

Université de Montréal

**Évaluation de la toxicité du béryllium en fonction de la  
forme chimique et de la taille des particules**

par

Caroline Muller

Département de santé environnementale et de santé au travail

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D)  
en Santé publique  
option toxicologie et analyse de risques

Février, 2010

© Caroline Muller, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Évaluation de la toxicité du béryllium en fonction de la forme chimique et de la taille des  
particules

présentée par :  
Caroline Muller

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Michelle Bouchard, présidente-rapporteuse  
Joseph Zayed, directeur de recherche  
Jean Lambert, co-directeur  
Marc Baril, membre du jury  
Claude Ostiguy, examinateur externe  
Lise Goulet, représentante du doyen de la FES

## Résumé

Le béryllium (Be) est un métal dont les propriétés physiques et mécaniques sont très recherchées, notamment dans les secteurs spatial, énergétique et électronique. Les principaux effets associés à l'exposition au Be sont la sensibilisation et la béryllose chronique. La prévalence des effets associés au Be suggère que les risques sont, entre autres, fonction de sa spéciation. Par ailleurs, il semble que les particules fines constituent la fraction d'intérêt pour l'occurrence de tels effets. Dans cette étude nous avons vérifié l'hypothèse que la forme chimique et la taille des particules du Be jouent un rôle majeur au niveau de la toxicité et de l'apparition d'effets spécifiques à une exposition au Be. Les effets spécifiques se traduisent, entre autres, par la formation de granulomes inflammatoires pulmonaire, par la prolifération de lymphocytes TCD4<sup>+</sup> et la production de cytokines de type Th1.

Pour chacune des trois formes chimiques visées par la présente étude (le Be métallique ou Be, l'oxyde de Be ou BeO et l'alliage Be aluminium ou BeAl), la toxicité a été évaluée à la suite d'une exposition subchronique par inhalation oro-nasale à des particules fines (F) et totales (T). À cette fin, un modèle animal (souris) a été utilisé. Au total, 245 souris ont été utilisées. Elles ont été subdivisées en sept groupes de 35 souris. Un groupe a servi de contrôle, alors que chacun des six autres a été exposé soit à des particules fines soit à des particules totales, pour chacune des trois formes chimiques de Be (Be-F, Be-T, BeO-F, BeO-T, BeAl-F, BeAl-T). La durée d'exposition pour chacun des groupes s'est étendue sur 3 semaines, 5 jours par semaine, 6 heures par jour. Le niveau d'exposition des souris était de 250 µg/m<sup>3</sup>. L'urine des souris a été recueillie avant et durant l'exposition. Au moment du sacrifice, plusieurs tissus (poumon, rate, foie et reins) ainsi que des échantillons de sang ont été prélevés puis immédiatement congelés jusqu'à leur analyse pour la détermination de leur teneur en Be. De plus, certains poumons et rates ont été

analysés pour l'évaluation de la sensibilité immunologique et de l'inflammation pulmonaire.

Cette étude d'exposition subchronique est la première étude murine qui étudie les effets toxiques de différentes tailles particulières sur les changements pathologique et immunologique similaires à ceux observés chez l'humain. Cette étude a permis de constater qu'il existait des différences importantes au niveau de la toxicité du Be d'après les différentes tailles particulières à l'étude. Ces différences seraient reliées au dépôt des particules de Be dans les voies respiratoires et également à la capacité des voies respiratoires à les éliminer totalement ou partiellement. La clairance respiratoire est fonction, notamment, du site de déposition et du caractère soluble ou non des particules. Cette recherche aura également permis de démontrer que les souris C3H/HeJ représentent un bon modèle pour l'étude des effets toxicologiques et immunologiques d'une exposition au Be. De plus, nos résultats démontrent que la sévérité des lésions pulmonaires causées par le Be, tel que l'infiltration interstitielle de lymphocytes et la formation de granulomes non-caséeux, augmente avec le temps de résidence pulmonaire des particules de Be. Combinés à d'autres résultats, nos résultats contribueront à guider les actions de prévention relativement à l'exposition au Be, incluant éventuellement la révision de la valeur limite de l'exposition et possiblement l'établissement de valeurs limites en fonction de la forme chimique et de la taille des particules.

**Mots-clés :** Exposition oro-nasale, Béryllium, Forme chimique, Taille des particules, Béryllose chronique, Sensibilisation

## Abstract

Beryllium (Be) is a metal with physical and mechanical properties and is used extensively in the aerospace, energy, and electronics industries. The main effects associated with Be exposure are sensitization and chronic beryllium disease. The prevalence of the effects associated with Be suggests that the risks are function of its speciation. Furthermore, it appears that the fine particles constitute the fraction of interest for the occurrence of such effects. In this study we verified the hypothesis that the chemical form and the particle size of Be play a major role in the level of the toxicity and in the appearance of specific effects in an exposure to Be. The specific effects are translated, among others, by the formation of inflammatory granulomas, by the proliferation of lymphocytes TCD4 + and the production of type Th1's cytokines.

For each of the three chemical forms assessed in this research (Be metal or Be, Be oxide or BeO and Be aluminum alloy or BeAl) the toxicity was estimated following an subchronic exposure by nose-only to fine (F) and total (T) particles. An animal model (mouse) was used. Two hundred and forty five mice divided into seven groups of 35 each were used. The first group was used as a control, while the six other groups were exposed to total or fine particles of three different Be species (Be-F, Be-T, BeO-F, BeO-T, BeAl-F, BeAl-T). The duration of exposure for each of the groups was 3 consecutive weeks, 5 days per week and 6 hours per day. The target level of exposure was  $250 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Urine was collected before and during exposure. At the time of the sacrifice, several tissues (lungs, spleens, livers and kidneys) and blood samples were taken and immediately frozen until their chemical analysis for Be concentrations. Lungs and spleens were also sampled to evaluate the immunological effects and pulmonary inflammation.

This study of subchronic exposure is the first murine study to examine the toxic effects of various particle sizes for similar pathological and immunological changes to those observed in a human being. This study allowed for the identification of important differences in the level of the toxicity of Be according to the various particles sizes. These differences are connected to the deposit of the particles of Be in respiratory tracts and also the capacity of respiratory tracts to eliminate them totally or partially. The respiratory clearance is a function of the site of deposition and of the solubility of the particles. This research has also demonstrated that mouse C3H/HeJ represents a good model for the study of the toxicological and immunological effects of a Be exposure. Furthermore, our results showed that the severity of the lung hurts caused by Be, such as the interstitial infiltration of lymphocytes and the formation of non-caseous granulomes, increases in time by lung residence of Be. Alongside other results, the results of this research will contribute to informing the prevention of Be exposure, including possibly the revision of the limit value and the establishment of a scientifically based threshold according to chemical form and particle size.

**Keywords:** Nose-only inhalation, Beryllium, Chemical form, Particle sizes, Chronic beryllium disease, Sensitization

## Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xiii
Liste des sigles et abréviations.....	xv
Remerciements.....	xviii
Introduction.....	1
1. Chapitre premier : État des connaissances.....	3
1.1 Le béryllium.....	3
1.1.1 Découverte et sources.....	3
1.1.2 Caractéristiques physico-chimiques.....	3
1.1.3 Applications.....	4
1.2 Sources d'exposition au béryllium.....	5
1.2.1 Exposition non professionnelle.....	5
1.2.1.1 Exposition par l'air.....	6
1.2.1.2 Exposition par l'eau et la nourriture.....	6
1.2.1.3 Exposition par la fumée de cigarettes.....	7
1.2.1.4 Exposition par les alliages dentaires.....	7
1.2.2 Exposition professionnelle.....	7
1.2.2.1 Contexte québécois.....	8
1.3 L'épidémiologie du béryllium.....	9
1.4 La toxicocinétique du béryllium.....	11
1.4.1 Absorption.....	11
1.4.1.1 Absorption cutanée.....	11
1.4.1.2 Absorption gastrointestinale.....	11
1.4.1.3 Absorption par inhalation.....	12
<i>Déposition et clairance respiratoire.....</i>	<i>12</i>

Chez l'humain .....	14
Chez la souris .....	20
1.4.2 Distribution .....	21
1.4.3 Métabolisme .....	22
1.4.4 Excrétion .....	22
1.4.5 Demi-vie .....	23
1.5. Mécanismes d'action du béryllium et pathologies .....	24
1.5.1 La béryllose aiguë .....	23
1.5.2 La sensibilisation (BeS) .....	25
1.5.3 La béryllose chronique (BC) .....	26
1.5.4 Le cancer .....	28
1.5.5 Le diagnostic .....	28
1.5.6 Les traitements .....	29
1.6 Normes et valeurs de référence .....	29
1.7 Facteurs de risques .....	32
1.7.1 La taille des particules .....	32
1.7.1.1 La surface spécifique et le nombre de particules .....	33
1.7.2 Les formes chimiques de béryllium .....	33
1.7.3 La prédisposition génétique .....	34
1.7.4 La nature du travail .....	35
1.7.5 La solubilité .....	35
1.7.6 La dose et la durée d'exposition .....	36
2. Chapitre deuxième: Problématique et objectifs de recherche .....	38
2.1 Problématique de recherche .....	38
2.2 Objectifs de recherche .....	39
3. Chapitre troisième: Présentation des articles .....	41
Article premier: Immunotoxicity of three chemical forms of beryllium following inhalation exposure to different particles sizes .....	43



Article deuxième: Urinary levels, tissue concentrations and lung inflammation after nose-only exposure to three different chemical forms of beryllium.....	78
Article troisième: Béryllium contamination and exposure monitoring in an inhalation laboratory setting.....	102
Article quatrième: Immunological responses in C3H/HeJ mice following nose-only inhalation exposure to different sizes of beryllium metal particles .....	125
4. Chapitre quatrième: Discussion et conclusion .....	156
Bibliographie.....	161

## Liste des tableaux

### 1. Chapitre premier : État des connaissances

Tableau 1 : Déposition respiratoire chez la souris.....21

Tableau 2 : Normes et valeurs de référence d'exposition par inhalation  
.....31

### 3. Chapitre troisième: Présentation des articles

#### **Article premier: Immunotoxicity of three chemical forms of beryllium following inhalation exposure to different particle sizes**

Table 1: Beryllium mass median aerodynamic diameter, atmospheric concentration in the inhalation chamber and theoretical pulmonary deposition for the three exposures to Be species.....70

Table 2: Mean Be tissue concentrations in mice following exposure to Be-F, BeO-F and BeAl-F and for the control group.....71

Table 3: IFN- $\gamma$ , CD4+, CD8+ and CD19 expression (%  $\pm$  SD) in mice spleen mononuclear cells for control mice and for mice exposed to Be-F, BeO-F and BeAl-F.....72

Table 4: Mean cytokines concentration in BAL (pg/ml  $\pm$  SD) for control mice and for mice exposed to Be-F, BeO-F and BeAl-F.....73

Table 5: Histological scores of lung inflammation for the control group and for mice exposed to Be-F, BeO-F and BeAl-F sacrificed 1 and 3 weeks after the end of exposure...74

Table 6: Correlations between tissue concentration, cytokine concentration and splenic mononuclear expressed cell.....	75
--	----

## **Article deuxième: Urinary levels, tissue concentrations and lung inflammation after nose-only exposure to three different chemical forms of beryllium**

Table 1: Beryllium mass median aerodynamic diameter (MMAD), atmospheric concentration in the inhalation chamber and theoretical pulmonary deposition of Be particles.....	98
---	----

Table 2: Histological scores of lung inflammation for the control group and for mice nose-only exposed to Be-F, BeO-F and BeAl-F.....	99
---	----

Table 3: Urinary Be (nmol / L $\pm$ SD) for the control group and for mice nose-only exposed to Be-F, BeO-F and BeAl-F.....	100
---	-----

## **Article troisième: Beryllium contamination and exposure monitoring in an inhalation laboratory setting**

Table 1: Mean atmospheric concentrations during the inhalation exposure of mice to Be.....	119
--	-----

Table 2: Average airborne Be ( $\mu\text{g}/\text{m}^3 \pm \text{SD}$ ) in the laboratory and in the exposure box during the inhalation toxicology studies.....	120
---	-----

Table 3: Average Be concentration ( $\mu\text{g}/100\text{cm}^2 \pm \text{SD}$ ) on surfaces during the inhalation toxicology study.....121

Table 4: Average Be concentration ( $\mu\text{g}/100\text{cm}^2 \pm \text{SD}$ ) on protective clothing during the inhalation toxicology study.....122

Table 5: Average Be concentration ( $\mu\text{g}/100\text{cm}^2$ ) on surfaces at the end of the inhalation toxicology study.....123

**Article quatrième: Immunological responses in C3H/HeJ mice following nose-only inhalation exposure to different sizes of Beryllium metal particles**

Table 1: Aerodynamic Be particle size distribution in the inhalation chamber.....147

Table 2: T cells proliferation responses were evaluated by incorporation of tritiated thymidine.....148

## Liste des figures

### 1. Chapitre premier : État des connaissances

Figure 1: Dépôt régional dans les voies respiratoires en fonction de la taille des particules.....13

Figure 2: Prédiction du dépôt total et régional des particules dans les voies respiratoires en fonction de la taille des particules.....15

Figure 3: Les mécanismes de clairance respiratoire.....17

### 3. Chapitre troisième

#### **Article premier: Immunotoxicity of three chemical forms of beryllium following inhalation exposure to different particle sizes**

Figure 1: Images from standard histology of lung in control mice (A) and in those exposed to Be-F (B), BeO-F (C) and BeAl-F (D) sacrificed one week after the end of exposure....76

Figure 2: Images from standard histology of lung in control mice (A) and in those exposed to Be-F (B), BeO-F (C) and BeAl-F (D) sacrificed three weeks after the end of exposure..77

#### **Article deuxième: Urinary levels, tissue concentrations and lung inflammation after nose-only exposure to three different chemical forms of beryllium**

Figure 1: Blood (pg/ml) and tissue (ng/g) Be concentrations for controls compared to mice nose-only exposed to Be-F, BeO-F and BeAl-F.....101

### **Article troisième: Beryllium contamination and exposure monitoring in an inhalation laboratory setting**

Figure 1: Views of (A) aerosol generator unit glovebox enclosure, (B) exposure chamber box, (C) inhalation chamber, and (D) animal handling trolley.....118

### **Article quatrième: Immunological responses in C3H/HeJ mice following nose-only inhalation exposure to different sizes of Beryllium metal particles**

Figure 1: Z contrast TEM micrographs showing Be powder particles a) Be-F and b) Be-I.....149

Figure 2: PEELS spectrum acquired on a powder particle showing the detection of Be.150

Figure 3: Electron diffraction pattern acquired on an individual Be-containing powder particle showing the presence of several crystals.....151

Figure 4: Histological score of lung inflammation in mice following inhalation exposure to Be metal, Inhalable (Be-I, n=6) and fine (Be-F, n=7) particles.....152

Figure 5: Images from Histology of lung in mice exposed to Be metal, inhalable (Be-I) and fine (Be-F), particles.....153

Figure 6: CD4+, CD8+, IFN- $\gamma$ , and CD19 expression in mouse splenic mononuclear cells following exposure to Be metal particles.....154

Figure 7: Cytokine expression in BAL of mice exposed to Be metal, Be-I (n=5) and Be-F (n=5), particles.....155

## Liste des sigles et des abréviations

ACGIH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists

ASP: Associations sectorielles paritaires

ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry (Etats Unis)

BAL-BeLPT: Test de prolifération lymphocytaire au Be dans le liquide broncho-alvéolaire

BC: Bériiliose chronique

Be: Béryllium

BeAl: Béryllium-aluminium

BeCl<sub>2</sub>: Chlorure de béryllium

BeCu: Béryllium-cuivre

BeF<sub>2</sub>: Fluorure de béryllium

BeHPO<sub>4</sub>: Phosphate de béryllium

BeLPT: Test sanguin de prolifération lymphocytaire au béryllium

BeNi: Béryllium-nickel

BeO: Oxyde de béryllium

BeOH: Hydroxyde de Be

BeS: Sensibilisation au Be

BeSO<sub>4</sub>: Sulfate de béryllium

CIRC: Centre international de recherche sur le cancer

CMH-II: Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

CMPP: Comité des maladies pulmonaires professionnelles du Québec

CO<sub>2</sub>: Dioxyde de carbone

CSST: Commission de la santé et de la sécurité du travail

g/cm<sup>3</sup>: gramme par centimètre cube

IFN $\gamma$ : Interféron  $\gamma$

IL-2: Interleukine 2

IRSST: Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et sécurité du travail  
LBA: Lavage broncho-alvéolaire  
LOAEL: Lowest Observed Adverse Effect Level  
mg/Kg: milligramme par kilogramme  
MMAD: Diamètre aérodynamique médian de masse  
NOAEL: No Observed Adverse Effect Levels  
OEL: Occupational exposure limit  
OSHA: Occupational Safety and Health Administration des États-Unis  
PEL: Permissible Exposure Limit  
REL: Recommended Exposure Limit  
STEL: Short-Term Exposure Limit  
TLV: Threshold Limit Value  
TNF $\alpha$ : Facteur nécrosant des tumeurs  
TWA: 8-hour Time-Weighted Average  
USAEC: United States Atomic Energy Commission  
US EPA: United States Environmental Protection Agency  
VEMP: Valeur d'exposition moyenne pondérée des travailleurs au Québec  
%: Pourcentage  
°C: Degrés celcius



*À ma mère qui, par son amour et sa  
confiance, m'a permis cette belle réussite.*

## Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes impliquées de près ou loin dans ce projet. Tout d'abord mon directeur de thèse, Dr Joseph Zayed qui m'a donné l'opportunité de participer à ce projet ainsi que pour l'encouragement et les conseils qu'il m'a prodigués tout au long de mon doctorat. Mon co-directeur Dr Jean Lambert, pour son aide dans l'analyse statistique. Les techniciennes Elmira Elviera et Lise Gareau pour leur travail et Julienne Lama, étudiante à la maîtrise pour sa participation et son apport au projet.

Je remercie Marie-Odette St-Hilaire, Stéfanie Pellerin, Sarah Ferron, Anne Tessier, Jean-François Rozon et Patrick Larivée pour leur amitié qui m'est très précieuse.

Un gros merci à mon frère, Alix Muller pour son aide et ses attentions qui m'ont facilité la traversée de cette grande étape de la vie.

Mille mercis à mes parents, Henri Muller et Lucie Muller, pour m'avoir donné cette conviction de pouvoir réussir et celle d'être aimée. Merci pour ce plus beau cadeau qu'un enfant puisse recevoir.

Merci à ma grand-mère, Pauline Savoiaro, pour tout son amour et pour m'avoir rendu la vie si belle.

Merci à mon amour, Alassane Basse, pour sa confiance, son appui et sa grande patience.

## Introduction

Le béryllium (Be), un métal dont les propriétés physiques et mécaniques sont très recherchées notamment dans les secteurs spatial, énergétique et électronique, est un élément ubiquiste dans l'environnement (Taylor *et al.*, 2003). La production de Be a débuté dans les années 30 et déjà, à cette époque, des atteintes respiratoires ont été rapportées en Allemagne, en URSS et en Italie parmi les ouvriers employés à l'extraction du métal et à la fabrication d'alliages (Hardy, 1980). La première grande utilisation du Be aux États-Unis a eu lieu à la fin des années 1930 lors de la fabrication de lampes fluorescentes pour lesquelles il était employé comme produit fluorescent en association avec le silicate de zinc. Cette utilisation a eu pour conséquence l'émergence de plusieurs cas de béryllose chronique (BC), une atteinte respiratoire découlant d'une exposition au Be (Rosenberg, 2005). En 1949, l'emploi du Be dans la fabrication des lampes fluorescentes a été supprimé. La même année, la commission d'énergie atomique américaine (USAEC) déclarait une limite d'exposition occupationnelle (OEL) de  $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Cette limite se conformait aux pratiques d'hygiène du travail de l'époque (Eisenbud, 1998). En 1959, la comice américaine des hygiénistes industriels gouvernementaux (ACGIH) a jugé cette valeur de  $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$  adéquate en établissant leur valeur seuil limite (TLV-TWA), même si aucun test spécifique n'avait été effectué sur les effets potentiels du Be (Paustenbach *et al.*, 2001; Taylor, 2003). Cette valeur a par la suite été acceptée par l'Occupational Safety and Health Administration des États-Unis (OSHA) en 1972 (Kolan, 2001). Au Québec, le Règlement sur la santé et la sécurité du travail édicte les normes d'exposition en milieu de travail pour plusieurs substances. La valeur d'exposition moyenne pondérée (VEMP) a été établie à  $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$  pour le Be en 1979 (RQMT, 2009). En 2007, la VEMP est passée de  $2,0 \mu\text{g}/\text{m}^3$  à  $0,15 \mu\text{g}/\text{m}^3$  alors qu'en 2009 c'est la TLV-TWA de l'ACGIH qui est passée de  $2,0 \mu\text{g}/\text{m}^3$  à  $0,05 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (Gazette officielle du Québec, 2006; ACGIH, 2009).

La prévalence de la BC reste toutefois préoccupante. Effectivement, au cours des dernières années plusieurs auteurs ont remis en cause les niveaux de protection accordés aux travailleurs par la valeur seuil reconnue pour le Be. À titre d'exemple, la récupération des déchets métalliques est une des activités présentant de nos jours un risque de BC, particulièrement difficile à cerner due à la composition très variable de la matière première (Rosenberg, 2005). Les modalités d'exposition de sujets atteints suggèrent que, même à des concentrations inférieures aux valeurs limites d'exposition, l'exposition au Be peut induire la BC (Epstein *et al.*, 1982). Le Be est inoffensif à l'état solide. Il devient cependant très toxique sous forme de poussière et de fumée. En 1993, le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a classé le Be et ses composés parmi les agents cancérigènes pour l'homme (Groupe 1).

Dans cette étude nous avons vérifié l'hypothèse que la forme chimique (le Be métallique ou Be, l'oxyde de Be ou BeO et l'alliage Be aluminium ou BeAl) et la taille des particules (fine et totale) du Be jouent un rôle majeur au niveau de la toxicité et de l'apparition d'effets spécifiques à une exposition au Be. Un état des connaissances (chapitre 1), recueillant les principaux éléments nécessaires à la compréhension de la problématique et à l'explication des objectifs spécifiques, a été documenté. Ainsi, l'origine du Be, les différentes sources d'exposition, l'épidémiologie, la toxicocinétique et les mécanismes d'action du Be ainsi que les différentes normes et valeurs de référence pour l'exposition par inhalation ont été détaillés. De plus, les facteurs de risques influençant la probabilité que les travailleurs développent une pathologie attribuable au Be ont été décrits. La problématique et les objectifs de recherche sont présentés au chapitre 2. Les résultats sont présentés sous forme de 4 manuscrits au chapitre 3. Une discussion relative à l'étude et la conclusion se retrouvent au chapitre 4.

# 1. Chapitre premier: État des connaissances

## 1.1 Le béryllium

### 1.1.1 Découverte et sources

Le Be fut découvert en France en 1798 par Louis Nicolas Vauquelin sous forme d'oxyde dans le béryl et dans les émeraudes (Poulin et Ricard, 2004). Il fut par la suite isolé en France par Bussy et en Allemagne par Wöhler. Le nom de béryllium lui fut attribué par Wöhler et Bussy en 1828 par rapprochement au « berullos », une pierre précieuse ayant une coloration verte rappelant l'eau de mer (Poulin et Ricard, 2004).

Le Be est le 35<sup>e</sup> élément le plus abondant de la croûte terrestre et se distribue de façon ubiquiste à des concentrations variant généralement de 2,8 à 5,0 mg/Kg (Kolanz, 2001). Le Be n'existe pas à l'état pur dans la nature. Il est incorporé à 45 éléments naturels dont 5 ont une importance en matière d'exploitation industrielle. Ces 5 éléments sont le béryl, la bertrandite, le phénacite, le chrysobéryl et la gadolinite. De ces 5 éléments, le béryl et la bertrandite sont les plus rentables économiquement (Savary *et al.*, 2003). La bertrandite est composée de moins de 1% de Be alors que la proportion de Be dans le béryl s'élève jusqu'à 4%. Les réserves mondiales sont évaluées à environ 80 000 tonnes dont 65 % seraient aux États-Unis (Savary *et al.*, 2003). On retrouve aussi des mines de béryllium au Brésil, en Afrique du sud, en Chine, à Madagascar et au Zimbabwe (Williams, 1994).

### 1.1.2 Caractéristiques physico-chimiques

Le Be est un métal gris brillant, très dur, très léger et doté d'une grande élasticité. Il est caractérisé par un nombre atomique de 4 et il est le deuxième métal le plus léger des

métaux avec un poids moléculaire de 9,01218 daltons (Poulin et Ricard, 2004). Il possède la même densité ( $1,8477 \text{ g/cm}^3$ ) que le magnésium, est trois fois plus léger que l'aluminium et est six fois plus rigide que l'acier (Bruce et Odin, 2001). Il résiste à la pression, à la chaleur, aux vibrations et à la corrosion. À titre d'exemple, le cuivre est six fois plus résistant en présence de 2 % de Be (Plante *et al.*, 2002). Le Be a un point de fusion très élevé, soit  $1287 \text{ }^\circ\text{C}$ , et conserve sa forme malgré de très grandes variations de températures (Bruce et Odin, 2001). Son point d'ébullition est de  $2472 \text{ }^\circ\text{C}$  (Bruce et Odin, 2001). Le Be est transparent aux rayons X et aux micro-ondes (Bruce et Odin, 2001). C'est un amphotère dont la structure cristalline est hexagonale et il constitue un excellent produit fluorescent (Bruce et Odin, 2001). Le Be est donc un métal dont les propriétés physiques et mécaniques sont très recherchées, notamment dans les secteurs aéronautique, énergétique, électrique et électronique. (Bruce et Odin, 2001; Kolanz, 2001). Effectivement, toutes ces propriétés rendent le Be hautement stratégique pour la haute technologie d'où son utilisation à grande échelle dans différents domaines (Marchand-Adam et Valeyre, 2005).

### 1.1.3 Applications

Il existe plusieurs composés chimiques de Be tels que l'oxyde de béryllium ( $\text{BeO}$ ), le sulfate de béryllium ( $\text{Be(SO}_4\text{)}$ ), le fluorure de béryllium ( $\text{BeF}_2$ ), le phosphate de béryllium ( $\text{BeHPO}_4$ ), l'hydroxyde de Be ( $\text{Be(OH)}_2$ ) (Schepers, 1964), et des alliages tels que béryllium-cuivre ( $\text{BeCu}$ ), béryllium-aluminium ( $\text{BeAl}$ ) ou béryllium-nickel ( $\text{BeNi}$ ) (ATSDR, 2002). Le béryllium métallique (Be), les alliages et l'oxyde de béryllium sont les produits les plus importants pour le commerce (Bruce et Odin, 2001; Stonehouse et Zenczak, 1991).

Le Be métallique est utilisé principalement comme modérateur et réflecteur de neutrons dans les réacteurs nucléaires et dans les fenêtres pour tubes de rayons X et dans l'industrie de l'armement nucléaire (Poulin et Ricard, 2004). Actuellement, la principale

utilisation du Be est au niveau des alliages (Kolanz, 2001). Les alliages d'aluminium, de cuivre, de magnésium, de nickel, de zinc et de zirconium, trouvent de nombreuses applications dans les industries aérospatiale, électronique et mécanique ainsi que dans la fabrication d'articles de sport tels que les bâtons de golf (Bruce et Odin, 2001). Les alliages d'aluminium-béryllium contiennent entre 20 et 62 % de Be. Leur utilisation demeure réservée à des applications spécialisées, telles que les pièces d'avionique, les étriers de freins de voiture de Formule-1 et des pièces d'équipement de précision (Bruce et Odin, 2001). D'autres alliages d'aluminium contiennent du Be mais à des teneurs beaucoup plus faibles (moins de 0,07 %). Ils sont utilisés, entre autres, dans le secteur de l'aéronautique. Les oxydes de béryllium sont utilisés comme modérateur dans les réacteurs nucléaires et servent à la fabrication de céramiques dans les domaines de l'électronique, de l'automobile, en microélectronique, dans les lasers et dans les tubes à micro-ondes (Kreiss *et al.*, 2007). Les sels solubles de fluorure et de sulfate de béryllium constituent principalement des intermédiaires dans les procédés de production (Bruce et Odin, 2001).

## **1.2 Sources d'exposition au béryllium**

### **1.2.1 Exposition non professionnelle**

L'exposition au Be peut être de nature environnementale ou professionnelle (Willis et Florig, 2002). Cependant, des cas de béryllose chronique (BC) d'origine environnementale restent exceptionnels. En 1949, à Lorain aux États-Unis, 11 personnes furent découvertes atteintes de BC dans la population vivant aux alentours d'une usine de lampes fluorescentes, utilisant le Be, alors qu'elles n'y travaillaient pas. Parmi elles, 10 habitaient dans un rayon d'environ 1 km (Eisenbud *et al.*, 1949). L'apparition de problèmes de santé liés au Be, en dehors d'une exposition occupationnelle, a interpellé les scientifiques et les décideurs à conjuguer leurs efforts afin de réglementer cette forme d'exposition. C'est ainsi que la norme d'exposition environnementale a été établie par les

États-Unis à  $0,01 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (US EPA, 1998). Il n'existe pas de norme environnementale au Québec (Poulin et Ricard, 2004).

### **1.2.1.1 Exposition par l'air**

La principale source d'émissions de Be dans l'atmosphère vient de la combustion des combustibles fossiles, principalement le charbon. Équivalant à 187,1 tonnes par année, cette source est responsable de 97 % de tous les rejets atmosphériques de Be aux États-Unis (Poulin et Ricard, 2004). Les émissions atmosphériques annuelles dues à la production et à la transformation du Be sont approximativement de 0,3 tonne. Les particules issues de l'ensemble de ces procédés sont généralement émises sous forme d'oxyde de béryllium (Bruce et Odin, 2001). Les sources naturelles d'émission de Be soient, les particules volcaniques et les poussières sont estimées à environ 5,2 tonnes par année (Bruce et Odin, 2001). La concentration moyenne dans l'air ambiant aux États-Unis est de  $0,00003 \mu\text{g}/\text{m}^3$  alors que la concentration médiane dans les villes est de  $0,0002 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (Kolan, 2001).

### **1.2.1.2 Exposition par l'eau et la nourriture**

Les sols cultivables contiennent de 1 à 7 mg/Kg de Be. Il existe de rares endroits où les concentrations moyennes peuvent atteindre 60 mg/Kg avec un maximum de 300 mg/Kg (Poulin et Ricard, 2004). Le Be se retrouve dans les aliments à des concentrations variant de 0,2 à 2200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  avec pour chef de file les fèves soya (Poulin et Ricard, 2004). Les concentrations dans l'eau aux États-Unis varient de 0,010 à 1,220  $\mu\text{g}/\text{L}$  avec une moyenne de 0,190  $\mu\text{g}/\text{L}$  (Kolan, 2001). L'ingestion journalière de Be par la population générale est évaluée à environ 0,423  $\mu\text{g}$  dont 0,12  $\mu\text{g}$  par la nourriture et 0,3  $\mu\text{g}$  par l'eau selon des calculs effectués jusqu'en 1987. Il fut établi que la concentration de Be dans l'eau ne devrait pas dépasser 4  $\mu\text{g}/\text{L}$  (US EPA, 1998).



### **1.2.1.3 Exposition par la fumée de cigarette**

Les concentrations de Be ont été estimées à 0,47, 0,68 et 0,74  $\mu\text{g}/\text{cigarette}$  dans le tabac de trois marques différentes de cigarettes (Bruce et Odin, 2001). En estimant que 10 % de ces concentrations passent dans la fumée, un fumeur consommant 20 cigarettes par jour serait exposé à environ 1,5  $\mu\text{g}/\text{jour}$ , équivalant de trois à quatre fois l'exposition occasionnée par l'air ambiant, l'eau, la nourriture et l'ingestion de poussières (Bruce et Odin, 2001).

### **1.2.1.4 Exposition par les alliages dentaires**

Dû à sa capacité à faciliter l'adhésion de la céramique, le Be a été employé en dentisterie où il entre dans la composition d'alliages destinés à la réalisation de prothèses dentaires (couronnes, armatures de ponts céramo-métal) (US OSHA, 2002). Le niveau d'exposition des personnes qui ont certains alliages dentaires (nickel-béryllium) n'est pas connu, mais le dosage de ces alliages indique qu'ils peuvent contenir de 0,5 à 2 % de Be. Depuis 2002, la norme ISO limite le Be à 0,02 % de la masse totale (US OSHA, 2002).

## **1.2.2 Exposition professionnelle**

En milieu professionnel, des milliers de travailleurs sont exposés par inhalation au Be sous forme particulaire. Récemment, une étude a montré qu'environ 134 000 travailleurs étaient potentiellement exposés au Be à travers les États-Unis (Henneberger *et al.*, 2004). Les travailleurs présentant un très grand potentiel d'exposition sont ceux œuvrant dans des mines de Be, les fabricants d'alliage de Be, les techniciens de missiles et de réacteurs nucléaires ainsi que ceux rattachés à l'équipement électrique et électronique (NIEHS, 2003).

### 1.2.2.1 Contexte québécois

En 1998, un premier cas de BC a été diagnostiqué au Québec chez un employé d'une fonderie (Poulin et Ricard, 2004). Au début de 2001, la CSST a mis sur pied l'Opération Béryllium avec ses partenaires (Réseau de la santé, Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et sécurité du travail (IRSST) et associations sectorielles paritaires (ASP) visées), afin de faire le point sur l'utilisation du Be et le niveau d'exposition des travailleurs québécois (CSST *et al.*, 2004). Ainsi, d'après les résultats de ces recherches, dans les fonderies, environ 40 % des travailleurs étaient exposés à des concentrations supérieures à  $0,2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Dans certains établissements où la norme en vigueur à ce moment était respectée (VEMP =  $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ), des cas de BC ont été découverts (CSST *et al.*, 2004). Le rapport concernant le secteur de la première transformation des métaux et de certains établissements où s'effectuent des opérations de fonderie a confirmé la présence de Be dans 44 établissements comptant plus de 13 000 travailleurs (CSST *et al.*, 2004). Les expositions au Be se situant au-dessus de  $0,01 \mu\text{g}/\text{m}^3$  sont liées aux activités d'entretien des bains électrolytiques, d'usinage et d'ébarbage et de coupage et de polissage d'alliages à forte teneur en Be. En date de juillet 2003, l'Opération Béryllium avait permis de diagnostiquer 31 cas de BC ou subclinique et 24 cas de sensibilisation au Be. Les travailleurs sensibilisés au Be ou atteints de BC provenaient d'établissements où la présence de Be avait été confirmée dans les secteurs de mines de cuivre, d'autres mines de métaux, l'industrie de la production d'aluminium de première fusion, d'autres industries de la fonte et de l'affinage de métaux non ferreux et de l'industrie des aéronefs et des pièces d'aéronefs (CSST *et al.*, 2004). Pour les établissements du secteur de l'aéronautique et des établissements d'usinage de pièces aéronautiques, il a été démontré que le Be était présent dans 28 établissements, qui emploient 11 434 travailleurs. Le bilan des activités du secteur de l'industrie de l'environnement (récupération, transfert, entreposage, transformation de matières résiduelles) indiquait que la présence de Be avait été décelée dans 26 établissements. Quarante-trois travailleurs de ces établissements étaient susceptibles d'être exposés à des

concentrations supérieures à  $0,2 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (CSST *et al.*, 2006). Les expositions les plus importantes ont été constatées dans 4 établissements qui traitent des matières résiduelles de l'industrie de l'aluminium. (CSST *et al.*, 2006).

### 1.3 L'épidémiologie du béryllium

Quelques études et systèmes de surveillance ont été mis en place afin de documenter la prévalence de la BC et de la sensibilisation au Be dans les industries qui utilisent du Be. Les résultats des études étaient principalement représentés par les seuils d'anormalité du test sanguin de prolifération lymphocytaire au béryllium (BeLPT) ainsi que par le diagnostic de la sensibilisation et de la béryllose chronique. Kreiss *et al.*, (1993), ont effectué une étude transversale afin de mettre au point un système de surveillance de la béryllose chez les travailleurs d'une usine de fabrication d'armes nucléaires. Cet établissement a commencé à utiliser du Be entre 1951 et 1953 et a produit ses propres alliages de béryllium entre 1957 et 1979. Le taux de BC était très bas (1,7 %) ainsi que celui des travailleurs sensibilisés (0,3 %). Certains de ces cas appartenaient à des groupes professionnels n'étant pas vu comme à risque, soit des secrétaires, des gardiens de sécurité et des inspecteurs. Cette étude montrait également une proportion significativement plus élevée de machinistes présentant un résultat anormal au BeLPT (4,7 %). Certaines activités comme le sciage ressortaient également comme étant plus à risque de présenter un BeLPT anormal (Kreiss *et al.*, 1993). Strange *et al.*, (2001), ont publié un rapport sur les résultats du programme de surveillance médicale de la béryllose chronique chez les travailleurs actifs et retraités de cette même usine de fabrication d'armes nucléaires. En considérant l'ensemble des dépistages, le pourcentage de tests anormaux était de 4,5 % et les prévalences respectives de BC et de sensibilisation étaient de 1,6 % et 3,0 % (Strange *et al.*, 2001). L'association des catégories d'emploi aux cas recensés montre que la proportion de BeLPT anormaux était plus élevée chez les machinistes et les experts en radiophysique médicale sanitaire (Strange *et al.*, 2001).

Une étude transversale de Kreiss *et al.* (1996) a été effectuée dans une usine de céramique en service depuis 1980 et utilisant de la poudre d'oxyde de béryllium. Les résultats publiés indiquent un taux de sensibilisation de 1,5 % et un pourcentage de BC de 4,4 %. Les machinistes et les personnes travaillant au rodage (opération de finition diminuant la rugosité des surfaces) présentaient une fréquence élevée de BC et de sensibilisation (Kreiss *et al.*, 1996). Henneberger *et al.* (2001) ont effectué une étude visant à déterminer si la prévalence de sensibilisation et de la BC avait décliné depuis le dépistage réalisé en 1992 par Kreiss *et al.* (1996) dans la même usine de céramique. Les auteurs rapportent que 9,9 % des travailleurs avaient des résultats de tests anormaux. Parmi eux, 5,3 % avaient une BC (Henneberger *et al.*, 2001). Les auteurs rapportent que le rodage présentaient la plus forte proportion de sensibilisés et que l'usinage venait en deuxième lieu.

Kreiss *et al.* (1997) ont effectué un programme de dépistage de BC dans une usine de production de béryllium métallique, d'oxyde de béryllium et d'alliage de Be. La médiane des concentrations moyennes d'exposition au Be pour l'ensemble des travailleurs était de  $1,0 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . La prévalence de BC était de 4,6 % et de 3,0 % pour la sensibilisation.

Newman *et al.* (2001) ont effectué un programme de surveillance médicale, dans une usine utilisant le béryllium métallique, suite à la détection d'un cas de BC en 1995. L'âge moyen des travailleurs était de 39 ans et la durée moyenne de l'exposition était de 11,7 ans. Pour 344 travailleurs qui ont été testés, 22 étaient sensibilisés au Be, 13 ont été diagnostiqués avec la BC caractérisée par des granulomes et/ou des infiltrations de cellules mononucléaires lors de biopsies pulmonaires et 2 travailleurs ont été diagnostiqués avec une BC probable. Les travailleurs atteints de BC étaient plus âgés que ceux sensibilisés au Be (41 ans versus 33,5 ans). Kelleher *et al.* (2001) ont utilisé les résultats de Newman *et al.* (2001) en examinant les relations entre l'exposition au Be et la sensibilisation au Be et la BC. Il n'y avait aucune différence significative entre les cas et les témoins pour l'âge, la durée de l'emploi et le statut de fumeur. Une proportion élevée et significative des cas

travaillait comme machinistes. Le niveau d'exposition total moyen était de  $0,13 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Les cas avaient été exposés à des niveaux d'exposition moyens de Be ayant des tailles particulières de  $<6$  ou  $<1 \mu\text{m}$  (Kelleher *et al.*, 2001).

La BC a aussi été décrite en 2004 chez des ouvriers du bâtiment affectés à la construction, l'entretien et la démolition des bâtiments de différents sites nucléaires américains dans lesquels du Be avait été employé (Welch *et al.*, 2004). Parmi les 3845 sujets de l'étude, 54 (1,4 %) étaient sensibilisés au Be dont 5 % présentaient une BC (Welch *et al.*, 2004).

## **1.4 La toxicocinétique du béryllium**

### **1.4.1 Absorption**

#### **1.4.1.1 Absorption cutanée**

Le Be n'est que très peu absorbé par la peau intacte, car il se lie à des constituants de l'épiderme, soit des protéines et acides nucléiques, pour former des complexes peu diffusibles (IRIS, 1998). Cependant, il se pourrait que le contact cutané puisse jouer un rôle dans la sensibilisation suite à l'exposition à de fines particules. Tinkle *et al.* (2003) ont montré que de fines particules fluorescentes de dextran ( $0,5 \mu\text{m}$ - $1 \mu\text{m}$ ) en combinaison avec un mouvement peuvent pénétrer la couche cornée, le derme et l'épiderme d'une peau morte et initier une réponse immunitaire et jouer un rôle dans la sensibilisation au Be. Toutefois, sur une peau saine, cette voie d'absorption est négligeable par rapport à la voie respiratoire (Emond *et al.*, 2007).

#### **1.4.1.2 Absorption gastrointestinale**

Le Be est très faiblement absorbé par la voie digestive, soit moins de 1% de la dose potentielle. L'absorption se fait au niveau des villosités intestinales (IRIS, 1998). La

quantité absorbée est limitée par la formation de phosphate colloïdal insoluble au niveau de l'intestin (Reeves, 1965). La fraction absorbée passe dans les veines mésentériques puis arrive au foie par la veine porte. Le Be qui n'est pas absorbé est éliminé dans les selles. Le peu de Be absorbé au niveau intestinal est excrété principalement dans les urines. La quantité absorbée dépend de la dose et de la solubilité des composés (Reeves, 1965). L'absorption gastrointestinale du Be peut se faire aussi bien en cas d'inhalation que d'exposition par voie orale. Une partie du Be inhalé se retrouve dans le tractus digestif en raison du mécanisme mucociliaire ou en raison de la déglutition des particules insolubles déposées au niveau des voies respiratoires supérieures (Reeves, 1965; US EPA, 1987; Hervé-Bazin, 2007).

#### **1.4.1.3 Absorption par inhalation**

Il existe plusieurs évidences chez l'humain selon lesquelles le poumon constitue la première cible de la toxicité du Be. L'absorption se fait donc principalement par la voie respiratoire suite à l'inhalation de particules de fumée, de poussières ou de poudres (INRS, 2006).

#### ***Déposition et clairance respiratoire***

Le dépôt dans les voies respiratoires des particules inhalées est un processus complexe qui implique de nombreux paramètres anatomiques et physiologiques et fait appel à différents éléments de mécanique de fluides, de physique et de dynamique des particules (Hervé-Bazin, 2007). Conséquemment, les voies respiratoires sont souvent découpées en trois régions anatomiques (figure 1) (Oberdörster *et al.*, 2005). La première région (en bleu sur la figure 1) est la région extra-thoracique, qui inclut les fosses nasales, le pharynx et le larynx. La deuxième région (en vert sur la figure 1), trachéobronchique (voies respiratoires de la trachée aux bronchioles terminales) est la région à partir de laquelle les particules sont éliminées physiquement par l'action du tapis muco-ciliaire

(Martinet, 1999). La troisième région (en rouge sur la figure 1), alvéolaire, inclut les alvéoles, lieu des échanges gazeux (Hervé-Bazin, 2007).

En hygiène industrielle, l'évaluation de l'exposition aux poussières repose sur la mesure en concentration massique des aérosols qui sont échantillonnés, selon le diamètre aérodynamique des particules (MMAD), en trois fractions correspondant aux zones de dépôt dans l'appareil respiratoire (norme NF EN 481 citée par Afsset, 2006):

- la fraction inhalable: fraction massique des particules totales en suspension dans l'air, susceptible d'être inhalée par le nez ou par la bouche (MMAD inférieur à 100  $\mu\text{m}$ ) ;
- la fraction thoracique: fraction massique des particules inhalées susceptibles de pénétrer au-delà du larynx (MMAD inférieur à 11,64  $\mu\text{m}$ ) ;
- la fraction alvéolaire: fraction massique des particules inhalées qui peuvent atteindre la zone alvéolaire (MMAD inférieur à 4,25  $\mu\text{m}$ ).

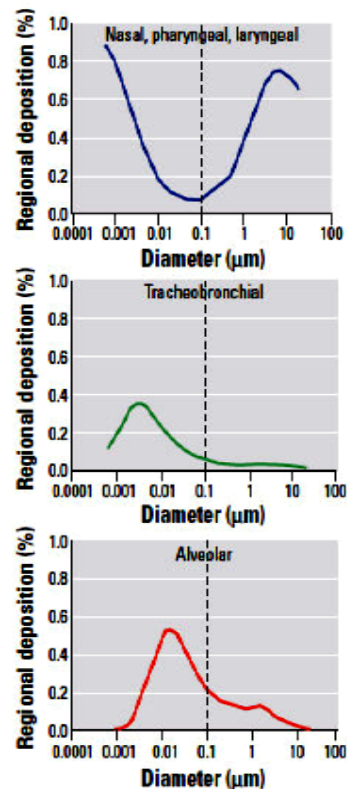
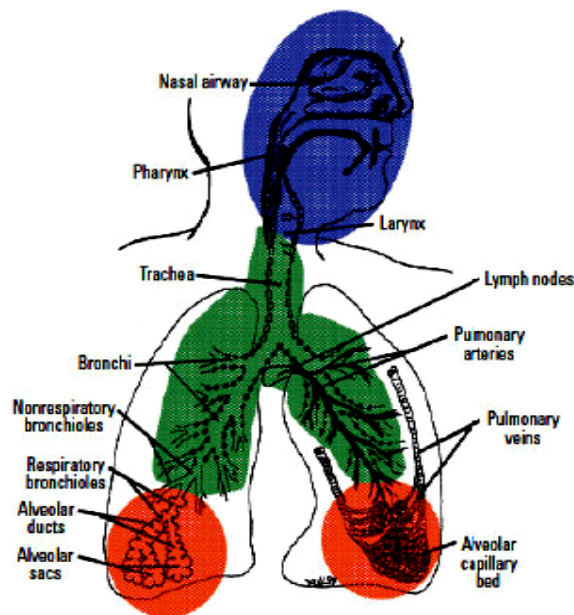


Figure 1: Dépôt régional dans les voies respiratoires en fonction de la taille des particules (Oberdörster *et al.*, 2005)

### **Chez l'humain**

Le dépôt des poussières le long des voies respiratoires varie considérablement en fonction de la granulométrie des poussières et de leur comportement dans l'air (Ostiguy *et al.*, 2008). Les figures 1 et 2 illustrent le taux de déposition dans les différentes régions pulmonaires en fonction du diamètre aérodynamique des particules inhalées (Oberdörster *et al.*, 2005; Witschger et Fabriès, 2005). La figure 1 démontre qu'il y a une distribution plus uniforme pour les nanoparticules (particules ultra-fines) (0.0001 à 0.1  $\mu\text{m}$ ) que pour les particules de taille micrométrique (particules fines) (0.1 à 100  $\mu\text{m}$ ) (Oberdörster *et al.*, 2005).

D'après la figure 2, on peut observer que quasiment aucune particule de 0,001  $\mu\text{m}$  de diamètre aérodynamique n'atteint les alvéoles alors que 80 % se déposent au niveau du nez et du pharynx. Les autres 20 % se situent dans la région de la trachée et des bronches (Ostiguy *et al.*, 2008). La figure 2 montre que la courbe de dépôt total atteint un minimum pour les particules fines de diamètre  $\approx 0,3\mu\text{m}$ . À cette taille, les particules transportées avec l'air inhalé ont une mobilité intrinsèque insuffisante pour les faire entrer en contact avec les surfaces des voies respiratoires. Ces particules sont trop grosses pour la diffusion et trop petites pour que l'impaction et la sédimentation soient sensibles (Hervé-Bazin, 2007). Au minimum de dépôt, seules environ 10 à 20 % des particules inhalées ne seront pas exhalées. Au-dessus de ce minimum de dépôt, la fraction déposée croît de manière significative lorsque le diamètre de la particule augmente (pour les particules allant jusqu'à  $\approx 7 \mu\text{m}$ ). Ceci s'explique par le fait qu'au fur et à mesure que le diamètre des particules augmente, l'impaction et la sédimentation augmentent (Hervé-Bazin, 2007). Parallèlement, la



déposition au niveau alvéolaire pour les particules fines augmente aussi pour atteindre près de 15 % pour les particules fines dont le diamètre est  $\approx 3\mu\text{m}$ . Par la suite la déposition alvéolaire diminue pour atteindre théoriquement près de 0 % pour les particules supérieures à  $10\mu\text{m}$ . La granulométrie des particules a donc un impact majeur sur le site de déposition (Witschger et Fabriès 2005 ; Oberdörster, 2005). Ces différences importantes au niveau des différents sites de déposition devraient avoir des conséquences sur les effets potentiels des particules inhalables dans le système respiratoire (Afsset, 2006).

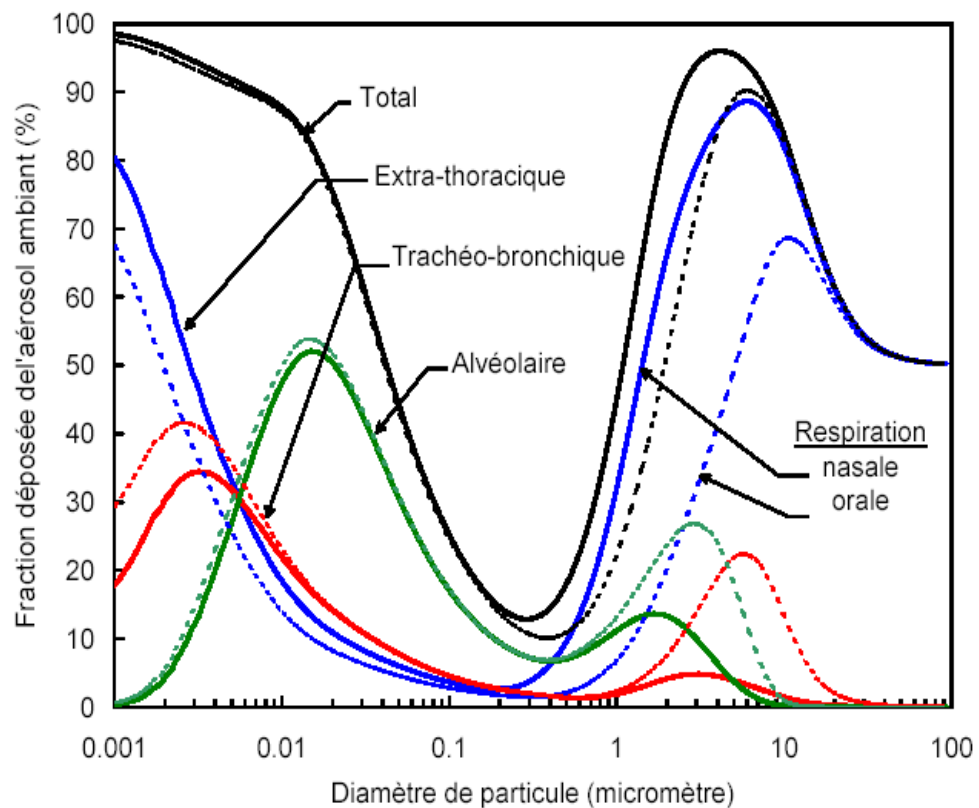


Figure 2: Prédiction du dépôt total et régional des particules dans les voies respiratoires en fonction de la taille des particules (Witschger et Fabriès, 2005).

Les trois régions pulmonaires laissent apparaître d'importantes différences de surface là où les particules se déposent (Hervé-Bazin, 2007, Ostiguy *et al.* 2008). À cet effet, Oberdörster (2005) prend l'exemple des particules de 20 nm qui se déposent dans la région alvéolaire. Bien que la masse de ces particules représente plus de 50 % de la masse totale, la concentration de poussières déposées (exprimée par unité de surface dans le poumon), sera tout de même plus de 100 fois supérieure dans la région nasale et plus de 10 fois supérieure dans la région trachéo-bronchique.

D'autres facteurs influencent grandement la déposition des particules, comme la présence d'une maladie pulmonaire préexistante (Maynard et Kuempel, 2005; US EPA, 2005). Le taux de déposition des particules dans les bronchioles supérieures est ainsi quatre fois plus élevé chez les personnes souffrant de maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) que chez les individus en santé (US EPA, 2005). De plus, une augmentation du volume respiratoire et de la fraction déposée durant un effort physique peut accroître de plus de 4,5 fois le taux de déposition (Daigle *et al.*, 2003) et changer le site de dépôt en augmentant significativement la vitesse des particules et la possibilité d'impaction dans les voies supérieures (Zhao et Nalwa, 2007).

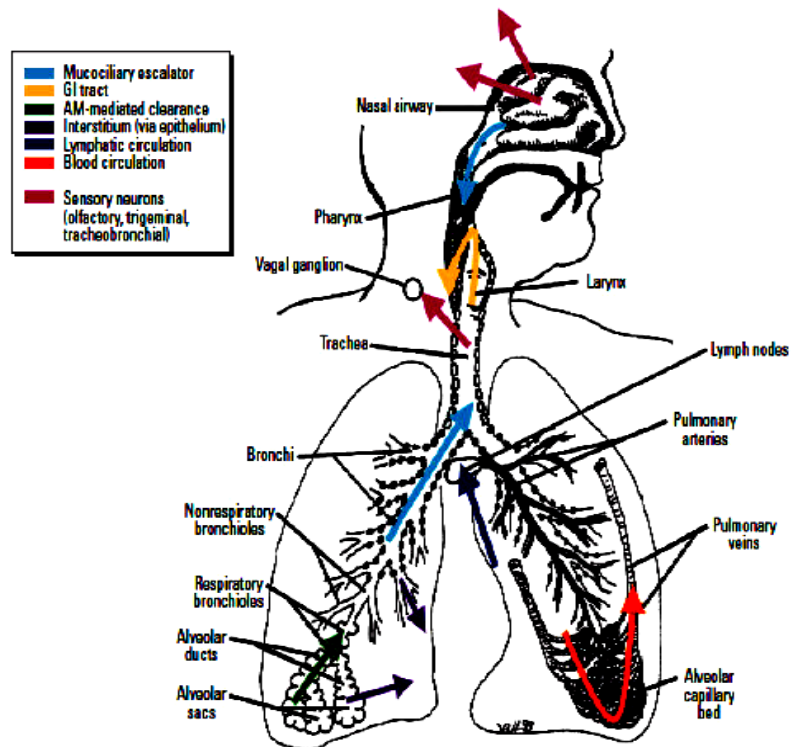


Figure 3: Les mécanismes de clairance respiratoire (Oberdörster *et al.*, 2005)

La toxicité des particules inhalées dépend, entre autres, de leur dépôt dans les voies respiratoires, mais également de la capacité des voies respiratoires à les éliminer totalement ou partiellement (Hervé-Bazin, 2007). La clairance respiratoire est fonction, notamment, du site de déposition et du caractère soluble des particules. Plusieurs mécanismes protègent les voies respiratoires de la pénétration de substances étrangères (figure 3) (Oberdörster *et al.*, 2005). L'air est en partie filtré par les poils du nez et les particules qui réussissent à traverser sont généralement captées par la couche de mucus qui tapisse les voies aériennes. Les voies respiratoires supérieures sont tapissées de cellules épithéliales ciliées, recouvertes d'une couche de mucus sécrété par les cellules à mucus caliciformes et des glandes mucipares présentes dans l'épithélium bronchique (Kelly, 2003). Le mucus sécrété a pour

rôle de piéger les particules pénétrant dans les voies respiratoires et permet ainsi leur évacuation grâce à un mouvement de courant continu (mécanisme d'ascenseur mucociliaire), entretenu par les cils des cellules épithéliales. C'est normalement un mécanisme efficace qui élimine les particules en moins de 24 heures (Kreyling *et al.*, 2002). Il sert également de rempart contre les stress chimiques grâce à un contenu riche en molécules anti-oxydantes (glutathion, acide ascorbique, acide urique,...) et en enzymes anti-oxydantes (superoxyde dismutase, catalase,...) (Kelly, 2003). Les particules insolubles déposées au niveau des voies aériennes supérieures sont éliminées principalement par le système mucociliaire qui les transporte au niveau du nasopharynx (système digestif) ou vers l'extérieur (éternuement, mouchage) (Hervé-Bazin, 2007). Les particules solubles y subissent une absorption systémique rapide et importante due à la riche vascularisation de la muqueuse nasale (Hervé-Bazin, 2007).

Les particules insolubles déposées dans l'arbre trachéobronchique sont principalement éliminées par le transport mucociliaire en direction de l'oropharynx (Bailey *et al.*, 1982). Les cils mobiles de la trachée, des bronches et des bronchioles transportent donc le film de mucus vers le haut, vers le larynx puis le pharynx où il est dégluti. Certaines particules insolubles sont susceptibles de traverser l'épithélium, grâce à des processus d'endocytose, atteignant ainsi les régions péribronchiques (Masse *et al.*, 1974). Les macrophages bronchiques, localisés à la surface de la couche de mucus ou au-dessus de celle-ci, sont également susceptibles de phagocyter certaines particules insolubles (Hervé-Bazin, 2007).

Les macrophages alvéolaires prennent en charge la majeure partie des particules déposées au niveau des alvéoles pulmonaires. Ce processus est rapide, mais saturable. Une exposition chronique pourrait entraîner une cessation quasi complète de la clairance pulmonaire, due à la surcharge des macrophages (Hervé-Bazin, 2007). Le recrutement des macrophages alvéolaires augmente proportionnellement avec le nombre de particules déposées dans les alvéoles (Adamson et Bowden, 1981). Pour une masse égale, des

particules plus petites entraîneront un recrutement cellulaire plus important (Hervé-Bazin, 2007). Les alvéoles pulmonaires du poumon profond sont constituées de 3 types cellulaires: les pneumocytes de type I, les pneumocytes de type II et les macrophages alvéolaires. Les pneumocytes de type I sont responsables des échanges gazeux avec le sang (Elgrabli, 2008). Il s'agit de grandes cellules qui recouvrent 90% de la surface alvéolaire bien que leur nombre soit équivalent à celui des pneumocytes de type II (Elgrabli, 2008). Les pneumocytes de type II sécrètent le surfactant pulmonaire capable de fluidifier le mucus et de faciliter les échanges gazeux (Elgrabli, 2008). Les macrophages alvéolaires sont des cellules résidentes des poumons, présentes dans la lumière alvéolaire et qui jouent un rôle majeur dans les mécanismes de défense innée de l'hôte. Ces macrophages ont des capacités de présentation antigénique et de sécrétion de cytokines et donc un rôle important dans les processus inflammatoires pulmonaires (Kierszenbaum, 2006). Les macrophages vont phagocyter les particules insolubles. Ils vont entourer les particules, les digérer si elles le peuvent et se diriger lentement vers l'ascenseur mucociliaire pour leur élimination (Kierszenbaum, 2006). Ce processus est relativement lent et présente une demi-vie de plus de 100 jours chez l'homme (HSE 2004; Oberdörster, 2005). L'efficacité de la phagocytose est par contre fortement dépendante de la forme et de la grosseur de la particule. Plusieurs études semblent démontrer que la phagocytose est très efficace pour les particules fines de 1 à 3  $\mu\text{m}$  comparativement aux particules plus fines non agglomérées déposées dans les alvéoles (Tabata et Ikada, 1988; Green *et al.*, 1998; Oberdörster, 2005). Le fait que les poussières plus fines soient moins phagocytées peut entraîner une importante accumulation dans l'alvéole pulmonaire et une probabilité plus grande d'être endocytées par les cellules épithéliales et transférées vers l'interstitium (Oberdörster *et al.*, 1992 et 2000; Kreyling et Scheuch, 2000). La biopersistance de ces particules dans le poumon est donc substantiellement accrue. Une fois l'épithélium franchi, une fraction des particules pourra rejoindre les nodules lymphatiques par transport interstitiel (Oberdörster, 2005). Les macrophages chargés de particules peuvent quitter la région pulmonaire selon plusieurs voies pour aboutir dans la circulation sanguine (Hervé-Bazin, 2007). D'autres mécanismes

de défense pour éliminer des substances toxiques ultrafines existent, soient le transport de ces particules par la circulation sanguine aux organes extrapulmonaires et le transport le long des axones des nerfs sensitifs vers le système nerveux central (Oberdörster, 2005). Les phénomènes de transcytose (transfert via l'épithélium vers le sang, le système lymphatique, ou accumulation cellulaire) constituent le mode dominant d'élimination des particules ultrafines : les particules de 1-10 nm seraient rapidement transférées vers le sang tandis que l'accumulation dans les cellules épithéliales constituerait le mécanisme préférentiel pour les particules de 10-100 nm (Hoffman *et al.*, 2003).

La dissolution locale des particules (au niveau de l'alvéole, de l'interstitium ou du système lymphatique) sera, entre autres, dépendante de la solubilité chimique du composé, mais aussi de la surface spécifique des particules. Des particules dont le rapport surface/volume est élevé seront donc plus rapidement solubilisées (Lundborg *et al.*, 1992; Harper *et al.*, 1994).

### **Chez la souris**

D'après une étude effectuée par Raabe *et al.* (1988), portant sur la déposition respiratoire d'aérosol chez la souris, il y a une augmentation du taux de déposition dans la région naso-pharynx pour les particules de 3  $\mu\text{m}$  et plus avec parallèlement une diminution du taux de déposition alvéolaire. Pour les particules de 10  $\mu\text{m}$  et plus, la déposition alvéolaire est presque nulle alors que la déposition au niveau du naso-pharynx et du larynx est importante (Raabe *et al.*, 1988). Par ailleurs, à partir des données de Raabe *et al.* (1988) et de Thomas *et al.* (2008), le Tableau 1 : Déposition respiratoire chez la souris détaille le pourcentage de déposition des particules inhalées au niveau du système gastrointestinal et de différentes régions du système respiratoire en fonction du MMAD (diamètre aérodynamique médian de masse). Une partie importante des particules est déposée au niveau du tractus gastrointestinal, principalement dû à la clairance mucociliaire suite à une

exposition par inhalation. (Thomas *et al.*, 2008). De façon générale, la déposition au niveau alvéolaires et des bronches augmente avec la diminution du MMAD.

Tableau 1 : Déposition respiratoire chez la souris

MMAD (µm)	Alvéoles et bronches	Trachée	Naso-pharynx et larynx	Système gastrointestinal	Lignée souris	auteurs
1,09	26,4%	0,3%	8,6%	64,7%	CF1	Raabe <i>et al.</i> , 1988
1-3	8,04	0,21	0,67	89,7	Balb/c	Thomas <i>et al.</i> , 2008
9,65	0,44	0,26	74,8	24,5	CF1	Raabe <i>et al.</i> , 1988
10-15	1,4	0,64	36,5	61,5	Balb/c	Thomas <i>et al.</i> , 2008

### 1.4.2 Distribution

Les macrophages chargés de particules peuvent quitter la région pulmonaire selon plusieurs voies, le transport mucociliaire trachéobronchique, la migration dans l'interstitium et, de là, vers le système lymphatique pour aboutir dans les ganglions locorégionaux et finalement la circulation systémique, ou un passage vers la circulation sanguine en traversant la barrière alvéolo-capillaire (Holt, 1981; Oberdörster *et al.* 2002 et 2005). Des particules libres peuvent aussi passer le compartiment sanguin systémique après avoir été endocytées par les cellules endothéliales et faire l'objet d'une exocytose dans la lumière capillaire (Oberdörster, 1988). Des particules peuvent également pénétrer l'interstitium via des processus d'endocytose par les pneumocytes de type I. Ce processus semble prendre une part importante lorsque les macrophages alvéolaires sont saturés (Oberdörster *et al.*, 1992). Les caractéristiques physico-chimiques des particules, comme la réactivité de surface, la taille et probablement la charge, modulent leur passage à travers une monocouche de cellules épithéliales et endothéliales (Afsset, 2006). Le Be absorbé est transporté à travers la circulation sanguine sur des protéines plasmatiques (pré-albumine ou

immunoglobulines) sous forme de phosphate colloïdal ou fixé sur la membrane de lymphocytes (INRS, 2006). Lors d'exposition par inhalation, le Be et ses composés ont tendance à s'accumuler principalement dans les poumons. À court terme, le Be s'accumule dans le foie, surtout dans le cas d'une exposition importante. À long terme, on le retrouve principalement dans les ganglions lymphatiques et les os. Ces derniers constituent ainsi le site de stockage à long terme du Be (Sanders *et al.*, 1975; Finch *et al.*, 1990). Le Be se retrouve aussi dans le foie, les reins, la rate, les ganglions mésentériques et autres tissus mous. Le Be a aussi été identifié dans le sang du cordon ombilical et le sang maternel (IRIS, 1998). Les composés insolubles s'accumulent préférentiellement dans les poumons et les os. Les composés solubles se distribuent principalement dans le foie, la rate, les reins et les ganglions lymphatiques (IRIS, 1998).

### **1.4.3 Métabolisme**

Le Be n'est pas métabolisé. Au niveau des poumons, les sels solubles de Be sont partiellement transformés en sels insolubles. L'action immunologique semble passer par la formation d'un complexe béryllium-protéine, en raison du faible poids moléculaire du Be (Reeves et Vorwald 1967). Quant au Be insoluble, une fois phagocyté par les macrophages, il peut être ionisé par des enzymes tels que les myéloperoxydases (Leonard et Lauwerys, 1987; Landsdown, 1995). Il est à noter que les mécanismes entrant dans le métabolisme et le transport du Be à travers la membrane cellulaire ne sont pas encore bien élucidés (Marchand-Adam et Valeyre, 2005). Il n'existe pas d'information sur le fait que le Be puisse subir un effet de premier passage qui consiste en la métabolisation et l'élimination d'une fraction de ce métal lors de son premier passage dans le foie après ingestion (Marchand-Adam et Valeyre, 2005).

### **1.4.4 Excrétion**

L'excrétion de la fraction absorbée est lente et se fait essentiellement par la voie urinaire (IRIS, 1998). Pour les composés qui ne sont pas absorbés dans l'organisme,



l'excrétion se fait principalement par les fèces suite à une exposition orale ou par clairance mucociliaire suite à une exposition par inhalation. L'excrétion dépend aussi de la solubilité des composés de Be ingérés. Le Be a aussi été identifié dans le lait maternel et le colostrum (Krachler *et al.*, 1999). La mobilisation et l'excrétion peuvent continuer pendant plusieurs années et persister très longtemps après l'arrêt de l'exposition (IRIS, 1998). Environ 90 % de la dose absorbée par inhalation est éliminée par les urines jusqu'à 10 ans après l'arrêt de l'exposition (Truchon, 2004).

### 1.4.5 Demi-vie

En ce qui concerne la clairance du Be en cas d'exposition par inhalation, des études mentionnent que la clairance semble s'effectuer de façon biphasique: une phase rapide et une deuxième phase lente. La première est sans doute due à la phagocytose par les macrophages se retrouvant dans le système broncho-alvéolaire (Van Cleave et Kaylor, 1955; Hart *et al.*, 1984). La demi-vie pendant cette phase est de l'ordre de 1 à 60 jours, au cours de laquelle 30 à 50 % du Be inhalé est éliminé (Sanders *et al.*, 1975; Rhoads et Sanders, 1985). La deuxième phase a une demi-vie d'environ 0,6 à 2,3 ans. Cette fraction représente la migration interstitielle et la dissolution lente des particules relativement insolubles au niveau alvéolaire qui ne sont pas encapsulées dans les granulomes (Rhoads et Sanders, 1985; Hervé-Bazin, 2007). La demi-vie diffère également selon la solubilité du Be. Ainsi, les composés solubles auraient une demi-vie de l'ordre de quelques semaines voire quelques mois, tandis qu'elle varierait de quelques mois à quelques années pour les composés peu ou pas solubles (IRIS, 1998). Le chlorure de béryllium ( $\text{BeCl}_2$ ), un composé soluble, présenterait une demi-vie pulmonaire de l'ordre de 20 jours, et plus d'un tiers de la quantité inhalée passerait dans la circulation systémique (INRS, 2007). Les composés insolubles, tels que le Be métallique (Be) et les composés très peu solubles tels que le BeO et le BeAl, seraient retenus beaucoup plus longtemps au niveau pulmonaire avec une demi-vie de l'ordre de plusieurs mois. La demi-vie du Be est inversement proportionnelle à la dose absorbée (Truchon, 2004).

## 1.5 Mécanismes d'action du béryllium et pathologies

Le Be est un métal reconnu pour induire une réponse immunitaire et des inflammations chez les gens qui sont exposés à ce métal. Trois principaux effets sont associés à l'exposition au Be: la sensibilisation au Be, la béryllose chronique et la béryllose aiguë (Sawyer *et al.*, 2002; Kriebel *et al.*, 1988a).

### 1.5.1 La béryllose aiguë

La béryllose aiguë traduit l'effet irritant direct du Be sur les muqueuses, dont celles de l'appareil respiratoire et de la peau (Poulin et Ricard, 2002). Elle s'observe lors d'expositions à des concentrations élevées de courtes durées. Au niveau respiratoire, il s'agit d'une pneumonite chimique qui, de nos jours, n'est plus observée en dehors des situations accidentelles (Rosenberg, 2005). La béryllose aiguë est souvent complètement réversible (Poulin et Ricard, 2002). La béryllose aiguë se manifeste par des problèmes respiratoires rapidement évolutifs. Elle se diagnostique au moyen de la radiographie pulmonaire, et par l'évaluation des échanges gazeux pulmonaires, chez des travailleurs exposés à des concentrations élevées de Be (Rosenberg, 2005). Aucun cas de béryllose aiguë n'aurait été décrit chez des travailleurs dont l'exposition serait demeurée inférieure à  $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (Poulin et Ricard, 2002).

Lors d'expositions à de fortes concentrations de Be, une réponse inflammatoire précoce non spécifique peut survenir (Haley *et al.*, 1990). La réaction inflammatoire se fait selon les étapes suivantes (Kriebel *et al.*, 1988a):

1-La phagocytose par les macrophages entraîne une altération des fonctions macrophagiques. Certaines cellules seront lysées, d'autres seront endommagées.

2-Les macrophages altérés vont déverser des enzymes lysosomiaux, des facteurs chimiotactiques et des intermédiaires chimiques qui stimuleront le recrutement de nouveaux macrophages et des polynucléaires neutrophiles.

3-Les médiateurs de l'inflammation qui seront libérés par les macrophages et les neutrophiles pourront aussi augmenter la perméabilité capillaire, ce qui causera un œdème pulmonaire.

### **1.5.2 La sensibilisation (BeS)**

L'exposition au Be peut mener à une réaction immunitaire de type cellulaire, la sensibilisation au béryllium (BeS), qui précéderait le développement de la béryllose chronique dans les poumons (Pott *et al.*, 2005; Newman *et al.*, 2005; Fournier *et al.*, 2008). La BeS est une réponse allergique se traduisant par une prolifération lymphocytaire des cellules TCD4+, induite par le Be, qui mémorisent l'information. Ces cellules sont alors sensibilisées et lors d'expositions ultérieures, une fois qu'elles ont reconnu les particules de Be, vont proliférer en réponse à la présence de ces corps étrangers. Les lymphocytes s'accumuleront alors autour des particules de Be logées dans les poumons, se multiplieront et produiront des granulomes, entraînant une réaction inflammatoire (Falcy, 2003). Des travailleurs qui auront été sensibilisés, certains développeront une béryllose chronique. La BeS, caractérisée par la prolifération des lymphocytes sanguins qui réagissent à une exposition au Be, est plus ou moins longue et asymptomatique (Rosenberg, 2005). Cette sensibilisation peut être mise en évidence par un test de prolifération lymphocytaire dans le sang (BeLPT). Le même test de prolifération peut être effectué sur le liquide prélevé par lavage bronchique (BAL-BeLPT) (Poulin et Ricard, 2002). La sensibilisation témoigne, notamment, d'une susceptibilité accrue de l'individu à développer la BC. Dans certains cas, les symptômes et les signes caractéristiques de la béryllose sont présents alors que les tests de sensibilisation demeurent négatifs (Poulin et Ricard, 2002). Le mécanisme de passage de la sensibilisation à la béryllose chronique n'est pas encore bien compris. Ainsi, des

travailleurs en santé exposés au Be, 1-20% seront sensibilisés et 1-10% des sensibilisés développeront la béryllose chronique (Fournier *et al.*, 2008).

### 1.5.3 La béryllose chronique (BC)

La BC est une granulomatose systémique non caséuse avec atteinte pulmonaire largement dominante (Kriebel *et al.*, 1988a). Cette atteinte est associée à une alvéolite lymphocytaire et est caractérisée par la formation de granulomes constitués de cellules épithélioïdes géantes entourées de lymphocytes, plasmocytes, fibroblastes (Saltini *et al.*, 1989; Newman *et al.*, 1996). La BC peut évoluer, même après l'arrêt de l'exposition au Be, vers la fibrose pulmonaire et l'insuffisance respiratoire chronique plus ou moins rapidement ou peut se stabiliser (Hardy, 1980).

Le Be agit comme un antigène de classe II et stimulerait la migration et la prolifération des monocytes et des lymphocytes du sang circulant vers le poumon et accélérerait la maturation des monocytes vers un phénotype macrophage mature et présentateur d'antigène (Hanifin *et al.*, 1970 ; Amicosante et Fontenot, 2006; Saltini *et al.*, 1989). Les particules de Be, une fois dans le poumon, sont identifiées par les macrophages comme des corps étrangers et sont phagocytées par ces derniers. Les macrophages, ne pouvant métaboliser le Be, le présentent à leur surface. Le Be phagocyté est cytotoxique pour le macrophage et favorise son apoptose (Finch *et al.*, 1998a ; Sawyer *et al.*, 2000). Le Be est de nouveau libéré suite à la mort du macrophage puis recapté par d'autres macrophages (Sawyer *et al.*, 2000). Le macrophage qui phagocytera le Be le présentera aux lymphocytes. À la suite de l'interaction entre le récepteur HLA du macrophage, le Be et le récepteur du lymphocyte, ce sont des lymphocytes TCD4+ mémoires qui prolifèrent et s'accumulent en présence de Be (Saltini *et al.*, 1989 ; Fontenot *et al.*, 2002). Cette interaction déclenche la différenciation du lymphocyte T en CD4 effecteur, au profil cytokinique orienté vers une réponse immunitaire de type Th1, amenant ainsi une diminution de l'expression des lymphocytes T CD28 (Tinkle *et al.*, 1997 ; Fontenot *et al.*,

2002 ; Amicosante et Fontenot, 2006). Cette réponse immunitaire entraîne également la sécrétion des cytokines IL-2 (interleukine 2) et IFN $\gamma$  (interféron  $\gamma$ ). L'IL-2 favorise la prolifération lymphocytaire et la stimulation des macrophages (Tinkle *et al.*, 1997; Maier *et al.*, 2001). L'IFN $\gamma$  intervient en co-stimulation avec la TNF $\alpha$  (facteur nécrosant des tumeurs), cytokine produite par le macrophage, sans doute comme initiateur de la libération d'autres cytokines ainsi que pour recruter des cellules au site inflammatoire (Semenzato *et al.*, 2000). Les différentes cytokines inflammatoires favorisent la libération de facteurs de croissance qui vont activer les autres cellules de l'inflammation et les fibroblastes (Marchand-Adam *et al.*, 2005).

Ces réactions entraînent une réponse inflammatoire généralisée ce qui explique les sueurs nocturnes, la fièvre et la fatigue. Les lymphocytes et d'autres macrophages infiltrent le site de dépôt du Be et poursuivent leur prolifération. Les fibroblastes se multiplient et la fibrose pulmonaire s'installe, aboutissant ainsi à la formation des granulomes. Ce processus entraîne un épaissement interstitiel au niveau des alvéoles, ce qui entraîne une perturbation des échanges gazeux et une diminution de l'élasticité pulmonaire, dès lors le patient ressent de la dyspnée au moindre effort (Poulin et Ricard, 2004; Brousseau *et al.*, 2006). La BC se manifeste d'abord par des signes généraux comme l'anorexie s'accompagnant d'une perte de poids. Par la suite surviennent les signes pulmonaires caractérisés par une toux persistante, une dyspnée à l'effort qui avec le temps se manifeste même au repos et une cyanose avec un retentissement cardiaque secondaire désigné sous le nom de cœur pulmonaire chronique (Poulin et Ricard, 2004). La BC est une maladie très grave ayant un taux de mortalité variant de 2,5 à 38 % selon les études (Poulin et Ricard, 2004). La cause habituelle de la mort est l'insuffisance respiratoire. Le décès survient dans des délais variables pouvant atteindre plusieurs dizaines d'années (Jones William, 1996).

### 1.5.4 Le cancer

Plusieurs études animales réalisées avec le Be chez différentes espèces animales et par différentes voies d'administration ont démontré ses propriétés cancérigènes. Effectivement, suite à la plupart des études par inhalation, ou par instillation intratrachéale le cancer est apparu au niveau des poumons (Nickell-Brady *et al.*, 1994; Reeves, 1969; Reeves et Vorwald, 1967; Vorwald, 1968; Wagner *et al.*, 1969). Aucun excès de cancer dans d'autres organes que le poumon n'a été démontré (Poulin et Ricard, 2004). Plusieurs études épidémiologiques effectuées sur des travailleurs exposés au Be ont également mis en évidence le risque de cancer relié au Be (Steenland et Ward, 1991; Sarraci, 1983; Infante *et al.*, 1980; Sanderson *et al.*, 2001).

### 1.5.5 Le diagnostic

Le diagnostic de la béryllose chronique se fonde sur les critères établis par le US Beryllium Case Registry (Poulin et Ricard, 2004). Il s'agit de signes d'exposition importante au Be, d'anomalies notées dans les radiographies thoraciques, résultats des explorations fonctionnelles respiratoires et présence de Be dans des tissus pulmonaires et autres. Le diagnostic précoce est possible par le BeLPT. Les résultats de deux tests doivent être positifs pour qu'on puisse considérer qu'un travailleur est sensibilisé au Be (Poulin et Ricard, 2004). Selon l'avis du comité des maladies pulmonaires professionnelles du Québec (CMPP), les travailleurs sensibilisés ne devront pas être exposés à une concentration environnementale de plus de  $0,01 \mu\text{g}/\text{m}^3$  de Be. Au Québec, pour ne pas imposer inutilement à trop de patients une démarche diagnostique très invasive, qui n'est pas sans risque, le CMPP propose de reconnaître un stade sousclinique de BC chez le travailleur asymptomatique qui présente un résultat positif au BAL-BeLPT à la suite de deux BeLPT sanguins positifs. La reconnaissance de cette maladie permet d'attribuer au travailleur des limitations fonctionnelles qui se résument à l'exigence qu'il ne soit plus du tout exposé au Be (Poulin et Ricard, 2004).

### 1.5.6 Les traitements

Le traitement de la béryllose aiguë comprend l'arrêt de l'exposition, le repos au lit, et l'administration d'oxygène et de corticostéroïdes pour prévenir l'inflammation. La BC n'est traitée que lorsque les symptômes apparaissent et que les résultats des tests de la fonction respiratoire et les échanges gazeux se détériorent (Poulin et Ricard, 2004). Le traitement vise à ralentir l'évolution des signes et symptômes, et non la guérison. Le seul traitement connu de la forme chronique de la maladie est celui aux corticostéroïdes. Habituellement, il doit se poursuivre toute la vie durant. Les patients dont on a interrompu le traitement ont présenté des signes de détérioration de leur état. L'arrêt de l'exposition au Be du travailleur sensibilisé est un geste médical prudent et représente la seule intervention susceptible de prévenir l'apparition ou l'aggravation de la maladie (Poulin et Ricard, 2004). Cependant, la BC a déjà été diagnostiquée chez des travailleurs sensibilisés bien des années après la fin de l'exposition (Plante *et al.*, 2002).

## 1.6 Normes et valeurs de référence

La première substance pour laquelle une norme d'air communautaire fut adoptée est le béryllium (Eisenbud, 1998). Parallèlement, la commission d'énergie atomique américaine (USAEC) déclarait une limite d'exposition occupationnelle (OEL) de  $2,0 \mu\text{g}/\text{m}^3$  en 1949 (Rouleau *et al.*, 2004). Cette valeur fut adoptée par l'*American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) en 1959 pour établir leur valeur seuil limite (TLV (*Threshold Limit Value*)) (Paustenbach *et al.*, 2001; Taylor, 2003) et par l'*Occupational Safety and Health Administration des États-Unis* (OSHA) en 1972 (Kolanz, 2001; CSST, 2008). En 2007 l'ACGIH fit une recommandation de  $0,2 \mu\text{g}/\text{m}^3$  pour le niveau d'action. Dans sa «Notice of Intended Change» datée de 2008, l'ACGIH proposait d'abaisser cette norme à  $0,05 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . En 2009, l'ACGIH a en effet abaissé sa norme d'exposition (TLV-TWA) aux particules inhalables ( $<100\mu\text{m}$ ) à  $0,05 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (Tableau 2)

(ACGIH, 2009). En Australie et dans la plupart des pays européens, dont la France, la valeur limite d'exposition est de  $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$  pour les particules inhalables (CSST, 2008). L'ACGIH a aussi adopté en 2009 la classification de cancérigène A1 pour le Be (ACGIH, 2009). Selon l'Environmental Protection Agency des États-Unis, le Be est classé B1; cancérigène probable chez l'humain (US EPA, 1998).

Au Québec, le Règlement sur la santé et la sécurité du travail édicte les normes d'exposition en milieu de travail pour plusieurs substances. La valeur d'exposition moyenne pondérée (VEMP) a été récemment abaissée de  $2,0 \mu\text{g}/\text{m}^3$  à  $0,15 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (Tableau 2) (Gazette officielle du Québec, 2006) pour les particules inhalables. Le niveau d'action est de  $0,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  dans le but de mieux protéger les travailleurs. Le dépassement de ce niveau d'action entraîne la mise en place de mesures de réduction de l'exposition et de mesures de protection pour les travailleurs telle que le port d'un appareil de protection respiratoire et de vêtements de protection (CSST, 2008). Cette norme a été abaissée puisque plusieurs études rapportent que même exposé à des niveaux inférieurs de  $2,0 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , des travailleurs pouvaient développer des problèmes de santé (Eisenbud, 1998). De plus, une étude publiée en 2001 notait que l'on avait trouvé des cas de BC chez des travailleurs qui n'avaient pas été exposés à des concentrations de plus de  $0,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (Stange *et al.*, 2001). Les résultats d'une étude s'échelonnant sur 4 ans ont démontré que les travailleurs soumis à des niveaux de béryllium supérieurs à  $0,01 \mu\text{g}/\text{m}^3$  avaient des valeurs de BeLPT beaucoup plus élevées que les travailleurs exposés à des niveaux inférieurs à cette concentration (Yoshida *et al.*, 1997). Au Québec, le Règlement sur la santé et la sécurité du travail classe le Be comme un cancérigène soupçonné chez l'humain (classe C2). Le centre international de recherche sur le cancer a classé le Be comme cancérigène chez l'humain (Groupe 1) (CIRC, 1993).

Le tableau 2 présente une synthèse des normes et des valeurs de référence d'exposition par inhalation pour le Be en milieu de travail.



Tableau 2 : Normes et valeurs de référence d'exposition par inhalation en milieu de travail

Organisme	Limites d'exposition
Gouvernement du Québec (Règlement sur la santé et la sécurité du travail du Québec, 2007)	VEMP <sup>1</sup> : 0,15 µg/m <sup>3</sup> Notations: C2 <sup>2</sup> , RP <sup>3</sup> , EM <sup>4</sup>
American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH 2009)	TLV <sup>5</sup> -TWA <sup>6</sup> : 0,05 µg/m <sup>3</sup> Notation: A1 <sup>7</sup>
Occupational Safety and Health Administration des États-Unis (US OSHA 2005)	PEL <sup>8</sup> -TWA: 2 µg/m <sup>3</sup> Plafond <sup>9</sup> : 5 µg/m <sup>3</sup> Pic <sup>10</sup> : 25 µg/m <sup>3</sup> (30 min)
National Institute of Occupational Safety And Health des États-Unis (US NIOSH 2005)	REL <sup>11</sup> : 0,5 µg/m <sup>3</sup> Cancérogène occupationnel potentiel

<sup>1</sup> VEMP : Valeur d'exposition moyenne pondérée : la concentration moyenne, pondérée pour une période de 8 heures par jour, en fonction d'une semaine de 40 heures, d'une substance chimique (sous forme de gaz, poussières, fumées, vapeurs ou brouillards) présente dans l'air au niveau de la zone respiratoire du travailleur.

<sup>2</sup> C2 : un effet cancérigène soupçonné chez l'humain.

<sup>3</sup> RP : une substance dont la recirculation est prohibée conformément à l'article 108.

<sup>4</sup> EM : une substance dont l'exposition doit être réduite au minimum conformément à l'article 42.

<sup>5</sup> TLV: Threshold Limit Value / Valeur seuil.

<sup>6</sup> TWA : 8-hour Time-Weighted Average / Valeur moyenne pondérée sur 8 heures.

<sup>7</sup> A1 : Cancérogène confirmé chez l'humain.

<sup>8</sup> PEL : Permissible Exposure Limit / Limite d'exposition permise.

<sup>9</sup> Plafond: Acceptable ceiling concentration / Concentration plafond acceptable.

<sup>10</sup> Pic : Acceptable maximum peak above the acceptable ceiling concentration for an 8-hr shift (maximum duration : 30 minutes) / Maximum acceptable pendant une période de 30 minutes au-dessus de la concentration plafond acceptable pour une période de 8 heures.

<sup>11</sup> REL : Recommended Exposure Limit / Limite d'exposition recommandée.

## 1.7 Facteurs de risques

Plusieurs facteurs peuvent influencer la probabilité que les travailleurs développent une pathologie attribuable au Be. Parmi ces facteurs il y a la taille des particules, les formes chimiques de béryllium, la prédisposition génétique, la nature de travail relié à des procédés industriels différents, la solubilité des particules, la concentration médiane de Be dans l'air ainsi que la durée et les voies d'exposition (Kolanz, 2001; Stefaniak *et al.*, 2007; Henneberger *et al.*, 2001; Kreiss *et al.*, 1996; Paustenbach *et al.*, 2001; Maier *et al.*, 2003; Kent *et al.*, 2001).

### 1.7.1 La taille des particules

La taille des particules semble jouer un rôle majeur au niveau de la toxicité du Be en lien avec la réponse immunitaire cellulaire et la formation de granulomes non-caséux (Stefaniak *et al.*, 2005). La taille des particules conditionne le site de déposition pulmonaire, l'efficacité de la phagocytose et de la clairance pulmonaire jouant ainsi sur la bio-persistance des particules, les processus de translocation et les interactions avec les protéines du milieu biologique (Hervé-Bazin, 2007). Effectivement, plusieurs études montrent que, lorsque la taille des particules diminue, la toxicité des particules inhalées tend à croître et la surface totale augmente (Maynard et Kuempel, 2005, Oberdorster *et al.*, 2005). La pénétration et le dépôt au sein des voies respiratoires sont traditionnellement décrits au moyen du diamètre aérodynamique (MMAD), diamètre équivalent de la particule sphérique de masse volumique égale à  $1\text{g/cm}^3$  ayant la même vitesse limite de chute dans l'air calme que la particule considérée (Hervé-Bazin, 2007). Représentatif du comportement aérodynamique de la particule, ce diamètre est souvent utilisé pour caractériser les particules dont les diamètres sont supérieurs à environ  $0,3\ \mu\text{m}$ , aux conditions atmosphériques normales de température et de pression (Hervé-Bazin, 2007). Parce que la BC est une granulomatose pulmonaire, il a été proposé qu'elle serait induite par des particules inférieures à  $10\ \mu\text{m}$  de diamètre, seules aptes à se déposer dans la région

trachéobronchique (Kolanz, 2001). Au niveau du nez et du pharynx, du fait de leur conformation et de leur rôle de réchauffement et d'humification, presque toutes les particules de diamètres aérodynamiques supérieurs à 7  $\mu\text{m}$  sont piégées (Hervé-Bazin, 2007). De plus, les particules de Be ayant un MMAD inférieur à 3,5  $\mu\text{m}$  augmentent la prévalence de BC et de BeS comparativement aux particules plus grosses (Kent *et al.*, 2001).

### **1.7.1.1 La surface spécifique et le nombre de particules**

Plus la taille diminue, plus le rapport surface/volume devient grand et plus les propriétés de surface finissent par devenir plus importantes que la masse en jeu (Hervé-Bazin, 2007). La réduction de la taille entraîne une augmentation de la surface spécifique et du nombre de groupes réactifs, avec accroissement des effets à dose équivalente. En d'autres termes, plus la particule est petite, plus sa surface est grande par rapport à sa masse, et plus elle devient réactive en regard des tissus avec lesquels elle entre en contact. (Oberdörster *et al.*, 2005).

### **1.7.2 Les formes chimiques de béryllium**

Bien que tous les composés de Be puissent être associés au développement de la BC, des études soulèvent l'hypothèse que le BeO présenterait un plus grand risque de BC chez les travailleurs (Falcy, 2003). De plus, des études animales ont démontré une clairance pulmonaire très lente pour le BeO (Sanders *et al.*, 1975; Rhoads et Sanders, 1985). Des cas de BC ont également été diagnostiqués dans une usine où était manipulé uniquement l'alliage 2% béryllium-cuivre (Balkissoon et Newman, 1999). Aussi d'autres études affirment que le degré de toxicité du Be métal et de BeO est similaire à celui de l'alliage Be-Cu (Hoover *et al.*, 1989). Deubner *et al.* (2001) ont démontré que les différentes industries et postes de travail (moulage, affinage, sablage, etc.) induisent la production de poussières variables au niveau de la spéciation chimique et des particularités physiques des

particules. Ces auteurs notent également que le développement d'affections est relié à des types spécifiques de composés de Be. Les sels, solubles, mèneraient vers une sensibilisation des individus et les oxydes, insolubles, seraient plutôt responsables du développement de la CBD (Deubner *et al.*, 2001).

### 1.7.3 La prédisposition génétique

Bien que des expositions à de fortes concentrations augmentent l'incidence des problèmes de santé, des polymorphismes génétiques prédisposant semblent jouer un rôle important dans la pathogénie en cas d'exposition modérée (Marchand-Adam et Valeyre, 2005). La prédisposition génétique concerne les sujets porteurs, dans l'une des régions hypervariables du complexe majeur d'histocompatibilité (la région D du CMH II) d'un glutamate en position 69 sur le HLA DP  $\beta$ 1 du macrophage présentateur d'antigène (Newman *et al.*, 1994). La présence du glutamate en position 69, au lieu de la lysine, modifie la conformation et la charge électrique du site de présentation de l'antigène créant une zone chargée négativement ce qui augmenterait l'affinité du cation béryllium ( $\text{Be}^{2+}$ ) et perturberait l'interaction avec le lymphocyte (Amicosante *et al.*, 2001; Arroyo *et al.*, 1995). Un glutamate en position 69 sur le HLA DP (HLA DP  $\beta$ Glu69) a été trouvé exprimé chez 80 à 97 % des malades contre 30 à 35 % chez les sujets exposés non atteints et dans la population en général (Richeldi *et al.*, 1997). Des liens moins forts avec d'autres polymorphismes sur le HLA DP, ou sur d'autres molécules du CMH de classe II ont aussi été observés et d'autres gènes que ceux du CMH II prédisposent aussi à l'affection comme un polymorphisme dans le promoteur du gène du TNF- $\alpha$  (Facteur nécrosant des tumeurs) (Marchand-Adam et Valeyre, 2005).

De récentes études ont montré une prédisposition des femmes puisqu'elles représentaient 20 % des cas de béryllose chronique alors qu'elles ne représentaient que 10 % des travailleurs exposés (Maier *et al.*, 2003).

#### **1.7.4 La nature du travail**

La nature de la tâche et les moyens de protection des travailleurs sont également des facteurs pouvant influencer l'exposition et la survenue éventuelle de la BeS ou de la BC. Ainsi, les postes de travail et les techniques utilisées pour accomplir différentes tâches seraient importants dans la pathogenèse (CSST, 2008). C'est ainsi que les machinistes présentent un risque d'exposition plus élevé que les autres travailleurs dans les usines utilisant le Be car les procédés de concassage, de sciage et de polissage, génèrent des poussières et des aérosols de petite taille (Kreiss *et al.*, 1993 ; Strange *et al.*, 2001). Certains travaux ont également démontré que dans les fonderies, les concentrations de Be peuvent être élevées, avec des valeurs moyennes d'environ  $0,87 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (Johnson *et al.*, 2001). Les travailleurs affectés à l'extraction et à la production du Be et les travailleurs d'usinage des pièces de Be ou d'alliages contenant du Be sont parmi les plus exposés aujourd'hui. Dans certaines fonderies du Québec, plusieurs travailleurs ont été exposés pendant plusieurs années, sans protection, à des niveaux largement supérieurs à la norme lors de la récupération de métaux contenant du Be (CSST, 2004). De nombreuses études ont montré que la sensibilisation et la BC peuvent se produire dans des industries où les niveaux d'exposition sont nettement inférieurs à  $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$  pendant 8 heures, qui était alors la norme jusqu'en 2006 au Québec (Cullen *et al.*, 1987; Kreiss *et al.*, 1996; Kreiss *et al.*, 1997).

#### **1.7.5 La solubilité**

La solubilité joue un rôle important dans la clairance et le transport transmembranaire des particules de Be. En effet, plus la solubilité est importante, plus le transfert vers le sang sera rapide (Oberdörster *et al.*, 2005). La durabilité d'un groupe de particules sera plus élevée si elles sont insolubles et ne peuvent être dégradées ou éliminées par le poumon. On assistera alors à une accumulation locale importante s'il y a une exposition soutenue (Ostiguy *et al.*, 2008). En fait, plus une particule qui atteint les alvéoles est hydrosoluble, plus elle se dissout dans les muqueuses qui tapissent les alvéoles (Hervé-

Bazin, 2007). Lorsqu'il y a dissolution dans le mucus, il y a une plus grande possibilité de phagocytose ou de contact avec les pneumocytes de type I et II pour favoriser la transcytose (translocation épithéliale dans l'interstitium, ce qui permet d'atteindre le système sanguin directement ou par les lymphatiques et conduit à la distribution des particules) (Afsset, 2006). Les molécules insolubles dans le mucus auront un temps de résidence alvéolaire potentiellement très long contrairement aux particules solubles dans l'eau qui peuvent être phagocytées (selon la taille) ou traverser l'épithélium alvéolaire par transcytose (Oberdörster *et al.*, 2007).

### **1.7.6 La dose et la durée d'exposition**

Le Be est souvent associé à des maladies pulmonaires en fonction des niveaux d'exposition. Une forte exposition (excédant  $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) peut causer de graves maladies pulmonaires. Effectivement, la béryllose aiguë, pouvant se manifester par une pneumonite chimique, a été observée suite à des expositions à de très fortes concentrations, ce qui n'est plus le cas de nos jours (Labrèche *et al.*, 2006). De nombreuses études ont montré que la sensibilisation et la béryllose chronique peuvent se produire dans des industries où les niveaux d'exposition sont nettement inférieurs à  $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (Kreiss *et al.*, 1997; OSHA, 2005; Schuler *et al.*, 2005). Une exposition chronique peut donc entraîner des désordres pulmonaires chroniques allant de la sensibilisation à la béryllose chronique (Fournier *et al.*, 2008). Le nombre de particules influence la biodisponibilité et la gravité des lésions pulmonaires augmente avec le temps de résidence et la charge pulmonaire de Be (Haley *et al.*, 1990). Toutefois, les relations entre les doses et les réponses sont difficiles à établir à cause notamment de la très grande variabilité des niveaux retrouvés dans les environnements échantillonnés, variant de  $<0,002$  à  $10 \text{ mg}/\text{m}^3$  (ATSDR, 2002). De plus, la quantité de Be inhalé demeurant au niveau pulmonaire après l'exposition est fonction de la quantité déposée et de la clairance, lesquelles dépendent de la dose, de la taille et de la solubilité des particules (HSE, 1994). Une étude faite sur 30 cas de BC a montré que la latence moyenne était de 10,2 ans tandis qu'une autre étude portant sur le registre américain

de la béryllose a montré que 55% de 76 cas ont eu une latence supérieure à 10 ans, après la première exposition (Solvignon, 1995; Hasan et Kazemi, 1974). D'autres études ont trouvé une moyenne de latence comprise entre 11-20 ans parmi les cas rapportés dans le Beryllium Case Registry (BCR) (Eisenbud et Lisson, 1983; Maier, 2001).

## **2. Chapitre deuxième: Problématique et objectifs de recherche**

### **2.1 Problématique de recherche**

Au cours des dernières années, plusieurs auteurs ont remis en cause le niveau de protection accordé aux travailleurs par la valeur seuil reconnue pour le béryllium (VEMP Québec, TLV (TWA) ACGIH). Un ensemble de cas récents de travailleurs québécois sensibilisés ou atteints de BC interpelle la communauté scientifique pour mieux comprendre la problématique sous-jacente à l'exposition du Be. Il n'existe pas actuellement d'études toxicologiques qui fournissent suffisamment d'informations pour contribuer de façon tangible à la réévaluation de la norme actuelle. Tout au plus, la prévalence des effets associés au Be suggère que les risques sont en fonction de sa spéciation. Depuis 1998, plusieurs demandes d'indemnisation ont été soumises à la CSST en lien avec la BC. À la fin de l'année 2000, une première analyse de documents scientifiques a permis d'établir que la situation était problématique au Québec (CSST, 2004).

De plus, plusieurs facteurs de risques sont impliqués au niveau de la toxicité du Be, tant pour la réaction de sensibilisation au Be que pour le développement de la BC (Kolan, 2001). La dose à laquelle les travailleurs sont exposés, la durée de cette exposition, la susceptibilité génétique ainsi que la forme chimique et la taille des particules du Be sont des facteurs de risques corrélant avec les atteintes pulmonaires (Kolan, 2001; Henneberger *et al.*, 2001; Maier *et al.*, 2003, Stefaniak *et al.*, 2007; Kent *et al.*, 2001). La forme chimique et la taille des particules jouent un rôle important au niveau de la déposition pulmonaire, ce qui peut influencer la formation de granulomes non-caséux et la réponse cellulaire immunitaire (Stefaniak *et al.*, 2005, Rouleau *et al.*, 2005). La rétention du Be



dans le poumon, dû entre autres à son caractère soluble ou non, peut exercer un rôle important dans le développement et la persistance d'inflammation granulomateuse (Salehi *et al.*, 2008).

## 2.2 Objectifs de recherche

Dans cette étude nous avons vérifié l'hypothèse que la forme chimique et la taille des particules du Be jouent un rôle majeur au niveau de la toxicité et de l'apparition d'effets spécifiques à une exposition au Be. Les effets spécifiques se traduisent, entre autres, par la formation de granulomes inflammatoires pulmonaire, par la prolifération de lymphocytes TCD4+ et la production de cytokines de types Th1 (Amicosante *et al.*, 2006, Fontenot *et al.*, 2002).

L'objectif général de cette recherche est d'évaluer et de comparer la toxicité du Be en fonction des principales formes chimiques utilisées en industries et de la taille particulaire, et ce, afin de contribuer aux connaissances toxicologiques nécessaires et utiles pour la redéfinition éventuelle de la VEMP actuelle. Considérant que la forme chimique de Be et la taille particulaire semblent être des variables clefs pour une telle redéfinition, les objectifs spécifiques de la recherche se retrouvent au niveau des 4 manuscrits présentés au chapitre 3:

- 1- Manuscrit 1: *Immunotoxicity of three chemical forms of beryllium following inhalation exposure to different particle sizes.* L'objectif de cette recherche était de décrire et de comparer l'immunotoxicité de trois formes chimiques de Be (Be-F, BeO-F, BeAl-F) utilisées régulièrement au sein d'industries.
- 2- Manuscrit 2: *Urinary levels, tissue concentrations and lung inflammation after nose-only exposure to three different chemical forms of beryllium.* L'objectif de cette étude était d'évaluer la toxicité et la cinétique (concentrations tissulaires, sanguine et urinaire) de trois différentes formes chimiques de Be (Be-F, BeO-F, BeAl-F).
- 3- Manuscrit 3: *Methodology for controlling Beryllium exposure in laboratory using*

*Beryllium powder.* Considérant le potentiel toxique du Be, l'objectif de cette étude était de mettre en place et d'évaluer des mesures de surveillance de l'exposition, de nettoyage et de sécurité dans le laboratoire d'inhalation afin de vérifier et d'atténuer au minimum les niveaux d'exposition du personnel et de contamination du laboratoire.

- 4- Manuscrit 4: *Immunological responses in C3H/HeJ mice following nose-only inhalation exposure to different sizes of beryllium metal particles.* L'objectif spécifique de cette étude était de déterminer le rôle de deux tailles particulières différentes de Be métallique (Be-F et Be-T) dans le développement de maladie pulmonaire, l'activation cellulaire de lymphocytes T et dans la production de cytokines de type Th1.

Ces objectifs spécifiques reposent sur plusieurs hypothèses à savoir : 1) Les différentes formes chimiques de Be et les différentes tailles particulières du Be ne représentent pas le même risque potentiel; 2) La taille des particules, représentée par le MMAD dans cette étude, influence l'apparition des maladies pulmonaires, l'activation des cellules T ainsi que la production de cytokines de type Th1; 3) le respect de la valeur seuil de  $0,15 \mu\text{g}/\text{m}^3$  n'est pas protectrice pour toutes les formes chimiques de Be ni pour toutes les tailles particulières de Be indépendamment de leur distribution granulométrique.

De plus, la TLV de l'ACGIH ayant été récemment revue et diminuée à  $0,05 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , la VEMP de  $0,15 \mu\text{g}/\text{m}^3$  adoptée par le Québec mérite d'être évaluée sur son fondement scientifique. Parallèlement, la communauté scientifique reconnaît qu'il n'y a pas suffisamment d'informations toxicologiques et de connaissances scientifiques sur l'exposition des travailleurs pour permettre le développement d'une TLV adéquate.

### 3. Chapitre troisième: Présentation des articles

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse de doctorat sont présentés sous la forme de quatre manuscrits scientifiques. Le premier manuscrit intitulé "*Immunotoxicity of three chemical forms of beryllium following inhalation exposure to different particle sizes*" décrit les résultats obtenus suite à l'exposition oro-nasale d'un modèle animale (souris). Un total de 140 souris (35 souris/groupe (sacrifiées 1 et 3 semaines post-exposition), 4 groupes (Be-F, BeO-F, BeAl-F, contrôle)) ont été analysées pour cette étude. Seules les particules inférieures à 5 µm (F) ont été considérées pour chacune des trois formes chimiques à l'étude. Les résultats de ce manuscrit ont été présentés lors de l'évènement suivant : 3<sup>ème</sup> colloque international sur les particules de Béryllium et leur détection à Albuquerque (2008). Ce manuscrit a été soumis à la revue "Journal of Toxicology" en juillet 2009.

Le deuxième manuscrit intitulé "*Urinary levels, tissue concentrations and lung inflammation after nose-only exposure to three different chemical forms of beryllium*" évalue la toxicité et la cinétique de trois formes chimiques de Be. Un total de 120 souris (30 souris/groupe (sacrifiées 1 semaine post-exposition), 4 groupes (Be-F, BeO-F, BeAl-F, contrôle)) ont été analysées pour cette étude. Seules les particules inférieures à 5 µm (F) ont été considérées pour chacune des trois formes chimiques à l'étude. Ce manuscrit a été accepté pour publication dans la revue "Journal of Applied Toxicology" en janvier 2010.

Le troisième manuscrit intitulé "*Beryllium contamination and exposure monitoring in an inhalation laboratory setting*" porte sur la méthodologie développée dans notre laboratoire pour diminuer tout risque de contamination et d'exposition au Be. Ce papier a fait l'objet de deux présentations: À la rencontre annuelle sur la santé et la sécurité liées au Béryllium à Bethesda (2008) et au 48<sup>ème</sup> congrès annuel de la Society of Toxicology à Baltimore (2009). Ce manuscrit a été accepté (décembre 2009) pour publication dans la

revue "Toxicology and Industrial Health".

Finalemment, le quatrième manuscrit intitulé "*Immunological responses in C3H/HeJ mice following nose-only inhalation exposure to different sizes of Beryllium metal particles*" porte sur les réponses immunologiques des souris suite à une exposition oronasale au Be. Un total de 105 souris (35 souris/groupe (sacrifiées 1 et 3 semaines post-exposition), 3 groupes (Be-F, Be-T, contrôle)) ont été analysées pour cette étude. Les résultats de cet article ont été présentés à une conférence: À la 3<sup>ème</sup> conférence internationale sur les maladies reliées au Béryllium à Philadelphie (2007). Cet article a été publié dans la revue "Journal of Applied Toxicology" en novembre 2008.

# **Article premier: Immunotoxicity of three chemical forms of beryllium following inhalation exposure to different particle sizes**

Caroline Muller,<sup>1</sup> Fariba Salehi,<sup>2</sup> Bruce Mazer,<sup>2</sup> Séverine Audusseau,<sup>2</sup> Gaston Chevalier,<sup>3</sup> Ginette Truchon,<sup>4</sup> Jean Lambert,<sup>5</sup> and Joseph Zayed<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Department of Environmental and Occupational Health, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, P.O. Box 6128, Main station, Quebec, Canada, H3C 3J7.*

<sup>2</sup> *Meakins-Christie Laboratories, McGill University, Quebec, Canada.*

<sup>3</sup> *Department of Biological Sciences, University of Quebec in Montreal, Quebec, Canada.*

<sup>4</sup> *Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST), Quebec, Canada.*

<sup>5</sup> *Department of social and preventive medicine, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.*

Corresponding author

Joseph Zayed, Ph.D.

Telephone: (514) 343-5912

Fax : (514) 343-2200

**Abstract**

*Introduction.* We compared the toxicity of three chemical forms of beryllium. *Methods.* One hundred forty mice equally divided into four groups were exposed by inhalation (nose-only) during 3 consecutive weeks, 5 d/week, 6 hr/d. One group was used as a control while the three others were exposed to particles of Be metal, Be-F; Be oxide, BeO-F; Be aluminium alloy, BeAl-F). Except for the controls, the target level of exposure was 250  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . Thirty mice/group were sacrificed one week after exposure. The last five mice were sacrificed three weeks post-exposure. *Results.* BeO-F has the highest lung Be concentration with a higher IL-12 and IFN- $\gamma$ , while Be-F group has the highest lung inflammation and produces significantly more IL4, TNF- $\alpha$  and CD4<sup>+</sup> T cells although the results seem in the same range. *Conclusion.* Be and BeO seem to be the most toxic.

Keywords: Beryllium particles, chemical form, lung inflammation, T cells proliferation, cytokine secretion, nose-only inhalation

## Introduction

Beryllium (Be), a naturally occurring metal, has been utilized in aerospace, automotive, energy, defense, medical, and electronics industries for more than half a century. It is a unique material exhibiting physical and mechanical properties unmatched by any other metal [1]. The Be industry produces three primary forms of Be: beryllium alloys, beryllium metal, and beryllium oxide [2].

Workers exposed to Be particles may develop acute beryllium disease, sensitization (BeS), chronic beryllium disease (CBD) or lung cancer [3]. Numerous studies indicate sensitization may progress to CBD [4–5]. CBD is a progressive granulomatous lung disease characterized by mononuclear cell infiltration and granulomatous inflammation in the lungs [6]. The immunological reactions observed in affected individuals are Be-specific hypersensitivity responses involving CD4+ T-lymphocytes, production of T helper 1 (Th1) type cytokines and the subsequent generation of granulomatous inflammation in the lung [6–8].

Cases of workers with BeS or CBD challenge the scientific community for a better understanding of Be toxicity. In 2007, the province of Quebec reduced the TLV from 2  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  to 0.15  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  for an 8-hour time-weighted average [9] while the TLV-TWA recently adopted by the ACGIH is 0.05  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  [10] compared with the previous one of 2  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ .

Be toxicity may be related to atmospheric concentration, particle size, chemical form and duration of exposure [11–13]. Be particles of less than 3.5  $\mu\text{m}$  in diameter are more likely to induce CBD or BeS than larger particles [12]. In a previous paper, our research group focused on the immunologic effects resulting from a nose-only exposure of C3H/HeJ mice to fine particles of Be comparing to coarse particles. Our findings suggest that exposure to fine particles may induce more pronounced immunological effects [14]: higher splenocyte

proliferation, and greater levels of cytokine assays of bronchoalveolar lavage IL-12, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ .

In the present paper we describe and compare the effects of three chemical forms of beryllium particles using a murine model of inhalation exposure to different particle sizes ( $< 5\mu\text{m}$ ). This is especially relevant since there are different prevalence rates of sensitization and CBD depending on the process and chemical form of beryllium. The main objective of this study was to determine the immunotoxicity of each of the three chemical forms commonly used in the industries.



**Materials and Methods**

**Animals:** One hundred and forty (140) C3H/HeJ nine-weeks-old male mice (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). This strain, with a known mutation in TLR-4, was utilized as it would have lower early inflammatory responses and more prominent lymphocytic infiltration. This allowed us to better follow the Th1 type immune reactions that were crucial to our study, with less clearance of Be by innate immune pathways. Mice were divided into four groups of 35 each were nose-only exposed. The first group was used as a control and was exposed to HEPA-filtered air, while the three other groups were exposed to particles ( $< 5\mu\text{m}$ ) of three different Be species (Be metal, Be-F; Be oxide, BeO-F; Be aluminium alloy, BeAl-F) obtained from Brush-Wellman. Mice were housed in polycarbonate cages with stainless steel wire lids under controlled temperature and humidity, with 12:12 h day/night cycles. Animals were given NIH-07 chow *ad libitum* when they were not exposed. Ethical Committee on Animal Care of the University of Quebec in Montreal approved all the experimental procedures.

**Chemicals and reagents:** Ketamine (Vetalar, 100 mg/ml), Xylazine (AnaSed, 20 mg/ml), and Acepromazine (Ayerst, 10 mg/ml) were used as anaesthetic agents. RPMI 1640 (GIBCO, Invitrogen Life Technologies, Mississauga, Ontario, Canada) medium was supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum (HyClone, Fisher, Toronto, Ontario, Canada), 100 U/ml penicillin (Invitrogen), 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin (Invitrogen), 2 mM L-glutamine (Invitrogen), 5 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-n-2-ethanesulfonic acid

(HEPES), 50  $\mu$ M 2-mercaptoethanol, and 50  $\mu$ g/ml Sodium Pyruvate (GIBCO, Invitrogen, Mississauga, Ontario, Canada).

**Inhalation exposure:** The exposure was conducted in a metallic nose-only inhalation chamber (Model 04-1100; In-Tox Products, Albuquerque, NM) that is able to expose 48 mice simultaneously. Be aerosol was generated, with a flow rate of total 22 L air/min, by a Fluidized Bed Aerosol Generator (Model 3400, TSI Inc., St. Paul, MN). A stainless steel ASME pressure tank (Model 73, Mc Master-Carr, NJ) that allowed settling of larger Be aerosol particles was used in order to obtain particles smaller than 5  $\mu$ m diameters. Each group was exposed during 3 consecutive weeks, 5 days per week and 6 hours per day. However, for logistical reasons mainly related to the time required between tissue sampling and effect assessment, each group was divided into subgroups so that each experiment on a group lasted over seven weeks.

The target level of exposure was 250  $\mu$ g/m<sup>3</sup>. The mass median aerodynamic diameter (MMAD) was measured using a Marple Personal Cascade Impactor (Series 290) and a MOUDI (Uniform Deposit Impactor, model 100, MSP Corp., Minneapolis) once a week. These impactors were designed to determine the aerodynamic diameter between 0.5 to 22  $\mu$ m and 0.05  $\mu$ m to 10  $\mu$ m respectively. The rationale for the 250  $\mu$ g/m<sup>3</sup> concentration was provided in details in a previous paper published by our research group [14]. Briefly, this level was derived from the sole toxicological sub-chronic inhalation study focussing on

immunological effects. Stiefel *et al.* [15] observed increased activity of T cells in rats after exposure to 500  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . To derive a level of exposure for mice, we took into account the difference between animal species in terms of inhalation rate and body weight and ensured that the dose per unit of body weight was similar.

**Sacrifice:** Thirty mice in each group were sacrificed one week after the end of exposure (day 28), following intraperitoneal injection of an overdose of anaesthetic cocktail (mixture of Ketamine, Xylazine, and Acepromazine) and exsanguinated by cardiac puncture at the level of the abdominal aorta. Blood and several tissues were collected. The last five mice in each group were sacrificed three weeks after the end of exposure to only examine the effect of time on the severity of lung inflammation (histological assessment).

**Tissue collection:** After sacrifice lung, spleen, liver and kidneys were sampled, weighed and packaged for chemical analysis. Blood samples (1-2 ml) were also collected from the abdominal aorta during the exsanguinations. Samples were immediately frozen at  $-45\text{ }^\circ\text{C}$  and stored at  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  until their chemical analysis by ICP-MS according to an adapted method of described in Salehi *et al.* [14]. Briefly, tissues were digested in 6 ml of a nitric acid and perchloric acid (3:1). For BeO-R group tissues, 500  $\mu\text{L}$  of sulphuric acid were added to the 6 mL of nitric acid mixture and perchloric acid to insure a complete solubilization of the particles.

For each group (n=35), 15 lungs were used for Be analysis, 8 for BAL, 7 and 5 for histological purposes at one and three weeks after the end of exposure respectively. For the spleen, 18 were used for Be analysis and 7 for the flow cytometry analysis. Moreover, 5 were used for Beryllium lymphocyte proliferation test; not presented in this paper. For kidney, liver and blood, 30 samples of each group were used for Be analysis. Specific sample sizes may be different because of the lost of some mice during the exposure.

**Bronchoalveolar lavage (BAL):** Following euthanasia, the trachea was cannulated and 1 ml of precooled sterile phosphate-buffered saline (PBS) (GIBCO) was slowly inserted through the trachea, gently pooled and collected in a 15 ml plastic tube on ice. The PBS remained in the lung for 30s. The washing was repeated twice with the same volume of PBS. The BAL was aliquoted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until cytokine measurement.

**Cytokine measurement:** Supernatants from bronchoalveolar lavage were analyzed for IL-12, IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  using specific two-site enzyme-linked immunosorbent assays kits (ELISA) according to instructions provided by the manufacturer (BioLegend). The measurement for each condition was performed in triplicate. The lower limits of detection for IL-12, IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  were 2 pg/ml, 1 pg/ml, 1 pg/ml, 2 pg/ml, and 4 pg/ml, respectively.

**Preparation of lymphoid cell suspension from spleen:** The lymphoid cells in spleen were harvested using physical disruption. Briefly, spleens were pooled from animals and placed

in dissociation cups (Sigma, Mississauga, ON), containing 3 ml complete RPMI. Mononuclear cells were separated using physical disruption until mostly fibrous tissue remained. The collected cell suspensions were filtered through 75  $\mu$ m cell strainers in 50 ml plastic tubes and centrifuged at 1200 rpm for 10 min. The cells pellets were washed twice with 1X PBS then lysed with ACK (0.15 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10mM  $\text{KHCO}_3$ , and 0.1mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) lysing buffer to remove red blood cells. Cells were washed and counted with an automatic counter (Coulter Corporation, Miami, FL). The total cells were adjusted with complete medium to  $2.5 \times 10^6$  cell/ml and were used for the flow cytometry analysis.

**Flow cytometry analysis:** Fluorescent labeled antibodies specific for cell surface and intracellular markers were used to determine the percentage of cells expressing CD4<sup>+</sup> T, CD8<sup>+</sup> T, CD19, and intracellular IFN- $\gamma$  in the mononuclear cell suspension from spleen. Three-color fluorescence staining was performed by using the following monoclonal antibodies; phycoerythrin (PE)-conjugated rat anti-mouse CD8, fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated rat anti-mouse CD4, allophycocyanin (APC)-conjugated rat anti-mouse CD19, or allophycocyanin (APC)-conjugated rat anti-mouse IFN- $\gamma$ , purchased from BD Pharmingen (Mississauga, Ontario, Canada). We optimized the concentration for all antibodies with control mice. Cells were cultured in a 60 mm Petri dishes with phorbol 12-myristate 13-acetate (PDB) (5 ng/ml) and Ionomycin (500 ng/ml) at 37°C over-night. Mononuclear cells, harvested from spleens or lungs, were incubated with a protein transport inhibitor, GolgiStop (4  $\mu$ l in 6 ml) for 4 hr at 37°C. After stimulation,  $1 \times 10^6$  cells were washed with PBS containing 1% BSA and stained with anti-CD4, anti-CD8, or anti-CD19

for 30 min in the dark. Cells were fixed and permeabilized with Cytotfix/Cytoperm (BD), for 20 min and washed twice with 1X Perm/wash buffer (BD) then stained with anti-IFN- $\gamma$  antibodies for 30 min at 4°C. Fluorescence intensity was detected by using a FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson, Mississauga, ON) and CellQuest software. The lymphocytes were recognized by gating in forward and side scatter based on cell granularity and size. Isotype controls were used to define negative populations.

**Histological assessment of lung tissue:** The whole lungs were clamped off and airways were perfused with 10% neutral buffered formalin until the pleura was smooth. The heart/lung/trachea were removed and kept in formalin for 24 hr. Lungs were removed and inflated with formalin using a tissue processor (LEICA TP 1020) over night. The left lobe was embedded in paraffin, sectioned with a microtome (LEICA RM 2125 RT) at 5  $\mu$ m thicknesses and stained with hematoxylin and eosin (H&E). An inflammation score was determined by two independent investigators blinded to the treatment groups and graded on a scale of 1, 2, 3, and 4 corresponding to no inflammation, mild, moderate, and severe inflammation, respectively. In the Be-F, BeO-F and BeAl-F exposed groups, 5 mice were sacrificed three weeks after the last exposure to study the effect of time on development of granulomatous inflammation in the lung.

**Statistical analysis:** For continuous dependent parameters, groups were compared using one-way analyses of variance. Following statistically significant results with the ANOVA,

pairwise comparisons were performed using the Tukey procedure. Preliminary assumptions, such as normality of residuals and homoscedasticity of variances, were verified and no major discrepancies were observed. For categorical dependent parameters, groups were compared using the Pearson's chi-square test. Pairwise associations between quantitative variables were estimated using the Pearson's correlation coefficient. The significant level was set to 0.05, then results were considered statistically significant for  $p < 0.05$ . All data are presented as means  $\pm$  standard deviations (SD). All statistical analyses were performed using SPSS 9.0, SPSS Inc., 233 South Wacker Drive, Chicago, IL, USA.

## Results

Based on the cascade and the MOUDI impactors, the mean MMADs varied between 0.41 and 4.40  $\mu\text{m}$  while the average concentrations in the inhalation chamber was quite near the target concentration of 250  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (Table 1). The mean daily chamber temperatures ranged from 22-25°C, and relative humidity from 25-40 %.

Table 2 shows blood and tissue concentrations. There was a significant difference between the exposed groups and the controls. However, the most important result is related to lung concentrations showing a huge discrepancy between Be species, with mice exposed to BeO-F obtaining the highest value.

Splenic mononuclear cells expressed significantly higher levels ( $p < 0.05$ ) of CD4+, CD8+, and IFN- $\gamma$  in all exposed mice compared to controls (Table 3). Although the results seem in the same range, the mean percentage of CD4+ expression for Be-F was significantly higher than BeO-F and BeAl-F while the mean expression for BeO-F was significantly higher than BeAl-F.

The results of cytokine assessment (ELISA) from bronchoalveolar lavage fluid (BAL) are presented in Table 4. All exposed groups secreted significantly more TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$ ,



and IL-2 (except BeO-F) compared to controls ( $p < 0.05$ ). The Be-F group produced significantly more ( $p < 0.05$ ) IL-4 compared BeO-F and BeAl-F. TNF- $\alpha$  was significantly higher in the Be-F group than the two other exposed groups while IFN- $\gamma$  concentration was significantly higher in BeO-F. Finally, IL-12 was significantly higher in BeO-F compared to the other groups.

Table 5 shows the distribution of the histological scores of lung inflammation in mice one and three weeks after the end of exposure compared to controls. There was a significant difference between the controls and the exposed groups ( $p < 0.05$ ) in the distribution of scores. The inflammation scores for mice sacrificed three weeks after the end of exposure were higher than those sacrificed one week after the end of exposure, although the differences were not statistically significant. Be exposed animals were characterized by a mononuclear cell infiltrate predominantly peribronchially, with some perivascular infiltration as well. In those animals sacrificed 3 weeks after the completion of inhalation exposure, the infiltrate was more prominent, with large granulomatus-like structures noted in the peribronchial region. The most intensive inflammation was observed in mice exposed to Be-F but no granuloma was observed. Photomicrographs of lung sections from representative animals within each group at X40 magnification are presented in Figures 1 and 2. The sections that were evaluated were primarily peripheral lung where small amounts of Be deposition occurred.

Finally, Table 6 shows the correlations between the combination of all tissue concentrations, cytokine assessment and splenic mononuclear cells expressed for the three chemical forms. Be lung concentration shows a high correlation with the expression of cytokines IL-12 and IFN- $\gamma$  and the CD4+ T cells.

## **Discussion**

Our results show several links between chemical form, lung inflammation and production of some cytokines. It is not very easy to determine which species should be considered as more toxic. However, Be and BeO seem to be the most toxic. BeO-F has the highest lung Be concentration with a higher IL-12 and IFN- $\gamma$ , while Be-F group has the highest lung inflammation and produces significantly more IL4, TNF- $\alpha$  and CD4+ T cells.

Particle size may also play an important role in particle deposition in the alveolar region, eventually leading to cellular immune responses and formation of non-caseating granulomas lesions [17]. According to the regional deposition of inhaled monodisperse particles in mice found by Raabe *et al.* [18], inhaled Be-F with an average MMAD of 1.5  $\mu\text{m}$  should show about a 50% deposition in the nasopharyngeal region while the BeAl-F with an average MMAD of 4.4  $\mu\text{m}$  should reach a nasopharyngeal deposition of at least 60% (Table 1). BeO-F, with the smallest average MMAD of 0.4  $\mu\text{m}$ , should have about a 15% deposition in the nasopharyngeal region. The MMADs obtained in this study should lead to about 11 %, 40% and 0.25 % deposition into the lung for Be-F, BeO-F and of BeAl-

F respectively. These rates of deposition correlate with the results of pulmonary concentrations measured.

The BeAl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-F with the largest average particle size and thus highest nasopharyngeal deposition, may thus be more efficiently cleared by the mucociliary escalator and ingested [19-20] which may explain the lower lung concentrations and the much higher blood, kidney and liver concentrations of this form compared to BeO-F and Be-F.

The deposited fraction of Be-F, which is water insoluble, and BeO-F and BeAl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-F, which are very sparingly water soluble, are poorly dissolved in the respiratory mucous, favouring a longer local residence time in the respiratory tract contrary to the more soluble salts, that more efficiently undergo dissolution in respiratory secretions, phagocytosis by alveolar macrophages or dendritic cells for fine particles and epithelial translocation for smaller-sized particles [19, 21-22]. BeO-F, with the lowest MMAD and thus highest lung deposition together with its poor water solubility, is likely to have a longer local residency in the respiratory tract, more specifically in the alveolar space, than the other studied Be forms. Interestingly, it is the BeO-F form that shows the highest IL-12 and INF- $\gamma$  concentrations in the bronchoalveolar lavage albeit the Be form was associated with the highest histological scores of lung inflammation.

The results of standard histology showed that Be exposed mice had lung inflammation. This shorter term exposure led to similar histology compared to that observed in CBD patients, although Nikula *et al.* [23] and Finch *et al.* [24] established that lung effects in humans seem to be greater than those seen in animal model. However, these authors observed some microgranulomas and severe aggregated lymphocytes after exposure to high level of Be. Our results also show a significant link between lung inflammation and chemical form. Inflammation was more severe in Be-F group. Our finding is consistent with other animal studies that have been conducted to investigate pulmonary effect of Be exposure [25–27].

In our study, mice sacrificed three weeks after the end of exposure showed a more severe lung inflammation compared to those sacrificed one week after the end of exposure. This means that lung inflammation continue, even increase, after the cessation of the exposure. This add information to the previous findings showing that interstitial infiltration of lung is a dose-dependent pattern and severity of lung lesions increased with time and lung burden [28]. Our results are also in keeping with those of another nose-only inhalation study where mice from the same strain were exposed to Be metal for 90 min and developed interstitial compact aggregates of lymphocytes and granulomatous pneumonia six months later [23].

It has been established that the development of granulomatous inflammation in the lung of CBD patients is associated with activation and accumulation of CD4+ T cells [8]. In our

study, Be-F group expressed significantly more CD4<sup>+</sup> T cells compared to control, BeO-F and BeAl-F groups. This finding is also consistent with previous studies suggesting that Be-specific T cells are mostly CD4<sup>+</sup> in CBD and BeS patients [29].

In CBD, the activated T cells clonally proliferate and secrete Th1-type cytokines, mostly, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-2 but not IL-4, indicative of a T helper 1 (Th1) response [30]. These immunological activities lead to the formation of noncaseating granulomas in the lungs [30]. Our data from cytokine assessment in BAL show similar pattern of Th1-type cytokine secretion in mice exposed to Be-F. This group expresses significantly more TNF- $\alpha$ , while BeO-F group expresses significantly more IFN- $\gamma$  and IL-12. For these two groups, the expression of IL-4 is lower than the control group. This is in accordance with individuals with CBD. TNF- $\alpha$  is produced by activated cells for both neutrophils and macrophages that may have effects on cells recruitment at sites of inflammation, and eventually, induce granulomatous structures [31]. When T cells are activated with Be antigen they produce a so called Th1 type cytokines, particularly, IFN- $\gamma$  [30]. In addition to the role of Be as an antigene, adjuvant activities have been observed in animals [30]. IL-12 has proinflammatory properties and is essential for proliferation of activated T cells. In contrast, Th2-type cytokines, for instance IL-4, are not detected in CBD patients [8]. This converge with the significantly lower concentrations of IL-4 obtained for the three exposed groups compared to controls. Moreover, our data show a significant enhancement of cytokine for exposed mice that can be correlated to lung inflammation.

According to Table 6, IL-12 was correlated to lung and spleen concentrations. On the other hand, the concentration of IL-12 was significantly higher in mice exposed to BeO-F and to Be-F. IL-12 concentration was correlated to INF- $\gamma$  and CD4 $^{+}$  which are higher in Be-F and BeO-F groups. IL-2 and INF- $\gamma$  induce protective cell-mediated immunity and delayed-type hypersensitivity reactions [32]. IL-12 is a proinflammatory cytokine produced mostly by phagocytic cells and to some degree by B cells. IL-12 induces T cell proliferation and INF- $\gamma$  secretion from activated T cells. It was also reported that IL-12 prevents apoptosis of CD4 $^{+}$  cells [33].

## **Conclusion**

Overall, this study is a unique murine model to investigate the importance of chemical forms of different particle sizes in producing the chronic lung disease that may enhance our knowledge to identify a scientifically based threshold to protect workers against CBD. Obviously, there is still an important lack of adequate toxicological information and further studies such as those related to the dose response are needed to provide successful implementation of evidence-based risk assessment approaches.

## **Acknowledgments**

This research was supported by the *Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail* (IRSST), and the Costello Foundation. The authors enormously appreciate the professional advice of Yves Cloutier and Vincent Paquette from the IRSST and the technical supports of Elmira Aliyeva, Lise Gareau, Natalya Karp, Issa Lozano, Julienne Lama and Louis Zayed. Dr. Mazer is a Chercheur-National supported by the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.



## Reference

- [1] Kolanz ME. 2001. Introduction to beryllium: uses, regulatory history and disease. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* 16(5): 559-67.
- [2] Stonehouse AJ, Zenczak S. 1991. Properties, production processes and applications. In: *Beryllium: Biomedical and Environmental Aspects*. M.D. Rossman; O.P. Preuss; M.B.Powers, Eds. Williams and Wilkins, Baltimore.
- [3] Sawyer RT, Maier LA, Kittle LA, Newman LS. 2002. Chronic Beryllium disease: a model interaction between innate and acquired immunity. *Int. Immunopharmacol.* 2: 249-261.
- [4] Pott GB, Pulmer BE, Sullivan AK, Silveira L, Maier LA, Newman LS, Kotzine BL, Fontenot AP. 2005. The frequency of beryllium specific, Th1-type cytokines-expressing CD<sup>4</sup> T cells in patients with beryllium-induced disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115: 1036-1042.

- [5] Newman LS, Mroz MM, Balkissoon R, Maier LA. 2005. Beryllium sensitization progresses to chronic beryllium disease: a longitudinal study of disease risk. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171:54-60.
- [6] Saltini C, Winestock K, Kriby M, Pinkston P, Crystal RG. 1989. Maintenance of alveolitis in patients with chronic beryllium disease by beryllium-specific helper T cells. *N. Engl. J. Med.* 320: 1103-1109.
- [7] Amicosante M, Fontenot AP. 2006. T cell recognition in chronic beryllium disease. *Clin. Immunol.* 121:134-143.
- [8] Fontenot AP, Maier LA, Canavera SJ, Hendry-Hofer TB, Boguniewicz M, Barker EA, Newman LS, Kotzin BL. 2002. Beryllium skin patch testing to analyze T cell stimulation and granulomatous inflammation in the lung. *J. Immunol.* 168: 3627-3634.
- [9] Gazette Officielle du Québec. Règlement modifiant le Règlement sur la santé et la sécurité du travail. 20 décembre 2006, Partie 2 138(51):5793-99.
- [10] ACGIH. 2009. Beryllium and Compounds. In: Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices, 7th Edition, pp. 1-14. American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati, OH.

- [11] Stefaniak AB, Hoover MD, Day GA, Dickerson RM, Peterson EJ, Kent MS, Schuler CR, Breysse PN, Scripsick RC. 2004. Characterization of physicochemical properties of beryllium aerosols associated with prevalence of chronic beryllium disease. *J. Environ. Monitor* 6:523-532.
- [12] Kent MS, Robins TG, Madl AK. 2001. Is total mass or mass of alveolar-deposited airborne particles of beryllium a better predictor of the prevalence of disease? A preliminary study of a beryllium processing facility. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* 16(5):539-58.
- [13] Maier LA, McGrath DS, Sato H, Lympany P, Welsh K, Du Bois R, Silveira L, Fontenot AP, Sawyer RT, Wilcox E, Newman LS, 2003. Influence of MHC class II in susceptibility to beryllium sensitization and chronic beryllium disease. *J. Immunol.* 171, 6910-6918.
- [14] Salehi F, Zayed J, Audusseau S, Muller C, Truchon G, Plamondon P, L'Espérance G, Chevalier G, Mazer B. 2008. Immunological responses in C3H/HeJ mice following inhalation exposure to different sizes of Beryllium metal particles. *J. App. Toxicol.* 29: 61-68.

- [15] Stiefel T, Schulze K, Zorn H, Tölg G. 1980. Toxicokinetic and toxicodynamic studies of beryllium. *Arch. Toxicol.* 45:81-92.
- [16] Krachler, M., Radner, H. and Irgolic K. J. 1996. Microwave Digestion Methods for the Determination of Trace Elements in Brain and Liver Samples by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Fresenius J Anal Chem* 355: 120-128.
- [17] Stefaniak AB, Gulmette RA, Day GA, Hoover MD, Breyse PN, Scripsick RC. 2005. Characterization of phagolysosomal stimulant fluid for study of beryllium aerosol particle dissolution. *Toxicol. In Vitro.* 19(1): 123-134.
- [18] Raabe OG, Al-Bayati MA, TeagueSV, Rasolt A. 1988. Regional deposition of inhaled monodisperse coarse and fine aerosol particles in small laboratory animals. *Ann. Occup. Hyg.* 32: 53-63. Supplement 1.
- [19] Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology. 2005. An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113: 823-839.

- [20] Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A, Kreyling W, Cox C. 2002. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J. Toxicol. Environ. Health* 65:1531-1543.
- [21] Rothen-Rutishauser B, Mühlfeld C, Blank F, Musso C, Gehr P. 2007. Translocation of particles and inflammatory responses after exposure to fine particles and nanoparticles in an epithelial airway model. *Part. Fibre Toxicol.* 4:1-9.
- [22] Peters A, Veronesi B, Calderón-Garcidueñas L, Gehr P, Chi Chen L, Geiser M, Reed W, Rothen-Rutishauser B, Schürch S, Schulz H. 2006. RothenTranslocation and potential neurological effects of fine and ultrafine particles a critical update. *Part. Fibre Toxicol.* 3:1-13.
- [23] Nikula KJ, Swafford DS, Hoover MD, Tohulka MD, Finch GL. 1997. Chronic granulomatous pneumonia and lymphocytes responses induced by inhaled beryllium metal in A/J and C3H/HeJ mice. *Toxicol. Pathol.* 25: 2-12.
- [24] Finch GL, Nikula KJ, Hoover M.D. 1998. Dose-Response relationships between inhaled beryllium metal and lung toxicity in C3H Mice. *Toxicol. Sciences* 42:36-48.

- [25] Finch GL, Hoover, MD, Hahn FF, Nikula KJ, Belinsky SA, Haley PJ, Griffith WC. 1996. Animal models of beryllium-induced lung disease. *Environ. Health Perspect.* 104: 973–979.
- [26] Finch GL, Mewhinney JA, Hoover MD, Eidson AF, Haley PJ, Bice DE. 1990. Clearance, translocation, and excretion of beryllium following acute inhalation of beryllium oxide by beagle dogs. *Fundam. Appl. Toxicol.* 15(2): 231-241.
- [27] Haley PJ, Pavia KF, Swafford DS, Davila DR, Hoover MD, Finch GL. 1994. The comparative pulmonary toxicity of beryllium metal and beryllium oxide in cynomolgus monkeys. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 16(4):627-44.
- [28] Haley PJ, Finch GL, Hoover MD, Cuddihy RG. 1990. The acute toxicity of inhaled beryllium metal in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 15(4): 767-78.
- [29] Fontenot AP, Palmer BE, Sullivan AK, Joslin FG, WilsonCC, Maier LS, Newman LS, Kotzin BL. 2005. Frequency of beryllium-specific, central memory CD4+ T cells in blood determines proliferative response. *J. clinical Investigation* 115:2886-2893.

- [30] Tinkle SS, Kittle LA, Schumacher BA, Newman LS. 1997. Beryllium induces IL-2 and IFN-  $\gamma$  in berylliosis. *J. Immunol.* 158: 518-526.
- [31] Semenzato G, Adami F, Maschio N, Agostini C. 2000. Immune mechanisms in interstitial lung diseases. *Allergy.* 55:1103-1120.
- [32] Lee JY, Atochina O, King B, Taylor L, Elloso M, Scott P, Rossman MD. 2000. Beryllium, an adjuvant that promotes gamma interferon production. *Infect Immun.* 2000 Jul;68(7):4032-9.
- [33] Yoo JK, Cho JH, Lee SW, Sung YC. 2002. IL-12 Provides Proliferation and Survival Signals to Murine CD4<sup>+</sup> T Cells Through Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathway. *J Immunol.* 169: 3638-3643.

**Table 1**

**Beryllium mass median aerodynamic diameter, atmospheric concentration in the inhalation chamber and theoretical pulmonary deposition for the three exposures to Be species**

<b>Chemical forms</b>	<b>MMAD (<math>\mu\text{m} \pm \text{SD}</math>) (n=7)</b>	<b>Concentration (<math>\mu\text{g}/\text{m}^3 \pm \text{SD}</math>) (n=35)</b>
<b>Be-F</b>	$1.50 \pm 0.12$	$254 \pm 31$
<b>BeO-F</b>	$0.41 \pm 0.03$	$248 \pm 10$
<b>BeAl-F</b>	$4.40 \pm 1.64$	$253 \pm 49$



**Table 2**

**Mean Be tissue concentrations in mice following exposure to Be-F, BeO-F and BeAl-F and for the control group**

	<b>Lung</b> <b>(ng/g ± SD)</b>	<b>Spleen</b> <b>(ng/g ± SD)</b>	<b>Liver</b> <b>(ng/g ± SD)</b>	<b>Kidneys</b> <b>(ng/g ± SD)</b>	<b>Blood</b> <b>(pg/ml ± SD)</b>
<b>Control</b>	0.60 ± 0.60 (n=12)	0.04 ± 0.04 (n=15)	0.03 ± 0.03 (n=27)	0.007 ± 0.200 (n=27)	0.03 ± 0.02 (n=27)
<b>Be-F</b>	12070 ± 3037 A (n=13)	2.2 ± 4.0 B (n=16)	3.03 ± 6.20 D (n=28)	1.9 ± 4.0 (n=28)	0.9 ± 3.0 F (n=28)
<b>BeO-F</b>	84606 ± 13968 A (n=14)	4.7 ± 7.1 C (n=17)	3.9 ± 5.0 E (n=29)	1.9 ± 3.2 (n=29)	0.30 ± 1.02 G (n=29)
<b>BeAl-F</b>	1968 ± 1398 A (n=13)	1.2 ± 2.0 BC (n=16)	11.6 ± 35.2 DE (n=28)	18.8 ± 36.1 (n=28)	15.6 ± 36.9 FG (n=28)

All exposed groups were significantly different from the controls ( $p < 0.05$ )

For the exposed groups, means with the same letter are significantly different ( $p < 0.05$ )

**Table 3**

**IFN- $\gamma$ , CD4+, CD8+ and CD19 expression (%  $\pm$  SD) in mice spleen mononuclear cells for control mice and for mice exposed to Be-F, BeO-F and BeAl-F**

	<b>INF-<math>\gamma</math></b>	<b>CD4+</b>	<b>CD8+</b>	<b>CD19</b>
<b>Control</b> <b>(n=6)</b>	3.13 $\pm$ 2.80	14.14 $\pm$ 2.22	7.72 $\pm$ 1.89	58.12 $\pm$ 9.78
<b>Be-F</b> <b>(n=7)</b>	7.63 $\pm$ 0.92	21.40 $\pm$ 1.88 AB	11.78 $\pm$ 1.22	40.88 $\pm$ 6.88 DE
<b>BeO-F</b> <b>(n=7)</b>	9.49 $\pm$ 1.12	20.19 $\pm$ 3.55 BC	12.17 $\pm$ 1.81	45.14 $\pm$ 4.88 EF
<b>BeAl-F</b> <b>(n=7)</b>	7.90 $\pm$ 1.23	18.53 $\pm$ 2.76 AC	12.82 $\pm$ 1.49	47.20 $\pm$ 4.40 DF

All exposed groups were significantly different from the controls ( $p < 0.05$ )

Means with the same letter are significantly different ( $p < 0.05$ )

**Table 4**

**Mean cytokines concentration in BAL (pg/ml  $\pm$  SD) for control mice and for mice exposed to Be-F, BeO-F and BeAl-F**

	<b>IL-2</b>	<b>IL-4</b>	<b>IL-12</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>INF-<math>\gamma</math></b>
<b>Control</b> (n=7)	1.58 $\pm$ 0.00	2.26 $\pm$ 0.17	13.15 $\pm$ 1.53	8.40 $\pm$ 0.55	14.00 $\pm$ 1.19
<b>Be-F</b> (n=8)	1.93 $\pm$ 0.20	1.91 $\pm$ 0.15 AB	23.24 $\pm$ 8.69 C	12.50 $\pm$ 2.85 DE	17.20 $\pm$ 2.98 F
<b>BeO-F</b> (n=7)	1.60 $\pm$ 0.02	1.70 $\pm$ 0.07 A	28.96 $\pm$ 6.07 C	11.12 $\pm$ 1.22 D	20.49 $\pm$ 1.49 FG
<b>BeAl-F</b> (n=7)	2.34 $\pm$ 0.37	1.71 $\pm$ 0.08 B	17.30 $\pm$ 3.89 C	10.90 $\pm$ 4.88 E	18.60 $\pm$ 3.97 G

All exposed groups were significantly different from the controls ( $p < 0.05$ ) except IL-2 for BeO-F

Means with the same letter are significantly different ( $p < 0.05$ )

**Table 5**

**Histological scores of lung inflammation for the control group and for mice exposed to Be-F, BeO-F and BeAl-F sacrificed 1 and 3 weeks after the end of exposure**

<b>Histological score of lung inflammation</b>				
	1=no	2=mild	3=moderate	4=severe
<b>Controls (n=9)</b>	95.5%	4.5%	0	0
<b>Mice sacrificed 1 week after the end of exposure</b>				
<b>Be-F (n=10)</b>	0	54.5%	45.5%	0
<b>BeO-F (n=10)</b>	22.7%	63.6%	13.7%	0
<b>BeAl-F (n=10)</b>	44.4%	55.6%	0	0
<b>Mice sacrificed 3 weeks after the end of exposure</b>				
<b>Be-F (n=5)</b>	0	29.4%	70.6%	0
<b>BeO-F (n=5)</b>	0	75.0%	25.0%	0
<b>BeAl-F (n=5)</b>	0	77.8%	22.2%	0

**Table 6**

**Correlations between tissue concentration, cytokine concentration and splenic mononuclear expressed cell**

<b>Tissue concentration</b>	<b>Cytokine concentration</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
<b>Lung</b>	IL-12	0.615	0.002 (n=23)
	IFN- $\gamma$	0.573	0.008 (n=20)
<b>Blood</b>	IL-2	0.543	0.000 (n=47)
<b>Spleen</b>	IL-12	0.602	0.000 (n=31)

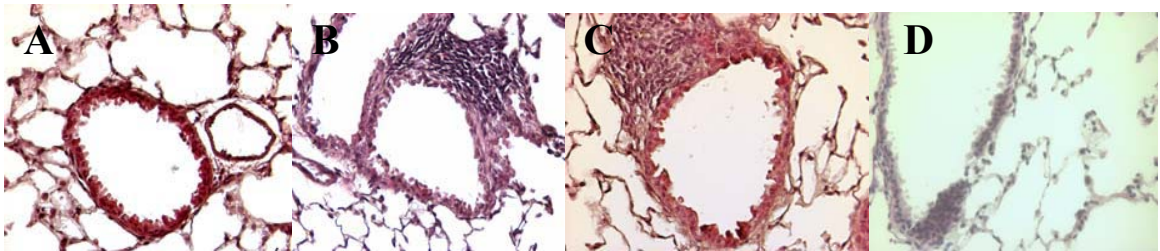
<b>Tissue concentration</b>	<b>Expressed cell</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
<b>Lung</b>	INF- $\gamma$	0.518	0.003 (n=31)
	CD4+	0.424	0.016 (n=32)
<b>Blood</b>	CD8+	0.482	0.000 (n=96)
<b>Spleen</b>	INF- $\gamma$	0.452	0.006 (n=36)

<b>Cytokine concentration</b>	<b>Expressed cell</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
<b>IL-12</b>	INF- $\gamma$	0.467	0.000 (n=62)
	CD4+	0.448	0.000 (n=64)

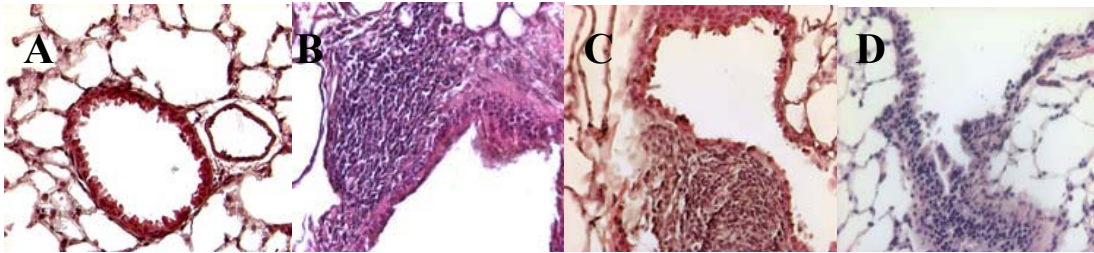
**Figure 1**

**Images from standard histology of lung in control mice (A)  
and in those exposed to Be-F (B), BeO-F (C) and BeAl-F (D)  
sacrificed one week after the end of exposure**



**Figure 2**

**Images from standard histology of lung in control mice (A)  
and in those exposed to Be-F (B), BeO-F (C) and BeAl-F (D)  
sacrificed three weeks after the end of exposure**



## **Article deuxième: Urinary levels, tissue concentrations and lung inflammation after nose-only exposure to three different chemical forms of beryllium**

Caroline Muller<sup>1</sup>, Bruce Mazer<sup>2</sup>, Fariba Salehi<sup>2</sup>, Séverine Audusseau<sup>2</sup>, Gaston Chevalier<sup>3</sup>, Ginette Truchon<sup>4</sup>, Jean Lambert<sup>5</sup> and Joseph Zayed<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Environmental and Occupational Health, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada, <sup>2</sup>Meakins-Christie Laboratories, McGill University, <sup>3</sup> Department of Biological Sciences, University of Quebec in Montreal, <sup>4</sup>Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST), Quebec, Canada, <sup>5</sup>Department of social and preventive medicine, Faculty of Medicine, University of Montreal.

Ce manuscrit a été accepté pour publication dans la revue "Journal of Applied Toxicology" en janvier 2010.

Corresponding author

Joseph Zayed, Ph.D.

Department of Environmental and Occupational Health

Faculty of Medicine

University of Montreal

P.O. Box 6128, Main station

Montreal, Quebec

Canada, H3C 3J7

Telephone: (514) 343-5912

Fax : (514) 343-2200



## **Abstract**

This study aims to determine the toxicity and toxicokinetic of three Be chemical species. A total of 120 mice (four groups of 30) were nose-only exposed. The first group was used as a control while the three others were exposed to  $250 \mu\text{g}/\text{m}^3$  of fine particles of three different Be species (Be metal, Be-F; Be oxide, BeO-F; Be aluminium alloy, BeAl-F). Exposure last over 3 consecutive weeks, 5 d/week and 6 hr/d. Blood and several tissues were collected one week after exposure. Urines were collected before the beginning of exposure, at the end of every week of exposure and 1 week after exposure. Results shows that urine concentrations are different from one Be specie to another and excretion continue after the end of exposure. Except for BeO-F where Be urine concentrations are stable during the three week of exposure, those of Be-F and BeAl-F reach a peak after the first week. According to particle size, BeO-F obtained the highest theoretical pulmonary deposition rate which can partially lead to the highest Be lung concentration. This group presents also the lowest urine concentration but that does not lead to a more severe lung inflammation. Moreover, even if BeAl-F obtained the lowest percentage of the theoretical pulmonary deposition, it shows the highest Be urinary concentration, the lowest Be lung concentration and the lowest lung toxicity. In this specific case, a high Be concentration in urine does not reflect a high exposure neither a severe toxic effect.

Keywords: Be species; toxicity; lung inflammation; nose-only exposure; urine Be.



## Introduction

Beryllium (Be) is an element that occurs naturally. Pure Be is commonly used in nuclear weapons and reactors. Most of the Be ore that is mined is converted into alloys which are mainly used in automobiles and computers. Beryllium oxide (BeO) is used to make specialty ceramics for electrical and high-technology applications (Kreiss *et al.*, 2007, ATSDR, 2002). Individuals employed in Be manufacturing, fabricating, or reclaiming industries are at highest risk for exposure and may encounter dusts and fumes of many different beryllium compounds (ATSDR, 1988).

The current occupational standard for worker exposure to Be in Quebec is  $0.15 \mu\text{g}/\text{m}^3$  for an 8-hour workshift (VEMP) while the TLV-TWA adopted by the ACGIH is  $0.05 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (Gazette officielle du Québec, 2006; ACGIH, 2009). Humans inhaling Be may develop sensitization (BeS), chronic beryllium disease (CBD) and lung cancer (Sawyer *et al.*, 2002; Kriebel *et al.*, 1988). CBD is highly variable in onset and can develop within few months or more than 20 years after exposure is a systemic, granulomatous disease that primarily affects the lungs (Kriebel *et al.*, 1988). One of the immunological reactions observed in affected individuals are subsequent generation of granulomatous inflammation in the lung (Amicosante *et al.*, 2006; Fontenot *et al.*, 2002). Be particles less than  $3.5 \mu\text{m}$  diameters are more likely to increase the prevalence of CBD or BeS than larger particles (Kent *et al.*, 2001).

Inhaled Be particles are deposited in the respiratory tract and can subsequently be cleared (INRS, 2006). The deposition and clearance of Be are governed by important factors such as dose, particle size, solubility of particles and the ambient concentration (Kolanz, 2001; Stefaniak *et al.*, 2007, Henneberger *et al.*, 2001; Kent *et al.*, 2001). The more soluble compounds are generally cleared more rapidly by dissolution in respiratory tract fluid.

Insoluble particles deposited in the upper respiratory tract and tracheobronchial tree are cleared by mucociliary transport. Those deposited in the pulmonary regions are cleared by a number of mechanisms and pathways, primarily by alveolar macrophages. The clearance of insoluble compounds from the lungs has been generally shown to be biphasic, with clearance half-time of days by mucus transport and alveolar macrophages to years by dissolution and other translocation mechanisms (IRIS, 1998).

Since the three aerosols used in this study were insoluble in water (Be metal or Be) and relatively insoluble in water (Be oxide or BeO and Be aluminum alloy or BeAl), clearance should be an important mechanism of particle elimination from the lung (ACGIH, 2009; Stefaniak *et al.*, 2007; Finch *et al.*, 1988). However, as BeAl are slightly soluble in water and dilute alkali, compared to BeO which is very sparingly soluble in these media and Be which is insoluble, dissolution of BeAl should be more important. In fact, additional studies of the dissolution behaviour of beryllium materials is needed (Stefaniak *et al.*, 2006). Recently, Cummings *et al.* (2009), suggested that acute Be disease and chronic Be disease represent a continuum of disease, and both involve hypersensitivity reactions to Be. Differences in disease presentation and progression are likely influenced by the solubility of the Be compound.

In humans, residence times in the lungs are assumed to be very long on the basis of the presence of insoluble Be many years after the cessation of occupational exposure (ATSDR, 2002). Following inhalation exposure, Be cleared from the lungs is distributed to the tracheobronchial lymph nodes and the skeleton, which is the ultimate site of Be storage (Finch *et al.*, 1990). Be is also distributed to the liver, kidneys, spleens and the other soft tissues.

Toxicants are eliminated from the body by several routes. The primary routes of Be are urine and feces. In rats and dogs, whole body clearance of inhaled Be follows a single-phase exponential curve with a half-life of 300–400 days (Finch *et al.*, 1990; Rhoads and Sanders, 1985). Absorbed Be is generally eliminated primarily in the urine (Stiefel *et al.*, 1980), whereas excretion of unabsorbed Be is primarily via the fecal route shortly after mucociliary clearance from the respiratory tract (Finch *et al.*, 1990).

According to ATSDR (2002), the information regarding normal background level of Be in urine associated with exposure is limited. Levels ranging from 0.28 to 1 µg/L were established by Paschal *et al.* (1998) and Stiefel *et al.* (1980) while other studies reported mean urinary Be concentrations ranging from <0.03 to 0.4 µg/L (Apostoli and Schaller, 2001). Stiefel *et al.* (1980) found increased levels in the urine of smokers (2 µg/L compared with 0.9 µg/L for non smokers). However, it seems obvious that sufficient data are not currently available to be able to propose a biological exposure index (BEI) for urinary Be. Investigations are needed to improve the evaluation of dose indicators and the relationship between external and internal exposure to Be.

This study aims to determine the toxicity and toxicokinetic (tissue and urinary concentrations) of three Be chemical species.

## Materials and Methods

A total of 120 C3H/HeJ nine-week-old male mice (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) divided into four groups of 30 were nose-only exposed. The first group was used as a control and was exposed to HEPA-filtered air, while the three other groups were exposed to fine particles ( $< 5\mu\text{m}$ ) of three different Be species (Be metal, Be-F; Be oxide, BeO-F; Be aluminium alloy, BeAl-F) obtained from Brush-Wellman (Elmore, Ohio).

Upon arrival at the animal facility, the animal's health was certified by the resident veterinarian and mice were weighed on a weekly basis, tail-colored for identification purposes and acclimatized for two weeks prior to initiation of the study.

Mice were individually housed in polycarbonate cages with stainless steel wire lids under controlled temperature and humidity. The environmental controls were set to achieve target values of  $22 \pm 3\text{ C}$  and 30-70 % relative humidity. The animal room was ventilated for at least 15 air exchanges per hour and the lighting controlled to give 12 hours of continuous artificial light in each twenty-four hour period. Animals were given NIH-07 chow *ad libitum* when they were not exposed. The diet and drinking water were routinely analysed and are considered not to contain any contaminants that could reasonably be expected to affect the purpose or integrity of the study.

### *Inhalation Exposure*

Prior to animal exposures, test material atmospheres were generated within the exposure chamber. During these technical trials, air-flow settings and test material input rates were varied to achieve the required atmospheric characteristics. Moreover, Be was sampled in the inhalation chamber for physicochemical characterization using electronic microscopy.

The method and the results were published by our research group in a previous paper Salehi *et al.*, 2008)

Exposure was conducted in a metallic nose-only inhalation chamber (Model 04-1100; In-Tox Products, Albuquerque, NM) that is able to expose 48 mice simultaneously. Be aerosol was generated, with a flow rate of total 22 L air/min, by a Fluidized Bed Aerosol Generator (Model 3400, TSI Inc., St. Paul, MN). A stainless steel ASME pressure tank (Model 73, Mc Master-Carr, NJ) was used in order to obtain fine particles < 5 µm.

Each group of mice was exposed during 3 consecutive weeks, 5 days per week and 6 hours per day. The exposure target level was 250 µg/m<sup>3</sup>. In order to confirm this concentration, air samples were also collected from the inhalation chamber 5 d/week, 6 hr/d in the exposure box. Sampling was carried out with a Gilian pump (Gilian Corp. West Caldwell, N.J.) with a standard 3-piece cassette and 37 mm diameter filters. The filters were Teflon (manufactured for SKC Inc., Gelman Sciences, MI) with a 0.45 µm pore size. Pumps were used at a constant flow rate of 1.5 L/min. The flow rate was calibrated each time, before and after the sampling, with a Gilibrator (Gilian Corp. West Caldwell, N.J.).

The mass median aerodynamic diameter (MMAD) was measured by using an eight-stage Marple Personal Cascade Impactor (Series 290) twice per week. This impactor is designed to determine the aerodynamic diameter of particles between 0.5 to 22 µm in the air.

The experiments were performed in compliance with the guidelines outlined by the Canadian Council on Animal Care and the assent of the Animal Ethics Committee of the University of Quebec in Montreal where exposure experiments were conducted.

#### *Tissue collection*

One week after exposure, mice were euthanized by exsanguination and the several tissues (lung, spleen, liver and kidneys) were sampled, weighed and packaged for chemical analysis. According to several studies in experimental animal models, the severity of lung lesions such as lymphocytic interstitial infiltration and non-caseating granuloma formation increased with time and lung burden (Finch *et al.*, 1990; Nikula *et al.*, 1997). This is why we decided to sacrifice mice one more week after the end of exposure.

Blood samples (1-2 ml) were also collected from the abdominal aorta. All samples were immediately frozen at a temperature of  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$  and stored at  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  until their chemical analysis by ICP-MS according to an adapted method of Krachler *et al.* (1996). Briefly, tissues were digested in 6 ml of a nitric acid and perchloric (3:1). For BeO-R group tissues, 500  $\mu\text{L}$  of sulphuric acid were added to the 6 mL of nitric acid mixture and perchloric to insure a complete solubilization of the particles.

#### *Urine collection and analysis*

Urine samples were collected during 16 hours before the beginning of exposure (week 0), at the end of each week of exposure (weeks 1, 2 and 3) and 1 week after the end of exposure (week 4). They were frozen at  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  until the chemical analysis. Samples were shaken and diluted quantitatively (1:10) with 1% (v/v)  $\text{HNO}_3$ . Solutions were filtered and analysed by ICP-MS (Elan DRC II, Perkin Elmer-Sciex, Concord, Ontario, Canada) equipped with an AS-93Plus Autosampler (PerkinElmer, Wellesley, USA). Lithium6 was used as internal standard. Detection limit is  $0.006\text{ }\mu\text{g/L}$  for non-diluted sample.

#### *Histological assessment of lung tissue*

The two lobes were clamped off and airways were perfused with 10% neutral buffered formalin until the pleura was smooth. The heart/lung/trachea were removed and kept in formalin for 24 hr. The two lobes were removed and inflated with formalin by using a



tissue processor (LEICA TP 1020) over night. The left lobe was embedded in paraffin, sectioned with a microtome (LEICA RM 2125 RT) at 5  $\mu\text{m}$  thicknesses and stained with hematoxylin and eosin (H&E). An inflammation score was determined by two independent investigators blinded to the treatment groups and graded on a scale of 1, 2, 3, and 4 corresponding to no inflammation, mild, moderate, and severe inflammation, respectively.

#### *Statistical analysis*

For continuous parameters, groups were compared using one-way analyses of variance. Following statistically significant results with the ANOVAs, pairwise comparisons were performed using the Tukey procedure. Preliminary assumptions, such as normality of residuals and homoscedasticity of variances, were verified and no major discrepancies were observed. For categorical parameters, groups were compared using the Pearson's chi-square statistic. The significant level was set to 0.05, then results were considered statistically significant for  $p < 0.05$ . All data are presented as means  $\pm$  standard deviations (SD). All statistical analyses were performed using SPSS 9.0, SPSS Inc., 233 South Wacker Drive, Chicago, IL, USA.

## Results

The mean daily chamber temperatures ranged from 22-25°C, and relative humidity from 25-40 %. The average concentration in the inhalation chamber was 252 µg/m<sup>3</sup> quite near the target concentration of 250 µg/m<sup>3</sup> (Table 1). Based on the cascade impactor measurements, the mean MMADs varied between 0.4 and 4.4 µm. According to Raabe *et al.* (1988) data related to the regional deposition of inhaled monodisperse coarse and fine aerosol particles in small laboratory animals (in this case mice), the percentage of the theoretical pulmonary depositions were calculated. These deposition coefficients vary from 0.25 to 40 (Table 1).

Blood and tissue concentrations are presented in Figure 1. Excluding the significant differences between the exposed groups and the controls, the most important results are related to lung concentrations showing a huge discrepancy between Be species and where BeO-F group obtained the highest value followed of Be-F and BeAl-F.

Lung inflammation were significantly different ( $p < 0.05$ ) between controls and exposed groups. Histological scores of Be-F group show more severe effect with 45.5% of moderate inflammation comparing to BeAl-F group with the lowest score (Table 2).

Table 3 shows the urinary concentrations. Control group shows an average of 9 nmol/L, which is significantly different from all exposed groups ( $p < 0.05$ ). For each exposed group, the urine concentrations at weeks 1, 2 and 3 were significantly different from the weeks 0 and 4.

## Discussion

Background urinary level of Be in mice was determined to be about 9 nmol/L (81 pg/ml). This concentration is lower than those of 280–1000 pg/mL established for human (Paschal *et al.*, 1998; Stiefel *et al.*, 1980) or 1580 pg/mL and 830 pg/mL as respectively established by Horng *et al.* (2002) for steel production workers and for controls. In comparison with the controls, all exposed groups have, as expected, significantly higher Be concentration in urine as well as for blood and all tissues analyzed in this study (lung, spleen, liver and kidney).

The kidney is a very efficient organ for the elimination of toxicants from the body and question can be raised by their Be high concentration in BeAl-F group since this group presents the higher urinary excretion. One explanation remains in the relative solubility of BeAl which may lead to low accumulation in lung and as its consequence a higher concentration in kidneys and blood. Inhaled water-soluble Be salts are excreted mainly by the kidneys, with a half-life of 2-8 weeks (Zorn *et al.*, 1988). Also, it seems evident that urinary Be declined rapidly after the cessation of exposure. The mechanism of urinary excretion is probably active tubular secretion, because most of the colloiddally bound plasma beryllium does not pass the glomerulus in the kidney (Reeves, 1986).

The overall results also shows that blood, urine and tissue concentrations are different from one Be specie to another. Urinary excretion of Be continues after the end of exposure. For BeO-F group, Be urine concentrations are stable during the three week of exposure, while those of Be-F and BeAl-F groups reach a peak after the first week of exposure.

According to particle size, BeO-F group obtained the highest theoretical pulmonary deposition rate (Table 1) which can partially lead to the highest Be lung concentration observed. Low urinary concentration for BeO-F is in accordance with other animal studies

which have demonstrated very slow pulmonary clearance for this specie (Sanders *et al.*, 1975; Rhoads and Sanders 1985). It is usually admitted that the retention of Be in the lung can play an important role in the development of lung inflammation (Salehi *et al.*, 2008). But this is not obvious in our study. No greater lung inflammation due to possible ultrafine or nanosize particles could be surmised. Relatively low Be concentrations were found in spleen, liver, kidney and blood for BeO.

On the other hand, even if BeAl-F group obtained the lowest percentage of the theoretical pulmonary deposition because of its size particle, he shows the highest Be urinary concentration, the lowest Be lung concentration and the lowest lung inflammation.

The discrepancy between the expected and the urinary Be levels cannot be well explained and it is not possible that entrapment of the inhaled particles in the lungs is simple enough to account for the proportionately lower concentrations reaching the urine. Perhaps that the deposition and clearance of Be are governed by too many important factors which govern the deposition and clearance of Be and thus, do not allow to consider urine as a good indicator of exposure and toxicity.

Although the level of Be in urine may be informative of the current exposure, it is not useful for quantitative exposure analysis. A similar observation can be made for blood. Although increased levels of Be in urine and blood indicate exposure Be, the amount found may not reflect the level of exposure.

On another perspective, the fact that the effect assessed in this study is related to a local action at the lung level, urinary and blood concentrations of Be can not be used as general indicators of toxicity. In order to determine the real potential of urine and blood as

bioindicators of exposure and toxicity, dose/response studies should be performed for each chemical species.

## **Conclusion**

This study is the first to report lung inflammation in relation to Be concentrations in tissues and biological fluids in mice nose-only exposed to different species of Be. Urine biomonitoring can be used in order to establish baseline levels of chemicals and to examine the relationship between the dose and health effects. However, our results do not allow to establish the usefulness of urinary Be levels as a quantitative indicator of exposure and toxicity with the murine model. More investigations are necessary to study the relationship between external dose, which has to consider the chemical speciation of Be and the exposure.

## **Acknowledgments**

This research was supported by the *Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail* (IRSST), and the Costello Foundation. The authors enormously appreciate the supports of Yves Cloutier, Elmira Aliyeva, Lise Gareau, Natalya Karp, Issa Lozano, Julienne Lama, Brigitte Blanchette, Diane Cormier and Louis Zayed. Dr. Mazer is a Chercheur-National supported by the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## References

ACGIH. 2009. Beryllium and Compounds. In: *Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices*, 7th Edition, pp. 1-14. American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati, OH.

Amicosante M, Fontenot AP. 2006. T cell recognition in chronic beryllium disease. *Clinical Immunol.* 121:134-143.

Apostoli P, Schaller KH. 2001. Urinary beryllium-a suitable tool for assessing occupational and environmental beryllium exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 74:162-166.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2002. *Toxicological profile for beryllium*. Atlanta, GA. Prepared by: Syracuse Research Corporation (MO-015745), Microfiche : PB2003-100135 <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/>

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 1988. *Toxicological Profile for Beryllium*. Prepared by Syracuse Research Corporation under Contract 68-C8-0004. U.S. Public Health Service. ATSDR/TP-88/09.

Cummings KJ, Stefaniak AB, Virji MA, Kreiss K. 2009. A reconsideration of acute beryllium disease. *Environ. Health Perspec.* 117(8):1250-1256

Finch GL, Mewhinney JA, Eidson AF, Hoover MD, Rothenberg, SJ. 1988. *In vitro* dissolution characteristics of beryllium oxide and beryllium metal aerosols. *J. Aerosol Sci.* 19(3): 333-342.

Finch GL, Mewhinney JA, Hoover MD, Eidson AF, Haley PJ, Bice DE. 1990. Clearance, translocation, and excretion of beryllium following acute inhalation of beryllium oxide by beagle dogs. *Fund. Appl. Toxicol.* 15(2): 231-241.



Fontenot AP, Maier LA, Canavera SJ, Hendry-Hofer T.B, Boguniewicz M, Barker EA, Newman LS, Kotzin BL. 2002. Beryllium skin patch testing to analyze T cell stimulation and granulomatous inflammation in the lung. *J. Immunol.* 168: 3627-3634.

Gazette Officielle du Québec. 2006. *Règlement modifiant le Règlement sur la santé et la sécurité du travail.* 20 december 2006, Partie 2 138(51):5793-99.

Henneberger PK, Cumro D, Deubner DD, Kent MS, MaCawley M, Kreiss K. 2001. Beryllium sensitization and disease among long-term and short-term workers in a beryllium ceramics plant. *In. Arch. Occup. Environ. Health* 74: 167-176.

Hornig CJ, Hornig PH, Lin SC, Tsai JL, Lin SR, Tzeng C.C. 2002. Determination of urinary beryllium, arsenic, and selenium in steel production workers. *Biol. Trace Elem. Res.* 88:235-46.

INRS. 2006. *Béryllium et composés minéraux.* Fiche toxicologique no. 92. Paris, Institut national de recherche et de sécurité, 6p.

IRIS. 1998. *Toxicological review of beryllium and compounds.* Washington, DC : U.S. Environmental Protection Agency. (1998). Microfiche : PB98-151756, EPA/635/R-98/008.

Kent MS, Robins TG, Madl AK. 2001. Is total mass or mass of alveolar-deposited airborne particles of beryllium a better predictor of the prevalence of disease? A preliminary study of a beryllium processing facility. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* 16(5):539-58.

Kolanz ME. 2001. Introduction to beryllium : uses, regulatory history and disease. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* 16(5): 559-67.

Krachler M, Radner H, Irgolic KJ. 1996. Microwave Digestion Methods for the Determination of Trace Elements in Brain and Liver Samples by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Fresenius J. Anal. Chem.* 355: 120-128.

Kriebel D, Sprince NL, Eisen EA, Greaves IA, Feldman HA, Greene RE. 1988. Beryllium exposure and pulmonary function: a cross sectional study of beryllium workers. *Br. J. Ind. Med.* 45(3): 167-73.

Kreiss K, Day GA, Schuler CR. 2007. Beryllium: A modern industrial hazard. *Ann. Rev. Pub. Health* 28:259–277.

Nikula KJ, Swafford DS, Hoover MD, Tohulka MD, Finch GL. 1997. Chronic Granulomatous pneumonia and lymphocyte responses induced by inhaled beryllium metal in A/J and C3H/HeJ mice. *Toxicol Pathol.* 25:2-12.

Paschal DC, Ting BG, Morrow JC. 1998. Trace metals in urine of United States residents: reference range concentrations. *Environ. Res.* 76(1):53-59.

Raabe OG, Al-Bayati MA, Teague SV, Rasolt A. 1988. Regional deposition of inhaled monodisperse coarse and fine aerosol particles in small laboratory animals. *Ann. Occup. Hyg.* 32, 53-63. Sup 1.

Rhoads K, Sanders CL. 1985. Lung clearance, translocation, and acute toxicity of arsenic, beryllium, cadmium, cobalt, lead, selenium, vanadium, and ytterbium oxides following deposition in rat lung. *Environ. Res.* 36(2):359-378.

Salehi F, Zayed J, Audusseau S, Muller C, Truchon G, Plamondon P, L'Espérance G, Chevalier G, Mazer B. 2008. Immunological responses in C3H/HeJ mice following inhalation exposure to different sizes of Beryllium metal particles. *J. App Toxicol.* 29: 61-68.

Sanders CL, Cannon WC, Powers GJ, Adee RR, Meier DM. 1975. Toxicology of high-fired beryllium oxide inhaled by rodents. II. Metabolism and early effects. *Arch. Environ. Health* 30(11):546-551.

Sawyer RT, Maier LA, Kittle LA, Newman LS. 2002. Chronic Beryllium disease: a model interaction between innate and acquired immunity. *Int. Immunopharmacol.* 2: 249-261.

Stefaniak AB, Day GA, Hoover MD, Breyse PN, Scripsick RC. 2006. Differences in dissolution behavior in a phagolysosomal stimulant fluid for single-constituent and multi-constituent materials associated with beryllium sensitization and chronic beryllium disease. *Toxicol. In Vitro* 20(1): 82-95.

Stefaniak AB, Hoover MD, Dickerson RM, Day GA, Breyse PN, Scripsick RC. 2007. Differences in estimates of size distribution of beryllium powder materials using phase contrast microscopy, scanning electron microscopy, and liquid suspension counter techniques. *Part. Fiber Toxicol.* 4: 3.

Stiefel T, Schulze K, Zorn H. 1980. Toxicokinetic and toxicodynamic studies of beryllium. *Arch. Toxicol.* 45:81-92.

**Table 1**

**Beryllium mass median aerodynamic diameter (MMAD), atmospheric concentration  
in the inhalation chamber  
and theoretical pulmonary deposition of Be particles**

<b>Chemical forms</b>	<b>MMAD (<math>\mu\text{m} \pm \text{SD}</math>) (n=14)</b>	<b>Concentration (<math>\mu\text{g}/\text{m}^3 \pm \text{SD}</math>) (n=35)</b>	<b>Theoretical pulmonary deposition<sup>1</sup> (%)</b>
Be-F	$1.50 \pm 0.12$	$254 \pm 31$	11
BeO-F	$0.41 \pm 0.03$	$248 \pm 10$	40
BeAl-F	$4.40 \pm 1.64$	$253 \pm 49$	0.25

<sup>1</sup> According to Raabe *et al.*, (1988) data

**Table 2**

**Histological scores of lung inflammation for the control group and for mice  
nose-only exposed to Be-F, BeO-F and BeAl-F**

(1: no inflammation, 2: mild inflammation, 3: moderate inflammation, 4: severe inflammation)

	<b>Histological score</b>			
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Controls</b>	95.5%	4.5%	0	0
<b>Be-F</b>	0	54.5%	45.5%	0
<b>BeO-F</b>	22.7%	63.6%	13.6%	0
<b>BeAl-F</b>	44.4%	55.6%	0	0

Table 3

**Urinary Be (nmol / L  $\pm$  SD) for the control group and for mice nose-only exposed to Be-F, BeO-F and BeAl-F**

	Before exposure	After 1 <sup>st</sup> week of exposure	After 2 <sup>nd</sup> week of exposure	After 3 <sup>rd</sup> week of exposure	One week after the end of exposure
<b>Control</b>	14.1 $\pm$ 5.5	9.2 $\pm$ 3.6	7.7 $\pm$ 4.3	10.5 $\pm$ 5.8	5.2 $\pm$ 2.4
<b>Be-F</b>	16.4 $\pm$ 14.5	374.1 $\pm$ 157.7*	341.6 $\pm$ 148.5*	262.3 $\pm$ 85.4*	60.4 $\pm$ 11.0**
<b>BeO-F</b>	10.6 $\pm$ 9.1	91.4 $\pm$ 38.0*	82.3 $\pm$ 17.6*	91.2 $\pm$ 18.7*	58.4 $\pm$ 8.4**
<b>BeAl-F</b>	9.6 $\pm$ 3.3	499.5 $\pm$ 1050.7*	263.1 $\pm$ 67*	336.9 $\pm$ 188.7*	93.7 $\pm$ 103.3**

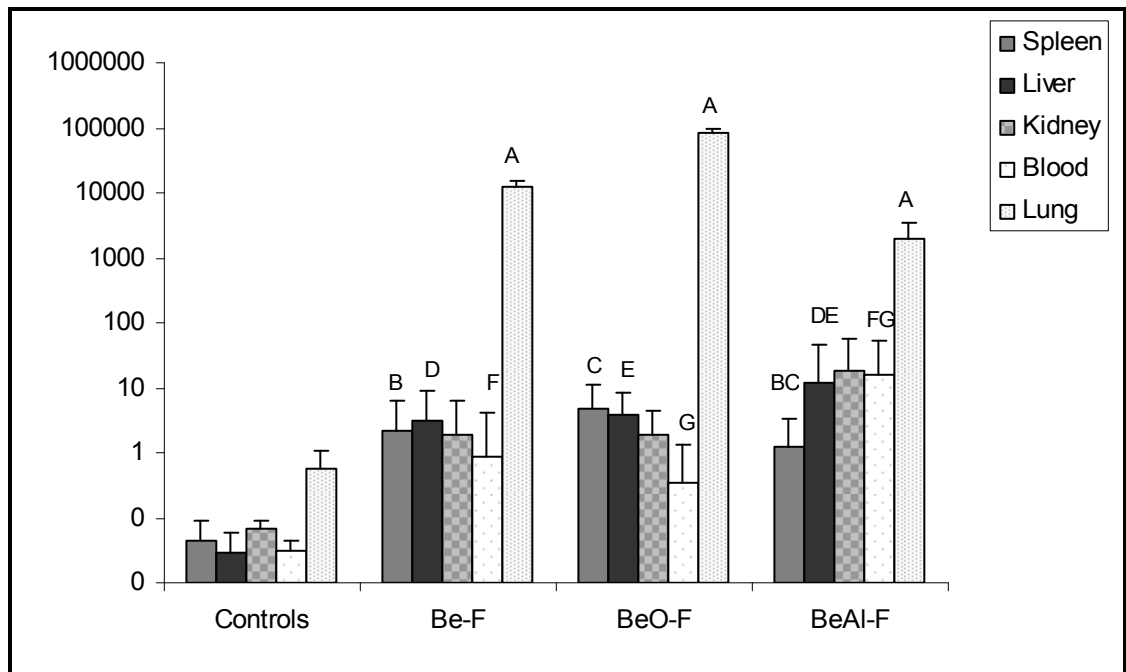
All exposed groups were significantly different from the controls ( $p < 0.05$ )

Means with \* are significantly different from the values at pre-exposure and post-exposure ( $p < 0.05$ )

Mean with \*\* is significantly different from the value at pre-exposure ( $p < 0.05$ )

Figure 1

**Blood (pg/ml) and tissue (ng/g) Be concentrations for controls compared to mice nose-only exposed to Be-F, BeO-F and BeAl-F**



All exposed groups were significantly different from the controls ( $p < 0.05$ )

Means with the same letter are significantly different ( $p < 0.05$ )

# **Article troisième: Beryllium contamination and exposure monitoring in an inhalation laboratory setting**

**Running Title: Beryllium Monitoring**

Caroline Muller<sup>1</sup>, Séverine Audusseau<sup>2</sup>, Fariba Salehi<sup>2</sup>, Ginette Truchon<sup>3</sup>,  
Gaston Chevalier<sup>4</sup>, Bruce Mazer<sup>2</sup>, Greg Kennedy<sup>5</sup>, Joseph Zayed<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Environmental and Occupational Health, University of Montreal,  
<sup>2</sup>Meakins-Christie Laboratories, McGill University, <sup>3</sup>Institut de recherche Robert-Sauvé en  
santé et en sécurité du travail (IRSST), <sup>4</sup>Department of Biological Sciences, University of  
Quebec in Montreal, <sup>5</sup>Department of Engineering Physics, École Polytechnique de  
Montréal.

Ce manuscrit a été accepté (décembre 2009) pour publication dans la revue "Toxicology  
and Industrial Health".

Address correspondence:

Joseph Zayed, Ph.D.

Department of Environmental and Occupational Health

Faculty of Medicine

University of Montreal

P.O. Box 6128, Main station

Montreal, Quebec

Canada, H3C 3J7

Phone : (514) 343-5912

Fax : (514) 343-2200



## **Abstract**

Beryllium (Be) is used in several forms: pure metal, beryllium oxide, and as an alloy with copper, aluminum, or nickel. Beryllium oxide, beryllium metal and beryllium alloys are the main forms present in the workplace with inhalation being the primary route of exposure. Cases of workers with sensitization or chronic beryllium disease challenge the scientific community for a better understanding of Be toxicity. Therefore, a toxicological inhalation study using a murine model was performed in our laboratory in order to identify the toxic effects related to different particle sizes and chemical forms of Be. This paper attempts to provide information regarding the relative effectiveness of the environmental monitoring and exposure protection program that was enacted to protect staff (students and researchers) in this controlled animal beryllium inhalation exposure experiment. This includes specific attention to particle migration control through intensive housekeeping and systematic airborne and surface monitoring. Results show that the protective measures applied during this research have been effective. The highest airborne Be concentration in the laboratory was less than one-tenth of the Quebec TLV of  $0.15 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Considering the protection factor of  $10^3$  of a powered air purifying respirator cover used in this research, the average exposure level would be  $0.03 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\text{m}^3$  which is extremely low. Moreover, with the exception of one value, all average Be concentrations on surfaces were below the Quebec Standard guideline level of  $3 \mu\text{g}/100\text{cm}^2$  for Be contamination. Finally, all beryllium lymphocyte proliferation tests for the staff were not higher than controls.

## Introduction

Beryllium (Be) is a silver-gray metallic element with high stiffness. Compared to other metals, Be is very light, has a high melting point, low electrical conductivity, superior strength and stiffness, high thermal conductivity, and most alloys are highly resistant to corrosion (DOE, 1999). Be is used in several forms: as a pure metal, as beryllium oxide, and as an alloy with copper, aluminum, or nickel. Be oxide, Be metal and Be alloys are the forms present in the workplace today with inhalation being the primary route of exposure (DOE, 1999; Rouleau *et al.*, 2005)

Exposure to Be can cause sensitization (BeS) in a relatively high percentage (as high as 15%) of the exposed population. Chronic beryllium disease (CBD) may develop after subsequent exposure and sometimes from a single exposure. Individuals who are only sensitized are asymptomatic and not physically impaired. CBD is a progressive granulomatous lung disease that is characterized by mononuclear cell infiltration and granulomatous inflammation in the lungs (Saltini *et al.*,; Newman *et al.*, 2005). For those who develop CBD, the rate of progression and severity of the disease may be of the order of 30% to 80%. Be toxicity may depend upon particle properties including particle number, concentration or size of the particles (McCawley *et al.*, 2001), surface area (Stefaniak *et al.*, 2003), and chemical form (Stefaniak *et al.*, 2004). Recent developments on multiple exposure pathways that may lead to Be sensitization and CBD suggest that a prudent approach to worker protection implies the assessment both skin and inhalation exposures (Day *et al.* 2006). Moreover, immunologic and genetic factors are involved to the development of BeS and CBD (Stefaniak *et al.*, 2006).

Once sensitization has occurred, it is medically prudent to prevent additional exposure to Be. Individuals with CBD have a clinical illness varying from mild to severe. In severe cases, the affected individuals may be permanently and totally disabled. Lung cancer has

also been associated with exposure to Be (Sanderson *et al.*, 2001). The beryllium-induced lymphocyte proliferation test (BeLPT), conducted on peripheral blood, is used in several cases and allows for the detection of sensitization and is recommended as a screening tool. The BeLPT is highly specific for beryllium sensitivity and has a high predictive value for beryllium disease (Stephan *et al.*, 2009).

Cases of workers with BeS or CBD challenge the scientific community for a better understanding of Be toxicity. In 2007, Quebec province reduced the TLV from  $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$  to  $0.15 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , for an 8-hour time-weighted average (Government of Quebec, 2006), while the Environmental Sub-committee on Be proposed a reference level of  $0.2 \mu\text{g}/100 \text{ cm}^2$  as criteria for the presence of Be in wipe samples and  $3 \mu\text{g}/100 \text{ cm}^2$  as a guideline level for contamination. In order to increase our knowledge on Be toxicity, an inhalation toxicological study was performed in our laboratory and several papers were published or submitted for publication (Salehi *et al.*, 2008; Drolet-Vives *et al.*, 2009).

This paper attempts to provide information regarding the relative effectiveness of the Be contamination and exposure monitoring that was enacted to protect staff (students and researchers) in this controlled animal beryllium exposure experiment.

## Methods

The toxicological study was a 1.5 year experiment that was carried out using a nose-only exposure chamber to expose mice to fine ( $< 5\mu\text{m}$ ) and total particles with three different beryllium chemical forms (Be, BeO and BeAl alloy). About 2 000 mg of Be powder were used, including 300 mg for the pre-experimentation and 1 400 mg for the duration of the exposure. Theoretically, 600 mg (100 mg per Be specie/particle size) were needed for all exposures in order to reach a level of  $250\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ . This means that about 1100 mg did not reach the inhalation chamber. Such powder was mainly adsorbed on the feed air pipes or partially emitted in the air of the generator unit box and in the exposure box and than to the laboratory.

### *Inhalation Exposure*

The exposure was conducted in a metal, nose-only inhalation chamber. Air was filtered and Be aerosol was generated by a Fluidized Bed Aerosol Generator. The concentrations of Be in the nose-only inhalation chamber were verified continuously by means of a leading spray monitor DustTrak directly connected to one hole of the inhalation apparatus. Details are given in the paper by Salehi et al. (2008).

### *Human exposure and monitoring*

The laboratory was a restricted work zone and was clearly identified as a beryllium work area. The laboratory was maintained at negative pressure and had local exhaust ventilation, connected to a HEPA filter with an exit outside the building.

The two boxes containing the nose-only inhalation chamber and the generator unit (Figure 1) were also under negative pressure and were connected to a HEPA filtering

system capable of trapping at least 99.97 % of particles with a diameter of 0.3  $\mu\text{m}$ . The laboratory room and the two boxes underwent 6 air exchanges per hour.

Work practices were developed to prevent contamination. Training and information on risks and preventive measures were given to the staff and procedures were both written and orally communicated. Procedures were mainly related to protective clothing, respiratory protection, personal hygiene, housekeeping, human and environmental monitoring and decontamination methods. A changing room was provided for staff (technicians and graduate students). Dedicated showers were provided and workers were required to shower after removing protective clothing and before changing into personal clothing.

For respiratory protection, quantitative and qualitative fitness testing and respirator training were done prior to work, with the assistance of a professional consultant (AEROTOX INC., Montreal). Staff were obliged to wear a complete head cover offering a protection factor of  $10^3$  (3M, Breathe Easy 12 polycoated Tyvek, Levitt Safety Limited, Ontario, Canada) connected to a breathing tube assembly with a HEPA filter. Before entering into the laboratory, staff had to wear a first pair of gloves, an inner disposable Tyvek coverall (with shoe and head coverings) and a complete mask. Once in the laboratory, the staff had to wear a second pair of gloves and an outer coverall before the beginning of the experiment.

Before leaving the laboratory, the staff had to remove and dispose of the second coverall as well as the second pair of gloves. Sampling of Be dust on the first coverall was done with a filter of area  $900\text{ cm}^2$ , moistened on 80 % of its surface with demineralised water. Each sampling area covered  $100\text{ cm}^2$ . Then the first coverall, the outer mask and the first pair of gloves were washed with a disposable wet wipe. After re-entering the hatch, the first coverall, the mask and the gloves were removed. The coverall and the gloves were disposed of while the inner part of the mask was sampled for Be dust and then washed with a wet

wipe. Sampling inside the mask was dictated in order to measure its effectiveness. Each mask was used for one month before being discarded. The use of personal items was not allowed in the laboratory as well as eating, drinking, smoking or applying cosmetics.

Daily cleaning of devices, mice and surfaces which could be contaminated was done with disposable wet linen. A thorough housekeeping of the laboratory and the laboratory room and the hatch room was performed once a week. Wet cleaning methods were applied for particulate removal from walls and working surfaces. Vacuum cleaning with high efficiency particulate air (HEPA) was used to remove particulates from surface equipment and floor. The exposure box and generator gloveboxes were washed outside and inside with soapy water. All the measuring devices, counters, doors, floors, hoods and trolley on which mice were transported were washed. The hatch, its walls, floor and bench were also washed.

At the end of the each experiment (for a given chemical form of Be), all the sources of Be were removed from the laboratory and the generator was cleaned with soapy water, as well as the inhalation chamber and the two boxes. All the measuring devices, the animal husbandry cabinet, counters, doors, floors, hood and trolley on which mice were transported were washed with soapy water. The hatch, its walls, floor and bench were also washed. Moreover, cleaning with soapy water was performed for the closed installations, i.e. the closed system of pipes through which Be passed from the generator to the IN-TOX. Pipes were soaked in soapy water 24 hours and then washed with a brush, then again soaked in soapy water for 2 hours and rinsed in clean water 4 times.

Finally, at the very end of the study, we carried out a triple cleaning of the entire laboratory and its components.

### *Air and surface sampling*

Air samples were collected 5 d/week, 6 hr/d in the exposure box and in the middle of the laboratory. Sampling was carried out with a Gilian pump (Gilian Corp. West Caldwell, N.J.) with a standard 3-piece cassette and 37 mm diameter filters. The filters were Teflon (manufactured for SKC Inc., Gelman Sciences, MI) with a 0.45  $\mu\text{m}$  pore size. Pumps were used at a constant flow rate of 1.5 L/min. The flow rate was calibrated each time, before and after the sampling, with a Gilibrator (Gilian Corp. West Caldwell, N.J.). Once a week sampling of surface dust was taken at several strategic places (exposure box, lavatory, laboratory door, laboratory floor, counter, hood, trolley, hatch bench, and hatch floor) using the same methods as for coverall and mask sampling.

Several reasons have led to the decision that personal breathing zone sampling was neither required nor appropriate: the staff was obliged to wear a complete head cover connected to a breathing tube assembly with a HEPA filter; the laboratory was quite small (10 m x 5 m); the protective clothing, including wearing a pump for air filtration was already experiencing enough.

### *Be analysis*

Samples were analyzed by inductively coupled plasma-mass spectrometry ICP-MS. Briefly, filters and wipe samples were solubilized by acid digestion ( $\text{HNO}_3\text{-HCL}$ ), after which the solution was introduced into the plasma in the form of an aerosol.

### *Staff BeLPT tests*

Monitoring for early detection of Be effects was done with the Beryllium lymphocyte proliferation test (BeLPT), which screens for Be sensitization by measuring proliferation of T cells to  $\text{BeSO}_4$ . Blood tests took place before the beginning of the experiment, then once a month during the experiment and finally at 6 months after the end of the study. Blood sampling and BeLPT were done at the Meakins-Christie Laboratories (McGill University,

Montreal, Canada). Blood mononuclear cells were cultured ( $2.5 \times 10^5$  cells) in 96-well flat-bottom microtiter plates. Cells labelled by tritiated-thymidine incorporation at a final concentration of 1  $\mu\text{Ci/ml}$  (MP Biomedical, specific activity, 60 Ci/mmol) for 18 hr after four days and six days of stimulation. Cells were harvested in a Micro96 Harvester (Skatron Instruments, 11055, Haverhill, MA) and radioactive  $\beta$ -emission was measured by scintillation counting (Wallac Inc., Perkin Elmer, Trilux 1450-024 Microbeta, Waltham, MA). All results were posted on the outside door of the hatch.



## Results

The average airborne Be concentration obtained in the inhalation chamber varied from 253 to 285  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (Table 1). All concentrations were close to the target of 250  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ .

All individual data as well as the mean airborne Be concentration in the laboratory were always under the Quebec TLV of 0.15  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . However, the exposure box showed occasionally higher levels (Table 2).

All average Be concentrations on surfaces were below the Quebec guideline level for Be contamination, with one exception. In fact, Be concentrations in the inhalation chamber glovebox were relatively high, showing several values exceeding the Quebec guideline levels of 0,2  $\mu\text{g}/100 \text{ cm}^2$  for the presence of Be or 3  $\mu\text{g}/100 \text{ cm}^2$  for Be contamination (Table 3). All values for the hatch (Table 3) as well as for the masks (Table 4) were below the guideline levels while those for the coveralls (Table 4) exhibited two values higher than the guideline for the presence of Be.

Table 5 shows that even after three cleanings of the entire laboratory and its components after the end of the study, Be concentrations in the generator unit box were still higher than the guideline level for the presence of Be. However, none of the obtained values were higher than the guideline level of contamination. All BeLPT studies on personnel were comparable to proliferation levels of unexposed individuals, indicating no evidence of immunologic sensitization.

## Discussion

Air and surface dust monitoring were used to determine the presence of Be and to determine the source of Be contamination, to check the effectiveness of routine housekeeping and cleanup activities, and to make sure that all objects used in a Be-containing environment were cleaned thoroughly enough to be used in a Be-free area. Moreover, preventive and protective measures were applied to reduce exposure to a minimum and to prevent the spread of Be particules to Be-free areas.

One of the major goals of the monitoring carried out throughout the experimental work was to maintain as low as possible the inhalation exposure of technicians (including graduate students) to Be. Results presented in table 2 show an average of  $0.003 \mu\text{g}/\text{m}^3$  for airborne Be. Considering the protection factor of the head cover ( $10^3$ ), the calculated exposure would be  $0.3 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{m}^3$ . This is extremely low compared to the TLV of  $0.15 \mu\text{g}/\text{m}^3$  for Quebec.

Surprisingly, the concentration under the head cover showed no relation to the level of airborne Be in the laboratory. The highest concentration of  $0.01 \mu\text{g}/\text{m}^3$  in the laboratory did not lead to the highest concentration under the head cover ( $0.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ). This latter concentration was probably due to the exposure in the exposure box during the manipulation where the concentration was as high as  $6.7 \mu\text{g}/\text{m}^3$ .

At the end of each day of exposure the inhalation chamber was opened in order to recover the mice. The manipulations required likely led to a resuspension in the air of Be particles that had deposited on the surface of the chamber. During the use of the fine BeAl alloy, a mechanical problem with a pipe was observed, causing the only surface contamination that occurred during the inhalation toxicology studies.

This also explains the very high concentration of  $26 \mu\text{g}/\text{m}^3$  obtained in the generator box after the first cleaning (table 5). Overall, except inside the two boxes (for the generator and for the inhalation chamber, figure 1), all wipes did not vary significantly and are under the level of contamination.

We conclude that the protective measures applied during this research were effective. However, it is possible that the requirement of wearing a double Tyvek coverall was an overprotection and was not really appropriate because it was waterproof and increased the heat stress on the technicians. Perhaps a cotton coverall would be more appropriate. In a previous study, no Be was found on skin of workers wearing a cotton cloth coverall protection (Emond *et al.*, 2007).

However, we recall that the beginning of this research coincided with an important debate on the toxicity of Be, when existing standards were considered not sufficiently protective. The risk of BS or CDB had caused fear among industrial workers exposed to Be and no less among the technicians and graduate students involved in the project. It was therefore very important to ensure their safety and take ultimate precautions, to allow them to feel safe. It was also our obligation to ensure the university ethics committee that all protective measures were considered.

The importance of studying Be related diseases is obvious considering the number of exposed individuals and the rising incidence of the disease. This study is an example of a rigorous approach to control and reduce the level of contamination and the potential of exposure in an inhalation laboratory setting. This included specific attention to the control of particle migration through intensive housekeeping and systematic surface and airborne monitoring. Procedures such as these set a standard for future protocols examining the contribution of Be exposure to disease.

## **Acknowledgments**

This research was supported by the Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail. The authors enormously appreciate the technical supports of Lise Gareau, Elmira Aliyeva and Louis Zayed. Dr. Mazer is a Chercheur-National supported by the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

## References

Day, GA, Stefaniak AB, Weston A, Tinkle SS (2006) Beryllium exposure: dermal and immunological considerations. *Int Arch Occup Environ Health* 79(2):161-164.

DOE (Department of Energy): Chronic Beryllium Disease Prevention Program; Final Rule. *Federal Register* / Vol. 64, No. 235 (1999).

Drolet-Vives, K, Zayed J, Sauve, S (2009) Assessment of hair and bone accumulation of beryllium by mice exposed to contaminated dusts. *J Appl Toxicol*. May 29. [Epub ahead of print]

Emond, C, Robin, JP, Breton, R, Philippe, S, Zayed, J (2007) Dermal exposure to beryllium: a pilot case study. *J Toxicol Environ Health* 70: 529–533.

Government of Quebec. *Gazette officielle du Québec* : Part 2, 2006, 138, no 51, 5793–5799.

McCawley, MA, Kent MS, Berakis, MT (2001) Ultra fine beryllium number concentration as a possible metric for chronic beryllium disease risk. *Appl Occup Environ Hyg* 16: 631–638.

Newman, LS, Mroz, MM, Balkissoon R, Maier, LA (2005) Beryllium sensitization progresses to chronic beryllium disease: a longitudinal study of disease risk. *Am J Respir Crit Care Med* 171: 54–60.

Rouleau, M, Dion, C, Plamondon, P, L'Espérance G, Zayed, J (2005) Physical and chemical characterization of beryllium particles from several workplaces in Québec (Canada) – Part B: Time-of-flight secondary ion mass spectroscopy. *J Toxicol Environ Health* 68:1907–1916.

Salehi, F, Zayed, J, Audusseau, S, Chevalier, G, Muller, C, Truchon, G, Mazer, B (2008) Immunological responses in C3H/HeJ mice following nose-only inhalation exposure to different sizes of beryllium metal particles. *J Appl Toxicol* 29: 61–68.

Saltini, C, Winestock, K, Kriby, M, Pinkston, P, Crystal, RG (1989) Maintenance of alveolitis in patients with chronic beryllium disease by beryllium-specific helper T cells. *N Engl J Med* 320: 1103–1109.

Sanderson, WT, Ward, EM, Steenland K, Peterson, MR (2001) Lung cancer case–control study of beryllium workers. *Am J Ind Med* 39: 133–144.

Stefaniak, AB, Hoover, MD, Dickerson, RM, Peterson, EJ, Day, GA, Breysse, PN, Kent, MS, Scripsick, RC (2003) Surface area of respirable beryllium metal, oxide, and copper alloy aerosols and implications for assessment of exposure risk of chronic beryllium disease. *Am Ind Hyg Assoc J* 64: 297–305.

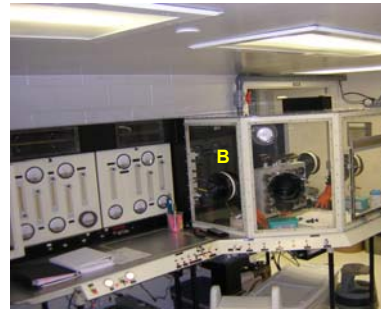
Stefaniak, AB, Hoover, MD, Day, GC, Dickerson, RM, Peterson, EJ, Kent, MS, Schuler, CR, Breysse PN, Scripsick RC (2004) Characterization of physicochemical properties of beryllium aerosols associated with prevalence of chronic beryllium disease. *J Environ Monit* 6: 523–532.

Stefaniak, AB, Weston, A, Tinkle, SS (2006) Beryllium exposure: dermal and immunological considerations. *Int Arch Occup Environ Health* 79: 161–164.

Stephan, CH, Sauve, S, Fournier M, Brousseau, P (2009) Use of proliferation tests to evaluate the effects of complexing agents on beryllium toxicity. *J Appl Toxicol* 29: 27–35.

**Figure 1**

Views of the (A) aerosol generator unit glovebox enclosure,  
(B) exposure chamber box, (C) inhalation chamber,  
and (D) animal handling trolley





**Table 1**

Mean atmospheric concentrations  
during the inhalation exposure of mice to Be

Chemical Form	N	Mean atmospheric concentration ( $\mu\text{g}/\text{m}^3 \pm \text{SD}$ )
Be – total	35	$285 \pm 32$
Be – fine	35	$254 \pm 31$
BeO – total	35	$267 \pm 27$
BeO – fine	35	$248 \pm 10$
BeAl – total	35	$275 \pm 8$
BeAl – fine	35	$253 \pm 49$

**Table 2**  
**Average airborne Be ( $\mu\text{g}/\text{m}^3 \pm \text{SD}$ ) in the laboratory and in the exposure box**  
**during the inhalation toxicology studies**

	<b>Be – total (n=35)</b>	<b>Be – fine (n=35)</b>	<b>BeO – total (n=35)</b>	<b>BeO – fine (n=35)</b>	<b>BeAl – total (n=35)</b>	<b>BeAl – fine (n=35)</b>
<b>LAB</b>	0.0002 ± 0.0001	0.003 ± 0.003	0.0004 ± 0.001	0.0010 ± 0.001	0.01 ± 0.02	0.004 ± 0.002
<b>Exposure box</b>	0.23* ± 0.3	0.26* ± 0.06	0.005 ± 0.003	0.095 ± 0.05	0.7* ± 1.4	0.07 ± 0.1

\* Indicates values higher than the Quebec TLV of  $0.15 \mu\text{g}/\text{m}^3$

**Table 3**

**Average Be concentration ( $\mu\text{g}/100\text{cm}^2 \pm \text{SD}$ ) on surfaces  
during the inhalation toxicology study**

	<b>Be – total (n=7)</b>	<b>Be – fine (n=7)</b>	<b>BeO – total (n=7)</b>	<b>BeO – fine (n=7)</b>	<b>BeAl – total (n=7)</b>	<b>BeAl – fine (n=7)</b>
<b>Exposure box</b>	0.87* $\pm$ 1.2	0.05 $\pm$ 0.04	0.58* $\pm$ 0.7	0.21* $\pm$ 0.04	0.60* $\pm$ 0.4	6.7** $\pm$ 1.2
<b>Lavatory</b>	0.30* $\pm$ 0.4	0.01 $\pm$ 0.005	0.15 $\pm$ 0.2	0.03 $\pm$ 0.05	0.35* $\pm$ 0.3	0.06 $\pm$ 0.05
<b>Laboratory door</b>	ND	ND	0.17 $\pm$ 0.05	0.05 $\pm$ 0.05	0.08 $\pm$ 0.001	<LOD
<b>Counter</b>	0.02 $\pm$ 0.02	0.01 $\pm$ 0.01	<LOD	<LOD	0.16 $\pm$ 0.06	<LOD
<b>Laboratory floor</b>	ND	ND	0.80* $\pm$ 0.3	<LOD	2.18* $\pm$ 3	0.31* $\pm$ 0.05
<b>Hood</b>	0.04 $\pm$ 0.04	0.02 $\pm$ 0.05	0.70* $\pm$ 0.8	0.03 $\pm$ 0.05	0.52* $\pm$ 0.1	0.15 $\pm$ 0.1
<b>Trolley</b>	ND	ND	0.09 $\pm$ 0.08	<LOD	0.10 $\pm$ 0.002	<LOD
<b>Airlock bench</b>	0.07 $\pm$ 0.05	0.04 $\pm$ 0.02	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
<b>Airlock floor</b>	0.01 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01	<LOD	<LOD	0.05 $\pm$ 0.02	<LOD

\* Indicates values higher than the guideline level of 0.2  $\mu\text{g}/100\text{cm}^2$  for the presence of Be.

\*\* Indicate value higher than the guideline level of 3  $\mu\text{g}/100\text{cm}^2$  for Be contamination.

ND: Not Determined.

LOD: Limit of Detection (0.05  $\mu\text{g}/100\text{cm}^2$ ).

**Table 4**

**Average Be concentration ( $\mu\text{g}/100\text{cm}^2 \pm \text{SD}$ ) on protective clothing  
during the inhalation toxicology study**

	<b>Be – total (n=7)</b>	<b>Be – fine (n=7)</b>	<b>BeO – total (n=7)</b>	<b>BeO – fine (n=7)</b>	<b>BeAl – total (n=7)</b>	<b>BeAl – fine (n=7)</b>
<b>On the coverall (Animal keeper)</b>	0.11 $\pm$ 0.07	0.02 $\pm$ 0.05	0.09 $\pm$ 0.07	0.03 $\pm$ 0.07	0.29* $\pm$ 0.1	ND
<b>Under the head cover (Animal keeper)</b>	0.006 $\pm$ 0.008	<LOD	<LOD	<LOD	0.006 $\pm$ 0.005	ND
<b>On the coverall (Technician)</b>	0.15 $\pm$ 0.2	0.09 $\pm$ 0.05	0.18 $\pm$ 0.1	0.04 $\pm$ 0.04	<LOD	0.28* $\pm$ 0.3
<b>Under the head cover (Technician)</b>	0.01 $\pm$ 0.02	<LOD	<LOD	<LOD	0.03 $\pm$ 0.02	0.1 $\pm$ 0.2

\* Indicates values higher than the guideline level of 0.2  $\mu\text{g}/100\text{cm}^2$  for the presence of Be.

ND: Not Determined.

LOD: Limit of Detection (0.05  $\mu\text{g}/100\text{cm}^2$ ).

**Table 5**  
**Average Be concentration ( $\mu\text{g}/100\text{cm}^2$ ) on surfaces**  
**at the end of the inhalation toxicology study**

	<b>After the 1st cleaning</b>	<b>After the 2nd cleaning</b>	<b>After the 3rd cleaning</b>
<b>Hood (inside)</b>	0.25*	0.07	<LOD
<b>Hood (outside)</b>	0.23*	0.07	<LOD
<b>Animal husbandry cage (outside)</b>	0.38*	0.10	<LOD
<b>Animal husbandry cage (inside)</b>	0.80*	0.09	<LOD
<b>Exposure box</b>	5.7**	0.28*	0.19
<b>Generator unit box</b>	26**	13**	0.30*
<b>Airlock bench</b>	0.26*	0.10	<LOD
<b>Airlock floor</b>	1.2*	<LOD	<LOD

---

<b>Laboratory floor (1)</b>	0.84*	0.11	<LOD
<b>Laboratory floor (2)</b>	1.9*	0.10	<LOD
<b>Inhalation chamber counter</b>	0.37*	6.8**	0.10
<b>Trolley</b>	1.0*	0.14	<LOD
<b>Laboratory door</b>	0.12	<LOD	<LOD

---

\* Indicates values higher than the guideline level of 0.2  $\mu\text{g}/100\text{ cm}^2$  for the presence of Be.

\*\* Indicates values higher than the guideline level of 3  $\mu\text{g}/100\text{ cm}^2$  for Be contamination.

LOD: Limit of Detection (0.05  $\mu\text{g}/100\text{cm}^2$ ).

## **Article quatrième: Immunological responses in C3H/HeJ mice following nose-only inhalation exposure to different sizes of beryllium metal particles**

Fariba Salehi<sup>1</sup>, Joseph Zayed<sup>2</sup>, Séverine Audusseau<sup>1</sup>, Caroline Muller<sup>2</sup>, Ginette Truchon<sup>3</sup>, Philippe Plamondon<sup>4</sup>, Gilles L'Espérance<sup>4</sup>, Gaston Chevalier<sup>5</sup>, Bruce Mazer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Meakins-Christie Laboratories, McGill University, <sup>2</sup>Department of Occupational and Environmental Health, University of Montreal, <sup>3</sup>Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST), <sup>4</sup>Centre de caractérisation microscopique des matériaux, École Polytechnique, <sup>5</sup>Department of Biological Sciences, University of Quebec at Montreal

Corresponding author

Joseph Zayed, Ph.D.

Department of Environmental and Occupational Health

Faculty of Medicine

Université de Montréal

C.P. 6128 Succursale Centre-Ville,

Montréal, Québec

Canada, H3C 3J7

Telephone : (514) 343-5912

Fax : (514) 343-2200

## Abstract

Beryllium is used in a wide variety of industries. Chronic beryllium disease is the most common occupational disease among workers following exposure to Be. The objective of this study was to determine the immunologic effects of two different particle sizes of Be metal,  $<2.5 \mu\text{m}$  (fine Be or Be-F) and  $<10 \mu\text{m}$  (inhalable Be or Be-I) on C3H/HeJ mice following three weeks of nose-only inhalation exposure at a target concentration of  $250 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Mice were sacrificed either on day 28 or day 42 (Be-F group only) after exposure. The mass median aerodynamic diameter (MMAD) obtained in the inhalation chamber was  $1.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$  for Be-F and  $4.1 \pm 0.6 \mu\text{m}$  for Be-I. Results showed peri-bronchial inflammation with early granulomatous changes in exposed mice. The extent of the inflammation appeared more severe for mice sacrificed at day 42. Splenocyte proliferation was higher for mice exposed to fine particles compared to Be-I and control animals. Flow-cytometric analysis indicated a significantly greater expression of  $\text{CD4}^+$ ,  $\text{CD8}^+$ , and intracellular  $\text{IFN-}\gamma$  expression for both Be particle sizes, particularly for fine particles. Cytokine assays of bronchoalveolar lavage (BAL) revealed significantly greater levels of IL-12,  $\text{TNF-}\alpha$ , and  $\text{IFN-}\gamma$  for mice exposed to fine particles. Our findings suggest that exposure to fine particles may induce more pronounced immunological effects than inhalable particles.

KEY WORDS: Beryllium metal, particle size, lung inflammation, T cells proliferation, cytokine secretion, nose-only inhalation



## Introduction

Be is a naturally occurring metal found in over 30 minerals in rocks, coal, oil, soil, and volcanic dust. Be is characterized by low density, high melting point, and extreme stiffness. Therefore, it is used in a wide variety of applications such as aerospace, automotive, ceramics, electronics, and defense industries. Despite its utility, workers exposed to Be particles (e.g. Be metal or BeO) may develop sensitization (BeS) or chronic beryllium disease (CBD) (Sawyer *et al.*, 2002; Newman *et al.*, 1998). CBD is a progressive granulomatous lung disease that is characterized by mononuclear cell infiltration and granulomatous inflammation in the lungs (Saltini *et al.*, 1989). The immunological reactions observed in affected individuals are Be-specific hypersensitivity responses involving CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, production of T helper 1 (Th1) type cytokines and the subsequent generation of granulomatous inflammation in the lung (Amicosante *et al.*, 2006; Fontenot *et al.*, 2002a; Saltini *et al.*, 1989).

Approximately 50% of BeS patients may ultimately progress to CBD (Kreiss *et al.*, 1997). Many studies have documented that BeS and CBD can occur in workers exposed to airborne Be concentration even lower than the recommended time-weight-average exposure limit of 2 µg/m<sup>3</sup> (Kreiss *et al.*, 1997; OSHA, 2005; Schuler *et al.*, 2005). Accordingly, other factors than the mean air Be concentration may correlate with induction of adverse health effects. These factors might include particle size, chemical form, duration of exposure, and genetic susceptibility of individuals (Henneberger *et al.*, 2001; Kent *et al.*, 2001; Maier *et al.*, 2003). According to Kent *et al.* (2001), Be particles less than 3.5 micron are more relevant to elevating the prevalence of CBD or BeS than the larger particles. Thus, particle sizes may influence biological activity of Be aerosols following inhalation exposure (Stefaniak *et al.*, 2007).

To better understand the effect of particle sizes with prevalence of BeS and CBD, we developed a murine model in our laboratories that will address the magnitude of particle

sizes of Be particles on immunological changes similar to those observed in human. The specific main objective of this study was to determine the role of two different particle sizes of Be metal in the development of pulmonary disease, T cell activation, and production of Th1 type cytokines. Consequently, this animal model may help to enhance our knowledge and identify scientifically based thresholds to protect workers against CBD.

## Methods

### Animals

One hundred and five C3H/HeJ 12 week old male mice (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) randomly divided into three groups (n=35) were used as follows: a control group, a group exposed to fine particles (Be-F, <2.5 µm diameter) and a group exposed to inhalable particles (Be-I, <10 µm ). The control animals were exposed to HEPA filtered air in the same apparatus as the treated groups exposed to Be particles. Be metal powder (Be S-200F, blended powder purity 99.1% minus 325 mesh) was obtained from Brush-Wellman (Cleveland, Ohio). Thirty mice in each group were sacrificed one week after the end of exposure (day 28) by intraperitoneal injection of an overdose anaesthetic cocktail (consisting of Ketamine, Xylazine, and Acepromazine, as per McGill University Animal Care Standard Operating Protocols) and exsanguinated by cardiac puncture. In order to determine the influence of time on the histopathology produced in a particular treatment group, five mice in Be-F group were kept for two more weeks and sacrificed at day 42. The Ethical Committee for Animal Care of the University of Quebec at Montreal approved all the experimental procedures

### Chemical and Reagents

Ketamine (Vetalar, 100 mg/ml), Xylazine (AnaSed, 20 mg/ml), and Acepromazine (Ayerst, 10 mg/ml) were used as anaesthetics agents. RPMI 1640 (GIBCO, Invitrogen Life Technologies, Mississauga, Ontario, Canada) medium was supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum (HyClone, Logan, Utah), 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen), 100 U/ml penicillin (Invitrogen), 2 mM L-glutamine (Invitrogen), 5 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-n-2-ethanesulfonic acid (HEPES), 50 µM 2-mercaptoethanol, and 50 µg/ml Sodium Pyruvate (GIBCO, Invitrogen, Mississauga, Ontario, Canada).

### Inhalation Exposure

The exposure was conducted at University of Quebec in Montreal, in a metallic nose-only inhalation chamber (Model 04-1100; In-Tox Products, Albuquerque, NM) that is able to expose 48 mice or rats simultaneously. Be aerosol was generated by a Fluidized Bed Aerosol Generator (Model 3400, TSI Inc., St. Paul, MN) with a flow rate of 22 L air/min. A stainless steel ASME pressure tank (Model 73, Mc Master-Carr, Robbinsville, NJ) was used in order to obtain fine particles smaller than 2.5  $\mu\text{m}$ . Mice were exposed to a target concentration of 250  $\mu\text{g Be}/\text{m}^3$  for 3 consecutive weeks, 5 days/week and 6 hr/ d.

The level (250  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) at which the mice were exposed was derived from the sole toxicological sub-chronic study focussing on immunological effects. Stiefel *et al.* (1980) observed increased activity of T cells in rats after exposure to 500  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  for 10 weeks, 6 hours per day. To derive a level of exposure for mice, we took into account the difference between animal species (rat vs mouse) in terms of inhalation rate and body weight (0.29  $\text{m}^3/\text{d}$  vs 0.052  $\text{m}^3/\text{d}$  and 0.35 kg vs 0.03 kg according, (Derelanko, 1995) and ensured that the dose per unit of body weight was similar. Since the dose for rats was 500  $\mu\text{g}/\text{m}^3 \times 0.29 \text{ m}^3/\text{d} / 350 \text{ g}$  which is equal to 0.414  $\mu\text{g}/\text{g}/\text{d}$ . To achieve the same dose in mice we used 0.414  $\mu\text{g}/\text{g}/\text{d} \times 30 \text{ g} / 0.052 \text{ m}^3/\text{d}$ , which results to 238.8  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . Thus, the target level of exposure for mice was established at 250  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ .

Since 250  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  represents a LOAEL (lowest observed adverse effect level) in our study, the classical approach to derive a level for human by using uncertainty factors (UF) could lead to levels between 0.25 and 0.025  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . Indeed, 4 UF of 10 each would be used: one for the extrapolation of data from animal to human, one for the intraspecific variation, one for the extrapolation of LOAEL to NOAEL (highest level without adverse effect) and one for the extrapolation of a sub-chronic study to a chronic one. Finally, a fifth factor (modifying factor) of 10 could be used to account for the small sample size. Thus, 250  $\mu\text{g}/\text{m}^3 \times 10^{-5}$  (or  $10^{-4}$ ) = 0.025  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  or 0.25  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ .

In order to obtain the same deposition rate in the lung, we determined that the MMAD of respirable Be should be in the range of 1  $\mu\text{m}$ . In fact the deposition rate for 1  $\mu\text{m}$  diameter particles is about 8% for rat and 9.7% for mice. These percentages were derived from those established by Raabe *et al.* (1988). The mass median aerodynamic diameter (MMAD) was measured by using an eight-stage Marple Personal Cascade Impactor (Series 290, Andersen Samplers Incorporated, Atlanta, GA., USA) twice per week (n=6). This impactor is designed to determine the aerodynamic diameter of particles between 0.5 to 22  $\mu\text{m}$  in the air.

Moreover, Be was sampled in the inhalation chamber for physicochemical characterization. Particles were transferred from the filter to a TEM grid by delicately rubbing the filter with the grid. The observations and analyses were performed on JEOL JEM-2100F TEM equipped with a field emission gun (FEG) operated at 200kV. The microscope was coupled with an energy dispersive X-ray spectrometer (EDS) and a parallel electron energy loss spectrometer (PEELS) for chemical analysis. The images were acquired in scanning mode (STEM) using a dark field detector with a large collecting angle. With this mode, also called Z contrast, the areas of larger mean atomic number appear brighter on the image (Williams and Carter, 1996). The brightness of that imaging mode is also dependant on the thickness of the sample.

### **Bronchoalveolar Lavage (BAL)**

Following euthanasia, the trachea was cannulated and 1 ml of precooled sterile phosphate-buffered saline (PBS) (GIBCO) was slowly inserted through the trachea, gently pooled and collected in a 15 ml plastic tube on ice. The PBS remained in the lung for 30s. The washing was repeated twice with the same volume of PBS. The BAL was aliquoted and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until cytokine measurement.

### **Preparation of Lymphoid Cell Suspensions from Spleens**

Splenic lymphocytes were harvested using physical disruption. Briefly, spleens were removed from mice and placed in dissociation cups (Sigma, Mississauga, ON), containing 3 ml complete RPMI, and physical disruption was performed using a plunger until mostly fibrous tissues remained. The collected cell suspensions were filtered through 75  $\mu$ m cell strainers into 50 ml plastic tubes and centrifuged at 1200 rpm for 10 min. The cell pellets were washed twice with 1X PBS then lysed with ACK (0.15 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10mM  $\text{KHCO}_3$ , and 0.1mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) lysing buffer to remove red blood cells. Cells were washed and counted with an automated counter (Coulter Corporation, Miami, FL). The total cells were adjusted with complete medium to  $2.5 \times 10^6$  cell/ml.

### **Beryllium Lymphocyte Proliferation Test (BeLPT)**

Be sensitization in mice was detected by measuring the proliferation of T cells. The cells from spleens were cultured ( $2.5 \times 10^5$  cells) in 96-well flat-bottom microtiter plates in the presence of medium alone, three different concentrations (1, 10, 100  $\mu$ M) of  $\text{BeSO}_4$  (0.2 M), or with 2  $\mu$ g/ml Concanavalin A (Sigma, Mississauga, ON). We have previously performed dose responses to Con A to determine the optimal concentration for proliferation, and to minimize cell number we used this optimal dose along with the dose response to of  $\text{BeSO}_4$  performed at two time points. Proliferation assays were performed in triplicate for each condition. The level of proliferation was assayed by tritiated-thymidine incorporation at a final concentration of 1  $\mu$ Ci/ml (MP Biomedical, specific activity, 60 Ci/mmol) added for 18 hr after five days of stimulation. The cells were harvested by water lysis on a Micro96 Harvester (Skatron Instruments, 11055, Haverhill, MA) and radioactive  $\beta$ -emissions were measured by liquid scintillation counting (Wallac Inc., Perkin Elmer, Trilux 1450-024 Microbeta, Waltham, MA). The data were expressed as counts per minute (CPM) and Stimulation Index (SI) which is calculated by ratio of the CPM from stimulated cells to CPM of the equivalent non-stimulated cells.

### **Flow Cytometry**

Fluorescent labeled antibodies specific for cell surface and intracellular markers were used to determine the percentage of cells expressing CD4, CD8, CD19, and intracellular IFN- $\gamma$  in the mononuclear cell suspension from spleen. Three-color fluorescence staining was performed by using the following monoclonal antibodies; phycoerythrin (PE)-conjugated rat anti-mouse CD8, fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated rat anti-mouse CD4, allophycocyanin (APC)-conjugated rat anti-mouse CD19, or APC-conjugated rat anti-mouse IFN- $\gamma$ , purchased from BD Pharmingen (Mississauga, Ontario, Canada). We optimized the concentration for all antibodies with control mice. Cells were cultured in a 60 mm Petri dishes with phorbol 12-myristate 13-acetate (PDB) (5 ng/ml) and Ionomycin (500 ng/ml) at 37°C over-night. Prior to analysis a protein transport inhibitor, GolgiStop (4  $\mu$ l in 6 ml) was added for 4 hr at 37°C to enhance cytokine retention in the cells. After stimulation,  $1 \times 10^6$  cells were washed with PBS containing 1% BSA and stained with anti-CD4, anti-CD8, or anti-CD19 for 30 min in the dark. Cells were fixed and permeabilized with Cytofix/Cytoperm (BD), for 20 min and washed twice with 1X Perm/wash buffer (BD) then stained with anti-IFN- $\gamma$  antibodies for 30 min at 4°C. Fluorescence intensity was detected by using a FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson, Mississauga, ON) and CellQuest software. The lymphocytes were recognized by their characteristic pattern gating in forward and side scatter based on cell granularity and size. Isotype controls were used to define negative populations.

### **Histological Assessment of Lung Tissue**

Whole lungs were clamped off and airways were perfused with 10% neutral buffered formalin until the pleura was smooth. The heart, lung, and trachea were removed and kept in formalin for 24 hr. Lungs were removed and inflated with formalin using a tissue processor (LEICA TP 1020, Ramsey, Minnesota) overnight. The left lung was embedded in paraffin, sectioned with a microtome (LEICA RM 2125 RT, Meyer Instruments Inc. Houston, TX) at 5  $\mu$ m thicknesses and stained with hematoxylin and eosin (H&E). The

pulmonary histology assessment was based on visualization of the extent of alveolar inflammation. The morphological data was collected by two independent individuals blinded to experiment by using a semiquantitative method. The method is based on a 5-point severity scoring system as graded on scale of 1= no inflammation, 2= mild, 3= moderate, 4= high, and 5= severe inflammation in multiple microscopic fields. Each scoring number was correlated with the percentage of the extent of inflammation as 1 for normal lung; 2=0-25%; 3=25-50%; 4=50-75%, and 5=75-100% in the pre-bronchial. The mean was calculated for all the variables in each mouse.

### **Cytokine Measurement**

Supernatants from bronchoalveolar lavage were analysed for IL-12, IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  using specific two-site enzyme-linked immunosorbent assays kits (ELISA) according to instructions provided by the manufacturer (BioLegend, Inc., San Diego, CA). The measurement for each condition was performed in triplicate. The lower limits of detection for IL-12, IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  were 2 pg/ml, 1 pg/ml, 1 pg/ml, 2 pg/ml, and 4 pg/ml, respectively.

### **Statistical Analysis**

Data were analyzed with GraphPad Prism 4 software using one-way ANOVA and Tukey post-test to compare variances. The comparisons were considered to be statistically significantly different at  $p < 0.05$ . All data are presented as mean  $\pm$  SD.



## Results

### Be Particles in the Inhalation Chamber

The average Be concentrations for Be-I and Be-F obtained in the chamber were  $285.3 \pm 32 \mu\text{g}/\text{m}^3$  and  $253.3 \pm 31 \mu\text{g}/\text{m}^3$  respectively, close to the target concentration of  $250 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Based on the cascade impactor data, the MMAD for Be-I and Be-F were  $4.1 \pm 0.6 \mu\text{m}$  and  $1.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$ , respectively (Table 1). The mean daily chamber temperatures ranged from 22-25 °C and relative humidity ranged from 25-40 %.

The physicochemical characterization of the particles showed Be-containing particles for Be-F (Fig. 1a) and Be-I (Fig. 1b). The particles observed measured between about 0.2 and 1.6  $\mu\text{m}$  for Be-F and between 3 and 5  $\mu\text{m}$  for Be-I, which is consistent with the MMAD obtained by the cascade impactor data. Fig. 2 shows a PEELS spectrum with a Be edge confirming the nature of the particle. The presence of Be was verified with PEELS for each particle analyzed. The shape of the particles was irregular. Some particles were rounded and others were elongated but never angular. Diffraction patterns obtained on individual particles show that they are crystalline and usually made of many crystals as shown by the presence of Laue rings on the patterns (Fig. 3). The interplanar spacing measured on the diffraction patterns match those of pure Be according to the Powder Diffraction File 2 database (PDF2, version 1.0 September 1994) from the ICDD (International Centre for Diffraction Data). These observations lead to 2 possibilities: the Be particles are individual polycrystalline particles or they are agglomerates of smaller Be particles.

### Lung Histology

Haematoxylin and Eosin staining of lung sections was used to document cellular infiltration and examine for the presence of granulomatous inflammation in the lung. Exposure to Be induced a perivascular and peribronchial mononuclear cell infiltration, with few

polymorphonuclear cells detected. (Figure 5 B and C) compared to unexposed mice (Figure 5A). Mice exposed to Be-F had significantly higher lung inflammation ratings than the other 2 groups ( $p < 0.05$ ). The inflammation score for Be-F was  $2.5 \pm 0.51$  compared to mice exposed to Be-I with score of  $1.9 \pm 0.56$  (Fig. 4). The inflammation score for mice exposed to Be-F and sacrificed at day 42 were higher than those sacrificed at day 28, although the differences were not statistically significant, possibly, due to the smaller sample size ( $n=5$ ). Regarding animals sacrificed at 42 days, while the number of inflamed areas were not increased, the mononuclear cell infiltration was consistently larger and occasional giant cells were seen, suggesting early granulomatous changes (Figure 5D). This experiment, comparing the severity of inflammation with time, was just conducted for Be-F group because at that time we had finished all the experiments with Be-I group.

### **Phenotypic Profile of Lymphocytes in Spleen**

Splenic mononuclear cells expressed higher CD4 and CD8 counts, and higher numbers of intracellular IFN- $\gamma$  expressing cells in mice exposed to Be metal particles than control. The relative percentage of CD19, a marker for B cells, was lower for Be exposed mice, Be-F ( $40.88 \pm 6.80$ ) and Be-I ( $42.24 \pm 7.5$ ) vs. control ( $58.12 \pm 9.77$ ), mirroring the increases in T cell populations. The mean expression of CD4<sup>+</sup> T helper cells for mice exposed to Be-F ( $21.39 \pm 1.89$ ) and Be-I ( $20.12 \pm 0.96$ ) were significantly higher than control ( $14.48 \pm 2.16$ ). The expression of cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells for mice exposed to Be-F ( $11.78 \pm 1.27$ ) and Be-I ( $13 \pm 1.21$ ) were also significantly higher compare to control ( $8.54 \pm 2.01$ ) with  $p < 0.001$ . The intracellular production of IFN- $\gamma$  was significantly increased following exposure to different Be particles sizes. The percentage of IFN- $\gamma$  expression for Be-F ( $7.6 \pm 0.92$ ) and Be-I ( $7.2 \pm 1.11$ ) were significantly altered ( $p < 0.001$ ) compared to control ( $3.13 \pm 1.14$ ) (Fig. 6).

### **Beryllium Lymphocyte Proliferation Testing (BeLPT)**

T cell proliferation responses were determined by incorporation of tritiated-thymidine  $^3\text{H}$  {thy}. BeLPT results are presented as CPM and SI in the presence of three different concentrations of  $\text{BeSO}_4$ , based on protocols used for patient screening (Newman, 1996). The CPM and SI for mice exposed to Be-F and Be I were significantly higher than control at an in vitro  $\text{BeSO}_4$  dose of  $10\ \mu\text{M}$  ( $P < 0.05$ ), as presented in Table 2.  $\text{BeSO}_4$   $1\ \mu\text{M}$  also led to some proliferation in the Be-F group. Unfortunately, higher concentrations of  $\text{BeSO}_4$  appeared to be toxic for murine T cells, in contrast to the effects on human T cells. In fact, the dose of  $100\ \mu\text{M}$ , which is a standard dose in the human BeLPT, was associated with toxicity in the majority of cultures, as suggested by SI below 1 in almost all cases with this dose. ConA, used in parallel as positive control to verify cell proliferation, indicated normal proliferation responses, suggesting that cell preparation and handling did not contribute to the low SI values.

#### **Cytokine Measurement (ELISA)**

Cytokine assessment from bronchiolar lavage fluid (BAL) indicated that Be exposed mice secreted more IL-12, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$ , compared to control. TNF- $\alpha$  concentration in the BAL was significantly higher ( $P < 0.001$ ) in mice exposed to Be-F ( $12.5 \pm 2.85\ \text{pg/ml}$ ) than control ( $8.56 \pm 0.62\ \text{pg/ml}$ ). The level of TNF- $\alpha$  was also elevated for Be-I ( $11.71 \pm 2.19\ \text{pg/ml}$ ) but was not significantly different from the control group. The IFN- $\gamma$  concentration in BAL was significantly increased ( $P < 0.05$ ) in mice exposed to Be-F ( $17.20 \pm 2.98$ ) compared to Be-I ( $14.16 \pm 1.17$ ) and control ( $13.96 \pm 1.30$ ) ( $P < 0.01$ ). IL-4, the classic Th2 cytokine, was not altered following exposure to Be metal particles. The results of the cytokine assessments are presented in Fig. 7.

## Discussion

Approximately one million individuals in workplaces are exposed to Be aerosols and only 20% may develop CBD. There is a gap in our knowledge regarding why the prevalence of disease is still inconsistent among workers exposed to Be particle concentrations less than the recommended occupational exposure limit of  $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (Kreiss *et al.*, 1997; Schuler *et al.*, 2005). Moreover, there is a weak dose-response correlation between Be exposure and CBD and BeS, probably due to sole measurement of the total mass concentration of Be particles, which excludes particle characteristics such as particle size and chemical form. We therefore tested the hypothesis that the nature of exposure, as particle size, may need to be accounted for in the pathogenesis of CBD.

Various animal studies have been conducted to explore the immunological responses observed in CBD and BeS individuals, but a model to investigate the effects of different particle sizes has not been established. Therefore, our murine model provides a unique opportunity to investigate the toxic effects of different particles sizes of Be metal on histopathological and immunological changes similar to those observed in humans. The important features of this study include cumulative doses of Be metal ( $250 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ), and three weeks of exposure, the longest exposure duration among all animal studies. In addition, nose-only inhalation exposure was used to reduce the systemic accumulation either from skin or gastric absorption (Fontenote *et al.*, 2002b). Overall, this study tried to mimic in a precise manner the exposure conditions at workplaces.

Recent studies suggest that Be particle size may play an important role in deposition in the alveolar region of the lung, eventually leading to cellular immune responses and formation of non-caseating granulomatous lesions (Stefaniak *et al.*, 2005; Rouleau *et al.*, 2005). Most total particles characterized by a MMAD smaller than  $100 \mu\text{m}$  are trapped in the human nose and throat, while the inhalable particles ( $<10 \mu\text{m}$ ) may be trapped by the ciliary lining of the bronchi which transit particles up and out of the respiratory tract. Fine particles,

smaller than 2.5  $\mu\text{m}$ , can penetrate into the lungs and into regions where there are no cilia to remove the particles. Thus, particle size may influence biological activity of Be aerosols following inhalation exposure (Stefaniak *et al.*, 2007). In our study, the MMAD for Be-F and Be-I were 1.5 and 4.1  $\mu\text{m}$  respectively, implying in mice predominant alveolar deposition in the first case and deposition in upper airway compartments in the second case (Raabe *et al.*, 1988). In fact, if we assess the mean deposition percentages of Be in the light of the data from Raabe *et al.*, we can assume that 8.1% and 5% of respirable Be was deposited in the pulmonary and the bronchial regions respectively whereas it would be 0.5 % and 1.3 % for inhalable Be.

The effects of inhalable Be in the exposed mice show significant differences with the control group for the lung inflammation, IFN- $\gamma$  expression in splenic mononuclear cells and the expression of TNF- $\alpha$ , IL-12, in the BAL. The control group was also subjected to the same nasal exposure system, suggesting that the observed effects were simply not a consequence of exposure and handling. This implies that even a very small fraction can reach the pulmonary and the bronchiolar regions and may induce immunologic effects.

In previous animal studies, only exposure to total particles was assessed in order to investigate pulmonary effects of Be exposure (Finch *et al.*, 1996; Haley *et al.*, 1994; Finch *et al.*, 1990). Lung lesions such as lymphocytic interstitial infiltration and non-caseating granuloma formation have been observed in mice, rats, monkeys, and dogs following inhalation exposure to Be. The severity of the lesions were influenced by time post exposure, (from 40 to 210 days), as well as dose. In this study, we initially chose 28 days after initiating exposure as the time to assess pulmonary lesions. However, we sacrificed a group of mice in the Be-F exposed group 42 days after initiating exposure, which demonstrated more pronounced lung inflammation, compared with groups sacrificed at 28 days. This finding is in accordance with studies that indicate that interstitial infiltration of lung is both dose-dependent and the severity of the lung lesions increased with time (Finch

*et al.*, 1998; Haley *et al.*, 1990). Nikula and his colleagues (1997) conducted a nose-only inhalation exposure to Be metal for 90 min with two strains of mice, C3H/HeJ and A/J. Both strains had interstitial compact aggregates of lymphocytes and granulomatous pneumonia six months later. It has been established that the development of granulomatous inflammation in the lung of CBD patients is associated with activation and accumulation of CD4<sup>+</sup> T cells (Fontenote *et al.*, 2002a; Day *et al.*, 2005). However when smaller Be particles are deposited in the alveoli, they are engulfed by macrophages in lungs (Day *et al.*, 2005). This may predispose to granuloma formation. Therefore, Be particles sizes can play an important role in Be availability in the lung tissue and subsequent inflammation, including the development of granulomas.

Many studies have suggested that the activation and proliferation of Be-specific CD4<sup>+</sup> T cells in the lung is the most important component in the induction of BeS and CBD (Amicosante *et al.*, 2006; Fontenot *et al.*, 2002; Saltini *et al.*, 1989). In our study, T cell proliferation was measured by incorporation of tritiated thymidine (<sup>3</sup>[H]thy) in mononuclear cells after 5 days of BeSO<sub>4</sub> stimulation similar to that performed in workers screened for CBD. As such, we utilized in these experiments a BeLPT protocol that was identical in dose and timing to standard human BeLPT. Cellular proliferation was statistically different for the Be-F group compared to Be-I and control, although the responses were below the stimulation index cut-off for diagnosis of sensitized humans. Similar results have been obtained in previous animal studies using in vitro lymphocyte proliferation test. The proliferation responses were positive for cells stimulated with ConA or phytohemagglutinin but not with Be salts (Nikula *et al.*, 1997; Finch *et al.*, 1996; Haley *et al.*, 1994). This may be due to the length of the culture, the doses of BeSO<sub>4</sub> utilized, and the cell concentration. Thus we have optimised this test to make it more useful for future animal studies. For example, stimulation indices below 1.0 may indicate toxic effects of high concentrations of BeSO<sub>4</sub> on murine lymphocytes. We have adjusted the doses of BeSO<sub>4</sub> that were utilized in subsequent protocols, which have caused less non-specific

toxicity and better proliferation using murine lymphocytes. Indeed, in subsequent studies using another Be compound, we have found that a lower, less toxic doses and longer incubation may provides more reproducible results. (Salehi *et al*, Manuscrit in preparation).

Mice exposed to Be-F and Be-I expressed significantly more CD4<sup>+</sup> T cells compared to control. This finding is consistent with previous studies that suggested Be-specific T cells are mostly CD4<sup>+</sup> in CBD and BeS patients (Pott *et al.*, 2005; Fontenot *et al.*, 2005). The expression of CD4<sup>+</sup> T cells in mice exposed to fine particles was higher than for larger particles, although this was not significant. In CBD, the activated T cells clonally proliferate and secrete Th1-type cytokines, mostly, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-2 (Tinkle *et al.*, 1997). Our data from cytokine assessment in BAL revealed similar pattern of Th1-type cytokine secretion in exposed mice. The secretion of IL-12, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  were significantly elevated in mice exposed to Be-F than control. In contrast, Th2-type cytokines, such as IL-4, are not detected in CBD patients (Fontenot *et al.*, 2002). Th1 cytokine production, mainly IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-2, can up-regulate the expression of mRNA to favor the T cells proliferation at site of inflammation. Accumulation of CD4<sup>+</sup> T cells, alveolar macrophages, and/or CD8<sup>+</sup> T cells leads to local inflammation and formation of granulomas, all crucial to the pathogenesis and development of CBD (Semenzato *et al.*, 2000, Popper, 1999).

In conclusion, we present a robust animal model of subacute exposure to Be. Our findings suggest that exposure to fine particles may induce more pronounced immunological effects than inhalable particles due to deeper deposition. Moreover, our results confirm that the C3H/HeJ mice represent a good model to study the immunologic aspects of CBD. These results provide a novel model as a basis to investigate the important role of physiochemical characteristics of Be, and to better protect workers against CBD, and support efforts to control Be exposure in the workplace.

**Acknowledgments**

This research was supported by the *Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail* (IRSST), and the Costello Foundation. The authors enormously appreciate the technical supports of Lise Gareau, Natalya Karp, Issa Lozano, Julienne Lama and Louis Zayed. Dr. Mazer is a Chercheur-National supported by the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.



**Reference:**

- Amicosante M., Fontenot AP. 2006. T cell recognition in chronic beryllium disease. *Clin. Immunol.* **121**:134-143.
- Day GA, Hoover MD, Stefaniak A.B, Dickerson RM, Peterson EJ, Esmen NA, Scripsick RC. 2005. Bioavailability of beryllium oxide particles: an in vitro study in the murine J774A.1 macrophage cell line model. *Exp. Lung Res.* **31**: 341-360.
- Derelanko M.J. 1995. Risk assessment. In CRC Handbook of Toxicology, CRC press, Inc., Edited by MJ Derelanko and MA Hollinger, pp. 591- 676.
- Finch LM, Nikula KJ, Hoover MD. 1998. Dose-Response relationships between inhaled beryllium metal and lung Toxicity in C3H Mice. *Toxicol. Sc.* **42**: 36-48.
- Finch GL, Hoover MD, Hahn FF, Nikula KJ, Belinsky SA, Haley PJ, Griffith WC. 1996. Animal models of beryllium-induced lung disease. *Environ. Health Perspect.* **104**: 973-979.
- Finch GL, Mewhinney JA, Hoover MD, Eidson AF, Haley PJ, Bice DE. 1990. Clearance, translocation, and excretion of beryllium following acute inhalation of beryllium oxide by beagle dogs. *Fundam. Appl. Toxicol.* **15(2)**: 231-241.
- Fontenot AP, Canavera SJ, Gharavi L, Newman LS. 2002a. Target organ localization of memory CD4<sup>+</sup> T cells in patients with chronic beryllium disease. *J. Clin. Invest.* **110**: 1473-1481.
- Fontenot AP, Maier LA., Canavera SJ, Hendry-Hofer TB, Boguniewicz M, Barker EA, Newman LS, Kotzin BL, 2002b. Beryllium skin patch testing to analyze T cell stimulation and granulomatous inflammation in the lung. *J. Immunol.* **168**: 3627-3634.

- Fontenot AP, Palmer BE, Sullivan AK, Joslin FG, Wilson CC, Maier LS, Newman LS, Kotzin BL. 2005. Frequency of beryllium-specific, central memory CD4 T cells in blood determines proliferative response. *J. Clin. Invest.* **115**: 2886-2893.
- Haley PJ, Pavia KF, Swafford DS, Davila DR, Hoover MD, Finch GL. 1994. The comparative pulmonary toxicity of beryllium metal and beryllium oxide in cynomolgus monkeys. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **16(4)**: 627-644.
- Haley PJ, Finch GL, Hoover MD, Cuddihy RG. 1990. The acute toxicity of inhaled beryllium metal in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* **15(4)**: 767-778.
- Henneberger PK, Cumro D, Deubner DD, Kent MS, MaCawley M, Kreiss K. 2001. Beryllium sensitization and disease among long-term and short-term workers in a beryllium ceramics plant. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **74**: 167-176.
- Johnson, J.S., Foote, K., McClean, M. and Cogbill, G. 2001. Beryllium Exposure Control Program at the Cardiff Atomic Weapons Establishment in the United Kingdom. *Appl Occup Environ Hyg* 16(5):619-630.
- Kent MS, Robins TG, Madl AK. 2001. Is total mass or mass of alveolar-deposited airborne particles of beryllium a better predictor of the prevalence of disease? A preliminary study of a beryllium processing facility. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* **16(5)**: 539-558.
- Kreiss K, Mroz MM, Zhen B, Wiedemann H., Barna B. 1997. Risks of beryllium disease related to work processes at a metal, alloy, and oxide production plant. *Occup. Environ. Med.* **54**: 605-612.
- Maier LA, McGrath DS, Sato H, Lympany P, Welsh K, Du Bois R, Silveira L, Fontenot AP, Sawyer RT, Wilcox E, Newman LS. 2003. Influence of MHC class II in susceptibility to beryllium sensitization and chronic beryllium disease. *J. Immunol.* **171**: 6910-6918.

- Newman, L.S., Balkissoon R, Daniloff E, Solida M, Mroz M. 1998. Rate of progression from beryllium sensitization to chronic beryllium disease is 9-19% per year. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157.
- Newman LS. 1996. Significance of the blood beryllium lymphocyte proliferation test (BeLPT). *Environ. Health Perspect.* **104**: 953-956.
- Nikula KJ, Swafford DS, Hoover MD, Tohulka M.D, Finch G.L. 1997. Chronic granulomatous pneumonia and lymphocytes responses induced by inhaled beryllium metal in A/J and C3H/HeJ mice. *Toxicol. Pathol.* **25**: 2-12.
- OSHA, Occupational Safety and Health Administration., 2005. Toxic and Hazardous Substances. 29CFR 1000, Table Z-1, Washington D.C.
- Popper HH, 1999. Epithelioid cell granulomatosis of the lung: new insights and concepts. *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis.* **16**: 32-46.
- Pott GB, Pulmer BE, Sullivan AK, Silviera L, Maier LA, Newman LS, Kotzine BL, Fontenot AP. 2005. The frequency of beryllium specific, Th1-type cytokines-expressing CD<sup>4</sup> T cells in patients with beryllium-induced disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **115**: 1036-1042.
- Raabe OG, Al-Bayati MA, Teague SV, Rasolt A. 1988. Regional deposition of inhaled monodisperse coarse and fine aerosol particles in small laboratory animals. *Ann. Occup. Hyg.* **32, supp 1**: 53-63.
- Rouleau M, Dion C, Plamondon P, L'Espérance G, Zayed J. 2005. Physical and Chemical Characterization of Beryllium Particles from Several Workplaces in Quebec, Canada- Part A: Time-of-flight Secondary-ion Mass Spectroscopy. *J. Toxicol. Env. Health* **68**: 1907-1916.

- Saltini C, Winestock K, Kriby M, Pinkston P, Crystal RG. 1989. Maintenance of alveolitis in patients with chronic beryllium disease by beryllium-specific helper T cells. *N. Engl. J. Med.* **320**: 1103-1109.
- Sawyer RT, Maier LA, Kittle LA, Newman L.S. 2002. Chronic Beryllium disease: a model interaction between innate and acquired immunity. *Int. Immunopharmacol.* **2**: 249-261.
- Schuler CR, Kent MS, Deubner DC, Berakis MT, McCawly M, Henneberger PK, Rossman MD, Kreiss K. 2005. Process-related risk of beryllium sensitization and disease in a copper-beryllium alloy facility. *Am. J. Ind. Med.* **47(3)**: 195-205.
- Semenzato G, Adami F, Maschio N, Agostini C. 2000. *Immune mechanisms in interstitial lung diseases.* *Allergy* **55**: 1103-1120.
- Stefaniak AB, Hoover MD, Dickerson RM, Day GA, Breyse PN, Scripsick R.C. 2007. Differences in estimates of size distribution of beryllium powder materials using phase contrast microscopy, scanning electron microscopy, and liquid suspension counter techniques. *Part Fiber Toxicol.* **4**: 3.
- Stefaniak AB, Gulmette RA, Day GA, Hoover MD, Breyse PN, Scripsick RC. 2005. Characterization of phagolysosomal stimulant fluid for study of beryllium aerosol particle dissolution. *Toxicol. In Vitro* **19(1)**: 123-134.
- Tinkle SS, Kittle LA, Schumacher BA, Newman LS. 1997. Beryllium induces IL-2 and IFN-  $\gamma$  in berylliosis. *J. Immunol.* **158**: 518-526.
- Williams DB, Carter CB. 1996. *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science*, 1st ed., Plenum Press, New York, p.359.

**Table 1.** Aerodynamic Be particle size distribution in the inhalation chamber

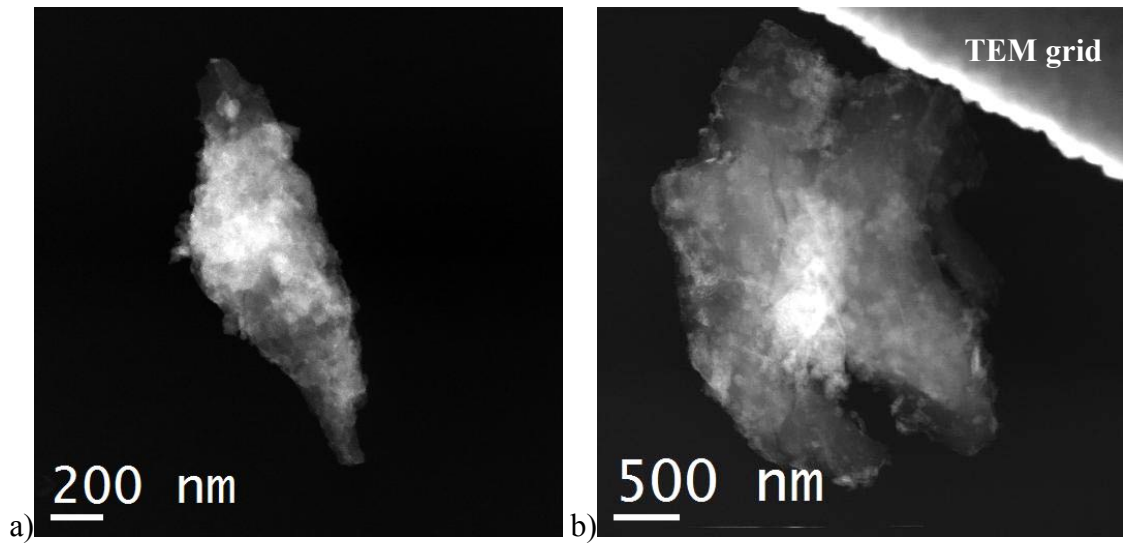
<b>Particle size (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Inhalable particles (Be-I) %</b>	<b>Fine particles (Be-F) %</b>
21.3	10.1 $\pm$ 8.6	4.4 $\pm$ 3.1
14.8	8.0 $\pm$ 3.0	3.5 $\pm$ 1.8
9.8	16.0 $\pm$ 5.0	8.2 $\pm$ 3.3
6.0	21.0 $\pm$ 6.1	14.0 $\pm$ 2.8
3.5	16.4 $\pm$ 3.0	17.4 $\pm$ 8.6
1.55	14.0 $\pm$ 3.8	31.0 $\pm$ 7.3
0.93	4.0 $\pm$ 1.0	7.0 $\pm$ 5.6
0.52	3.0 $\pm$ 1.2	3.1 $\pm$ 1.6
Back up filter	7.5 $\pm$ 3.1	11.4 $\pm$ 4.2

The calculated MMAD  $\pm$  SD was 1.5  $\pm$  0.1  $\mu\text{m}$  for fine particles and 4.1  $\pm$  0.6  $\mu\text{m}$  for inhalable particles.

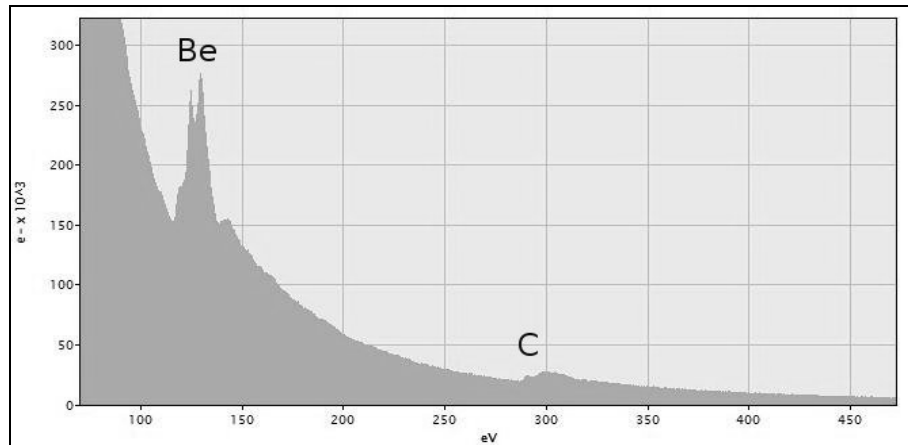
**Table 2.** T cells proliferation responses were evaluated by incorporation of tritiated thymidine

<b>BeLPT</b>	<b>Control</b>	<b>Fine Particles (Be-F)</b>	<b>Inhalable Particles (Be-I)</b>
CPM Non-Stimulated Cells	618.63±157.6	495.23±237.5	481.36±217.7
CPM ConA (2 µg)	84400±35330	61360±11560	106600±52640
CPM BeSO <sub>4</sub> (1 µM)	408.3±136.7	643.8±202.7	669.1±328.5
CPM BeSO <sub>4</sub> (10 µM)	356.3±133.1	639.7±188.5*	415±126.1
CPM BeSO <sub>4</sub> (100 µM)	435.4±125.5	557.5±181.1	353.4±84.81
SI ConA (2 µg)	136.43±152.9	123.9±107.5	221.45±20.97
SI BeSO <sub>4</sub> (1 µM)	0.66±0.39	1.3±1.175	1.39±1.04
SI BeSO <sub>4</sub> (10 µM)	0.57±0.33	1.29±0.98*	0.86±0.31
SI BeSO <sub>4</sub> (100 µM)	0.69±0.34	1.12±1.04	0.73±0.34

BeLPT results are presented as CPM and SI from mice exposed to Be metal, Be-F (n=18) and Be-I (n=18) particles. ConA was used as positive control for cell proliferation. Non-stimulated cells are spleen cells cultured with completed medium (RPMI). \* SI and CPM of the mice exposed to fine particles (Be-F) are significantly different compared with control (n=8) and Be-I (p< 0.05). Data are presented as the mean ± SD.

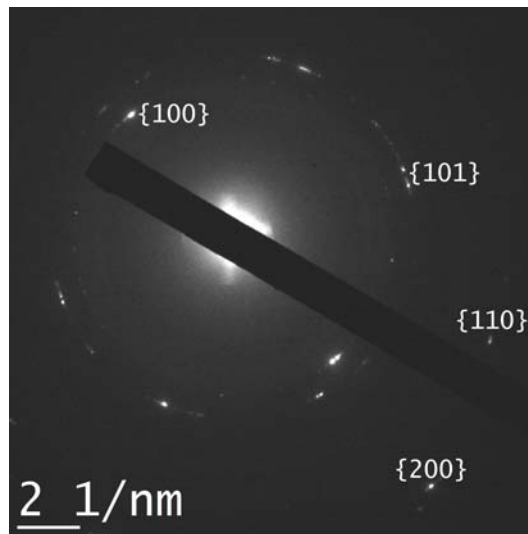


**Figure 1.** Z contrast TEM micrographs showing Be powder particles a) Be-F and b) Be-I.

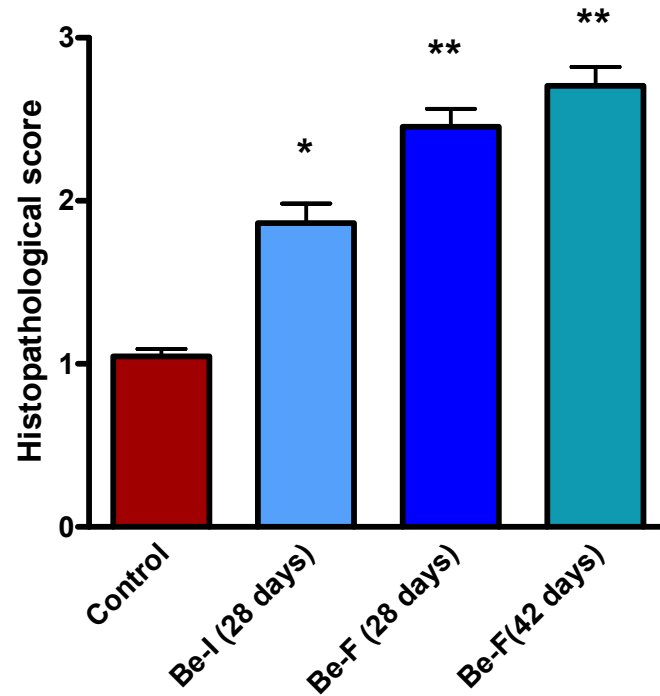


**Figure 2.** PEELS spectrum acquired on a powder particle showing the detection of Be.  
The carbon edge comes from the film holding the powder particles.

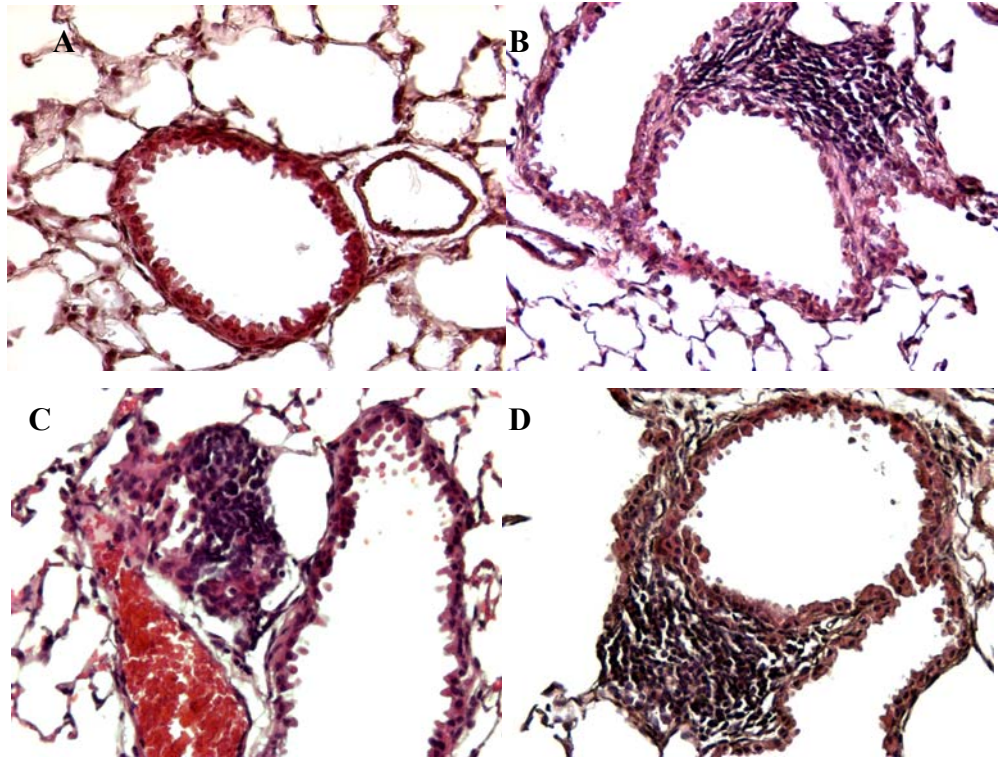




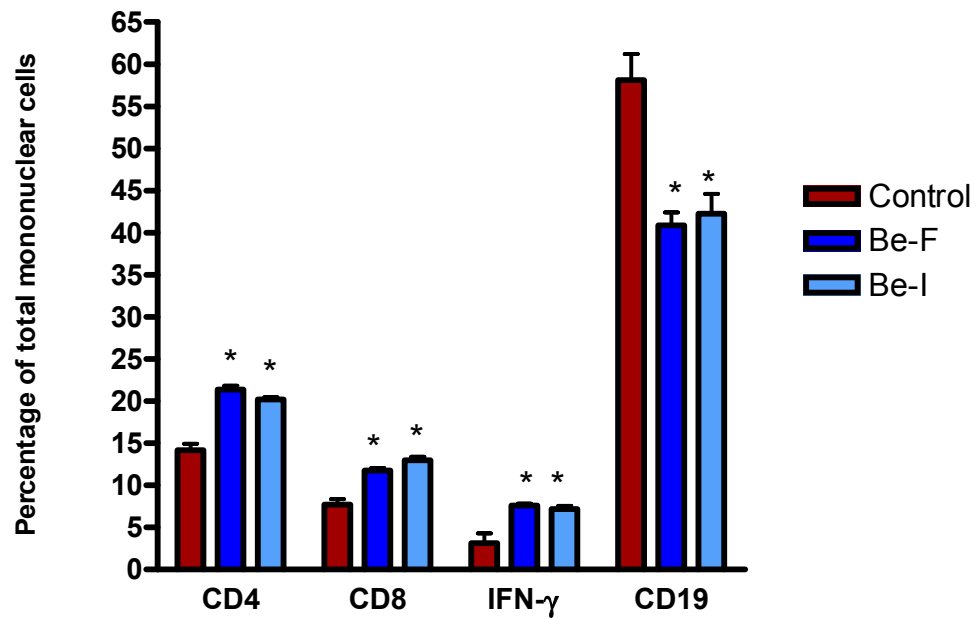
**Figure 3.** Electron diffraction pattern acquired on an individual Be-containing powder particle showing the presence of several crystals. The interplanar spacing measured match those of pure Be and the families of atomic plane are identified in the figure.



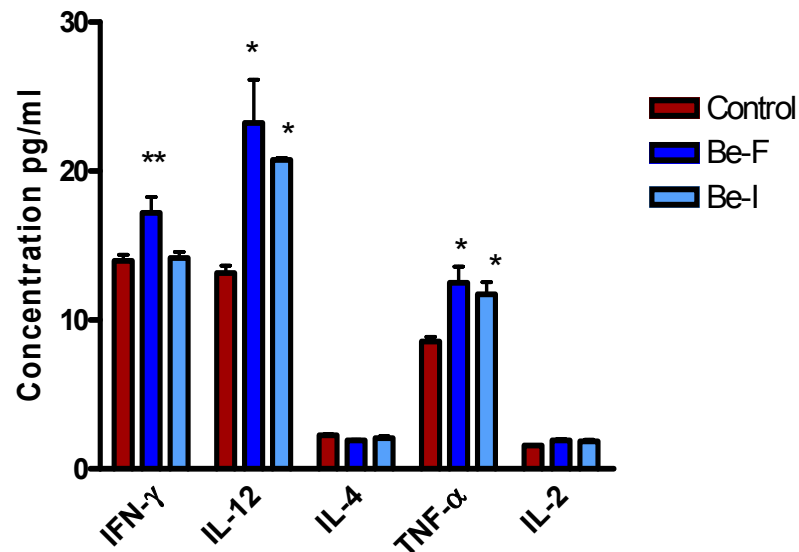
**Figure 4.** Histological score of lung inflammation in mice following inhalation exposure to Be metal, Inhalable (Be-I, n=6) and fine (Be-F, n=7) particles. Histological score was graded on a semi-quantitative scale of 1, 2, 3, and 4 corresponding to 1 for no inflammation, 2 for mild, 3 for moderate, and 4 for severe inflammation. \*\* Histological score was significantly different compared with Be-I ( $p < 0.001$ ). \* Histological score was significantly different compared with control ( $P < 0.001$ ).



**Figure 5.** Images from Histology of lung in mice exposed to Be metal, inhalable (Be-I) and fine (Be-F), particles. Shown are photomicrographs of lung sections from representative animals within each group at 40X magnification. The lung of control group (n=7) (A) shows no inflammation. In contrast, the lung of mice exposed to Be-I (n=6) (B), Be-F at day 28 (n=7) (C), and Be-F at day 42 (n=5) (D) show different levels of inflammation.



**Figure 6.** CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, IFN-γ, and CD19 expression in mouse splenic mononuclear cells following exposure to Be metal particles. Mice exposed to Be metal fine particles are shown as Be-F (n=20) and mice exposed to Be metal inhalable particles are marked as Be-I (n=9). \* Be-exposed groups are significantly different compared with control (n=7) (p< 0.001). Data are presented as the mean ± SD.



**Figure 7.** Cytokine expression in BAL of mice exposed to Be metal, Be-I (n=5) and Be-F (n=5), particles. Be-exposed mice had elevated expression of TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$ , and IL-2 in the BAL compared with control (n=5). \* Be-F groups are significantly different compared with control ( $p < 0.05$ ). \*\* Be-F groups are significantly different compared to Be-I ( $p < 0.05$ ). Data are presented as the mean  $\pm$  SD.

## 4. Chapitre quatrième: Discussion et conclusion

Dans notre étude, la toxicité a été évaluée à la suite d'une exposition par inhalation oro-nasale à des particules fines (F) et totales (T), et ce, pour chacune des principales formes chimiques de Be produites par l'industrie (Be, BeO et BeAl). L'évaluation de la toxicité a été faite à l'aide d'un modèle animal, soit des souris mâles (C3H/HeJ) âgées de neuf semaines (*The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME*). Au total, 245 souris ont été utilisées. Les souris ont été subdivisées en sept groupes de 35 souris. Un groupe a servi de contrôle, alors que chacun des six autres a été exposé soit à des particules fines soit à des particules totales, pour chacune des trois formes chimiques de Be à l'étude (Be métallique (Be-F, Be-T), oxyde de béryllium (BeO-F, BeO-T) alliage béryllium-aluminium (BeAl-F, BeAl-T)). Trente souris par groupe ont été sacrifiées 1 semaine après la fin de l'exposition. Les cinq souris restantes par groupe ont été sacrifiées 3 semaines après la fin de l'exposition pour des considérations histopathologiques concernant l'inflammation pulmonaire (seules des analyses histologiques ont été faites pour ces souris).

Le niveau auquel ont été exposées les souris a été dérivé de la seule étude toxicologique subchronique ayant été axée sur les effets immunologiques et lymphocytaires. En effet, l'étude de Stiefel *et al.* (1980) a permis d'observer chez le rat une augmentation de l'activité des cellules T à la suite d'une exposition à  $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$  pendant 10 semaines à raison de 6 heures par jour. Pour dériver un niveau d'exposition pour la souris, il faut prendre en compte la différence entre le rat et la souris quant au taux d'inhalation et au poids corporel ( $0,29 \text{ m}^3/\text{j}$  vs  $0,052 \text{ m}^3/\text{j}$  et  $0,35 \text{ kg}$  vs  $0,03 \text{ kg}$  selon Derelanko, 1995) et s'assurer que la dose par unité de poids corporel soit semblable.

$$\text{Dose chez le rat : } 500 \mu\text{g}/\text{m}^3 \times 0,29 \text{ m}^3/\text{j} / 350 \text{ g} = 0,414 \mu\text{g}/\text{g}/\text{j}$$

Pour atteindre cette même dose chez la souris :  $0,414 \mu\text{g}/\text{g}/\text{j} \times 30 \text{ g} / 0,052 \text{ m}^3/\text{j} = 238,8 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Ainsi, le niveau d'exposition cible auquel les souris ont été exposées a été de  $250 \mu\text{g}/\text{m}^3$ .

Cette étude d'exposition subchronique est la première étude murine qui étudie les effets toxiques de différentes tailles particulaires sur les changements pathologique et immunologique similaires à ceux observés chez l'humain (Salehi *et al.*, 2008). L'exposition oro-nasale a permis de réduire au minimum l'accumulation de Be venant de l'absorption cutanée et gastro-intestinale. De plus, dans cette étude, nous avons essayé de reproduire le plus précisément possible les conditions d'exposition des travailleurs dans leur lieu de travail.

Notre étude apporte des données nouvelles quant à l'impact de la taille des particules sur les effets pulmonaires reliés au Be. Une partie de notre étude (manuscrit 1: *Immunotoxicity of three chemical forms of beryllium following inhalation exposure to different particle sizes*; manuscrit 2: *Urinary levels, tissue concentrations and lung inflammation after nose-only exposure to three different chemical forms of beryllium*) semble démontrer que le Be et le BeO sont les formes chimiques les plus toxiques. Par contre, le MMAD pour chacune des formes chimiques à l'étude (Be-F, BeO-F et BeAl-F) est différent et ne permet pas de statuer clairement sur le rôle de la forme chimique au niveau de l'immunotoxicité et de la cinétique du Be. Le MMAD agit comme facteur limitant dans notre étude pour la comparaison des différentes formes chimiques entre elles. Les données obtenues permettent plutôt de faire ressortir le rôle de la taille particulaire du Be. Effectivement, la taille particulaire, représentée par le MMAD, ainsi que le caractère soluble ou non des particules de Be, ont joué un rôle très important sur la déposition et la rétention pulmonaire. Cette expérience a permis de démontrer que le dépôt des poussières le long des voies respiratoires, et donc au niveau alvéolaire, varie considérablement en fonction de la taille des poussières. Nos résultats soutiennent donc le fait que la granulométrie des particules ait un impact majeur sur le site de déposition. Ces différences importantes au niveau des différents sites de déposition ont des conséquences sur les effets potentiels du Be au niveau du système respiratoire. Effectivement, le Be entraîne une plus grande inflammation pulmonaire ainsi qu'une expression significativement supérieure de

TNF- $\alpha$  et de cellules CD4<sup>+</sup> au niveau des cellules de la rate des souris. Le BeO, ayant le plus petit MMAD, montre la concentration pulmonaire la plus élevée ainsi que l'expression significativement supérieure des cytokines Il-12 et IFN- $\gamma$  au niveau du lavage broncho-alvéolaire des souris.

De plus, les résultats des manuscrits 1, 2 et 4 (*Immunological responses in C3H/HeJ mice following nose-only inhalation exposure to different sizes of Beryllium metal particles*) démontrent plusieurs corrélations entre les concentrations tissulaires de Be et les effets spécifiques reconnus lors d'une exposition au béryllium. Les résultats des coupes histologiques montrent que les souris exposées au Be ont des niveaux d'inflammation pulmonaire similaires à ceux observés chez des patients atteints de béryllose chronique. Les lésions pulmonaires chez les humains sont par contre reconnues pour être plus grandes que celles observées chez les animaux. Nos résultats démontrent aussi une association entre la taille des particules, l'inflammation pulmonaire, la production de certaines cytokines et l'expression de certains lymphocytes. De plus, les données obtenues dans l'article 4 font aussi ressortir le rôle prépondérant de la taille particulaire sur la toxicité du Be pour une même forme chimique. Les souris exposées à la taille fine de Be ont des concentrations tissulaires et sanguines supérieures à celles exposées à la taille totale. En outre, l'expression de certaines cytokines ainsi que l'inflammation pulmonaire est supérieure chez les souris exposées à la taille fine de Be.

Nos résultats démontrent que la sévérité des lésions pulmonaires causées par le Be, tel que l'infiltration interstitielle de lymphocytes et la formation de granulomes non-caséux, augmente avec le temps de résidence pulmonaire (Finch *et al.*, 1990; Nikula *et al.*, 1997). Effectivement, les souris sacrifiées 3 semaines post-exposition montrent une inflammation pulmonaire beaucoup plus sévère que les souris sacrifiées 1 semaine post-exposition, et ce pour toutes les formes chimiques à l'étude (Be-F, BeO-F, BeAl-F). Les



effets pulmonaires apparaissent donc suite à l'exposition au Be et la gravité de ceux-ci augmente avec le temps de résidence pulmonaire des particules de Be.

Compte tenu du potentiel toxique du Be, des mesures de surveillance de l'exposition, de nettoyage et de sécurité dans le laboratoire d'inhalation ont été mises en place afin de vérifier et d'atténuer au minimum les niveaux d'exposition du personnel et de contamination du laboratoire. L'évaluation de ces mesures est une première en toxicologie de l'inhalation et permettra à des équipes de recherches travaillant dans le même domaine de bénéficier de cette expérience et de cette expertise. Cette évaluation n'avait jamais, à notre connaissance, été faite dans un laboratoire de toxicologie de l'inhalation. Les résultats et recommandations retrouvés dans le manuscrit 3 (*Methodology for controlling Beryllium exposure in laboratory using Beryllium powder*) démontrent que nos mesures ont été efficaces, mais que nous pouvons tout de même juger de l'utilité de certaines d'entre elles. Effectivement, le port d'un deuxième survêtement et de la prise hebdomadaire de la contamination des surfaces s'avérait, après analyse des résultats, des mesures non nécessaires pour prévenir la contamination et l'exposition au Be dans notre laboratoire d'inhalation.

En conclusion, cette étude a permis de constater qu'il existait des différences importantes au niveau de la toxicité du Be d'après les différentes tailles particulières à l'étude. Ces différences seraient reliées au dépôt des particules de Be dans les voies respiratoires et également de la capacité des voies respiratoires à les éliminer totalement ou partiellement. La clairance respiratoire est fonction, notamment, du site de déposition et du caractère soluble ou non des particules. Cette recherche aura également permis de démontrer que les souris C3H/HeJ représentent un bon modèle pour l'étude des effets toxicologiques et immunologiques d'une exposition au Be. Ajoutés aux résultats de la première étape du programme de recherche qui consiste à déterminer la spéciation et la caractérisation des particules de Be, les résultats de cette recherche contribueront d'une part

à la compréhension du rôle de la taille des particules et de la forme chimique dans la toxicité du Be. Combinés à d'autres résultats, ils contribueront aussi à guider les actions de prévention relativement à l'exposition au béryllium, entre autre, en permettant la proposition de valeurs limites d'exposition différenciées et ainsi permettre une meilleure évaluation des risques liés à une exposition au Be chez l'humain.

## Bibliographie

- ACGIH. 2009. Beryllium and Compounds. In: Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices, 7th Edition, pp. 1-14. American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati, OH.
- Adamson, I.Y., Bowden, D.H. 1981. Dose response of the pulmonary macrophagic system to various particulates and its relationship to transepithelial passage of free particles. *Exp Lung Res.* 2: 165-175.
- Afsset, Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail, 2006. Les nanomatériaux : Effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement, juillet 2006, 248 pages.
- Amicosante, M., Sanarico, N., Berreta, F. and Arroyo, J. 2001. Beryllium binding to HLA-DP molecule carrying the marker of susceptibility to berylliose glutamate beta 69. *Hum Immunol.* 62(7): 686-93.
- Amicosante, M. and Fontenot, A.P. 2006. T cell recognition in chronic beryllium disease. *Clinical Immunology.* 121:134-143.
- Apostoli, P. and Schaller, K.H. 2001. Urinary beryllium-a suitable tool for assessing occupational and environmental beryllium exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 74:162-166.
- Arroyo, J., Alvarez, A.M., Nombela, C. and Sanchez-Perez, M. 1995. The role of HLA-DP beta residue 69 in the definition of antibody-binding epitopes. *Hum Immunol.* 43(3): 219-26.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2002. Toxicological profile for beryllium. Atlanta, GA. Prepared by: Syracuse Research Corporation (MO-015745), Microfiche: PB2003-100135  
<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/>
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 1988. Toxicological Profile for Beryllium. Prepared by Syracuse Research Corporation under Contract 68-C8-0004. U.S. Public Health Service. ATSDR/TP-88/09.

- Barna, B.P., Chiang, T., Pillariseti, S.G. and Deodhar, S.D. 1981. Immunologic studies of experimental beryllium lung disease in the guinea pig. *Clin Immunol Immunopathol*, 20:402-11.
- Bailey, M.R., Fry, F.A., James, A.C. 1982. The long-term clearance kinetics of insoluble particles from the human lung. *Ann Occup Hyg*. 26: 273-290.
- Balkissoon, R.C. and Newman, L.S. 1999. Beryllium copper alloy (2%) causes chronic beryllium disease. *Journal of occupational and environmental medicine*. 41(4):304-8.
- Brousseau, P., Rossignol, M., Dion, C., Sicard, N., Audusseau, S. et Mazer B. 2007. Concordance interlaboratoire des tests de prolifération lymphocytaire induite par le béryllium (BeLPT). Rapport IRSST ; R-538. 44p.
- Bruce, R.M. and Odin, M. 2001. Beryllium and beryllium compounds. Concise international chemical assessment document (CICAD), no. 32. Geneva, Organisation mondiale de la santé: 75.
- CIRC. 1993. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. Lyon: 444 p.
- Cullen, M.R., Kominsky, J.R., Rossman, M.D., Cherniack, M.G., Ranklin, J.A., Balmes, J. R., Daniele, R.P., Palmer, L., and Naegel, G.P. 1987. Chronic beryllium disease in a previous metal refinery. Clinical epidemiologic and immunologic evidence for continuing risk from exposure to low level beryllium fume. *Am Rev Respir Dis*. 135(1): 201-8.
- Cummings KJ, Stefaniak AB, Virji MA, Kreiss K. 2009. A reconsideration of acute beryllium disease. *Environ. Health Perspec*. 117(8):1250-1256.
- Commission de la santé et de la sécurité du travail du Québec (CSST), Ministère de la santé et des services sociaux, Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST). 2004. Opération Béryllium. Activités dans les établissements du secteur de la première transformation des métaux et dans certains établissements où s'effectuent des opérations de fonderie. Rapport d'étape déposé au comité technique du conseil d'administration sur le béryllium (N° 3.69) le 11 mai 2004. 143 p.

- Commission de la santé et de la sécurité du travail du Québec (CSST), Ministère de la santé et des services sociaux, Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST). 2005. Opération Béryllium. Activités dans les établissements du secteur de l'aéronautique et dans des établissements d'usinage de pièces aéronautiques. Rapport déposé au comité technique du conseil d'administration sur le béryllium (N° 3.69) le 6 juin 2005. 46p.
- Commission de la santé et de la sécurité du travail du Québec (CSST), Ministère de la santé et des services sociaux, Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST). 2006. Opération béryllium. Activités dans les établissements du secteur de l'environnement. Rapport déposé au comité technique du conseil d'administration sur le béryllium (n° 3.69) le 31 octobre 2006. 44p.
- Commission de la santé et de la sécurité du travail du Québec (CSST). Béryllium. Liste sélective de publications disponibles au centre de documentation de la CSST. La prévention, j'y travaille. Septembre 2008.
- Daigle, C.C., Chalupa, D.C., Gibb, F.R., Morrow, P.E., Oberdörster G., Utell, M.J. 2003. Ultrafine particle deposition in humans during rest and exercise. *Inhal Toxicol* 15: 539-552.
- Day, G.A., Hoover, M.D., Stefaniak, A.B., Dickerson, R.M., Peterson, E.J., Esmen, N.A., Scripsick, R.C. 2005. Bioavailability of beryllium oxide particles: an in vitro study in the murine J774A.1 macrophage cell line model.
- Derelanko, M.J. Risk assessment. In *CRC Handbook of Toxicology*, CRC press, Inc., Edited by MJ Derelanko and MA Hollinger, 1995, pp. 591- 676.
- Deubner, D.C., Lockey, J.L., Kotin, P., Powers, M.B., Miller, F., Rogers, A.E., Trichopoulos D. 2001. Re: Lung cancer case-control study of beryllium workers. Sanderson WT, Ward EM, Steenland K, Petersen MR. *Am J Ind Med* 2001. 39:133-144. *Am J Ind Med* 40:284-285.
- DOE (Department of Energy. 1999. Chronic Beryllium Disease Prevention Program; Final Rule. *Federal Register* / Vol. 64, No. 235.

- Drolet-Vives, K., Zayed, J. and Sauve, S. 2009. Assessment of hair and bone accumulation of beryllium by mice exposed to contaminated dusts. *J Appl Toxicol*. May 29. [Epub ahead of print]
- Elgrabli, D. 2008. Toxicité et clairance pulmonaire des nanotubes de carbone. Thèse de docteur de l'Université Paris 7-Denis Diderot; spécialité: Toxicologie. École doctorale ABIES.
- Emond, C., Robin, JP., Breton, R., Philippe, S. and Zayed, J. 2007. Dermal exposure to beryllium : a pilot case study. *Journal of toxicology and environmental health, Part A*, 70 p. 529-533.
- Eisenbud, M. 1998. The standard for control of chronic berullium disease. *Appl Occup Environ Hyg*. 13(1): 25-31.
- Eisenbud, M. and Lisson, J. 1983. Epidemiological aspects of beryllium-induced nonmalignant lung disease: a 30-year update. *J Occup Med*. 25(3): 196-202.
- Eisenbud, M., Wanta, R.C., Dustan, C., Steadman, L.T., Harris, W.B. and Wolf, B.S. 1949. Non-occupational berylliosis. *J Ind Hyg Toxicol*. 31: 281-94.
- Epstein, P. E., Daliber, J. H., Rossman, M. D. and Daniele, R. P. 1982. Bronchoalveolar lavage in a patient with chronic berylliosis: evidence for hypersensitivity pneumonitis. *Ann Intern Med*. 97(2): 213-16.
- Falcy, M. 2003. Béryllium et composés. *Encycl. Méd. Chir. Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS, Paris. Toxicologie-Pathologie professionnelle*, 16-002-B-10, 4 pages.
- Finch, G.L., Mewhinney, J.A., Eidson, A.F., Hoover, M.D. and Rothenberg, S.J. 1988. In vitro dissolution characteristics of beryllium oxide and beryllium metal aerosols. *J. Aerosol Sci*. 19(3): 333-342.
- Finch, G.L., Mewhinney, J.A. and Hoover, M.D. 1990 Clearance, translocation, and excretion of beryllium following acute inhalation of beryllium oxide by beagle dogs. *Fundam Appl Toxicol* 15:231-241.
- Finch, G.L., Hoover, M.D., Hahn, F.F, Nikula, K.J., Belinsky, S.A., Haley, P.J. and Griffith, W.C. 1996. Animal models of beryllium-induced lung disease. *Environ Health Perspect* 104 Suppl 5:973-979.

- Finch, G.L., Verburg, R.G., Mewhinney, J.A. and Eidson, A.F. 1998a. The effect of beryllium compound solubility on in vitro canine alveolar macrophage cytotoxicity. *Toxicol Lett.* 41(2): 97-105.
- Finch, G.L., Nikula, K.J. and Hoover, M.D. 1998. Dose-response relationships between inhaled beryllium metal and lung toxicity in C3H mice. *Toxicol Sci* 42(1):36-48.
- Fontenot, A.P., Canavera, S.J., Gharavi, L., Newman, L.S. 2002. Target organ localization of memory CD4+ T cells in patients with chronic beryllium disease. *The Journal of clinical Investigation.* 110:1473-1481.
- Fontenot, A.P., Maier, L.A., Canavera, S.J., Hendry-Hofer, T.B., Boguniewicz, M., Barker, E.A., Newman, L.S. and Kotzin B.L. 2002b. Beryllium skin patch testing to analyze T cell stimulation and granulomatous inflammation in the lung. *J. Immunol.* 168: 3627-3634.
- Fontenot, A.P., Palmer, B.E., Sullivan, A.K., Joslin, F.G., Wilson, C.C., Maier, L.S., Newman, L.S. and Kotzin, B.L. 2005. Frequency of beryllium-specific, central memory CD4+ T cells in blood determines proliferative response. *J. clinical Investigation* 115:2886-2893.
- Fournier, M., Bernier, J., Brousseau, P., Cyr, D., Viel G. et Sauvé, S. Développement de marqueurs et validation d'outils de diagnostic pour le dépistage de l'hypersensibilité induite par le béryllium. Rapport IRSST : R-556. Avril 2008. 30p.
- Gazette Officielle du Québec. Règlement modifiant le Règlement sur la santé et la sécurité du travail. 20 décembre 2006, Partie 2 138(51):5793-99.
- Green, T.R, Fisher, J., Stone, M.H., Wroblewski, B.M. and Ingham, E. 1998. Polyethylene particles of a 'critical size' are necessary for the induction of cytokins by macrophages in vitro. *Biomaterials* 19: 2297-2302.
- Haley, P.J., Finch, G.L., Mewhinney J.A, Harmsen, A.G., Hahn F.F., Hoover, M.D and Bice, D.E. 1989. A canine model of beryllium-induced granulomatous lung disease. *Lab Invest*, 61:219-227.
- Haley, P.J., Finch, G.L., Hoover, M.D., and Cuddihy, R.G. 1990. The acute toxicity of inhaled beryllium metal in rats. *Fundam Appl Toxicol.* 15(4): 767-78.

- Haley, P.J., Pavia, K.F., Swafford, D.S., Davila, D.R., Hoover, M.D. and Finch, G.L. 1994. The comparative pulmonary toxicity of beryllium metal and beryllium oxide in cynomolgus monkeys. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 16(4): 627-644.
- Hanifin, J.M., Epstein, W.L., and Cline, M.J. 1970. In vitro studies of granulomatous hypersensitivity to beryllium. *J Invest Dermatol.* 55(4): 284-88.
- Hardy, H.L. 1980. Beryllium disease: a clinical perspective. *Environ Res.* 21(1): 1-9.
- Harper, R.A., Stirling, C., Townsend, K. M., Kreyling, W.G., Patrick, G. 1994. Intracellular particle dissolution in macrophages isolated from the lung of the Fischer (F-344) rat. *Exp Lung Res.* 20: 43-56.
- Hart, B.A., Harmsen, A.G., Low, R.B. and Emerson, R. 1984. Biochemical, cytological, and histological alterations in rat lung following acute beryllium aerosol exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 75(3):454-465.
- Hasan, F.M., and Kazemi, H. 1974. Chronic beryllium disease: a continuing epidemiologic hazard. *Chest* 65:289-293.
- Hennerberger, P.K., Cumro, D., Deubner, D.D., Kent, M.S., McCawley, M. and Kreiss, K. 2001. Beryllium sensitization and disease among long-term and short-term workers in a beryllium ceramics plant. *Int Arch Occup Environ Health.* 74(3): 167-76.
- Henneberger, P.K., Goe, S.K., Miller, W.E., Doney, B. and Groce, D.W. 2004. Industries in the United States with airborne beryllium exposure and estimates of the number of current workers potentially exposed. *J Occup Environ Hygiene.* 1(10): 648 – 59.
- Health and Safety Executive (HSE). Summary criteria for occupational exposure standards: beryllium and beryllium compounds, EH64, Sudbury, Suffolk, Health and Safety Executive Books, 1994.
- Health and Safety Executive (HSE). 2004. Health effects of particles produced for nanotechnologies., Health and Safety Executive, Grande-Bretagne. 37 pages et annexes. <http://www.hse.gov.uk/horizons/nanotech/healtheffects.pdf>.



- Hervé-Bazin, B. Les nanoparticules: un enjeu majeur pour la santé au travail?» Sous la direction de INRS, édition EDP sciences, 2007.
- Hofmann, W., Sturm, R., Winkler-Heil, R. and Pawlak, E. 2003. Stochastic model of ultra fine particle deposition and clearance in the human respiratory tract. *Radiation Protection Dosimetry*. 105: 77-79.
- Holt, P.F. 1981. Transport of inhaled dust to extrapulmonary sites. *J. Pathol.* 133: 123-129.
- Hoover, M.D., Castorina, B.T., Finch, G.L., and Rothenberg, S.J. 1989. Determination of the oxide layer thickness on beryllium metal particles. *J. Amer. Ind. Hyg. Assoc.* 50, 550-553.
- Horng, C.J., Horng, P.H., Lin, S.C., Tsai, J.L., Lin, S.R. and Tzeng, C.C. 2002. Determination of urinary beryllium, arsenic, and selenium in steel production workers. *Biol. Trace Elem. Res.* 88:235-46.
- Infante, P.F., Wagoner, F.K. and Sprince, N.L. 1980. Mortality patterns from lung cancer and nonneoplastic respiratory disease among white males in the beryllium case registry. *Environ Res.* 21(1):35-43.
- INRS. 2006. Béryllium et composés minéraux. Fiche toxicologique no. 92. Paris, Institut national de recherche et de sécurité, 6p.
- INRS. 2007. Béryllium et composés minéraux. Nature du dosage, Béryllium sanguin. Paris, Institut national de recherche et de sécurité.  
[http://www.inrs.fr/htm/beryllium\\_sanguin.html](http://www.inrs.fr/htm/beryllium_sanguin.html)
- IRIS. 1998. Toxicological review of beryllium and compounds. Washington, DC : U.S. Environmental Protection Agency. (1998). Microfiche: PB98-151756, EPA/635/R-98/008.
- Jones William, W. 1996. United Kingdom beryllium registry: mortality and autopsy study. *Environ Health Perspect.* 104(Suppl ): 949-51.
- Kelleher, P.C., Martyny, J.W. and Mroz, M.M. 2001. Beryllium particulate exposure and disease relations in a beryllium machining plant. *J Occup Environ Med.* 43(3):238-249.
- Kelly, F.J. 2003. Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. *Occup Environ Med.* 60 (8): 612-616.

- Kent, M.S., Robins, T.G. and Madl, A.K. 2001. Is total mass or mass of alveolar-deposited airborne particles of beryllium a better predictor of the prevalence of disease? A preliminary study of a beryllium processing facility. *Appl Occup Environ Hyg.* 16(5):539-58.
- Kierszenbaum, A.L. 2006. *Histologie et biologie cellulaire : une introduction à l'anatomie pathologique*, De Boeck edn. De Boeck University.
- Kolanz, M.E. 2001. Introduction to beryllium : uses, regulatory history and disease. *Appl Occup Environ Hyg.* 16(5): 559-67.
- Krachler, M., Radner, H. and Irgolic K.J. 1996. Microwave Digestion Methods for the Determination of Trace Elements in Brain and Liver Samples by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Fresenius J Anal Chem* 355: 120-128.
- Krachler, M., Rossipal, E. and Micetic-Turk, D. 1999. Trace of element transfer from the mother to the newborn--investigations on triplets of colostrum, maternal and umbilical cord sera. *Eur J Clin Nutr.* 53(6):484-494.
- Kreiss, K., Mroz, M.M., Zhen, B., Wiedemann, H. and Barna, B. 1997. Risks of beryllium disease related to work processes at a metal, alloy, and oxide production plant. *Occup Environ Med.* 54 (8): 605-612.
- Kreiss, K., Mroz, M.M., Newman, L.S., Martiny, J. and Zhen, B. 1996. Machining risk of beryllium disease and sensitization with median exposure below 2 micrograms/m<sup>3</sup>. *Am J Ind Med.* 30(1): 16-25.
- Kreiss, K., Mroz, M.M. and Zhen, B. 1993. Epidemiology of beryllium sensitization and disease in nuclear workers. *Am Rev Respir Dis.* 148(4 Pt 1): 985-991.
- Kreyling, W.G. and Scheuch, G, 2000. Chapter 7: Clearance of Particles deposited in the lungs. In: *Particle lungs interactions* (Gehr P, Heyder J, Eds), New-York – Basel: Marcel Dekker Inc, 323-376.
- Kreyling, W.G., Semmler, M., Erbe, F., Mayer, P., Takenaka, S., Schultz, H., Oberdorster, G. and Ziesenis A, 2002. Ultrafine insoluble iridium particles are negligibly translocated from lung epithelium to extrapulmonary organs. *J Tox Environ Health* 65 (20): 1513-1530.
- Kriebel, D., Brain, J.D., Sprince, N.L. and Kazemi, H. 1988a. The pulmonary toxicity of beryllium. *Am Rev Respir Dis.* 137(2): 464-73.

- Kriebel, D., Sprince, N.L., Eisen, E.A., Greaves, I.A., Feldman, H.A., and Greene, R.E. 1988. Beryllium exposure and pulmonary function: a cross sectional study of beryllium workers. *Br J Ind Med.* 45(3): 167-73.
- Labrèche, F., De Guire, L. et Provencger, S. 2006. Maladies reliées à l'exposition au béryllium au Québec. Études des réclamations soumises à la commission de la santé et de la sécurité du travail entre 1999 et 2002. Institut national de santé publique du Québec : Risques biologiques, environnementaux et occupationnels. 86p.
- Lansdown, A.B.G. 1995. Physiological and toxicological changes in the skin resulting from the action and interaction of metal ions. *Critical reviews in toxicology,* 25(5):397-462.
- Lee, J.Y., Atochina, O., King, B., Taylor, L., Elloso, M., Scott, P. and Rossman, M.D. 2000. Beryllium, an adjuvant that promotes gamma interferon production. *Infect Immun.* 68(7):4032-9.
- Leonard, A. and Lauwerys, R. 1987. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of beryllium. *Mutation research,* 186:35-42.
- Lundborg, M., Falk, R., Johansson, A., Kreyling, W., Camner, P. 1992. Phagolysosomal pH and dissolution of cobalt oxide particles by alveolar macrophages. *Environ Health Perspect.* 97: 153-157.
- Maier, L.A., Sawyer, R.T., Tinkle, S.S., Kittle, L.A., Barker, E.A. and Balkissoon, R. 2001. IL-4 fails to regulate in vitro beryllium-induced cytokines in berylliosis. *Eur Respir J* 17(3):403-15.
- Maier, L.A. 2001. Beryllium health effects in the era of the beryllium lymphocyte proliferation test. *Appl Occup Environ Hyg.* 16(5): 514-20.
- Maier, L.A., McGrath, D.S., Sato, H., Lympany, P., Welsh, K., Du Bois, R., Silveira, L., Fontenot, A.P., Sawyer, R.T., Wilcox, E. and Newman, L.S., 2003. Influence of MHC class II in susceptibility to beryllium sensitization and chronic beryllium disease. *J. Immunol.* 171, 6910-6918.
- Marchand-Adam, S., Guillon, F., Brauner, M. et Valeyre, D. 2005. Béryllose pulmonaire chronique (2ème partie). Pathogénie, expression clinique, prévention et législation. *Rev Mal Respir.* 22(2) : 271-87.

- Marchand-Adam, S. et Valeyre, D. 2005. Bérylliose pulmonaire chronique : un modèle d'interactions entre environnement et prédisposition génétique (1ère partie). Minéralogie, toxicologie et facteurs de risques. *Rev Mal Respir.* 27. 257-69.
- Martinet, Y. Anthoine, D. et Petiet, G. 1999. Les maladies respiratoires d'origine professionnelle. 2<sup>ème</sup> éditions, Masson, Paris. 288p.
- Masse, R. Ducouso, R. et Nobile, D. 1974. Passage transbronchique des particules métalliques. *Rev Fr Mal Resp.* 1 : 123-129.
- Maynard, A.D. and Kuempel, E.D, 2005. Airborne nanostructured particles and occupational health. *Journal of Nanoparticle Research*, 7: 587-614.
- McCawley, M.A., Kent, M.S. and Berakis, M.T. 2001. Ultra fine beryllium number concentration as a possible metric for chronic beryllium disease risk. *Appl Occup Environ Hyg* 16: 631–638.
- Newman, L.S., Buschman, D.L., Newell, D.J. and Lynch, D.A. 1994. Beryllium disease: assesment with CT. *Radiology.* 190(3): 835-40.
- Newman, L.S., Lloyd, J. and Daniloff, E. 1996. The natural history of beryllium sensitization and chronic beryllium disease. *Environ Health Perspect* 104 (Suppl 5):937-43.
- Newman, L.S., Balkissoon R, Daniloff E, Solida M, Mroz M. 1998. Rate of progression from beryllium sensitization to chronic beryllium disease is 9-19% per year. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157.
- Newman, L.S., Mroz, M.M. and Maier, L.A., 2001. Efficacy of serial medical surveillance for chronic beryllium disease in a beryllium machining plant. *JOEM.* 43(3):231-237.
- Newman, L.S., Mroz, M.M., Balkissoon, R. and Maier. L.A. 2005. Beryllium sensitization progresses to chronic beryllium disease: a longitudinal study of disease risk. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171:54-60.
- Nickell-Brady, C., Hahn, F.F., Finch, G.L. and Belinsky, S.A. 1994. Analysis of K-ras, p53 and c-raf-1 mutations in beryllium-induced rat lung tumors. *Carcinogenesis.* 15(2): 257-62.

- NIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences). The National Toxicology Program-Update. January 2003.
- Nikula, K.J., Swafford, D.S., Hoover, M.D., Tohulka, M.D. and Finch, G.L. 1997. Chronic Granulomatous pneumonia and lymphocyte responses induced by inhaled beryllium metal in A/J and C3H/HeJ mice. *Toxicol Pathol*, 25:2-12.
- Oberdörster, G. 1988. Lung clearance of inhaled insoluble and soluble particles. *J Aerosol Med*. 1: 289-330.
- Oberdörster, G., Finkelstein, J.N., Johnston, C., Gelein, R., Cox, C. and Baggs R. 2000. HEI Research Report: Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. HEI Research Report No. 96, August, 2000, Health Effects Institute.
- Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Lunts, A., Kreyling, W. and Cox, C. 2002. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J. Toxicol. Environ. Health* 65:1531-1543.
- Oberdörster, G, 2005. Inhaled Nano-sized Particles: Potential effects and Mechanisms. *Compte-rendu du First International Symposium on Occupational Health Implications of Nanomaterials, 12 au 14 octobre 2004, Buxton, Grande-Bretagne*, p 35-46. Édité par le Health and Safety Executive Grande-Bretagne et le National Institute for Occupational Safety and Health, États-Unis, juillet 2005.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E. and Oberdörster, J. 2005. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles, *Environ Health Perspect.* 113(7), 823-839.
- Oberdörster, G., Ferin, J., Gelein, R., Soderholm, S.C. and Finkelstein, J. 1992. Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 97: 193-199.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster J. 2007. Concepts of nanoparticle dose metric and response metric. *Environ Health Perspect.* 115(6):A290.
- OSHA (Occupational Safety and Health Administration). 2005. Toxic and Hazardous Substances. 29CFR 1000, Table Z-1, Washington D.C.

- Ostiguy, C., Soucy, B., Lapointe, G., Woods, C. et Ménard, L. 2008. Les effets sur la santé reliés aux nanoparticules. Études et recherches IRSST, Seconde édition, R-558, avril 2008, 112 p.
- Paschal, D.C., Ting, B.G. and Morrow, J.C. 1998. Trace metals in urine of United States residents: reference range concentrations. *Environ. Res.* 76(1):53-59.
- Paustenbach, D.J., Madl, A.K., and Greene, J. 2001. Identifying an appropriate occupational exposure limit (OEL) for Beryllium: Data gaps and current research initiatives. *Applied Occupational and Environmental Hygiene.* 16(5) : 527-538.
- Peters, A., Veronesi, B., Calderón-Garcidueñas, L., Gehr, P., Chi Chen, L., Geiser, M., Reed, W., Rothen-Rutishauser, B., Schürch, S. and Schulz, H. 2006. Translocation and potential neurological effects of fine and ultrafine particles a critical update. *Part. Fibre Toxicol.* 3:1-13.
- Plante, R., Nadeau, D., Robitaille, M. et Ganlin, C. 2002. La béryllose. *Le médecin du Québec.* 37(10) : 97-101.
- Popper HH, 1999. Epithelioid cell granulomatosis of the lung: new insights and concepts. *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis.* 16: 32-46.
- Pott, G.B., Pulmer, B.E., Sullivan, A.K., Silveira, L., Maier, L.A., Newman, L.S., Kotzine, B.L. and Fontenot, A.P. 2005. The frequency of beryllium specific, Th1-type cytokines-expressing CD<sup>4</sup> T cells in patients with beryllium-induced disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115: 1036-1042.
- Poulin, M. et Ricard, S. 2004. Le test sanguin de prolifération lymphocytaire au béryllium (BeLPT) : de la théorie à la pratique. Institut National de Santé Publique, Direction des risques biologiques, environnementaux et occupationnels, 71 p. (NSPQ: 2004-018).
- Raabe, O.G., Al-Bayati, M.A., Teague, S.V. and Rasolt, A. 1988. Regional deposition of inhaled monodisperse coarse and fine aerosol particles in small laboratory animals. *Ann Occup Hyg., Vol. 32,pp.53-63. Supplement 1.*
- Reeves, A.,L. 1965. The absorption of beryllium from the gastrointestinal tract. *Arch Environ Health.* 11(2): 209-14.

- Reeves, A.L. and Vorwald, A.J. 1967. Beryllium carcinogenesis. II. Pulmonary deposition and clearance of inhaled beryllium sulphate in the rat. *Cancer Res.* 27(3): 446-51.
- Reeves, A.,L. 1976. Berylliosis as an auto-immune disorder. *Ann Clin Lab Sci.* 6(3): 256-62.
- Rhoads, K and Sanders, C.L. 1985. Lung clearance, translocation, and acute toxicity of arsenic, beryllium, cadmium, cobalt, lead, selenium, vanadium, and ytterbium oxides following deposition in rat lung. *Environ Res* 36(2):359-378.
- Richeldi, L., Kreiss, K., Mroz, M.M. and Zhen, B. 1997. Interaction of genetic and exposure factors in the prevalence of berylliosis. *Am J Ind Med.* 32(4): 337-40.
- Rothen-Rutishauser, B., Mühlfeld, C., Blank, F., Musso, C. and Gehr, P. 2007. Translocation of particles and inflammatory responses after exposure to fine particles and nanoparticles in an epithelial airway model. Part. *Fibre Toxicol.* 4:1-9.
- RQMT, Règlement sur la qualité du milieu de travail. c. S-2.1, r.15. Lois ur la santé et la sécurité au travail. L.R.Q., c. S-2.1. Mise à jour 7 octobre 2009. [http://www2.publicationsduquebec.gouv.qc.ca/dynamicSearch/telecharge.php?type=3&file=/S\\_2\\_1/S2\\_1R15.htm](http://www2.publicationsduquebec.gouv.qc.ca/dynamicSearch/telecharge.php?type=3&file=/S_2_1/S2_1R15.htm)
- Rosenberg, N. 2005. Béryllose pulmonaire. Dmt: fiche d'allergologie-pneumologie professionnelle (104 TR 36). INRS : no. 104, 4<sup>ème</sup> trimestre.
- Rouleau, M., Dion, C., Plamondon, P., L'Espérance, G. and Zayed, J. 2005. Physical and Chemical Characterization of Beryllium Particles from Several Workplaces in Quebec, Canada-Part A: Time-of-flight Secondary-ion Mass Spectroscopy. *J Toxicol Env Health.* 68:1907–1916.
- Salehi, F., Zayed, J., Audusseau, S., Muller, C., Truchon, G., Plamondon, P., L'Espérance G., Chevalier, G., Mazer, B. 2008. Immunological responses in C3H/HeJ mice following inhalation exposure to different sizes of Beryllium metal particles. Accepted in *J. App.Toxicol.*

- Saltini, C., Winestock, K., Kirby, M. and Pinkston, P. 1989. Maintenance of alveolitis in patients with chronic beryllium disease by beryllium-specific helper T cells. *New Engl J Med.* 320(17): 1103-09.
- Sanders, C.L., Cannon, W.C. and Powers, G.J. 1975 Toxicology of high-fired beryllium oxide inhaled by rodents. I. Metabolism and early effects. *Arch Environ Health* 30:546-551.
- Sanderson, W.T., Ward, E.M., Steenland, K. and Petersen, M.R. 2001. Lung cancer case-control study of beryllium workers. *Am J Ind Med.* 39(2): 133-144.
- Saracci, R. 1983. Epidemiological evidence. In Interpretation of negative epidemiological evidence for carcinogenicity. Proceedings of a symposium held in Oxford, 4-6 july 1983, Oxford, International Agency for Research on Cancer.
- Savary, B., Vincent, R. et Pelletier, A. Le point des connaissances sur le béryllium. INRS, avril 2003.
- Sawyer, R.T., Fadok, V.A., Kittle, L.A. and Maier, L.A. 2000. Beryllium-stimulated apoptosis in macrophage cell lines. *Toxicology.* 149(2-3): 129-42.
- Sawyer, R.T., Maier, L.A., Kittle, L.A. and Newman, L.S. 2002. Chronic Beryllium Disease: A Model Interaction Between Innate and Acquired Immunity. *International Immunopharmacology* 2: 249-261.
- Schepers, G.W.H. 1964. Biological action of beryllium: Reaction of the monkey to inhaled aerosols. *Industrial Medicine and Surgery.* 33: 1-16.
- Schuler, C.R., Kent, M.S., Deubner, D.C., Berakis, M.T., McCawly, M., Henneberger, P.K., Rossman, M.D. and Kreiss, K. 2005. Process-related risk of beryllium sensitization and disease in a copper-beryllium alloy facility. *Am. J. Ind .Med.* 47(3): 195-205. Semenzato, G., Adami, F., Maschio, N. and Agostini, C. 2000. Immune mechanisms in interstitial lung diseases. *Allergy.* 55:1103-20.
- Solvignon, L. 1995. La béryllose, maladie inconnue ? Bilan épidémiologique actuelle en France et dans le monde. Thèse de médecine. Université Claude Bernard, Lion I, 98p.
- Steenland, K. and Ward, E. 1991. Lung cancer incidence among patients with beryllium disease: a cohort mortality study. *J Natl Cancer Inst.* 83(19): 1380-5.



- Stefaniak, A.B., Hoover, M.D., Dickerson, R.M., Peterson, E.J., Day, G.A., Breysse, P.N.,  
Kent, M.S. and Scripsick, R.C. 2003. Surface area of respirable beryllium metal, oxide, and copper alloy aerosols and implications for assessment of exposure risk of chronic beryllium disease. *Am Ind Hyg Assoc J* 64: 297–305.
- Stefaniak, A.B., Hoover, M.D., Day, G.A., Dickerson, R.M., Peterson, E.J., Kent, M.S., Schuler, C.R., Breysse, P.N. and Scripsick, R.C. 2004. Characterization of physicochemical properties of beryllium aerosols associated with prevalence of chronic beryllium disease. *J. Environ. Monitor.* 6:523-532.
- Stefaniak, A.B., Gulmette, R.A., Day, G.A., Hoover, M.D., Breysse, P.N., Scripsick, R.C. 2005. Characterization of phagolysosomal stimulant fluid for study of beryllium aerosol particle dissolution. *Toxicol In Vitro.* 19(1): 123-134.
- Stefaniak, A.B., Weston, A. and Tinkle, S.S. 2006. Beryllium exposure: dermal and immunological considerations. *Int Arch Occup Environ Health* 79: 161–164.
- Stefaniak, A.B., Day, G.A., Hoover, M.D., Breysse, P.N. and Scripsick, R.C. 2006. Differences in dissolution behavior in a phagolysosomal stimulant fluid for single-constituent and multi-constituent materials associated with beryllium sensitization and chronic beryllium disease. *Toxicol. In Vitro* 20(1): 82-95.
- Stefaniak, A.B., Hoover, M.D., Dickerson, R.M., Day, G.A., Breysse, P.N., Scripsick, R.C. 2007. Differences in estimates of size distribution of beryllium powder materials using phase contrast microscopy, scanning electron microscopy, and liquid suspension counter techniques. *Part Fiber Toxicol.* 4:3.
- Stephan, C.H., Sauve, S., Fournier, M. and Brousseau, P. 2009. Use of proliferation tests to evaluate the effects of complexing agents on beryllium toxicity. *J Appl Toxicol* 29: 27–35.
- Stiefel, T., Schulze, K. and Zorn H. 1980. Toxicokinetic and toxicodynamic studies of beryllium. *Arch Toxicol* 45:81-92.
- Stonehouse, A.J. and Zenczak, S. 1991. Properties, production processes and applications. In: *Beryllium: Biomedical and Environmental Aspects*. M.D. Rossman; O.P. Preuss; M.B.Powers, Eds. Williams and Wilkins, Baltimore.

- Strange, A.W. Hilmas, D.E. Furnam, F.J. and Gatcliffe, T.R. 2001. Beryllium sensitization and chronic beryllium disease at a former nuclear weapons facility. *Appl Occup Environ Hyg.* 16(3): 405-17.
- Tabata, Y. and Ikada, Y. 1988. Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophages. *Biomaterials* 9: 356-362.
- Taylor, T.P., Ding, M, Ehler, D.S., Foreman, T.M., Kaszuba, J.P. and Sauer, N.N. 2003. Beryllium in the environment: A review. *Journal of environmental science and health.* Vol. A38 (2) 439- 469.
- Tinkle, S.S., Antonini, J.M. and Rich, B.A. 2003. Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. *Environ Health Perspect;* 111: 1202–8.
- Tinkle, S.S., Kittle, L.A., Schumacher, B.A. and Newman, L.S. 1997. Beryllium induces IL-2 and IFN-  $\gamma$  in berylliosis. *J Immunol.* 158: 518-26.
- Thomas, R.J., Webber, D., Sellors, W., Collinge, A., Frost, A., Stagg, A.,J., Bailey, S.C. Jayasekera, P.N., Taylor, R.R., Eley, S. and Titball, R.W. 2008. Characterisation and deposition of respirable large and small particle bioaerosols. *Appl. Environ. Microbiol.* Doi :10.1128.
- Truchon, G. Guide de surveillance biologique. Prélèvement et interprétation des résultats. Guide technique, 6e édition, IRSST, novembre 2004, T-03, 93 pages.
- US EPA. 1998. Integrated risk information system, substance file: Beryllium and compounds (CASRN 7440-41-7). Washington DC, United States Environmental Protection Agency.
- US EPA. United States Environmental Protection Agency/Science Policy Council, 2005. Nanotechnology White Paper – External Review Draft, Washington D.C., December,2,2005,134p.
- US OSHA. 2002. Preventing adverse health effects from exposure to beryllium in dental laboratories. Hazard information bulletin (HIB 02-04-19). United states occupational safety and health administration, Departementm of labor, 9p.
- US OSHA. 2005. Safety and health topics: Beryllium. United States Occupational Safety and Health Administration, Department of Labor.
- Van Cleave, C.D. and Taylor, C.T. 1955. Distribution, retention and elimination of <sup>7</sup>Be in the rat after intratracheal injection. *Arch Ind Health* 1(1):375-392.

- Vorwald, A.J. Pneumoconiosis (Sixth Saranac Symposium). New-York: Paul B. Hoeber Publishing, 1950.
- Vorwald, A.J. 1968. Pneumoconiosis-diagnostic considerations. *Mich Med.* 67(1): 33-4.
- Wagner, W.D. Groth, D.H. Holtz, J.L. Madden, G.E. and Stokinger, H.E. 1969. Comparative chronic inhalation toxicity of beryllium ores, bertrandite and beryl, with production of pulmonary tumors by beryl. *Toxicol Appl Pharmacol.* 15: 10-29.
- Welch, L., Ringen, K., Bingham, E. and Demen, J. 2004. Screening for beryllium disease among construction trade workers at Department of Energy nuclear sites. *Am J Ind Med.* 46(3): 207-18.
- Williams, W.J. 1994. Beryllium disease. *Occupational Lung Disorders.* P. W. Raymond. London, Butterworth Heinemann. 3ème édition: 571.
- Williams, D.B. and Carter, C.B. 1996. *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science*, 1st ed., Plenum Press, New York, p.359.
- Willis, H.H. and Floring, H.K. 2002. Potential exposures and risks from beryllium-containing products. *Risk Anal.* 22(5): 1019-33.
- Witschger, O. et Fabries J.F. 2005. Particules ultrafines et santé au travail: 1- caractéristiques et effets potentiels sur la santé. *Hygiène et sécurité du travail.* Cahiers de notes documentaires, INRS, 199 : 21-35.
- Yoo, J.K., Cho, J.H., Lee, S.W. and Sung, Y.C. 2002. IL-12 Provides Proliferation and Survival Signals to Murine CD4+ T Cells Through Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathway. *J Immunol.* 169: 3638-3643.
- Yoshida, T., Shima, S., Nigaoka, K., Taniwaki, H., Wada, A., Kurita, H. and Morita, K. 1997. A study on the beryllium lymphocyte transformation test and the beryllium levels in working environment. *Ind Health.* 35(3): 374-9.
- Zhao, Y. and Nalwa, H.S. 2007. *Nanotoxicology, Interactions of Nanomaterials with Biological Systems*, American Scientific Publishers, 300 p