0,022*	0,45 [0,014;0,61]	0,52 [0,30;0,96]	0,472*	0,024 [0,012;0,034]	0,027 [0,017;0,10]	0,355*	0,004 [0,003;0,005]	0,004 [0,003;0,006]	0,819
<b>Fe</b>	153881 [69877,5;189280]	200827 [171966;223585]	0,011*	483,35 [29,65;725,00]	243,91 [0,95;512,37]	0,304*	9,29 [5,81;15,71]	8,63 [3,73;15,23]	0,532*	45,60 [26,61;66,10]	54,67 [40,65;68,20]	0,171
<b>La</b>	0,24 [0,077;0,42]	0,27 [0,097;0,59]	0,652*	0,11 [0,0;0,21]	0,12 [0,0;0,32]	0,977*	0,007 [0,004;0,01]	0,015 [0,008;0,028]	0,003*	0,001 [0,0;0,001]	0,001 [0,0;0,003]	0,951
<b>Mo</b>	15,37 [6,83;22,90]	27,45 [17,71;44,91]	0,018*	11,58 [0,50;19,33]	15,56 [5,23;32,76]	0,437*	0,058 [0,048;0,099]	0,072 [0,057;0,222]	0,17*	0,045 [0,036;0,095]	0,056 [0,039;0,14]	0,352
<b>Ni</b>	1,16 [0,19;2,82]	5,06 [2,16;7,90]	0,007*	0,87 [0,0;2,41]	3,29 [0,40;6,50]	0,089*	0,16 [0,081;0,29]	0,26 [0,13;0,45]	0,083*	0,009 [0,001;0,021]	0,019 [0,007;0,062]	0,068
<b>Te</b>	0,29 [0,20;0,54]	0,74 [0,47;1,23]	0,001*	0,30 [0,004;0,48]	0,37 [0,26;0,86]	0,371*	0,001 [0,001;0,002]	0,003 [0,002;0,006]	0,01*	ND	0,001 [0,0;0,002]	0,724
<b>Ti</b>	1,15 [0,001;3,71]	0,004 [0,0;2,00]	0,162*	2,67 [0,58;3,93]	ND	0,038*	0,99 [0,43;1,68]	0,67 [0,40;1,67]	0,879*	0,018 [0,013;0,093]	0,0 [0,0;0,015]	<0,0001

ET	Rate			Reins			Côte/Tissu péri-prothétique		
	Témoins	Patients	p-value	Témoins	Patients	p-value	Témoins	Patients	p-value
Be	ND	0,001 [0,001;0,001]	<0,0001	ND	ND		ND	0,001 [0,001;0,001]	<0,0001
Cr	0,012 [0,002;0,020]	0,015 [0,010;0,056]	0,107	0,005 [0,0;0,015]	0,011 [0,0;0,016]	0,745	0,026 [0,013;0,047]	0,057 [0,016;0,24]	0,088
Co	0,009 [0,006;0,012]	0,009 [0,007;0,017]	0,302	0,012 [0,010;0,014]	0,013 [0,009;0,018]	0,991	0,003 [0,002;0,004]	0,003 [0,002;0,007]	0,944
Fe	133,09 [104,88;146,75]	154,55 [128,58;198,78]	0,036	61,45 [45,60;84,14]	46,52 [38,00;63,00]	0,03	27,10 [20,98;57,38]	25,84 [11,37;91,65]	0,796
La	0,001 [0,0;0,002]	0,002 [0,001;0,004]	0,417	0,001 [0,001;0,002]	0,003 [0,002;0,005]	0,041	0,001 [0,0;0,002]	0,002 [0,001;0,003]	0,027
Mo	0,034 [0,029;0,040]	0,037 [0,029;0,052]	0,359	0,28 [0,25;0,36]	0,26 [0,23;0,32]	0,408	0,032 [0,026;0,048]	0,050 [0,026;0,15]	0,424
Ni	0,006 [0,002;0,017]	0,041 [0,026;0,068]	0,001	0,006 [0,002;0,014]	0,042 [0,013;0,070]	0,004	0,022 [0,014;0,032]	0,045 [0,028;0,093]	0,006
Te	ND	0,001 [0,0;0,002]	0,008	ND	0,001 [0,0;0,002]	0,112	ND	0,001 [0,0;0,002]	0,135
Ti	0,049 [0,022;0,073]	0,087 [0,028;0,12]	0,471	0,017 [0,011;0,048]	0,006 [0,0;0,017]	0,006	0,046 [0,023;0,080]	0,080 [0,007;0,74]	0,538

ET	Coeur			Foie			Poumons		
	Témoins	Patients	p-value	Témoins	Patients	p-value	Témoins	Patients	p-value
Be	ND	0,001 [0,001;0,001]	<0,0001	0,001 [0,0;0,001]	0,001 [0,001;0,002]	<0,0001	0,001 [0,0;0,001]	0,001 [0,001;0,001]	<0,0001
Cr	0,009 [0,002;0,018]	0,007 [0,003;0,018]	1	0,010 [0,0;0,019]	0,009 [0,0;0,022]	0,444	0,055 [0,024;0,12]	0,11 [0,071;0,33]	0,04
Co	0,013 [0,012;0,017]	0,023 [0,017;0,032]	0,001	0,041 [0,035;0,051]	0,043 [0,035;0,049]	0,919	0,025 [0,011;0,033]	0,046 [0,020;0,10]	0,025
Fe	39,51 [32,38;45,38]	47,59 [36,60;56,07]	0,067	103,00 [88,94;132,39]	111,62 [74,59;136,02]	0,865	94,16 [82,74;105,95]	109,99 [81,01;148,93]	0,13
La	0,001 [0,001;0,002]	0,001 [0,001;0,002]	0,486	0,016 [0,011;0,032]	0,026 [0,009;0,085]	0,448	0,015 [0,007;0,025]	0,034 [0,013;0,086]	0,045
Mo	0,042 [0,038;0,055]	0,055 [0,039;0,13]	0,191	0,75 [0,60;1,04]	0,79 [0,54;1,06]	0,991	0,031 [0,025;0,061]	0,032 [0,024;0,051]	0,76
Ni	0,002 [0,0;0,01]	0,030 [0,013;0,05]	<0,0001	0,005 [0,0;0,017]	0,032 [0,017;0,060]	0,007	0,017 [0,008;0,039]	0,054 [0,025;0,073]	0,022
Te	ND	0,001 [0,0;0,001]	0,044	ND	0,001 [0,0;0,001]	0,288	ND	0,001 [0,0;0,002]	0,069
Ti	0,025 [0,011;0,049]	0,021 [0,0;0,038]	0,452	0,027 [0,014;0,046]	0,019 [0,0;0,052]	0,542	0,46 [0,23;0,85]	0,77 [0,32;2,42]	0,103

ND= non détecté

Tableau 9 - Variations des concentrations d'ET significativement impactés par la présence de prothèse, dans les matrices (sang et urines à l'entrée et à la sortie d'hospitalisation ou recueillis pendant l'autopsie, cheveux, tissu péri-prothétique, liquide synovial et viscères) des patients porteurs de prothèse de l'étude Prometox

« +/- » signifie augmentation/diminution dans la population porteuse de prothèse par rapport aux témoins.

ET	VIVANTS							AUTOPSIES										
	Sang entrée	Sang sortie	Urines entrée	Urines sortie	Cheveux	Tissu	Synovie	Sang	Urines	Cheveux	Cerveau	Cœur	Foie	Poumons	Rate	Reins	Tissu	
Sb					+	+												
Ba	+	+	+	+	+	+												
Be	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+			+
Cs	-	-		-		-	-											
Cr						+	+							+				
Co	+	+	+	+		+	+	+				+		+				
Fe			+	+		+		+							+	-		
La							+			+				+		+	+	
Mn	+				+	+												
Mo	-	-			-	+		+										
Ni	+	+	+	+	+	+		+				+	+	+	+	+	+	
Ru	-	-	-	-	-	-	-											
Te	-	-		-	-	-	-	+		+		+			+			
Ti	+	+		+		+	+		-		-						-	
W						+												
V	+		+	+	+	+												
Zr						+												

## **IV. Discussion**

### **IV.1 Population générale**

#### *IV.1.1 Valeurs de référence*

Les patients témoins de l'étude Prometox peuvent être assimilés à la population générale, non exposée professionnellement aux métaux. Les covariables, tabac et implant dentaire, ne semblent pas avoir d'effet sur les concentrations de métaux mesurées, dans cette étude. Seul le Ti est augmenté dans les urines à l'entrée d'hospitalisation, en cas d'implant dentaire. Le Ti entre en effet, dans la composition des implants dentaires (270). Cette augmentation n'est pas retrouvée dans le sang ou les urines de sortie et ne semble donc pas perturber les résultats de cette étude.

Aucune étude récente n'a rapporté de valeurs de référence d'ET dans le sang. Des valeurs seuils de toxicité (VTR) sont davantage décrites et utilisées de manière consensuelle. En ce sens, l'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS) a émis des valeurs biologiques d'interprétation pour la population générale adulte française, pour certains ET : Al, Ag, As, Ba, Be, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Sn, Fe, Mn, Hg, Mo, Ni, Pt, Pb, Tl, U, V et Zn (271). Nos résultats sont tous en dessous du seuil proposé, excepté pour le Mo. Néanmoins, une carence en ET essentiel peut être délétère pour l'organisme, à l'origine de troubles métaboliques, de dysfonctionnements immunitaires voire de cancers (272). La définition de concentrations de référence semble donc d'intérêt, afin de prévenir ces troubles.

Caroli et al., en 1994, ont effectué une revue de la littérature afin d'émettre des concentrations standards pour l'Ag, Al, B, Bi, Cd, Co, Cr, F, Hg, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Sc, Se, Sn, Ti, Tl, Zn et Zr dans le sang total (239). Ces dernières sont égales ou supérieures (pour l'Ag, Co, Sn, Hg, Mn, Ni, Pb, Ti, Tl, Zr) à celles que nous rapportons, de même dans l'urine. Les progrès des méthodes analytiques utilisées (ICP-HRMS et minéralisation totale par micro-onde), l'évolution des restrictions quant à l'usage des métaux, ainsi que les variations d'exposition selon la population d'étude peuvent être à l'origine de ces disparités.

La comparaison des études retrouvées dans la littérature est délicate, du fait des différences de population (âge, sexe, exposition, tabagisme, ethnies) et des méthodes d'échantillonnage (tubes) et d'analyse (sensibilité, spécificité) utilisées. Néanmoins, les valeurs que nous rapportons sont comparables à celles émises par des institutions nationales et internationales

ou lors d'études sur des populations et cohortes. L'institut National de Santé Publique du Québec (INSPQ) a émis des propositions de valeurs de référence dans le sang, le sérum et les urines, pour le Sb, As, Cd, Cr, Co, Mn, Hg, Mo, Ni, Pb, Se, Te et Tl (*Tableau 10*) (273). Toutes les concentrations retrouvées dans le sang et l'urine de nos patients sont comprises dans les intervalles décrits par l'INSPQ, excepté pour le Mo plus élevé dans le sang et le Sb, l'As et le Te dans les urines. Cesbron et al. ont rapporté les concentrations sanguines de 27 ET chez 106 français, représentatifs de la population générale (242). Une fois de plus, les concentrations retrouvées sont en accord avec celles que nous décrivons ici. Seul le Mo est augmenté dans notre étude. De même, les médianes des concentrations de Al, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb et Zn publiées par Schultze et al. dans le sang total de 1000 suédois âgés de 70 ans et non exposés aux métaux (244), sont semblables à celles retrouvées dans la population témoin de l'étude Prometox, sauf pour le Mo augmenté et le Ni diminué dans notre étude. Il en va de même lorsque l'on compare nos résultats à ceux de Rodushkin et al. en 1999, dans le sang total de 31 sujets (274) ou pour le Ni dans l'étude publiée par Minoia et al. en 1990 (246). Le Ni sanguin est aussi plus élevé dans l'étude de Nisse et al., qui ont déterminé les concentrations sanguines de 14 ET chez 1992 sujets du nord de la France (275), tandis que toutes les autres concentrations d'ET sont semblables aux nôtres. Ces résultats sont aussi retrouvés en comparaison avec les 26 ET (Al, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Li, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Si, Sn, Sr, Tl, V, W, Zn et Zr) étudiés par Alimonti et al. dans une population de 110 individus sains vivants à Rome (245).

La discordance des concentrations de Mo retrouvées dans notre étude par rapport aux données de la littérature peut être éventuellement due à une technologie différente puisque nous avons utilisé de la Haute Résolution et une minéralisation complète des échantillons, ce qui est rarement effectué. L'absence d'EEQ sur matrice biologique ne nous permet toutefois pas de valider cette hypothèse. Hormis celle du Mo, les concentrations sanguines retrouvées chez les 51 témoins vivants de l'étude Prometox sont en accord avec celles rapportées dans la littérature et peuvent incrémenter les connaissances sur les concentrations d'ET chez l'homme. Il pourrait être envisagé de les appliquer comme référence dans la population générale française.

Concernant les concentrations capillaires, Mikulewicz et al. ont publié en 2013 une revue de littérature afin de proposer des valeurs de références d'ET dans les cheveux (276). Seul l'As est plus faible que la borne inférieure qu'ils rapportent. Le reste des ET (Al, Sb, Ba, Bi, Cd,

Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Sr, V, Zn) ont des concentrations comprises dans la zone de référence proposée par ces auteurs. De même, les concentrations capillaires d'ET rapportées par Goullé et al. chez 45 sujets français et Chojnacka et al. chez 117 étudiants polonais, concordent avec celles de notre étude (241,277). Le Cr et le Fe sont néanmoins diminués tandis que le Ge est plus élevé dans notre population d'étude.

Notre étude a été réalisée sur 51 sujets. Il pourrait être pertinent de compléter les données recueillies avec un échantillon de population plus important. De plus, la littérature a largement décrit l'impact du tabagisme sur les concentrations de métaux, notamment de Cd, de Cr ou de Pb (278). Notre étude ne retrouve pas ce résultat, mais le nombre faible de fumeurs (n=7) ne semble pas suffisant pour obtenir une significativité.

*Tableau 10 - Proposition de valeurs de référence de 13 ET dans le sang, le sérum et les urines, de l'INSPQ, en µg/L. (273)*

µg/L	Sang	Sérum	Urines
<b>Sb</b>	NR	<0,12-0,27	<0,12-0,58
<b>As</b>	<0,22-5,99	<0,22-5,54	<0,007-0,29
<b>Cd</b>	0,2-6,18	<0,11-0,45	<0,34-3,93
<b>Cr</b>	NR	<0,16-0,45	<0,26-0,62
<b>Co</b>	<0,18-0,54	<0,18-0,65	<0,35-3,48
<b>Mn</b>	4,83-16,5	0,43-0,93	<0,11-0,41
<b>Hg</b>	<0,2-3,21	NR	<0,2-9,03
<b>Mo</b>	0,45-2,3	0,71-2,69	17,7-201,5
<b>Ni</b>	<0,59-1,23	<0,59-2,58	<0,59-8,22
<b>Pb</b>	8,29-66,3	<0,21-0,41	0,62-7
<b>Se</b>	165,8-284,3	102,6-181,6	39,5-181,6
<b>Te</b>	<0,26-2,04	<0,26-0,88	<0,13
<b>Tl</b>	<0,2	<0,2	<0,1-0,69

NR= non renseigné

#### *IV.1.2 Répartition tissulaire*

Au-delà des concentrations sanguines de la population générale française, l'analyse des ET dans les organes (cerveau, cœur, foie, poumon, rate, reins) de patients autopsiés a été réalisée afin d'améliorer les connaissances sur la répartition tissulaire des ET. La répartition des ET est globalement homogène dans les organes, à quelques exceptions près.

L'analyse multiélémentaire a une sensibilité moins importante que si chaque élément avait été analysé séparément en ICP-MS. La haute résolution permet de s'affranchir de toutes les interférences mais peut diminuer la sensibilité de la méthode. De ce fait, plusieurs éléments sont proches ou inférieurs à la limite de quantification de notre méthode : Sb, Ag, As, Be, Pd, Pt, Ru, Te, Tl, Th et U.

Nous avons mis en évidence des concentrations élevées d'Al, Cr, Sb, La, Ni, Sr, Ti, V et Zr dans les poumons, un stockage de Co, Fe, La, Mn, Mo, Pb et Zn dans le foie, organe privilégié de métabolisation (conjugaison avant élimination des ET essentiels), une accumulation de Fe dans la rate et un tropisme des Cd, Hg, Mo, Se et Tl pour les reins. Les particules d'Al, Cr, Ni, Sr, Ti et V sont retrouvées dans les poussières présentes dans l'air et peuvent donc être inhalées, d'où l'augmentation de leurs concentrations dans les poumons (279). Cette accumulation est responsable d'une toxicité. Des pathologies respiratoires (fibroses, bronchites, pneumonies, cancers) ont été décrites pour l'Al, Cr, Ni, V et Ti (107,119,133,280). Ils ont été classifiés comme carcinogènes par le CIRC (66,92,108,121,281). Le Zr semble responsable de granulomes (154). En ce qui concerne le rein, le Cd a été classifié comme possiblement carcinogène par le CIRC et est responsable d'une néphrotoxicité, comme le Hg : atteintes tubulaire et glomérulaire, altération du métabolisme de la vitamine D (282–284). La toxicité rénale du Tl reste à explorer et a été décrite uniquement chez l'animal (285).

Goullé et al. ont publié en 2010 des résultats de répartition tissulaire de 34 ET chez 21 individus autopsiés en France (249), concordants avec les nôtres. Ils retrouvent, en effet, une augmentation de Cd, Hg, Se et Tl dans les reins, d'Al et La dans les poumons, de Pb et La dans le foie et de Mn et Mo dans les organes métaboliques. De même que pour notre étude, ils ne retrouvent de l'Ag que dans le cerveau et le foie. Les concentrations mesurées sont similaires à celles que nous rapportons, excepté pour le Sr, augmenté dans notre étude. L'inclusion de trois sujets, morts par noyade, pourrait expliquer cet écart. L'eau, riche en Sr, est inhalée lors d'une noyade (286,287). Ceci explique aussi l'augmentation de Sr dans les poumons. Néanmoins, en ôtant ces trois cas, les concentrations de Sr retrouvées dans notre étude restent importantes. L'interprétation des concentrations de Sr est délicate car cet ET subit de grandes variations de concentrations selon l'apport hydrique, la contamination des eaux de boissons selon les régions (288), mais aussi l'application de lotions capillaires.

Les résultats de l'étude Prometox sont également en accord avec ceux de Ingrao et al. et Yoo et al., qui, de plus, ont aussi mis en évidence une concentration hépatique de Zn et une



concentration splénique de Fe augmentées par rapport aux autres organes analysés (poumons, foie, rate et rein) chez 14 sujets italiens et 150 coréens, respectivement (248,289). La concentration splénique élevée du Fe est due au fait que la rate est l'organe de l'hématopoïèse. L'exposition aux métaux lourds semblent plus élevée dans la population coréenne qu'europpéenne. Les concentrations d'Al, As, Cd, Cr, Fe, Hg, Ni, Pb, Se, V et Sn sont en effet, plus importantes que celles que nous retrouvons. L'environnement impacte les concentrations métalliques, notamment l'alimentation (consommation de poisson accrue chez les asiatiques), l'exposition professionnelle (environnement industriel), mais aussi le sexe (255), l'âge, l'ethnie (290), le lieu de vie (257,291).

Rahil-Khazen et al. rapportent de plus, une accumulation de Co, Cu et Mn dans le foie, de Co dans la rate et de Cu dans le cerveau, dans une population de 30 norvégiens. Les hommes avaient des concentrations d'ET plus élevées que les femmes (252).

Des publications plus anciennes présentent des concentrations d'ET essentiels équivalentes et des concentrations d'ET non essentiels supérieures ou égales à celles que nous rapportons (hormis pour le Sr), dans différentes populations : USA (251), Afrique, Inde, Orient, Suisse (250), Chine (292). Cependant, Tipton et al. ne relèvent pas de variations de concentrations des 24 ET analysés, selon les régions, excepté pour le Cu et Zn, plus élevés dans les groupes du Proche et Extrême Orient. Versieck et al. ont même tenté d'émettre des valeurs de références pour les ET dans les poumons, le foie, les reins et le muscle (240). Ces données, datant de 1985, sont néanmoins à interpréter avec prudence du fait de leur ancienneté et des variations de méthodologies utilisées par les différentes études répertoriées. Plusieurs biais peuvent impacter la mesure des concentrations d'ET, en particulier en post-mortem : les variations intra-organes, la contamination par le sang, l'autolyse post-mortem, les erreurs de mesure, la dessiccation ou le prétraitement de l'échantillon (256). De plus, notre étude a été réalisée sur du tissu frais, après décongélation. Les résultats ne peuvent donc pas être strictement comparés à ceux d'études sur tissu sec. Des facteurs de 0,225 et de 0,011 ont été utilisés pour convertir le poids des échantillons secs et minéralisés respectivement (240).

L'analyse d'autres tissus, notamment les os, le muscle, le pancréas, la thyroïde ou les intestins, auraient pu enrichir notre étude.

### *IV.1.3 Comparaison des morts et vivants*

L'étude Prometox rapporte des concentrations sanguines différentes entre les sujets vivants et morts, pour beaucoup d'ET. On retrouve à la fois des ET augmentés (Ba, Cd, Cs, Co, La, Mn, Hg, Ni, Tl, V) et d'autres diminués (Al, Sb, As, Be, Cu, Sn, Ge, Ru, Se, Te, Zr) dans le sang des individus morts. Ces résultats sont confirmés pour le Be, Cd, Ge, Mn, Ni, Ru, Se, Te, V et Zr dans les cheveux.

Peu d'études ont comparé les concentrations d'ET chez les sujets vivants et morts. Ragab et al. ont analysé 8 ET chez 212 individus décédés et 200 vivants (293). Ils ont montré une augmentation de Cd, Hg et Pb et une diminution de Se et Sb chez les morts. L'augmentation de Cd et Hg a aussi été mise en évidence dans une étude américaine préalable (294). La putréfaction, l'emplacement du site de collecte, les comorbidités, l'environnement post-mortem, la redistribution et la diffusion tissulaire post-mortem peuvent altérer ces concentrations, compliquant ainsi l'interprétation des résultats (294). La détermination des concentrations capillaires, représentatives de l'exposition au long cours aux xénobiotiques, permet de s'affranchir de la contamination du sang et de mettre en évidence les métaux libérés par les cellules (Cd, Mn, Ni, V) et ceux pour lesquels une diffusion tissulaire post-mortem a lieu (Be, Ge, Ru, Se, Te, Zr). Goullé et al. ont étudié l'impact du protocole de prélèvement sur les concentrations d'ET et ont aussi mis en évidence le relargage cellulaire de Mn et Cd en post-mortem (238). La comparaison avec des prélèvements ante-mortem pour les mêmes sujets permettraient de confirmer ces hypothèses. De plus, la population d'étude (n=51 vivants et 20 morts) reste limitée. Cette étude pourrait être poursuivie sur un échantillon de population plus important.

## **IV.2 Etude Prometox**

L'étude Prometox vise à évaluer le retentissement systémique du relargage des ET par les DMI. Seuls des sujets porteurs de PTH, PTG et PTC à couple de frottement PE/Me ont pu être inclus dans l'étude. La composition des PTH des sujets autopsiés n'a pu être obtenue.

La comparaison des concentrations d'ET retrouvées chez les porteurs de prothèse et chez les témoins révèle des différences, en faveur d'un relargage des ET par le DMI défectueux chez les sujets vivants et de manière précoce chez les sujets décédés, porteurs d'une prothèse *a priori* saine. Il doit cependant être noté que les concentrations urinaires, exprimées en µg/L,

ne tiennent pas compte de la clairance de la créatinine. De plus, bien qu'une modification analytique semble induire une augmentation du Mo par rapport aux études retrouvées dans la littérature, la validation des séries par des contrôles de qualité permet la comparaison des populations au sein de notre étude.

#### *IV.2.1 Sujets vivants*

On constate une augmentation de Co, Ni, V et Ti dans le sang, les urines et le tissu péri-prothétique des porteurs de prothèse. Le Cr est augmenté de manière locale uniquement, dans le tissu péri-prothétique et le liquide synovial, de même pour le Zr et le Mo. Ces ET entrent dans la composition des prothèses (26) et sont relargués par le DMI, à l'origine d'une contamination locale (tissu péri-prothétique, liquide synovial) puis systémique (sang, urines, organes). L'étude des viscères des sujets autopsiés permettra, par la suite, de déterminer les organes cibles de ces ET relargués. D'autres ET non décrits comme composants des prothèses sont modifiés chez les porteurs de prothèse : le Be, Cs, Ru et Te sont diminués dans toutes les matrices analysées. Un phénomène de compétition entre les métaux peut être envisagé : de même que le Cu et le Zn présentent un antagonisme mutuel dans leur absorption cellulaire (295) ou que le Cd entre en compétition avec les ions métalliques bivalents dans la liaison aux ligands (296), le relargage des Co, Mn, Ni, Ti, V pourrait entraîner une compétition au niveau des transporteurs ou des liaisons aux protéines avec les autres ET et ainsi être responsable de la diminution du Be, Cs, Ru et Te. Les métaux se lient à l'albumine, à la ferritine et à la transferrine. En particulier, le Cr et le V entrent dans la cellule par des transporteurs anioniques non spécifiques de phosphate/sulfate, le Co traverse la membrane cellulaire grâce à un transporteur du fer non spécifique (189,297), le Mn utilise le DMT1 (Divalent Metal Transporter 1) et les ZIP (ZRT, IRT-like Protein) (298). Ces différents transporteurs et canaux peuvent avoir une affinité plus importante pour certains métaux que d'autres, notamment le Co, Mn, Ti, V ou Ni, à l'origine d'une diminution des concentrations d'autres ET.

Une autre hypothèse envisageable est l'impact de l'inflammation (augmentation des cytokines) induite par la prothèse défectueuse sur les concentrations de ces ET diminués, notamment au niveau du transport. Bonaventura a mis en évidence la perturbation de l'homéostasie des métaux en cas d'inflammation chronique (299), notamment l'effet de l'IL-1 $\beta$  et de TNF- $\alpha$  sur l'accumulation du Cd dans les synoviocytes (300), cela reste à étudier pour d'autres ET. Cette inflammation peut aussi modifier le pH péri-prothétique, d'après

Hench et Ethridge (301), or le pH influe sur la concentration des ET (302). Konttinen et al. ont rapporté une variation entre 4,38 et 7,7 du pH environnant, dans le cas d'un descellement (303). Il a aussi été montré qu'un pH acide favorisait la corrosion des prothèses en acier inoxydable et ainsi le relargage des ET (304,305). Ce phénomène a aussi été décrit dans le cas des implants dentaires, chez des diabétiques et des patients avec des maladies inflammatoires (306). La présence d'une prothèse pourrait donc être responsable d'une modification du pH local et ainsi favoriser la corrosion et le relargage des ET par la prothèse.

Le Mo, diminué dans le sang mais augmenté dans le tissu péri-prothétique, semble être particulièrement impacté par l'inflammation, à l'origine d'une perturbation de son transport et d'une captation tissulaire.

Le Ba est augmenté dans toutes les matrices, sauf les cheveux. Des agents de contraste, notamment le sulfate de baryum ( $BaSO_4$ ) et le dioxyde de zirconium ( $ZrO_2$ ), sont couramment ajoutés au ciment osseux afin de lui conférer une radio-opacité et ainsi faciliter l'évaluation radiographique des implants (307,308). Cette augmentation de Ba n'a jamais été rapportée chez des porteurs de prothèse, de même pour le Zr.

L'environnement local est le milieu le plus impacté par les prothèses. Le tissu péri-prothétique présente, en effet, le plus d'ET modifiés, avec les mêmes modifications que le sang, plus une augmentation de Sb, Cr, Fe, Mo, W et Zr. Ces résultats ne sont pas retrouvés dans le liquide synovial, renouvelé en permanence, tandis que les ET peuvent s'accumuler dans le tissu en contact avec le DMI. Les nanoparticules métalliques traversent la membrane cellulaire par diffusion ou endocytose et sont stockées dans la cellule. Les ions métalliques, générés par oxydation, induisent une apoptose ou une nécrose de la cellule et provoquent ainsi une ostéolyse locale (309).

Le sang et les urines ont été collectés à l'entrée, la veille de l'opération de reprise de prothèse et 3 jours post opératoires. Les ET sont modifiés de la même manière avant et après l'opération, excepté pour le Mn et le V dans le sang post opératoire. La demi-vie des ET dans les tissus n'a pas été évaluée à notre connaissance, et semble trop longue pour mesurer l'impact du retrait du DMI défectueux sur les concentrations sanguines 3 jours après. Le Cs, Fe, Te et Ti ne sont modifiés que dans l'urine de sortie. Ces ET sont aussi modifiés dans le tissu péri-prothétique et le liquide synovial (sauf le Fe). L'opération de reprise pourrait être à l'origine d'une modification de l'environnement local, favorisant ainsi l'élimination urinaire de ces ET.

Peu de publications rapportent les concentrations d'ET chez des porteurs de prothèse PE/Me. Seules des concentrations de Cr, Co, Ni, Ti et Mo ont été retrouvées dans la littérature. Sarmiento et al., Karamat et al. et Engh et al. ont publié des concentrations sanguines inférieures à celles que nous retrouvons (161,258,259), tandis que Savarino et al. et Dahlstrand et al. rapportent des concentrations de Cr et Co identiques aux nôtres, dans le sérum de 26 et 16 patients respectivement (260,310). Les concentrations sériques de Ti et Co décrites par Rasquinha et al. sont inférieures à celles de notre étude (1,8 et 0,3 µg/L versus 3,3 et 0,6 µg/L, respectivement), et les concentrations de Cr sont identiques (311). Enfin, dans une étude réalisée sur les érythrocytes de 18 patients porteurs de PTH PE/Me, Ti et Co ont des concentrations plus faibles que celles que nous décrivons ici, tandis que le Cr est plus élevé (1,3 µg/L versus 0,7 µg/L) (312).

Les concentrations sanguines de Cr et Co des porteurs de prothèse MoM décrites dans la littérature, sont plus élevées que celles que nous retrouvons chez les porteurs de prothèse PE/Me (163,313).

Les concentrations sanguines de Co et Ni des porteurs de prothèse de l'étude Prometox sont supérieures aux seuils recommandés par l'INRS, de 0,45 et 1,4 µg/L respectivement (271) et aux valeurs de référence proposées par l'INSPQ (273). Les résultats de notre étude sont donc en faveur d'un relargage de particules métalliques des prothèses PE/Me et ainsi d'une contamination systémique, à l'origine d'une toxicité. L'évaluation de cette toxicité est nécessaire, notamment l'étude des organes cibles des ET. Il serait intéressant de corrélérer ces concentrations augmentées d'ET à des troubles cliniques présents chez les porteurs de prothèse.

#### *IV.2.2 Sujets autopsiés et comparaison*

L'étude des concentrations d'ET dans les organes de sujets autopsiés porteurs de prothèse a permis d'étudier les organes cibles des ET relargués par les prothèses.

En comparant les porteurs de prothèse aux témoins, nous rapportons une augmentation de Co dans le sang, le cœur et les poumons ; une accumulation de Cr dans les poumons et des concentrations augmentées de Ni dans tous les organes, sauf le cerveau. Le poumon est l'organe concentrant le plus d'ET relargués par les prothèses. Seul le Ni est significativement augmenté dans le tissu péri-prothétique. Les prothèses des sujets autopsiés sont *a priori* saines, sans inflammation locale, ce qui pourrait expliquer l'absence de fixation des ET et

ainsi l'absence d'augmentation des concentrations de Cr et de Co dans le tissu péri-prothétique.

De manière prévisible, le Fe est augmenté dans le sang et la rate, site majeur de l'hématopoïèse. Le La est augmenté dans le tissu des autopsiés porteurs de prothèse, avec une accumulation dans les poumons et les reins. L'oxyde de La peut être utilisé comme revêtement antibactérien dans les prothèses (314,315). Les données concernant la composition des PTH de la population autopsiée n'ont néanmoins pu être recueillies dans cette étude.

En comparant avec la population vivante, moins d'ET semblent modifiés chez les porteurs de prothèse autopsiés et notamment dans l'environnement péri-prothétique. Il semble donc y avoir un relargage moindre de particules métalliques dans l'environnement péri-prothétique lorsque l'implant est fonctionnel. Néanmoins, le Be est augmenté dans toutes les matrices des patients autopsiés porteurs de prothèse alors qu'il est diminué chez les vivants, de même pour le Te dans le sang, les cheveux, le cœur et la rate. Le phénomène de compétition entre les ET envisagé chez les vivants n'a pas lieu chez les autopsiés porteurs d'une prothèse non inflammatoire. La modification du pH en post-mortem chez les porteurs de prothèse peut éventuellement expliquer ce résultat. Le Ti est diminué dans l'urine, les reins et le cerveau des porteurs de prothèse autopsiés, résultat contradictoire par rapport aux vivants. Le Ti n'étant pas modifié dans l'environnement péri-prothétique ni dans le sang, ce résultat ne semble pas être lié à la présence de la prothèse. La longue demi-vie du Ti et sa présence dans les implants dentaires (270) peuvent éventuellement avoir causé cette différence. La composition de ces implants dans la population autopsiée de l'étude Prometox n'a pas été obtenue.

Peu de données de littérature sont disponibles concernant le relargage des ET par les prothèses et leurs organes cibles. D'anciennes études ont rapportées des concentrations importantes de Cr et Co dans le tissu péri-prothétique de porteurs de prothèse MoM, entre 100 et 1300  $\mu\text{g/g}$  pour le Cr et 26 et 130  $\mu\text{g/g}$  pour le Co (316,317), largement supérieures à celles que nous décrivons ici. Les concentrations dans le foie, les poumons, la rate et les reins, publiées en 1980 par Dobbs et Minski chez une femme de 81 ans porteuse d'une prothèse PE/Me depuis 14 ans sont toutes largement supérieures à celles que nous retrouvons (318), de même pour les concentrations hépatiques de Cr, Co, Ni, Ti et V d'une patiente de 47 ans porteuse d'une prothèse MoM (319). Case et al. ont publié en 1994 une étude sur 13 cas

autopsiés porteurs de prothèse en alliage Cr-Co ou en acier inoxydable, avec ou sans usure de la prothèse (191). Les concentrations de Al, Cr, Co, Fe, Mo, Ni, Ti, Zr ont été analysées dans l'os, les ganglions lymphatiques, le cortex frontal, le foie, les poumons, la rate et les reins. Ils rapportent une augmentation de Co, Cr, Mo, Fe, Ni, Ti dans les ganglions lymphatiques, le foie et la rate des porteurs de prothèse, selon l'usure ou non de l'implant. Les concentrations de l'étude Prometox sont inférieures à celles rapportées par Case et al. pour le Ni, Ti, Zr, Cr (sauf les poumons) et le Co (sauf les poumons et les reins), à la fois chez les porteurs de prothèses usées et saines. Les concentrations ferriques des deux études sont équivalentes. Cette comparaison est donc en faveur d'un relargage moins important d'ET dans le cas de prothèses PE/Me. La migration de particules métalliques et de polyéthylène dans le foie, la rate et les ganglions lymphatiques a aussi été montrée par Urban et al. (192). Ils ont retrouvé un nombre plus important de particules en cas de révision de la prothèse et davantage de débris de polyéthylène que métalliques. Les voies lymphatiques semblent être privilégiées pour le transport de ces particules.

Après avoir mis en évidence le relargage de particules métalliques chez les sujets porteurs de prothèse et les organes cibles des ions métalliques, il est intéressant de comparer cela à la toxicité systémique et aux perturbations cliniques retrouvées chez ces patients. Bradberry et al. et Zywiell et al. ont effectué une revue des cas publiés de toxicité systémique relative aux PTH MoM (157,159). Les cas de rupture d'implant rapportés semblent présenter une cardiotoxicité (cardiomyopathie), une neurotoxicité (neuropathies, pertes auditives neurosensorielles, atteinte cognitive), une déficience visuelle ou une atteinte thyroïdienne, en lien avec une cobaltémie augmentée. De même, Gessner et al. décrivent des atteintes cardiaques, de la thyroïde, des systèmes audiovestibulaire, sensorimoteur périphérique, visuel, hématologique et immunitaire chez des sujets porteurs d'implants ayant une cobaltémie élevée (194). L'accumulation cardiaque du Co et du Ni mise en évidence dans l'étude Prometox est en accord avec la littérature et pourrait être à l'origine des cardiomyopathies décrites. Les données cliniques des patients porteurs de prothèse défaillante inclus dans le protocole Prometox n'ont pas été recueillies. Il serait intéressant de les mettre en lien avec d'éventuelles atteintes cardiaques, neurologiques ou thyroïdiennes. Il aurait également pu être pertinent d'obtenir les concentrations d'ET dans la thyroïde des sujets Prometox autopsiés.

L'étude Prometox a aussi montré des concentrations de Ni augmentées dans le foie des porteurs de prothèse, à l'origine d'une éventuelle toxicité. De la même manière, Polyzois et

al. ont souligné l'hépatotoxicité des ET contenus dans les prothèses, notamment des nécroses hépatocytaires et lésions hépatiques dues au Cr, au Ni ou au Ti (268). Cette toxicité potentielle hépatique sera étudiée dans la partie 3 de ce travail.

Enfin, d'après notre étude, les poumons semblent être l'organe cible de nombreux ET composants les implants orthopédiques (Co, Cr, Ni, La). La toxicité respiratoire de ces ET a été décrite lors d'exposition professionnelle mais très peu dans le cas de porteurs de prothèse, et donc par inhalation plutôt que par voie vasculaire. Des affections inflammatoires respiratoires (pneumopathie et bronchite), des maladies pulmonaires obstructives (emphysème, fibrose pulmonaire, pneumoconiose et asthme) et des cancers du poumon peuvent être attribués à l'exposition aux métaux (268). Seul un cas de granulome pulmonaire a été publié chez une patiente de 55 ans ayant des antécédents de fracture d'un implant CoC, remplacé par une prothèse PE/Me. Les concentrations de Cr et Co étaient élevées dans le liquide synovial (25400 et 26500 µg/L respectivement) et dans le sang (31,8 et 22,2 µg/L respectivement) (320). Il pourrait donc être pertinent de confronter ces données à d'éventuels signes cliniques de toxicité pulmonaire chez les sujets inclus dans l'étude Prometox.

## **V. Conclusion**

L'étude Prometox a permis d'étudier les concentrations métalliques et leur répartition dans l'organisme, dans une population saine et chez des porteurs d'implants orthopédiques. Il a ainsi été possible de proposer des valeurs de référence d'ET dans la population française, cohérentes avec les données retrouvées dans la littérature.

A notre connaissance, il s'agit de la première étude analysant un si grand nombre d'ET chez des porteurs de prothèse PE/Me. L'usure de ces implants induit un relargage de particules métalliques au niveau local (Sb, Ba, Co, Cr, Fe, Mn, Mo, Ni, Ti, W, V, Zr) et systémique (Ba, Co, Ni, Ti, V). Chez les patients porteurs de prothèse à priori saine, les concentrations de certains de ces ET sont déjà augmentées (Co, Fe, Mo, Ni). Ces métaux semblent avoir comme organes cibles majoritaires, le cœur, les poumons et le foie. Cette accumulation de métaux dans les organes peut être à l'origine d'une toxicité systémique, notamment une cardiotoxicité, une neurotoxicité et une hépatotoxicité. Le suivi rapproché des concentrations d'ET permettrait une prise en charge précoce en cas de rupture de l'implant et ainsi la prévention de signes cliniques de toxicité de ces métaux.



## **Partie 2 B**

**Évaluation de l'impact pro-inflammatoire des prothèses**

**- Analyse des cytokines -**



## **I. Introduction**

L'inflammation correspond à une réponse biologique de l'organisme envers une affection (infection, pathogène, toxiques, allergie, lésion, brûlure...), afin d'éliminer les stimuli nocifs et initier un processus de guérison (321). C'est un processus rapide, dynamique et réversible. Il est défini par quatre termes : calor (chaleur), dolor (douleur), rubor (rougeur) et tumor (tuméfaction). Le système immunitaire déclenche une cascade de signaux chimiques qui stimulent des réponses visant à guérir les tissus affectés. Ces signaux activent le chimiotactisme des macrophages de la circulation générale vers les sites des lésions. Ces macrophages activés produisent des cytokines qui induisent des réponses inflammatoires (322). Les premières cellules circulantes recrutées sont les polynucléaires neutrophiles, permettant l'élimination du pathogène. Ces derniers, ainsi que les cytokines, vont agir sur les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins locaux, provoquant une vasodilatation, responsable de la chaleur et de la rougeur, et le recrutement des leucocytes circulants. Le recrutement des neutrophiles est ainsi suivi par la migration des monocytes et des lymphocytes, responsables de la douleur et de la tuméfaction (323). En cas de persistance du recrutement, de la prolifération et de la migration des cellules immunitaires, une inflammation chronique peut s'instaurer (324).

Les cytokines sont de petites protéines (15-25 kDa) majoritairement secrétées, qui agissent par l'intermédiaire de récepteurs de surface. Leur action est transitoire, à courte distance (autocrine ou paracrine), quoique parfois endocrine (à distance), à effets multiples (pléiotropes) et qui peuvent agir en synergie ou être antagonistes. Elles exercent un contrôle de la prolifération, de la différenciation, de la migration et de l'activation cellulaire, ainsi que de l'hématopoïèse. Elles coordonnent et adaptent les réponses immunitaires innées et adaptatives. Les interleukines (IL), les facteurs stimulant les colonies (CSF), les facteurs de nécrose tumorale (TNF) et les interférons (IFN) sont les principales classes de cytokines (215). Le rôle des principales cytokines pro-inflammatoires est décrit : IL-1 active d'autres cytokines (IL-6, IL-8, TNF, GM-CSF, G-CSF) via les macrophages, induit la migration des phagocytes sanguins et est responsable d'une hyperalgie et de fièvre. IL-2 permet la prolifération des lymphocytes B et l'activation des lymphocytes T. IL-3 induit la croissance des cellules hématopoïétiques. IL-4 et IL-13 sont impliqués dans la prolifération des lymphocytes B, la croissance des éosinophiles (de même que l'IL-5) et des mastocytes, ainsi que dans la libération d'IgE (anticorps retrouvés dans les réactions d'hypersensibilité). IL-6 est à l'origine de la différenciation des cellules souches myéloïdes et d'une élévation des

protéines de la phase inflammatoire aigüe (CRP). IL-7 active la lymphopoïèse (B et T). IL-8 active les neutrophiles et recrute d'autres molécules de l'inflammation. IL-9 et IL-11 exercent des effets hématopoïétiques et thrombopoïétiques. IL-10 inhibe la production de cytokines, promeut la prolifération lymphocytaire et la production d'anticorps. IL-12 induit la production d'IFN- $\gamma$  et la cytotoxicité des cellules Natural Killer (NK). IL-17 intervient dans les infections bactériennes en stimulant le recrutement de polynucléaires neutrophiles. GM-CSF et G-CSF activent les macrophages et stimulent respectivement la croissance des progéniteurs myéloïdes et granulocytaires. TNF induit la sécrétion des cytokines, les molécules d'adhérence, la fièvre et active les macrophages. IFN- $\gamma$  est impliqué dans les infections virales, active les macrophages, les neutrophiles et les cellules NK. MIP-1  $\alpha$  et  $\beta$ , sécrétés par les macrophages et les lymphocytes, respectivement, ont des propriétés chimiotactiques (215,321).

En plus de l'inflammation aiguë induite par le procédé chirurgical invasif de la pose de prothèse, le relargage de particules de la prothèse peut être responsable d'une inflammation chronique. En effet, bien que constituées des matériaux les plus inertes et les plus résistants possible, les prothèses en métal, en polyéthylène ou en céramique se dégradent au cours du temps, suite à des phénomènes d'abrasion, adhésion et de fatigue et suite à la corrosion (oxydation) (325). Les débris d'usure peuvent induire le recrutement des macrophages, à l'origine de la production de cytokines pro-inflammatoires, du recrutement des cellules immunitaires et à terme d'une fibrose. Cette réaction tissulaire peut provoquer une ostéolyse et finalement, le descellement de l'implant (214,326,327). La réponse cellulaire aux particules et l'ostéolyse peuvent varier selon la taille, la forme, la composition, la charge et le nombre de particules (328–331).

Le but de cette étude est d'évaluer l'inflammation induite par les prothèses défaillantes, en dosant les cytokines pro-inflammatoires dans le sang de patients opérés pour reprise de leur implant en comparaison avec le sang de témoins non porteurs de prothèse. Il pourrait être envisagé de définir un biomarqueur de cette inflammation, pour le suivi des patients porteurs de prothèse.

## **II. Matériel et méthodes**

### **II.1 Réactifs, standards et solutions de travail**

L'analyse des cytokines a été réalisée en Elisa Multiplex sur des kits Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay (Bio-rad, Marnes-La-Coquette, France), en suivant les recommandations du fabriquant. 27 cytokines et chimiokines ont été recherchées : FGF basic, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A, IP-10, MCP-1 (MCAF), MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , PDGF-BB, RANTES, TNF- $\alpha$ , VEGF. Le kit contient une plaque d'analyse à 96 puits, des microsphères (billes) magnétiques de capture, des anticorps de détection, des standards, un contrôle de qualité (CQ), du diluant, de tampon de test et de lavage, de la streptavidine-PE.

Les standards doivent être reconstitués dans 250  $\mu$ L de diluant. Après mise en suspension des billes magnétiques dans le tampon, elles sont déposées dans chaque puits.

### **II.2 Préparation d'échantillon**

50  $\mu$ L de sang total pré-opératoire de 97 sujets vivants de l'étude Prometox (description en partie 2A de ce manuscrit) et de CQ dilués au quart dans le diluant ont été déposés dans les puits contenant les billes magnétiques et incubés 30 minutes à température ambiante sous agitation à 850 RPM, avant 3 rinçages par 100  $\mu$ L de tampon de lavage sur un support aimanté. Après reconstitution dans le diluant, 25  $\mu$ L de solution d'anticorps de détection ont été déposés dans les puits et incubés 30 minutes sous agitation à 850 RPM. Après plusieurs séries de lavage, le complexe de détection final est formé par l'ajout de 50  $\mu$ L d'un conjugué streptavidine-phycoérythrine, la phycoérythrine servant d'indicateur fluorescent. 125  $\mu$ L de tampon de test ont été déposés dans chaque puits avant lecture (332).

### **II.3 Instrumentation**

Un analyseur Bioplex® 2000 System (Bio-rad Laboratories (Hercules, Californie)) a été utilisé pour la lecture des plaques. Un laser rouge et vert illumine les colorants fluorescents à l'intérieur de chaque bille permettant de fournir une classification des billes et une excitation de la phycoérythrine, qui est détectée par un tube photomultiplicateur. Les données sont présentées sous forme d'intensité de fluorescence médiane (IFM) ainsi que de concentrations

en pg/mL. La concentration de l'analyte lié à chaque plage est proportionnelle à l'IFM du signal du rapporteur. Tous les échantillons, standards et CQ ont été testés en duplicat.

#### **II.4 Analyse des données**

Les données ont été analysées par l'Unité de Recherche Clinique Paris Saclay Ouest, dans le cadre du protocole Prometox (APHP180539), en utilisant le logiciel R (R version 3.4.4 (2018-03-15)). Les concentrations de cytokines ont été comparées par population d'étude (patient versus témoin), grâce à un test t de Student ou un test de Wilcoxon si les conditions de normalité et/ou d'égalité de variance n'étaient pas respectées. Les résultats de cytokines inférieurs ou supérieurs aux seuils de la méthode ont été considérés comme des valeurs manquantes (NA). Les p-values inférieures à 0,05 sont considérées comme significatives. L'influence des covariables (sexe, tabac, implant dentaire et présence d'autre prothèse) sur le taux de cytokines a été évaluée par moyen de modèles linéaires, pour les cytokines significativement impactées par les prothèses. Si nécessaire, une transformation (log ou autre) des concentrations a été faite afin d'améliorer le respect des hypothèses des modèles statistiques utilisés. Les variables d'ajustement : sexe, tabac et implant dentaire pour lesquelles la p-value était inférieure à 0,2 en analyse bivariée ont été retenues pour les modèles multivariés.

### **III. Résultats**

Les résultats (moyenne, médiane, écart type, espace interquartile, valeurs minimales et maximales) de la comparaison des taux de cytokines entre les patients porteurs de prothèse et les témoins sont rapportés dans le *Tableau 11*. Sept cytokines : GM-CSF, IL-2, IL-5, IL-10, IL-12-p70, IL-15 et IL-17, comportent plus de 80 % de valeurs NA et n'ont pas été analysées. Elles ne figurent pas dans le *Tableau 11*.

Quatre cytokines sont significativement différentes entre les deux groupes (p-value < 0,05). IL-1 $\beta$ , G-CSF et MIP-1 $\alpha$  sont augmentées chez les patients porteurs de prothèse (p-value respectives = 0,01, 0,028 et < 0,0001) et l'éotaxine diminue de manière significative (p-value = 0,024).

Tableau 11 - Comparaison des taux de cytokines (médianes, écarts interquartiles) dans le sang total pré-opératoire des témoins et des sujets vivants porteurs de prothèse de l'étude Prometox

Cytokine	Témoins	Patients	p-value
<b>Basic-FGF</b>	27,32 [19,57;33,79]	30,25 [21,66;39,90]	0,128
<b>Eotaxine</b>	74,93 [58,81;107,96]	69,18 [51,19; 81,53]	0,024
<b>G-CSF</b>	68,60 [52,77; 86,12]	84,31 [59,46;103,79]	0,028
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	7,92 [6,79; 9,80]	8,51 [6,27;10,58]	0,686
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	2,11 [1,66;2,85]	2,82 [2,11;4,13]	0,01
<b>IL-1ra</b>	4354,86 [3561,64;5382,27]	5211,35 [3475,01;6309,66]	0,135
<b>IL-4</b>	3,23 [2,48;4,15]	2,75 [2,11;3,57]	0,122
<b>IL-6</b>	2,21 [2,15;2,23]	2,31 [1,28;4,84]	1
<b>IL-7</b>	15,16 [13,60;17,28]	13,88 [12,20;14,80]	0,163
<b>IL-8</b>	17,99 [12,97;24,79]	19,92 [11,63;45,61]	0,379
<b>IL-9</b>	480,55 [400,62;531,27]	485,73 [423,22;570,73]	0,518
<b>IL-13</b>	2,25 [1,48;3,56]	1,74 [0,71;2,43]	0,197
<b>IP-10</b>	312,61 [209,01;419,91]	310,91 [213,03;409,48]	0,94
<b>MCP-1</b>	107,01 [73,66;127,58]	89,85 [57,50;134,77]	0,184
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	1,83 [1,23;2,41]	3,31 [2,48;3,81]	<0,0001
<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	210,45 [151,62;245,72]	229,12 [164,61;265,05]	0,192
<b>PDGF-BB</b>	1076,87 [927,79;1581,87]	1088,58 [922,17;1526,95]	0,897
<b>RANTES</b>	14438,53 [10665,36;18249,59]	14429,89 [11270,12;18131,98]	0,813
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	34,38 [29,47;41,77]	35,99 [32,09;45,14]	0,163
<b>VEGF</b>	349,81 [292,05;354,29]	222,42 [157,42;338,67]	0,306

L'analyse des covariables (sexe, implant dentaire, tabagisme et présence d'une autre prothèse) sur les cytokines significativement impactées, a révélé l'absence d'impact des covariables sur les résultats en analyse bivariée et surtout l'absence de différence significative entre les patients témoins et ceux porteurs d'autre DMI non inflammatoire.

#### **IV. Discussion**

Notre étude a mis en évidence 3 cytokines significativement augmentées (p-value < 0,05) dans le sang des patients porteurs de prothèse par rapport à la population témoin de l'étude Prometox : IL-1 $\beta$ , G-CSF et MIP-1 $\alpha$ . Ces trois cytokines exercent une action synergique et il a été rapporté que l'IL-1 $\beta$  stimule la production d'autres cytokines pro-inflammatoires, G-CSF particulièrement (333,334). Nos résultats sont en accord et viennent compléter ceux de la littérature. L'IL-1 $\beta$ , cytokine pro-inflammatoire a en effet, été largement décrite dans l'inflammation, et notamment dans l'inflammation induite par les particules d'usure des implants orthopédiques (216,218,220,223,226,227). Il a été montré que les fibroblastes, produisant l'IL-1 $\beta$ , sont impliqués dans l'ostéoclastogénèse et la résorption osseuse (335).

Les débris de la prothèse (particules ou ions métalliques) sont phagocytés, endommageant les lysosomes et entraînant ainsi la production d'espèces réactives de l'oxygène. L'inflammasome, formé suite à la reconnaissance des signaux inflammatoires, active alors la caspase 1, à l'origine de la conversion d'IL-1 $\beta$  en forme active (336,337). Jiranek et al. ont démontré que l'ARN messager de l'IL-1 $\beta$  est présent de manière prédominante dans les macrophages, alors que la protéine IL-1 $\beta$  est présente à la fois sur les macrophages et les fibroblastes. Cela suggère que les macrophages sécrètent activement cette cytokine, qui se fixe ensuite à la fois sur les macrophages et les fibroblastes (338). De plus, l'IL-1 $\beta$  est une cytokine dominante présente dans le tissu granulomateux péri-prothétique (325).

Christiansen et al. ont rapporté une augmentation significative de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  dans l'environnement péri-prothétique, en cas de descellement aseptique et en lien avec une augmentation des concentrations de métaux dans le tissu. Ces cytokines n'étaient néanmoins pas significativement augmentées dans le sérum (222).



Le facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF) est un facteur de croissance polypeptidique qui régule la production de granulocytes neutrophiles, à la fois basale et en cas de stimuli inflammatoires. Il semble aussi moduler certaines fonctions des neutrophiles ainsi que leur distribution dans l'organisme (339). Il est produit par les macrophages, les fibroblastes et les cellules endothéliales. La production et la libération de G-CSF est directement stimulée par l'IL-1 (334,340). De plus, G-CSF semble favoriser l'ostéolyse en inhibant la différenciation ostéoblastique (234,235). Lawlor et al. ont mis en évidence le rôle majeur de G-CSF dans l'inflammation articulaire, chez des souris : un déficit en G-CSF protège les souris contre l'arthrite aiguë et chronique, avec une mobilisation atténuée des cellules granulocytaires de la moelle osseuse et à une diminution de l'infiltration et de l'activation cellulaires dans les articulations inflammées (341). L'utilisation de facteur recombinant G-CSF (rhG-CSF), largement employé dans le traitement des neutropénies, a été évoqué comme traitement adjuvant dans les infections liées aux implants orthopédiques (342). Le rhG-CSF peut également jouer un rôle important dans le processus de revascularisation post-chirurgicale et de réparation des tissus, utile pour prévenir l'échec des implants. Enfin, de même que le rôle du GM-CSF (facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages) dans la transformation cellulaire et le développement de lésions érosives autour des implants orthopédiques a été évalué, des investigations concernant G-CSF pourraient être envisagées du fait de leur action similaire (343). Zhang et al. ont, en ce sens, analysé la cytotoxicité des nanoparticules (NPs) de TiO<sub>2</sub> sur des ostéoblastes murins MC3T3-E1. Ces NPs de TiO<sub>2</sub> ont induit une diminution de la viabilité cellulaire (augmentation significative de la libération de lactate déshydrogénase, de l'apoptose et de la perméabilité de la membrane mitochondriale) et une augmentation de l'expression génétique du GM-CSF et du G-CSF (344).

D'autre part, les ions métalliques libérés par la prothèse peuvent activer le système immunitaire en agissant comme des haptènes, à l'origine d'une hypersensibilité retardée (345,346). Ni est le sensibilisateur le plus courant, suivi du Cr et du Co (347,348). Il a été démontré que les lymphocytes peuvent jouer un rôle central dans la défaillance de certains types d'implants orthopédiques (349,350), notamment les lymphocytes T helper, impliqués dans l'hypersensibilité de type IV. Une fois activés par l'antigène métallique, ils libèrent des cytokines, responsables du recrutement et de l'activation des macrophages : IL-3, GM-CSF, G-CSF (218).

MIP-1 (MIP-1 $\alpha$  et MIP1 $\beta$ ) est une chimiokine (cytokine chimiotactique) produite par divers types de cellules, y compris les cellules adaptatives (lymphocytes) et innées (monocytes et macrophages), et les cellules tissulaires (fibroblastes et épithéliales). Elle agit après activation des récepteurs spécifiques couplés aux protéines G, présents à la surface des monocytes, macrophages, neutrophiles, basophiles, éosinophiles, cellules dendritiques, lymphocytes et des plaquettes (351). Impliquée dans l'inhibition de la prolifération des cellules hématopoïétiques, la cicatrisation, le recrutement cellulaire, la migration tumorale et les infections virales, son rôle dans l'inflammation a été décrit, mais peu en lien avec les implants. Peu de données sont en effet, disponibles quant à son implication dans les réponses immunitaires adaptatives aux débris métalliques (214). *In vitro*, il a été constaté que les débris d'usure d'implants métalliques (titane) et polymères (PMMA) augmentaient la production de MIP-1 $\alpha$  par les monocytes/macrophages humains primaires, entraînant une migration accrue des monocytes. La neutralisation de MIP-1 avec un anticorps anti-MIP-1 a diminué cet effet migratoire (229). Toutefois, ces résultats n'ont pas été retrouvés par Huang et al. et Yaszay et al (352,353). Il est à noter que MIP-1 $\alpha$  favorise l'orientation et la migration des ostéoclastes, en se liant notamment au récepteur CCR1 (CC chemokine receptor-1), principalement exprimé par les ostéoclastes (354). Il joue ainsi un rôle majeur dans la résorption osseuse. En ce sens, Gibon et al. ont récemment montré que les particules UHMWPE induisaient une augmentation de la différenciation ostéoblastique *in vivo*, neutralisée par une antagoniste CCR1, en faveur de l'action chimiotactique et pro-inflammatoire de MIP-1 $\alpha$ , ligand de CCR1, dans un contexte de débris d'implant (355). MIP-1 $\alpha$  a aussi été décrit dans les ruptures d'implant induites par une infection. Enfin, Dapunt et al. ont observé une augmentation de MIP-1 dans le tissu ostéolytique comparé au muscle sain, sans différence entre les prothèses infectées ou les descellements aseptiques. Ils ont aussi mis en évidence une augmentation de production de MIP-1 par les ostéoblastes, à l'origine d'une induction de la différenciation des ostéoclastes, en cas d'infection bactérienne (356).

Dans notre étude, une cytokine est significativement diminuée dans le sang des patients porteurs de prothèse, par rapport à la population témoin : l'éotaxine (p-value = 0,024). L'éotaxine est une chimiokine inductible impliquée dans les allergies via le recrutement des éosinophiles, en se fixant sur le récepteur CCR-3 (CC chemokine receptor-3) (357–359). Cette chimiokine a été décrite initialement dans un modèle d'inflammation pulmonaire allergique chez le cochon d'Inde (360). La diminution de l'éotaxine chez les patients porteurs de prothèse est contradictoire avec l'augmentation d'IL-1 $\beta$ , puisque sa sécrétion est stimulée,

entre autre, par les cytokines pro-inflammatoires (361,362). Néanmoins, l'impact des métaux sur la production et la libération d'éotaxine n'a pas été décrit à ce jour. Les métaux lourds pourraient inhiber les signaux induisant la production d'éotaxine ou sa libération par les macrophages, fibroblastes et cellules épithéliales. L'activité de l'éotaxine est synergique avec l'IL-5 (363), qu'il serait intéressant d'étudier de manière particulière par un test Elisa plus sensible que le multiplex utilisé dans notre étude. D'autres investigations, plus approfondies, doivent être envisagées, afin d'établir l'impact des métaux sur l'éotaxine. Il est, en effet, à noter que l'utilisation de kits multiplex, bien que d'utilisation simple et rapide, ne permet pas une sensibilité aussi élevée qu'une analyse en Elisa classique. De ce fait, les résultats de plusieurs cytokines n'ont pas pu être exploités car inférieurs au seuil de la méthode (GM-CSF, IL-2, IL-5, IL-10, IL-12-p70, IL-15 et IL-17). Il est possible que certaines cytokines pertinentes dans le cas de l'inflammation induite par les implants, aux concentrations très faibles, n'aient été étudiées. De même le nombre de cytokines analysées est limité. Certaines cytokines décrites dans la littérature, telles que RANK/RANKL, TGF- $\beta$ , ou encore les métalloprotéines ou PGE2, n'ont pas été recherchées.

L'UHMWPE (polyéthylène à très haute masse moléculaire) est la particule prédominante retrouvée dans l'environnement péri-prothétique, provenant de la surface articulaire (325). Des débris métalliques et particules d'acier ont aussi été observés (364). La toxicité et l'impact pro-inflammatoire des particules peut varier selon leur nature. Par exemple, Haynes et al. ont montré que les particules de TiAlV induisaient la libération de prostaglandine PGE2, d'IL-1, de TNF, d'IL-6 tandis que les particules de CrCo diminuent la libération de PGE2 et d'IL-6 (365). Malgré des connaissances incomplètes, les particules de polyéthylène semblent les plus actives sur le plan biologique, de par leur nombre et de leur petite taille, offrant une grande surface d'interaction avec les tissus environnants (325). En effet, la taille moyenne des particules d'UHMWPE a été rapportée à 0,1-10  $\mu\text{m}$ , les particules de CoCrMo semblent inférieures à 50 nm, et les particules de céramique sont comprises entre 5 nm et 25  $\mu\text{m}$  (174,366). Néanmoins, lorsque Kaufman et al. ont exposé des macrophages à des particules de UHMWPE, d'alliage TiAlV, CoCr et d'alumine *in vitro*, les macrophages ont été davantage stimulés par les particules de TiAlV que celles de CoCr et d'alumine. Les particules d'UHMWPE étaient les moins stimulantes. Les macrophages ont sécrété des niveaux détectables d'IL-1 $\alpha$ , de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$ , de MCP-1, d'IL-8, d'IL-6, de GM-CSF, d'IL-10 et d'IL-12p40 (231).

La question de l'utilisation de ces cytokines pro-inflammatoires comme biomarqueurs de l'ostéolyse dans le diagnostic du descellement prothétique se pose. Plusieurs études vont dans ce sens (220,367–371). MIP-1 $\alpha$  a été évoqué comme un potentiel biomarqueur d'ostéolyse (354,371). Dapunt et al. ont ainsi cherché à utiliser MIP-1 comme biomarqueur d'infection de prothèse. Ils n'ont pas réussi à différencier les cas aseptiques des infections, ni via les concentrations sériques, ni par l'expression génétique (356). En revanche, une autre étude a permis de différencier infections et descellements aseptiques sur les concentrations d'IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-17A, IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  (372). Et selon Randau et al. et Ettinger et al., les concentrations d'IL-6 largement augmentées en cas d'infection de la prothèse, font de l'IL-6 un biomarqueur de choix pour différencier infection et descellement aseptique (373,374). A ce jour, aucun biomarqueur ne fait référence, bien que le taux de descellement aseptique augmente (375).

Des investigations afin de prévenir ce descellement sont en cours. L'inhibition du recrutement des précurseurs des ostéoclastes via l'inhibition locale des cytokines pourrait réduire l'inflammation dans le tissu péri-prothétique et ainsi l'usure de l'implant. L'utilisation de la protéine antagoniste du récepteur de l'IL-1 ou de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 est aussi envisagée (326). De plus, les progrès dans le revêtement et l'ostéointégration des implants (hydroxyapatite, tantale), ainsi que l'émergence de nouveaux matériaux (polyéthylène hautement réticulé, polyétheréthercétone, alliages...) permettent d'améliorer leur survie.

## **V. Conclusion**

L'étude des cytokines sur le sang de patients porteurs de prothèse a été réalisée en Elisa Multiplex. Cette technique a permis l'analyse simultanée de 27 cytokines impliquées dans le processus inflammatoire, de manière rapide mais moins sensible qu'un test Elisa classique. Nous avons constaté une augmentation de trois cytokines pro-inflammatoires chez les patients porteurs de prothèse, comparés à une population témoin : IL-1 $\beta$ , G-CSF et MIP-1 $\alpha$  et la diminution de l'éotaxine. Ces trois molécules sont responsables de l'activation des macrophages et d'autres cellules de l'immunité, impliquées dans le processus inflammatoire, induisant ainsi une ostéolyse, à l'origine du descellement de l'implant et de la nécessité de reprise de la prothèse. Le MIP-1 $\alpha$  est systématiquement augmenté chez tous les porteurs de

prothèse de notre étude, et pourrait donc être un bon marqueur de suivi d'inflammation d'une prothèse.

Le suivi de ces cytokines pro-inflammatoires, pourrait être envisagé comme biomarqueur de l'évolution de l'implant. Une reprise précoce de la prothèse pourrait ainsi limiter l'impact de l'inflammation et de la toxicité locale et systémique des prothèses.



## **Partie 3**

### **Toxicity and metabolomic impact of Cobalt, Chromium and Nickel exposure on HepaRG hepatocytes**

Marie BELLOUARD, Marie GASSER, Sébastien LENGLET, Federica GILARDI, Nasim  
BARARPOUR, Marc AUGSBURGER, Aurélien THOMAS, Jean-Claude ALVAREZ

Soumis en mai 2021 et révisé en août 2021  
dans *Toxicology in vitro*





## **Toxicity and metabolomic impact of Cobalt, Chromium and Nickel exposure on HepaRG hepatocytes**

M.Bellouard<sup>1, 2, §</sup>, M.Gasser<sup>3, 4, §</sup>, S.Lenglet<sup>3</sup>, F.Gilardi<sup>3, 4</sup>, N. Bararpour<sup>5</sup>, M.Augsburger<sup>3</sup>, A.Thomas<sup>3, 4</sup>, J.C.Alvarez<sup>1, 2\*</sup>

<sup>1</sup>*Service de Pharmacologie-Toxicologie, Groupe Hospitalier Universitaire AP-HP. Paris-Saclay, hôpital Raymond Poincaré, FHU Sepsis, 104 bvd R. Poincaré 92380 Garches, France*

<sup>2</sup>*Plateforme MasSpecLab, UMR1173, Inserm, Université Paris Saclay (Versailles Saint Quentin-en-Yvelines), 2 Avenue de le Source de la Bièvre, 78180 Montigny-le-Bretonneux, France*

<sup>3</sup>*Unit of Forensic Toxicology and Chemistry, CURML, Lausanne University Hospital and Geneva University Hospitals, Lausanne-Geneva, Switzerland*

<sup>4</sup>*Faculty Unit of Toxicology, CURML, Faculty of Biology and Medicine, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland*

<sup>5</sup>*Department of Genetics, Stanford School of Medicine, Stanford, CA 94305*

\*corresponding author: [jean-claude.alvarez@aphp.fr](mailto:jean-claude.alvarez@aphp.fr) Tel: +33147107938; Fax:

+33147107923

§These authors contributed equally

### **Abstract**

Cobalt, chromium and nickel are used in orthopedic prostheses. They can be released, accumulate in organs, such as liver, and be toxic. The aim of this study is to evaluate the cytotoxicity of these metals on human hepatocytes and to improve our knowledge of their cellular toxicity mechanisms by a metabolomic analysis. HepaRG cells were incubated for 48

hours with increasing concentrations of metals, to determine their IC<sub>50</sub>. Then, a non-targeted metabolomic study using LC-HRMS was done at the IC<sub>50</sub> and at a lower concentration (100 nM), near to those found in blood and liver of patients with prostheses. IC<sub>50</sub> were defined at 940, 2 and 1380 µM for Co, Cr and Ni, respectively. Cr appears to be much more toxic than Co and Ni. Metabolomic analysis revealed the disruption of metabolic pathways from the low concentration of 100 nM, in particular tryptophan metabolism and lipid metabolism illustrated by an increase in phenylacetylglycine, a marker of phospholipidosis, for all 3 metals. They also appear to be responsible for oxidative stress. Dysregulation of these pathways impacts hepatocyte metabolism and may result in hepatotoxicity. Further investigations on accessible biological matrices should be conducted to correlate our *in vitro* results with the clinic of prostheses-bearing patients.

**Keywords:** HepaRG cells, metals, cytotoxicity, IC<sub>50</sub>, metabolomic analysis, metabolic pathways

## Introduction

Cobalt (Co), chromium (Cr) and nickel (Ni) are used in orthopedics in metal-on-metal (MoM) prostheses. With wear, prostheses may be responsible for metal release in the body, causing toxicity for prosthesis-bearing patients (Bradberry et al., 2014; Laurençon et al., 2016; Polyzois et al., 2012). The toxicity of these metals has been widely demonstrated, especially Co, explaining why MoM prostheses are monitored in France by Co measurement in blood (< 2 µg/L: safety of use, 2-7 µg/L: monitoring and further examination, > 10 µg/L: indication of revision) (ANSM, 2014).

Co salts were classified as group 2A (probably carcinogenic to humans) and 2B (possibly carcinogenic to humans) by the International Agency for Research on Cancer (IARC et al., 2006). Co tropism seems to be mainly liver, kidneys, pancreas and heart. Thyroid gland, lungs, skin, immune system, heart and brain may also be particularly affected by Co exposure (Catalani et al., 2012; Cheung et al., 2016; Leggett, 2008; Mao et al., 2011; Simonsen et al., 2012). Some mechanistic hypotheses were advanced to explain this toxicity. Co induces oxidative stress and reactive oxygen species (ROS) production via a Fenton reaction (Beyersmann and Hartwig, 2008; Petit et al., 2005), causing oxidative damage to DNA, lipids and proteins or K-ras oncogene mutation (National Toxicology Program, 1998). Moreover, Co may inhibit important enzymes due to its high affinity for sulfhydryl groups (Barceloux and Barceloux, 1999a). Finally, Co may upregulate the hypoxia-inducible factor HIF-1 $\alpha$  that is normally degraded in presence of oxygen, hence promoting tumor development by inducing the expression of genes controlling erythropoietin synthesis, angiogenesis, glucose uptake... (Beyersmann and Hartwig, 2008; Maxwell and Salnikow, 2004).

Cr exists in many oxidation states but the most stable are trivalent (CrIII) and hexavalent (CrVI) Cr. CrIII is an essential trace element (IARC working group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 1990). On the other hand, CrVI is irritant and

corrosive, with an acute toxicity by cutaneous absorption, inhalation or ingestion and a chronic toxicity leading to cutaneous lesions, lung cancers, respiratory pathologies, nephrotoxicity, intestinal disorders, teratogenic effects, etc. (Baruthio, 1992). Thus, it was classified as group 1 carcinogen by the IARC. Cr is responsible for the production of ROS (superoxide anion and hydroxyl radicals), inducing oxidative stress and thus, genomic DNA damage and oxidative deterioration of lipids and proteins (Bianchi et al., 1980; Valko et al., 2005). It also alters apoptosis regulation via the activation of the p53 tumor suppressor gene (Bagchi et al., 2001). Cr interacts with DNA to form adducts that interfere with DNA replication and may lead to DNA double strand breaks (Dayan and Paine, 2001). Finally, Cr also dysregulates the epigenetic profile of cells at the levels of DNA methylation and histone modification (DesMarias and Costa, 2019; Rager et al., 2019; Salnikow and Zhitkovich, 2008).

Acute toxicity of Ni leads to nausea, diarrhea, headaches, dyspnea, skin lesions or pulmonary fibrosis (Barceloux and Barceloux, 1999b). Accumulation of Ni in the body can cause lung fibrosis, kidney and cardiovascular diseases, allergic dermatitis, asthma or respiratory tract cancer (Chen et al., 2017). That is why IARC classified Ni compounds as group 1 carcinogen and Ni alloys as group 2B (IARC, 2012). Ni may affect different mechanisms of carcinogenesis such as chromosomal damage, inhibition of DNA repair, mutagenesis and tumor promotion (Sunderman, 1989) by binding to DNA and nuclear proteins. Ni is also responsible for epigenetic alterations : inhibition of DNA methyltransferase and dioxygenases, induction of hypermethylation, gene silencing... (Chen and Costa, 2009; Chen et al., 2017). As Co and Cr, Ni participates in oxidative stress and glutathione depletion (Cameron et al., 2011) and binds to sulfhydryl group proteins (Valko et al., 2005). At last, Ni induces apoptosis by activating caspases and the formation of death-inducing signaling complex (Ahamed et al., 2013; Genchi et al., 2020; Guo et al., 2016).

Co, Cr and Ni are distributed in tissues, in particular liver, lungs and kidneys (Rezuke et al., 1987; Smith et al., 1972; Wilbur et al., 2012), hence being responsible of hepatotoxicity through several mechanisms: oxidative stress, structural changes, cholesterol functions alteration, hyperplasia and cell death (Das et al., 2015; Mathur et al., 2011; Renu et al., 2021). HepaRG cells are human hepatocytes that exhibit few alterations in their karyotype (Gripon et al., 2002) and express various cytochromes and phase I and II xenobiotic metabolizing enzymes. They possess both the metabolic performances of primary cells and the growth capacity of hepatic cell lines (Guillouzo et al., 2007). Thus, this cell line is widely used for hepatotoxicity, drug biotransformation and hepatic function studies (Anthérieu et al., 2012). The aim of this study was to evaluate the toxicity of metals contained in MoM prostheses (Co, Cr, Ni) on human hepatocytes (HepaRG cells) and to perform a metabolomic analysis to improve our knowledge of the mechanisms of the metal toxicity at the cellular level.

## **Materials and methods**

### Chemicals, Reagents and materials

HPLC-grade methanol, water, formic acid (FA) and ammonium formate were purchased from Biosolve (Dieuze, France). William's E medium, fetal bovine serum (FBS), glutamine, penicillin, streptomycin, phosphate-buffered saline (PBS) and TrypLE Express enzyme were obtained from Gibco® Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts), Hydrocortisone hemisuccinate and Dimethyl Sulfoxide (DMSO) from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri) and human insulin from Eli Lilly (Indianapolis, Indiana). Cobalt, chromium nitrate and nickel in aqueous solution in 5% of HNO<sub>3</sub> were furnished by LGC standards (Manchester, UK).

### Cell culture

HepaRG cells were purchased from the laboratory of clinical pharmacology of Geneva University Hospital. Cells were seeded in 75 cm<sup>2</sup> flasks. The culture medium consisted of 500 mL William's E medium supplemented with 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 50 µM hydrocortisone hemisuccinate, 5 µg/mL human insulin, 10% FBS and 2 mM glutamine. When they reached 80% confluency, cells were rinsed with PBS and then trypsinization with 5 mL TrypLE Express enzyme for 5 minutes at 37°C allowed to remove cells from the flask. The medium was recovered and centrifuged at 200 rcf for 5 minutes. The cell pellet was also recovered and resuspended in 2 mL of complete medium. HepaRG cells were counted in 10 µL of trypan blue, on slide via automatic counter and inoculated in 24-well plates (0.26x10<sup>6</sup> cells/cm<sup>2</sup>). Once they reached confluency, 1.5% DMSO was added to induce differentiation for two weeks.

### Determination of the IC<sub>50</sub>

The half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) represents the concentration that inhibits 50% of cellular biological functions. After a review of the literature (Bresson et al., 2006; Elloumi-Mseddi et al., 2018; Ermolli et al., 2001; Tanaka et al., 2005; Terpiłowska et al.,

2018), the cells were incubated with ten levels of Co, Cr and Ni concentrations for 48 hours at 37°C in FBS-free medium: 10, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000 µM for Co and Ni and 0.5, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 50000 µM for Cr.

Cytotoxicity was evaluated with the MTT assay (Vybrant®, ThermoFisher). Briefly, after solubilization of the MTT reactant in PBS, serum-free medium containing 0.1% MTT reactant was added to each well and incubated for 4 hours at 37°C. The incubation solution was removed and the water-insoluble formazan was dissolved in DMSO before measuring the absorbance at 540 nm. The reported result is the average of two independent experiments in duplicate for each condition. The IC<sub>50</sub> was determined by nonlinear regression with GraphPad Prism 7.03 software (GraphPad Software, San Diego, California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

#### *Exposition to cobalt, chromium and nickel*

The HepaRG cells were plated and differentiated in 6-well plates (0.22x10<sup>6</sup> cells/cm<sup>2</sup>). After two weeks, cells were incubated with the metal solutions in FBS-free medium during 48 hours at 37°C. The experiment was performed two times in quadruplicate for each metal. Two concentrations levels were tested: the IC<sub>50</sub> previously defined by the MTT assay and a low concentration at 100 nM. The concentration at 100 nM was chosen to approximate the blood and liver levels of metals found in autopsied prosthesis-bearing patients. It was established after a thorough review of the literature (Campbell et al., 2003; Case et al., 1994; Dobbs and Minski, 1980; Jantzen et al., 2013; Rodríguez de la Flor et al., 2013) and determination by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (Grassin-Delye et al., 2019) of the blood and liver concentrations of Cr, Co and Ni in 25 patients with prostheses (Martin et al., 2019). At 100 nM, no morphological changes were observed in compound inverted microscopy.

#### *Sample pre-treatment*

After aspiration of the medium, the plates were incubated with a mixture of methanol/ethanol/water (2:2:1) in the presence of internal standards (phenobarbital-d5 and hydrocodone-d6) for 20 minutes at -80°C. The plates were scraped with a cell scraper and the mixture was transferred into Eppendorf tubes. After agitation in the presence of metal balls, Eppendorf tubes were centrifuged to agglomerate the cell debris. The supernatant was transferred, evaporated and then stored at -80°C. Before analysis by LC-HRMS, 100 µL of 10% methanol were added, mixed and then centrifuged before recovering the supernatant for analysis.

#### LC-HRMS

A Thermo Scientific Ultimate 3000 LC system with a C18 column (Phenomenex Kinetex, C18 - 50 mm × 2.1 mm, 2.6 µm) maintained at 45°C was used for chromatographic separation. Mobile phases were composed of A, methanol with 0.1% formic acid, and B, water with 0.1% formic acid. Phase A was ramped linearly from 2 to 98% over 6 minutes, and reached 100% at the 9<sup>th</sup> minute, followed by a 4 minutes re-equilibration at 2%. The total analysis run was 13 minutes with a debit of 300 µL/min. The LC was coupled to a Q Exactive Plus system (Thermo Scientific, Bremen, Germany) via a heated electro spray ionization (ESI) source (H-ESI II probe, Thermo Scientific). The ionization spray voltage was set to 3.20 and 2.90 kV in positive and negative mode respectively, sheath gas flowrate to 40 and 10 respectively, and auxiliary gas flowrate to 10 (both in arbitrary units). The data were acquired in full scan mode, in negative and positive polarity. The acquisition software was Xcalibur 3.1.66.10.

Quality controls were performed by pooling 20 µL of each sample together after resuspension in 10% methanol. They were injected every 8 samples to check if no deviation in the retention time occurs across the batch and to verify that all the molecules came out throughout the run.



### Data analysis

After conversion of the raw data obtained by LC-HRMS to the appropriate mzXML format, analysis by the XCMS online software 3.7.1 (The Scripps Research Institute, San Diego) allowed peak detection, chromatogram alignment and isotope annotation. Missing data were estimated using the *emvd* function of the *dbnorm* R package (Bararpour et al., 2021). Pre-processed data were normalized using MS Total Useful Signal (MSTUS), a normalization method available on the NOREVA online software (Li et al., 2017; Yang et al., 2020). Normalized data were log 2 transformed and Linear Models for Microarray data (LIMMA) using R software were applied to compare the different conditions of metal exposition, control versus 100 nM and control versus the IC<sub>50</sub>. Differences were considered significant if the adjusted p-value (adj. p-value) was < 0.05. Features of interest were thus highlighted and identified according to their mass to charge ratio, retention time, MS/MS fragmentation and presence in humans, via open access libraries such as the Human Metabolome Database (HMDB) or Metlin databases, and via an in-house library. Metabolites identified (with HMDB and KEGG IDs) in both positive and negative modes were regrouped and the online statistical tool MetaboAnalyst 4.0 (Xia Lab, McGill University) was used for multivariate statistical analysis (Heatmap). Identified metabolites were processed in Consensuspathdb software (Kamburov et al., 2009) to identify metabolic pathways impacted by metal exposure, exploiting the Reactome database. Only pathways involving at least two statistically significant metabolites with an adj. p-value < 0.05 were studied.

## Results

### Determination of the IC<sub>50</sub>

In HepaRG cells, after 48 hours of exposure to ten increasing levels of Co and Ni concentrations (10, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000  $\mu$ M) and Cr concentration (0.5, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 50000  $\mu$ M), MTT assay was carried out. Results of determination of IC<sub>50</sub> are presented in Figure 1. IC<sub>50</sub> values of 940  $\mu$ M for Co (Figure 1A), 2  $\mu$ M for Cr (Figure 1B) and 1380  $\mu$ M for Ni (Figure 1C) were measured.

### Metabolomic analysis

Detected, significant and identified features for the three metals are reported in Table 1 with the associated impacted biological pathways.

	<b>Cobalt</b>	<b>Chromium</b>	<b>Nickel</b>
<b>Detected features</b>	19'361		
<b>Significant features</b>	99	194	100
<b>Identified features</b>	13	27	13
<b>Impacted biological pathways</b>	9	36	2

**Table 1.** Detected metabolites in both ionization modes associated with the treatment of HepaRG cells with the three metals during 48 hours at 100 nM. The significant changes between control and metal treatment conditions were assessed (adj. p value < 0.05). These identified metabolites allowed to shed light on the biological pathways impacted by the metal treatments.

Figure 2 heatmaps represent the intensity levels in control, 100 nM, and IC<sub>50</sub> conditions of the significant features highlighted by the statistical analysis at 100 nM for the three metals. For the three analyzed metals, heatmaps presented in Figure 2 show a good separation between the three conditions of exposure.

Different metabolites of interest monitored at 100 nM and at the IC<sub>50</sub> for each metal are shown in Figure 3. At 100 nM, only one metabolite was increased by all three metals: an

amino acid derivative, phenylacetylglycine (Figure 3A). Alpha-tocotrienol (lipid, Figure 3B) was decreased by Co and Cr at 100 nM and 3-isopropylmalate (fatty acid) was decreased by Co and increased by Ni at 100 nM. Fatty acids were the main class of metabolites impacted by Co at 100 nM (phenylacetylglycine, 3-isopropylmalate, phosphatidylethanolamine and derivatives (PE, PE-NMe), ceramides, cholesteryl ester (CE)). After 48 hours of Cr exposure (100 nM), the metabolites impacted in HepaRG cells were mainly nucleosides (hypoxanthine, inosine, adenosine, guanosine, uridine, guanine), fatty acids, steroids (adrenosterone, calcidiol) and amino acids (L-Aspartic acid (Figure 3C), L-Methionine, L-Glutamic acid (Figure 3D)). For Ni, we highlighted some fatty acids (phenylacetylglycine, L-acetylcarnitine, 3-isopropylmalate, butyrylcarnitine, methylmalonylcarnitine), amino acids (S-(2-carboxypropyl)-cysteamine, acetylcysteine), a saccharide (deoxyribose 1-phosphate), a corticosteroid (11-Dehydrocorticosterone) and a pyrimidine (dihydrothymine). Functional pathways involving several of these metabolites, reported in Table 1, were identified with an adj. p-value < 0.05 and are presented in Figure 4. The bar chart represents the adj. p-values for each pathway impacted by Co, Cr or Ni. Metabolism, signal transduction, transport of small molecules and cellular responses to external stimuli were significantly impacted by Co at 100 nM (in green). In addition to these pathways, DNA repair function was also impacted after Cr exposure (in blue). At 100 nM, Ni seemed to have an effect only on the metabolism of nucleotides (in red).

## Discussion

In this study, we first evaluated the cytotoxicity of Co, Cr and Ni after an acute exposure of human hepatocytes by determining their  $IC_{50}$  values (940  $\mu$ M, 2  $\mu$ M and 1380  $\mu$ M, respectively). We then highlighted that a low exposure at 100 nM of the three metals has already an impact on metabolites and biological pathways in human hepatocytes.

### $IC_{50}$

Among the three metals, Cr is the most toxic for HepaRG cells with an estimated  $IC_{50}$  about 500 to 700 times smaller than that of Co and Ni. However, in order to confirm more precisely the  $IC_{50}$  of Cr, the experiment should be repeated with an increased number of low concentrations. To the best of our knowledge, no cytotoxicity studies have been published on human hepatocytes for Cr and Co and only one for Ni, but the values of the  $IC_{50}$  found for HepaRG cells were consistent with previous publications for other types of cells. Co, Cr and Ni  $IC_{50}$  values of different studies found in literature are reported in Table 2. The comparison of our results with those found in the literature is delicate because the cell types and exposure conditions were different. However, the  $IC_{50}$  of Cr in HepaRG cells was close to those obtained for other human cell models (Elloumi-Mseddi et al., 2018; Tanaka et al., 2005). For Co, there is a wide variation in  $IC_{50}$  among published studies (Cross et al., 2001; Yamamoto et al., 1998). The  $IC_{50}$  of Co in HepaRG cells was higher than in keratinocytes (Bresson et al., 2006), for similar exposure conditions. For Ni, the only cytotoxicity study on human hepatocytes found in the literature presented an  $IC_{50}$  slightly lower than ours, for a 24-hour exposure (Terpiłowska et al., 2018). To go further, it would be interesting to measure by ICP-MS the concentrations of metals in the medium and in the cell lysates, in order to determine the quantity really integrated by the cells.

Metal	Cell type	Exposure Duration	IC <sub>50</sub> (μM)	Reference
Co	Murine osteoblastic cells (MC3T3-E1) Murine fibroblasts (L929)	8 days	11 81	(Yamamoto et al., 1998)
	Human keratinocytes (HaCaT)	24 hours	620	(Ermolli et al., 2001)
	Human keratinocytes (HaCaT)	48 hours	475	(Bresson et al., 2006)
	Alveolar epithelial cells	4 hours	1100	(Cross et al., 2001)
	Bronchial epithelial cell	24 hours	339	(Bresson et al., 2013)
Cr	Murine osteoblastic cells (MC3T3-E1) Murine fibroblasts (L929)	8 days	9 1.6	(Yamamoto et al., 1998)
	Human Cervical Carcinoma cell (HeLa) Human Neuroblast (NB-1) Rat Kidney cells (NRK-52E)	24 hours	4 3 10	(Tanaka et al., 2005)
	Rat liver derivate cell line (H4-II-E-C3)	24 hours	10	(Permenter et al., 2011)
	Human Cervical Carcinoma cell (HeLa) Human Epithelial Colorectal Adenocarcinoma (Caco-2) HeLa derivative cell line (Hep-2) Human Breast Adenocarcinoma (MCF-7) Human embryonic kidney cells (Hek 293)	48 hours	2.6 2.4 1.9 20.9 1.4	(Elloumi-Mseddi et al., 2018)
	Murine osteoblastic cells (MC3T3-E1) Murine fibroblasts (L929)	8 days	52 106	(Yamamoto et al., 1998)
	Human Cervical Carcinoma cell (HeLa) Human Neuroblast (NB-1) Rat Kidney cells (NRK-52E)	24 hours	319 530 786	(Tanaka et al., 2005)
	Rat liver derivate cell line (H4-II-E-C3)	24 hours	400	(Permenter et al., 2011)
Ni	Human lymphocytes	12 hours	1000	(Zarei et al., 2018)
	Human liver cancer (HepG2)	24 hours	400-1200	(Terpiłowska et al., 2018)

**Table 2.** Literature review of Co, Cr and Ni IC<sub>50</sub> values in human and animal cells.

### Metabolomic analysis

To explore cellular mechanisms of toxicity of the three metals, we performed non-targeted metabolomic study, at a low concentration (100 nM, comparable to that found in prosthesis-wearing patients, without cytotoxicity (Martin et al., 2019)) and at the IC<sub>50</sub> for each metal. We mainly focused on the results at 100 nM to be closer to the concentrations found *in vivo* and to exclude the biological effects that could be triggered by the cellular death processes that have already been initiated by the IC<sub>50</sub>.

Metabolomics is an analytical technique to comprehensively study the metabolic pathways of a biological system, by investigating the overall changes of metabolites after exogenous stimulation. It has a real interest in cytotoxicity studies, particularly for *in vitro* studies. Experimental conditions are easier to set up than *in vivo* with a better repeatability, a fewer sample size and thus a reduced cost (Clish, 2015; Wang et al., 2019). Only few metabolomic data on Co, Cr and Ni are available in the literature and even less on human cell lines.

Heatmaps are good visualization tools for metabolomic data, highlighting group and feature clustering and the variation between the studied conditions (Wilkinson and Friendly, 2009). In the three heatmaps (Figure 2), some metabolites were either expressed in the controls and downregulated by the treatments at the two concentrations, or not expressed in the controls and upregulated by the treatments. These results suggest that there was an impact of the three metals from 100 nM, highlighting the metabolic dysregulation occurring after an acute exposure of 48 hours at a concentration found in prosthesis-bearing patients. As expected, at the IC<sub>50</sub>, the effects of the treatments were strongly exacerbated, in accordance with a dose/effect relationship, or altered by the cellular death process.

### *Lipid and amino-acid metabolism*

The only altered metabolite common to all three metals was phenylacetyl glycine. This amino acid derivative was significantly increased at both concentrations, as shown in Figure 3A. Phenylacetyl glycine is a terminal product of phenylalanine metabolism and is described as a biomarker of phospholipidosis (Delaney et al., 2004). This excessive accumulation of phospholipids in tissues, especially in hepatocytes, may be responsible for liver toxicity via vacuolated hepatocytes and necrosis (Doessegger et al., 2013). Indeed, in our study, many fatty acids were increased for the three metals at 100 nM, especially phospholipids for Cr and Co, with a dysregulation of phospholipid metabolism (adj. p-value = 0.01). Glycerophospholipid biosynthesis and catabolism (adj. p-value = 0.008 and 0.002, respectively), arachidonic acid and lipid metabolism (adj. p-value < 0.05) were also impacted by Cr. These results were in accordance with previous studies: Pal and Shil have highlighted the increase of fatty acid synthase and isocitrate dehydrogenase to promote lipogenesis, and cholesterol and triglyceride elevated levels after Cr intoxication (Pal and Shil, 2018).

The increase of phenylacetyl glycine was also bound to the perturbation of histidine, lysine, phenylalanine, tyrosine, proline and tryptophan catabolism (adj. p-value = 0.011) for Cr at 100 nM. Our study showed an alteration of some amino-acids, such as aspartate and glutamate (Figures 3C and 3D) for Cr at 100 nM and for the three metals at the IC<sub>50</sub>, in accordance with the Oliveira et al. study on human keratinocytes (Oliveira et al., 2016). These two amino-acids are involved in cell proliferation and survival, via tricarboxylic acid cycle (Alkan et al., 2018; Alkan and Bogner-Strauss, 2019).

It could be interesting to investigate the variations of phenylacetyl glycine in biological matrices of prosthesis-bearing patients. The monitoring of this biomarker might be relevant in the follow-up of these patients.

### *Tryptophan metabolism*

As mentioned above, we highlighted an alteration of tryptophan metabolism. Figure 3E shows a significant increase of tryptophan for the three metals at the IC<sub>50</sub> with an increasing trend already at 100 nM for Cr, but without significance. A metabolite of tryptophan, 5-hydroxy-L-tryptophan was also significantly impacted at 100 nM of Co (adj. p-value = 0.017) and at IC<sub>50</sub> for the three metals. Tryptophan is the precursor of serotonin, a major neurotransmitter that modulates numerous central nervous systems functions (behavior, mood, pain, anxiety, memory...) (Sandyk, 1992). Earlier publications mention the alteration of tryptophan metabolism by heavy metals (El-Sewedy et al., 1974; Ogasawara et al., 1962; Saran, 1958). One study revealed that exposure to metals significantly affected the metabolic status of tryptophan, arginine, proline, tyrosine and lysine metabolism in the maternal body during pregnancy (Wang et al., 2018). El Sewedy investigated the *in vitro* effects of some metal ions, including Co<sup>2+</sup>, on the metabolism of kynurenine, the central metabolite in the kynurenine pathway of tryptophan metabolism, and its conversion into anthranilic and kynurenic acids via the B6-dependent enzymes. Co<sup>2+</sup> may block and inactivate the –SH groups of the kynurenine hydrolase and also may inhibit the vitamin B6-independent enzyme kynurenine hydroxylase (El-Sewedy et al., 1974). Interestingly, kynurenine was significantly decreased at the IC<sub>50</sub> for the three metals in our study.

Clinically, a disruption of kynurenine pathway of tryptophan metabolism may cause neurological disorders (Lovelace et al., 2017). Neuropsychiatric symptoms were described after MoM implant failure (Green et al., 2017; Shanmugam et al., 2020). It could be interesting to complete this *in vitro* study by clinical observations to evaluate the impact of these metals on tryptophan metabolism at the systemic level.



### *Oxidative stress*

Alpha-tocotrienol (Figure 3B), which has an antioxidant activity (Packer et al., 2001), was significantly decreased for both Cr and Co at 100 nM (adj. p-value = 0.037 and 0.047 respectively). This result is in agreement with the knowledge that metals generate oxidative stress (Jomova and Valko, 2011; Valko et al., 2005). We also followed a biomarker of oxidative stress, glutathione and one of its precursors, glutamate (Amores-Sánchez and Medina, 1999). Indeed, glutathione is a tripeptide of glutamate, cysteine and glycine, with a high antioxidant activity (Li et al., 2002; Narayanankutty et al., 2019). It is involved in the detoxification of ROS and is depleted during oxidative stress (Forman et al., 2009). In our study, both glutamate and glutathione were depleted at the IC<sub>50</sub> for the three metals and glutamate was already significantly decreased at 100 nM of Cr (Figure 3D and 3F).

Pan et al. have previously reported that Cr may generate oxidative stress and apoptosis (Pan et al., 2012). Zarei et al. also showed an association between NiCl<sub>2</sub> cytotoxicity and an increase of ROS formation and glutathione depletion (Zarei et al., 2018).

Moreover, interactions among heavy metal exposure, ROS and signal transduction have been reported (DeMoor and Koropatnick, 2000; Paithankar et al., 2021). Paithankar et al. highlighted that regulators of heavy metal-induced oxidative stress, such as MAPK, JNK, NRF-2, HIF, NF-κB were disrupted in presence of Cr. Thus, heavy metals may dysregulate ROS that interact with signaling pathways. Consistent with these studies, signal transduction, and in particular signaling by G protein-coupled receptors (GPCR), involved in many signaling events, using a variety of pathways that include MAPK or JNK (Kristiansen, 2004), was significantly impacted by Cr and Co at 100 nM in our study (adj. p-value = 0.01 and 0.05 respectively). Guo et al. also highlighted that Cr may perturb G-protein signaling (Guo et al., 2013).

In our study, the 48 hours exposure was certainly imitating more an acute than a chronic exposure, which expected when patients are bearing prosthesis. The treatment, made with serum-free medium to remove any bias due to the serum composition, does not allow longer exposure to avoid cellular alteration. However, this acute exposure already shed light on the effects of Co, Cr and Ni on different metabolites and biological pathways, suggesting that a more chronic exposure could exacerbate the effects of the three metals. Moreover, our results cannot be directly transposed *in vivo*. It should be noticed that the medium used did not contain blood transporters. Thus, the concentration of each metal did not correspond to the circulating concentration in blood, where they are partially bound to proteins (Merritt et al., 1984).

Besides, MS/MS analyses and confirmation by standards should be performed to verify identified metabolites. Further studies are also necessary to perform quantitative measurements of the highlighted metabolites and to follow their changes in a dose effect study. Moreover, following these *in vitro* results, additional studies in humans will be required to determine the systemic clinical impact of these metals contained in prostheses. As we know that these metals have as a target organ the liver, it would also be interesting to look at their hepatic concentrations in autopsied prosthesis-bearing subjects compared to non-prosthesis-bearing subjects. And in the context of assessing toxicity of prostheses in humans, evaluate these metals toxicity at a low concentration, in other kinds of cells, especially the bone tissue, in direct contact with the prosthesis, could be relevant. In any case, careful monitoring of patients with prostheses is required to detect early degradation of the implant and to prevent metal toxicity.

## **Conclusion**

This study allowed to determine the cytotoxicity of cobalt, chromium and nickel on human HepaRG hepatocyte cells and highlighted higher toxicity of Cr, as compared to Co and Ni. We studied the impact of these three metals on cellular metabolism through non-targeted metabolomic approach. This *in vitro* study has revealed the impact of a low concentration of Co, Cr and Ni, similar to the concentrations found in prosthesis-wearing patients, on HepaRG cell activity. Oxidative stress and dysregulation of metabolisms, in particular of lipids and tryptophan, were emphasized. It would be interesting to see if these alterations at the cellular level may have an impact at the systemic level, especially in terms of phospholipidosis or neurological disorders. Further investigations by measuring the expression of key genes in the significant impacted pathways would support our results and increase the knowledge of the mechanisms of toxicity of heavy metals.

## **Acknowledgments**

We thank Pr Youssef Daali, head of the laboratory of clinical pharmacology of Geneva University Hospitals, for providing us HepaRG cells. Aurélien Thomas is supported by the Swiss National Science Foundation (#31003A-182420).

The authors declare that there is no conflict of interest.

## **References**

- Ahamed, M., Ali, D., Alhadlaq, H.A., Akhtar, M.J., 2013. Nickel oxide nanoparticles exert cytotoxicity via oxidative stress and induce apoptotic response in human liver cells (HepG2). *Chemosphere* 93, 2514–2522. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.09.047>
- Alkan, H.F., Bogner-Strauss, J.G., 2019. Maintaining cytosolic aspartate levels is a major

function of the TCA cycle in proliferating cells. *Molecular & Cellular Oncology* 6, e1536843. <https://doi.org/10.1080/23723556.2018.1536843>

Alkan, H.F., Walter, K.E., Luengo, A., Madreiter-Sokolowski, C.T., Stryeck, S., Lau, A.N., Al-Zoughbi, W., Lewis, C.A., Thomas, C.J., Hoefler, G., Graier, W.F., Madl, T., Vander Heiden, M.G., Bogner-Strauss, J.G., 2018. Cytosolic Aspartate Availability Determines Cell Survival When Glutamine Is Limiting. *Cell Metab* 28, 706-720.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.07.021>

Amores-Sánchez, M.I., Medina, M.A., 1999. Glutamine, as a precursor of glutathione, and oxidative stress. *Mol Genet Metab* 67, 100–105. <https://doi.org/10.1006/mgme.1999.2857>

Anthérieu, S., Chesné, C., Li, R., Guguen-Guillouzo, C., Guillouzo, A., 2012. Optimization of the HepaRG cell model for drug metabolism and toxicity studies. *Toxicol In Vitro* 26, 1278–1285. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.05.008>

Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S.J., 2001. Chromium (VI)-induced oxidative stress, apoptotic cell death and modulation of p53 tumor suppressor gene. *Mol Cell Biochem* 222, 149–158.

Bararpour, N., Gilardi, F., Carmeli, C., Sidibe, J., Ivanisevic, J., Caputo, T., Augsburger, M., Grabherr, S., Desvergne, B., Guex, N., Bochud, M., Thomas, A., 2021. DBnorm as an R package for the comparison and selection of appropriate statistical methods for batch effect correction in metabolomic studies. *Sci Rep* 11, 5657. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84824-3>

Barceloux, D.G., Barceloux, D.D., 1999a. Cobalt. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology* 37, 201–216. <https://doi.org/10.1081/CLT-100102420>

Barceloux, D.G., Barceloux, D.D., 1999b. Nickel. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology* 37, 239–258. <https://doi.org/10.1081/CLT-100102423>

Baruthio, F., 1992. Toxic effects of chromium and its compounds. *Biol Trace Elem Res* 32, 145–153. <https://doi.org/10.1007/BF02784599>

Beyersmann, D., Hartwig, A., 2008. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch Toxicol* 82, 493–512. <https://doi.org/10.1007/s00204-008-0313-y>

Bianchi, V., Toso, R.D., Debetto, P., Levis, A.G., Luciani, S., Majone, F., Tamino, G., 1980. Mechanisms of chromium toxicity in mammalian cell cultures. *Toxicology* 17, 219–224. [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(80\)90097-9](https://doi.org/10.1016/0300-483X(80)90097-9)

Bradberry, S.M., Wilkinson, J.M., Ferner, R.E., 2014. Systemic toxicity related to metal hip prostheses. *Clin Toxicol (Phila)* 52, 837–847. <https://doi.org/10.3109/15563650.2014.944977>

Bresson, C., Darolles, C., Carmona, A., Gautier, C., Sage, N., Roudeau, S., Ortega, R., Ansoborlo, E., Malard, V., 2013. Cobalt chloride speciation, mechanisms of cytotoxicity on human pulmonary cells, and synergistic toxicity with zinc. *Metallomics* 5, 133–143. <https://doi.org/10.1039/c3mt20196a>

Bresson, C., Lamouroux, C., Sandre, C., Tabarant, M., Gault, N., Poncy, J.L., Lefaix, J.L., Auwer, C. den, Spezia, R., Gaigeot, M.-P., Ansoborlo, E., Mounicou, S., Fraysse, A., Devès, G., Bacquart, T., Sez nec, H., Pouthier, T., Moretto, P., Ortega, R., Lobinski, R., Moulin, C., 2006. An interdisciplinary approach to investigate the impact of cobalt in a human keratinocyte cell line. *Biochimie* 88, 1619–1629. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.09.003>

Cameron, K.S., Buchner, V., Tchounwou, P.B., 2011. Exploring the Molecular Mechanisms of Nickel-Induced Genotoxicity and Carcinogenicity: A Literature Review. *Rev Environ*

Health 26, 81–92.

Campbell, P., Urban, R.M., Catelas, I., Skipor, A.K., Schmalzried, T.P., 2003. Autopsy analysis thirty years after metal-on-metal total hip replacement. A case report. *J Bone Joint Surg Am* 85, 2218–2222. <https://doi.org/10.2106/00004623-200311000-00027>

Case, C.P., Langkamer, V.G., James, C., Palmer, M.R., Kemp, A.J., Heap, P.F., Solomon, L., 1994. Widespread dissemination of metal debris from implants. *J Bone Joint Surg Br* 76, 701–712.

Catalani, S., Rizzetti, M.C., Padovani, A., Apostoli, P., 2012. Neurotoxicity of cobalt. *Hum Exp Toxicol* 31, 421–437. <https://doi.org/10.1177/0960327111414280>

Chen, H., Costa, M., 2009. Iron- and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases: an emerging group of molecular targets for nickel toxicity and carcinogenicity. *Biometals* 22, 191–196. <https://doi.org/10.1007/s10534-008-9190-3>

Chen, Q.Y., Brocato, J., Laulicht, F., Costa, M., 2017. Mechanisms of Nickel Carcinogenesis, in: Mudipalli, A., Zelikoff, J.T. (Eds.), *Essential and Non-Essential Metals: Carcinogenesis, Prevention and Cancer Therapeutics, Molecular and Integrative Toxicology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 181–197. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-55448-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-55448-8_8)

Cheung, A.C., Banerjee, S., Cherian, J.J., Wong, F., Butany, J., Gilbert, C., Overgaard, C., Syed, K., Zywiell, M.G., Jacobs, J.J., Mont, M.A., 2016. Systemic cobalt toxicity from total hip arthroplasties: review of a rare condition Part 1 - history, mechanism, measurements, and pathophysiology. *Bone Joint J* 98-B, 6–13. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.98B1.36374>

Clish, C.B., 2015. Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine. *Cold Spring Harb Mol Case Stud* 1. <https://doi.org/10.1101/mcs.a000588>

Cross, D.P., Ramachandran, G., Wattenberg, E.V., 2001. Mixtures of nickel and cobalt chlorides induce synergistic cytotoxic effects: implications for inhalation exposure modeling. *Ann Occup Hyg* 45, 409–418.

Das, J., Sarkar, A., Sil, P.C., 2015. Hexavalent chromium induces apoptosis in human liver (HepG2) cells via redox imbalance. *Toxicology Reports* 2, 600–608. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.03.013>

Dayan, A.D., Paine, A.J., 2001. Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: Review of the literature from 1985 to 2000. *Hum Exp Toxicol* 20, 439–451. <https://doi.org/10.1191/096032701682693062>

Delaney, J., Neville, W.A., Swain, A., Miles, A., Leonard, M.S., Waterfield, C.J., 2004. Phenylacetyl glycine, a putative biomarker of phospholipidosis: Its origins and relevance to phospholipid accumulation using amiodarone treated rats as a model. *Biomarkers* 9, 271–290. <https://doi.org/10.1080/13547500400018570>

DeMoor, J.M., Koropatnick, D.J., 2000. Metals and cellular signaling in mammalian cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 46, 367–381.

DesMarias, T.L., Costa, M., 2019. Mechanisms of chromium-induced toxicity. *Current Opinion in Toxicology, Mechanistic Toxicology* 14, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2019.05.003>

Dobbs, H.S., Minski, M.J., 1980. Metal ion release after total hip replacement. *Biomaterials* 1, 193–198. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(80\)90016-2](https://doi.org/10.1016/0142-9612(80)90016-2)

Doessegger, L., Schmitt, G., Lenz, B., Fischer, H., Schlotterbeck, G., Atzpodien, E.-A., Senn, H., Suter, L., Csato, M., Evers, S., Singer, T., 2013. Increased levels of urinary

phenylacetyl glycine associated with mitochondrial toxicity in a model of drug-induced phospholipidosis. *Ther Adv Drug Saf* 4, 101–114. <https://doi.org/10.1177/2042098613479393>

Elloumi-Mseddi, J., Mnif, S., Akacha, N., Hakim, B., Pigeon, P., Jaouen, G., Top, S., Aifa, S., 2018. Selective cytotoxicity of arene tricarbonylchromium towards tumour cell lines. *Journal of Organometallic Chemistry* 862, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2018.01.036>

El-Sewedy, S.M., Abdel-Tawab, G.A., El-Zoghby, S.M., Zeitoun, R., Mostafa, M.H., Shalaby, Sh.M., 1974. Studies with tryptophan metabolites in vitro. effect of zinc, manganese, copper and cobalt ions on kynurenine hydrolase and kynurenine aminotransferase in normal mouse liver. *Biochemical Pharmacology* 23, 2557–2565. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(74\)90178-6](https://doi.org/10.1016/0006-2952(74)90178-6)

Ermolli, M., Menné, C., Pozzi, G., Serra, M.A., Clerici, L.A., 2001. Nickel, cobalt and chromium-induced cytotoxicity and intracellular accumulation in human haec keratinocytes. *Toxicology* 159, 23–31. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(00\)00373-5](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(00)00373-5)

Forman, H.J., Zhang, H., Rinna, A., 2009. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med* 30, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>

Genchi, G., Carocci, A., Lauria, G., Sinicropi, M.S., Catalano, A., 2020. Nickel: Human Health and Environmental Toxicology. *Int J Environ Res Public Health* 17. <https://doi.org/10.3390/ijerph17030679>

Grassin-Delyle, S., Martin, M., Hamzaoui, O., Lamy, E., Jayle, C., Sage, E., Etting, I., Devillier, P., Alvarez, J.-C., 2019. A high-resolution ICP-MS method for the determination of 38 inorganic elements in human whole blood, urine, hair and tissues after microwave digestion. *Talanta* 199, 228–237. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.02.068>

Green, B., Griffiths, E., Almond, S., 2017. Neuropsychiatric symptoms following metal-on-metal implant failure with cobalt and chromium toxicity. *BMC Psychiatry* 17, 33. <https://doi.org/10.1186/s12888-016-1174-1>

Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C., Guguen-Guillouzo, C., 2002. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15655–15660. <https://doi.org/10.1073/pnas.232137699>

Guillouzo, A., Corlu, A., Aninat, C., Glaise, D., Morel, F., Guguen-Guillouzo, C., 2007. The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem Biol Interact* 168, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.12.003>

Guo, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, Junliang, Wang, X., Zhao, L., Wu, B., Chen, K., Deng, Jie, 2016. Nickel chloride-induced apoptosis via mitochondria- and Fas-mediated caspase-dependent pathways in broiler chickens. *Oncotarget* 7, 79747–79760. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12946>

Guo, L., Xiao, Y., Wang, Y., 2013. Hexavalent Chromium-induced Alteration of Proteomic Landscape in Human Skin Fibroblast Cells. *J. Proteome Res.* 12, 3511–3518. <https://doi.org/10.1021/pr400375p>

IARC, 2012. Nickel and nickel compounds, in: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. pp. 169–218.

IARC working group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 1990. Chromium and chromium compounds. *International Agency for Research on Cancer*.

IARC, World Health Organization, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (Eds.), 2006. Cobalt in hard metals and cobalt sulfate, gallium arsenide, indium phosphide, and vanadium pentoxide, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. International Agency for Research on Cancer ; Distributed by WHO Press, Lyon, France : Geneva, Switzerland.

Jantzen, C., Jørgensen, H.L., Duus, B.R., Sporning, S.L., Lauritzen, J.B., 2013. Chromium and cobalt ion concentrations in blood and serum following various types of metal-on-metal hip arthroplasties: a literature overview. *Acta Orthop* 84, 229–236. <https://doi.org/10.3109/17453674.2013.792034>

Jomova, K., Valko, M., 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283, 65–87. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.03.001>

Kamburov, A., Wierling, C., Lehrach, H., Herwig, R., 2009. ConsensusPathDB--a database for integrating human functional interaction networks. *Nucleic Acids Res* 37, D623–628. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn698>

Kristiansen, K., 2004. Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol Ther* 103, 21–80. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.05.002>

Laurençon, J., Augsburger, M., Faouzi, M., Becce, F., Hassani, H., Rüdiger, H.A., 2016. Systemic Metal Ion Levels in Patients With Modular-Neck Stems: A Prospective Cohort Study. *J Arthroplasty* 31, 1750–1755. <https://doi.org/10.1016/j.arth.2016.01.030>

Leggett, R.W., 2008. The biokinetics of inorganic cobalt in the human body. *Science of The Total Environment* 389, 259–269. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.08.054>

Li, B., Tang, J., Yang, Q., Li, S., Cui, X., Li, Y., Chen, Y., Xue, W., Li, X., Zhu, F., 2017. NOREVA: normalization and evaluation of MS-based metabolomics data. *Nucleic Acids Res* 45, W162–W170. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx449>

Li, J., Starnes, C.A., Winkler, B.S., 2002. Mitochondrial Activity Supplies Glutamate for Glutathione Synthesis in Rat Müller Cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 3622–3622.

Lovelace, M.D., Varney, B., Sundaram, G., Lennon, M.J., Lim, C.K., Jacobs, K., Guillemin, G.J., Brew, B.J., 2017. Recent evidence for an expanded role of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in neurological diseases. *Neuropharmacology* 112, 373–388. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.03.024>

Mao, X., Wong, A.A., Crawford, R.W., 2011. Cobalt toxicity — an emerging clinical problem in patients with metal-on-metal hip prostheses? *The Medical Journal of Australia* 194, 649–651. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.2011.tb03151.x>

Martin, M., Lenglet, S., Gilardi, F., Thomas, A., Augsburger, M., Alvarez, J.-C., 2019. Determination of lethal dose (LD50) of chromium (Cr), cobalt (Co) and nickel (Ni) in HepaRG cells. Comparison to concentrations found in liver from autopsied prosthesis-bearing patients. *Toxicologie Analytique et Clinique* 31, S56. <https://doi.org/10.1016/j.toxac.2019.03.081>

Mathur, N., Jain, G., Pandey, G., 2011. Hepatotoxicity of Cobalt Chloride in Albino Rat. *Pharmacologyonline* 2.

Maxwell, P., Salnikow, K., 2004. HIF-1: an oxygen and metal responsive transcription factor. *Cancer Biol Ther* 3, 29–35. <https://doi.org/10.4161/cbt.3.1.547>

- Merritt, K., Brown, S.A., Sharkey, N.A., 1984. Blood distribution of nickel, cobalt, and chromium following intramuscular injection into hamsters. *J Biomed Mater Res* 18, 991–1004. <https://doi.org/10.1002/jbm.820180904>
- Narayanankutty, A., Job, J.T., Narayanankutty, V., 2019. Glutathione, an Antioxidant Tripeptide: Dual Roles in Carcinogenesis and Chemoprevention. *Curr Protein Pept Sci* 20, 907–917. <https://doi.org/10.2174/1389203720666190206130003>
- National Toxicology Program, 1998. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Cobalt Sulfate Heptahydrate (CAS No. 10026-24-1) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser* 471, 1–268.
- Ogasawara, N., Hagino, Y., Kotake, Y., 1962. Kynurenine-Transaminase, Kynureninase and the Increase of Xanthurenic Acid Excretion. *The Journal of Biochemistry* 52, 162–166.
- Oliveira, A.B.B., de Moraes, F.R., Candido, N.M., Sampaio, I., Paula, A.S., de Vasconcellos, A., Silva, T.C., Miller, A.H., Rahal, P., Nery, J.G., Calmon, M.F., 2016. Metabolic Effects of Cobalt Ferrite Nanoparticles on Cervical Carcinoma Cells and Nontumorigenic Keratinocytes. *J. Proteome Res.* 15, 4337–4348. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00411>
- Packer, L., Weber, S.U., Rimbach, G., 2001. Molecular Aspects of  $\alpha$ -Tocotrienol Antioxidant Action and Cell Signalling. *The Journal of Nutrition* 131, 369S-373S. <https://doi.org/10.1093/jn/131.2.369S>
- Paithankar, J.G., Saini, S., Dwivedi, S., Sharma, A., Chowdhuri, D.K., 2021. Heavy metal associated health hazards: An interplay of oxidative stress and signal transduction. *Chemosphere* 262, 128350. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128350>
- Pal, S., Shil, K., 2018. Metabolic Toxicity and Alteration of Cellular Bioenergetics by Hexavalent Chromium, in: Hussain, C.M. (Ed.), *Handbook of Environmental Materials Management*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–28. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-58538-3\\_58-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-58538-3_58-1)
- Pan, T.-L., Wang, P.-W., Chen, C.-C., Fang, J.-Y., Sintupisut, N., 2012. Functional proteomics reveals hepatotoxicity and the molecular mechanisms of different forms of chromium delivered by skin administration. *PROTEOMICS* 12, 477–489. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100055>
- Permenter, M.G., Lewis, J.A., Jackson, D.A., 2011. Exposure to Nickel, Chromium, or Cadmium Causes Distinct Changes in the Gene Expression Patterns of a Rat Liver Derived Cell Line. *PLoS ONE* 6, e27730. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027730>
- Petit, A., Mwale, F., Tkaczyk, C., Antoniou, J., Zukor, D.J., Huk, O.L., 2005. Induction of protein oxidation by cobalt and chromium ions in human U937 macrophages. *Biomaterials* 26, 4416–4422. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.11.019>
- Polyzois, I., Nikolopoulos, D., Michos, I., Patsouris, E., Theocharis, S., 2012. Local and systemic toxicity of nanoscale debris particles in total hip arthroplasty. *J Appl Toxicol* 32, 255–269. <https://doi.org/10.1002/jat.2729>
- Rager, J.E., Suh, M., Chappell, G.A., Thompson, C.M., Proctor, D.M., 2019. Review of transcriptomic responses to hexavalent chromium exposure in lung cells supports a role of epigenetic mediators in carcinogenesis. *Toxicology Letters* 305, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.01.011>
- Renu, K., Chakraborty, R., Myakala, H., Koti, R., Famurewa, A.C., Madhyastha, H., Vellingiri, B., George, A., Valsala Gopalakrishnan, A., 2021. Molecular mechanism of heavy metals (Lead, Chromium, Arsenic, Mercury, Nickel and Cadmium) - induced hepatotoxicity –



- A review. *Chemosphere* 271, 129735. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129735>
- Rezuke, W.N., Knight, J.A., Sunderman, F.W., 1987. Reference values for nickel concentrations in human tissues and bile. *Am J Ind Med* 11, 419–426. <https://doi.org/10.1002/ajim.4700110404>
- Rodríguez de la Flor, M., Hernández-Vaquero, D., Fernández-Carreira, J.M., 2013. Metal presence in hair after metal-on-metal resurfacing arthroplasty. *J Orthop Res* 31, 2025–2031. <https://doi.org/10.1002/jor.22450>
- Salnikow, K., Zhitkovich, A., 2008. Genetic and Epigenetic Mechanisms in Metal Carcinogenesis and Cocarcinogenesis: Nickel, Arsenic, and Chromium. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 28–44. <https://doi.org/10.1021/tx700198a>
- Sandyk, R., 1992. L-tryptophan in neuropsychiatric disorders: a review. *Int J Neurosci* 67, 127–144. <https://doi.org/10.3109/00207459208994781>
- Saran, A., 1958. Properties and partial purification of kynureninase. *Biochemical Journal* 70, 182–188. <https://doi.org/10.1042/bj0700182>
- Shanmugam, P.S.T., Chokkalingam, L., Bakthavachalam, P., 2020. *Toxicological Aspects of Medical Device Implants*. Academic Press.
- Simonsen, L.O., Harbak, H., Bennekou, P., 2012. Cobalt metabolism and toxicology--a brief update. *Sci. Total Environ.* 432, 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.009>
- Smith, T., Edmonds, C.J., Barnaby, C.F., 1972. Absorption and retention of cobalt in man by whole-body counting. *Health Phys* 22, 359–367. <https://doi.org/10.1097/00004032-197204000-00007>
- Sunderman, F.W., 1989. Mechanisms of nickel carcinogenesis. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 15, 1–12.
- Tanaka, M., Ishizaka, Y., Tosuji, H., Kunimoto, M., Hosoya, N., Nishihara, N., Kadono, T., Kawano, T., Kosaka, T., Hosoya, H., 2005. A New Bioassay for Toxic Chemicals Using Green Paramecia, *Paramecium bursaria*, in: Lichtfouse, E., Schwarzbauer, J., Robert, D. (Eds.), *Environmental Chemistry: Green Chemistry and Pollutants in Ecosystems*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 673–680. [https://doi.org/10.1007/3-540-26531-7\\_61](https://doi.org/10.1007/3-540-26531-7_61)
- Terpiłowska, S., Siwicka-Gieroba, D., Siwicki, A.K., 2018. Cell Viability in Normal Fibroblasts and Liver Cancer Cells After Treatment with Iron (III), Nickel (II), and their Mixture. *J Vet Res* 62, 535–542. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2018-0067>
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T.D., 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 12, 1161–1208. <https://doi.org/10.2174/0929867053764635>
- Wang, L., Du, Y., Xu, B., Deng, X., Liu, Q., Zhong, Q., Wang, C., Ji, S., Guo, M., Tang, D., 2019. Metabolomics Study of Metabolic Changes in Renal Cells in Response to High-Glucose Exposure Based on Liquid or Gas Chromatography Coupled With Mass Spectrometry. *Front. Pharmacol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00928>
- Wang, M., Xia, W., Liu, Hongbin, Liu, F., Li, H., Chang, H., Sun, J., Liu, W., Sun, X., Jiang, Y., Liu, Hongxiu, Wu, C., Pan, X., Li, Y., Rang, W., Lu, S., Xu, S., 2018. Urinary metabolomics reveals novel interactions between metal exposure and amino acid metabolic stress during pregnancy. *Toxicol Res (Camb)* 7, 1164–1172. <https://doi.org/10.1039/c8tx00042e>
- Wilbur, S., Abadin, H., Fay, M., Yu, D., Tencza, B., Ingerman, L., Klotzbach, J., James, S., 2012. *Toxicological Profile for Chromium*, Agency for Toxic Substances and Disease

Registry (ATSDR) Toxicological Profiles. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US), Atlanta (GA).

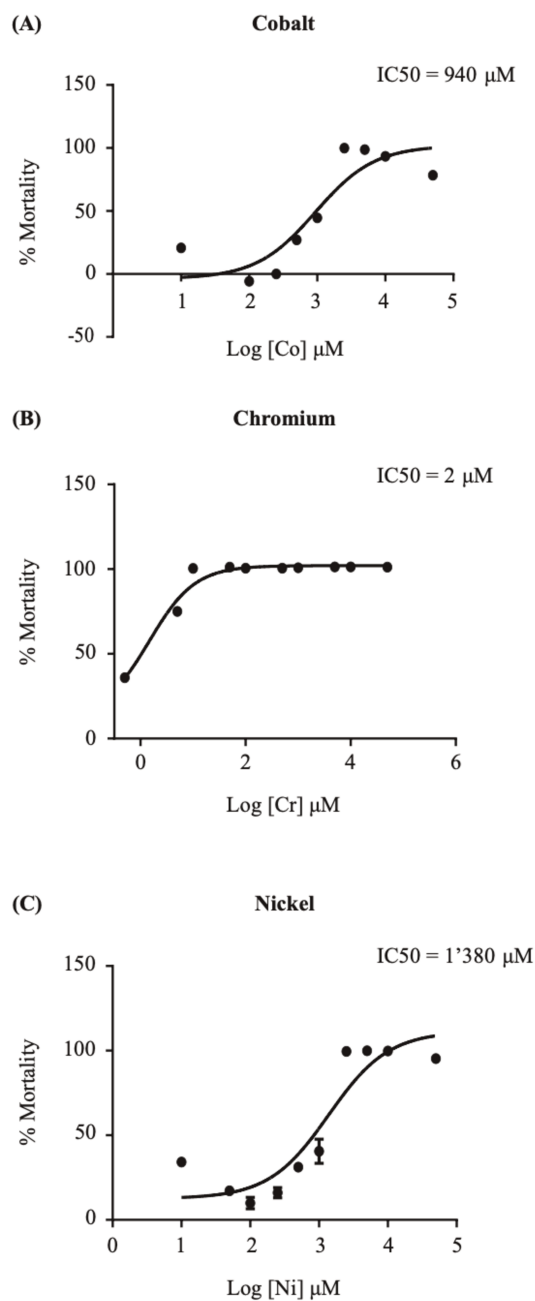
Wilkinson, L., Friendly, M., 2009. The History of the Cluster Heat Map. *The American Statistician* 63, 179–184. <https://doi.org/10.1198/tas.2009.0033>

Yamamoto, A., Honma, R., Sumita, M., 1998. Cytotoxicity evaluation of 43 metal salts using murine fibroblasts and osteoblastic cells. *Journal of Biomedical Materials Research* 39, 331–340. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199802\)39:2<331::AID-JBM22>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199802)39:2<331::AID-JBM22>3.0.CO;2-E)

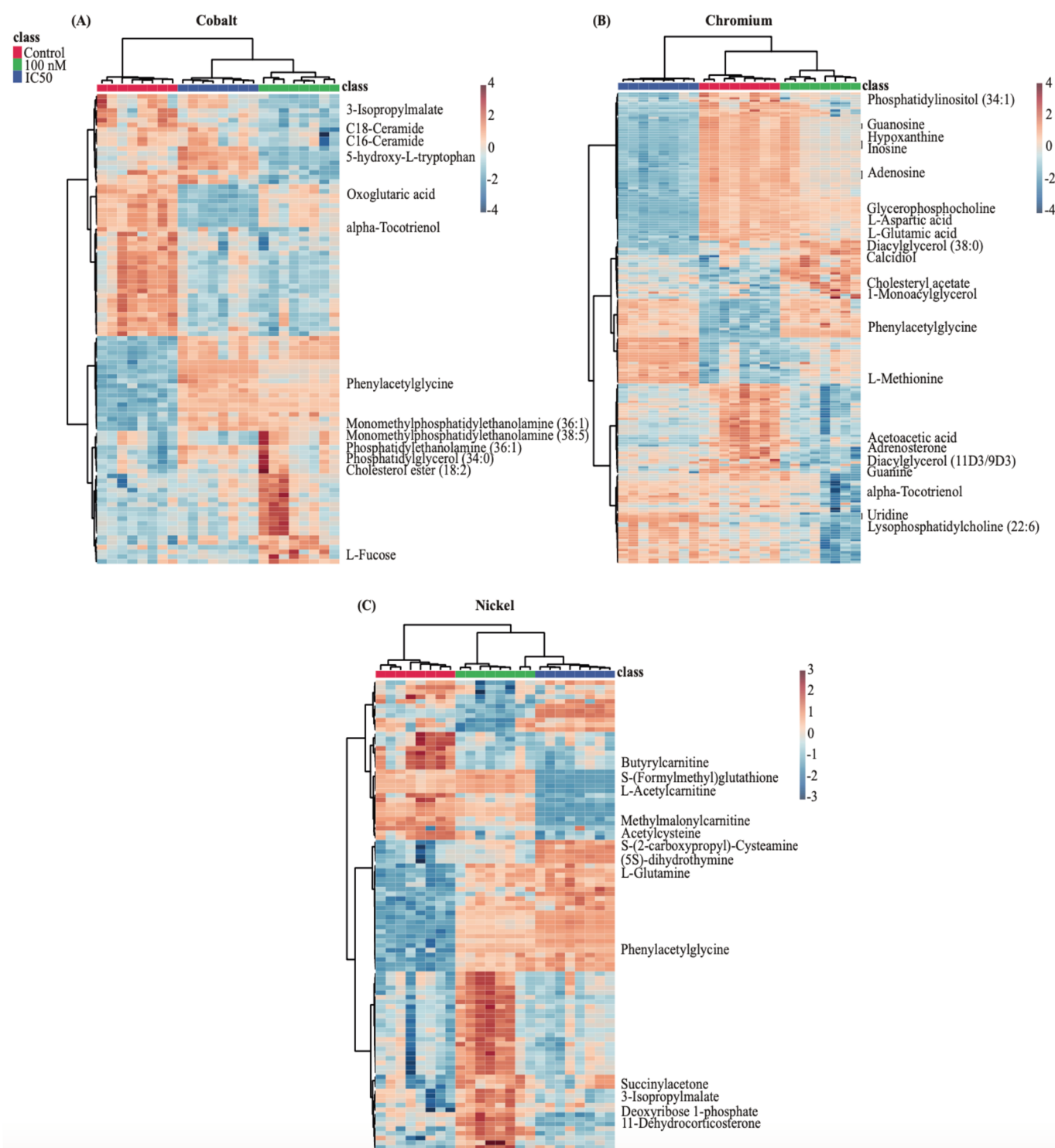
Yang, Q., Wang, Y., Zhang, Y., Li, F., Xia, W., Zhou, Y., Qiu, Y., Li, H., Zhu, F., 2020. NOREVA: enhanced normalization and evaluation of time-course and multi-class metabolomic data. *Nucleic Acids Research* 48, W436–W448. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa258>

Zarei, M.H., Hosseini Shirazi, S.F., Aghvami, M., Salimi, A., Pourahmad, J., 2018. Analysis of cytotoxic effects of nickel on human blood lymphocytes. *Toxicol Mech Methods* 28, 79–86. <https://doi.org/10.1080/15376516.2017.1364314>

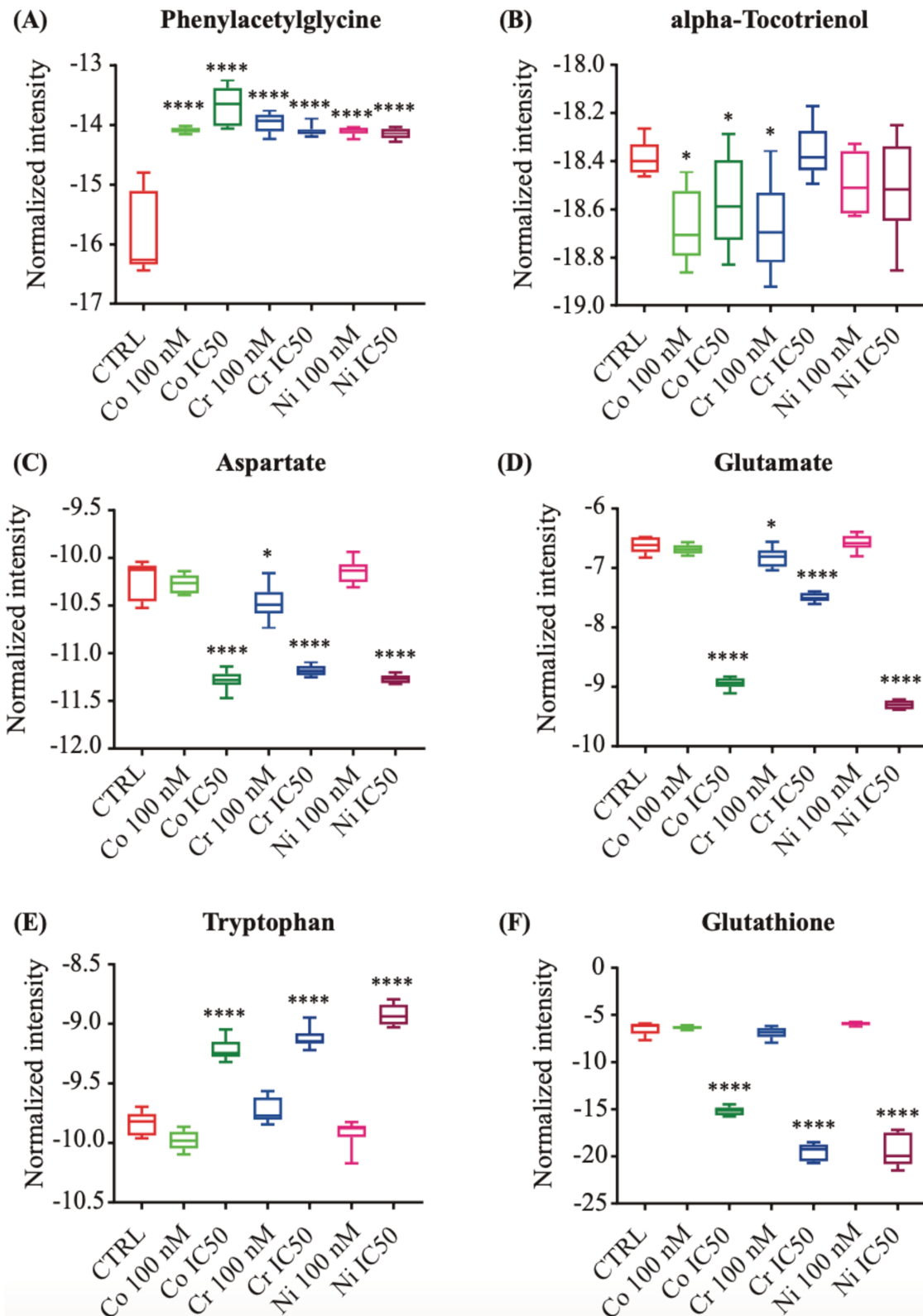
## Figures



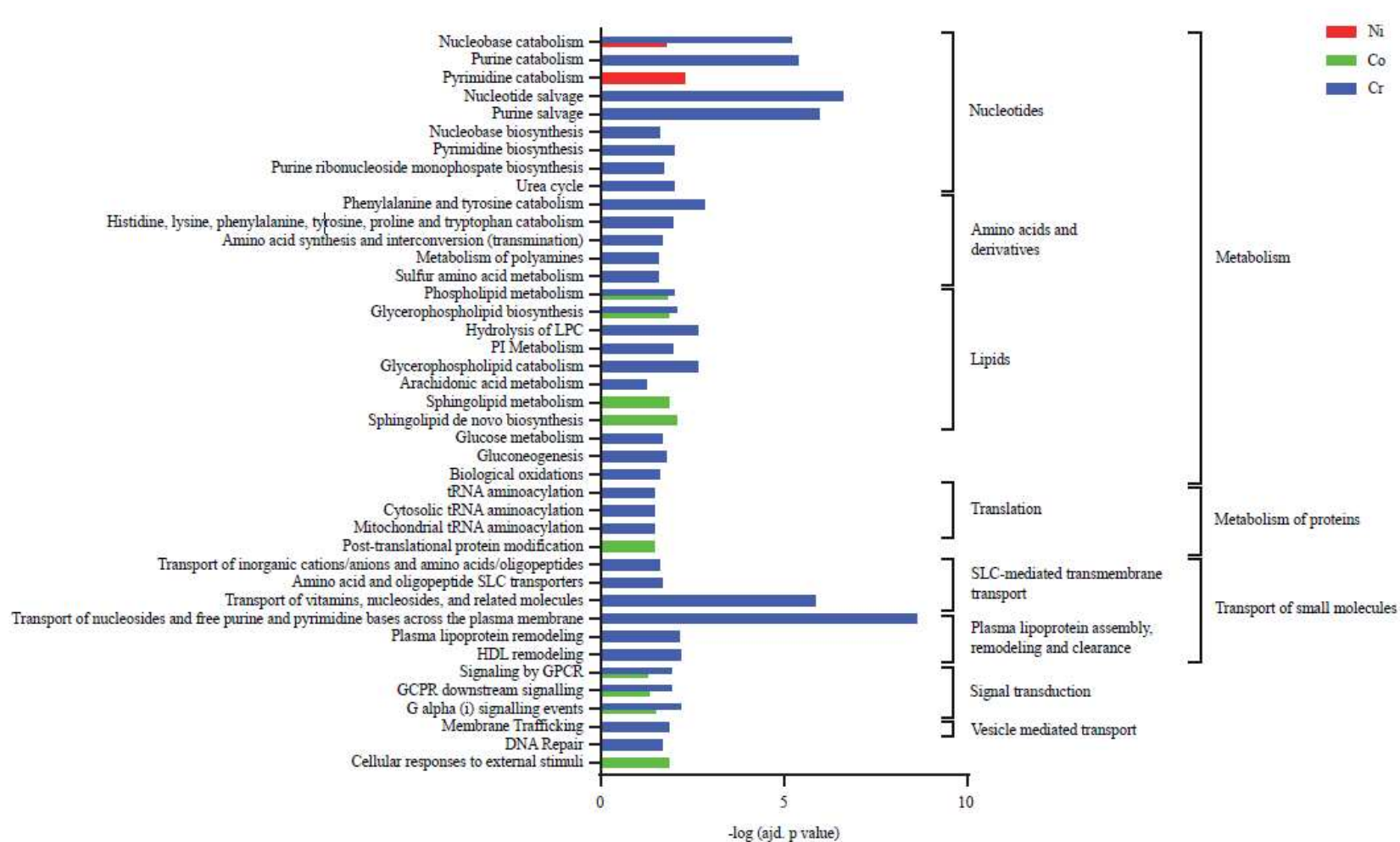
**Figure 1.** Cytotoxicity of the three metals, (A) Cobalt (Co), (B) Chromium (Cr) and (C) Nickel (Ni) on HepaRG liver cells. The percent of mortality was determined using MTT assay in duplicate for two independent experiments, after 48 hours of exposure at concentrations between 10 µM and 50 mM for Co and Ni and between 0.5 µM and 50 mM for Cr. The error bars represent the standard deviation. The IC<sub>50</sub> of each metal on cells was determined using nonlinear regression in Graphpad Prism.



**Figure 2.** 48 hours of exposure at two concentrations (100 nM and IC<sub>50</sub>) of cobalt (A), chromium (B) and nickel (C) induces metabolomic changes in HepaRG liver cells. The fold change between control and samples treated with 100 nM was calculated for each feature and statistical significances were assessed using Linear Models for Microarray data (LIMMA) in R (adj. p value < 0.05). The IC<sub>50</sub> condition was added to assess the behavior of the significant features at this concentration. The significant data were clustered by samples and by features by Ward's clustering with the Euclidean distance in Metaboanalyst. The heatmaps highlight clusters of metabolites up- or downregulated by the treatments and the identified metabolites are annotated on the right of each heatmap.



**Figure 3.** Patterns of selective identified metabolites of interest (mean normalized intensity). (A) Phenylacetylglutamine, (B) alpha-Tocotrienol, (C) Aspartate, (D) Glutamate, (E) Tryptophan and (F) Glutathione were differentially expressed after 48 hours of exposure at the two concentrations for each metal (100 nM and the IC<sub>50</sub>) or control. Statistical significance was determined using Linear Models for Microarray data (LIMMA) in R (\* adj. p value < 0.05, \*\* adj. p value < 0.01, \*\*\* adj. p value < 0.001, \*\*\*\* adj. p value < 0.0001).



**Figure 4.** Impact of cobalt, chromium and nickel exposure on biological pathways after 48 hours exposure of HepaRG hepatocytes. The graphic represents the overrepresentation pathway analysis of the significantly altered metabolites at 100 nM for each metal (adj. p value < 0.05). The bars represent the adj. p value for each pathway at the logarithmic scale for the three metals, chromium (blue), cobalt (green) and nickel (red).







# Conclusion générale

Les dispositifs médicaux implantables (DMI) utilisés en orthopédie sont composés de céramique ou de métaux, pouvant être associés à du polyéthylène. L'usure de la prothèse induit un relargage de particules métalliques dans l'environnement péri-prothétique, à l'origine d'une toxicité locale. Les ET peuvent aussi migrer au sein de l'organisme, dans le sang circulant et s'accumuler dans des organes, responsables d'une toxicité systémique.

L'analyse des ET peut être réalisée par spectroscopie ou par spectrométrie. L'ICP-MS ou torche à plasma induit couplée à un spectromètre de masse, est largement utilisée car sensible, spécifique, rapide et multiélémentaire. La haute résolution, d'une grande précision, permet de s'affranchir des interférences polyatomiques grâce à une secteur magnétique.

Nous avons mis au point et validé une méthode en ICP-MS haute résolution pour la détection et la quantification simultanées de 38 ET dans le sang, les urines, les cheveux et les tissus, après minéralisation par micro-onde.

Cette méthode a été appliquée à l'essai clinique « Prometox » visant à « évaluer le retentissement systémique du relargage des éléments traces par les dispositifs médicaux implantables. Identification de biomarqueurs d'inflammation systémique » (code projet : APHP180539, n°IDRCB : 2018-A02780-55). Le sang, les urines, le tissu péri-prothétique et le liquide synovial de sujets vivants porteurs de prothèse ainsi que les viscères de sujets autopsiés ont été analysés et comparés avec des témoins.

Il a en parallèle, été possible d'obtenir les concentrations d'ET dans les différentes matrices des témoins, représentatifs de la population générale francilienne. Ainsi, nous avons pu émettre des normes de concentrations pour les ET et étudier leur répartition tissulaire.

Les concentrations métalliques retrouvées chez les porteurs de prothèse sont en faveur d'un relargage d'ET dans l'environnement péri-prothétique, passant ensuite dans la circulation et s'accumulant dans certains organes comme le cœur et les poumons. Cette émission de particules est observée même en cas d'implant fonctionnel. Il s'agit de la première étude analysant un si grand nombre d'ET dans de nombreuses matrices d'une population porteuse de prothèses PE/Me.

La corrosion de la prothèse et le relargage des ET semblent influencés par l'inflammation. L'étude Prometox a aussi évalué l'inflammation induite par la prothèse, afin de définir un biomarqueur précoce de la dégradation de l'implant. Les cytokines pro-inflammatoires ont été

dosées. L'IL-1 $\beta$ , G-CSF et MIP-1 $\alpha$  sont augmentées chez la population porteuse de prothèses défaillantes. L'utilisation de ces cytokines, notamment le MIP-1 $\alpha$ , comme biomarqueur de l'usure de la prothèse mérite de plus amples investigations et pourrait être envisagée.

Nous avons ensuite étudié la toxicité de trois ET, composants majeurs des implants orthopédiques et relargués chez les patients porteurs de prothèse : le Cr, le Co et le Ni sur un modèle hépatocytaire, largement utilisé dans les études du métabolisme et de toxicité *in vitro*. La concentration inhibitrice médiane (IC<sub>50</sub>) de chaque métal a été déterminée dans des cellules HepaRG, provenant d'une lignée hépatocytaire humaine. Les mécanismes de toxicité cellulaires ont été analysés par une étude métabolomique à l'IC<sub>50</sub> et à une concentration plus faible de 100 nM, inférieure à celle retrouvée chez les sujets porteurs de prothèse. Le métabolisme hépatocytaire semble impacté par les trois métaux dès la concentration faible de 100nM, via l'induction d'un stress oxydant et la perturbation du métabolisme lipidique et du métabolisme du tryptophane. Bien que ces résultats ne puissent être transposés directement, des études métabolomiques *in vivo* doivent être poursuivies pour enrichir les connaissances sur les mécanismes de toxicité des métaux sur les différents organes dans lesquels ils semblent s'accumuler.

# Bibliographie

1. Article L5211-1 - Code de la santé publique - Légifrance [Internet]. [cited 2021 Apr 28]. Available from: [https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article\\_lc/LEGIARTI000021964486/](https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000021964486/)
2. Section 3 : Classification des dispositifs médicaux (Articles R5211-7 à R5211-11) - Légifrance [Internet]. [cited 2021 Apr 28]. Available from: [https://www.legifrance.gouv.fr/codes/section\\_lc/LEGITEXT000006072665/LEGISCTA000006190738/](https://www.legifrance.gouv.fr/codes/section_lc/LEGITEXT000006072665/LEGISCTA000006190738/)
3. Direction générale de la santé, Direction générale de la santé. Les dispositifs médicaux (implants, prothèses...) [Internet]. Ministère des Solidarités et de la Santé. 2015 [cited 2021 Apr 28]. Available from: <https://solidarites-sante.gouv.fr/soins-et-maladies/autres-produits-de-sante/article/les-dispositifs-medicaux-implants-protheses>
4. Snitem. Progrès et dispositifs médicaux. Innovation en orthopédie [Internet]. [cited 2021 May 6]. Available from: [https://www.snitem.fr/sites/default/files/snitem\\_orthopedie\\_web.pdf](https://www.snitem.fr/sites/default/files/snitem_orthopedie_web.pdf)
5. Hernigou P. Les prothèses totales de hanche – Académie nationale de médecine | Une institution dans son temps [Internet]. 2018 Dec [cited 2021 May 6] p. 1063–70. (Bulletin de l'Académie Nationale de médecine). Report No.: 202. Available from: <https://www.academie-medecine.fr/les-protheses-totales-de-hanche/>
6. Passuti N, Philippeau J-M, Gouin F. Couples de frottement dans les prothèses totales de hanche. *Revue de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique*. 2009 Jun 1;95(4, Supplement):32–40.
7. Boissier M-C. Inserm. Arthrose [Internet]. Inserm - La science pour la santé. 2017 [cited 2021 May 6]. Available from: <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/arthrose>
8. US Food and Drug Administration. General Information about Hip Implants. FDA [Internet]. 2019 Apr 25 [cited 2021 May 31]; Available from: <https://www.fda.gov/medical-devices/metal-metal-hip-implants/general-information-about-hip-implants>
9. Haute Autorité de Santé. Prothèses de hanche. Phase contradictoire suite à la révision d'une catégorie de dispositifs médicaux. [Internet]. Haute Autorité de Santé. 2014 [cited 2021 May 6]. Available from: [https://www.has-sante.fr/jcms/c\\_2006405/fr/evaluation-des-protheses-de-hanche](https://www.has-sante.fr/jcms/c_2006405/fr/evaluation-des-protheses-de-hanche)
10. Fessy M-H, Viste A, Chaudier P. Qu'entend-on par « cupule à double mobilité » ? Avantages et limites. *Revue du Rhumatisme Monographies*. 2020 Feb 1;87(1):89–93.
11. Medacta Corporate. Medacta Corporate, Prothèse totale de hanche [Internet]. [cited 2021 May 7]. Available from: <https://www.medacta.com/FR/hip-replacement>
12. Medacta Corporate. Medacta Corporate, Prothèse totale de genou [Internet]. [cited 2021 May 7]. Available from: <https://www.medacta.com/FR/knee-replacement>

13. Dubois-Ferriere V, Monsellato E, Vieira Cardoso DC. La prothèse totale de cheville : mise au point. *Revue médicale suisse*. 2019;15(675):2274.
14. Prothèse totale de cheville | Centre Orthopédique Santy [Internet]. [cited 2021 May 31]. Available from: <http://centre-orthopedique-santy.com/membre-inferieur-pathologies-prothese-totale-de-cheville/>
15. Stiglitz Y. Prothèse de cheville : présentation [Internet]. *Chirurgie du Pied*. [cited 2021 May 31]. Available from: <https://www.chirurgie-du-pied.fr/fr/prothese-de-cheville-presentation/>
16. Haute Autorité de Santé. Rapport d'évaluation des implants articulaires d'épaule [Internet]. 2014 Mar. Available from: [https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2014-04/rapport\\_devaluation\\_des\\_implants\\_articulaires\\_depaule.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2014-04/rapport_devaluation_des_implants_articulaires_depaule.pdf)
17. Hu CY, Yoon T-R. Recent updates for biomaterials used in total hip arthroplasty. *Biomaterials Research*. 2018 Dec 5;22(1):33.
18. Ribeiro AM, Flores-Sahagun THS, Paredes RC. A perspective on molybdenum biocompatibility and antimicrobial activity for applications in implants. *J Mater Sci*. 2016 Mar 1;51(6):2806–16.
19. Fischer L-P, Planchamp W, Fischer B, Chauvin F. Les premières prothèses articulaires de la hanche chez l'homme (1890-1960). *Histoire des sciences médicales*. 2000;34(1):57–70.
20. Gluck T. Autoplastik, Transplantation, Implantation vom Fremdkörpern : Vortrag, gehalten in der Sitzung der Berliner medicinischen Gesellschaft vom 23. April 1890 [Internet]. Berlin : Gedr. bei L. Schumacher; 1890 [cited 2021 Jun 1]. 24 p. Available from: <http://archive.org/details/b22453702>
21. Judet J, Judet R, Crepin G, Rigault A. Essais de prothèses ostéo-articulaires (prothèses en acrylique). *La Presse Médicale*. 1947;26.
22. Moore AT. Metal hip joint; a new self-locking vitallium prosthesis. *South Med J*. 1952 Nov;45(11):1015–9.
23. Salenius P, Laurent LE. Experience with the McKee-Farrar total hip replacement. A report of 143 operations. *Acta Orthop Scand*. 1973;44(4):451–9.
24. Charnley J. Arthroplasty of the hip. A new operation. *Lancet*. 1961 May 27;1(7187):1129–32.
25. Boutin P. [Total arthroplasty of the hip by fritted aluminum prosthesis. Experimental study and 1st clinical applications]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot*. 1972 May;58(3):229–46.
26. Katti K, Verma D, Katti D. Materials for joint replacement. In: Revell PA, editor. *Joint Replacement Technology* [Internet]. Woodhead Publishing; 2008 [cited 2021 Jun 3]. p. 81–104. (Woodhead Publishing Series in Biomaterials). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781845692452500044>
27. Wiles P. The surgery of the osteoarthritic hip. *Br J Surg*. 1958 Mar 18;45(193):488–97.

28. Affatato S, Traina F, Ruggeri O, Toni A. Wear of metal-on-metal hip bearings: metallurgical considerations after hip simulator studies. *Int J Artif Organs*. 2011 Dec;34(12):1155–64.
29. Ihaddadene R, Affatato S, Zavalloni M, Bouzid S, Viceconti M. Carbon composition effects on wear behaviour and wear mechanisms of metal-on-metal hip prosthesis. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*. 2011;14(S1):33–4.
30. Delaunay C, Petit I, Learmonth ID, Oger P, Vendittoli PA. Metal-on-metal bearings total hip arthroplasty: the cobalt and chromium ions release concern. *Orthop Traumatol Surg Res*. 2010 Dec;96(8):894–904.
31. Veiga C. Properties and applications of titanium alloys: a brief review. undefined [Internet]. 2012 [cited 2021 Jun 6]; Available from: /paper/PROPERTIES-AND-APPLICATIONS-OF-TITANIUM-ALLOYS%3A-A-Veiga/6ea2f8d570db70dc91faec223e15596863482f3d
32. Merola M, Affatato S. Materials for Hip Prostheses: A Review of Wear and Loading Considerations. *Materials (Basel)* [Internet]. 2019 Feb 5 [cited 2021 Jun 1];12(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6384837/>
33. Petit R. Revêtement des implants prothétiques par l'hydroxyapatite. *Orthop Traumatol*. 1993 Jun 1;3(2):97–100.
34. Tailor H, Patel S, Patel RV, Haddad FS. Bearing couples in total hip arthroplasty. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2010 Aug;71(8):446–50.
35. National Joint Registry for England, Wales and Northern Ireland, 11th Annual Report [Internet]. 2014 Sep [cited 2021 Jun 1]. Available from: <https://www.njrcentre.org.uk/njrcentre/News-and-Events/NJR-11th-Annual-Report>
36. Bozic KJ, Kurtz S, Lau E, Ong K, Chiu V, Vail TP, et al. The Epidemiology of Bearing Surface Usage in Total Hip Arthroplasty in the United States. *JBJS*. 2009 Jul 1;91(7):1614–20.
37. Berry DJ, Harmsen WS, Cabanela ME, Morrey BF. Twenty-five-year survivorship of two thousand consecutive primary Charnley total hip replacements: factors affecting survivorship of acetabular and femoral components. *J Bone Joint Surg Am*. 2002 Feb;84(2):171–7.
38. Oonishi H, Kadoya Y. Wear of high-dose gamma-irradiated polyethylene in total hip replacements. *J Orthop Sci*. 2000;5(3):223–8.
39. Kurtz SM. *The UHMWPE Handbook: Ultra-High Molecular Weight Polyethylene in Total Joint Replacement*. Elsevier; 2004. 397 p.
40. Cowie RM, Briscoe A, Fisher J, Jennings LM. PEEK-OPTIMA™ as an alternative to cobalt chrome in the femoral component of total knee replacement: A preliminary study. *Proc Inst Mech Eng H*. 2016 Nov;230(11):1008–15.
41. Hu D, Tie K, Yang X, Tan Y, Alaidaros M, Chen L. Comparison of ceramic-on-ceramic to metal-on-polyethylene bearing surfaces in total hip arthroplasty: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Orthop Surg Res*. 2015 Feb 3;10:22.

42. Fritsch E, Remberger K, Mittelmeier H. Biocompatibility of Alumina-Ceramic in Total Hip Replacement . Macroscopic-and Microscopic Findings on Capsular Tissues after Long-term Implantation [Internet]. 2003 [cited 2021 Jun 1]. Available from: /paper/2-. -1- Biocompatibility-of-Alumina-Ceramic-in-Total-Fritsch-Remberger/a6edd38343ff093d84c0daf3f574b302a3f71b05
43. Basu B, Kalin M. Tribology of Ceramics and Composites: A Materials Science Perspective. John Wiley & Sons; 2011. 552 p.
44. Nizard R, Sedel L, Christel P, Meunier A, Soudry P, Witvoet J. Ten-year survivorship of cemented ceramic-ceramic total hip prosthesis. *Clin Orthop Relat Res.* 1992 Sep 1;(282):53–63.
45. Miller EH, Heidt RS, Welch MC, Harding WG, Heidt RS, Lawhon SM. Self-bearing, uncemented, ceramic total hip replacement arthroplasty. *Instr Course Lect.* 1986;35:188–202.
46. Prudhommeaux F, Hamadouche M, Nevelos J, Doyle C, Meunier A, Sedel L. Wear of alumina-on-alumina total hip arthroplasties at a mean 11-year followup. *Clin Orthop Relat Res.* 2000 Oct;(379):113–22.
47. Lee Y-K, Yoon B-H, Choi YS, Jo W-L, Ha Y-C, Koo K-H. Metal on Metal or Ceramic on Ceramic for Cementless Total Hip Arthroplasty: A Meta-Analysis. *J Arthroplasty.* 2016 Nov;31(11):2637-2645.e1.
48. Garcia-Rey E, Cruz-Pardos A, Garcia-Cimbrela E. Alumina-on-alumina Total Hip Arthroplasty in Young Patients: Diagnosis is More Important than Age. *Clin Orthop Relat Res.* 2009 Sep;467(9):2281–9.
49. Bizot P. Le couple céramique-céramique dans les arthroplasties totales de hanche : Ceramic on ceramic total hip replacement. Conférences d’enseignement [Internet]. 2010 [cited 2021 Jun 1];(99). Available from: <https://www.em-consulte.com/article/280176/le-couple-ceramique-ceramique-dans-les-arthroplast>
50. Chevalier J. What future for zirconia as a biomaterial? *Biomaterials.* 2006 Feb;27(4):535–43.
51. Walter WL, Lusty PJ, Watson A, O’Toole G, Tuke MA, Zicat B, et al. Stripe Wear and Squeaking in Ceramic Total Hip Bearings. *Seminars in Arthroplasty: JSES.* 2006 Sep 1;17(3):190–5.
52. Haute Autorité de Santé. OXINIUM (tête fémorale) [Internet]. Saint Denis La Plaine; 2016 [cited 2021 Jun 1]. Available from: [https://www.has-sante.fr/jcms/c\\_2634276/fr/oxinium-tete-femorale](https://www.has-sante.fr/jcms/c_2634276/fr/oxinium-tete-femorale)
53. Bal BS, Khandkar A, Lakshminarayanan R, Clarke I, Hoffman AA, Rahaman MN. Fabrication and testing of silicon nitride bearings in total hip arthroplasty: winner of the 2007 “HAP” PAUL Award. *J Arthroplasty.* 2009 Jan;24(1):110–6.
54. Macdonald N, Bankes M. Ceramic on ceramic hip prostheses: a review of past and modern materials. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2014 Sep;134(9):1325–33.

55. Plate JF, Seyler TM, Stroh DA, Issa K, Akbar M, Mont MA. Risk of dislocation using large- vs. small-diameter femoral heads in total hip arthroplasty. *BMC Res Notes*. 2012 Oct 5;5:553.
56. Jirat J, Kosata B. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology. In: *Gold Book* [Internet]. 2nd edition. Oxford: International Union of Pure and Applied Chemistry; 1997 [cited 2021 Jun 24]. (Blackwell scientific publications). Available from: <http://www.old.iupac.org/publications/books/author/mcnaught.html>
57. Bulska E, Rusczyńska A. Analytical Techniques for Trace Element Determination. *Physical Sciences Reviews* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2021 Jun 24];2(5). Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/psr-2017-8002/html>
58. Alleman L, Mathé F. Principales méthodes de prélèvement et d'analyse des émissions métalliques dans l'atmosphère. *Air Pur*. 2009 Jan 1;75.
59. Hébrard-Labit C, Meffay L. Comparaison de méthodes d'analyse des éléments traces métalliques (ETM) et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sur les sols et les végétaux. [Internet]. Centre d'études sur les réseaux, les transports, l'urbanisme et les constructions publiques (CERTU); 2004 [cited 2021 Jun 16]. Available from: <https://hal-lara.archives-ouvertes.fr/hal-02150475/document>
60. Pénicaut B, Bonnefoy C, Moesch C, Lachâtre G. Spectrométrie de Masse à Plasma couplé par induction (ICP-MS) Potentialités en analyse et en biologie. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 2006 Sep 1;64(5):312–27.
61. Tyler G, Yvon J. ICP-OES , ICP-MS and AAS Techniques Compared [Internet]. 2003 [cited 2021 Jun 16]. Available from: </paper/ICP-OES-%2C-ICP-MS-and-AAS-Techniques-Compared-Tyler-Yvon/3a997ca1a20b00e68003ca04937b2035d0d76a5d>
62. Bouhnik-Le Coz M, Petitjean P, Serrat E, Gruau G. Validation d'un Protocole Permettant le Dosage Simultané des Cations Majeurs et Traces dans les Eaux Douces Naturelles par ICP-MS. *Cahiers techniques de Géosciences rennes*. 2001;(1):13.
63. Paucot H, Potin-Gautier M. ICP-MS : couplage plasma induit par haute fréquence – spectrométrie de masse [Internet]. Ed. Techniques Ingénieur; 2010 [cited 2021 Jun 16]. 12 p. Available from: [https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=WTPGBVi0KckC&oi=fnd&pg=PA2&dq=principe+ICPMS&ots=5JUyag5O9b&sig=Ls-\\_KVFjN\\_s9svpvySOPCMLznS4#v=onepage&q=principe%20ICPMS&f=false](https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=WTPGBVi0KckC&oi=fnd&pg=PA2&dq=principe+ICPMS&ots=5JUyag5O9b&sig=Ls-_KVFjN_s9svpvySOPCMLznS4#v=onepage&q=principe%20ICPMS&f=false)
64. Wilbur S, Abadin H, Fay M, Yu D, Tencza B, Ingerman L, et al. Toxicological Profile for Chromium [Internet]. Atlanta (GA): Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US); 2012 [cited 2021 Feb 15]. (Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) Toxicological Profiles). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK158855/>
65. Chromium and its compounds. Ottawa: Minister of Supply and Services Canada; 1994.
66. IARC. Chromium and chromium compounds [Internet]. International Agency for Research on Cancer; 1990 [cited 2021 Feb 15]. (IARC working group on the Evaluation of

Carcinogenic Risks to Humans). Available from:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519246/>

67. Teraoka H. Distribution of 24 Elements in the Internal Organs of Normal Males and the Metallic Workers in Japan. *Archives of Environmental Health*. 1981 Aug 7;36(4):155.
68. Kerger BD, Finley BL, Corbett GE, Dodge DG, Paustenbach DJ. Ingestion of chromium(VI) in drinking water by human volunteers: absorption, distribution, and excretion of single and repeated doses. *J Toxicol Environ Health*. 1997 Jan;50(1):67–95.
69. Baruthio F. Toxic effects of chromium and its compounds. *Biol Trace Elem Res*. 1992 Mar;32:145–53.
70. Sastre J, Fernández-Nieto M, Marañón F, Fernandez-Caldas E, Pelta R, Quirce S. Allergenic cross-reactivity between nickel and chromium salts in electroplating-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Oct;108(4):650–1.
71. Thyssen JP, Menné T. Metal allergy--a review on exposures, penetration, genetics, prevalence, and clinical implications. *Chem Res Toxicol*. 2010 Feb 15;23(2):309–18.
72. Bianchi V, Toso RD, Debetto P, Levis AG, Luciani S, Majone F, et al. Mechanisms of chromium toxicity in mammalian cell cultures. *Toxicology*. 1980 Jan 1;17(2):219–24.
73. Valko M, Morris H, Cronin MTD. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*. 2005;12(10):1161–208.
74. World Health Organization. Chromium in drinking-water [Internet]. 2003 [cited 2021 Feb 15]. Available from: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/chromium/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/chromium/en/)
75. Lindberg E, Hedenstierna G. Chrome plating: symptoms, findings in the upper airways, and effects on lung function. *Arch Environ Health*. 1983 Dec;38(6):367–74.
76. US EPA National Center for Environmental Assessment IO. IRIS Toxicological Review of Hexavalent Chromium : in support of summary information on the integrated risk information system [Internet]. Environmental Protection Agency; 1998 [cited 2021 Jun 9]. Available from: [https://cfpub.epa.gov/ncea/iris\\_drafts/recordisplay.cfm?deid=221433](https://cfpub.epa.gov/ncea/iris_drafts/recordisplay.cfm?deid=221433)
77. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for cobalt [Internet]. Atlanta (GA): U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service; 2004. Available from: <https://wwwn.cdc.gov/TSP/ToxProfiles/ToxProfiles.aspx?id=373&tid=64>
78. Rickes EL, Brink NG, Koniuszy PR, Wood TR, Folkers K. Vitamin B12, a cobalt complex. *Science (Washington)* [Internet]. 1948 [cited 2020 Nov 27];108. Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19481403122>
79. Taylor A, Marks V. Cobalt:a review. *J Hum Nutr*. 1978 Jun;32(3):165–77.
80. Barceloux DG, Barceloux DD. Cobalt. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*. 1999 Jan 1;37(2):201–16.



81. Smith T, Edmonds CJ, Barnaby CF. Absorption and retention of cobalt in man by whole-body counting. *Health Phys.* 1972 Apr;22(4):359–67.
82. Valberg LS, Ludwig J, Olatunbosun D. Alteration in cobalt absorption in patients with disorders of iron metabolism. *Gastroenterology.* 1969 Feb;56(2):241–51.
83. Foster PP, Pearman I, Ramsden D. An interspecies comparison of the lung clearance of inhaled monodisperse cobalt oxide particles—Part II: Lung clearance of inhaled cobalt oxide in man. *Journal of Aerosol Science.* 1989 Jan 1;20(2):189–204.
84. Hewitt PJ. Accumulation of metals in the tissues of occupationally exposed workers. *Environ Geochem Health.* 1988 Dec;10(3–4):113–6.
85. Simonsen LO, Harbak H, Bennekou P. Cobalt metabolism and toxicology--a brief update. *Sci Total Environ.* 2012 Aug 15;432:210–5.
86. Leggett RW. The biokinetics of inorganic cobalt in the human body. *Science of The Total Environment.* 2008 Jan 25;389(2):259–69.
87. Catalani S, Rizzetti MC, Padovani A, Apostoli P. Neurotoxicity of cobalt. *Hum Exp Toxicol.* 2012 May;31(5):421–37.
88. Cheung AC, Banerjee S, Cherian JJ, Wong F, Butany J, Gilbert C, et al. Systemic cobalt toxicity from total hip arthroplasties: review of a rare condition Part 1 - history, mechanism, measurements, and pathophysiology. *Bone Joint J.* 2016 Jan;98-B(1):6–13.
89. Mao X, Wong AA, Crawford RW. Cobalt toxicity — an emerging clinical problem in patients with metal-on-metal hip prostheses? *The Medical Journal of Australia.* 2011 Jun 20;194(12):649–51.
90. Uter W, Gefeller O, Geier J, Schnuch A. Contact sensitization to cobalt--multifactorial analysis of risk factors based on long-term data of the Information Network of Departments of Dermatology. *Contact Dermatitis.* 2014 Dec;71(6):326–37.
91. Shirakawa T, Kusaka Y, Fujimura N, Goto S, Kato M, Heki S, et al. Occupational asthma from cobalt sensitivity in workers exposed to hard metal dust. *Chest.* 1989 Jan;95(1):29–37.
92. IARC, World Health Organization, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, editors. Cobalt in hard metals and cobalt sulfate, gallium arsenide, indium phosphide, and vanadium pentoxide. Lyon, France : Geneva, Switzerland: International Agency for Research on Cancer ; Distributed by WHO Press; 2006. 330 p. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans).
93. National Toxicology Program. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Cobalt Sulfate Heptahydrate (CAS No. 10026-24-1) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser.* 1998 Aug;471:1–268.
94. Nemery B, Casier P, Roosels D, Lahaye D, Demedts M. Survey of cobalt exposure and respiratory health in diamond polishers. *Am Rev Respir Dis.* 1992 Mar;145(3):610–6.
95. Davis JE, Fields JP. Experimental production of polycythemia in humans by administration of cobalt chloride. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1958 Nov;99(2):493–5.

96. OSHA. General industry, cobalt metal, dust, and fume [Internet]. Occupational Safety and Health; 2001 Jun [cited 2021 Jun 9]. Available from: [http://www.osha.gov/OshStd\\_data/1910\\_0000.html](http://www.osha.gov/OshStd_data/1910_0000.html)
97. Finley BL, Monnot AD, Paustenbach DJ, Gaffney SH. Derivation of a chronic oral reference dose for cobalt. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2012 Dec;64(3):491–503.
98. Nickel and its compounds [Internet]. Ottawa: Govt. of Canada, Environment Canada, Health Canada; 1994. Available from: [https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/migration/hc-sc/ewh-semt/alt\\_formats/hecs-sesc/pdf/pubs/contaminants/psl1-lsp1/compounds\\_nickel\\_composes/nickel-eng.pdf](https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/migration/hc-sc/ewh-semt/alt_formats/hecs-sesc/pdf/pubs/contaminants/psl1-lsp1/compounds_nickel_composes/nickel-eng.pdf)
99. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for nickel [Internet]. Atlanta (GA): U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES; 2005 Aug p. 397. Available from: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp15.pdf>
100. Genchi G, Carocci A, Lauria G, Sinicropi MS, Catalano A. Nickel: Human Health and Environmental Toxicology. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2020 Feb [cited 2021 Feb 17];17(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7037090/>
101. WHO Regional office for Europe. Chapter 6.10 Nickel. In: *Air Quality Guidelines* [Internet]. Second Edition. 2000 [cited 2021 Feb 17]. Available from: <https://www.euro.who.int/en/health-topics/environment-and-health/air-quality/publications/pre2009/who-air-quality-guidelines-for-europe,-2nd-edition,-2000-cd-rom-version>
102. Casarett LJ, Doull J, Amdur MO, Klaassen CD. *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*. New York: Pergamon Press; 1991.
103. Rezuze WN, Knight JA, Sunderman FW. Reference values for nickel concentrations in human tissues and bile. *Am J Ind Med*. 1987;11(4):419–26.
104. Sunderman FW, Aitio A, Morgan LG, Norseth T. Biological monitoring of nickel. *Toxicol Ind Health*. 1986 Jul;2(1):17–78.
105. Sunderman FW, Hopfer SM, Sweeney KR, Marcus AH, Most BM, Creason J. Nickel absorption and kinetics in human volunteers. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1989 May;191(1):5–11.
106. Barceloux DG, Barceloux DD. Nickel. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*. 1999 Jan 1;37(2):239–58.
107. Chen QY, Brocato J, Laulicht F, Costa M. Mechanisms of Nickel Carcinogenesis. In: Mudipalli A, Zelikoff JT, editors. *Essential and Non-essential Metals: Carcinogenesis, Prevention and Cancer Therapeutics* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017 [cited 2021 Feb 17]. p. 181–97. (Molecular and Integrative Toxicology). Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-55448-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-55448-8_8)
108. IARC. Nickel and nickel compounds. In: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* [Internet]. 2012 [cited 2021 Feb 17]. p. 169–218. Available from: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Chromium-Nickel-And-Welding-1990>

109. Sunderman FW. Mechanisms of nickel carcinogenesis. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*. 1989;15(1):1–12.
110. Cameron KS, Buchner V, Tchounwou PB. Exploring the Molecular Mechanisms of Nickel-Induced Genotoxicity and Carcinogenicity: A Literature Review. *Rev Environ Health*. 2011;26(2):81–92.
111. Lidén C, Norberg K. Nickel on the Swedish market. Follow-up after implementation of the Nickel Directive. *Contact Dermatitis*. 2005 Jan;52(1):29–35.
112. National Toxicology Program. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Nickel Sulfate Hexahydrate (CAS No. 10101-97-0) in F344 Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser*. 1996 Jul;454:1–380.
113. ICH. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Guideline for elemental impurities. Q3D Elemental Impurities. [Internet]. 2014 [cited 2021 Jun 9]. Report No.: current step 4 versoin. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q3d-elemental-impurities>
114. Gad SC. Titanium. In: Wexler P, editor. *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)* [Internet]. Oxford: Academic Press; 2014 [cited 2021 Jun 4]. p. 584–5. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123864543009428>
115. Jin T, Berlin M. CHAPTER 43 - Titanium. In: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg LT, editors. *Handbook on the Toxicology of Metals (Third Edition)* [Internet]. Burlington: Academic Press; 2007 [cited 2021 Jun 7]. p. 861–70. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123694133500987>
116. Kapp RW. Titanium Tetrachloride. In: Wexler P, editor. *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)* [Internet]. Oxford: Academic Press; 2014 [cited 2021 Jun 6]. p. 586–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012386454300943X>
117. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for titanium tetrachloride [Internet]. Atlanta (GA): U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES; 1997 Sep [cited 2021 Jun 4]. Available from: <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp101-p.pdf>
118. Kim KT, Eo MY, Nguyen TTH, Kim SM. General review of titanium toxicity. *Int J Implant Dent*. 2019 Mar 11;5(1):10.
119. Baselt RC. Titanium. *Disposition of toxic drugs and chemicals in man*. 11th ed. Foster City: Biomedical Publications; 2002. 2119–2120 p.
120. Berglund F, Carlmark B. Titanium, sinusitis, and the yellow nail syndrome. *Biol Trace Elem Res*. 2011 Oct;143(1):1–7.
121. IARC. Carbon Black, Titanium Dioxide, and Talc [Internet]. Lyon, France; 2010 [cited 2021 Jun 7]. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; vol. 93). Available from: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Carbon-Black-Titanium-Dioxide-And-Talc-2010>

122. US EPA National Center for Environmental Assessment. Provisional Peer-Reviewed Toxicity Values for Titanium [Internet]. Cincinnati: US Environmental Protection Agency; 2010 [cited 2021 Jun 9]. Available from: <https://cfpub.epa.gov/ncea/pprtv/documents/Titanium.pdf>
123. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Molybdenum [Internet]. Atlanta (GA): U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service; 2020 May p. 246. Available from: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp212.pdf>
124. Kapp RW. Molybdenum. In: Wexler P, editor. Encyclopedia of Toxicology (Third Edition) [Internet]. Oxford: Academic Press; 2014 [cited 2021 Jun 7]. p. 383–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123864543008848>
125. Turnlund JR, Friberg LT. CHAPTER 34 - Molybdenum. In: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg LT, editors. Handbook on the Toxicology of Metals (Third Edition) [Internet]. Burlington: Academic Press; 2007 [cited 2021 Jun 7]. p. 731–41. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123694133500896>
126. Terpilowska S, Siwicki AK. Pro- and antioxidant activity of chromium(III), iron(III), molybdenum(III) or nickel(II) and their mixtures. *Chem Biol Interact.* 2019 Jan 25;298:43–51.
127. IARC. Welding, Molybdenum Trioxide, and Indium Tin Oxide [Internet]. 2018 [cited 2021 Jun 7]. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; vol. 118). Available from: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Welding-Molybdenum-Trioxide-And-Indium-Tin-Oxide-2018>
128. US EPA National Center for Environmental Assessment. IRIS Toxicological review of molybdenum [Internet]. US Environmental Protection Agency; 1992. Available from: [https://iris.epa.gov/static/pdfs/0425\\_summary.pdf](https://iris.epa.gov/static/pdfs/0425_summary.pdf)
129. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Vanadium. Atlanta (GA): U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES; 2012 p. 255.
130. Lagerkvist BJ-S, Oskarsson A. CHAPTER 46 - Vanadium. In: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg LT, editors. Handbook on the Toxicology of Metals (Third Edition) [Internet]. Burlington: Academic Press; 2007 [cited 2021 Jun 7]. p. 905–23. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123694133501014>
131. International commission on radiological protection. Report of Committee II on Permissible Dose for Internal Radiation. [Internet]. London: Pergamon press; 1960. Report No.: ICRP Publication 2. Available from: <https://www.icrp.org/publication.asp?id=ICRP%20Publication%202>
132. Heinemann G, Fichtl B, Vogt W. Pharmacokinetics of vanadium in humans after intravenous administration of a vanadium containing albumin solution. *Br J Clin Pharmacol.* 2003 Mar;55(3):241–5.
133. Barceloux DG. Vanadium. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1999;37(2):265–78.

134. US EPA National Center for Environmental Assessment. IRIS Toxicological Review of Vanadium pentoxide [Internet]. US Environmental Protection Agency; 1988 [cited 2021 Jun 9]. Available from: [https://iris.epa.gov/ChemicalLanding/&substance\\_nmbr=125](https://iris.epa.gov/ChemicalLanding/&substance_nmbr=125)
135. Kazantzis G, Leffler P. CHAPTER 44 - Tungsten. In: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg LT, editors. Handbook on the Toxicology of Metals (Third Edition) [Internet]. Burlington: Academic Press; 2007 [cited 2021 Jun 9]. p. 871–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123694133500999>
136. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for tungsten [Internet]. Atlanta (GA): U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service; 2005 Aug [cited 2021 Jun 9]. Available from: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp186.pdf>
137. Wester PO. Trace element balances in relation to variations in calcium intake. *Atherosclerosis*. 1974 Sep 1;20(2):207–15.
138. Moschinski G, Jurisch A, Reinl W. Die Lungenveränderungen bei Sinterhartmetall-Arbeitern. *Arch Gewerbepath*. 1959 Nov 1;16(6):697–720.
139. Moulin JJ, Wild P, Romazini S, Lasfargues G, Peltier A, Bozec C, et al. Lung cancer risk in hard-metal workers. *Am J Epidemiol*. 1998 Aug 1;148(3):241–8.
140. Anard D, Kirsch-Volders M, Elhajouji A, Belpaeme K, Lison D. In vitro genotoxic effects of hard metal particles assessed by alkaline single cell gel and elution assays. *Carcinogenesis*. 1997 Jan 1;18(1):177–84.
141. Schell J, Pardus M. Preliminary risk-based concentrations for tungsten in soil and drinking water. *Land contam reclam*. 2009;17(1):179–88.
142. Jackson M, Lemus-Olalde R, Inhof C, Venezia C, Pardus M. Development of worker inhalation derived no effect levels for tungsten compounds. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2013;16(2):114–26.
143. Tylenda CA, Fowler BA. CHAPTER 18 - Antimony. In: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg LT, editors. Handbook on the Toxicology of Metals (Third Edition) [Internet]. Burlington: Academic Press; 2007 [cited 2021 Jun 9]. p. 353–65. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123694133500732>
144. Oskarsson A, Reeves AL. CHAPTER 20 - Barium. In: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg LT, editors. Handbook on the Toxicology of Metals (Third Edition) [Internet]. Burlington: Academic Press; 2007 [cited 2021 Jun 9]. p. 407–14. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123694133500756>
145. Jakubowski M, Palczynski C. CHAPTER 21 - Beryllium. In: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg LT, editors. Handbook on the Toxicology of Metals (Third Edition) [Internet]. Burlington: Academic Press; 2007 [cited 2021 Jun 9]. p. 415–31. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123694133500768>
146. Baselt RC. Cesium. Disposition of toxic drugs and chemicals in man. 11th ed. Foster City: Biomedical Publications; 2002. 2119–2120 p.

147. Ponka P, Tenenbein M, Eaton JW. CHAPTER 30 - Iron. In: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg LT, editors. Handbook on the Toxicology of Metals (Third Edition) [Internet]. Burlington: Academic Press; 2007 [cited 2021 Jun 9]. p. 577–98. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123694133500859>
148. Persy VP, Behets GJ, Bervoets AR, Broe MED, D’Haese PC. Lanthanum: A Safe Phosphate Binder. *Seminars in Dialysis*. 2006;19(3):195–9.
149. D’Haese PC, Douglas G, Verhulst A, Neven E, Behets GJ, Vervaet BA, et al. Human health risk associated with the management of phosphorus in freshwaters using lanthanum and aluminium. *Chemosphere*. 2019 Apr 1;220:286–99.
150. Šarić M, Lucchini R. CHAPTER 32 - Manganese. In: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg LT, editors. Handbook on the Toxicology of Metals (Third Edition) [Internet]. Burlington: Academic Press; 2007 [cited 2021 Jun 10]. p. 645–74. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123694133500872>
151. Kruszyna H, Kruszyna R, Hurst J, Smith RP. Toxicology and pharmacology of some ruthenium compounds: Vascular smooth muscle relaxation by nitrosyl derivatives of ruthenium and iridium. *J Toxicol Environ Health*. 1980 Jul;6(4):757–73.
152. Gerhardsson L. CHAPTER 40 - Tellurium. In: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg LT, editors. Handbook on the Toxicology of Metals (Third Edition) [Internet]. Burlington: Academic Press; 2007 [cited 2021 Jun 10]. p. 815–25. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123694133500951>
153. Kazantzis G. CHAPTER 41 - Thallium. In: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg LT, editors. Handbook on the Toxicology of Metals (Third Edition) [Internet]. Burlington: Academic Press; 2007 [cited 2021 Jun 10]. p. 827–37. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123694133500963>
154. Ghosh S, Sharma A, Talukder G. Zirconium. An abnormal trace element in biology. *Biol Trace Elem Res*. 1992 Dec;35(3):247–71.
155. Cohen D. How safe are metal-on-metal hip implants? *BMJ* [Internet]. 2012 Feb 28 [cited 2017 Jan 6];344(e1410). Available from: <http://www.bmj.com/content/bmj/344/bmj.e1410.full.pdf>
156. Campbell JR, Estey MP. Metal release from hip prostheses: cobalt and chromium toxicity and the role of the clinical laboratory. *Clin Chem Lab Med*. 2013 Jan;51(1):213–20.
157. Bradberry SM, Wilkinson JM, Ferner RE. Systemic toxicity related to metal hip prostheses. *Clin Toxicol (Phila)*. 2014 Oct;52(8):837–47.
158. Bijukumar D, Segu A, Souza J, Li X, Barba B, Mercuri L, et al. Systemic and local toxicity of metal debris released from hip prostheses: A review of experimental approaches. *Nanomedicine*. 2018 Jan 12;14(3):951–63.
159. Zywił MG, Cherian JJ, Banerjee S, Cheung AC, Wong F, Butany J, et al. Systemic cobalt toxicity from total hip arthroplasties: review of a rare condition Part 2. measurement, risk factors, and step-wise approach to treatment. *Bone Joint J*. 2016 Jan;98-B(1):14–20.

160. Lons A, Putman S, Pasquier G, Migaud H, Drumez E, Girard J. Metallic ion release after knee prosthesis implantation: a prospective study. *Int Orthop.* 2017;41(12):2503–8.
161. Sarmiento-González A, Marchante-Gayón JM, Tejerina-Lobo JM, Paz-Jiménez J, Sanz-Medel A. High-resolution ICP–MS determination of Ti, V, Cr, Co, Ni, and Mo in human blood and urine of patients implanted with a hip or knee prosthesis. *Anal Bioanal Chem.* 2008 Aug 1;391(7):2583–9.
162. Hennig FF, Raithel HJ, Schaller KH, Döhler JR. Nickel-, chrom- and cobalt-concentrations in human tissue and body fluids of hip prosthesis patients. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis.* 1992 Dec;6(4):239–43.
163. Newton AW, Ranganath L, Armstrong C, Peter V, Roberts NB. Differential distribution of cobalt, chromium, and nickel between whole blood, plasma and urine in patients after metal-on-metal (MoM) hip arthroplasty. *J Orthop Res.* 2012 Oct 1;30(10):1640–6.
164. Iavicoli I, Falcone G, Alessandrelli M, Cresti R, De Santis V, Salvatori S, et al. The release of metals from metal-on-metal surface arthroplasty of the hip. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* 2006 May 10;20(1):25–31.
165. Nicolli A, Trevisan A, Bortoletti I, Pozzuoli A, Ruggieri P, Martinelli A, et al. Biological Monitoring of Metal Ions Released from Hip Prostheses. *Int J Environ Res Public Health.* 2020 May 6;17(9).
166. Okazaki Y, Gotoh E. Comparison of metal release from various metallic biomaterials in vitro. *Biomaterials.* 2005 Jan 1;26(1):11–21.
167. Van Der Straeten C, Van Quickenborne D, Pennynck S, De Smet K, Victor J. Systemic Toxicity of Metal Ions in a Metal-on-Metal Hip Arthroplasty Population. *Orthopaedic Proceedings.* 2013 Dec 1;95-B(SUPP\_34):187–187.
168. Hartmann A, Hannemann F, Lützner J, Seidler A, Drexler H, Günther K-P, et al. Metal Ion Concentrations in Body Fluids after Implantation of Hip Replacements with Metal-on-Metal Bearing – Systematic Review of Clinical and Epidemiological Studies. *PLoS One [Internet].* 2013 Aug 7 [cited 2021 Jun 11];8(8). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3737219/>
169. Engh CA, Moore KD, Vinh TN, Engh GA. Titanium prosthetic wear debris in remote bone marrow. A report of two cases. *J Bone Joint Surg Am.* 1997 Nov;79(11):1721–5.
170. Lutter C, Klüß D, Enz A, Mittelmeier W. Impingement of metal-polyethylene hip prostheses : Potential cause of high systemic titanium levels? *Orthopade.* 2020 Dec;49(12):1066–71.
171. Craig P, Bancroft G, Burton A, Collier S, Shaylor P, Sinha A. Raised levels of metal ions in the blood in patients who have undergone uncemented metal-on-polyethylene Trident-Accolade total hip replacement. *Bone Joint J.* 2014 Jan;96-B(1):43–7.
172. Lindgren JU, Brismar BH, Wikstrom AC. Adverse reaction to metal release from a modular metal-on-polyethylene hip prosthesis. *The Journal of Bone and Joint Surgery British volume.* 2011 Oct 1;93-B(10):1427–30.

173. Eltit F, Alassiri A, Garbuz D, Duncan C, Masri B, Greidanus N, et al. Adverse Reactions to Metal on Polyethylene Implants: Highly destructive lesions related to elevated concentration of Cobalt and Chromium in synovial fluid. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2017 Mar 1;105.
174. Doorn PF, Campbell PA, Worrall J, Benya PD, McKellop HA, Amstutz HC. Metal wear particle characterization from metal on metal total hip replacements: transmission electron microscopy study of periprosthetic tissues and isolated particles. *J Biomed Mater Res*. 1998 Oct;42(1):103–11.
175. Atrey A, Waite J, Hart A, Meswania J, Morison Z, Carr R, et al. Failure of a Ceramic-on-Ceramic Hip Resurfacing Due to Metallosis: A Case Report. *JBJS Case Connect*. 2014 Mar;4(1):e28.
176. Pesce V, Maccagnano G, Vicenti G, Notarnicola A, P P, Soleo L, et al. First case report of vanadium metallosis after ceramic-on-ceramic total hip arthroplasty. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2013 Oct 1;27(4):1063–8.
177. Oliveira CA, Candelária IS, Oliveira PB, Figueiredo A, Caseiro-Alves F. Metallosis: A diagnosis not only in patients with metal-on-metal prostheses. *European Journal of Radiology Open*. 2015 Jan 1;2:3–6.
178. Oldenburg M, Wegner R, Baur X. Severe Cobalt Intoxication Due to Prosthesis Wear in Repeated Total Hip Arthroplasty. *The Journal of Arthroplasty*. 2009 Aug 1;24(5):825.e15-825.e20.
179. Levine BR, Hsu AR, Skipor AK, Hallab NJ, Paprosky WG, Galante JO, et al. Ten-year outcome of serum metal ion levels after primary total hip arthroplasty: a concise follow-up of a previous report\*. *J Bone Joint Surg Am*. 2013 Mar 20;95(6):512–8.
180. Back DL, Young DA, Shimmin AJ. How do serum cobalt and chromium levels change after metal-on-metal hip resurfacing? *Clin Orthop Relat Res*. 2005 Sep;438:177–81.
181. Lass R, Grübl A, Kolb A, Stelzeneder D, Pilger A, Kubista B, et al. Comparison of synovial fluid, urine, and serum ion levels in metal-on-metal total hip arthroplasty at a minimum follow-up of 18 years. *J Orthop Res*. 2014 Sep;32(9):1234–40.
182. Kwon Y-M, Xia Z, Glyn-Jones S, Beard D, Gill R, Murray D. Dose-Dependent Cytotoxicity of Clinically Relevant Cobalt Nanoparticles and Ions on Macrophages in Vitro. *Biomedical materials (Bristol, England)*. 2009 May 1;4:025018.
183. Davda K, Lali FV, Sampson B, Skinner JA, Hart AJ. An analysis of metal ion levels in the joint fluid of symptomatic patients with metal-on-metal hip replacements. *J Bone Joint Surg Br*. 2011 Jun;93(6):738–45.
184. De Smet K, De Haan R, Calistri A, Campbell PA, Ebramzadeh E, Pattyn C, et al. Metal ion measurement as a diagnostic tool to identify problems with metal-on-metal hip resurfacing. *J Bone Joint Surg Am*. 2008 Nov;90 Suppl 4:202–8.
185. Drummond J, Tran P, Fary C. Metal-on-Metal Hip Arthroplasty: A Review of Adverse Reactions and Patient Management. *J Funct Biomater*. 2015 Jun 26;6(3):486–99.



186. Scientific Committee on Emerging Newly Identified Health Risks. Opinion on: The safety of metal-on-metal joint replacements with a particular focus on hip implants [Internet]. 2014 Sep. Available from: [https://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/emerging/docs/scenihr\\_o\\_042.pdf](https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenihr_o_042.pdf)
187. Malek IA, King A, Sharma H, Malek S, Lyons K, Jones S, et al. The sensitivity, specificity and predictive values of raised plasma metal ion levels in the diagnosis of adverse reaction to metal debris in symptomatic patients with a metal-on-metal arthroplasty of the hip. *J Bone Joint Surg Br.* 2012 Aug;94(8):1045–50.
188. Hart AJ, Sabah SA, Bandi AS, Maggiore P, Tarassoli P, Sampson B, et al. Sensitivity and specificity of blood cobalt and chromium metal ions for predicting failure of metal-on-metal hip replacement. *J Bone Joint Surg Br.* 2011 Oct;93(10):1308–13.
189. Mabileau G, Kwon Y-M, Pandit H, Murray DW, Sabokbar A. Metal-on-metal hip resurfacing arthroplasty: A review of periprosthetic biological reactions. *Acta Orthopaedica.* 2008 Jan 1;79(6):734–47.
190. Park Y-S, Moon Y-W, Lim S-J, Yang J-M, Ahn G, Choi Y-L. Early Osteolysis Following Second-Generation Metal-on-Metal Hip Replacement. *JBJS.* 2005 Jul;87(7):1515–21.
191. Case CP, Langkamer VG, James C, Palmer MR, Kemp AJ, Heap PF, et al. Widespread dissemination of metal debris from implants. *J Bone Joint Surg Br.* 1994 Sep;76(5):701–12.
192. Urban RM, Jacobs JJ, Tomlinson MJ, Gavrilovic J, Black J, Peoc'h M. Dissemination of Wear Particles to the Liver, Spleen, and Abdominal Lymph Nodes of Patients with Hip or Knee Replacement\*. *JBJS.* 2000 Apr;82(4):457.
193. Jakobsen SS, Danscher G, Stoltenberg M, Larsen A, Bruun JM, Mygind T, et al. Cobalt-Chromium-Molybdenum Alloy Causes Metal Accumulation and Metallothionein Up-Regulation in Rat Liver and Kidney. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* 2007 Dec 1;101(6):441–6.
194. Gessner BD, Steck T, Woelber E, Tower SS. A Systematic Review of Systemic Cobaltism After Wear or Corrosion of Chrome-Cobalt Hip Implants. *J Patient Saf.* 2019 Jun;15(2):97–104.
195. Tower SS. Arthroprosthetic Cobaltism: Neurological and Cardiac Manifestations in Two Patients with Metal-on-Metal Arthroplasty: A Case Report. *JBJS.* 2010 Dec 1;92(17):2847–51.
196. Tower SS. Arthroprosthetic cobaltism associated with metal on metal hip implants. *BMJ.* 2012 Jan 17;344:e430.
197. Hart AJ, Hester T, Sinclair K, Powell JJ, Goodship AE, Pele L, et al. The association between metal ions from hip resurfacing and reduced T-cell counts. *The Journal of Bone and Joint Surgery British volume.* 2006 Apr 1;88-B(4):449–54.
198. Savarino L, Granchi D, Ciapetti G, Stea S, Donati ME, Zinghi G, et al. Effects of metal ions on white blood cells of patients with failed total joint arthroplasties. *Journal of Biomedical Materials Research.* 1999;47(4):543–50.

199. Nemery B. Metal toxicity and the respiratory tract. *European Respiratory Journal*. 1990 Feb 1;3(2):202–19.
200. Kawahara M, Kato-Negishi M. Link between Aluminum and the Pathogenesis of Alzheimer’s Disease: The Integration of the Aluminum and Amyloid Cascade Hypotheses. *Int J Alzheimers Dis* [Internet]. 2011 Mar 8 [cited 2021 Jun 11];2011. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3056430/>
201. Steens W, Foerster GV, Katzer A. Severe cobalt poisoning with loss of sight after ceramic-metal pairing in a hip—a case report. *Acta Orthopaedica*. 2006 Jan 1;77(5):830–2.
202. Apel W, Stark D, Stark A, O’Hagan S, Ling J. Cobalt-chromium toxic retinopathy case study. *Doc Ophthalmol*. 2013 Feb;126(1):69–78.
203. Rizzetti M, Liberini P, Zarattini G, Catalani S, Pazzaglia U, Apostoli P, et al. Loss of sight and sound. Could it be the hip? *Lancet (London, England)* [Internet]. 2009 Mar 21 [cited 2021 Jun 14];373(9668). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19304018/>
204. Ikeda T, Takahashi K, Kabata T, Sakagoshi D, Tomita K, Yamada M. Polyneuropathy caused by cobalt-chromium metallosis after total hip replacement. *Muscle Nerve*. 2010 Jul;42(1):140–3.
205. Severe cobalt intoxication following hip replacement revision: Clinical features and outcome, Pelclova D, *clin tox* 2012 (50-4) [Internet]. [cited 2018 Apr 23]. Available from: <http://sci-hub.tw/10.3109/15563650.2012.670244>
206. Charette RS, Neuwirth AL, Nelson CL. Arthroprosthetic cobaltism associated with cardiomyopathy. *Arthroplast Today*. 2017 Dec;3(4):225–8.
207. Machado C, Appelbe A, Wood R. Arthroprosthetic cobaltism and cardiomyopathy. *Heart Lung Circ*. 2012 Nov;21(11):759–60.
208. Granchi D, Cenni E, Giunti A, Baldini N. Metal hypersensitivity testing in patients undergoing joint replacement. *The Journal of Bone and Joint Surgery British volume* [Internet]. 2012 Aug 1 [cited 2021 Jun 14]; Available from: <https://online.boneandjoint.org.uk/doi/abs/10.1302/0301-620X.94B8.28135>
209. Willert H-G, Buchhorn GH, Fayyazi A, Flury R, Windler M, Köster G, et al. Metal-on-metal bearings and hypersensitivity in patients with artificial hip joints. A clinical and histomorphological study. *J Bone Joint Surg Am*. 2005 Jan;87(1):28–36.
210. Hallab N, Merritt K, Jacobs JJ. Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants. *J Bone Joint Surg Am*. 2001 Mar;83(3):428–36.
211. Gill HS, Grammatopoulos G, Adshead S, Tsiologiannis E, Tsiridis E. Molecular and immune toxicity of CoCr nanoparticles in MoM hip arthroplasty. *Trends Mol Med*. 2012 Mar;18(3):145–55.
212. Purdue PE, Koulouvaris P, Nestor BJ, Sculco TP. The Central Role of Wear Debris in Periprosthetic Osteolysis. *HSS Journal®*. 2006 Sep 1;2(2):102–13.

213. Camuzard O, Breuil V, Carle GF, Pierrefite-Carle V. Autophagy Involvement in Aseptic Loosening of Arthroplasty Components. *J Bone Joint Surg Am.* 2019 Mar 6;101(5):466–72.
214. Goodman SB, Ma T. Cellular chemotaxis induced by wear particles from joint replacements. *Biomaterials.* 2010 Jul 1;31(19):5045–50.
215. Zhang J-M, An J. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007;45(2):27–37.
216. Stea S, Visentin M, Granchi D, Ciapetti G, Donati ME, Sudanese A, et al. Cytokines and osteolysis around total hip prostheses. *Cytokine.* 2000 Oct;12(10):1575–9.
217. Nich C, Takakubo Y, Pajarinen J, Ainola M, Salem A, Sillat T, et al. Macrophages – Key Cells in the Response to Wear Debris from Joint Replacements. *J Biomed Mater Res A.* 2013 Oct;101(10):3033–45.
218. Hallab NJ, Jacobs JJ. Chemokines Associated with Pathologic Responses to Orthopedic Implant Debris. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017;8:5.
219. Dyskova T, Gallo J, Kriegova E. The Role of the Chemokine System in Tissue Response to Prosthetic By-products Leading to Periprosthetic Osteolysis and Aseptic Loosening. *Front Immunol.* 2017;8:1026.
220. Hundrić-Haspl Z, Pecina M, Haspl M, Tomicic M, Jukic I. Plasma cytokines as markers of aseptic prosthesis loosening. *Clin Orthop Relat Res.* 2006 Dec;453:299–304.
221. Sypniewska G, Lis K, Bilinski PJ. Bone turnover markers and cytokines in joint fluid: analyses in 10 patients with loose hip prosthesis and 39 with coxarthrosis. *Acta Orthop Scand.* 2002 Oct;73(5):518–22.
222. Christiansen RJ, Münch HJ, Bonefeld CM, Thyssen JP, Sloth JJ, Geisler C, et al. Cytokine Profile in Patients with Aseptic Loosening of Total Hip Replacements and Its Relation to Metal Release and Metal Allergy. *J Clin Med.* 2019 Aug 20;8(8).
223. Archibeck MJ, Jacobs JJ, Roebuck KA, Glant TT. The basic science of periprosthetic osteolysis. *Instr Course Lect.* 2001;50:185–95.
224. Campbell PA, Wang M, Amstutz HC, Goodman SB. Positive cytokine production in failed metal-on-metal total hip replacements. *Acta Orthop Scand.* 2002 Oct;73(5):506–12.
225. Clarke SA, Brooks RA, Hobby JL, Wimhurst JA, Myer BJ, Rushton N. Correlation of synovial fluid cytokine levels with histological and clinical parameters of primary and revision total hip and total knee replacements. *Acta Orthop Scand.* 2001 Oct;72(5):491–8.
226. Bauer TW. Particles and periimplant bone resorption. *Clin Orthop Relat Res.* 2002 Dec;(405):138–43.
227. Beraudi A, Stea S, Cremonini S, Visentin M, Toni A. Assessment of five interleukins in human synovial fluid as possible markers for aseptic loosening of hip arthroplasty. *Artif Organs.* 2009 Jul;33(7):538–43.
228. Fiorito S, Magrini L, Goalard C. Pro-inflammatory and anti-inflammatory circulating cytokines and periprosthetic osteolysis. *J Bone Joint Surg Br.* 2003 Nov;85(8):1202–6.

229. Nakashima Y, Sun DH, Trindade MC, Chun LE, Song Y, Goodman SB, et al. Induction of macrophage C-C chemokine expression by titanium alloy and bone cement particles. *J Bone Joint Surg Br.* 1999 Jan;81(1):155–62.
230. Lassus J, Waris V, Xu J-W, Li T-F, Hao J, Nietosvaara Y, et al. Increased interleukin-8 (IL-8) expression is related to aseptic loosening of total hip replacement. *Arch Orth Traum Surg.* 2000 Apr 1;120(5):328–32.
231. Kaufman AM, Alabre CI, Rubash HE, Shanbhag AS. Human macrophage response to UHMWPE, TiAlV, CoCr, and alumina particles: analysis of multiple cytokines using protein arrays. *J Biomed Mater Res A.* 2008 Feb;84(2):464–74.
232. Horowitz SM, Purdon MA. Mechanisms of cellular recruitment in aseptic loosening of prosthetic joint implants. *Calcif Tissue Int.* 1995 Oct;57(4):301–5.
233. Granchi D, Verri E, Ciapetti G, Stea S, Savarino L, Sudanese A, et al. Bone-resorbing cytokines in serum of patients with aseptic loosening of hip prostheses. *J Bone Joint Surg Br.* 1998 Sep;80(5):912–7.
234. Christopher MJ, Link DC. Granulocyte colony-stimulating factor induces osteoblast apoptosis and inhibits osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res.* 2008 Nov;23(11):1765–74.
235. Zhao J, Zhao Q, Ning P, Shang K, Liu C, Ni M, et al. G-CSF Inhibits Growths of Osteoblasts and Osteocytes by Upregulating Nitric Oxide Production in Neutrophils. *J Craniofac Surg.* 2019 Dec;30(8):e776–80.
236. Frigerio E, Pigatto PD, Guzzi G, Altomare G. Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants: a prospective study. *Contact Dermatitis.* 2011 May;64(5):273–9.
237. Goullé JP, Sausseureau E, Mahieu L, Bouige D, Groenwont S, Guerbet M, et al. Application of inductively coupled plasma mass spectrometry multielement analysis in fingernail and toenail as a biomarker of metal exposure. *J Anal Toxicol.* 2009 Mar;33(2):92–8.
238. Goullé J-P, Mahieu L, Maignant V, Bouige D, Sausseureau É, Lacroix C. Valeurs usuelles des métaux et métalloïdes dans le sang total et les urines par ICP-MS chez cinquante-quatre sujets décédés. *Ann Toxicol Anal.* 19(1):43–51.
239. Caroli S, Alimonti A, Coni E, Petrucci F, Senofonte O, Violante N. The Assessment of Reference Values for Elements in Human Biological Tissues and Fluids: A Systematic Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry.* 1994 Jan 1;24(5–6):363–98.
240. Versieck J. Trace elements in human body fluids and tissues. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1985;22(2):97–184.
241. Goullé J-P, Mahieu L, Castermant J, Neveu N, Bonneau L, Lainé G, et al. Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair: Reference values. *Forensic Science International.* 2005 Oct 4;153(1):39–44.
242. Cesbron A, Sausseureau E, Mahieu L, Couland I, Guerbet M, Goullé J-P. Metallic Profile of Whole Blood and Plasma in a Series of 106 Healthy Volunteers. *Journal of Analytical Toxicology.* 2013 Sep 1;37(7):401–5.

243. Heitland P, Köster HD. Biomonitoring of 37 trace elements in blood samples from inhabitants of northern Germany by ICP–MS. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2006 Dec 4;20(4):253–62.
244. Schultze B, Lind PM, Larsson A, Lind L. Whole blood and serum concentrations of metals in a Swedish population-based sample. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 2014 Mar 1;74(2):143–8.
245. Alimonti A, Bocca B, Mannella E, Petrucci F, Zennaro F, Cotichini R, et al. Assessment of reference values for selected elements in a healthy urban population. *Ann Ist Super Sanita*. 2005;41(2):181–7.
246. Minoia C, Sabbioni E, Apostoli P, Pietra R, Pozzoli L, Gallorini M, et al. Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European community I. A study of 46 elements in urine, blood and serum of Italian subjects. *Science of The Total Environment*. 1990 Jun 1;95:89–105.
247. Grandjean P. Reference intervals for toxic metals: problems and prospects. Abraham J. Gitlitz memorial lecture. *Ann Clin Lab Sci*. 1986 Feb;16(1):67–74.
248. Yoo Y, Lee S, Yang J, In S, Kim K, Chung K, et al. Organ Distribution of Heavy Metals in Autopsy Material from Normal Korean. *Journal of Health Science - J HEALTH SCI*. 2002 Apr 1;48:186–94.
249. Goullé J-P, Mahieu L, Anagnostides J-G, Bouige D, Sausseureau E, Guerbet M, et al. Profil métallique tissulaire par ICP-MS chez des sujets décédés. *Ann Toxicol Anal*. 2010;22(1):1–9.
250. Tipton IH, Schroeder HA, Perry HMJ, Cook MJ. Trace Elements in Human Tissue Part III. Subjects from Africa, the Near and Far East and Europe. *Health Physics*. 1965 May;11(5):403–51.
251. Tipton IH, Cook MJ. Trace elements in human tissue. II. Adult subjects from the United States. *Health Phys*. 1963 Feb;9:103–45.
252. Rahil-Khazen R, Bolann BJ, Myking A, Ulvik RJ. Multi-element analysis of trace element levels in human autopsy tissues by using inductively coupled atomic emission spectrometry technique (ICP-AES). *J Trace Elem Med Biol*. 2002;16(1):15–25.
253. Marks G, Moore CE, Kanabrocki E, Oester Y, Kaplan E. Determination of Trace Elements in Human Tissue. I. Cd, Fe, Zn, Mg, and Ca. 1972;
254. Rikhanov LP, Baranovskaya NV, Ignatova TN, Sudyko AF, Sandimirova GP, Pakhomova NN. Trace elements in human organs and tissues and their significance for environmental monitoring. *Geochem Int*. 2011 Jul 1;49(7):738–42.
255. Beneš B, Jakubec K, Šmíd J, Spěváčková V. Determination of thirty-two elements in human autopsy tissue. *Biol Trace Elem Res*. 2000 Jun 1;75(1):195–203.
256. Aalbers TG, Houtman JP, Makkink B. Trace-element concentrations in human autopsy tissue. *Clinical Chemistry*. 1987 Nov 1;33(11):2057–64.

257. Persigehl M, Schicha H, Kasperek K, Feinendegen LE. Behaviour of trace element concentration in human organs in dependence of age and environment. *J Radioanal Chem.* 1977 Sep 1;37(2):611–5.
258. Karamat L, Pinggera O, Knahr K. Blood analysis for trace metals in metal-on-metal, ceramic-on-ceramic and metal-on-cross-linked PE bearings in total hip arthroplasty. *HIP International.* 2005 Jul 1;15(3):136–42.
259. Engh CA, MacDonald SJ, Sritulanondha S, Thompson A, Naudie D, Engh CA. 2008 John Charnley Award: Metal Ion Levels After Metal-on-Metal Total Hip Arthroplasty: A Randomized Trial. *Clin Orthop Relat Res.* 2009 Jan;467(1):101–11.
260. Dahlstrand H, Stark A, Wick MC, Anissian L, Hailer NP, Weiss RJ. Comparison of metal ion concentrations and implant survival after total hip arthroplasty with metal-on-metal versus metal-on-polyethylene articulations. *Acta Orthop.* 2017 Oct;88(5):490–5.
261. Tarpada SP, Loloi J, Schwechter EM. A Case of Titanium Pseudotumor and Systemic Toxicity After Total Hip Arthroplasty Polyethylene Failure. *Arthroplast Today.* 2020 Dec;6(4):710–5.
262. Peters RM, Willemsse P, Rijk PC, Hoogendoorn M, Zijlstra WP. Fatal Cobalt Toxicity after a Non-Metal-on-Metal Total Hip Arthroplasty. *Case Reports in Orthopedics.* 2017 Aug 27;2017:e9123684.
263. Hasegawa M, Sudo A, Uchida A. Cobalt-chromium head wear following revision hip arthroplasty performed after ceramic fracture—a case report. *Acta Orthopaedica.* 2006 Jan 1;77(5):833–5.
264. Kempf I, Semlitsch M. Massive wear of a steel ball head by ceramic fragments in the polyethylene acetabular cup after revision of a total hip prosthesis with fractured ceramic ball. *Arch Orthop Trauma Surg.* 1990;109(5):284–7.
265. O'Brien ST, Burnell CD, Hedden DR, Brandt J-M. Abrasive wear and metallosis associated with cross-linked polyethylene in total hip arthroplasty. *J Arthroplasty.* 2013 Jan;28(1):197.e17-21.
266. Pelclova D, Sklensky M, Janicek P, Lach K. Severe cobalt intoxication following hip replacement revision: clinical features and outcome. *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa)* [Internet]. 2012 Apr [cited 2021 Jun 14];50(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22455358/>
267. Harris A, Johnson J, Mansuripur PK, Limbird R. Cobalt toxicity after revision to a metal-on-polyethylene total hip arthroplasty for fracture of ceramic acetabular component. *Arthroplasty Today.* 2015 Oct 31;1(4):89–91.
268. Polyzois I, Nikolopoulos D, Michos I, Patsouris E, Theocharis S. Local and systemic toxicity of nanoscale debris particles in total hip arthroplasty. *J Appl Toxicol.* 2012 Apr;32(4):255–69.
269. Grassin-Delyle S, Martin M, Hamzaoui O, Lamy E, Jayle C, Sage E, et al. A high-resolution ICP-MS method for the determination of 38 inorganic elements in human whole blood, urine, hair and tissues after microwave digestion. *Talanta.* 2019 Jul 1;199:228–37.

270. Özcan M, Hämmerle C. Titanium as a Reconstruction and Implant Material in Dentistry: Advantages and Pitfalls. *Materials (Basel)*. 2012 Aug 24;5(9):1528–45.
271. INRS. INRS. Base de données Biotox. Guide biotoxicologique pour les médecins du travail. Inventaire des dosages biologiques disponibles pour la surveillance des sujets exposés à des produits chimiques [Internet]. 2020 [cited 2021 Jul 13]. Available from: <https://www.inrs.fr/publications/bdd/biotox.html>
272. Roussel A-M, Hininger-Favier I. Éléments-trace essentiels en nutrition humaine : chrome, sélénium, zinc et fer. In 2009.
273. Institut National de Santé Publique du Québec. INSPQ. Étude sur l'établissement de valeurs de référence d'éléments traces et de métaux dans le sang, le sérum et l'urine de la population de la grande région de Québec [Internet]. Direction toxicologie humaine direction risques biologiques, environnementaux et occupationnels; 2003 Oct [cited 2021 Jun 25]. Available from: <https://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/289-ValeursReferenceMetaux.pdf>
274. Rodushkin I, Ödman F, Branth S. Multielement analysis of whole blood by high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry. *Fresenius J Anal Chem*. 1999 Jun 1;364(4):338–46.
275. Nisse C, Tagne-Fotso R, Howsam M, Members of Health Examination Centres of the Nord – Pas-de-Calais region network, Richeval C, Labat L, et al. Blood and urinary levels of metals and metalloids in the general adult population of Northern France: The IMEPOGE study, 2008-2010. *Int J Hyg Environ Health*. 2017 Apr;220(2 Pt B):341–63.
276. Mikulewicz M, Chojnacka K, Gedrange T, Górecki H. Reference values of elements in human hair: a systematic review. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2013 Nov;36(3):1077–86.
277. Chojnacka K, Zielińska A, Górecka H, Dobrzański Z, Górecki H. Reference values for hair minerals of Polish students. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2010 May 1;29(3):314–9.
278. Caruso RV, O'Connor RJ, Stephens WE, Cummings KM, Fong GT. Toxic Metal Concentrations in Cigarettes Obtained from U.S. Smokers in 2009: Results from the International Tobacco Control (ITC) United States Survey Cohort. *Int J Environ Res Public Health*. 2014 Jan;11(1):202–17.
279. Schroeder WH, Dobson M, Kane DM, Johnson ND. Toxic Trace Elements Associated with Airborne Particulate Matter: A Review. *JAPCA*. 1987 Nov 1;37(11):1267–85.
280. Taiwo OA. Diffuse Parenchymal Diseases Associated With Aluminum Use and Primary Aluminum Production. *J Occup Environ Med*. 2014 May;56(5 Suppl):S71–2.
281. IARC. Occupational exposures during aluminium production. [Internet]. 2012 [cited 2021 Jul 22]. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; vol. 100F). Available from: <https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/06/mono100F-22.pdf>
282. Johri N, Jacquillet G, Unwin R. Heavy metal poisoning: the effects of cadmium on the kidney. *Biometals*. 2010 Oct;23(5):783–92.

283. Bridges CC, Zalups RK. The Aging Kidney and the Nephrotoxic Effects of Mercury. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2017;20(2):55–80.
284. Orr SE, Bridges CC. Chronic Kidney Disease and Exposure to Nephrotoxic Metals. *Int J Mol Sci.* 2017 May 12;18(5):1039.
285. Leung KM, Ooi VEC. Studies on thallium toxicity, its tissue distribution and histopathological effects in rats. *Chemosphere.* 2000 Jul 1;41(1):155–9.
286. Pérez-Cárceles MD, Sibón A, Gil Del Castillo ML, Vizcaya MA, Osuna E, Casas T, et al. Strontium levels in different causes of death: diagnostic efficacy in drowning. *Biol Trace Elem Res.* 2008;126(1–3):27–37.
287. Deveaux M, Pépin G. Les métaux marqueurs de la noyade. *Ann Toxicol Anal.* 2007;19(1):59–64.
288. Angino EE, Billings GK, Andersen N. Observed variations in the strontium concentration of sea water. *Chemical Geology.* 1966 Jan 1;1:145–53.
289. Ingrao G, Belloni P, Di Pietro S, Santaroni GP. Levels of some trace elements in selected autopsy organs, and in hair and blood samples from adult subjects of the Italian population. *Biol Trace Elem Res.* 1990 Dec;26–27:699–708.
290. Barr DB, Wilder LC, Caudill SP, Gonzalez AJ, Needham LL, Pirkle JL. Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: implications for urinary biologic monitoring measurements. *Environ Health Perspect.* 2005 Feb;113(2):192–200.
291. Takács S, Tatár A. Trace elements in the environment and in human organs: analysis according to domicile and sex. *Z Gesamte Hyg.* 1991 Feb;37(2):53–5.
292. Yinsong W, Guisun Z, Mingguang T, Min Z, Yuandi C. Distribution of some elements in human hair and internal organs, determined by neutron activation analysis. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, Articles.* 1991 Oct 1;151(2):301–11.
293. Ragab Ali AR, Mazroua M, Younis S, Al Emam A, Moagel N, Buaijan A, et al. Comparative Study of Blood Metal Levels in Post-Mortem and Living Population Samples from Dammam, KSA. *Journal of Forensic Research.* 2017 Jan 1;08.
294. Schier JG, Heninger M, Wolkin A, Kieszak S, Caldwell KL, Fajardo GC, et al. Postmortem blood cadmium, lead, and mercury concentrations: comparisons with regard to sampling location and reference ranges for living persons. *J Anal Toxicol.* 2010 Apr;34(3):129–34.
295. Oestreicher P, Cousins RJ. Copper and Zinc Absorption in the Rat: Mechanism of Mutual Antagonism. *The Journal of Nutrition.* 1985 Feb 1;115(2):159–66.
296. Remelli M, Nurchi VM, Lachowicz JI, Medici S, Zoroddu MA, Peana M. Competition between Cd(II) and other divalent transition metal ions during complex formation with amino acids, peptides, and chelating agents. *Coordination Chemistry Reviews.* 2016 Nov 15;327–328:55–69.
297. Pessoa J, Garribba E, Santos MFA, Santos-Silva T. Vanadium and proteins: Uptake, transport, structure, activity and function. 2015;



298. Gunter TE, Gerstner B, Gunter KK, Malecki J, Gelein R, Valentine WM, et al. Manganese Transport via the Transferrin Mechanism. *Neurotoxicology*. 2013 Jan;34:118–27.
299. Bonaventura P. Zinc and Cadmium homeostasis changes in chronic inflammation and new treatment options in arthritis [Internet] [phdthesis]. Université de Lyon; 2016 [cited 2021 Aug 9]. Available from: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01468220>
300. Bonaventura P, Lamboux A, Albarède F, Miossec P. Differential effects of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  on the control of metal metabolism and cadmium-induced cell death in chronic inflammation. *PloS one* [Internet]. 2018 May 16 [cited 2021 Aug 9];13(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29768427/>
301. Hench LL, Ethridge EC. Biomaterials—The Interfacial Problem. In: Brown JHU, Dickson JF, editors. *Advances in Biomedical Engineering* [Internet]. Academic Press; 1975 [cited 2021 Aug 7]. p. 35–150. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780120049059500074>
302. Whitehead MW, Thompson RP, Powell JJ. Regulation of metal absorption in the gastrointestinal tract. *Gut*. 1996 Nov 1;39(5):625–8.
303. Konttinen YT, Takagi M, Mandelin J, Lassus J, Salo J, Ainola M, et al. Acid attack and cathepsin K in bone resorption around total hip replacement prosthesis. *J Bone Miner Res*. 2001 Oct;16(10):1780–6.
304. Kovačević N, Pihlar B, Šelih V, Milošev I. The Effect of pH Value of a Simulated Physiological Solution on the Corrosion Resistance of Orthopaedic Alloys. *Acta Chimica Slovenica*. 2012 Mar 1;59:144.
305. Okazaki Y, Nagata H. Comparisons of immersion and electrochemical properties of highly biocompatible Ti–15Zr–4Nb–4Ta alloy and other implantable metals for orthopedic implants. *Science and Technology of Advanced Materials*. 2012 Dec 13;13:064216.
306. Tamam E, Turkyilmaz I. Effects of pH and elevated glucose levels on the electrochemical behavior of dental implants. *J Oral Implantol*. 2014 Apr;40(2):153–9.
307. Tigani D, Fosco M, Ben Ayad R, Fantasia R. Orthopaedic implant materials and design. In: Affatato S, editor. *Wear of Orthopaedic Implants and Artificial Joints* [Internet]. Woodhead Publishing; 2013 [cited 2021 Aug 6]. p. 133–77. (Woodhead Publishing Series in Biomaterials). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780857091284500066>
308. Gillani R, Ercan B, Qiao A, Webster TJ. Nanofunctionalized zirconia and barium sulfate particles as bone cement additives. *Int J Nanomedicine*. 2010;5:1–11.
309. Sansone V, Pagani D, Melato M. The effects on bone cells of metal ions released from orthopaedic implants. A review. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2013;10(1):34–40.
310. Savarino L, Granchi D, Ciapetti G, Cenni E, Pantoli AN, Rotini R, et al. Ion release in patients with metal-on-metal hip bearings in total joint replacement: A comparison with metal-on-polyethylene bearings. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2002;63(5):467–74.

311. Rasquinha VJ, Ranawat CS, Weiskopf J, Rodriguez JA, Skipor AK, Jacobs JJ. Serum metal levels and bearing surfaces in total hip arthroplasty. *J Arthroplasty*. 2006 Sep;21(6 Suppl 2):47–52.
312. MacDonald SJ, McCalden RW, Chess DG, Bourne RB, Rorabeck CH, Cleland D, et al. Metal-on-metal versus polyethylene in hip arthroplasty: a randomized clinical trial. *Clin Orthop Relat Res*. 2003 Jan;(406):282–96.
313. Jantzen C, Jørgensen HL, Duus BR, Sparring SL, Lauritzen JB. Chromium and cobalt ion concentrations in blood and serum following various types of metal-on-metal hip arthroplasties: a literature overview. *Acta Orthop*. 2013 Jun;84(3):229–36.
314. Ong KL, Yun BM, White JB. New biomaterials for orthopedic implants. *ORR*. 2015 Sep 8;7:107–30.
315. Lou W, Dong Y, Zhang H, Jin Y, Hu X, Ma J, et al. Preparation and Characterization of Lanthanum-Incorporated Hydroxyapatite Coatings on Titanium Substrates. *Int J Mol Sci*. 2015 Sep 2;16(9):21070–86.
316. Smethurst E, Waterhouse RB. Causes of failure in total hip prostheses. *J Mater Sci*. 1977 Sep 1;12(9):1781–92.
317. Evans EM, Freeman M a. R, Miller AJ, Vernon-Roberts B. Metal sensitivity as a cause of bone necrosis and loosening of the prosthesis in total joint replacement. *The Journal of Bone and Joint Surgery British volume*. 1974 Nov 1;56-B(4):626–42.
318. Dobbs HS, Minski MJ. Metal ion release after total hip replacement. *Biomaterials*. 1980 Oct;1(4):193–8.
319. Campbell P, Urban RM, Catelas I, Skipor AK, Schmalzried TP. Autopsy analysis thirty years after metal-on-metal total hip replacement. A case report. *J Bone Joint Surg Am*. 2003 Nov;85(11):2218–22.
320. Balbouzis T, Georgiadis T, Grigoris P. Granulomatous Lung Disease: A Novel Complication following Metallosis from Hip Arthroplasty. *Hip Pelvis*. 2016 Dec;28(4):249–53.
321. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2017 Dec 14;9(6):7204–18.
322. Jabbour HN, Sales KJ, Catalano RD, Norman JE. Inflammatory pathways in female reproductive health and disease. *Reproduction*. 2009 Dec;138(6):903–19.
323. Noack M, Kolopp-Sarda M-N. Cytokines et inflammation : physiologie, physiopathologie et utilisation thérapeutique. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2018 Feb 1;2018(499):28–37.
324. Lawrence T, Gilroy DW. Chronic inflammation: a failure of resolution? *Int J Exp Pathol*. 2007 Apr;88(2):85–94.
325. Jacobs JJ, Shanbhag A, Glant TT, Black J, Galante JO. Wear Debris in Total Joint Replacements. *JAAOS - Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 1994 Aug;2(4):212–20.

326. Abu-Amer Y, Darwech I, Clohisy JC. Aseptic loosening of total joint replacements: mechanisms underlying osteolysis and potential therapies. *Arthritis Research & Therapy*. 2007 Jun 29;9(1):S6.
327. Jacobs JJ, Hallab NJ, Urban RM, Wimmer MA. Wear particles. *J Bone Joint Surg Am*. 2006 Apr;88 Suppl 2:99–102.
328. González O, Smith RL, Goodman SB. Effect of size, concentration, surface area, and volume of polymethylmethacrylate particles on human macrophages in vitro. *J Biomed Mater Res*. 1996 Apr;30(4):463–73.
329. Sabokbar A, Pandey R, Athanasou NA. The effect of particle size and electrical charge on macrophage-osteoclast differentiation and bone resorption. *J Mater Sci Mater Med*. 2003 Sep;14(9):731–8.
330. Shanbhag AS, Jacobs JJ, Glant TT, Gilbert JL, Black J, Galante JO. Composition and morphology of wear debris in failed uncemented total hip replacement. *J Bone Joint Surg Br*. 1994 Jan;76(1):60–7.
331. Maloney WJ, Smith RL. Periprosthetic Osteolysis in Total Hip Arthroplasty: the Role of Particulate Wear Debris. *JBJS*. 1995 Sep;77(9):1448–61.
332. Costantini A, Takam Kamga P, Julie C, Corjon A, Dumenil C, Dumoulin J, et al. Plasma Biomarkers Screening by Multiplex ELISA Assay in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Treated with Immune Checkpoint Inhibitors. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2020 Dec 31 [cited 2021 May 20];13(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7795942/>
333. Shieh J, Gordon M, Jakubowski A, Peterson R, Gabrilove J, Moore M. Interleukin-1 modulation of cytokine receptors on human neutrophils: in vitro and in vivo studies. *Blood*. 1993 Apr 1;81(7):1745–54.
334. Leizer T, Cebon J, Layton JE, Hamilton JA. Cytokine Regulation of Colony-Stimulating Factor Production in Cultured Human Synovial Fibroblasts: I. Induction of GM-CSF and G-CSF Production by Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor. *Blood*. 1990 Nov 15;76(10):1989–96.
335. Koreny T, Tunyogi-Csapó M, Gál I, Vermes C, Jacobs JJ, Glant TT. The role of fibroblasts and fibroblast-derived factors in periprosthetic osteolysis. *Arthritis Rheum*. 2006 Oct;54(10):3221–32.
336. Hallab NJ, Jacobs JJ. Chapter II.5.6 - Orthopedic Applications. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, editors. *Biomaterials Science (Third Edition)* [Internet]. Academic Press; 2013 [cited 2021 Jun 21]. p. 841–82. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080877808000735>
337. Hallab NJ, Jacobs JJ. Chemokines Associated with Pathologic Responses to Orthopedic Implant Debris. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017 Jan 19;8:5.
338. Jiranek WA, Machado M, Jasty M, Jevsevar D, Wolfe HJ, Goldring SR, et al. Production of cytokines around loosened cemented acetabular components. Analysis with

- immunohistochemical techniques and in situ hybridization. *J Bone Joint Surg Am*. 1993 Jun;75(6):863–79.
339. Demetri G, Griffin J. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood*. 1991 Dec 1;78(11):2791–808.
340. Zsebo KM, Yuschenkoff VN, Schiffer S, Chang D, McCall E, Dinarello CA, et al. Vascular Endothelial Cells and Granulopoiesis: Interleukin-1 Stimulates Release of G-CSF and GM-CSF. *Blood*. 1988 Jan 1;71(1):99–103.
341. Lawlor KE, Campbell IK, Metcalf D, O'Donnell K, van Nieuwenhuijze A, Roberts AW, et al. Critical role for granulocyte colony-stimulating factor in inflammatory arthritis. *PNAS*. 2004 Aug 3;101(31):11398–403.
342. Bai X, Zhang C, Ruan D, He Q, Hou L, Li H. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) could be an effective adjuvant therapy for orthopedic implant-related infections (OIRI). *Medical Hypotheses*. 2011 May 1;76(5):703–5.
343. Al-Saffar N, Khwaja HA, Kadoya Y, Revell PA. Assessment of the Role of GM-CSF in the Cellular Transformation and the Development of Erosive Lesions Around Orthopaedic Implants. *American Journal of Clinical Pathology*. 1996 May 1;105(5):628–39.
344. Zhang Y, Yu W, Jiang X, Lv K, Sun S, Zhang F. Analysis of the cytotoxicity of differentially sized titanium dioxide nanoparticles in murine MC3T3-E1 preosteoblasts. *J Mater Sci: Mater Med*. 2011 Aug 1;22(8):1933–45.
345. Yang J, Black J. Competitive binding of chromium, cobalt and nickel to serum proteins. *Biomaterials*. 1994 Mar;15(4):262–8.
346. Merritt K, Rodrigo JJ. Immune response to synthetic materials. Sensitization of patients receiving orthopaedic implants. *Clin Orthop Relat Res*. 1996 May;(326):71–9.
347. Kanerva L, Sipiläinen-Malm T, Estlander T, Zitting A, Jolanki R, Tarvainen K. Nickel release from metals, and a case of allergic contact dermatitis from stainless steel. *Contact Dermatitis*. 1994 Nov;31(5):299–303.
348. Gawkrödger DJ. Nickel sensitivity and the implantation of orthopaedic prostheses. *Contact Dermatitis*. 1993 May;28(5):257–9.
349. Hallab NJ, Caicedo M, Finnegan A, Jacobs JJ. Th1 type lymphocyte reactivity to metals in patients with total hip arthroplasty. *J Orthop Surg Res*. 2008 Feb 13;3:6.
350. Hallab NJ, Caicedo M, McAllister K, Skipor A, Amstutz H, Jacobs JJ. Asymptomatic prospective and retrospective cohorts with metal-on-metal hip arthroplasty indicate acquired lymphocyte reactivity varies with metal ion levels on a group basis. *J Orthop Res*. 2013 Feb;31(2):173–82.
351. Menten P, Wuyts A, Van Damme J. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002 Dec;13(6):455–81.

352. Huang Z, Ma T, Ren P-G, Smith RL, Goodman SB. Effects of orthopedic polymer particles on chemotaxis of macrophages and mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A*. 2010 Sep 15;94(4):1264–9.
353. Yaszay B, Trindade MCD, Lind M, Goodman SB, Smith RL. Fibroblast expression of C—C chemokines in response to orthopaedic biomaterial particle challenge in vitro. *Journal of Orthopaedic Research*. 2001;19(5):970–6.
354. Bhavsar I, Miller CS, Al-Sabbagh M. Macrophage Inflammatory Protein-1 Alpha (MIP-1 alpha)/CCL3: As a Biomarker. *General Methods in Biomarker Research and their Applications*. 2015 Jun 1;223–49.
355. Gibon E, Ma T, Ren P-G, Fritton K, Biswal S, Yao Z, et al. Selective inhibition of the MCP-1-CCR2 ligand-receptor axis decreases systemic trafficking of macrophages in the presence of UHMWPE particles. *Journal of Orthopaedic Research*. 2012;30(4):547–53.
356. Dapunt U, Maurer S, Giese T, Gaida MM, Hänsch GM. The Macrophage Inflammatory Proteins MIP1 (CCL3) and MIP2 (CXCL2) in Implant-Associated Osteomyelitis: Linking Inflammation to Bone Degradation. *Mediators of Inflammation*. 2014 Mar 25;2014:e728619.
357. Humbert M, Garcia G. Éotaxine, chimiokine de premier plan de l’allergie. *Revue Française d’Allergologie et d’Immunologie Clinique*. 2004 Jan 1;44(1):62–4.
358. Garcia-Zepeda EA, Rothenberg ME, Ownbey RT, Celestin J, Leder P, Luster AD. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. *Nat Med*. 1996 Apr;2(4):449–56.
359. Rothenberg ME. Eotaxin, An Essential Mediator of Eosinophil Trafficking into Mucosal Tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999 Sep 1;21(3):291–5.
360. Gonzalo J-A, Jia G-Q, Aguirre V, Friend D, Coyle AJ, Jenkins NA, et al. Mouse Eotaxin Expression Parallels Eosinophil Accumulation during Lung Allergic Inflammation but It Is Not Restricted to a Th2-Type Response. *Immunity*. 1996 Jan 1;4(1):1–14.
361. Luster AD, Rothenberg ME. Role of the monocyte chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*. 1997;62(5):620–33.
362. Lilly CM, Nakamura H, Kesselman H, Nagler-Anderson C, Asano K, Garcia-Zepeda EA, et al. Expression of eotaxin by human lung epithelial cells: induction by cytokines and inhibition by glucocorticoids. *J Clin Invest*. 1997 Apr 1;99(7):1767–73.
363. Collins PD, Marleau S, Griffiths-Johnson DA, Jose PJ, Williams TJ. Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *J Exp Med*. 1995 Oct 1;182(4):1169–74.
364. Gilbert JL, Buckley CA, Jacobs JJ. In vivo corrosion of modular hip prosthesis components in mixed and similar metal combinations. The effect of crevice, stress, motion, and alloy coupling. *J Biomed Mater Res*. 1993 Dec;27(12):1533–44.

365. Haynes DR, Rogers SD, Hay S, Percy MJ, Howie DW. The differences in toxicity and release of bone-resorbing mediators induced by titanium and cobalt-chromium-alloy wear particles. *JBJS*. 1993 Jun;75(6):825–34.
366. Takakubo Y, Berce A, Trebše R, Tamaki Y, Milošev I, Al-Samadi A, et al. Wear and corrosion in the loosening of total joint replacements (TJR). In: Yan Y, editor. *Bio-Tribocorrosion in Biomaterials and Medical Implants* [Internet]. Woodhead Publishing; 2013 [cited 2021 Jun 21]. p. 74–110. (Woodhead Publishing Series in Biomaterials). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780857095404500041>
367. Erdemli B, Özbek EA, Başarir K, Karahan ZC, Öcal D, Biriken D. Proinflammatory biomarkers' level and functional genetic polymorphisms in periprosthetic joint infection. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica*. 2018 Mar 1;52(2):143–7.
368. Keemu H, Vaura F, Maksimow A, Maksimow M, Jokela A, Hollmén M, et al. Novel Biomarkers for Diagnosing Periprosthetic Joint Infection from Synovial Fluid and Serum. *JBJS Open Access*. 2021 Jun;6(2):e20.00067.
369. He T, Wu W, Huang Y, Zhang X, Tang T, Dai K. Multiple biomarkers analysis for the early detection of prosthetic aseptic loosening of hip arthroplasty. *Int Orthop*. 2013 Jun;37(6):1025–31.
370. Mertens MT, Singh JA. Biomarkers in Arthroplasty: A Systematic Review. *Open Orthop J*. 2011 Mar 16;5:92–105.
371. Perkins M, Lowell J, Kerkhof A, Mihalko W. Inflammatory Cytokines as Potential Biomarkers for Damage in Total Knee Arthroplasty. *Beyond the Implant: Retrieval Analysis Methods for Implant Surveillance* [Internet]. 2018 Jun [cited 2021 Jun 24]; Available from: [http://www.astm.org/DIGITAL\\_LIBRARY/STP/PAGES/STP160620170100.htm](http://www.astm.org/DIGITAL_LIBRARY/STP/PAGES/STP160620170100.htm)
372. Gollwitzer H, Dombrowski Y, Prodinger PM, Peric M, Summer B, Hapfelmeier A, et al. Antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines in periprosthetic joint infection. *J Bone Joint Surg Am*. 2013 Apr 3;95(7):644–51.
373. Randau TM, Friedrich MJ, Wimmer MD, Reichert B, Kuberra D, Stoffel-Wagner B, et al. Interleukin-6 in Serum and in Synovial Fluid Enhances the Differentiation between Periprosthetic Joint Infection and Aseptic Loosening. *PLOS ONE*. 2014 Feb 21;9(2):e89045.
374. Ettinger M, Calliess T, Kielstein JT, Sibai J, Brückner T, Lichtinghagen R, et al. Circulating Biomarkers for Discrimination Between Aseptic Joint Failure, Low-Grade Infection, and High-Grade Septic Failure. *Clinical Infectious Diseases*. 2015 Aug 1;61(3):332–41.
375. Sumner DR, Ross R, Purdue E. Are There Biological Markers for Wear or Corrosion? A Systematic Review. *Clin Orthop Relat Res*. 2014 Dec 1;472(12):3728–39.

# **Annexes**

**Annexe 1** : Supplementary data (Grassin-Delyle et al., Talanta, 2019)

**Supplementary Table 1: ICP-MS parameters.**

<b>Parameter</b>	<b>Value</b>
<b>Cool gas flow (L/min)</b>	16.0
<b>Auxiliary gas flow (L/min)</b>	0.80
<b>Sample gas flow (L/min)</b>	1.2
<b>Peristaltic pump speed (rpm)</b>	12.5
<b>Take-up time (s)</b>	120
<b>Wash time (s)</b>	20



Supplementary Table 2: Operating conditions for all isotopes.

Isotopes	<sup>9</sup> Be, <sup>85</sup> Rb, <sup>88</sup> Sr, <sup>90</sup> Zr, <sup>95</sup> Mo, <sup>101</sup> Ru, <sup>107</sup> Ag, <sup>111</sup> Cd, <sup>118</sup> Sn, <sup>121</sup> Sb, <sup>125</sup> Te, <sup>133</sup> Cs, <sup>137</sup> Ba, <sup>139</sup> La, <sup>140</sup> Ce	<sup>178</sup> Hf, <sup>182</sup> W, <sup>195</sup> Pt, <sup>197</sup> Au, <sup>202</sup> Hg, <sup>208</sup> Pb, <sup>209</sup> Bi, <sup>232</sup> Th, <sup>238</sup> U	<sup>47</sup> Ti	<sup>51</sup> V, <sup>52</sup> Cr, <sup>55</sup> Mn, <sup>56</sup> Fe, <sup>59</sup> Co, <sup>60</sup> Ni, <sup>63</sup> Cu, <sup>66</sup> Zn	<sup>205</sup> Tl	<sup>72</sup> Ge, <sup>75</sup> As, <sup>77</sup> Se, <sup>105</sup> Pd
Resolution	Low	Low	Medium	Medium	Medium	High
Internal standard	<sup>115</sup> In	<sup>193</sup> Ir	<sup>45</sup> Sc	<sup>71</sup> Ga	<sup>115</sup> In	<sup>115</sup> In
Mass window (%)	20	20	105-125	125	125	125
Setting time (s)	0.001-0.012	0.001-0.023	0.001-0.300	0.001-0.034	0.075	0.001-0.300
Sample time (s)	0.01-0.05	0.01-0.05	0.05-0.20	0.05-0.20	0.02	0.20
Samples per peak	50	50	20	20	20	20
Search window (%)	-	-	60	60	60	60
Integration window (%)	20	20	60	60	60	60
Scan type	EScan	EScan	EScan	EScan	EScan	EScan
Detection mode	Triple	Triple	Triple	Triple	Triple	Triple

## Étude Prometox

*Étude du retentissement systémique du relargage des éléments traces (ET) par les Dispositifs Médicaux Implantables. Identification de biomarqueurs d'inflammation systémique*

Version N°1.0 du 04/12/2018  
Code projet : APHP180539  
N° IDRCB / **2018-A02780-55**

Équipe coordonnatrice : Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie  
Pr Jean-Claude Alvarez  
Hôpital Raymond Poincaré – GH HUPIFO  
104 Boulevard Raymond Poincaré,  
92380 Garches

Responsable scientifique : Professeur Thomas BAUER

Promoteur : Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (AP-HP)  
et par délégation : Délégation à la Recherche Clinique et à  
l'innovation (DRCI)  
Hôpital Saint-Louis  
1, avenue Claude Vellefaux  
75010 Paris

Structure chargée du suivi de la recherche :  
Unité de Recherche Clinique Paris Île-de-France Ouest (URCPO)  
Hôpital Ambroise Paré – GH HUPIFO  
9 avenue Charles de Gaulle, 92104 Boulogne cedex  
chef de projet DRCI-URC : Nawal Derridj-Ait Younes  
Tél. : 01 49 09 47 47  
Fax : 01 49 09 44 71  
Courriel : nawal.derridj@aphp.fr

Délégation à la Recherche Clinique et à l'innovation (DRCI)  
Hôpital Saint Louis 75010 PARIS

Page de SIGNATURE DU PROTOCOLE de recherche

Version N°1.0 du 04/12/2018

Code projet : code promoteur APHP180539 / N° IDRCB: 2018-A02780-55

Titre : « Étude du retentissement systémique du relargage des éléments traces (ET) par les Dispositifs Médicaux Implantables. Identification de biomarqueurs d'inflammation systémique » PROMETOX

La recherche sera conduite conformément au protocole, aux bonnes pratiques en vigueur et aux dispositions législatives et réglementaires en vigueur.

L'équipe coordonnatrice :

Pr Jean-Claude Alvarez

Date : ...../...../.....

Signature :

Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie  
Hôpital Raymond Poincaré – GH HUPIFO  
104 Boulevard Raymond Poincaré,  
92380 Garches

Le promoteur :

Assistance Publique – Hôpitaux de Paris

Date : ...../...../.....

Département de la Recherche Clinique et du Développement

Signature :

Hôpital Saint Louis

75010 PARIS

La recherche a reçu un avis favorable du CPP EST II en date du 04 mars 2019

## TABLE DES MATIÈRES

<b>1 RÉSUMÉ SYNOPTIQUE</b> .....	<b>7</b>
ABREVIATIONS .....	7
<b>2 JUSTIFICATION SCIENTIFIQUE DE LA RECHERCHE</b> .....	<b>8</b>
2.1 POSITION DU PROBLEME .....	8
2.2 HYPOTHESES DE LA RECHERCHE.....	8
2.3 DESCRIPTION DE LA POPULATION A ETUDIER ET JUSTIFICATION DE SON CHOIX .....	8
2.4 DESCRIPTION DES ACTES PRATIQUES OU PRODUITS UTILISES CONFORMEMENT A LEUR UTILISATION COURANTE .....	8
2.5 DESCRIPTION DES ACTES ET DES PROCEDURES AJOUTES PAR LA RECHERCHE .....	8
2.6 RESUME DES BENEFICES ET DES RISQUES PREVISIBLES ET CONNUS POUR LES PERSONNES SE PRETANT A LA RECHERCHE .....	8
<b>3 OBJECTIFS DE LA RECHERCHE</b> .....	<b>8</b>
<b>3.1 OBJECTIF PRINCIPAL DE LA RECHERCHE</b> .....	<b>8</b>
<b>3.2 OBJECTIFS SECONDAIRES DE LA RECHERCHE</b> .....	<b>8</b>
<b>4 DESCRIPTION DE LA METHODOLOGIE DE LA RECHERCHE</b> .....	<b>9</b>
<b>4.1 PLAN EXPERIMENTAL</b> .....	<b>9</b>
<b>4.2 NOMBRE DE CENTRES PARTICIPANTS</b> .....	<b>9</b>
<b>4.3 MESURES PRISES POUR REDUIRE ET EVITER LES BIAIS</b> .....	<b>9</b>
<i>Identification des sujets</i> .....	9
<i>Randomisation</i> .....	9
<i>Résumé des mesures de contrôle des biais</i> .....	9
<b>5 CRITÈRES D'ÉVALUATION</b> .....	<b>9</b>
5.1 CRITERE D'ÉVALUATION PRINCIPAL .....	9
5.2 CRITERES D'ÉVALUATION SECONDAIRES .....	10
<b>6 DEROULEMENT DE LA RECHERCHE</b> .....	<b>11</b>
6.1 MODALITES DE RECUEIL DU CONSENTEMENT .....	11
6.2 VISITE D'INCLUSION .....	11
<i>Données recueillies à l'inclusion</i> .....	11
6.3 VISITES DE SUIVI DE LA RECHERCHE.....	12
6.4 VISITE DE FIN DE LA RECHERCHE .....	12
6.5 TABLEAU OU SCHEMA RECAPITULATIF DE LA CHRONOLOGIE DE LA RECHERCHE.....	12
<i>Tableau chronologique</i> .....	12
6.6 CALENDRIER DE LA RECHERCHE.....	12
6.7 DISTINCTION SOIN-RECHERCHE .....	14
<i>Tableau 3 : Distinction entre les actes liés au « soin » et les actes ajoutés par la         « recherche »</i> .....	14
<b>7 POPULATION DE L'ÉTUDE</b> .....	<b>14</b>
7.1 CRITERES D'INCLUSION .....	14
7.2 CRITERES DE NON INCLUSION .....	14
7.3 MODALITES DE RECRUTEMENT .....	14
<b>8 REGLES D'ARRET</b> .....	<b>15</b>

8.1 CRITERES ET MODALITES D'ARRET PREMATURE DE LA PARTICIPATION A LA RECHERCHE D'UN SUJET .....	15
8.2 MODALITES DE REMPLACEMENT DE CES PERSONNES, LE CAS ECHEANT.....	15
8.3 ARRET D'UNE PARTIE OU DE LA TOTALITE DE LA RECHERCHE .....	15
<b>9 TRAITEMENTS.....</b>	<b>15</b>
TRAITEMENTS DE L'ESSAI .....	15
<b>10 VIGILANCE .....</b>	<b>15</b>
<b>11 COMITES SPECIFIQUES DE LA RECHERCHE .....</b>	<b>15</b>
COMITE DE PILOTAGE.....	15
<b>12 GESTION DES DONNÉES .....</b>	<b>16</b>
12.1 MODALITES DE RECUEIL DES DONNEES .....	16
12.2 IDENTIFICATION DES DONNEES RECUEILLIES DIRECTEMENT DANS LES CRF QUI SERONT CONSIDEREES COMME DONNEES-SOURCE .....	16
12.3 DROIT D'ACCES AUX DONNEES ET DOCUMENTS SOURCE.....	16
<i>Accès aux données</i> .....	16
<i>Confidentialité des données</i> .....	16
12.4 TRAITEMENT DES DONNEES ET CONSERVATION DES DOCUMENTS ET DES DONNEES.....	17
<i>Identification du responsable et du lieu de la gestion du traitement des données</i> .....	17
<i>Saisie des données</i> .....	17
<i>Traitements des données (CNIL)</i> .....	17
<i>Archivage</i> .....	17
12.5 PROPRIETE DES DONNEES .....	18
<b>13 ASPECTS STATISTIQUES .....</b>	<b>18</b>
13.1 CALCUL DE L'EFFECTIF REQUIS .....	18
13.2 PLAN D'ANALYSE STATISTIQUE .....	18
13.3 DESCRIPTION.....	18
13.4 ANALYSE PRINCIPALE.....	18
13.5 ANALYSES SECONDAIRES .....	18
13.6 POPULATIONS .....	18
13.7 CRITERE STATISTIQUE D'ARRET DE L'ETUDE .....	19
13.8 GESTION DES MODIFICATIONS DU PLAN D'ANALYSE INITIAL .....	19
<b>14 CONTROLE ET ASSURANCE DE LA QUALITE .....</b>	<b>19</b>
14.1 ORGANISATION GENERALE .....	19
<i>Stratégie d'ouverture des centres</i> .....	19
<i>Contrôle qualité des données</i> .....	19
14.2 CAHIER D'OBSERVATION .....	19
14.3 GESTION DES NON CONFORMITES .....	20
14.4 AUDIT.....	20
14.5 ENGAGEMENT DE RESPONSABILITES DE L'INVESTIGATEUR PRINCIPAL.....	20
<b>15 ASPECTS ÉTHIQUES ET LÉGAUX .....</b>	<b>20</b>
15.1 MODALITES D'INFORMATION ET DE RECUEIL DU CONSENTEMENT DES PERSONNES SE PRETANT A LA RECHERCHE .....	20
15.2 INTERDICTION POUR LA PERSONNE DE PARTICIPER A UNE AUTRE RECHERCHE OU PERIODE D'EXCLUSION PREVUE A L'ISSU DE LA RECHERCHE, LE CAS ECHEANT .....	21
15.3 INDEMNISATION DES SUJETS .....	21
15.4 INSCRIPTION AU FICHER NATIONAL DES PERSONNES SE PRETANT A UNE RECHERCHE IMPLIQUANT LA PERSONNE HUMAINE .....	21

15.5 OBLIGATIONS LEGALES .....	21
<i>Rôle du promoteur</i> .....	21
15.6 DEMANDE D'AVIS AU COMITE DE PROTECTION DES PERSONNES CPP .....	21
15.7 INFORMATION DE L'ANSM .....	21
15.8 DECLARATION NORMALE AUPRES DE LA CNIL.....	22
15.9 MODIFICATIONS DE LA RECHERCHE .....	22
<b>16 FINANCEMENT ET ASSURANCE.....</b>	<b>22</b>
16.1 SOURCE DE FINANCEMENT .....	22
16.2 ASSURANCE .....	22
<b>17 RÈGLES RELATIVES A LA PUBLICATION.....</b>	<b>22</b>
17.1 MENTION DE L'AFFILIATION DE L'AP-HP POUR LES PROJETS PROMUS OU GERES PAR L'AP-HP .....	22
17.2 MENTION DU PROMOTEUR AP-HP (DRCD) DANS LES "ACKNOWLEDGMENTS" DU MANUSCRIT .....	23
17.3 MENTION DU FINANCEUR DANS LES "ACKNOWLEDGMENTS" DU MANUSCRIT .....	23
<b>18 BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>23</b>
<b>19 LISTE DES ADDENDA .....</b>	<b>23</b>
19.1 LISTE DES INVESTIGATEURS .....	23

# 1 RÉSUMÉ SYNOPTIQUE

Titre complet	Étude du retentissement systémique du relargage des éléments traces (ET) par les Dispositifs Médicaux Implantables. Identification de biomarqueurs d'inflammation systémique
Acronyme/référence	Prometox
Equipe coordonnatrice	Laboratoire de toxicologie, hôpital Raymond Poincaré
Responsable scientifique	Pr Jean-Claude Alvarez
Promoteur	AP-HP
Justification scientifique	Les DMI se dégradent au cours du temps, provoquant un relargage de particules, responsable d'une élévation des concentrations d'ET, au niveau péri-prothétique et éventuellement, au niveau systémique. Les DMI peuvent ainsi causer des phénomènes délétères locaux pouvant conduire à la nécessité de reprise des implants mais également des phénomènes inflammatoires systémiques.
Objectif et critère d'évaluation principal	Évaluer le retentissement systémique du relargage des ET par les DMI métalliques et non métalliques et notamment la réaction immune de l'organisme vis-à-vis de ces ET, leurs organes cibles, et d'identifier des biomarqueurs protéiques circulants susceptibles d'indiquer une évolution inflammatoire d'un DMI.
Objectifs et critères d'évaluation secondaires	-Établir les paramètres (moyennes, écart-type, quantiles) de la distribution des concentrations d'ET chez les sujets non porteurs de DMI (non porteurs de prothèse) dans différentes matrices (sang, cheveux, urine, viscères) -Établir les paramètres (moyennes, écart-type, quantiles) de la distribution des concentrations de ces métaux dans ces matrices chez des sujets porteurs de DMI sains et inflammatoires -Définir la matrice optimale pour le suivi de l'évolution de l'inflammation du DMI -Déterminer la forme de circulation des ET dans l'organisme
Schéma expérimental	Étude multi-centrique prospective sur 290 patients répartis en plusieurs groupes : <ol style="list-style-type: none"> <li>1. patients hospitalisés pour reprise de prothèse de hanche ou de genou</li> <li>2. patients décédés porteurs de DMI autopsiés dans un cadre médico-légal</li> <li>3. deux groupes non porteurs de DMI : <ol style="list-style-type: none"> <li>a. patients hospitalisés avant pose de DMI</li> <li>b. patients autopsiés non porteurs de DMI</li> </ol> </li> </ol> <p>Des échantillons d'urine, de sang et de cheveux seront prélevés en début et fin d'hospitalisation. Les tissus péri-prothétiques seront prélevés lors de l'intervention chirurgicale. Chez les patients décédés seront également utilisés les résultats des examens réalisés sur les prélèvements des 6 viscères (cœur, foie, rein, poumon, rate et cerveau) faits dans le cadre médico-légal. L'analyse toxicologique sera effectuée sur spectromètre de masse en plasma induit couplé (ICP-MS) haute résolution. Un prélèvement de sang sur Ficoll sera réalisé chez tous les patients vivants afin d'isoler les cellules mononucléées circulantes (macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes T</p>

	et B) en cytométrie de flux. L'analyse du plasma par Luminex™ multiplex permettra de déterminer la présence de protéines circulantes dirigées contre les ET et ainsi définir un (des) biomarqueur(s) d'une hyper-activation cellulaire liée à la libération de particules de la prothèse (TNF, IFN, cytokines, chémokines, métalloprotéines...).
Population concernée	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Patients porteurs d'une prothèse de hanche MoM, inox, céramique ou porteur d'une prothèse de genou, hospitalisés dans le service de chirurgie orthopédique (HUPIFO) dans le cadre d'une reprise de DMI pour cause d'inflammation, de dégradation ou de descellement</li> <li>✓ Utilisation de résultat de prélèvement de patients décédés et déjà autopsiés dans un cadre médico-légal porteurs et non porteurs de DMI</li> </ul>
Critères d'inclusion	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Patients hospitalisés pour reprise de : prothèse de hanche à couple de frottement en céramique/céramique ou métal/métal, prothèse de hanche à bille en inox prothèse de genoux (polyéthylène-métal)</li> <li>✓ Patients autopsiés porteurs et non porteurs de DMI (utilisation de données déjà existantes (sans aucune analyse complémentaire).</li> <li>✓ Affiliation à un régime d'Assurance-Maladie ou ayant-droit.</li> </ul>
Critères de non inclusion	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Infection à l'origine de la reprise de prothèse</li> <li>✓ Exposition professionnelle aux métaux</li> <li>✓ Patient sous tutelle.</li> </ul>
Autres actes ou procédures ajoutés par la recherche	Prélèvements de sang, urine et cheveux au cours de l'hospitalisation. Prélèvements de muqueuse, synovie péri-prothétiques au cours de l'intervention chirurgicale de reprise de prothèse ou lors de la première pose de prothèse.
Bénéfices attendus pour les participants et pour la société	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Aucun bénéfice direct pour les patients</li> <li>✓ Bénéfice collectif : <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Détermination de biomarqueurs de l'inflammation induite par les prothèses</li> <li>○ Approfondissement des connaissances sur la toxicité des métaux (forme de circulation, organes cible, manifestations cliniques...)</li> <li>○ Détermination des distributions des concentrations des ET dans la population générale et porteuse de DMI.</li> </ul> </li> </ul>
Déroulement pratique	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Inclusion des patients</li> <li>✓ Prélèvements biologiques en début d'hospitalisation, chirurgie de ou pose de la première prothèse, et en fin d'hospitalisation</li> <li>✓ Analyse toxicologique des échantillons</li> <li>✓ Exploitation des résultats</li> </ul>
Nombre de sujets prévus	290 ( dont 180 patients hospitalisés et les résultats de 110 patients autopsiés
Nombre de centres	2
Calendrier de la recherche	Période d'inclusion : 24 mois Durée de l'étude : 25 mois
Nombre d'inclusions prévues par centre et par mois	10
Source de financement	Laboratoire de toxicologie



## Abréviations

ET	Éléments traces
DMI	Dispositif médical implantable
ICP-MS	Spectromètre de masse en plasma induit couplé
PTH	Prothèse totale de hanche
MoM	Couple de frottement métal-métal
APR	Hôpital Ambroise Paré de Boulogne
RPC	Hôpital Raymond Poincaré de Garches

## 2 JUSTIFICATION SCIENTIFIQUE DE LA RECHERCHE

### 2.1 Position du problème

Les dispositifs médicaux implantables (DMI) ont connu une grande évolution ces dernières années. En France, 150 000 prothèses de hanche et 90 000 prothèses de genou sont posées par an (1) avec un taux de reprise de respectivement 10 % et 7 % à 10 ans (2, 3). Les matériaux utilisés sont la céramique, le polyéthylène ainsi que des métaux et alliages métalliques relativement inertes (chrome-cobalt, titane, acier inoxydable, nickel...) (4). Les couples de frottement implantés se répartissent en 33,5 % de métal-polyéthylène, 29,5 % de céramique-polyéthylène, 29,3 % de céramique-céramique et 7,7 % de métal-métal ou MoM (5) (données 2007 de l'Union nationale des caisses d'assurance maladie, UNCAM). En Angleterre et au Pays de Galles, des données plus récentes (2012) montrent une répartition différente : 57,1 % de métal-polyéthylène, 6,5 % de céramique-polyéthylène, 14,3 % de céramique-céramique et 14,2 % de métal-métal (6). L'utilisation du couple de frottement MoM diminue au profit des couples mixtes. En 2015, le couple MoM représente 1% des couples de frottement implantés en France. Environ 1000 prothèses totales de hanche de type MoM sont implantées chaque année en France (ANSM).

Bien que ces matériaux possèdent une excellente résistance à la corrosion et de bonnes propriétés mécaniques, les dispositifs médicaux implantables (DMI) se dégradent au cours du temps (7), libérant des éléments traces (ET) métalliques dont la concentration locale et systémique va augmenter (8). Les céramiques que l'on croyait plus inertes que les DMI à couple de frottement métal-métal (MoM) semblent également libérer des ET comme du strontium ou du zirconium (9, 10). Les DMI peuvent ainsi causer des phénomènes délétères locaux pouvant conduire à la nécessité de reprise des implants (3) mais également des phénomènes inflammatoires systémiques peu étudiés à ce jour (11, 12, 13). Les causes habituelles de reprise de prothèses sont des descellements aseptiques, des luxations, des fractures et des infections (14). Une étude de 2011, basée sur l'étude des registres nationaux de six pays, montre qu'une prothèse sur huit nécessite une reprise dans un délai de 10 ans après la pose (15).

De nombreux éléments comme le chrome, le nickel, le cobalt, le titane, le molybdène, le tantale, le zirconium, le tungstène, l'or, l'argent, le mercure, le strontium ou le vanadium peuvent être utilisés comme biomatériaux prothétiques. Les concentrations locales de ces ET peuvent être mesurées au niveau péri-prothétique, dans le sang, les urines, les cheveux, voire dans les viscères en post-mortem afin d'en évaluer l'exposition systémique et l'accumulation éventuelle dans les différents organes grâce à l'ICP-MS (spectrométrie de masse en plasma induit couplé) Haute Résolution (16).

La présence de corps étrangers tels que des nanoparticules est reconnue dans l'organisme par les systèmes de défense immunitaire, soit inné, soit adaptatif (17). Cette réponse immune peut être évaluée en utilisant les cellules mononucléées circulantes (18, 19). Cette approche peut permettre

la mise en évidence de biomarqueurs en faveur d'une hyper-activation cellulaire liée à la libération de particules issues de la prothèse, et non à un processus infectieux (20, 21).

Peu de données sont disponibles sur la toxicité des métaux dans le domaine de l'implantologie. Les données disponibles concernent majoritairement l'administration par voie orale ou par voie inhalée lors d'expositions professionnelles. À ce jour, seulement quelques données sur le retentissement systémique du relargage d'ET et sur les valeurs usuelles de concentrations métalliques sont disponibles chez l'Homme (22, 23, 24, 25, 26).

## 2.2 Hypothèses de la recherche

La dégradation des DMI au cours du temps est à l'origine d'une élévation des concentrations d'ET chez les sujets porteurs de DMI avec signe inflammatoire, au niveau péri-prothétique et éventuellement, au niveau systémique, cette augmentation étant probablement plus élevée que chez les porteurs de prothèses saines.

Cette étude permettra de déterminer puis de comparer les concentrations d'ET dans les différentes matrices étudiées (sang, urines, cheveux, tissus péri-prothétiques et pour les patients décédés, les viscères : foie, poumon, cœur, rein, rate, cerveau) chez des patients témoins non porteurs de DMI (patients autopsiés sans DMI et patient avant pose de DMI), porteurs de DMI inflammatoires (lors d'une reprise de DMI) et patients décédés et autopsiés porteurs de DMI avec ou sans signe inflammatoire péri-prothétique. Selon le type de couple de frottement (céramique, bille en inox, MoM), les ET impliqués seront probablement différents.

Les paramètres (moyenne, écart-type, quantiles) des distributions de concentrations dans les différentes matrices étudiées pourront être évalués selon les populations d'étude (saines, porteuses de DMI inflammatoires ou non). Il sera alors recherché une relation entre la dégradation des DMI, la présence d'éventuels signes histologiques systémiques tissulaires (identification notamment de foyers inflammatoires et tumoraux dans les différents viscères analysés) lors de l'analyse anatomopathologique réalisée en post autopsie et la concentration des ET au niveau local, systémique et dans les cheveux, matrice cumulative mois par mois (l'analyse segmentaire de chaque cm de cheveu correspond à l'analyse d'un mois d'intégration d'ET, la pousse des cheveux étant d'environ 1 cm/mois).

Il sera également recherché la présence de biomarqueurs (type protéines) prédictifs de l'inflammation par l'étude des cellules mononucléées porteuses de la réaction immune aux ET.

La forme (libre ou particulaire) de circulation des ET sera étudiée grâce à une analyse d'abord sans minéralisation puis avec minéralisation. En effet, la minéralisation permet de lyser la totalité de l'échantillon à l'état minéral, en particulier les nanoparticules, permettant le dosage de ses constituants. Les ions métalliques sous forme particulaire échappent aux dosages conventionnels.

La forme nanoparticulaire est à ce jour, considérée comme plus toxique car plus à même de déclencher les phénomènes inflammatoires.

La matrice de prélèvements optimale pour le suivi de la population porteuse de DMI pourrait ainsi également être définie afin d'améliorer et de faciliter le suivi clinique et biologique. À cet égard, l'utilisation des cheveux apparaît prometteuse, ce mode de prélèvement étant simple et non invasif, et des études antérieures ayant démontré des concentrations élevées d'ET. Ce prélèvement est très utilisé en toxicologie environnementale du fait de son caractère cumulatif qui le distingue du sang et des urines qui ne sont le reflet que des heures voire au maximum des 2-3 jours qui précèdent le prélèvement.

### **2.3 Description de la population à étudier et justification de son choix**

La population d'étude correspond à 290 patients. 150 patients hospitalisés pour reprise de DMI ou pour une première pose de DMI dans le service de chirurgie orthopédique, au sein du groupe hospitalier PIFO seront inclus sur 18 mois. Les services de chirurgie orthopédique du groupe hospitalier HUPIFO effectuent environ 200 reprises de prothèses par an. Les DMI concernés sont des prothèses de hanche et de genou à couple de frottement en métal, en céramique ou bille en inox :

- 50 patients hospitalisés pour reprise de prothèse de hanche à couple de frottement en céramique/céramique ou métal/métal (25 patients par groupe)
- 50 patients hospitalisés pour reprise de prothèse de hanche à bille en inox
- 50 patients hospitalisés pour reprise de prothèse de genoux (polyéthylène-métal)

De plus, 80 patients décédés porteurs de DMI (majoritairement non inflammatoires) et autopsiés à l'institut médico-légal de l'hôpital Raymond Poincaré, seront inclus. L'institut médico-légal réalise environ 800 autopsies par an.

Deux groupes contrôles seront constitués :

- 30 patients autopsiés non porteurs de DMI,
- 30 patients avant la première pose de DMI.

### **2.4 Description des actes pratiqués ou produits utilisés conformément à leur**

## **utilisation courante**

Les patients inclus dans l'étude sont hospitalisés pour pose ou reprise de prothèse. L'opération sera pratiquée par le chirurgien orthopédique en charge du patient et se déroulera conformément à la pratique courante.

Des prélèvements de sang et d'urine seront réalisés en début et en fin d'hospitalisation, en vue d'un bilan inflammatoire (CRP).

Pour les patients décédés autopsiés, le déroulement de l'autopsie n'est pas modifié par l'étude. Des échantillons de cheveux, urine, sang, tissu péri-prothétique, viscères (foie, rein, rate, cerveau, cœur, poumon) sont recueillis pour chaque autopsie, conformément aux prélèvements effectués dans un cadre médico-légal.

## **2.5 Description des actes et des procédures ajoutés par la recherche**

Lors de l'opération de reprise de prothèse, seront prélevés 1mL de liquide synovial ainsi que du tissu péri-prothétique (environ 1cm<sup>3</sup>) dans des tubes spécifiques à l'analyse élémentaire.

Un prélèvement de cheveux (une mèche de diamètre environ égal à 0,5 cm, orientée, de toute la longueur) sera réalisé au cours de l'hospitalisation.

Deux prélèvements de sang (tube hépariné à bouchon bleu marine 5mL et tube Ficoll de 5mL) et un prélèvement d'urine (monovette 5mL) seront effectués en début d'hospitalisation.

Un prélèvement de sang (tube hépariné à bouchon bleu marine 5mL) et d'urine (monovette 5mL) seront réalisés en fin d'hospitalisation.

Un questionnaire afin de recueillir les informations concernant le tabagisme, l'exposition professionnelle aux métaux et la présence de prothèses ou de dispositifs dentaires (notamment le type d'amalgames) sera remis au patient.

## **2.6 Résumé des bénéfices et des risques prévisibles et connus pour les personnes se prêtant à la recherche**

### **2.6.1 Bénéfice individuel :**

La recherche ne présente pas de bénéfice direct pour les participants

### **2.6.2 Bénéfice collectif :**

Les résultats de cette étude pourront avoir un impact sur les pratiques de bon usage des DMI et sur le suivi des patients porteurs de prothèses. Cette étude permettra de déterminer puis de comparer les concentrations d'ET (sous forme libre et nanoparticulaire) dans les différentes matrices biologiques étudiées (sang, urines, cheveux, tissus péri-prothétiques et pour les patients décédés, les viscères : foie, poumon, cœur, rein, rate, cerveau) chez des patients témoins non porteurs de DMI (patients autopsiés sans DMI et population générale), porteurs de DMI MoM et non MoM avec réaction inflammatoire (lors d'une reprise de DMI) et patients décédés et autopsiés porteurs de DMI avec ou sans signe inflammatoire péri-prothétique. Il sera alors recherché une relation entre la dégradation des prothèses, la présence d'éventuels signes histologiques systémiques tissulaires (identification notamment de foyers inflammatoires et tumoraux dans les différents viscères analysés) lors de l'analyse anatomopathologique réalisée en post autopsie et la concentration des ET au niveau local et systémique. L'activation des systèmes de défenses immunitaires peut être mise en évidence par analyses immunologiques (type luminex), pouvant ainsi révéler un immuno-phénotype responsable de cette inflammation, en l'occurrence les ET. Le retentissement systémique du relargage des métaux par les DMI, à l'origine d'effets délétères sur l'état clinique du patient, pourrait être évité par un suivi rigoureux de ces biomarqueurs, à savoir la concentration d'un ET spécifique dans une des matrices biologiques analysées, hors viscère, ainsi que l'apparition et le suivi d'éventuel(s) biomarqueur(s) type protéique en faveur de l'hyperactivation cellulaire liée aux particules métalliques. Ce suivi amélioré pourrait permettre d'envisager une opération précoce de remplacement de DMI avant l'apparition de signes cliniques délétères en cas d'inflammation importante. Il pourrait aussi être envisagé d'anticiper la dégradation du DMI en adaptant la prise en charge des patients. La matrice de prélèvements optimale pour le suivi de la population porteuse de DMI pourrait ainsi également être définie afin d'améliorer et de faciliter le suivi clinique et biologique des patients.

### **3 OBJECTIFS DE LA RECHERCHE**

#### **3.1 Objectif principal de la recherche**

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer le retentissement systémique du relargage des ET par les DMI métalliques et non métalliques et notamment la réaction immune de l'organisme vis-à-vis de ces ET, leurs organes cibles, et d'identifier des biomarqueurs protéiques circulants susceptibles d'indiquer une évolution inflammatoire d'un DMI.

### 3.2 Objectifs secondaires de la recherche

Les objectifs secondaires de cette étude sont :

- Établir des normes de concentrations d'ET libres et nano-particulaires pour une quarantaine d'éléments, (notamment Chrome, Cobalt, Nickel, Titane, Tantale, Zirconium, Tungstène, Or, Argent, Mercure, Molybdène, Strontium...) chez les sujets non porteurs de DMI dans différentes matrices (sang, urine, cheveux, viscères) avant et après minéralisation de ces matrices (patients décédés et autopsiés non porteurs de DMI et patients avant pose de DMI (pour les concentrations dans le sang, l'urine et les cheveux).
- Évaluer la distribution des concentrations de métaux dans ces mêmes matrices ainsi que dans le milieu péri-prothétique chez des sujets porteurs de DMI (patients décédés et autopsiés), le plus souvent sans signe inflammatoire, avec possibilité d'avoir certains DMI probablement inflammatoires.
- Évaluer les paramètres des distributions de concentrations des métaux dans ces mêmes matrices (à l'exception des viscères) chez des sujets vivants porteurs de DMI avec réaction inflammatoire (lors d'une reprise chirurgicale).
- Définir la matrice la plus adaptée (accessibilité, concentrations, absence de contamination) au suivi de l'apparition et à l'évolution de l'inflammation pour déterminer des normes de concentration des métaux étudiés.
- Déterminer les proportions entre les différentes formes de circulation : forme particulaire (analyse après minéralisation complète) ou forme libre (analyse sans minéralisation, permettant ainsi de doser les formes libres dissoutes), des ET dans l'organisme.

## 4 CRITÈRES D'ÉVALUATION

### 4.1 Critère d'évaluation principal

La mise en évidence de l'inflammation systémique induite par les ET présents dans les DMI reposera sur des critères sanguins et tissulaires :

- Mise en évidence par cytométrie de flux de l'hyperactivité des cellules de l'inflammation au contact de nanoparticules d'ET.
- Identification par Luminex<sup>TM</sup> multiplex (Bio-plex Pro<sup>TM</sup> human inflammation panel, Bio-rad) de biomarqueurs protéiques (protéines circulantes type TNF, IFN, cytokines, chemokines,

métalloprotéines...) liés à l'activation des cellules de l'inflammation lors de la libération de particules et du relargage des ET par le DMI.

- Corrélation dans les différentes matrices entre les concentrations des ET et l'analyse semi-quantitative de l'inflammation cellulaire et la présence de foyers tumoraux identifiés sur l'analyse histologique standard des tissus des principaux organes et des tissus péri-prothétiques prélevés à l'autopsie.

## 5.2 Critères d'évaluation secondaires

- Dosage des ET dans les liquides et tissus par ICP-MS haute résolution dans les sous populations étudiées (patients non porteurs de DMI autopsiés, patients porteurs de DMI autopsiés, patients porteurs de DMI avec réaction inflammatoire et repris chirurgicalement) et dans chacune des matrices analysées sous forme non minéralisée afin de déterminer les concentrations libres des ET (habituellement réalisé dans les études) et après minéralisation complète par minéraliseur type UltraWave afin de déterminer les concentrations sous forme nanoparticulaire des ET.

- Comparaison des concentrations des quarante ET analysés dans les différentes matrices en fonction des groupes.

# 6 DESCRIPTION DE LA METHODOLOGIE DE LA RECHERCHE

## 6.1 Plan expérimental

Il s'agit d'une étude multi-centrique prospective, contrôlée, à risques et contraintes minimales selon la loi Jardé, qui portera sur 290 patients. Les sujets seront inclus en 18 mois par les deux services de chirurgie orthopédique (Raymond Poincaré et Ambroise Paré) du groupe hospitalier PIFO, qui effectuent environ 200 reprises de prothèse annuelles et par l'institut médico-légal de l'hôpital Raymond Poincaré à Garches :

- 50 patients hospitalisés pour reprise de prothèse de hanche à couple de frottement en céramique/céramique ou métal/métal (25 patients par groupe)
- 50 patients hospitalisés pour reprise de prothèse de hanche à bille en inox
- 50 patients hospitalisés pour reprise de prothèse de genoux (polyéthylène-métal)
- 80 patients décédés autopsiés à l'institut médico-légal, porteurs de DMI.

L'institut médico-légal réalise environ 800 autopsies par an. Les prélèvements sont réalisés sous autorité Judiciaire dans le cadre d'une autopsie médico-légale. Douze prélèvements différents (milieux liquides, phanères et viscères) sont systématiquement prélevés dans ce cadre. Ils sont analysés quoi qu'il arrive dans un contexte de recherche des causes du décès. Les résultats seront utilisés pour le protocole.



- Deux groupes contrôles seront constitués :
  - o 30 patients autopsiés non porteurs de DMI,
  - o 30 patients avant la première pose de DMI.

Chez tous les sujets, l'urine, le sang, le tissu péri-prothétique et les cheveux seront prélevés. Chez les patients vivants, l'urine et le sang seront prélevés en début de période d'hospitalisation avant l'intervention, puis lors de la sortie (environ une semaine ou moins, après l'intervention de reprise ou première pose du DMI) afin d'évaluer les éventuelles variations des ET. Les tissus péri-prothétiques seront prélevés au cours de l'opération.

Chez les patients décédés, sera également réalisé un échantillon pour chacun des 6 viscères (cœur, foie, rein, poumon, rate et cerveau). Ces prélèvements sont effectués de manière systématique dans toute autopsie médico-légale réalisée en France et l'analyse des ET demandée dans un cadre médico-judiciaire. L'étude des viscères est novatrice et a été peu retrouvée dans la littérature (28, 29) et encore moins dans le domaine de l'implantologie. L'accumulation éventuelle dans les viscères des métaux relargués par les DMI pourra ainsi être évaluée par l'analyse en ICP-MS des viscères (en plus de l'analyse capillaire) et permettra d'identifier la répartition et les organes cibles de l'accumulation de ces ET.

L'analyse toxicologique sera effectuée sur spectromètre de masse en plasma induit couplé (ICP-MS) haute résolution, disponible dans l'équipe investigatrice. Cette technologie associe un plasma induit couplé à haute température à un spectromètre de masse et détecte, après ionisation, les molécules, selon leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ). La haute résolution permet de s'affranchir des interférences grâce à un secteur magnétique permettant une très grande sensibilité. La procédure analytique est en cours de validation. Les prélèvements, y compris les cheveux et les viscères, sont d'abord minéralisés en présence d'acides dans un minéraliseur type UltraWave puis analysés en ICP-MS haute résolution, quantifiant simultanément une quarantaine d'ET sur chaque échantillon.

Il sera aussi possible de définir la matrice la plus adaptée à l'analyse et au suivi des concentrations des métaux chez la population porteuse de DMI et tenter de définir des concentrations usuelles d'ET.

Parallèlement, il sera possible d'étudier la forme de circulation, libre ou nanoparticulaire, des ET métalliques ou non, grâce à la minéralisation par minéraliseur puissant type UltraWave.

La liste des ET mesurés comprend les éléments suivants : aluminium, antimoine, argent, arsenic, baryum, béryllium, bismuth, bore, cadmium, cérium, césium, chrome, cobalt, cuivre, étain, fer, germanium, hafnium, lanthane, manganèse, mercure, molybdène, nickel, or, palladium, platine, plomb, rubidium, ruthénium, sélénium, strontium, tellure, thallium, thorium, titane, tungstène, uranium, vanadium, zinc, zirconium. Les principaux ET d'intérêt, entrant dans la composition des alliages utilisés dans les DMI et pouvant présenter une toxicité, sont le nickel, chrome, cobalt, tungstène, molybdène, cadmium, manganèse, titane (3, 30).

Concernant les patients autopsiés, une analyse histologique des prélèvements visant à évaluer l'inflammation de manière semi-quantitative et à déterminer la présence éventuelle de foyers tumoraux (responsables d'une inflammation), sera réalisée sur le prélèvement péri-prothétique (réalisé dans un cadre médico-judiciaire). L'état d'inflammation du patient sera estimé par l'anatomopathologiste via l'étude macroscopique des organes suivi d'analyses cytopathologiques sur lame, après prélèvement, fixation, inclusion et coloration à l'hématoxyline-éosine-safran. Il sera alors possible de mettre en évidence la présence ou non de cellules mononuclées (macrophages, monocytes), marqueurs de l'inflammation chronique ainsi que de polynucléaires neutrophiles, marqueurs d'une inflammation aiguë. Une grille d'évaluation permettra de caractériser le type d'inflammation (mononuclées, neutrophiles ou mixte) et le degré (nul, discret, modéré, intense) selon le nombre de cellules présentes.

Un prélèvement de sang sur Ficoll (tube de 5mL) sera réalisé chez tous les patients vivants afin d'isoler les cellules mononuclées circulantes (macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes T et B). Leur réponse immune vis-à-vis des nanoparticules ou ET identifiés dans le sang de chaque patient sera évaluée en cytométrie de flux, afin de révéler un immuno-phénotype en faveur d'une activation de ces cellules liée à la libération des particules issues des prothèses posées chez ces patients. Cette approche peut permettre la mise en évidence de biomarqueurs en faveur d'une hyper-activation cellulaire liée à la libération de particules issues de la prothèse. L'analyse du plasma par Luminex<sup>TM</sup> multiplex permettra de déterminer la présence de protéines circulantes dirigées contre les ET et ainsi définir un(des) biomarqueur(s) en faveur d'une inflammation systémique liée à la libération de particules de la prothèse (TNF, IFN, cytokines, chémokines, métalloprotéines...)(31). Cette technique est déjà présente au sein de la plateforme des biomarqueurs innovants en cours de développement à l'hôpital Poincaré. L'objectif sera donc de rechercher un ou (des) biomarqueur(s) liée à la libération de particules métalliques par les DMI.

Les informations concernant les principaux facteurs pouvant influencer sur la concentration d'ET, c'est-à-dire le type et la composition précise de la prothèse, l'ancienneté de sa pose, l'exposition alimentaire et professionnelle, le tabagisme, éventuellement la présence de prothèses et d'amalgames dentaires, l'âge et le sexe du patient, principaux facteurs pouvant être impliqués dans l'augmentation des concentrations de métaux (25), seront recueillies lors de l'inclusion. Les données de la littérature sur l'impact de chacun de ces facteurs sur les concentrations d'ET sont à ce jour, limitées et ne concernent pas tous les éléments ni toutes les matrices analysées.

Les mesures réalisées dans les différents groupes de patients analysés, à savoir non porteurs de DMI, porteurs de DMI (métallique ou non) avec réaction inflammatoire ou non, permettront d'identifier les facteurs associés aux variations de concentrations des ET et d'établir des normes de concentration des ET dans les différentes matrices en fonction ou non de la présence d'une inflammation.

## **6.2 Nombre de centres participants**

Il s'agit d'une étude multi-centrique, dans laquelle participent les deux unités du service de chirurgie orthopédique (hôpitaux Ambroise Paré et Raymond Poincaré) du groupe hospitalier PIFO, qui effectuent environ 200 reprises de prothèse annuelles et l'institut médico-légal de l'hôpital Raymond Poincaré (RPC) à Garches, pratiquant environ 800 autopsies par an.

## **DESCRIPTION DES MESURES PRISES POUR REDUIRE ET EVITER LES BIAIS**

### ***Mesures de contrôle des biais***

- **Biais de sélection :**

La participation à l'étude sera proposée à tous les patients consécutifs présentant les critères d'inclusion/non inclusion.

- **Biais de confusion :**

L'exposition aux causes connues comme pouvant induire des variations des concentrations des ET sera évaluée.

- **Biais de réalisation et de mesure :**

L'exposition aux causes connues de variations des ET sera évaluée de manière standardisée à l'aide d'un questionnaire remis au patient lors de l'inclusion. Au niveau analytique, la méthode d'analyse multiélémentaire en ICP-MS est validée selon les recommandations de la Société Française de Biologie Clinique. Les échantillons seront

analysés en série avec une gamme et des contrôles de qualité (matériaux de référence de l'Institut National de Santé Publique du Québec et contrôle de qualité interne).

## 7 CRITÈRES D'ÉVALUATION

### 5.1 Critère d'évaluation principal

La mise en évidence de l'inflammation systémique induite par les ET présents dans les DMI reposera sur des critères sanguins et tissulaires :

- Mise en évidence par cytométrie de flux de l'hyperactivité des cellules de l'inflammation au contact de nanoparticules d'ET.
- Identification par Luminex<sup>TM</sup> multiplex (Bio-plex Pro<sup>TM</sup> human inflammation panel, Bio-rad) de biomarqueurs protéiques (protéines circulantes type TNF, IFN, cytokines, chemokines, métalloprotéines...) liés à l'activation des cellules de l'inflammation lors de la libération de particules et du relargage des ET par le DMI.
- Corrélation dans les différentes matrices entre les concentrations des ET et l'analyse semi-quantitative de l'inflammation cellulaire et la présence de foyers tumoraux identifiés sur l'analyse histologique standard des tissus des principaux organes et des tissus péri-prothétiques prélevés à l'autopsie.

### 5.2 Critères d'évaluation secondaires

- Dosage des ET dans les liquides et tissus par ICP-MS haute résolution dans les sous populations étudiées (patients non porteurs de DMI autopsiés, patients porteurs de DMI autopsiés, patients porteurs de DMI avec réaction inflammatoire et repris chirurgicalement) et dans chacune des matrices analysées sous forme non minéralisée afin de déterminer les concentrations libres des ET (habituellement réalisé dans les études) et après minéralisation complète par minéraliseur type UltraWave afin de déterminer les concentrations sous forme nanoparticulaire des ET.
- Comparaison des concentrations des quarante ET analysés dans les différentes matrices en fonction des groupes.

## 8 DEROULEMENT DE LA RECHERCHE

### 6.1 Modalités de recueil du consentement

Tableau 1 : recueil du consentement

Personnes dont le consentement est sollicité	Qui informe et recueille le consentement de la personne ?	A quel moment la personne est informée ?	A quel moment le consentement de la personne est recueilli ?
la personne qui se prête à la recherche	l'investigateur du centre	avant l'intervention	dans la journée suivant l'information

### 6.2 Visite d'inclusion

Dans le cadre du soin habituel, il sera procédé à l'examen clinique et le cas échéant, à la prescription d'examens biologiques non spécifiques (numération - formule sanguine, hémostase,...), par l'équipe médicale dans le service d'hospitalisation.

Le recrutement des patients répondant aux critères d'inclusion, sera réalisé par un investigateur dans chaque centre. Le médecin sera chargé :

- de diffuser l'information oralement au patient / en précisant les objectifs et le déroulement de l'étude,
- de distribuer et d'expliquer la notice d'information
- et enfin de recueillir le consentement éclairé écrit après le délai de réflexion.

Si le patient (et / ou son représentant légal) donne son accord de participation, ce dernier et l'investigateur inscrivent leurs noms et prénoms en clair, datent et signent le formulaire de consentement.

Les différents exemplaires de la note d'information et du formulaire de consentement sont alors répartis comme suit :

- un exemplaire de la note d'information et du consentement signé est remis au patient (ou à son représentant légal)
- l'exemplaire original est conservé par le médecin investigateur.
- un exemplaire de la note d'information et du consentement signé destiné au promoteur

A la fin des inclusions ou au plus tard à la fin de la recherche, un exemplaire de chaque formulaire de consentement est transmis au promoteur ou à son représentant selon les modalités communiquées en temps utile aux investigateurs.

La visite d'inclusion est assurée par les médecins investigateurs. Avant tout examen lié à la recherche, l'investigateur recueille le consentement libre et éclairé du patient ou de son représentant légal.

### **Données recueillies à l'inclusion :**

Les données démographiques et cliniques des patients inclus seront recueillies sur le cahier d'observation, par extraction du dossier-patient ou par questionnaire rempli à l'inclusion:

- Date de naissance
- Sexe
- Taille
- Poids
- Date de pose de prothèse
- Type de prothèse
- Nombre de reprise(s) de prothèse
- Présence d'autres prothèses (localisation et date de pose)
- Cause de l'opération de reprise
- CRP (bilan biologique habituellement réalisé en début d'hospitalisation)
- Tabagisme
- Exposition professionnelle aux métaux
- Soins dentaires

### **6.3 Visites de suivi de la recherche**

Il n'y a pas de visite de suivi prévue dans le cadre de cette recherche.

### **6.4 Visite de fin de la recherche**

Lors de la sortie d'hospitalisation, une visite sera effectuée afin de recueillir des prélèvements de sang et d'urine.

### **6.5 Tableau récapitulatif de la chronologie de la recherche**

*Tableau 2 : chronologie de la recherche*

	Inclusion J0	Intervention chirurgicale (J1)	à la sortie d'hospitalisation
Information	✓		
Consentement écrit	✓		
Examen clinique	✓		
Recueil de prélèvements (sang, urine, cheveux)	✓		
Recueil de prélèvements périprothétiques		✓	
Recueil de prélèvements (sang, urine,)			✓

## 6.6 Calendrier de la recherche

1. Durée de la période d'inclusion : 24 mois
2. Durée de participation de chaque patient : environ 7 jours (durée de l'hospitalisation)
3. Durée totale de la recherche : 25 mois

## 6.7 Distinction soin-recherche

**8.2.1** *Tableau 3 : Distinction entre les actes liés au « soin » et les actes ajoutés par la « recherche »*

<b>Interventions réalisées dans le cadre de la recherche</b>	<b>Actes, procédures et traitements liés aux <u>soins</u></b>	<b>Actes, procédures ajoutés par <u>la recherche</u></b>
Consultations	Examen clinique initial	Recueil du consentement
Prélèvements	NFS – bilan hémostase	Prélèvements de sang, urine et cheveux
Opération chirurgicale	Reprise de prothèse	Prélèvements de tissus péri-prothétiques

## 9 POPULATION DE L'ÉTUDE

### 7.1 Critères d'inclusion

Les patients, hommes ou femmes, inclus dans l'étude sont hospitalisés pour reprise de prothèse dans le service de chirurgie orthopédique du groupe hospitalier PIFO. Ils sont porteurs de prothèses totales de hanche à couple de frottement métal-métal, en céramique, à bille en inox et porteurs de prothèses totales de genou en polyéthylène-métal.

Les patients décédés porteurs de prothèses (de hanche et de genou, tout type de couple de frottement), autopsiés à l'institut médico-légal de l'hôpital Raymond Poincaré à Garches seront inclus dans l'étude (utilisation de données déjà existantes (sans aucune analyse complémentaire).

Affiliation à un régime d'Assurance-Maladie ou ayant-droit.

### 7.2 Critères de non inclusion

Les patients hospitalisés pour reprise de prothèses due à une infection ne seront pas inclus dans l'étude. Les marqueurs de l'inflammation identifiés pourraient être liés au processus infectieux et non à la libération de particules métalliques dans l'organisme. Les patients présentant une exposition professionnelle/environnementale aux éléments traces, source de contamination, ne seront pas inclus dans l'étude.

Patient sous tutelle.

### 7.3 Modalités de recrutement

Il est prévu de recruter 180 patients parmi les patients hospitalisés pour reprise de prothèses dans le service de chirurgie orthopédique et 110 patients décédés autopsiés à l'institut médico-légal.

Le recrutement sera effectué par un des cliniciens investigateurs chargés du patient dans son centre.

**Tableau 4 : nombre de sujets**

Nombre total de sujets sélectionnés	290
Nombre de centres	3
Période d'inclusion (mois)	24

180 patients au total hospitalisés :

- 50 patients hospitalisés pour reprise de prothèse de hanche à couple de frottement en céramique/céramique ou métal/métal (25 patients par groupe)
- 50 patients hospitalisés pour reprise de prothèse de hanche à bille en inox
- 50 patients hospitalisés pour reprise de prothèse de genoux (polyéthylène-métal)
- 80 patients décédés autopsiés à l'institut médico-légal, porteurs de DMI.
- Deux groupes contrôles ( 60 patients) seront constitués :
  - o 30 patients autopsiés non porteurs de DMI,
  - o 30 patients avant la première pose de DMI.

## 8 REGLES D'ARRET

### 8.1 Critères et modalités d'arrêt prématuré de la participation à la recherche d'un sujet

- Tout sujet peut arrêter sa participation à la recherche, à n'importe quel moment et quelle qu'en soit la raison.
- En cas d'arrêt prématuré de la recherche d'un sujet, ou de retrait du consentement, les données le concernant recueillies avant l'arrêt prématuré pourront être utilisées sauf opposition manifestée par le sujet.
- Il sera ensuite pris en charge selon le soin habituel.



- En cas de perte de vue, l'investigateur mettra tout en œuvre pour reprendre contact avec le sujet (et documenter le suivi dans le dossier source) afin de savoir au moins si le sujet est vivant ou décédé
- L'investigateur peut interrompre temporairement ou définitivement la participation d'un sujet à la recherche pour toute raison ayant un impact sur sa sécurité ou qui servirait au mieux les intérêts du sujet
- Le cahier d'observation doit lister les différentes raisons d'arrêt de participation à la recherche:
  - Effet indésirable
  - Autre problème médical
  - Raison personnelle du sujet
  - Retrait explicite de consentement

## **8.2 Modalités de remplacement de ces personnes, le cas échéant**

Les sujets ayant arrêté prématurément leur participation à la recherche ne seront pas remplacés. Ils ne seront exclus de l'analyse qu'en cas de retrait de consentement.

## **8.3 Arrêt d'une partie ou de la totalité de la recherche**

Le promoteur AP-HP se réserve le droit de suspendre définitivement les inclusions, à tout moment, s'il s'avère que les objectifs d'inclusion ne sont pas atteints.

# **9 TRAITEMENTS**

## **Traitements de l'essai**

Aucun traitement n'est évalué dans cette étude.

# **10 VIGILANCE**

Dans le cadre de cette étude, les événements indésirables (graves ou non) ne sont pas à notifier au promoteur. La notification doit se faire dans le cadre de la vigilance mise en place dans le cadre du soin pour le produit ou la pratique faisant l'objet de la recherche (pharmacovigilance pour un médicament, matériovigilance pour un dispositif médical...).

# **11 COMITES SPECIFIQUES DE LA RECHERCHE**

## **Comité de pilotage**

Il sera constitué des membres de l'équipe coordonnatrice, du responsable scientifique, du méthodologiste, du statisticien, d'un représentant du promoteur (chef de projet URC).

Il définira l'organisation générale et le déroulement de la recherche et coordonnera les informations. Il décidera en cours de recherche des conduites à tenir dans les cas imprévus,

surveillera le déroulement de la recherche en particulier sur le plan de la tolérance et des évènements indésirables.

**Un comité indépendant de surveillance n'est pas nécessaire au cours de cette étude, considérant qu'il s'agit d'une recherche interventionnelle à risques et contraintes minimales.**

## **12 GESTION DES DONNÉES**

### **12.1 Modalités de recueil des données**

Les données sont recueillies au lit du malade par entretien avec celui-ci et au cours de l'examen para-clinique, enfin par consultation du dossier médical et infirmier du patient.

Chaque patient se verra attribuer un identifiant unique qui servira à indexer le CRF, l'e-CRF et tout autre document de l'étude.

Un e-CRF sera développé par l'URC Paris-Ile de France Ouest en utilisant un logiciel dédié (CleanWeb), pour vérifier les données et faciliter le monitoring. Il permettra la saisie des données sur site par les investigateurs ou leurs assistants,

L'accès à l'e-CRF via internet sera sécurisé par un nom d'utilisateur et un mot de passe, et le flux des données sera chiffré à l'aide du protocole https. Les données seront recueillies sur un CRF papier puis enregistrées dans l'eCRF.

A la fin de l'étude, après le traitement des requêtes, la base de données sera gelée et transmise au statisticien, selon les procédures établies par le promoteur.

### **12.2 Identification des données recueillies directement dans les CRF qui seront considérées comme données-source :**

Age

Sexe

Taille

Poids

Date de pose de prothèse

Type de prothèse

Nombre de reprise(s) de prothèse

Présence d'autres prothèses (localisation et date de pose)

Cause de l'opération de reprise

CRP (bilan biologique habituellement réalisé en début d'hospitalisation)

Tabagisme

Exposition professionnelle aux métaux

Soins dentaires

Durée totale d'hospitalisation pour reprise ou pose de prothèse

Concentration des éléments traces dans les différentes matrices analysées

\*des résultats des dosages des ET dans les différentes matrices

\*du profil immuno-phénotypique de l'activation cellulaire obtenu en cytométrie de flux

\*des protéines circulantes (type TNF, IFN, cytokines, chémokines, métalloprotéines...) mises en évidence en Luminex Multiplex

## **12.3 Droit d'accès aux données et documents source**

### *12.2.1 Accès aux données*

Conformément aux BPC :

- le promoteur est chargé d'obtenir l'accord de l'ensemble des parties impliquées dans la recherche afin de garantir l'accès direct à tous les lieux de déroulement de la recherche, aux données source, aux documents source et aux rapports dans un but de contrôle de qualité et d'audit par le promoteur,
- les investigateurs mettront à disposition des personnes chargées du suivi et du contrôle de qualité, en cas d'audit de la recherche impliquant la personne humaine, les documents et données individuelles strictement nécessaires à ce contrôle, conformément aux dispositions législatives et réglementaires en vigueur.

#### Documents source :

Les documents source étant définis comme tout document ou objet original permettant de prouver l'existence ou l'exactitude d'une donnée ou d'un fait enregistrés au cours de la recherche seront conservés pendant 15 ans par l'investigateur ou par l'hôpital s'il s'agit d'un dossier médical hospitalier.

Dans le cadre de ce projet, les documents sources seront : le dossier médical informatisé du patient, les résultats des questionnaires et échelles, le cahier de transmissions infirmières. Ces dernières étant informatisées, elles seront retranscrites sur un cahier avant d'être saisies sur l'e-CRF.

### *12.2.2 Confidentialité des données*

Les personnes chargées du contrôle de qualité d'une recherche impliquant la personne humaine (article L.1121-3 du code de la santé publique), prendront toutes les précautions nécessaires en vue d'assurer la confidentialité des informations relatives à la recherche, aux personnes qui s'y prêtent et notamment en ce qui concerne leur identité ainsi qu'aux résultats obtenus.

Ces personnes, au même titre que les investigateurs eux-mêmes, sont soumises au secret professionnel (selon les conditions définies par les articles 226-13 et 226-14 du code pénal).

Pendant la recherche impliquant la personne humaine ou à son issue, les données recueillies sur les personnes qui s'y prêtent et transmises au promoteur par les investigateurs (ou tout autre intervenant spécialisé) seront rendues non-identifiantes.

Elles ne doivent en aucun cas faire apparaître en clair les noms des personnes concernées, ni leur adresse.

Seules les initiales du nom et du prénom seront enregistrées, accompagnées d'un numéro codé propre à la recherche indiquant l'ordre d'inclusion des sujets.

Le promoteur s'assurera que chaque personne qui se prête à la recherche a donné son accord par écrit pour l'accès aux données individuelles la concernant et strictement nécessaires au contrôle de qualité de la recherche.

## 12.4 Traitement des données et conservation des documents et des données

### 12.2.3 Identification du responsable et du lieu de la gestion du traitement des données

Les données seront conservées et analysées sous la responsabilité du Dr Jacques Ropers, Responsable Adjoint de l'Unité de Recherche Clinique des Hôpitaux Universitaires de Paris Île-de-France Ouest

### 12.2.4 Saisie des données

- **Le CRF papier** sera mis à la disposition de l'équipe investigatrice pour les guider dans le recueil et la saisie des données de l'étude.
- **Un CRF électronique (e-CRF)** sera développé et mis en place, permettant un accès sécurisé (login/mot de passe, protocole de transfert https) pour les divers participants à la recherche et un contrôle en ligne de la cohérence des données saisies. Les données devront être saisies dans l'e-CRF au fur et à mesure qu'elles sont obtenues, qu'il s'agisse de données cliniques ou para-cliniques. Toutes les informations requises par le protocole doivent être fournies dans l'e-CRF et une explication sera fournie par l'investigateur pour chaque donnée manquante. Sur tous les documents physiques nécessaires à la recherche, l'anonymat des sujets sera assuré par un code patient composé selon la procédure du gestionnaire-promoteur AP-HP : trois chiffres pour le numéro de centre, quatre chiffres pour le numéro d'inclusion et 2 lettres pour les initiales (première lettre du nom et du prénom) de la personne qui se prête à la recherche. Cet anonymat pourra se faire soit par effacement, soit par les moyens appropriés des données nominatives sur les copies des documents sources, destinés à la documentation de la recherche. Le développement du cahier électronique et la maintenance de la base de données seront organisés au sein de l'Unité de Recherche Clinique Paris-Ouest.

### 12.2.5 Traitements des données (CNIL)

Cette recherche entre dans le cadre de la « Méthodologie de Référence pour les traitements de données personnelles opérés dans le cadre des recherches interventionnelles à risques et contraintes minimales » (MR-001 modifiée).

L'AP-HP, promoteur de la recherche, a signé un engagement de conformité à cette «Méthodologie de Référence».

### 12.2.6 Archivage

Les documents spécifiques d'une recherche impliquant la personne humaine à risque et contraintes minimales seront archivés par l'investigateur et le promoteur pour une durée de 15 ans après la fin de la recherche.

Cet archivage indexé comporte notamment :

- Une enveloppe scellée pour l'investigateur contenant un exemplaire original de toutes les notes d'information et les formulaires de consentement signés de toutes les personnes du centre ayant participé à la recherche;

- Une enveloppe scellée pour le promoteur contenant un exemplaire de toutes les notes d'information et les formulaires de consentement signés de toutes les personnes du centre ayant participé à la recherche;
- Les classeurs « recherche » pour l'investigateur et le promoteur comprenant (liste non exhaustive):
  - les versions successives du protocole (identifiées par le n° et la date de version), ses annexes
  - les avis du CPP
  - les courriers de correspondance,
  - la liste ou registre d'inclusion,
  - les annexes spécifiques à la recherche
  - le rapport final de la recherche.
- Les documents de recueil des données.
- 

### **12.5 Propriété des données**

L'AP-HP est propriétaire des données et aucune utilisation ou transmission à un tiers ne peut être effectuée sans son accord préalable.

## **13 ASPECTS STATISTIQUES**

L'analyse statistique sera effectuée à la fin du suivi de tous les patients.

Le plan d'analyse statistique initial pourrait être révisé en réponse à des modifications du protocole ou des changements dans le processus de l'étude. Ces modifications seront indiquées avant le gel de base de données et seront considérés comme «post-hoc» des analyses dans les rapports scientifiques et argumenté en conséquence.

Les données seront analysées en utilisant le langage R (R v3.5.0 ou ultérieure Fondation pour le calcul statistique, Vienne, Autriche. [Http://www.R-project.org/](http://www.R-project.org/)) par l'équipe de biostatistique de l'Unité de Recherche Clinique Paris-Ouest.

### **13.1 Calcul de l'effectif requis**

En l'absence d'hypothèse spécifique préalable, l'effectif de sujets a été fixé de manière pragmatique en fonction des possibilités de recrutement des services participants et de l'intérêt de recruter les sujets sur une période de 18 mois au maximum. Les sujets seront inclus en 18 mois par les deux services de chirurgie orthopédique (Raymond Poincaré et Ambroise Paré) du groupe hospitalier PIFO, qui effectuent environ 200 reprises de prothèse annuelles et par l'institut médico-légal de l'hôpital Raymond Poincaré à Garches qui réalise environ 800 autopsies par an. :

- 50 patients hospitalisés pour reprise de prothèse de hanche à couple de frottement en céramique/céramique ou métal/métal (25 patients par groupe)
- 50 patients hospitalisés pour reprise de prothèse de hanche à bille en inox
- 50 patients hospitalisés pour reprise de prothèse de genoux (polyéthylène-métal)
- 80 patients décédés autopsiés à l'institut médico-légal, porteurs de DMI.

- Deux groupes contrôles seront constitués :
  - o 30 patients autopsiés non porteurs de DMI,
  - o 30 patients avant la première pose de DMI.

### **13.2 Analyse statistique**

Les distributions des concentrations des différents ET mesurés seront représentées de manière graphique dans les différents groupes de patients et pour les différentes matrices biologiques analysées. Les moyennes (et leur intervalle de confiance à 95 %), écarts-types, valeurs extrêmes et les quartiles des distributions seront estimés. En particulier, les distributions des concentrations seront établies chez les sujets porteurs de DMI sans et avec complication et les paramètres de ces distributions seront étudiés selon l'ancienneté de la prothèse, le type et la composition de la prothèse, le tabagisme, l'âge et le sexe et les éventuelles expositions alimentaires et professionnelles.

Les concentrations en ET des patients porteurs de DMI avec réaction inflammatoire seront comparées aux valeurs de la population générale et aux porteurs de DMI non inflammatoire. L'influence de la durée entre la pose et l'opération de reprise du DMI sur les concentrations d'ET sera analysée. Une corrélation entre la durée de présence du DMI et les concentrations d'ET en particulier dans les cheveux et viscères sera recherchée.

Ces analyses, et de façon plus générale, l'influence des covariables recueillies sur les concentrations des différents ET sera étudiée au moyen de modèles linéaires, si nécessaire après log-transformation (ou autre transformation numérique appropriée) des concentrations afin d'améliorer le respect des hypothèses des modèles statistiques utilisés.

Des approches utilisant des modèles additifs généralisés pourront être utilisées pour investiguer d'éventuelles non linéarités. Les paramètres des modèles seront estimés avec le niveau de signification des tests statistiques des paramètres et leur intervalle de confiance à 95 %. Seront considérées comme statistiquement significatives les comparaisons dont le niveau de signification sera inférieur au seuil de 5 %.

Les normes de concentrations (intervalles de référence) seront établies chez les sujets non porteurs de DMI en fonction de l'âge, du sexe et de la consommation de tabac, en utilisant la méthode paramétrique décrite par Royston et Wright [1998 JRRS A], prenant en compte 2, 3 ou 4 moments de la distribution (moyenne, écart-type voire asymétrie et kurtosis). Chaque moment sera

modélisé en utilisant des polynômes fractionnaires ou en cas de non-normalité persistante par des modèles GAM avec splines cubiques.

L'association éventuelle des concentrations d'ET avec l'inflammation de la prothèse sera analysée par un modèle de régression logistique avec un ajustement sur l'âge et le sexe des patients.

### **13.3 Populations**

### **13.4 Critère statistique d'arrêt de l'étude**

Il n'est pas prévu d'analyse intermédiaire. Les éventuelles données manquantes ne seront pas imputées dans les analyses.

### **13.5 Gestion des modifications du plan d'analyse initial**

Ce plan pourra être révisé afin de tenir compte d'éventuels amendements au protocole s'adaptant ainsi à la survenue d'événements lors du déroulement de l'étude. Ces éventuelles révisions seront réalisées avant le gel de la base de données. Ces changements de méthodes statistiques décidés rétrospectivement seront validés par le Comité de Pilotage, justifiés dans un amendement au protocole et dans le rapport de l'essai.

## **14 CONTROLE ET ASSURANCE DE LA QUALITE**

### **14.1 Organisation générale**

Le promoteur doit s'assurer de la sécurité et du respect des personnes qui ont accepté de participer à la recherche. Il doit mettre en place un système d'assurance qualité permettant de surveiller au mieux le déroulement de la recherche dans les centres investigateurs.

A cet effet, le promoteur définira une stratégie d'ouverture des centres et pourra le cas échéant mettre un place un contrôle qualité des données.

#### *14.2.1 Stratégie d'ouverture des centres*

La stratégie d'ouverture des centres sera déterminée avant le démarrage de la recherche.

#### *14.2.2 Contrôle qualité des données*

Le promoteur en accord avec l'investigateur coordonnateur définira ce niveau de contrôle avant le début de la recherche.

Un Attaché de Recherche Clinique (ARC) mandaté par le promoteur s'assurera de la bonne réalisation de la recherche, du recueil des données générées par écrit, de leur documentation, enregistrement et rapport, en accord avec les Procédures Opératoires Standard mises en application au sein de la DRCI.

L'investigateur et les membres de son équipe acceptent de se rendre disponibles lors des visites de contrôle de qualité effectuées à intervalles réguliers par l'Attaché de Recherche Clinique.

## **14.2 Cahier d'observation**

### CRF électronique :

Toutes les informations requises par le protocole doivent être consignées dans les cahiers d'observation. Les données devront être recueillies au fur et à mesure qu'elles sont obtenues, et enregistrées dans ces cahiers de façon explicite. Chaque donnée manquante devra être codée.

Ce cahier d'observation électronique sera mis en place dans chacun des centres grâce à un support internet de recueil des données. Un document d'aide pour l'utilisation de cet outil sera fourni aux investigateurs.

Le remplissage du cahier d'observation via internet par l'investigateur permet ainsi à l'ARC de visualiser rapidement et à distance les données. L'investigateur est responsable de l'exactitude, de la qualité et de la pertinence de toutes les données saisies. De plus, lors de leurs saisies, ces données sont immédiatement vérifiées grâce à des contrôles de cohérence. L'investigateur doit valider toute modification de valeur dans le CRF. Ces modifications font l'objet d'un audit trail. Une justification peut éventuellement être intégrée en commentaire.

Une impression papier sera demandée en fin d'étude, authentifiée (datée et signée) par l'investigateur. L'original de ce document sera archivé par le promoteur. Une copie du document authentifié devra être archivée par l'investigateur.

## **14.3 Gestion des non conformités**

Tout évènement survenant suite au non-respect du protocole, des procédures opératoires standardisées, ou des dispositions législatives et réglementaires en vigueur par un investigateur ou toute autre personne impliquée dans la conduite de la recherche doit faire l'objet d'une déclaration de non-conformité au promoteur.

Ces non-conformités seront gérées conformément aux procédures du promoteur.

## **14.4 Audit**

Les investigateurs s'engagent à accepter les audits d'assurance qualité effectués par le promoteur ainsi que les inspections effectuées par les autorités compétentes. Toutes les données, tous les documents et rapports peuvent faire l'objet d'audits et d'inspections réglementaires sans que puisse être opposé le secret médical.

Un audit peut être réalisé à tout moment par des personnes mandatées par le promoteur et indépendantes des responsables de la recherche. Il a pour objectif de s'assurer de la qualité de la recherche, de la validité de ses résultats et du respect de la loi et des réglementations en vigueur.



Les personnes qui dirigent et surveillent la recherche acceptent de se conformer aux exigences du promoteur en ce qui concerne un audit.

L'audit pourra s'appliquer à tous les stades de la recherche, du développement du protocole à la publication des résultats et au classement des données utilisées ou produites dans le cadre de la recherche.

#### **14.5 Engagement de responsabilités de l'Investigateur Principal**

Avant de démarrer la recherche, chaque investigateur fournira au représentant du promoteur de la recherche son curriculum vitæ personnel actualisé, daté de moins d'un an et signé, comportant son numéro RPPS. Le CV devra comprendre les participations antérieures à des recherches et les formations liées à la recherche clinique.

Chaque investigateur s'engagera à respecter les obligations législatives et réglementaires et à mener la recherche conformément à la réglementation, en respectant les termes de la déclaration d'Helsinki en vigueur.

L'investigateur principal de chaque centre participant signera un engagement de responsabilités (document type DRCD) qui sera remis au représentant du promoteur.

Les investigateurs et leurs collaborateurs signeront un formulaire de délégation de fonctions précisant le rôle de chacun et fourniront leur CV.

### **15 ASPECTS ÉTHIQUES ET LÉGAUX**

#### **15.1 Modalités d'information et de recueil du consentement des personnes se prêtant à la recherche**

Conformément à l'article L1122-1-1 du Code de la santé publique, aucune recherche à risque et contraintes minimales impliquant la personne humaine ne peut être pratiquée sur une personne sans son consentement libre et éclairé, et exprès après que lui a été délivrée l'information prévue à l'article L.1122-1 du même code.

Les patients seront informés par l'investigateur au cours de leur hospitalisation. Ils recevront une information orale ainsi qu'un document écrit détaillant les objectifs et les modalités de la recherche. Un délai de réflexion est laissé à la personne entre le moment où elle est informée et celui où elle signe le formulaire de consentement.

Le consentement libre, éclairé et écrit de la personne est recueilli par l'investigateur principal, ou par un médecin qui le représente ou par la personne qualifiée avant l'inclusion de la personne dans la recherche. Le recueil du consentement se fait avant tout examen ou acte lié à la recherche.

La note d'information et un exemplaire du formulaire de consentement daté et signé par la personne qui se prête à la recherche ainsi que par l'investigateur ou le médecin qui le représente ou la personne qualifiée, sont remis à la personne préalablement à sa participation à la recherche.

En outre, l'investigateur précisera dans le dossier médical de la personne la participation de celle-ci à la recherche, les modalités de recueil de son consentement, ainsi que les modalités de la délivrance de l'information en vue de le recueillir. Il conserve l'exemplaire original du formulaire du recueil du consentement de la personne daté et signé.

### **Cas particuliers :**

En cas d'impossibilité physique pour la personne sollicitée de consentir par écrit, le consentement est attesté par ordre de priorité par la personne de confiance, un membre de la famille ou à défaut par un proche. Ceux-ci doivent être totalement indépendants de l'investigateur et du promoteur.

En outre, l'investigateur précisera dans le dossier médical de la personne la participation de celle-ci à la recherche, les modalités de recueil de son consentement [ou du consentement de toute autre personne dans les cas prévus aux articles L.1122-1-1 à L.1122-2 du CSP] ainsi que les modalités de la délivrance de l'information en vue de le recueillir. Il conserve l'exemplaire original du formulaire du recueil du consentement de la personne daté et signé.

### **15.2 Interdiction pour la personne de participer à une autre recherche ou période d'exclusion prévue à l'issu de la recherche, le cas échéant**

Il n'y a pas de période d'exclusion dans le cadre de cette recherche.

### **15.3 Indemnisation des sujets**

Aucune indemnisation n'est prévue pour cette recherche.

### **15.4 Inscription au fichier national des personnes se prêtant à une recherche impliquant la personne humaine**

La recherche ne portant pas sur un produit de santé, l'inscription des participants n'est pas prévue.

### **15.5 Obligations légales**

#### *Rôle du promoteur*

L'Assistance publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP) est le promoteur de cette recherche et par délégation la DRCI (Délégation à la recherche clinique et à l'innovation) en assure les missions, conformément à l'article L.1121-1 du code de la santé publique. L'Assistance Publique - Hôpitaux de Paris se réserve le droit d'interrompre la recherche à tout moment pour des raisons médicales ou administratives; dans cette éventualité, une notification sera fournie à l'investigateur.

### **15.6 Demande d'avis au comité de protection des personnes CPP**

L'AP-HP, en tant que promoteur, obtient pour la recherche à risque et contraintes minimales préalablement à sa mise en œuvre, l'avis favorable du CPP concerné, dans le cadre de ses compétences et conformément aux dispositions législatives et réglementaires en vigueur.

## **15.7 Information de l'ANSM**

Le promoteur transmettra à l'ANSM le résumé de la recherche ainsi que l'avis favorable du CPP. L'AP-HP, promoteur de la recherche, a signé un engagement de conformité à cette « Méthodologie de Référence ».

## **16.8 Engagement de conformité à la « Méthodologie de référence » MR 001**

Exemple de paragraphe type à ajouter si la recherche entre dans le champ de la méthodologie de référence :

L'AP-HP, promoteur de la recherche, a signé un engagement de conformité à cette « Méthodologie de Référence ».

## **15.8 Modifications de la recherche**

Toute modification substantielle apportée au protocole par l'investigateur coordonnateur, devra être transmise au promoteur pour approbation. Après cet accord, le promoteur devra obtenir préalablement à sa mise en œuvre un avis favorable du CPP.

La note d'information et le formulaire de consentement pourront être révisés si nécessaire, notamment en cas de modification substantielle de la recherche ou de la survenue d'effets indésirables.

# **16 FINANCEMENT ET ASSURANCE**

## **16.1 Source de financement**

Cette recherche est financée par l'unité coordinatrice : le laboratoire de toxicologie de l'hôpital Raymond Poincaré à Garches.

## **16.2 Assurance**

Le Promoteur souscrit pour toute la durée de la recherche une assurance garantissant sa propre responsabilité civile ainsi que celle de tout médecin impliqué dans la réalisation de la recherche. Il assure également l'indemnisation intégrale des conséquences dommageables à la recherche pour la personne qui s'y prête et ses ayants droit, sauf preuve à sa charge que le dommage n'est pas imputable à sa faute ou à celle de tout intervenant, sans que puisse être opposé le fait d'un tiers ou le retrait volontaire de la personne qui avait initialement consenti à se prêter à la recherche.

L'Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP) a pris une assurance auprès de la compagnie HDI-GERLING par l'intermédiaire de BIOMEDIC-INSURE, garantissant sa responsabilité civile ainsi que celle de tout intervenant (médecin ou personnel impliqué dans la réalisation de la recherche), conformément à l'article L.1121-10 du CSP.

## 17 RÈGLES RELATIVES A LA PUBLICATION

L'AP-HP est propriétaire des données et aucune utilisation ou transmission à un tiers ne peut être effectuée sans son accord préalable.

Seront premiers signataires des publications, les personnes ayant réellement participé à l'élaboration du protocole et à son déroulement ainsi qu'à l'analyse et la rédaction des résultats.

Un exemplaire de l'article sera adressé au promoteur.

### 17.1 Mention de l'affiliation de l'AP-HP pour les projets promus ou gérés par l'AP-HP

Les termes «Assistance Publique - Hôpitaux de Paris» doivent apparaître dans l'adresse des auteurs concernés. Les intitulés exacts d'appartenance de chacun des auteurs devront respecter les règles d'affiliation-dénominations correspondant à chacune des entités correspondantes, de façon à permettre un référencement correct des publications dans le système SIGAPS.

- Si un auteur a plusieurs affiliations, l'ordre dans lequel sont citées les institutions (AP-HP, Université, INSERM...) n'a pas d'importance
- Cependant, si la recherche est financée dans le cadre d'un appel d'offre interne de l'AP-HP, la première affiliation devrait être « AP-HP »
- Chacune de ces affiliations doit être identifiée par une adresse séparée par un point virgule (;)
- L'institution AP-HP doit apparaître sous le sigle « **AP-HP** » en premier dans l'adresse suivi précisément par : AP-HP, hôpital, service, ville, code postal, France

Les publications mentionneront obligatoirement la Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation de l'Assistance Publique – Hôpitaux de Paris et l'Unité de Recherche Clinique des Hôpitaux Universitaires de Paris Île-de-France Ouest.

### 17.2 Mention du promoteur AP-HP (DRCI) dans les "acknowledgments" du manuscrit

"The sponsor was Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (Délégation à la Recherche Clinique et à l'innovation)"

### 17.3 Mention du financeur dans les "acknowledgments" du manuscrit

Il sera mentionné dans les "acknowledgments" du manuscrit le financeur : "The study was funded by a grant from Groupe Hospitalier Hôpitaux Universitaires –Paris Ile-de-France-Ouest 2017, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris".

Cette recherche aura été enregistrée avant toute inclusion sur un registre d'essais cliniques reconnu par l'International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) tel que <http://clinicaltrials.gov> <http://clinicaltrials.gov/> : NCT03812627

## 18 BIBLIOGRAPHIE

- (1) SoFCOT Total Hip Arthroplasty register, 2015 annual report
- (2) ANSM, Surveillance des dispositifs médicaux à risque : prothèses totales de genou (juillet 2015)
- (3) ANSM, Étude des facteurs associés aux révisions sur prothèses totales de hanche (PTH): rôle du mode d'ancrage (cimentage) et des constituants prothétiques (couple de frottement) dans les révisions chirurgicales (mai 2015)
- (4) <https://www.sitedupoignet.com/nouveaux-materiels/de-quoi-sont-faits-plaques-vis-et-broches/> consulté le 15/12/2017
- (5) Haute Autorité de Santé. Évaluation des prothèses de hanche. Saint-Denis La Plaine: HAS; 2007.  
[http://www.hassante.fr/portail/plugins/ModuleXitiKLEE/types/FileDocument/doXiti.jsp?id=c\\_5961392](http://www.hassante.fr/portail/plugins/ModuleXitiKLEE/types/FileDocument/doXiti.jsp?id=c_5961392).
- (6) National Joint Registry. National Joint Registry for England and Wales. 9th annual report. Hemel Hempstead: NJR; 2012.  
[http://www.njrcentre.org.uk/NjrCentre/Portals/0/Documents/England/Reports/9th\\_annual\\_report/NJR %209th%20Annual%20Report%202012.pdf](http://www.njrcentre.org.uk/NjrCentre/Portals/0/Documents/England/Reports/9th_annual_report/NJR%209th%20Annual%20Report%202012.pdf)
- (7) Caton J, Papin P (2012). Typologie et épidémiologie des prothèses totales de hanche en France. e-mémoires de l'Académie Nationale de Chirurgie, 11 (2) : 001-007
- (8) De Smet K, De Haan R, Calistri A, Campbell PA, Ebramzade E, Pattyn C, Gill HS (2008). Metal ion measurement as a diagnostic tool to identify problems with metal-on-metal hip resurfacing. *J Bone Joint Surg Am*, 90 : 202 – 208
- (9) Atrey A, Waite J, Hart A, et al (2014). Failure of a ceramic-on-ceramic hip resurfacing due to metallosis. A case report. *JBJS Case Connect*, 4:e28
- (10) Matharu GS, Daniel J, Ziaee H, McMinn DJ (2015). Failure of a novel ceramic-on-ceramic hip resurfacing prosthesis. *J Arthroplasty*, 30(3):416-8
- (11) Bradberry SM, Wilkinson JM, Ferner RE (2014). Systemic toxicity related to metal hip prostheses. *Clin Toxicol (Phila)*, 1-11.
- (12) Prentice JR, Clark MJ, Hoggard N, Morton AC, Tooth C, Paley MN, Stockley I, Hadjivassiliou M, Wilkinson JM (2013). Metal-on-Metal Hip Prostheses and Systemic Health: A Cross-Sectional Association Study 8 Years after Implantation. *PLoS One* 8-6:e66186.

- (13) Wilkinson JM (2015). Metal exposure after hip replacement and risks of systemic toxicity. JTO vol 3 issue 2, p42
- (14) Delaunay C (2013 Dec). What are the causes for failures of primary hip arthroplasties in France? Clin Orthop Relat Res. 471(12):3863-9.
- (15) Labek G, Thaler M, Janda W, Agreiter M, Stöckl B (2011). Revision rates after total joint replacement: cumulative results from worldwide joint register datasets. J Bone Joint Surg Br 93-B: 293 – 297
- (16) Moesch C (2007). Utilisation de l'ICP-MS en biologie Clinique, Annal Tox Anal vol 19 n°1
- (17) Goodman SB (2007 dec) Wear particles, periprosthetic osteolysis and the Immune System. Biomaterials. 28 (34):5044-5048
- (18) Nich C, Takakubo Y, Pajarinen J, Ainola M, Salem A, Sillat T, Rao AJ, Raska M, Tamaki Y, Takagi M, Konttinen YT, Goodman SB, Gallo J (2013 oct). Macrophages-Key cells in the response to wear debris from joint replacements. J Biomed Mater Res A. 101(10):3033–3045
- (19) Nich C, Goodman SB (2014). Role of macrophages in the biological reaction to wear debris from joint replacements. J Long Term Eff Med Implants, 24 (4) 259-265
- (20) He T, Wu W, Huang Y, Zhang X, Tang T, Dai K (2013 jun). Multiple biomarkers analysis for the early detection of prosthetic aseptic loosening of hip arthroplasty. Int Orthop 37 (6) 1025-1031
- (21) Tang F, Liu X, Jiang H, Wu H, Hu S, Zheng J, Guo H, Yan L, Xu C, Lin Y, Lin J, Zhao J (2016). Biomarkers for early diagnosis of aseptic loosening after total hip replacement. Int J Clin Exp Pathol, 9(2):1954-1960
- (22) Goullé J.P., Mahieu L., Castermant J., Neveu N., Bonneau L., Lainé G., et al (2005). Metal and metalloïd multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair. Reference values, Forensic Science International, vol. 153 (pg. 39-44)
- (23) Goullé, J.P., Mahieu, L., Neveu, N., Bouige, D., Castermant, J., Laine, G. et al. (2004) Dosage multiélémentaire des métaux et métalloïdes dans les milieux biologiques par ICP-MS : valeurs usuelles chez 100 témoins. Annales de Toxicologie Analytique, 16, 261–268

- (24) Goullé JP, Mahieu L, Maignant V, Bouige D, Sausseureau E, Lacroix C (2007) Valeurs usuelles des métaux et métalloïdes dans le sang total et les urines par ICP-MS chez cinquante-quatre sujets décédés. *Annales de Toxicologie Analytique*, 19: 43–51.
- (25) Cesbron A., Sausseureau E., Mahieu L., Couland I., Guerbet M., Goullé J.P. (2013) Metallic profile of whole blood and plasma in a series of 106 healthy volunteers. *Journal of Analytical Toxicology*, 37, 401–405
- (26) Granchi D, Savarino LM, Ciapetti G, Baldini N. Biological effects of metal degradation in hip arthroplasties, *Critical Reviews in Toxicology* 2017; 48:2, 170-193
- (27) Goullé J.P., Mahieu L., Castermant J., Neveu N., Laine G., Nouveau M.P., Gehanne R., Bouige D., Lacroix C (2003). Validation d'une technique de dosage multiélémentaire des métaux par ICP-MS dans les milieux biologiques. *Ann. Toxicol. Anal.* 15 : 271-80.
- (28) Goulé, J.P., Mahieu, L., Anagnostides, J.G., Bouige, D., Sausseureau, E., Guerbet, M. et al. (2010). Profil métallique tissulaire par ICP-MS chez des sujets décédés. *Annales de Toxicologie Analytique*, 22, 1–9
- (29) Garcia F, Ortega A, Domingo JL, Corbella J (2001). Accumulation of metals in autopsy tissues of subjects living in tarragona county, spain. *J Environ Sci Health.* 36: 1767–1786
- (30) Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, Mathew BB, Beeregowda KN (2014 jun). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip Toxicol.* 7(2):60-72
- (31) Marmor S, Bauer T, Desplaces N, Heym B, Roux AL, Sol O, Rogé J, Mahé F, Désiré L, Aegerter P, Ghout I, Ropers J, Gaillard JL, Rottman M (2016 apr). Multiplex Antibody Detection for Noninvasive Genus-Level Diagnosis of Prosthetic Joint Infection. *J Clin Microbiol.* 54(4):1065-73.

## 19 LISTE DES ADDENDA

Chaque addendum et le registre des versions des addenda sont joints, indépendamment du protocole. Chaque addendum peut être modifié (changement de version de l'addendum) sans modification de la version du protocole.

### 19.1 Liste des Investigateurs

**Tableau 5 : Services Recruteurs**

N°centre	Centre	Titre	Prénom & NOM	Téléphone / e-mail
1	Service de chirurgie orthopédique	Pr	Thomas BAUER	thomas.bauer@aphp.fr
2	Service de chirurgie orthopédique	Pr	Thomas BAUER	thomas.bauer@aphp.fr
3	Institut médico-légal	Pr	Geoffroy LORIN DE LA GRANDMAISON	01 47 10 76 80 / g.lorin@aphp.fr

**Tableau 6 : Services Non - Recruteurs**

N°centre	Centre	Titre	Prénom & NOM	Téléphone / e-mail
1	Laboratoire de toxicologie	Pr	Jean-Claude ALVAREZ	01 47 10 79 20 / jean-claude.alvarez@aphp.fr
1	Laboratoire de toxicologie	Dr	Marie Martin	marie.martin@aphp.fr



## 19.2 Questionnaire

### 1- Prothèse

Est-ce votre première opération de reprise de prothèse ?  oui  non

Si non, combien d'opération(s) de reprise avez-vous eu à ce jour ? .....

Possédez-vous d'autres prothèses ?  oui  non

Si oui, précisez la localisation et la date de pose.....

**2- Implant dentaire**  oui  non

Si oui, combien ? nature ?.....

**3- Tabagisme**  fumeur  ex-fumeur  non-fumeur

Si fumeur, depuis combien de temps ?  >10 ans  <5 ans  <1 an

Si ex-fumeur, arrêt depuis combien de temps ?.....

Combien de paquets années ?.....

**4- Exposition professionnelle aux métaux**  oui  non

Si oui, à quel(s) type(s) de métal(aux) avez-vous été exposé ?.....

Pendant quelle durée ?.....

# Comité de Protection des Personnes Est-II



Siège : CHRU – Hôpital Saint Jacques  
2 place Saint Jacques  
25030 Besançon Cedex  
Tel : 03-81-21-93-12  
Fax : 03-81-21-93-13  
Email : cpp@chu-besancon.fr

Besançon, le 02 mai 2019

Le Président,

**APHP DE PARIS**  
**Madame Nawal DERRIDJ-AIT YOUNES**  
**D.R.C.I**  
**1 Avenue Claude Vellefaux**  
**75010 PARIS**

JMC/KJ

**Réf SI RIPH : 18/12/18/59739**

**« Étude du retentissement systémique du relargage des éléments traces (ET) par les Dispositifs Médicaux Implantables. Identification de biomarqueurs d'inflammation systémique » - Etude PROMETOX**

(référence à rappeler impérativement dans toute correspondance)

**Copie : HOPITAL Raymond POINCARE – GH HUPIFO**

**Professeur Jean-Claude ALVAREZ**  
**104 Boulevard Raymond Poincaré,**  
**92380 GARCHES**

Madame,

Le Comité lors de la session du Lundi 18 février 2019 a examiné l'étude (catégorie 2 HPS) intitulée :

**« Étude du retentissement systémique du relargage des éléments traces (ET) par les Dispositifs Médicaux Implantables. Identification de biomarqueurs d'inflammation systémique » - Etude PROMETOX.**

Par vos réponses du 04/04/19 : les modifications apportées au protocole répondent à l'ensemble des questions soulevées par le CPP lors de la séance.

Le CPP Est-II fonctionne en conformité avec les Bonnes Pratiques Cliniques (ICH-GCP).

Vu le courrier de demande d'avis initial daté et signé du 05/12/18, le document additionnel daté et signé du 12/12/18, le formulaire de demande d'avis ANSM daté et signé du 11/04/19, le protocole et son résumé amendés (version 1.1 du 22/03/19), la note d'information et formulaire de consentement (version 1 du 16/02/17), la « Justification de l'adéquation des moyens sur une recherche HPS » (version 01 datée du 12/12/18), la liste investigateurs (version 1.10 du 04/12/18) accompagnée du CV du Pr Alvarez (coordonnateur de l'étude) – Hôpital Raymond Poincaré à Garches, le tableau comparatif (version 1.1 du 22/03/19), la déclaration CNIL n° 1892381 v0 du 01/10/15 et l'attestation « HDI Gerling » daté et signé du 11/12/18, le comité donne un **AVIS FAVORABLE** à l'unanimité.

## PRESENCE DES MEMBRES

CATEGORIE	TITULAIRES	FONCTION	PRESENT	SUPPLEANTS	FONCTION	PRESENT
I. RECHERCHE BIOMEDICALE	Dr M.B VALNET RABIER	Praticien Hospitalier CHRU Besançon		Dr C. GUILLERMET-FROMENTIN	Pédiatre CHRU de Besançon	

	Pr J.M. CHALOPIN (Président)	Néphrologue Consultant CHRU Besançon	x	Mme L. VETTORETTI	Ingénieur Recherche Clinique CHRU Besançon	x
	Pr E. MONNET	Médecin épidémiologiste CHRU Besançon		Dr G. BESH	PH Anesthésiste CHRU de Besançon	
II. MEDECINE GENERALE						
III. PHARMACIEN(NE)	Mme S. PERRIN	Pharmacien Assistant Spécialiste CHRU de Besançon		Mme P. DEMOLY- POURET	Pharmacien GCS Pharmacie de Bavilliers	x
IV. INFIRMIER(E)	Mme K. MOUGEY- CHEMETT	Infirmière Direction des Soins – CHRU de Besançon	x			
V. ETHIQUE	Mr A. DIRAND	Doctorant en philosophie à l'UFC				
VI. SOCIAL	Mme A. BOURGE	Assistante sociale CHBM	x			
VII. PSYCHOLOGIE	Mme M. BONNET LLOMPART	Maître de Conférences en Psychologie Clinique à l'UFR SLHS de Besançon		Mme L. BARTHOD	Psychologue Clinicienne Clinique CHRU de Besançon	
VIII. JURISTE	Mlle S. DEPIERRE (Vice-Présidente)	Responsable Unité Réglementaire DRCI CHRU Besançon	x	Mr A. CHAUSSY	CPAM du DOUBS Service juridique et contentieux	
IX. REPRESENTANTS D'ASSOCIATION AGREE DE MALADES OU D'USAGERS DU SYSTEME DE LA SANTE	Mr M. COTTINY	Administrateur du Grand Besançon Habitat et de l'UDAF 25		Mme B. LANQUETIN	Retraitée de l'Education Nationale	x
	Mme E. TROCME	Cadre supérieure infirmier retraitée ARUCAH	x	Mr R. MARTINEZ	Retraité Assurance Maladie (membre de l'ARUCAH)	

Les membres titulaires (ou suppléant en l'absence du titulaire) ont participé au vote. **A noter que les membres impliqués dans le projet ne participent pas à la délibération.**

Professeur Jean-Marc CHALOPIN



« Étude du retentissement systémique du relargage des éléments traces (ET) par les Dispositifs Médicaux Implantables. Identification de biomarqueurs d'inflammation systémique »  
**PROMETOX**

Cette recherche est promue par l'Assistance Publique - Hôpitaux de Paris  
Département de la Recherche Clinique et du Développement  
1 avenue Claude Vellefaux  
75010 Paris

### NOTE D'INFORMATION

Madame, Monsieur,

Le Docteur/ Le Professeur/ La Personne qualifiée (barrer les mentions inutiles)..... (nom, prénom), exerçant à l'hôpital ....., vous propose de participer à une recherche concernant votre état de santé.

Il est important de lire attentivement cette note avant de prendre votre décision ; n'hésitez pas à lui demander des explications.

Si vous décidez de participer à cette recherche, un consentement écrit vous sera demandé.

#### 1) Quel est le but de cette recherche ?

Cette recherche porte sur L'évaluation de l'impact du relargage des métaux (éléments trace), qui composent le dispositif implantable (prothèses de hanche et de genou, métalliques et non métalliques) et du retentissement dans le sang, de ce relargage et notamment de la réaction immune de l'organisme vis-à-vis de ces éléments trace, susceptibles d'indiquer une évolution inflammatoire d'une prothèse

Les prothèses de hanche et de genou contiennent des métaux et alliages métalliques relativement inertes qui ont de bonnes propriétés mécaniques et une bonne résistance à la corrosion. Cependant, elles pourraient se dégrader au cours du temps, pouvant être à l'origine de divers phénomènes qui pourraient être préjudiciables à la santé humaine et conduire à des complications, surtout en cas de descellement du système d'implant. Cette étude vise à évaluer l'impact du relargage des métaux, qui composent le dispositif implantable, en mesurant la concentration d'ions métalliques au niveau systémique dans le sang, les urines, les cheveux et au niveau local autour de la prothèse (muqueuse péri-prothétique ( qui entoure la prothèse), liquide synovial). Un prélèvement de chacune de ces matrices (muqueuse et liquide synovial) sera effectué au cours de l'opération et durant la durée d'hospitalisation. Le but de cette recherche est d'envisager de définir des biomarqueurs prédictifs de l'inflammation pour la surveillance des patients porteurs de dispositifs médicaux métalliques.

Pour répondre à la question posée dans la recherche, il est prévu d'inclure 150 personnes porteuses de prothèses métalliques et non métalliques de hanche ou de genou , dans un établissements de soins situés à l'hôpital Raymond Poincaré.

#### 2) En quoi consiste la recherche ?

Dans la recherche proposée, nous allons évaluer le *retentissement dans le sang du relargage des métaux par les prothèses métalliques et non métalliques et notamment de la réaction immune de l'organisme vis-à-vis de ces métaux*

Un prélèvement de sang (10 mL), d'urine (5 mL) et de cheveux (une mèche d'environ 0,5 cm de diamètre, sur toute la longueur) sera effectué au début de votre hospitalisation.

PROMETOX\_nifc\_RIRCM\_majeur\_v1-0-20181204

Ce document est la propriété du DRCD / APHP. Toute reproduction est formellement interdite.

version 1 du 16/02/2017

Un prélèvement de liquide synovial (liquide qui se trouve au niveau des espaces articulaires) (1 mL) et de tissu péri-prothétique (<1 cm<sup>3</sup>) sera réalisé pendant l'opération.

Un prélèvement de sang (5 mL) et d'urine (5 mL) sera effectué en fin d'hospitalisation.

Des analyses immunologiques seront aussi effectuées afin de définir des biomarqueurs protéiques de l'inflammation liée au relargage de particules métalliques par les prothèses (dispositifs médicaux implantables).

Un questionnaire vous sera remis lors de la visite d'inclusion, afin de recueillir les informations concernant votre prothèse et votre exposition aux métaux (professionnelle, tabagisme, soins dentaires).

### **3) Quel est le calendrier de la recherche**

La durée prévisionnelle de la recherche est de 2 année(s) et votre participation durera pendant votre période d'hospitalisation. Après la signature de votre consentement, lors de la première visite qui se déroulera lors de votre hospitalisation prévu dans le soin., le déroulement de la recherche sera le suivant : *Les prélèvements sanguins et urinaires seront effectués lors d'un prélèvement prévu dans le soin (correspondant à un Tube supplémentaire de sang et d'urine), le prélèvement de cheveux se fera spécifiquement pour la recherche, qui consistera à prélever une mèche de cheveux sur toute sa longueur (sans conséquence esthétique) ; Les prélèvements de la muqueuse et du liquide synovial se feront lors de votre intervention chirurgicale prévue dans le cadre du soin.*

### **4) Quels sont les bénéfices liés à votre participation**

En participant à cette recherche, vous bénéficierez d'un suivi médical étroit et spécifique comme celui que vous avez habituellement. Vous n'aurez aucun bénéfice immédiat pendant la durée de votre participation. Par ailleurs vous contribuerez à une meilleure connaissance de la toxicité des métaux utilisés dans la fabrication des dispositifs médicaux implantables.

### **5) Quels sont les risques et les contraintes prévisibles ajoutés par la recherche?**

*Cette recherche ne comporte aucun risque supplémentaire à l'opération de pose ou de reprise de prothèse prévu dans le soin. Les prélèvements effectués se dérouleront au cours de votre hospitalisation.*

*Le prélèvement sanguin peut entraîner une sensation désagréable transitoire au moment de la piqûre, ainsi qu'un hématome au point de ponction.*

Les prélèvements nécessaires à cette étude seront réalisés lors de l'opération (pose ou de reprise de prothèse (synovie, muqueuse) ou au cours de l'hospitalisation (sang, urine, cheveux) et n'impacteront pas sur votre durée d'hospitalisation ou de votre période de convalescence.

Si vous acceptez de participer, vous devrez être affilié(e) à un régime de sécurité sociale ou être bénéficiaire d'un tel régime

### **6) Que vont devenir les prélèvements effectués pour la recherche ?**

Une fois analysés, les échantillons prélevés pendant la recherche seront conservés en fonction de leurs disponibilités *pour des recherches ultérieures* pendant une durée de 30 ans.

*les échantillons et les données seront accessibles, pendant 30 ans , au laboratoire de toxicologie à l'hôpital Raymond Poincaré sous la responsabilité du Pr Jean Claude Alvarez responsable de la conservation et de la destruction.*

**Vous avez la possibilité à tout moment de demander au médecin qui vous suit dans le cadre de la recherche, la destruction de ces prélèvements biologiques ou de vous opposer à toute utilisation ultérieure.**

## 7) Quels sont les éventuelles alternatives médicales ?

Les modalités de votre prise en charge ne seront pas différentes selon que vous décidiez ou pas de participer à l'étude.

## 8) Quelles sont les modalités de prise en charge médicale à la fin de votre participation ?

Votre médecin pourra décider à tout moment de l'arrêt de votre participation ; il vous en expliquera les raisons.

## 10) Si vous participez, comment vont être traitées les données recueillies pour la recherche ?

Dans le cadre de la recherche à laquelle l'AP-HP vous propose de participer, un traitement de vos données personnelles va être mis en oeuvre pour permettre d'en analyser les résultats.

A cette fin, les données médicales vous concernant et les données relatives à vos habitudes de vie, seront transmises au Promoteur ou aux personnes ou partenaires agissant pour son compte, en France *et conservées pendant 15 ans*. Ces données seront identifiées par un numéro d'enregistrement. Ces données pourront également, dans des conditions assurant leur confidentialité, être transmises aux autorités de santé françaises

Les données médicales vous concernant pouvant documenter un dossier auprès des autorités compétentes portant sur les *Dispositifs Médicaux implantables* évalués dans cette recherche, pourront être transmises à un industriel afin qu'un plus grand nombre de patients puissent bénéficier des résultats de la recherche. Cette transmission sera faite dans les conditions assurant leur confidentialité.

Vos données pourront être utilisées pour des recherches ultérieures ou des analyses complémentaires à la présente recherche en collaboration avec des partenaires privés ou publics, en France ou à l'étranger, dans des conditions assurant leur confidentialité et le même niveau de protection que la législation européenne.

Vous pouvez retirer à tout moment votre consentement à l'utilisation ultérieure de vos données auprès du médecin qui vous suit dans le cadre de cette recherche.

Le fichier informatique utilisé pour cette recherche est mis en oeuvre conformément à la réglementation française (loi Informatique et Libertés modifiée) et européenne (au Règlement Général sur la Protection des Données -RGPD), Vous disposez d'un droit d'accès, de rectification et d'opposition .au traitement des données couvertes par le secret professionnel utilisées dans le cadre de cette recherche. Ces droits s'exercent auprès du médecin en charge de la recherche qui seul connaît votre identité (identifié en première page du présent document).

Si vous décidez d'arrêter de participer à la recherche, les données recueillies précédemment à cet arrêt seront utilisées conformément à la réglementation, et exclusivement pour les objectifs de cette recherche. En effet, leur effacement serait susceptible de compromettre la validité des résultats de la recherche. Dans ce cas, vos données ne seront absolument pas utilisées ultérieurement ou pour une autre recherche.

En cas de difficultés dans l'exercice de vos droits, vous pouvez saisir le Délégué à la Protection des données de l'AP-HP à l'adresse suivante : [protection.donnees.dsi@aphp.fr](mailto:protection.donnees.dsi@aphp.fr), qui pourra notamment vous expliquer les voies de recours dont vous disposez auprès de la CNIL.

## 11) Comment cette recherche est-elle encadrée ?

L'AP-HP a pris toutes les mesures pour mener cette recherche conformément aux dispositions du Code de la Santé Publique applicables aux recherches impliquant la personne humaine.

L'AP-HP a souscrit une assurance N°0100518814033 180153 garantissant sa responsabilité civile et celle de tout intervenant auprès de la compagnie HDI-GERLING par l'intermédiaire de BIOMEDICINSURE dont l'adresse est Parc d'Innovation Bretagne Sud C.P.142 56038 Vannes Cedex.

L'AP-HP a obtenu l'avis favorable du Comité de Protection des Personnes pour cette recherche CPP est II le 02/05/2019

## 12) Quels sont vos droits ?

Votre participation à cette recherche est entièrement libre et volontaire. Votre décision n'entraînera aucun préjudice sur la qualité des soins et des traitements que vous êtes en droit d'attendre.

Vous pourrez tout au long de la recherche demander des informations concernant votre santé ainsi que des explications sur le déroulement de la recherche au médecin qui vous suit.

Vous pouvez vous retirer à tout moment de la recherche sans justification, sans conséquence sur la suite de votre traitement ni la qualité des soins qui vous seront fournis et sans conséquence sur la relation avec votre médecin. A l'issue de ce retrait, vous pourrez être suivi par la même équipe médicale. Dans ce cas, les données collectées jusqu'au retrait seront utilisées pour l'analyse des résultats de la recherche.

Votre dossier médical restera confidentiel et ne pourra être consulté que sous la responsabilité du médecin s'occupant de votre traitement ainsi que par les autorités de santé et par des personnes dûment mandatées par l'AP-HP pour la recherche et soumises au secret professionnel.

A l'issue de la recherche et après analyse des données relatives à cette recherche, vous pourrez être informé(e) des résultats globaux en le demandant au médecin qui vous suit dans le cadre de cette recherche

Vous pouvez également accéder directement ou par l'intermédiaire d'un médecin de votre choix à l'ensemble de vos données médicales en application des dispositions de l'article L 1111-7 du Code de la Santé Publique.

Après avoir lu toutes ces informations, discuté tous les aspects avec votre médecin et après avoir bénéficié d'un temps de réflexion, si vous acceptez de participer à la recherche vous devrez signer et dater le formulaire de consentement éclairé se trouvant à la fin de ce document.

## FORMULAIRE DE CONSENTEMENT

Je soussigné(e), M<sup>me</sup>, M. [rayer les mentions inutiles] (nom, prénom)..... **accepte librement de participer à la recherche intitulée** « Étude du retentissement systémique du relargage des éléments traces (ET) par les Dispositifs Médicaux Implantables. Identification de biomarqueurs d'inflammation systémique » organisée par l'Assistance Publique - Hôpitaux de Paris et qui m'est proposée par le Docteur/Professeur/Personne qualifiée (nom, prénom, téléphone) ....., médecin dans cette recherche.

- J'ai pris connaissance de la note d'information version du ..... V1.0 du 04/12/2018 (4 pages) m'expliquant l'objectif de cette recherche, la façon dont elle va être réalisée et ce que ma participation va impliquer,
- je conserverai un exemplaire de la note d'information et du consentement,
- j'ai reçu des réponses adaptées à toutes mes questions,
- j'ai disposé d'un temps suffisant pour prendre ma décision,
- j'ai compris que ma participation est libre et que je pourrai interrompre ma participation à tout moment, sans encourir la moindre responsabilité et préjudice pour la qualité des soins qui me seront prodigués.
- j'ai été informé que les données recueillies dans le cadre de la recherche peuvent être réutilisées pour des recherches ultérieures, et que je pouvais m'y opposer à tout moment
- Je suis conscient(e) que ma participation pourra aussi être interrompue par le médecin si besoin, il m'en expliquera les raisons,
- j'ai compris que pour pouvoir participer à cette recherche je dois être affilié(e) à un régime de sécurité sociale ou bénéficiaire d'un tel régime. Je confirme que c'est le cas
- j'ai bien été informé(e) que ma participation à cette recherche durera environ une semaine (soit la durée d'hospitalisation), et que cela implique que je ne pourrai pas envisager de participer à une autre recherche avant la fin de ma participation sans en informer le médecin qui me suit pour la recherche,
- j'ai été informé(e) que mes échantillons, prélevés dans le cadre de cette recherche, seront conservés et utilisés ultérieurement à des fins de recherche portant sur la même thématique
- mon consentement ne décharge en rien le médecin qui me suit dans le cadre de la recherche ni l'AP-HP de l'ensemble de leurs responsabilités et je conserve tous mes droits garantis par la loi.

### Signature de la personne participant à la recherche

Nom Prénom :

Date :

Signature :

### Signature du médecin

Nom Prénom :

Date :

Signature :

**Ce document est à réaliser en 3 exemplaires, un exemplaire doit être conservé 15 ans par l'investigateur, le deuxième remis à la personne donnant son consentement et le troisième transmis à l'AP-HP sous enveloppe scellée à la fin de la recherche.**





**Titre :** Retentissement systémique et toxicité du relargage des particules métalliques par les Dispositifs Médicaux Implantables. Études *in vitro* et *in vivo*

**Mots clés :** Toxicologie, prothèse, éléments traces, ICP-HRMS, inflammation, métabolomique

En cas d'usure ou de rupture de la prothèse, les particules métalliques sont émises dans l'environnement péri-prothétique, à l'origine d'une toxicité locale. Ces particules peuvent aussi migrer au sein de l'organisme, dans le sang circulant et s'accumuler dans des organes, responsables d'une toxicité systémique. L'objectif de ce travail a été d'évaluer la toxicité et le retentissement systémique du relargage des éléments traces (ET) par les implants orthopédiques. Une méthode de dosage simultané de 38 ET en ICP-HRMS a été mise au point et validée dans le sang, les urines, les cheveux et les tissus humains après minéralisation totale par micro-onde. *In vivo*, cette méthode a été appliquée à différentes matrices (sang, urines, cheveux, tissu, synovie, viscères) d'une population porteuse de prothèse et d'une population saine, représentative de la population francilienne, afin d'émettre des valeurs de référence pour les ET. Les concentrations métalliques retrouvées chez les porteurs de prothèse, même fonctionnelles, sont en faveur d'un relargage d'ET

dans l'environnement péri-prothétique, passant ensuite dans la circulation et s'accumulant dans certains organes comme le cœur et les poumons. L'inflammation induite par la prothèse a aussi été évaluée par le dosage des cytokines pro-inflammatoires, afin de définir un biomarqueur précoce de la dégradation de l'implant. L'utilisation du MIP-1 $\alpha$  comme biomarqueur de l'usure de la prothèse pourrait être envisagée, après de plus amples investigations. La toxicité du chrome, cobalt et nickel, composants majeurs des prothèses a enfin été évaluée *in vitro*, sur des hépatocytes humains. La concentration inhibitrice médiane (IC<sub>50</sub>) de chaque métal a été déterminée et les mécanismes de toxicité cellulaires ont été analysés par une étude métabolomique à l'IC<sub>50</sub> et à une concentration plus faible de 100 nM, inférieure à celle retrouvée chez les sujets porteurs de prothèse. Les ET semblent induire un stress oxydant et la perturbation des métabolismes lipidique et du tryptophane, même à faible concentration.

**Title :** Systemic impact and toxicity of metal particle release from Implantable Medical Devices. *In vitro* and *in vivo* studies

**Keywords :** Toxicology, prosthesis, trace elements, ICP-HRMS, inflammation, metabolomic analysis

In case of wear or rupture of the prosthesis, metallic particles are released into the peri-prosthetic environment, causing local toxicity. These particles can also migrate within the body, in the circulating blood and accumulate in organs, responsible for a systemic toxicity. The objective of this work was to evaluate the toxicity and systemic impact of trace element (TE) release from orthopedic implants. A method for the simultaneous determination of 38 TE by ICP-HRMS was developed and validated in blood, urine, hair and human tissues after total mineralization by microwave. *In vivo*, this method was applied to different matrices (blood, urine, hair, tissue, synovium, viscera) of a prosthesis-wearing population and a healthy population, representative of the Ile-de-France population, in order to produce reference values for TE. The metal concentrations found in prosthesis wearers, even functional ones, were in favor of a release of ET in

the peri-prosthetic environment, then passing into the circulation and accumulating in certain organs such as the heart and the lungs. Prosthesis-induced inflammation was also assessed by measuring proinflammatory cytokines to define an early biomarker of implant degradation. The use of MIP-1 $\alpha$  as a biomarker of prosthesis wear could be considered, after further investigations. Finally, the toxicity of chromium, cobalt and nickel, major components of the prostheses, was evaluated *in vitro*, on human hepatocytes. The median inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of each metal was determined and the mechanisms of cellular toxicity were analyzed by a metabolomic study at the IC<sub>50</sub> and at a lower concentration of 100 nM, lower than that found in subjects wearing prostheses. ET seemed to induce oxidative stress and disruption of lipid and tryptophan metabolism, even at a low concentration.