

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Spéciation chimique et immunotoxicologie du béryllium
Effets thérapeutiques des agents complexants
NTA, NTP et tiron

par

Chadi H. Stephan

Département de chimie
Université de Montréal
Facultés des arts et sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Ph.D
en Chimie analytique
option environnementale

Avril, 2008

© Chadi H. Stephan, 2008



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Spéciation chimique et immunotoxicologie du béryllium
Effets thérapeutiques des agents complexants NTA, NTP et tiron

présentée par :
Chadi H.Stephan

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Kevin Wilkinson, président-rapporteur et représentant du doyen de la FES

Sébastien Sauvé, directeur de recherche

Michel Fournier, co-directeur

Jean-François Masson, membre du jury

Diane Beauchemin, examinateur externe

Résumé

L'exposition au béryllium peut causer la maladie chronique du béryllium (MCB) qui est une pneumonie interstitielle granulomateuse caractérisée par une hypersensibilité retardée (type IV), orchestrée par les lymphocytes T mémoires. La maladie chronique du béryllium affecte principalement les poumons et se produit chez 1 à 15 % des individus exposés. Des études récentes d'épidémiologie moléculaire indiquent qu'une interaction de charge entre un certain type d'allèle du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) classe II, l'antigène du béryllium et le récepteur de cellule-T (RCT) est à la base de cette susceptibilité à développer la MCB. Une des approches pour éviter ou empêcher l'interaction de CMH-béryllium-RCT est la formation de complexes non-toxiques par chélation avec un substrat organique ou par encapsulation.

Dans ce travail de recherche, nous avons développé différents essais qui nous permettent de choisir et de vérifier l'efficacité d'un agent complexant dans une thérapie par chélation applicable au béryllium. Après une large revue de littérature basée sur la chimie de coordination du béryllium, nous avons choisi trois agents chélateurs : l'acide nitrilotriacétique (NTA), l'acide nitrilotripropionique (NTP) et le 4,5-dihydroxy-1,3-benzène bisulfonate (tiron). Dans notre premier article, nous avons utilisé le titrage calorimétrique isothermique (TCI) direct ou par compétition pour évaluer le pouvoir chélateur de ces agents complexants et mesurer leurs affinités envers le Be. Nous avons trouvé que NTP et tiron forment des complexes de plus grande stabilité avec du béryllium que NTA avec des constantes d'associations intrinsèques de $9.4 (\pm 1.2) * 10^{13} \text{ M}^{-1}$ pour Be-NTP, $3.2 (\pm 1.6) * 10^{12} \text{ M}^{-1}$ pour Be-tiron et $1.1 (\pm 1.1) * 10^7 \text{ M}^{-1}$ pour Be-NTA.

Dans le deuxième article, nous avons optimisé une technique *in vitro* de prolifération splénocytaire de cellules de souris pour évaluer l'effet bénéfique des trois chélateurs. Nous avons développé plusieurs protocoles pour étudier l'effet correctif, protecteur, et combiné de ces agents. Nous avons également regardé l'effet de la chélation

sur la sensibilisation splénocytaire au béryllium. Les trois agents complexants ont montré des effets correctifs et ont démontré une efficacité dans les effets combinés, sauf le NTA dans l'essai combiné à rapport fixe. Le NTP ainsi que le tiron ont montré des effets protecteurs significatifs même à de faibles concentrations tandis que le NTA n'a montré aucun effet. L'exposition des cellules splénocytaires au complexe Be-tiron a montré que le tiron en complexant le béryllium empêche la sensibilisation splénocytaire au Be.

Dans le troisième article, nous avons optimisé une méthode de spectrométrie par absorption atomique à four de graphite (SAA-FG) pour la détermination directe du béryllium dans des micros échantillons non digérés de sang et de sérum humain. Les échantillons de sang et de sérum sont préparés par une simple dilution de 8 fois et 5 fois respectivement avec un réactif de Nash. Nous avons également comparé trois procédures expérimentales : sans utilisation d'un modificateur, avec du nitrate de magnésium et avec du palladium/acide citrique en tant que modificateurs chimiques. Pour le sérum, aucun des modificateurs n'a amélioré la sensibilité de la méthode. Les températures optimales de pyrolyse et d'atomisation sont de 1000 et 2900 °C respectivement. La limite de détection de la méthode est 2 ng L⁻¹, la masse caractéristique est 0.22 (± 0.07) pg et le taux de recouvrement était de 97.5 (± 2.5) %. Dans le sang, l'utilisation de 6 µg de nitrate de magnésium a montré une amélioration de la sensibilité de méthode. Les températures optimales de pyrolyse et d'atomisation sont de 800 et 2800 °C respectivement. La limite de détection est 7 ng L⁻¹, la masse caractéristique est 0.20 (± 0.02) pg et le taux de recouvrement était de 100 (± 1) %.

Dans notre dernier article, nous avons étudié l'effet du NTP et tiron sur la répartition du béryllium dans le sérum humain. Nous avons, en premier lieu, mesuré la concentration moyenne du béryllium dans le sérum humain chez quatorze individus non exposés pour une moyenne de 0.5 (± 0.1) µg L⁻¹, avec 21 (± 3) % du béryllium complexé avec la fraction de faible masse moléculaire (FMM) et 79 (± 3) % liés à la fraction de haute masse moléculaire (HMM). L'addition du tiron a augmenté la masse de béryllium dans la fraction de HMM,

alors que le NTP n'a montré aucune influence sur la répartition moléculaire du Be entre les deux fractions mais complexe la totalité du Be dans la fraction de FMM selon une simulation de la spéciation chimique réalisée par MineqL+.

Mots-clés : Béryllium, thérapie par chélation, titrage isothermique calorimétrique, prolifération splénocytaire, spectrométrie d'absorption atomique à four de graphite, acide nitrilotriacétique, acide nitrilotripropionique, 4,5-dihydroxy-1,3-benzène disulphonate.

Abstract

Occupational exposure to beryllium may cause chronic beryllium disease (CBD), a granulomatous interstitial pneumonia caused by a cell-mediated immune response with delayed hypersensitivity (type IV), mediated by the memory T lymphocytes. CBD mainly affects the lungs and occurs in 1 to 15 % of exposed individuals. Molecular epidemiological studies indicate a charge interaction of a specific major histocompatibility complex (MHC) class II human leukocyte, beryllium antigen and T-cell receptor (TCR) as a factor in disease susceptibility. One of the approaches to circumvent the MHC-beryllium-TCR interaction is the formation of nontoxic complexes either by chelation with an organic substrate or by metal encapsulation.

In this work, we developed a series of tests to select and to study the efficiency of a complexing agent in a beryllium chelation therapy. After an in-depth literature review based on beryllium coordination chemistry, we selected three organic chelators: nitrilotriacetic acid (NTA), nitrilotripropionic acid (NTP) and 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulphonate (tiron). In our first paper, we used a direct and an optimized competitive isothermal titration calorimetry (ITC) to evaluate the chelation potential and selectivity of NTA, NTP and tiron. We found that NTP and tiron form complexes of increased stability with beryllium compared to NTA with an intrinsic association constant of $9.4 (\pm 1.2) \cdot 10^{13} \text{ M}^{-1}$ for beryllium-NTP, $3.2 (\pm 1.6) \cdot 10^{12} \text{ M}^{-1}$ for beryllium-tiron and $1.1 (\pm 1.1) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ for beryllium-NTA.

In the second paper, we optimized an *in vitro* technique to evaluate the beneficial effect of the three chelators using a splenocyte proliferation test (SPT) in mouse cells. We studied the corrective, protective, and combined effects using different experimental protocols. We also looked at the effect of chelation in preventing beryllium sensitization. All three complexing agents showed a corrective effect and proved efficient in the combined effects, except NTA in a fixed ratio assay. Both NTP and tiron showed a

significant protection at the lower beryllium concentrations while NTA did not. Mouse splenocytes exposed to chelated beryllium (Be-tiron) did not show any sensitization.

In the third paper, we focused on optimizing an analytical method that would allow us to look at the chelation effect and its influence on the fractionation of beryllium in human serum. For that, we optimized a graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF-AAS) method for the direct determination of beryllium in undigested micro quantities of human blood and serum. Blood and serum samples are prepared respectively by a simple 8-fold and 5-fold dilution with a Nash Reagent. We also compared three experimental setups: using no modifier, using magnesium nitrate and using palladium/citric acid as chemical modifiers. In serum, neither modifier improved the method sensitivity. The optimal pyrolysis and atomization temperatures are 1000 °C and 2900 °C, respectively. The method detection limit is 2 ng L⁻¹, the characteristic mass is 0.22 (± 0.07) pg and recovery ranges from 97.5 (± 2.5) %. In blood, 6 µg of magnesium nitrate was found to improve the method sensitivity. The optimal pyrolysis and atomization temperatures are 800 °C and 2800 °C, respectively. The detection limit is 7 ng L⁻¹, the characteristic mass is 0.20 (± 0.02) pg and recovery ranges from 100 (± 1) %.

In our last paper, we present the effect of NTP and tiron on the fractionation of beryllium in human serum. We found that the average serum beryllium concentration from fourteen non exposed individuals is 0.53 (± 0.14) µg L⁻¹, with 21 (± 3) % of the beryllium mass bound to the low molecular mass fraction (LMM) and 79 (±3) % bound to the high molecular mass fraction (HMM). The addition of tiron increased the beryllium mass in the HMM fraction, while NTP did not show any influence on the Be molecular mass distribution but was shown to complex most of the Be in the LMM according to a speciation simulation using MineqL+.

Keywords : beryllium, chelation therapy, isothermal titration calorimetry, splenocyte proliferation test, graphite furnace atomic absorption spectrometry, nitrilotriacetic acid, nitrilotripropionic acid and 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulphonate, serum fractionation.

Table des matières

Spéciation chimique et immunotoxicologie du béryllium, effets thérapeutiques des agents complexants, NTA, NTP et tiron.....	i
Résumé.....	iii
Abstract.....	vi
Table des matières.....	ix
Liste des tableaux.....	xvi
Liste des figures.....	xvii
Liste des abréviations.....	xxi
Remerciements.....	xxiv
Chapitre 1: Introduction.....	1
1.1 Historique et généralités du béryllium.....	2
1.2 Sources d'exposition.....	3
1.2.1 Air.....	4
1.2.2 Eau.....	5
1.2.3 Sol.....	7
1.3 Voies d'exposition.....	8
1.3.1 Inhalation.....	10
1.3.2 Orale.....	10
1.3.2 Dermique.....	11
1.4 Toxicité du béryllium.....	11
1.4.1 Toxicité suite à l'inhalation.....	12
1.4.1.1 Toxicité pulmonaire.....	12
1.4.1.2 Cancer pulmonaire.....	14
1.4.1.3 Toxicité immunologique et lymphatique.....	15
1.4.1.4 Autre toxicité.....	16
a) Toxicité cardio-vasculaire.....	16

Table des matières

b) Toxicité hématologique	16
c) Toxicité diverse	17
1.4.2 Toxicité suite à l'administration orale.....	17
1.4.2.1 Mort.....	17
1.4.2.2 Toxicité gastro-intestinale	18
1.4.2.3 Toxicité diverse	18
1.4.3 Toxicité suite à l'exposition dermique	18
1.4.3.1 Toxicité dermique	18
1.4.3.2 Toxicité immunologique et lymphatique	19
1.4.3.2 Mort.....	19
1.4.3.3 Toxicité systémique	20
1.5 Immunotoxicologie du béryllium.....	20
1.5.1 Système immunitaire.....	20
1.5.1.1 Les monocytes et macrophages.....	21
1.5.1.2 Les Lymphocytes T.....	22
1.5.1.3 Les Lymphocytes B	22
1.5.1.4 Les cellules tueuses naturelles (NK).....	23
1.5.2 Immunotoxicologie	24
1.5.2.1 Immunosuppression	24
1.5.2.2 Hypersensibilité.....	25
1.5.2.3 Auto-immunité	26
1.5.3 Inflammation chronique	26
1.6 Mécanisme d'action : béryllose chronique	27
1.6.1 Test sanguin de prolifération lymphocytaire au béryllium	31
1.7 Objectifs du projet.....	32
Chapitre 2: Revue bibliographique des agents complexants.....	34
2.1 Choix des agents complexants	35
Chapitre 3: Méthodes de mesure des constantes d'associations	48

Table des matières

3.1 Revue des méthodes de détermination des constantes d'associations	49
3.2 Théorie du titrage calorimétrique isothermique	50
3.2.1 Titrage calorimétrique isothermique directe	50
3.2.2 Théorie du titrage calorimétrique isothermique par compétition.....	51
3.3 Matériels et méthodes	55
3.3.1 Instrumentation	55
3.4 Résultats et discussions.....	57
3.4.1 Détermination de la constante d'association du béryllium, calcium et zinc avec le tampon MES	57
3.4.2 Étude de sélectivité du NTP et du tiron envers le béryllium en présence du magnésium	61
3.5 Conclusion	64
Chapitre 4: Méthodes de détermination du béryllium.....	65
4.1 Revue des méthodes de détermination du béryllium dans le sang et le sérum	66
4.1.1 Fluorométrie.....	66
4.1.2 Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CG-SM)	67
4.1.3 Émission atomique à source plasma (Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES))	67
4.1.4 Spectrométrie de masse à plasma couplé inductivement (ICP-MS)	68
4.1.5 Spectrométrie d'absorption atomique à four de graphite (SAA-FG).....	68
4.2 Matériels et méthodes	69
4.2.1 Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CG-SM)	69
4.2.1.1 Instrumentation	69
4.2.1.2 Préparation du complexe béryllium trifluoroacétylacétone (Be(TFAA) ₂).	69
4.2.1.3 Préparation des échantillons.....	70
4.2.2 Émission atomique à source plasma (Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES))	70
4.2.2.1 Instrumentation	70

4.2.2.2 Préparation et analyse des échantillons.....	71
4.2.3 Spectrométrie d'absorption atomique à four de graphite (SAA-FG).....	72
4.3 Résultats et discussion	73
4.3.1 Détermination du béryllium par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse.....	73
4.3.2 Détermination du béryllium par émission atomique à source plasma (ICP-AES)	74
4.3.3 Détermination du béryllium par spectrométrie d'absorption atomique à four de graphite (SAA-FG).....	76
4.4 Conclusion	77
Chapitre 5: Evaluation of three beryllium sequestering agents by isothermal titration calorimetry	78
5.1 Abstract	79
5.2 Résumé.....	80
5.3 Introduction	81
5.3.1 Competitive ITC	83
5.4 Materials and methods	86
5.4.1 Chemicals and reagents.....	86
5.4.2 Isothermal titration calorimetry.....	87
5.5 Results and discussion	88
5.5.1 Metal binding to buffer	88
5.5.2 Heat of buffer ionization	88
5.5.3. Be ²⁺ -Ca ²⁺ -EDTA validation system.....	88
5.5.4 Beryllium-Nitrilotriacetic acid.....	91
5.5.5 Beryllium-Nitrilotripropionic acid.....	92
5.5.6 Beryllium-tiron.....	93
5.6 Conclusion	93
5.7 Acknowledgements.....	93

Chapitre 6: Use of proliferation tests to evaluate the effects of complexing agents on beryllium toxicity	94
6.1 Abstract	95
6.2 Introduction	96
6.3 Materials and methods	100
6.3.1 Animals	100
6.3.2 Cell preparation and culture	100
6.3.3 Splenocytes Proliferation Test (SPT).....	101
6.3.3.1 Controls:.....	101
6.3.3.2 Corrective effect protocol:	101
6.3.3.3 Protective effect protocol:.....	102
6.3.3.4 Combined effect protocols:.....	102
6.3.3.5 Sensitizing effect:.....	102
6.3.4 Viability and exposure time	103
6.3.5 Data analysis	103
6.4 Results	104
6.4.1 Viability	104
6.4.2 Splenocyte proliferation test	106
6.4.2.1 Control	106
6.4.2.2 Corrective effect.....	108
6.4.2.3 Protective effect	110
6.4.2.4 Combined effect	111
6.4.2.5 Sensitization effect	117
6.5 Discussion	118
6.6 Conclusion	121
6.7 Acknowledgment	122
Chapitre 7: Graphite furnace atomic absorption spectrometry as a routine method for the quantification of beryllium in blood and serum.....	123

Table des matières

7.1 Abstract	124
7.2 Introduction	125
7.3 Experimental	127
7.3.1 Instrumentation	127
7.3.2 Reagents and solutions.....	128
7.3.3 Blood and serum Samples.....	129
7.4 Results and discussion	130
7.4.1 Optimization of the furnace temperature program.....	130
7.4.2 Palladium/citric acid as a chemical modifier	131
7.4.3 Magnesium as chemical modifier	134
7.4.4 Analysis of blood	136
7.4.5 Analysis of serum.....	138
7.5 Conclusion	139
7.6 Acknowledgements	140
Chapitre 8: Study on the effects of nitrilotripropionic acid and 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulphonate on the fractionation of beryllium in human serum using graphite furnace atomic absorption spectrometry	141
8.1 Abstract	142
8.1.1 Background	142
8.1.2 Results	142
8.1.3 Conclusions	142
8.2 Introduction	144
8.3 Materials and methods	147
8.3.1 Reagents	147
8.3.2 Solutions.....	147
8.3.3 Sample preparation.....	148
8.3.4 Graphite furnace atomic absorption spectrometer	148
8.3.5 Chemical Speciation.....	149

Table des matières

8.3.6 Statistical analysis	150
8.4 Results and discussion	150
8.4.1 Beryllium in serum.....	150
8.4.2 Beryllium distribution in serum	151
8.5 Conclusion	160
8.6 Acknowledgments.....	161
Chapitre 9: Conclusion et perspectives futures.....	162
Annexe des figures.....	I
Annexe des Tableaux	A

Liste des tableaux

Tableau 1-1. Source d'émissions atmosphériques du béryllium aux États-Unis (USEPA, 1987).	5
Tableau 2-1. Les différents agents complexant du béryllium.	36
Tableau 3-1. Paramètres de fonctionnement de l'ICP-AES.	72
Tableau 5-1. Complete thermodynamic data of the Be ²⁺ -Ca ²⁺ -EDTA calibration system. ..	89
Tableau 5-2. Complete thermodynamic data of Be-NTA, Be-NTP and Be-tiron complexes (25 °C ; $\mu = 0.1$).	92
Tableau 6-1. EC ₅₀ threshold values of the different splenocyte proliferation test for the control, corrective and protective assays with the resulting improvement ratio.....	107
Tableau 6-2. EC ₅₀ threshold values of the different splenocyte proliferation tests for the combined assays with the resulting improvement ratio.	115
Tableau 6-3. Results of Loewe additivity and Bliss independent for the combined assays of splenocyte proliferation test.	117
Tableau 7-1. Instrument conditions and furnace programme for the determination of beryllium.	128
Tableau 7-2. Beryllium contents in blood and serum of ten individuals.	138
Tableau 8-1. The furnace programme for the determination of beryllium in serum.	149
Tableau 8-2. Concentration and natural distribution of beryllium in human serum in non-exposed individuals.	152
Tableau A-1. Données thermodynamiques des agents complexants EDTA, NTA, NTP et tiron.	B

Liste des figures

Figure 1-1. Spéciation du béryllium dans l'eau de surface ($[\text{Be}] = 0.1 \text{ mM}$; Mineql+).	7
Figure 3-1. Schéma du calorimètre à titrage isothermique.	56
Figure 3-2. Variation des isothermes de Be-NTP en fonction de la concentration du MES.	58
Figure 3-3. Variation des isothermes de Ca-EDTA en fonction de la concentration du MES.	59
Figure 3-4. Variation des isothermes de Zn-EDTA en fonction de la concentration du MES.	60
Figure 3-5. Isothermes du titrage de NTP par le béryllium en présence et en absence du magnésium.	62
Figure 3-6. Isothermes du titrage de NTP par le béryllium en présence et en absence du magnésium.	63
Figure 4-1. Détermination du béryllium par chromatographie gazeuse couplée avec un spectromètre de masse.....	74
Figure 4-2. Détermination du béryllium par ICP-AES.	75
Figure 4-3. Analyse du béryllium par spectrométrie d'absorption atomique à four de graphite.....	76
Figure 5-1. Nitrilotriacetic acid (NTA), nitrilotripropionic acid (NTP) and 4,5-dihydroxy- 1,3-benzene disulphonate (tiron) structures.	82
Figure 5-2. Comparison between binding isotherms. The circles show the displacement titration of $500 \mu\text{M}$ of EDTA by 10 mM Ca(II) in the presence of 1 mM Be(II) while the squares show the same titration without Be(II) in 50 mM MES at pH 5.5, $25 \text{ }^\circ\text{C}$. 90	
Figure 6-1. Viability of splenocytes assessed after 48 hours of incubation (SPT protocol) with each of the chemicals (Be, NTA, NTP and tiron) calculated as a deviation in percentage from the positive control.....	105

- Figure 6-2. Control SPT dose-response curves performed on pre-incubated (20 h) splenocytes showing the inhibition of splenocytes expressed in stimulation index as a function of increasing concentrations of the different chemicals. 108
- Figure 6-3. L-SPT dose-response curves performed on beryllium (10^{-5} M) pre-exposed splenocytes showing the potential corrective effect of the three ligands expressed as a stimulation index as a function of increasing ligand concentration. 109
- Figure 6-4. Be-SPT dose-response curves performed on ligand (10^{-5} M) pre-exposed splenocytes showing the potential protective effect of the three ligands expressed in stimulation index as a function of increasing beryllium concentration. 111
- Figure 6-5. SPT dose-response curves performed on pre-incubated (20 h) splenocytes showing the combined effect of beryllium with each of the three ligands independently expressed in stimulation index as a function of increasing beryllium concentration in a fixed Be:L ratio of (1:2). 112
- Figure 6-6. Be-SPT dose-response curves performed on pre-incubated (20 h) splenocytes showing the combined effect at fixed ligand concentration (10^{-5} M) (each ligand independently) expressed in stimulation index as a function of increasing beryllium concentration. 114
- Figure 6-7. Be-SPT dose-response curves performed on pre-incubated (20 h) splenocytes showing the combined effect at fixed ligand concentration (10^{-5} M) (each ligand independently) expressed in stimulation index as a function of increasing beryllium concentration. 116
- Figure 6-8. L-SPT dose-response curves performed on pre-incubated (20 h) splenocytes showing the combined effect at a fixed beryllium concentration (10^{-5} M) expressed in stimulation index as a function of increasing ligand concentration (each ligand independently). 118
- Figure 7-1. Thermal pre-treatment pyrolysis and atomization curves for 5-fold diluted, non spiked serum and 8-fold diluted, non spiked blood without the addition of any chemical modifier. 131

Figure 7-2. Influence of the mass of added palladium on the relative absorbance of beryllium in 8-fold diluted blood and 5-fold diluted serum samples.....	133
Figure 7-3. Variations in the background signal; (a) blood without modifier; (b) blood with 15 µg of palladium; (c) blood with 10 µg magnesium; (d) serum without modifier; (e) serum with 10 µg palladium; (f) serum with 12 µg magnesium.....	134
Figure 7-4. Influence of the mass of added magnesium mass on the relative absorbance of beryllium in 8-fold diluted blood and 5-fold diluted serum samples.....	136
Figure 8-1. Chemical structures of nitrilotripropionic acid (NTP) and 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulphonate (tiron).....	145
Figure 8-2. Speciation of Be in the LMM of serum fluid. ($[\text{Be}^{2+}]$ $5.8 \cdot 10^{-5}$ mM; $[\text{Ca}^{2+}]$ 1.3 mM; $[\text{Cl}^-]$ 108 mM; $[\text{CO}_3^{2-}]$ 24 mM; $[\text{K}^+]$ 4.2 mM; $[\text{Mg}^{2+}]$ 0.8 mM; $[\text{Na}^+]$ 142 mM; $[\text{PO}_4^{2-}]$ 2 mM; $[\text{SO}_4^{2-}]$ 0.5 mM; $[\text{Cit}^{3-}]$ 0.1 mM; $[\text{Ox}^{2-}]$ 0.01 mM).....	153
Figure 8-3. Influence of tiron on the distribution of beryllium between the HMM and the LMM fractions in three spiked individuals.....	155
Figure 8-4. Influence of tiron on the distribution of beryllium between the HMM and the LMM fractions in three non spiked individuals.....	156
Figure 8-5. Mobilisation Index (MI) of Be as a function of tiron concentration.....	157
Figure 8-6. Influence of NTP on the distribution of beryllium between the HMM and the LMM fractions in three spiked individuals.....	158
Figure 8-7. Influence of NTP on the distribution of beryllium between the HMM and the LMM fractions in three non spiked individuals.....	159
Figure 8-8. Influence of NTP on the speciation of Be in the LMM of serum fluid. ($[\text{Be}^{2+}]$ $5.8 \cdot 10^{-5}$ mM; $[\text{NTP}^{3-}]$ 10^{-4} mM; $[\text{Ca}^{2+}]$ 1.3 mM; $[\text{Cl}^-]$ 108 mM; $[\text{CO}_3^{2-}]$ 24 mM; $[\text{K}^+]$ 4.2 mM; $[\text{Mg}^{2+}]$ 0.8 mM; $[\text{Na}^+]$ 142 mM; $[\text{PO}_4^{3-}]$ 2 mM; $[\text{SO}_4^{2-}]$ 0.5 mM; $[\text{Cit}^{3-}]$ 0.1 mM; $[\text{Ox}^{2-}]$ 0.01 mM).....	160
Figure A-1. Fractionnement molaire de l'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA) en fonction du pH.....	II

Figure A-2. Fractionnement molaire de l'acide nitrilotriacétique (NTA) en fonction du pH.	III
Figure A-3. Fractionnement molaire de l'acide nitrilotripropionique (NTP) en fonction du pH.....	IV
Figure A-4. Fractionnement molaire de l'acide 4,5-dihydroxy-1,3-benzènedisulfonique (tiron) en fonction du pH.....	V

Liste des abréviations

ACGIH :	American Conference of Governmental and Industrial Hygienists
ADCC :	Antibody dependent cell cytotoxicity
ADN :	Acide désoxyribonucleique
ATA :	Acide aurintricarboxylique
Be :	Béryllium
BeLPT :	Beryllium lymphoproliferation test
CBD :	Chronic beryllium disease
CD :	Classe de différenciation
CDR :	Complimentary determining region
CDTA :	Acide Trans-1,2-cyclohexanediamineN,N,N',N' tétraacétique
CID :	Charge injection device
Cl- <i>o</i> -PhDTA :	Acide 4-chloro- <i>o</i> -phenylènediamine-N,N,N',N'-tétraacétique
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
Con A :	Concanavalin A
DFO :	Deferoxamine
DMPS :	Acide 2,3-dimercapto-1-propanesulfonique
DMSA :	Acide méso-2,3-dimercaptosuccinique
DPA :	D-pénicillamine
DTPA :	Acide diéthylènetriamine pentaacétique
EC :	Effective concentration
EDDADP :	Acide éthylènediamine-N,N'-diacétique-N,N'-dipropionique
EDTA :	Acide éthylènediamine tétraacétique
EDTP :	Acide éthylènediamine-N,N,N',N'-tétrapropionique
EGTA :	Acide éthylèneglycol bis(2-aminoéthyléther)-N,N,N',N'-tétraacétique
Epitope :	Antigenic determinant
ES-MS-MS :	Electrospray tandem mass spectrometry

Liste des abréviations

FPLC :	Fast protein liquid chromatography
FMM :	Faible masse moléculaire
GC-MS :	Gas chromatography mass spectrometry
GF-AAS :	Graphite furnace atomic absorption spectrometry
Hdpp :	3-hydroxy-1,2-diméthyl-4(1H)-pyridone
HEDTA :	Acide n-(2-hydroxyéthyle) éthylènediamine-N,N',N'-triacétique
HEPES :	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
Hima :	1-(3-hydroxy-2-furanyl)éthanone
Hka :	5-hydroxy-2-hydroxyméthyl-4H-4-pyranone
HLA :	Human leukocyte antigen
Hma :	3-hydroxy-2-méthyl-4-pyrone
HMM :	High molecular mass
HBQS :	10-Hydroxybenzo[h]quinoline-7-sulfonate
ICP-AES :	Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry
ICP-MS :	Inductively coupled plasma mass spectrometry
Ig :	Immunoglobuline
Igm :	Immunoglobuline membranaire
IL :	Interleukine
INF :	Interféron
ITC :	Isothermal titration calorimetry
LMM :	Lourd masse moléculaire
LMM :	Low molecular mass
LTT :	Lymphocyte transformation test
MAB :	Maladie aiguë du béryllium
MCB :	Maladie chronique du béryllium
MES :	Acide 2-(N-morpholino) éthane sulfoniques
MI :	Mobilisation index
NDAP :	Acide nitrilodiacétiquepropionique

Liste des abréviations

NK :	Naturelle killer
NMML:	Nominal molecular mass limit
NR :	Nash reagent
NTA :	Acide nitrilotriacétique
NTP :	Acide nitrilotripropionique
PDTA :	Acide 1,2-propylène-diamine-N,N,N',N'-tétraacétique
PhDTA :	Acide <i>o</i> -phenylènediamine-N,N,N',N'-tétraacétique
PI :	Propidium iodide
USEPA :	United states environmental protection agency
RCC :	Retrocontrôle de cellule
RCT :	Récepteur de cellule-T
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
SAA-FG :	Spectrométrie par absorption atomique à four de graphite
SD :	Standard deviation
SM-ES :	Spectrométrie de masse en mode electrospray
SPT :	Splenocyte proliferation test
Succ :	Acide 1,2-éthanedicarboxylique
STEWB :	Seronorm trace elements whole blood
TBE :	Tribromoéthane
TCI :	Titration calorimétrique isothermique
TCR :	T cell receptor
TDTA :	Acide 3,4-toluènediamine-N,N,N',N'-tétraacétique
TFAA :	Trifluoroacétylène
Th :	T auxiliaire
Tiron :	4,5-dihydroxy-1,3-benzène bisulfonate
TNF :	Tumor necrosis factor
TPS :	Test de prolifération splénocytaire

Remerciements

Je remercie en tout premier lieu mon directeur de recherche, Mr. Sébastien Sauvé, et mon codirecteur, Mr. Michel Fournier de m'avoir accueilli dans leurs laboratoires de recherche. Leur précieux soutien tout au long de mon projet de recherche, leurs judicieux conseils, leur dévouement et leurs encouragements répétés m'ont permis de faire face aux difficultés qui n'ont pas manqué de surgir au cours de la réalisation de ce projet.

Je remercie tous ceux qui ont collaboré à la réalisation des articles découlant de ce travail, spécialement Mme Pauline Brousseau et Mr. Michel Lafleur.

Je remercie chaleureusement tous mes collègues du laboratoire de chimie analytique environnementale de l'Université de Montréal et Mme Marlène Fortier de l'Institut national de recherche scientifique pour leurs esprits d'entraide et d'amitié.

Je remercie mes parents Habib et Lamia, ma petite famille Ghislaine et Rachel pour leur appui et soutien. Qu'ils trouvent en ces lignes l'expression de toutes mes reconnaissances.

Merci

À Rachel, ma coquine

Chapitre 1

Introduction

1.1 Historique et généralités du béryllium

Le béryllium est le premier des métaux alcalino-terreux, de symbole chimique Be et de masse atomique 4. Ce métal fût découvert en 1797 par le chimiste français Louis Vauquelin sous la forme d'oxyde de béryllium (BeO) comme composant du béryl, un minéral transparent à translucide composé essentiellement d'aluminosilicates et de béryllium ($\text{Be}_3\text{Al}_2\text{Si}_6\text{O}_{18}$). Le nom béryllium dérive du Grec « *beryllos* ». Il était aussi connu sous le nom glucinium, en Grec « *glykys* » doux, en référence avec le goût sucré de ses composés avec 'Gl' comme symbole chimique. En 1828, le chimiste allemand Friedrich Wöhler ainsi que le chimiste français Antoine Alexandre Bussy l'isolèrent indépendamment en réduisant du chlorure de béryllium par du potassium (Wong and Woollins, 1994).

Le béryllium est le 35^{ème} élément en abondance de la croûte terrestre avec une moyenne de 2.8-5.0 mg kg⁻¹ (ATSDR, 2002) et existe naturellement sous l'isotope ⁹Be (Schmidt and Dietl, 1987; WHO, 1990). Le béryllium est un composant essentiel de centaines de minéraux dont les plus importants sont : bertrandite ($\text{Be}_4\text{Si}_2\text{O}_9\text{H}_2$), béryl ($\text{Al}_2\text{Be}_3\text{Si}_6\text{O}_{18}$), chrysobéryl (Al_2BeO_4), et phénakite (Be_2SiO_4). De ces minéraux, seul le béryl et le bertrandite sont d'une importance industrielle. L'émeraude et l'aiguemarine sont les deux formes précieuses du béryl (WHO, 1990).

Le béryllium est un métal gris, fort, léger, néanmoins fragile et qui possède des propriétés chimiques et physiques uniques. Il est le deuxième plus léger des métaux après le lithium avec une remarquable température de fusion (1287°C), la plus élevée parmi les métaux légers. Il possède une excellente ductilité, conductivité thermique, et est non magnétique et résistant à l'oxydation. Il est très perméable aux rayons X, et libère des neutrons quand il est bombardé par des particules alpha (USEPA, 1998a).

À cause de ces propriétés, le béryllium est un élément difficilement remplaçable dans plusieurs industries de hautes technologies. Il est principalement employé comme agent durcissant dans certains alliages, notamment le moldamax, un alliage de cuivre-béryllium. On le trouve dans les ressorts de montre (anti-magnétique), les gyroscopes, dans certaines applications spatiales et aéronautiques pour ses performances exceptionnelles en terme de rapport entre son module d'élasticité et sa densité. Il est aussi utilisé pour la réalisation des freins et de pistons sous forme d'alliages avec l'aluminium. Le béryllium est également utilisé dans des réacteurs nucléaires comme modérateur, comme un composant des céramiques industrielles, en haute technologie et en micro-électronique. Il est aussi utilisé dans des outils non déflagrants pour l'industrie des explosifs, dans la fabrication des filtres pour neutrons et dans les fenêtres à rayons X (USEPA, 1998a). L'oxyde de béryllium est utilisé en électronique, particulièrement en haute fréquence et dans le domaine de la haute tension. Il est à la fois un bon isolant (faibles pertes diélectriques) et un bon conducteur thermique (Greenfield, 1971). Plusieurs autres applications du béryllium furent interdites en raison de sa haute toxicité, un des éléments non radioactifs les plus toxiques du tableau périodique (ATSDR, 2002).

1.2 Sources d'exposition

Le béryllium se trouve naturellement dans la croûte terrestre comme un composé de roches et de minéraux à des concentrations qui varient de 0.038 à 11.4 mg kg⁻¹ (Drury *et al.*, 1978). La réserve mondiale du béryllium est estimée à 200 000 tonnes et la production annuelle est évaluée à 300 tonnes en 1991 (USEPA, 1998a). Les États-Unis sont les principaux producteurs du béryllium avec 75 % de la production mondiale, suivis par l'Argentine, la Chine et l'Inde (WHO, 1990). Les États-Unis sont aussi les principaux consommateurs des produits de béryllium suivis par la Russie et le Japon.

1.2.1 Air

En général, l'émission du béryllium est négligeable durant les activités de minage et de production comparée à celle produite par la combustion du pétrole et des combustibles fossiles qui contiennent en moyenne $100 \mu\text{g L}^{-1}$ et 1.8 à 2.2 mg kg^{-1} de Be respectivement. Aux États Unis, 93 % de l'émission atmosphérique du béryllium provient de la combustion des fossiles (USEPA, 1998a). L'émission naturelle du béryllium résultant de l'activité volcanique contribue autour de 2.6 % de l'émission totale. Le béryllium émis dans l'atmosphère par des activités anthropogéniques est sous forme particulière d'oxyde de béryllium de diamètre aérodynamique moyen de $2.5 \mu\text{m}$ (Gladney and Owens, 1976). Un sommaire des émissions naturelles et anthropogéniques aux États Unis est présenté au Tableau 1-1.

Entre 1981 et 1986, les stations d'interceptions urbaines à travers les États-Unis ont mesuré une concentration atmosphérique annuelle moyenne de béryllium qui varie entre 0.01 et 6.7 ng m^{-3} . La variation du taux atmosphérique du béryllium dépend du niveau d'industrialisation des villes. Cette concentration annuelle moyenne de béryllium varie de 0.04 à 0.07 ng m^{-3} dans les banlieues, de 0.1 à 0.2 ng m^{-3} dans les régions urbaines (Ross *et al.*, 1977; USEPA, 1998b). De plus grandes concentrations sont rapportées aux voisinages des industries de traitement de béryllium avec une concentration moyenne de 15.5 ng m^{-3} et un maximum de 82.7 ng m^{-3} en Pennsylvanie (USEPA, 1987). De façon générale, on ne considère pas que l'exposition des humains à ces taux atmosphériques de béryllium soit suffisante pour causer un risque significatif du développement de la MCB.

Tableau 1-1. Source d'émissions atmosphériques du béryllium aux États-Unis (USEPA, 1987).

Sources d'émission	Production Totale (t de Be par ans)	Facteur d'émission (g de Be par tonne)	Émissions (t de Be par ans)
Naturelle			
Poussière amorphe	8.2	0.6	5.0
Poussière volcanique	0.41	0.6	0.2
Anthropogénique			
Charbon	640	0.28	180
Pétrole	148	0.048	7.1
Minage	0.008	37.5	0.3

1.2.2 Eau

La principale source de contamination en béryllium des eaux de surfaces et souterraines provient des déversements industriels, notamment des industries de production du fer et d'acier. En 1988, aux États Unis, 155 kg de béryllium ont été versés dans les eaux à partir des effluents des industries contrôlées, ce chiffre n'inclue pas les effluents les industries de minage et de production de béryllium (ATSDR, 2002). Les autres sources de contamination des eaux de surfaces englobent la déposition atmosphérique (aérosols d'oxyde de béryllium) et l'effet de dégradation des roches et des minéraux contenant du

béryllium. Dans les eaux souterraines, on s'attend à ce que la totalité du béryllium soit adsorbé sur la matière en suspension ou dans les sédiments (ATSDR, 2002). Plusieurs publications confirment la présence du béryllium dans les sédiments des lacs à une concentration qui dépasse de plusieurs ordres de grandeur sa concentration dans l'eau (Lum and Gammon, 1985; Rossman and Barres, 1988; ATSDR, 2002). À pH neutre, la fraction soluble du béryllium est hydrolysée et se trouve sous forme d'hydroxyde de béryllium ($\text{Be}(\text{OH})_2$). Cette affinité du béryllium envers les ions hydroxydes tend à augmenter sa solubilité en le mobilisant du sédiment à pH basique sous forme de $\text{Be}_5(\text{OH})_7^{3+}$, $\text{Be}(\text{OH})_2$ et $\text{Be}(\text{OH})_3^-$ (Figure 1-1) (Callahan *et al.*, 1979). De façon générale, une plus grande concentration du béryllium est obtenue dans l'eau acidifiée (USEPA, 1998b). En bref, le béryllium n'est pas significativement bio-accumulé ni dans les espèces aquatiques vivant dans les eaux fraîches (Kenega, 1980), ni dans les espèces vivant dans les sédiments marins tel que les palourdes et les huîtres (Byrne and Deleon, 1986).

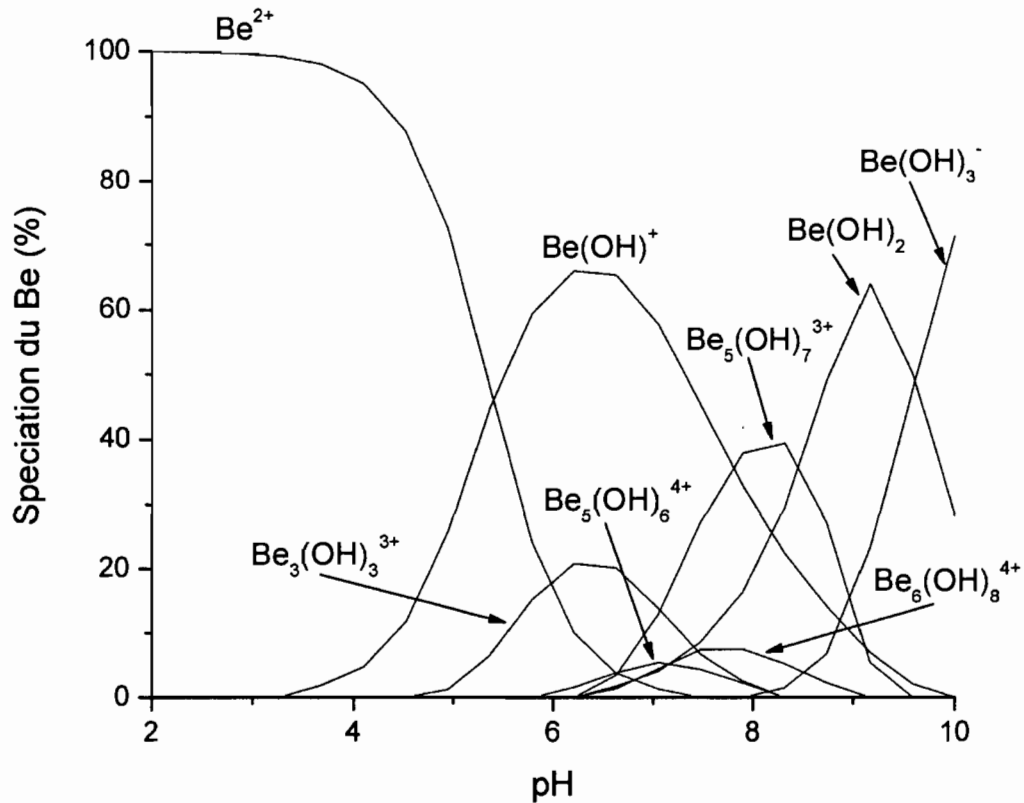


Figure 1-1. Spéciation du béryllium dans l'eau de surface ($[\text{Be}] = 0.1 \text{ mM}$; Mineql+ (Schecher and McAvoy, 2003)).

1.2.3 Sol

Dans les sols, la décharge de cendres de charbon des usines thermiques, des cendres d'incinération de déchets municipaux ainsi que les sources industrielles constituent les principales sources de contamination au béryllium. La déposition atmosphérique est aussi considérée comme une source de contamination des sols (Griffitts *et al.*, 1977). Aux États-Unis, la concentration moyenne du béryllium dans les sols varie entre 2.8 à 5.0 mg kg^{-1}

(sols urbains) et de 1.0 à 7.0 mg kg⁻¹ (sols agricoles) (ATSDR, 2002). La majorité des plantes absorbent le béryllium du sol à des concentrations inférieures à 1 mg kg⁻¹ de matière sèche. Malgré tout, quelques espèces tel que le bouleau ou le mélèze accumulent le béryllium et on peut retrouver une concentration qui s'élève à 10 mg kg⁻¹ de matière sèche (Griffitts *et al.*, 1977). Le coefficient de transfert du béryllium entre le sol et la plante dépend de la nature, de l'espèce et des paramètres du sol (compositions, pH et matière organiques) et varie entre 0.01 - 0.1 (i.e: [plante]/[sol]) (Kloke *et al.*, 1984). La majorité du béryllium accumulé dans les plantes se trouve dans les racines à 97 % (Kaplan *et al.*, 1990). Il n'y a pas de preuve de bioaccumulation significative de béryllium dans la chaîne alimentaire (Fishbein, 1981).

1.3 Voies d'exposition

L'exposition humaine au béryllium provient de la respiration de l'air, de la consommation de nourriture et de l'eau potable ainsi que par ingestion involontaire de poussières. Selon l'Agence de protection environnementale américaine (USEPA, 1987), la prise journalière moyenne du béryllium est de 423 ng. Cette dose se distribue entre la nourriture (28 % - 120 ng par jour calculés sur une consommation de 1200 g de nourriture contenant 0.1 ng de béryllium g⁻¹), l'eau potable (71 % - 300 ng par jour sur une consommation de 1500 g d'eau potable à une concentration de 0.2 ng g⁻¹), de l'air (0.5 % - 1.6 ng par jour sur une consommation de 20 m³ d'air à une concentration de 0.08 ng m⁻³) et de poussières (0.5 % - 1.2 ng par jour sur une consommation de 0.02 g de poussières à une concentration de 60 ng g⁻¹). La fumée de tabac est une autre source potentielle d'exposition au béryllium. Une personne qui fume en moyenne 20 cigarettes par jour est sujette à une inhalation de 1.5 µg de béryllium ce qui équivaut à une augmentation de 3.5 fois la dose journalière (USEPA, 1987). Une autre source potentielle d'exposition au béryllium provient

de la dégradation des prothèses dentaire formées à partir d'alliages de béryllium-nickel (Covington *et al.*, 1985).

L'exposition au béryllium dans le milieu de travail et spécialement dans les industries de minage, de raffinage et de fabrication sont les principaux cas rapportés de toxicité à ce métal. Au Québec, le taux permis d'une exposition journalière au béryllium est de $0.2 \mu\text{g m}^{-3}$. Le béryllium est libéré dans l'air durant une variété d'étapes de production tel que le moulage, le soudage ainsi que toutes autres étapes qui génèrent des aérosols. Aux États-Unis, le nombre total des employés exposés au béryllium dans le milieu de travail est estimé à 21 000 (ATSDR, 2002). Ce dénombrement découle des employés qui ont été exposés à une concentration de béryllium dépassant le taux admissible journalier établi de $2 \mu\text{g m}^{-3}$ fixé par le département de travail américain (Eisenbud, 1998).

Peu de données sont disponibles sur les caractéristiques des aérosols de béryllium dans le milieu de travail et spécialement la taille de ces particules qui influence grandement sa toxicité (Finch *et al.*, 1988). Haley *et al.*, (1989), ont documenté l'influence que porte la température de calcination de l'oxyde de béryllium sur sa toxicité. Ils ont trouvé que la production d'oxyde de béryllium à une température de $500 \text{ }^\circ\text{C}$ génère des particules caractérisées par une plus grande surface spécifique ($< 2.5 \mu\text{m}$ – diamètre particulaire) plus toxique que celles produites à $1000 \text{ }^\circ\text{C}$ ($> 2.5 \mu\text{m}$ – diamètre particulaire). Hoover *et al.*, (1990), ont trouvé que durant le sciage du béryllium métallique, 5.7 % des particules produites ont un diamètre aérodynamique plus petit que $25 \mu\text{m}$ mais plus grand que $5 \mu\text{m}$, et seulement 0.3 % des particules sont plus petites que $5 \mu\text{m}$. Durant le moulage de béryllium, de 12 à 28 % des particules ont un diamètre aérodynamique compris entre 25 et $5 \mu\text{m}$ et entre 4 à 9 % sont plus petites que $5 \mu\text{m}$. Il est très bien documenté dans la littérature que les particules de diamètre aérodynamique inférieur à $25 \mu\text{m}$ se déposent dans la partie supérieure des poumons tandis que les particules de diamètre aérodynamique inférieur à $5 \mu\text{m}$ pénètre plus profondément, causant une plus grande toxicité (Finch *et al.*, 1989; Eidson *et al.*, 1991; Stefaniak *et al.*, 2004; Stefaniak *et al.*, 2005).

1.3.1 Inhalation

L'inhalation est la route primaire d'exposition au béryllium dans le milieu de travail. Sa déposition ainsi que sa clairance pulmonaire sont gouvernées par plusieurs facteurs tel que la dose, la taille et la solubilité de l'aérosol. Selon des études effectuées auprès d'animaux, l'élimination du béryllium accumulé dans les poumons est un processus biphasique. Une phase rapide est attribuée au transport de particules de l'arbre trachéo-bronchial par l'activité mucociliaire à l'étendue gastro-intestinale suivie par une phase lente d'élimination prolongée via la translocation aux ganglions lymphatiques trachéo-bronchiaux, la consommation par macrophages et la solubilisation alvéolaire (ATSDR, 2002). Chez les rats, la demi-vie de l'élimination rapide est de 1 à 60 jours tandis que celle de la phase prolongée est de 0.6 à 2.3 ans dépendamment de la solubilité des composés de béryllium ingérés (Reeves, 1989).

1.3.2 Orale

L'absorption gastro-intestinale du béryllium suite à une ingestion orale est négligeable. Contrairement à l'inhalation où une portion significative du béryllium absorbé se fixe dans les os, l'exposition orale résulte en une absorption inférieure à 1 % de la quantité ingérée. La quasi-totalité du béryllium passe dans la voie intestinale sans absorption. Au pH de l'intestin (6-8), le béryllium se précipite sous forme de phosphate de béryllium ce qui limite son absorption (Flora *et al.*, 1995).

1.3.2 Dermique

L'absorption cutanée (ou dermale) du béryllium est négligeable, et cela en raison de la complexation du béryllium dans les constituants de l'épiderme (phosphatase alcaline et acide nucléique) qui le convertissent en un composé moins soluble au pH physiologique (USEPA, 1998b). Seulement des quantités traces de béryllium ont été absorbées par la peau dans une étude effectuée auprès de rats exposés à une solution aqueuse de chlorure de béryllium (ATSDR, 2002).

1.4 Toxicité du béryllium

Ce n'est qu'en 1930 que les premiers signes du danger potentiel d'exposition aux composés de béryllium sont rapportés (Sanchiz *et al.*, 2002). Le syndrome clinique de la maladie causée par l'exposition aux composés de béryllium a été initialement décrit en 1946 chez des ouvriers dans une industrie de lampes fluorescentes (Hardy and Tabershaw, 1946) et la première observation *in vitro* de la prolifération de cellules exposées au béryllium fût démontrée 20 ans plus tard (Frome *et al.*, 1996). L'exposition par inhalation constitue la voie d'exposition la plus dangereuse et la plus toxique étant donné que l'absorption du béryllium et ses composés est minime par voie orale et dermale. Chez les humains comme chez les animaux, l'appareil respiratoire est la cible privilégiée de la toxicité du béryllium. Cette toxicité pulmonaire se manifeste par un des deux syndromes suivant: la maladie aiguë et la maladie chronique du béryllium, dépendamment des taux d'exposition.

1.4.1 Toxicité suite à l'inhalation

1.4.1.1 Toxicité pulmonaire

En général, deux types d'effets toxiques non-cancérigènes sont associés avec l'exposition au béryllium et ses composés chez les humains: la maladie aiguë et la maladie chronique du béryllium aussi connues sous comme la béryllose et la béryllose chronique.

La maladie aiguë du béryllium (MAB) est une inflammation sévère de l'appareil respiratoire. Les syndromes cliniques de cette maladie varient d'une pharyngite nasale à une pneumonie chimique qui peut être fatale. Cette maladie aiguë est associée à une exposition à des concentrations supérieures à 0.1 mg m^{-3} de Be (Eisenbud *et al.*, 1948). Plusieurs cas de béryllose sont rapportés chez des employés exposés aux composés de béryllium (sulfate, fluorure et oxyde) (VanOrdstrand *et al.*, 1945). Les symptômes des employés atteints par la béryllose varie entre l'irritation nasale et pharyngienne, perte de poids, difficulté de respiration, baisse de capacité vitale et une faiblesse générale (USEPA, 1998a). Ce syndrome de béryllose est pratiquement éliminé suite à l'amélioration de l'hygiène industrielle et à l'introduction de réglementations strictes pour la surveillance de la qualité de l'air dans les milieux de travail (Eisenbud and Lisson, 1983).

La maladie chronique du béryllium (MCB) ou la béryllose chronique est aussi une inflammation de l'appareil respiratoire caractérisée par la formation de granulomes accompagnés par la formation de fibroses interstitielles. La MCB est une maladie immunitaire spécifique au béryllium qui se manifeste essentiellement dans les poumons. Les symptômes associés avec cette maladie incluent une douleur pulmonaire, toux, anorexie, fatigue générale et une dyspnée avec excrétion (Rossman, 1996). Une autopsie sur un des ouvriers atteints par MCB a montré une augmentation de masse pulmonaire, une diffusion de fibrose, formation de granulomes et une anomalie au niveau des bronchioles et des alvéoles. Plusieurs critères sont utilisés pour le diagnostic de la MCB : historique

d'exposition, rayons-x des poumons, faible taux de diffusion du dioxyde de carbone, formation de granulomes et la présence des cellules mononucléaires interstitielles (Newman *et al.*, 1989). Suite au développement technologique des années 80 (bronchoscopie par fibre optique et le test de prolifération des lymphocytes au béryllium), il est maintenant possible de repérer des cas sous-cliniques de béryllose chronique et des cas de sensibilisation au béryllium avant d'atteindre la maladie chronique de béryllium. Newman *et al.*, (1989), ont proposé de classer les individus en trois catégories : (1) sensibilisé au béryllium, caractérisée par un test positif de prolifération des lymphocytes au béryllium, (2) béryllose chronique sous-clinique, caractérisée par un test positif de prolifération des lymphocytes au béryllium avec évidence d'altérations histopathologiques et absence de signes cliniques de maladie, (3) la béryllose chronique, caractérisée par un test positif de prolifération des lymphocytes au béryllium avec évidence d'altérations histopathologiques, des symptômes respiratoires ainsi que de changements physiologiques pulmonaires. L'amélioration de l'hygiène industrielle et l'introduction de nouvelles normes sur la limite d'exposition ont réduit considérablement le nombre d'employés atteint par la béryllose chronique. Cette limite est de $2 \mu\text{g m}^{-3}$ pour une exposition de huit heures par jour, fixée par le département américain de travail - division de santé administrative et sécurité au travail (Rossman, 1996). Malgré ces nouvelles règles, plusieurs cas de sensibilisations et de béryllose chronique continuent à apparaître parmi des employés oeuvrant dans des industries de béryllium même à des taux d'exposition de $0.03 \mu\text{g m}^{-3}$ (Kreiss *et al.*, 1993a; Kreiss *et al.*, 1993b; Kreiss *et al.*, 1996; Stange *et al.*, 1996; Newman *et al.*, 2001). En moyenne, entre 3 à 15 % des employés deviennent sensibilisés au béryllium desquels la moitié développe la béryllose chronique. Ce pourcentage varie en fonction de la nature du travail exécuté par l'employé. Les machinistes ainsi que les mécaniciens sont classés au sommet des employés à haut risque d'être sensibilisés et de développer la maladie chronique du béryllium (Kreiss *et al.*, 1996). Bien que la béryllose chronique soit d'habitude associée aux ouvriers des industries de béryllium, plusieurs cas ont été rapporté chez des techniciens dentistes (Kotloff *et al.*, 1993; Brancaleone *et al.*, 1998) et dans des communautés avoisinantes des

industries de fabrications de matériel à base de béryllium (Eisenbud *et al.*, 1949; Sterner and Eisenbud, 1951).

Chez les animaux, le système respiratoire est aussi l'organe cible suite à l'inhalation des composés de béryllium. Des symptômes de formation de granulomes, infiltration de lymphocytes mononucléaires, altérations endothéliales vasculaires, augmentation du taux de calcium intracellulaire, stimulation de synthèse d'ADN, pneumonie accompagnée par inflammation alvéolaire et fibrose septique sont notés chez des rats comme chez des souris exposés à l'oxyde de béryllium (Sanders *et al.*, 1975; Hart *et al.*, 1984; Finch *et al.*, 1994; Togna *et al.*, 1997; Misra *et al.*, 1999) ou au sulfate de béryllium (Lindenschmidt *et al.*, 1986; Sendelbach and Witschi, 1987; Sendelbach *et al.*, 1989). Ces mêmes symptômes se sont aussi manifestés chez des chiens (Robinson *et al.*, 1968; Haley *et al.*, 1989; Haley *et al.*, 1992), des lapins (Hall *et al.*, 1950) et des singes (Schepers, 1964) exposés à une variété de produits de béryllium (fluorure, sulfate, hydroxyde, phosphate et oxyde).

1.4.1.2 Cancer pulmonaire

Plusieurs études ont été publiées examinant le lien entre l'exposition par inhalation et le développement du cancer chez des ouvriers travaillant dans des industries de traitement de béryllium (Mancuso and El-Attar, 1969; Mancuso, 1980; Infante *et al.*, 1980; Wagoner *et al.*, 1980; Ward *et al.*, 1992; Sanderson *et al.*, 2001a; Sanderson *et al.*, 2001b). En générale, une légère augmentation du taux de mortalité a été observée dans la majorité de ces études, mais aucune conclusion ferme sur l'effet cancérigène du béryllium n'a été proposée. La majorité des études concluant sur l'association entre l'exposition par inhalation au béryllium et le développement du cancer pulmonaire a été critiquée pour mauvaise gestion de paramètres tel que la fumée de cigarette, l'incorporation des employés qui n'ont pas été exposés (représentants de vente et gestionnaires) et l'utilisation de contrôles inappropriés (ouvriers d'industrie de fabrication de pneus ou population

générale). Des études plus récentes ont adressé plusieurs de ces critiques et ont prouvé d'avantage l'effet cancérigène du béryllium (Ward *et al.*, 1992; Steenland and Ward, 1992; Sanderson *et al.*, 2001a). Présentement, le béryllium est classé dans le groupe B1 des composés probablement cancérigènes par l'Agence américaine de protection environnementale (USEPA), quoique le Conseil international de recherche sur le cancer (CIRC) et l'American Conference of Governmental and Industrial Hygienists (ACGIH) le classe comme un cancérigène humain confirmé.

Chez les rats comme chez les singes, plusieurs composés de béryllium (oxyde et sulfate de béryllium) ont montré des effets cancérigènes (Nickellbrady *et al.*, 1994) alors que d'autres (béryl et bertrandite) n'ont montré aucun effet de toxicité (Wagner *et al.*, 1969). Collectivement, les résultats d'expositions des animaux aux différents composés de béryllium nous montrent que le béryllium est un élément cancérigène (ATSDR, 2002).

1.4.1.3 Toxicité immunologique et lymphatique

La maladie chronique du béryllium est en général une maladie immunologique. Le béryllium cause une réponse immunitaire chez les humains et les animaux (Steifel *et al.*, 1980b; Epstein *et al.*, 1982; Rossman *et al.*, 1982; Haley *et al.*, 1989; Saltini *et al.*, 1989; Misra *et al.*, 1999). Les cellules immunitaires sensibilisées au béryllium s'accumulent dans les poumons causant la formation de granulomes (Rossman *et al.*, 1988; Saltini *et al.*, 1990). Le béryllium a été identifié dans les granulomes des patients affectés par la béryllose chronique. Virtuellement, tous les patients atteints par cette maladie développent une hypersensibilité immunologique caractérisée par la formation de granulomes non caséux et non nécrosant dans les poumons, l'augmentation du taux de gammaglobuline sanguin et la présence d'anticorps spécifiques au béryllium (Clarke, 1991). Cette hypersensibilité immunologique a permis le développement du test de prolifération lymphocytaire spécifique au béryllium utilisé aujourd'hui dans la majorité des industries

traitant du béryllium comme un test de surveillance. Cette hypersensibilité immunologique est aussi observée chez les animaux exposés par inhalation aux composés de béryllium. Des chiens, des singes ainsi que des rats ont tous montré une augmentation dans la population lymphocytaire pulmonaire (Schepers, 1964; Steifel *et al.*, 1980b; Haley *et al.*, 1989).

1.4.1.4 Autre toxicité

a) Toxicité cardio-vasculaire

Chez les humains, plusieurs cas de béryllose chronique sont accompagnés par un élargissement du ventricule droit (hypertrophie ventriculaire) et une augmentation du nombre de décès suite à des maladies cardiovasculaires ou par ischémie cardiaque (Ward *et al.*, 1992). Un élargissement du cœur a été aussi remarqué chez des singes et des chiens exposés à différents composés de béryllium (Hall *et al.*, 1950; Schepers, 1964). Cette observation d'élargissement du système cardio-vasculaire est probablement due à l'augmentation de l'effort musculaire cardiaque qui compense la diminution du taux d'oxygène artériel causée par la fibrose pulmonaire suite à l'exposition par inhalation.

b) Toxicité hématologique

Les informations de toxicité hématologique humaine du béryllium sont limitées. Johnson, (1983) n'a trouvé aucune influence de toxicité hématologique (dénombrement de leucocytes et d'hématocrites) tandis que dans une autre étude menée auprès de 170 ouvriers oeuvrant dans une industrie de Cleveland aux États-Unis, (VanOrdstrand *et al.*, 1945) ont rapporté des différences mineures dans la numération globulaire et la physico-chimie sanguine. Similairement à l'humain, (Sanders *et al.*, 1975), n'ont trouvé aucune influence de toxicité hématologique chez des rats suite à une exposition à des aérosols d'oxyde de béryllium. Par contre, des effets de toxicologie hématologique ont été observés chez des

chiens exposés à 30 mg m^{-3} de sulfate de béryllium pendant 15 jours (Stokinger *et al.*, 1950).

c) Toxicité diverse

L'exposition par inhalation de composés de béryllium altère, chez les humains comme chez les animaux, le fonctionnement rénal (Ward *et al.*, 1992). Le béryllium présente des effets nocifs sur le système endocrinien (Sanders *et al.*, 1975; Hardy and Tabershaw, 1946) et cause la perte de poids (VanOrdstrand *et al.*, 1945; Hall *et al.*, 1950).

1.4.2 Toxicité suite à l'administration orale

1.4.2.1 Mort

Les données de létalité suite à l'administration orale de composés de béryllium sont seulement disponibles chez les animaux. La dose létale qui cause 50 % de décès (DL_{50}) varie en fonction des composés de béryllium. Par exemple, chez les rats, le DL_{50} pour le fluorure, le sulfate et le chlorure de béryllium sont de 20, 120 et 200 mg kg^{-1} respectivement. le DL_{50} pour l'oxyfluorure de béryllium est de 18 mg kg^{-1} (Kimmerle, 1966; Schroeder and Mitchener, 1975). Chez des souris une DL_{50} de 140 mg kg^{-1} est rapportée suite à l'administration de sulfate de béryllium (Ashby *et al.*, 1990). Cette différence entre les valeurs de DL_{50} est reliée à la solubilité des composés et leurs potentiels de former du phosphate de béryllium insoluble dans le conduit gastro-intestinal. Une augmentation de la mortalité a été aussi observée chez des chiens exposés à une dose journalière de 12 mg kg^{-1} de sulfate de béryllium, causée par la formation d'ulcères sévères dans le conduit gastro-intestinal (ATSDR, 2002).

1.4.2.2 Toxicité gastro-intestinale

Les seules données disponibles sur la toxicité gastro-intestinale du béryllium suite à l'administration orale proviennent des expérimentations effectuées auprès des animaux. Des ulcères et des lésions ont été observés à l'estomac, le petit et le grand intestins chez des chiens exposés chroniquement à une dose journalière de 12 mg kg⁻¹ de sulfate de béryllium (ATSDR, 2002).

1.4.2.3 Toxicité diverse

Chez les humains, aucun effet de toxicité pulmonaire, cardio-vasculaire, hématologique, hépatique, rénale ou dermique n'est documenté suite à une exposition orale. Chez les rats, l'administration orale d'une dose journalière de 1 mg kg⁻¹ de béryllium a montré de faibles altérations hématologiques (diminution du taux d'érythrocyte, hémoglobine et hématocrite), métabolique (décroissance du taux de phosphate et la phosphatase alcaline dans le sang) ainsi que l'observation de lésions hépatiques et rénales (Schroeder and Mitchener, 1975). Aucun effet dermique n'est remarqué chez des rats exposés au sulfate de béryllium (ATSDR, 2002). L'exposition au béryllium par administration orale ne cause ni toxicité immunologique, ni lymphatique, ne présente pas d'effets sur les systèmes nerveux ou reproducteur et ne cause pas le cancer.

1.4.3 Toxicité suite à l'exposition dermique

1.4.3.1 Toxicité dermique

Des anomalies dermatologiques ont été signalées chez des ouvriers exposés au sulfate, fluorure et oxyfluorure de béryllium (VanOrdstrand *et al.*, 1945). Cette altération

dermique est caractérisée par la formation d'œdèmes et de vésicules dermiques. Une exposition prolongée ainsi qu'une aberration dermique peut provoquer l'ulcération des œdèmes. La formation de granulomes a été aussi remarquée chez des ouvriers souffrant de lésions dermiques (Williams and Kelland, 1987).

1.4.3.2 Toxicité immunologique et lymphatique

Treize patients atteints de dermatite suite à une exposition dermique au fluorure de béryllium ont été évalués par un test d'hypersensibilité cutanée avec différents composés de béryllium pour déterminer la nature immunologique de la dermatite (Curtis, 1951). Le test était positif chez cinq des treize patients. Dans une autre étude, des cochons d'inde ont été exposés au fluorure et au sulfate de béryllium par injection cutanée de 0.0019 ou 0.0005 mg. Les auteurs ont observé une augmentation du taux de lymphokine et du facteur d'inhibition des macrophages quand les lymphocytes sont cultivées avec du sulfate de béryllium (Marx and Burrell, 1973). Une hypersensibilité retardée s'est développée chez des cochons d'inde exposés par voie dermique au sulfate de béryllium (Zissu *et al.*, 1996). Une exposition dermique au béryllium ou à ses composés nous met à risque de développer une hypersensibilité immunologique dont l'intensité relative dépend du sel de béryllium (fluorure > sulfate = chlorure > nitrate).

1.4.3.2 Mort

Aucun cas de décès n'est documenté suite à une exposition dermique au béryllium ou à ses composés chez l'humain ou chez les animaux (ATSDR, 2002).

1.4.3.3 Toxicité systémique

Aucun effet toxique cardiovasculaire, gastro-intestinal, hématologique, hépatique, endocrinien, rénal ou perte de poids est documenté chez les humains comme chez les animaux suite à une exposition dermique au béryllium ou à ses composés (ATSDR, 2002). Des effets de toxicités pulmonaires, formation de fibrose interstitiel, emphysème et hypertrophie bronchitique ont été rapportés chez des cochons d'inde exposés au sulfate de béryllium (Marx and Burrell, 1973).

1.5 Immunotoxicologie du béryllium

1.5.1 Système immunitaire

Le système immunitaire est formé d'un ensemble d'organes, de cellules et de médiateurs chimiques qui travaillent ensemble pour identifier, séquestrer et éliminer les substances étrangères. Chez les humains, ces principaux organes sont le thymus, la rate, la moelle osseuse, le système lymphatique et le système immunitaire commun aux muqueuses (Roitt, 1995). Le système immunitaire a pour rôle de préserver l'intégrité de l'organisme. Il est en charge de reconnaître le soi (corps) représenté par les tissus, organes et cellules de notre organisme du non-soi qui comprend les pathogènes tel que les bactéries, les virus, et les cellules modifiées ou transformées. En cas d'échec, on devient à risque de développer de graves infections et des maladies auto-immunitaires. Le système immunitaire est donc un gardien qui nous protège des infections et des maladies.

Les deux grandes familles de cellules du système immunitaire sont les lymphocytes et les phagocytes. Ces derniers comprennent les macrophages, les neutrophiles et les éosinophiles. Les lymphocytes sont les acteurs principaux dans une réponse immunitaire

spécifique et sont répartis en trois principales classes, les lymphocytes T, les lymphocytes B et les cellules tueuses naturelles (NK, pour *Natural Killer cells*).

1.5.1.1 Les monocytes et macrophages

On retrouve les monocytes en circulation dans le sang. Ils circulent environ huit heures puis migrent pour devenir des macrophages tissulaires. Les macrophages jouent un rôle très important dans le maintien de l'homéostasie normale des tissus en sécrétant des facteurs de croissance et en faisant la surveillance. Ils tuent les cellules cancéreuses et jouent le rôle de cellule présentatrice d'antigène. Les macrophages sont les principales cellules impliquées lors d'une infection par un pathogène. On retrouve les macrophages dans la majorité des tissus. Leur rôle principal est d'intercepter les antigènes, les transformer et les ré-exprimer à leur surface pour la présentation aux lymphocytes T. Cette présentation de l'antigène aux cellules T entraîne la production d'une gamme de cytokines telles que l'IL-1 et le TNF. C'est cette interaction entre les macrophages et les lymphocytes T qui entraîne des stimulations ou des inhibitions au niveau du système immunitaire. Les lymphocytes T et les macrophages utilisent les cytokines pour communiquer. Les cytokines produites par les lymphocytes T affectent les fonctions des macrophages et inversement, les macrophages sont influencés par les lymphocytes. Bref, les macrophages possèdent des capacités de phagocytose, de pinocytose et plusieurs mécanismes cytotoxiques (Al-Sarireh and Eremin, 2000).

Un des mécanismes d'action hypothétique soulevé lors d'une exposition au béryllium est que ce dernier est phagocyté principalement dans les voies pulmonaires par les macrophages alvéolaires. Il est par la suite ré-exprimé à la surface des macrophages et présenté aux lymphocytes T en association avec le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (Sawyer *et al.*, 2002).

1.5.1.2 Les Lymphocytes T

La famille des lymphocytes T regroupe deux classes majeures. Les cellules T qui expriment le CD4 (classe de différenciation), connues sous le nom des cellules T auxiliaires (T_h). Celles-ci reconnaissent les antigènes associés au CMH classe II. Deuxièmement, les cellules exprimant le CD8, connues sous le nom des cellules T cytotoxiques (T_C), reconnaissent les antigènes associés au CMH class I. Les cellules T_h reconnaissent les antigènes extracellulaires et ont pour rôle d'activer les cellules effectrices du système immunitaire : les macrophages, les lymphocytes B et aussi les cellules T_C . Les cellules T_C reconnaissent les antigènes intracellulaires produits par la cellule. Leur reconnaissance est le premier signal d'activation tandis qu'un second signal permet l'expression du pouvoir cytotoxique. Selon leur environnement, les lymphocytes T_h se différencient soit en lymphocytes T_{h1} , soit en lymphocytes T_{h2} . Les T_{h1} orientent la réponse immunitaire vers l'immunité à médiation cellulaire (T_C) tandis que les T_{h2} orientent la réponse immunitaire vers l'immunité à médiation humorale (production d'anticorps) (Roitt, 1995).

L'immunité induite par les lymphocytes T joue un rôle important chez les individus sensibilisés ou atteint par la maladie chronique du béryllium. Les cellules T activées par le béryllium augmentent le pourcentage du récepteur variable bêta trois ($V\beta 3$) qui est associé avec la séquence d'acide aminé de la zone d'hyper-variabilité du complexe majeur d'histocompatibilité (Fontenot *et al.*, 1999a). Bref, le béryllium modifie l'activation des cellules T en augmentant la présentation de l'antigène au CMH grâce à une molécule d'acide glutamique (Glu 69) (Fontenot *et al.*, 1999b).

1.5.1.3 Les Lymphocytes B

Les lymphocytes B expriment les molécules du CMH de classe I (ce sont des cellules nucléées) et les molécules CMH de classe II, ce qui en fait des cellules

présentatrices d'antigènes. L'activation de ces cellules résulte en une prolifération qui en un premier temps augmente le nombre de cellules afin de mieux combattre les substances antigéniques et par la suite différencie ces cellules afin d'obtenir les lymphocytes B mémoire. À la surface de chaque lymphocyte B, on trouve environ 10^5 molécules d'immunoglobuline membranaire (Igm). Chaque lymphocyte B ne synthétise qu'une seule variété d'Igm et n'est capable de reconnaître qu'un seul épitope. Ils reconnaissent directement les antigènes, qu'ils soient solubles et circulants dans le milieu intérieur ou qu'ils soient sous forme particulaire.

Une réponse immunitaire efficace et spécifique implique une coopération directe entre les lymphocytes B et les lymphocytes T. Autant les lymphocytes B que T reconnaissent les composantes du même antigène, pourtant les récepteurs de haute affinité (Igm) des lymphocytes B leur confère une spécificité à un seul antigène. Il est connu que le béryllium affecte les lymphocytes B en augmentant la quantité d'immunoglobulines dans le sérum. Il agit comme mitogène en stimulant non spécifiquement les lymphocytes B (Newman and Campbell, 1987).

1.5.1.4 Les cellules tueuses naturelles (NK)

Elles sont dénommées cellules NK (pour '*Natural Killer*'). Les NK sont dérivées des grands lymphocytes granulaires et qualifiées de cellules tueuses naturelles parce qu'elles exercent un effet cytotoxique direct sur les cellules anormales: les cellules infectées par des virus ou les cellules cancéreuses. Un récepteur membranaire détecte l'absence de molécules CMH de classe I à la surface des cellules cibles. Les cellules NK expriment également des récepteurs qui reconnaissent les antigènes fixés sur la cellule-cible, permettant la fixation de la cellule NK et son activité cytotoxique connue sous la cytotoxicité cellulaire anticorps dépendante ou ADCC (*antibody-dependant cell cytotoxicity*) (Roitt, 1995).

1.5.2 Immunotoxicologie

L'immunotoxicologie étudie les effets des xénobiotiques sur le système immunitaire. Une exposition à un xénobiotique peut perturber le système immunitaire causant sa suppression et diminuant sa résistance aux infections. Les trois principales réactions du système immunitaire suite à l'exposition à un xénobiotique ou à un agent pathogène sont : l'immunosuppression, l'hypersensibilité et les réactions auto-immunes.

1.5.2.1 Immunosuppression

L'immunosuppression est la suppression du système immunitaire suite à l'exposition d'un xénobiotique. Elle augmente l'incidence et la sévérité des infections causant, dans des cas extrêmes, la progression de certains cancers. Par exemple, les infections pathogéniques extracellulaires tel que les bactéries et les parasites causent la suppression de l'immunité humorale et/ou des cellules effectrices du système, comme les cellules phagocytaires. Les infections pathogéniques intracellulaires tel que les protozoaires, et les virus causent la suppression de l'immunité médiatrices et/ou de certaines autres cellules effectrices du système comme les cellules NK (Banerjee *et al.*, 1996).

En général, les métaux affectent différents organes de notre système et exercent leurs effets toxiques via l'interaction avec différentes cibles telle que le système enzymatique, les membranes ou les organelles cellulaires. Dans la plupart des cas, l'exposition aux métaux engendre des effets immunosuppresseurs ou immunomodulateurs dépendamment de la dose (Roitt, 1995).

1.5.2.2 Hypersensibilité

Il existe quatre types d'hypersensibilité immunitaire. Les types I, II et III produisent des anticorps spécifiques après une exposition à un antigène. Pour ce qui est du type IV d'hypersensibilité, il y a une production de cellules T mémoire suite à l'exposition à l'antigène. L'hypersensibilité de type I (immédiate), se produit suite à une exposition à un antigène via les voies respiratoires, cutanées ou gastro-intestinale qui cause la production d'immunoglobuline E (IgE) qui combat les antigènes non spécifiques, comme le pollen et les poussières de maison. L'IgE active les mastocytes qui libèrent l'histamine et déclenche une réaction immunitaire comme dans le cas de l'asthme. L'hypersensibilité de type II ou anticorps-dépendant, est caractérisée par la présence d'anticorps spécifiques contre des antigènes étrangers ou portés par des cellules-cibles. Ceci a comme effet d'induire une phagocytose ou un phénomène de cytotoxicité produit par les cellules NK. Le type III d'hypersensibilité ou hypersensibilité à complexes immuns, se traduit par l'activation du complément et des polynucléaires déclenchée par la présence des complexes immuns dans les tissus. Ils sont attirés par ces dépôts dans les tissus et lorsqu'ils s'accumulent, ils causent des lésions locales. C'est le cas de la maladie sérique. Lors de cette maladie, les complexes immuns circulants augmentent la perméabilité vasculaire provoquant des maladies inflammatoires. En ce qui concerne l'hypersensibilité de Type IV, elle est connue comme l'hypersensibilité à médiateurs cellulaires ou l'hypersensibilité retardée. Pour avoir ce type d'hypersensibilité, il faut d'abord qu'il y ait eu un premier contact avec l'antigène. Lors d'un deuxième contact, une cascade d'événements immunitaires prend place. Les cellules T mémoire libèrent des lymphokines qui induisent une réaction inflammatoire, attirent et activent les macrophages et il y a libération des médiateurs du système immunitaire. Il y a trois types d'hypersensibilité retardée : de contact, de type tuberculine et par réactions granulomatoses où les granulomes sont formés par l'accumulation et la prolifération des lymphocytes T (Roitt, 1995). Bref, plusieurs métaux sont responsables de plusieurs

réactions d'hypersensibilité et sont impliqués dans plusieurs maladies pulmonaires immunologiques ou non.

1.5.2.3 Auto-immunité

L'auto-immunité résulte de la non reconnaissance du soi par notre système immunitaire qui endommage nos propres tissus et organes. Elle est causée par la perte de tolérance aux antigènes du soi. Il y a trois types de composantes impliquées dans la reconnaissance du soi : les immunoglobulines (Igs), les récepteurs cellulaires (TCR) et les complexes majeurs d'histocompatibilités (CMH). Les Igs et le TCR sont exprimés sur les cellules B et T respectivement et les molécules du CMH sont présentées sur toutes les cellules nucléées. Certains produits chimiques, drogues et métaux, sont reconnus pour induire des maladies auto-immunes chez des personnes génétiquement prédisposées. Les mécanismes impliqués dans le développement de maladies auto-immunes sont encore imprécis et différent selon la nature du xénobiotique. En ce qui concerne les métaux, il n'y a pas de principes généraux pour expliquer leur toxicité qui est influencée par plusieurs facteurs dont l'état d'oxydation et la solubilisation. Un métal peut réagir avec des enzymes, des membranes cellulaires et même des cellules de notre organisme. Ces réactions peuvent inhiber ou stimuler notre système immunitaire.

1.5.3 Inflammation chronique

Une réponse inflammatoire chronique se développe lors d'une persistance d'un antigène dans l'organisme. Plusieurs métaux, microorganismes ou autres xénobiotiques ont des composantes particulières qui les empêchent d'être phagocytés. Ces produits induisent donc une inflammation chronique. Les inflammations chroniques sont aussi produites dans

certains cas de maladies auto-immunes ainsi que lors de la présence des antigènes qui stimulent d'une façon continue les cellules immunitaires (Fraser *et al.*, 2003).

L'accumulation et l'activation des macrophages sont la cause essentielle des inflammations chroniques, les cytokines secrétées par les macrophages lors de leur activation chronique stimulent la prolifération de fibroblastes et la production de collagène en plus de plusieurs autres produits toxiques comme les intermédiaires oxygénés tels que le peroxyde d'hydrogène et le TNF- α (*Tumor Necrosis Factor*). Ces inflammations chroniques entraînent la formation des fibroses qui causent des dysfonctionnements dans les organes touchés (Stout and Suttles, 1997).

Plusieurs cytokines jouent un rôle important dans le développement des inflammations chroniques. Les principales cytokines impliquées dans une telle réponse sont l'interleukine 1 et 6 (IL-1 et IL-6), l'interféron γ (IFN- γ) et le TNF- α . Les cellules Th1, NK et les T cytotoxiques secrètent l'IFN- γ alors que les macrophages secrètent du TNF- α . Un des effets les plus importants de l'IFN- γ est sa capacité à activer les macrophages. C'est cette activation qui augmente l'expression des molécules du CMH classe II, la production des cytokines et la présentation des antigènes.

Les macrophages et les lymphocytes jouent un rôle complémentaire lors d'une inflammation chronique. Les macrophages interviennent comme première ligne de défense non spécifique en phagocytant l'agent xénotoxique (le béryllium) et en libérant des cytokines qui recrutent les lymphocytes.

1.6 Mécanisme d'action : béryllose chronique

Les poumons sont l'organe cible d'une exposition au béryllium ou à ses composés. L'adsorption du béryllium par cet organe dépend de plusieurs facteurs dont les propriétés physique et chimique des particules (aérosols) comme la taille et la solubilité et de l'activité des macrophages. Le béryllium déposé dans les poumons est éliminé par un mécanisme à

deux phases : la phase rapide qui porte sur l'excrétion par activité mucociliaire (30 % du béryllium adsorbé a une demi-vie de 12 jours) et la phase lente qui compte sur la translocation, la solubilisation et l'élimination par les macrophages alvéolaires (demi-vie de 900 jours) (Rhoads and Sanders, 1985). Cette interaction entre le béryllium non éliminé et les macrophages alvéolaires est à la base de la sensibilisation au béryllium et du développement de la béryllose chronique.

La béryllose chronique est une hypersensibilité immunologique de type IV qui se développe en réponse à l'antigène du béryllium qui progresse en granulome. Le mécanisme d'action n'est pas complètement compris, mais selon les plus récentes études, on sait que le béryllium est phagocyté (macrophages) et re-exprimé sous forme d'haptène à la surface des cellules présentatrices des antigènes associées au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) classe II (Saltini *et al.*, 1989; Newman, 1996; Amicosante *et al.*, 2001; Saltini *et al.*, 2001). Ce complexe de CMH classe II-béryllium-peptide est par la suite reconnu par les lymphocytes T, spécialement les CD4⁺, qui les activent et déclenchent leur prolifération. Cette observation met en relief l'expansion sélective d'une sous souche spécifique de lymphocytes T. Cela a été confirmé par une étude menée auprès d'individus atteints par la béryllose chronique qui ont montré une augmentation du pourcentage du récepteur variable $\beta 3$ des lymphocytes T (V $\beta 3$) (Fontenot *et al.*, 1998). Ces même chercheurs ont par la suite prouvé que cette expansion du récepteur des lymphocytes T (V $\beta 3$) est associée avec la séquence d'acide aminé de la zone d'hyper-variabilité du complexe majeur d'histocompatibilité (*complementarily determining regions*) CDR3 (Fontenot *et al.*, 1999a). De cela, plusieurs chercheurs du domaine ont signalé l'association de cette hypersensibilité immunologique au béryllium avec la prédisposition génétique de certains individus à développer la béryllose chronique (Richeldi *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999). Plus précisément, c'est l'allèle HLA-DP du CMH classe II qui a montré une relation avec le développement de la béryllose chronique (Richeldi *et al.*, 1993). Par la suite, (Fontenot *et al.*, 2000), ainsi que (Lombardi *et al.*, 2001), ont confirmé que l'allèle HLA-DP possédant un acide glutamique à la position 69 (Glu⁶⁹) est impliqué dans la présentation du béryllium

aux lymphocytes T (CD4⁺). Chou *et al.*, (2005), ont montré que l'ajout de l'anticorps anti-HLA-DP réduit significativement la prolifération induite par le béryllium sans aucun impact sur les cytokines (TNF- α , INF- γ et IL-6) suggérant l'utilisation de ces molécules (anticorps) dans une thérapie pour la MCB.

Des plus amples analyses ont montré que le HLA-DPB1 Glu⁶⁹ n'est pas suffisamment précis pour prédire le développement de la béryllose chronique ($r^2 = 0.36$) (Wang *et al.*, 1999). Ils ont de même observé une relation plus significative avec une des sous-familles de HLA, HLA-non*0201 DPB1 Glu⁶⁹ allèle ($r^2 = 0.57$) et la prédisposition à développer la maladie chronique du béryllium. (Stubbs *et al.*, 1996), ont trouvé que plusieurs sous-familles de HLA sont associées avec la sensibilisation au béryllium dont HLA-DRB1 (*0103, *09, *1302, *0403 et *0302), suggérant que la béryllose chronique est une maladie qui dépend de plusieurs facteurs génétiques contribuant au développement de l'hypersensibilité immunitaire au béryllium. Snyder *et al.*, (2003), ont étudié des modèles structuraux à trois dimensions de HLA-DP codées par une variété de gènes (principalement DPA1*0103; DPB1*1701, DPB1*1901, DPB1*0201, et DPB1*0401). Ils ont trouvé une relation entre le potentiel électrostatique superficiel contrôlé par le positionnement des acides aminés dans la chaîne β du HLA-DP (position 55, 56, 69, 84 et 85) et le développement de la maladie chronique du béryllium. Plus le potentiel électrostatique superficiel est négatif, plus la personne est à risque de développer la béryllose chronique.

Cette hypersensibilité spécifique des lymphocytes T au béryllium est orchestrée par les cytokines. Plusieurs études supportent le rôle important que jouent les cytokines dans la béryllose chronique. Bost *et al.*, (1994), ont observé une augmentation du taux de « tumor necrosis facteur alpha » (TNF- α – qui induit la sécrétion de cytokines) et d'interleukine (IL-6 – qui stimule la sécrétion d'anticorps). Tinkle *et al.*, (1996), ont aussi observé une augmentation du taux de ces deux cytokines accompagnées par une élévation du taux d'interleukine (IL-2 – activation des lymphocytes T) et d'interféron (INF- γ – augmentation de la réponse inflammatoire et augmentation de l'activation des macrophages).

Bref, la béryllose chronique est une maladie qui se développe chez des personnes prédisposées génétiquement. De 10 à 15 % des personnes exposées deviennent sensibilisées desquelles 40 à 60 % développent la béryllose chronique (Newman *et al.*, 1989). La sélectivité de cette maladie est due au codage génétique du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) classe II qui joue un rôle crucial dans la prolifération des lymphocytes T et le développement de la maladie chronique du béryllium. Subséquemment, différents allèles (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR) du CMH classe II sont appelés à jouer un rôle dans la sensibilisation au béryllium. Cette sensibilisation au béryllium ainsi que la béryllose chronique sont dues aux interactions de charges entre le récepteur cellulaire (CMH classe II allèle) chargé négativement et le béryllium-peptide (anticorps) chargé positivement.

A présent, il n'y a pas de traitement pour la béryllose chronique ou la sensibilisation au béryllium. Des stéroïdes corticaux surréniaux tels que la prednisone, la dexaméthasone ou la prednisolone sont prescrits aux personnes atteintes par la béryllose chronique pour réduire l'inflammation pulmonaire. Beaucoup de recherches ciblent l'élaboration des tests de détection et le traitement des altérations immunologiques. Toutefois, peu de travaux sont réalisés sur le traitement par des agents complexants ou la thérapie par chélation. La chélation (du grec *khêlê* : « pince ») est un processus physico-chimique au cours duquel est formé un complexe, le chélate, entre un ligand, dit chélateur, et un cation métallique, dit chélaté. Le chélate se distingue du simple complexe par le fait que le cation métallique est fixé au chélateur par au moins deux liaisons de coordination définissant un cycle avec le métal. Le nombre de liaisons métal-ligand qu'il est possible de former définit la « denticité » : on parle de coordinations bidentés, tridentés, tétradentés, etc. L'atome central est lié aux atomes voisins par au moins deux liaisons en formant une structure annulaire, un cycle chélate. Les cycles chélates les plus stables sont les cycles chélates à 5 et à 6 chaînons. Cette thérapie est fréquemment utilisée lors d'une intoxication avec des métaux ; cette propriété est mise à profit avec des antidotes qui forment un chélate

éliminé lors de la miction. Néanmoins, un nombre limité d'agents complexants (discutés au chapitre 2) ont été essayés mais sans grand succès (Cash *et al.*, 1959; Price and Joshi, 1984; Scarrow *et al.*, 1985; Clevette *et al.*, 1989; Mathur *et al.*, 1993; Mathur *et al.*, 1994; Flora *et al.*, 1995; Chinae *et al.*, 1995; Kontoghiorghes, 1995; Shukla *et al.*, 1998; Johri *et al.*, 2002; Cecconi *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2002; Johri *et al.*, 2004; Mathur *et al.*, 2004), d'où l'objectif de ce travail.

1.6.1 Test sanguin de prolifération lymphocytaire au béryllium

Ce n'est qu'à partir de 1970 que des chercheurs ont démontré que les lymphocytes obtenus de patients atteints par la béryllose proliféraient *in vitro* lorsqu'ils sont en présence de sels de béryllium (Hanifin *et al.*, 1970). Au départ, ce test *in vitro* a été nommé *Lymphocyte Transformation Test* (LTT) parce qu'on pensait que la réaction des lymphocytes avec le béryllium représentait une transformation maligne. Vers la fin des années 80, ce test a été renommé test sanguin de prolifération lymphocytaire au béryllium (BeLPT). Les lymphocytes, obtenus du sang périphérique sont cultivés *in vitro* et exposés à une solution de sulfate de béryllium pour stimuler leur prolifération pendant une période d'incubation de 4 ou de 6 jours. La thymidine tritiée est utilisée pour évaluer la prolifération. Le comptage par un appareil de scintillation qui mesure l'incorporation des précurseurs de l'ADN marqués par un radionucléide quantifie la prolifération des cellules. Les résultats sont généralement exprimés en indice de stimulation, représentant la moyenne de comptes par minute (cpm) des cellules stimulées par le béryllium divisée par la moyenne des cpm des cellules témoins. Bref, le BeLPT nous permet de repérer les individus susceptibles de développer une sensibilisation au béryllium avant même qu'ils ne développent des symptômes. À présent, le BeLPT est utilisé comme un outil de dépistage de la sensibilisation au béryllium.

1.7 Objectifs du projet

Ce projet porte sur l'élaboration d'une série de tests qui nous permettent de sélectionner et de vérifier l'efficacité d'un agent complexant dans une thérapie par chélation applicable à la MCB. Le choix de ces agents complexants est basé sur les propriétés physico-chimiques du béryllium, ses préférences de coordination et les groupements fonctionnels du chélate.

La sensibilisation au béryllium ainsi que la béryllose chronique sont dues aux interactions de charges entre le récepteur cellulaire (CMH classe II allèle) chargé négativement et le béryllium-peptide (anticorps) chargé positivement. L'efficacité d'un traitement par agent complexant dépend donc de l'affinité de ce dernier envers le béryllium qui est évaluée en mesurant la constante d'association du complexe formé. Plus la valeur de cette constante est élevée, plus le complexe du béryllium est stable, plus on 's'attend' à une meilleure efficacité lors d'une thérapie par chélation. Les mesures des constantes d'associations sont réalisées par titrage calorimétrique isothermique (TCI) (article 1). Dans ce premier article, on met dans un contexte la mise au point de la méthode du titrage calorimétrique sous ces deux formes « titrage direct et titrage par compétition » et on mesure les constantes d'associations du béryllium avec certains agents complexants présélectionnés.

Après avoir classés les agents complexants par ordre d'efficacité selon la magnitude de leurs constantes d'associations, il fallait vérifier cette efficacité par un test plus spécifique au béryllium. Nous avons donc travaillé avec le test de prolifération lymphocytaire connue comme *beryllium lymphoproliferation test* (Be-LPT). Dans ce test, on utilise une souche de souris (C57BL/6) sensible au béryllium tout en élaborant plusieurs protocoles de prolifération lymphocytaire afin d'étudier l'effet thérapeutique, protecteur et combiné (article 2). La corrélation entre la grandeur de la constante d'association et les observations thérapeutiques des tests de prolifération lymphocytaire est à confirmer.

Par la suite, le potentiel chélateur de ces agents complexants est vérifié auprès des humains en étudiant l'effet que porte ces agents complexant sur la répartition du béryllium dans le sérum humain (article 4). La quantification du béryllium dans le sang, le sérum ainsi que ces différentes fractions (haute masse moléculaire et faible masse moléculaire) nécessite la mise au point d'une méthode analytique, d'où la spectroscopie d'absorption atomique à four de graphite (article 3).

Chapitre 2

Revue bibliographique des agents complexants

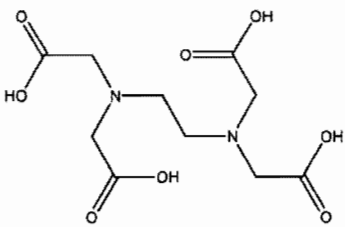
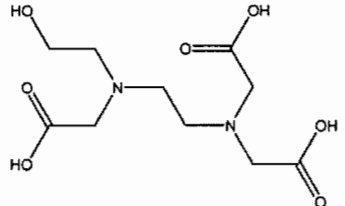
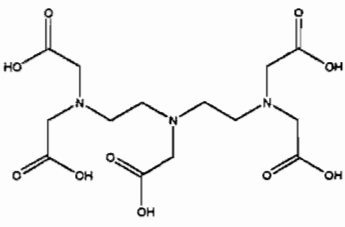
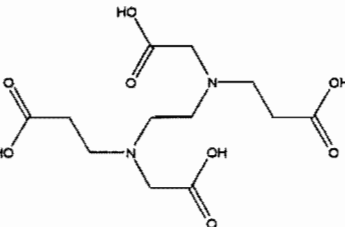
2.1 Choix des agents complexants

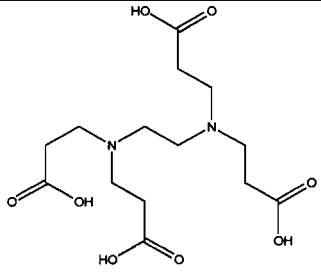
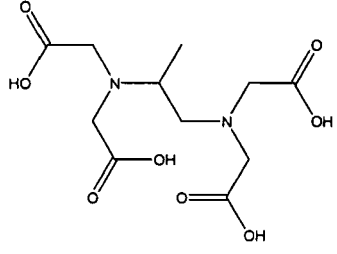
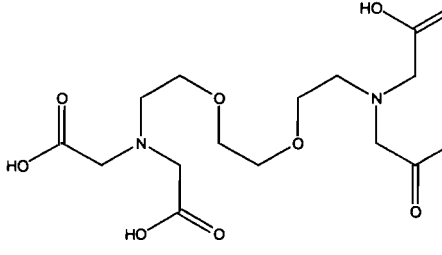
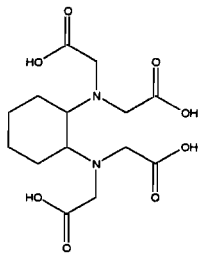
Le béryllium est le premier des alcalino-terreux, possède un rayon atomique de 112 picomètre, un rayon de covalence de 90 picomètre et un potentiel de réduction (E^0) de -1.97 V dans une solution aqueuse ($M^{2+} + 2 e \rightarrow M^0$), ce qui montre sa faible électropositivité. Cette faible électropositivité confère au béryllium la tendance à former des liaisons covalentes. Le béryllium ne forme pas de composés dans lequel la liaison est principalement ionique. Il préfère se relier à des molécules fortes donneurs d'électron tels que H_2O , NH_3 , CO , etc formant des complexes stables (Greenwood and Ebinger, 1997). La stabilité du complexe formé varie selon la série spectrochimique, une liste qui ordonne les ligands selon leurs capacités à donner des électrons, d'où $CO > CN^- > NO_2^- > NH_3 > NCS^- > H_2O > F^- > Cl^- > I^-$. Au niveau de la coordination, le béryllium utilise les orbitales $2s$, $2p_x$, $2p_y$ et $2p_z$, ce qui lui confère généralement des complexes de type tétraédrique.

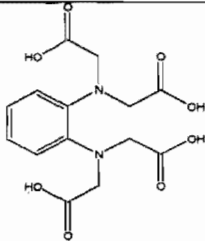
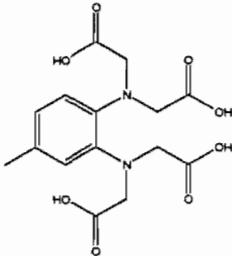
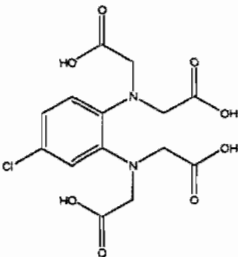
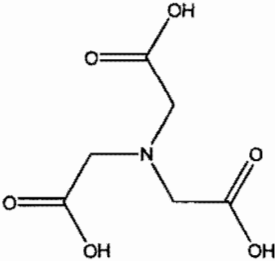
Le nombre d'études portant sur la capacité de coordination ou la chélation du béryllium dans une solution aqueuse est limité. Cette limitation est causée par sa forte toxicité ainsi que sa grande tendance à s'hydrolyser dans un milieu aqueux (Figure 1-1). Le béryllium(II) s'hydrolyse dans l'eau et forme des hydroxydes de béryllium à pH 6, et béryllates (BeO_3) à un pH supérieur à 8 (Baes and Mesmer, 1976; Wong and Woollins, 1994).

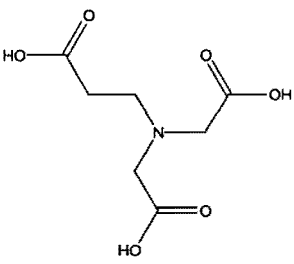
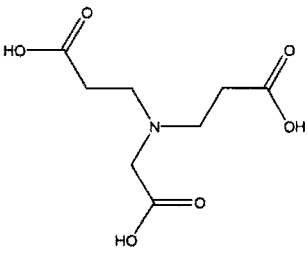
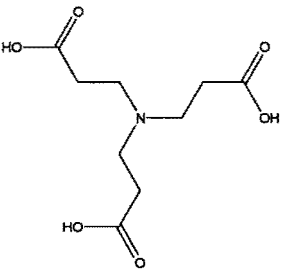
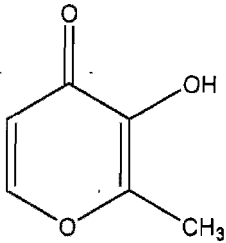
Une revue de la littérature nous a permis de cibler un certain nombre de ligands déjà utilisés avec le béryllium (Tableau 2-1). Cette étude a permis de sélectionner quelques ligands en fonction de leurs caractéristiques respectives et des résultats préalablement publiés. Cette sélection préalable de ligands va servir à étudier l'efficacité des tests élaborés durant ce projet en vue de sélectionner l'agent complexant le plus approprié pour une thérapie par chélation.

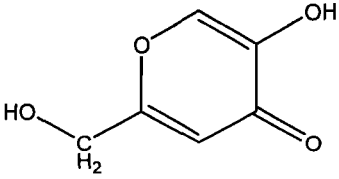
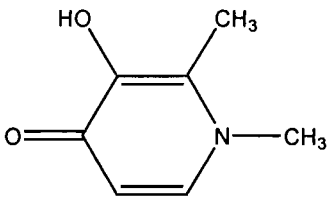
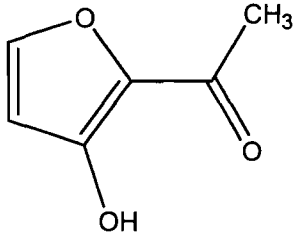
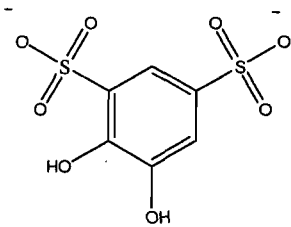
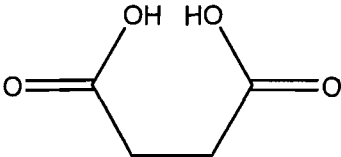
Tableau 2-1. Les différents agents complexant du béryllium.

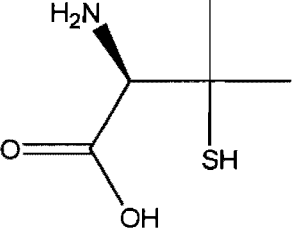
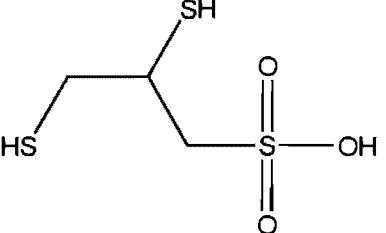
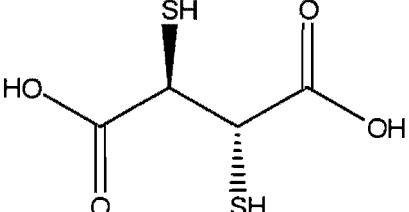
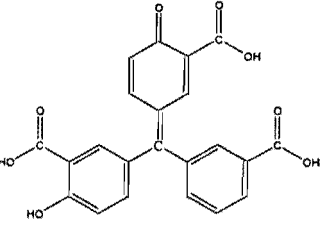
Nom	Formule	Structure	Log (K) [†]
Acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA) ^a	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈		7.90
Acide n-(2-hydroxyéthyle) éthylènediamine-N,N',N'- triacétique (HEDTA) ^b	C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₇		N/D*
Acide diéthylènetriamine pentaacétique (DTPA) ^{b,c}	C ₁₄ H ₂₁ N ₃ O ₁₀		N/D
Acide éthylènediamine- N,N'-diacétique-N,N'- dipropionique (EDDADP) ^a	C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O ₈		8.50

Nom	Formule	Structure	Log (K) [†]
Acide éthylènediamine- N,N,N',N'-tétrapropionique (EDTP) ^a	C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₈		8.45
Acide 1,2-propylène- diamine-N,N,N',N'- tétraacétique (1,2-PDTA) ^a	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₈		7.83
Acide éthylèneglycol bis(2- aminoéthyléther)-N,N,N',N'- tétraacétique (EGTA) ^d	C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₁₀		N/D
Acide Trans-1,2- cyclohexanediamineN,N,N', N'tétraacétique (CDTA) ^a	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₈		7.83

Nom	Formule	Structure	Log (K) [†]
Acide <i>o</i> -phénylènediamine- N,N,N',N'-tétraacétique (<i>o</i> -PhDTA) ^a	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₈		6.51
Acide 3,4-toluènediamine- N,N,N',N'-tétraacétique (3,4-TDTA) ^a	C ₁₅ H ₁₈ N ₂ O ₈		6.88
Acide 4-chloro- <i>o</i> - phénylènediamine- N,N,N',N'-tétraacétique (4-Cl- <i>o</i> -PhDTA) ^a	C ₁₅ H ₁₈ N ₂ O ₈		5.79
Acide nitrilotriacétique (NTA) ^a	C ₆ H ₉ NO ₆		7.83

Nom	Formule	Structure	Log (K) [†]
Acide nitrilodiacétiquepropionique (NDAP) ^a	C ₇ H ₁₁ NO ₆		8.12
Acide nitriloacétiquedipropionique (NADP) ^a	C ₈ H ₁₃ NO ₆		9.25
Acide nitrilotripropionique (NTP) ^a	C ₉ H ₁₅ NO ₆		9.23
3-hydroxy-2-méthyl-4- pyrone (maltol, Hma) ^e	C ₆ H ₆ O ₃		5.73

Nom	Formule	Structure	Log (K) [†]
5-hydroxy-2-hydroxyméthyl-4H-4-pyranone (acide kojique, Hka) ^e	C ₆ H ₆ O ₄		5.01
3-hydroxy-1,2-diméthyl-4(1H)-pyridone (Hdpp) ^e	C ₇ H ₉ NO ₂		8.47
1-(3-hydroxy-2-furanyl)éthanone (isomaltol, Hima) ^e	C ₆ H ₆ O ₃		4.11
Acide 4,5-dihydroxy-1,3-benzenedisulfonique (tiron) ^f	C ₆ H ₄ O ₈ S ₂		N/D
Acide 1,2-éthanedicarboxylique (acide succinique) ^g	C ₄ H ₆ O ₄		N/D

Nom	Formule	Structure	Log (K) [†]
D-penicillamine (DPA) ^{h,i}	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S		N/D
Acide 2,3-dimercapto-1- propanesulfonique (DMPS) ^{h,i}	C ₃ H ₈ O ₃ S ₃		N/D
Acide méso-2,3- dimercaptosuccinique (DMSA) ^j	C ₄ H ₆ O ₄ S ₂		N/D
Acide aurintricarboxylique (ATA) ^k	C ₂₂ H ₁₄ O ₉		N/D

^a(China *et al.*, 1995) ; ^b(Mathur *et al.*, 1993) ; ^c(Mathur *et al.*, 2004) ; ^d(Shrivastava *et al.*, 1995) ; ^e(Cecconi *et al.*, 2002) ; ^f(Sharma *et al.*, 2002) ; ^g(Shukla *et al.*, 1998) ; ^h(Johri *et al.*, 2004) ; ⁱ(Johri *et al.*, 2002) ; ^j(Mathur *et al.*, 1994) ; ^k(Krivanek and Reeves, 1972) ;
* donnée non disponible ; † constante intrinsèque.

Nous avons trié les agents complexants du Tableau 2-1 en trois catégories : les polyaminocarboxyliques (EDTA à 4-Cl-o-PhDTA), les aminocarboxyliques (NTA à NTP) et la catégorie mixte (Hma à ATA). Cette troisième catégorie, regroupe un mélange d'agents complexants dont certains ont été sélectionnés chimiquement, physiologiquement ou bien proposés comme agents complexants prometteurs pour la complexation du béryllium.

Nous commençons cette analyse avec la première catégorie en triant les polyaminocarboxyliques selon leurs constantes d'affinités envers le béryllium. En se basant sur les données de constante de stabilité intrinsèque (K) publiées par (Chinea *et al.*, 1995), on obtient l'ordre suivant : EDTP ~ EDDADP > EDTA ~ 1,2-PDTA ~ CDTA ~ EGTA > 3,4-TDTA > o-PhDTA > 4-Cl-o-PhDTA. Cet ordre est justifié par la notion des chélates à six-atomes qui manifestent une plus grande stabilité que les chélates formant un anneau de cinq atomes. Cette plus grande stabilité des chélates à six atomes, manifesté par EDDADP et EDTP, est justifiée par la présence des groupements propioniques plutôt qu'acétiques. Ils ont aussi documenté la forte tendance du béryllium à s'hydrolyser manifestée par la coexistence du complexe $[\text{Be}_3(\text{OH})_3(\text{HL})]$ avec $[\text{BeL}]$ par analyse aux rayons-X (L représente chacun des ligands). Cette observation nous mène à arranger les polyaminocarboxyliques ainsi que tous autres agents complexants en fonction de leur constante d'association conditionnelle. Cette constante d'association conditionnelle (K') tient compte de la compétition des différentes espèces d'hydroxyde du béryllium, d'où l'ordre à pH 7.4 : o-PhDTA ~ 3,4-TDTA > 4-Cl-o-PhDTA > EDTA ~ 1,2-PDTA ~ EGTA > EDTP ~ CDTA > EDDADP. C'est la compétition entre l'ion H^+ et le béryllium ionique (Be^{2+}) qui influence grandement la stabilité du complexe formé. En général, c'est la basicité des fonctions amines dans les polyaminocarboxyliques qui influence grandement la magnitude de la constante de stabilité conditionnelle. C'est la faible basicité des fonctions amines aromatiques dans o-PhDTA, 3,4-TDTA et 4-Cl-o-PhDTA qui justifie leurs positions en haut de la liste (K' accrue). Par contre, la forte basicité des fonctions amines

dans EDDADP, EDTP et CDTA explique leurs positions en fin de la liste (faible K'). EDTA, 1,2-PDTA et EGTA occupent le milieu de la liste tout en respectant la tendance de basicité des fonctions amines. Cette tendance supplante la préférence du béryllium à former une coordination d'anneaux de six-atomes au lieu de cinq manifestée par la plus forte affinité de o-PhDTA et 3,4-TDTA à chélater le béryllium que EDTA, EDDADP et EDTP.

Quand aux aminocarboxyliques, (China *et al.*, 1995) ont trouvé que NTP et NADP se lient au béryllium pour former un complexe non protoné $[\text{BeL}]$ à pH acide (inférieur à 4), ce qui retarde la formation de l'hydroxyde du béryllium à pH basique malgré la forte basicité de leurs fonctions amines. Cette basicité de fonctions amines plutôt défavorable est compensée par l'effet de chélate, une coordination tétraédrique et une liaison de six atomes, les préférés du Be^{2+} . L'effet séquestrant du NTA et NDAP envers le béryllium est diminué à cause de leurs groupements acétiques qui donnent moins de flexibilité que les groupements propioniques à coordiner le béryllium. L'ordre final des molécules dans cette catégorie sera comme suit : $\text{NTP} > \text{NADP} > \text{NDAP} > \text{NTA}$.

Pour relier les deux catégories, on s'est basé sur une des propriétés de toxicité du béryllium qui est l'inhibition de la phosphatase alcaline, l'adénosine triphosphatase hépatique en déplaçant le magnésium (Mg^{2+}) (Williams and Killeter, 1983). China *et al.*, (1995), ont étudié les sélectivités compréhensives de certains acides polyaminocarboxyliques et aminocarboxyliques envers le béryllium (Be^{2+}) en présence du magnésium (Mg^{2+}). Ils ont trouvé que certaines diamines aromatiques (coordination hexaédrique) perdent leurs sélectivités envers le Be^{2+} en présence du Mg^{2+} ($K'_{\text{BeL}} \approx K'_{\text{MgL}}$). Cela est justifié par la préférence du béryllium à former un complexe tétraédrique avec des liaisons de six atomes tandis que le magnésium préfère une coordination octaédrique avec des liaisons de cinq atomes. En bref, la coordination tétraédrique et les liaisons de six atomes fournies par NTP et NADP donnent une plus grande stabilité au complexe du (Be^{2+}) que (Mg^{2+}). Ces deux agents complexant ne séquestrent que le (Be^{2+}) même en présence de (Mg^{2+}). Bref, ces deux aminocarboxyliques NTP et NADP sont plus sélectifs au (Be^{2+}) que

les polyaminocarboxyliques aromatiques 4-Cl-o-PhDTA, o-PhDTA et 3,4-TDTA qui séquestrent simultanément le (Be^{2+}) et le (Mg^{2+}), Donc l'ordre des agents complexants devient: NTP ~ NADP >> o-PhDTA ~ 3,4-TDTA > 4-Cl-o-PhDTA > NDAP > NTA ~ EDTA ~ 1,2-PDTA ~ EGTA > EDTP ~ CDTA > EDDADP.

Dans une étude effectuée auprès des rats, (Mathur *et al.*, 1993), ont comparé l'efficacité de trois acides polyaminocarboxyliques (EDTA, HEDTA et DTPA) sur la miction urinaire, la clairance d'organe et la restauration des fonctions enzymatiques. HEDTA a montré une efficacité supérieure aux deux autres en réduisant le taux de béryllium dans le sang, le foie et la rate. EDTA n'a prouvé qu'une efficacité plus modeste en réduisant le taux de béryllium dans le sang tandis que le DTPA n'a dévoilé aucun changement physiologique. L'absence des valeurs de constante d'association pour Be-HEDTA et Be-DTPA ne nous permet pas de les positionner dans la série avec une grande précision. Cependant, en reliant l'effet physiologique observé à la préférence de coordination du béryllium (tétraédrique), HEDTA est le plus commode avec une coordination pentaédrique (deux amines et trois fonctions acides carboxyliques) suivis par EDTA avec une coordination hexaédrique (deux amines et quatre fonctions acides carboxyliques) et DTPA avec une coordination octaédrique (trois amines et cinq acides fonctions carboxyliques). D'où l'ordre global des agents complexants polyaminocarboxyliques et aminocarboxyliques: NTP ~ NADP >> o-PhDTA ~ 3,4-TDTA > 4-Cl-o-PhDTA > NDAP ~ HEDTA > NTA ~ EDTA ~ 1,2-PDTA ~ EGTA > EDTP ~ CDTA ~ DTPA > EDDADP.

Dans la troisième catégorie, chaque famille de ligands où chacun des ligands sont comparés séparément afin de trouver sa position approximative dans la série ci-dessus. Cecconi *et al.*, (2002), ont étudié l'efficacité de quelques hydroxykétones hétérocycliques (Hma, Hka, Hdpp et Hima) sur la séquestration du béryllium. Le choix de ces quatre agents complexants est justifié par leurs capacités prouvées comme complexant des ions durs tels que Fe^{3+} (Scarrow *et al.*, 1985) et Al^{3+} (Clevette *et al.*, 1989; Kontoghiorghes, 1995). Les

résultats montrent qu'à un ratio de 1:2 (Be:L) ou supérieur, l'Hdpp ainsi que l'isomaltol (Hima) forme un complexe tétraédrique (BeL_2) tandis que le maltol (Hma) complexe légèrement le béryllium dans un milieu acide ($\text{pH} < 6$) et l'Hka ne le complexe pas. Comme on vient de le mentionner, il faut prendre en considération la compétition des ions hydroxydes qui compétitionnent efficacement avec les ligands et forment différents hydroxydes de béryllium. Bref, selon leurs résultats expérimentaux (potentiométrique et RMN), on peut remarquer que la basicité des quatre ligands ainsi que la stabilité de leurs complexes de béryllium diminuent dans le même ordre : $\text{Hdpp} > \text{Hma} > \text{Hka} > \text{Hima}$.

En se basant sur les conclusions précédentes et les constantes conditionnelles respectives, Hdpp est l'agent complexant le plus efficace de cette série d'hydroxycétones hétérocycliques. D'où l'ordre approximatif des agents complexants devient: $\text{NTP} \sim \text{NADP} \gg \text{o-PhDTA} \sim \text{3,4-TDTA} > \text{4-Cl-o-PhDTA} > \text{NDAP} \sim \text{HEDTA} \sim \text{Hdpp} > \text{NTA} \sim \text{EDTA} \sim \text{1,2-PDTA} \sim \text{EGTA} > \text{EDTP} \sim \text{CDTA} \sim \text{DTPA} \sim \text{Hma} \sim \text{Hka} > \text{EDDADP} \sim \text{Hima}$.

Dans une étude physiologique, (Shukla *et al.*, 1998), ont comparé l'efficacité de l'acide succinique et du tiron comme agents complexants du béryllium. Le tiron a montré une plus grande capacité de mobilisation du béryllium et de restauration des paramètres biochimiques altérés que l'acide succinique. Cette efficacité du tiron est attribuée à la grande stabilité de son complexe tétraédrique de béryllium ($\text{Be}-(\text{tiron})_2$). Dans une étude similaire, (Sharma and Shukla, 2000) ont comparé l'efficacité du tiron à l'EDTA. Ils ont rapporté que le traitement avec l'EDTA n'a pas restauré significativement les activités enzymatiques tandis que le tiron était beaucoup plus efficace. Le tiron circule dans le sang sans causer de déplétion corporelle significative des métaux essentiels Zn, Cu, Fe, Co et Mn comme l'EDTA et ne cause pas de toxicité rénale.

Similairement, (Mathur *et al.*, 1994) ont comparé l'efficacité de l'acide meso-2,3-dimercaptosuccinique (DMSA) et de l'acide 2,3-dimercapto-1-propanesulfonique (DMPS) comme agents complexants du béryllium chez des rats. Ils ont trouvé que le DMPS possède une plus grande capacité à mobiliser le béryllium et restaurer les paramètres biochimiques

altérés que le DMSA. Johri *et al.*, (2004), ont comparé l'efficacité de la D-pénicillamine (DPA) et du DMPS et ont découvert que le DPA est supérieur au DMPS dans la mobilisation du béryllium et la restauration des paramètres biochimiques altérés. D'où on obtient ; DPA > DMPS > DMSA.

L'acide d'aurintricarboxylique (ATA) a aussi été testé comme agent séquestrant pour le béryllium (Schubert and Rosenthal, 1959). Il a montré une plus grande efficacité contre l'empoisonnement aigu au béryllium qu'à l'empoisonnement chronique. Le problème dans les cas chroniques est d'établir le contact entre l'ATA administré et le béryllium enfoncé dans les tissus et entouré de granulome. L'administration d'ATA doit se faire intraveineusement puisqu'il précipite dans l'acide gastrique ce qui rend son administration orale inefficace. L'administration d'ATA n'a pas montré une augmentation du béryllium dans la miction. De ces observations, (Schubert and Rosenthal, 1959) ont conclu que l'ATA inactive le béryllium ionique dans l'organe cible. Vue l'absence de toute donnée pour les constantes de stabilité et de toute étude de comparaison avec un agent complexant de la série pour le complexe Be-ATA, il est difficile de trouver sa position exacte dans notre série d'agents complexants, pourtant je le place parmi les agents complexant les plus efficaces à cause de son effet physiologique. Donc, l'ordre final des agents complexants: NTP ~ NADP ~ Tiron >> o-PhDTA ~ 3,4-TDTA ~ ATA ~ DPA > 4-Cl-o-PhDTA > NDAP ~ HEDTA ~ Hdpp ~ DMPS > NTA ~ EDTA ~ 1,2-PDTA ~ EGTA ~ DMSA > EDTP ~ CDTA ~ DTPA ~ Hma ~ Hka > EDDADP ~ Hima ~ Succ.

De cette analyse, on note que le NTP, NADP et tiron sont les agents complexants les plus prometteurs pour une thérapie par chélation au béryllium. Dans ce projet, on va étudier le pouvoir complexant du NTP, tiron et NTA pour une utilisation potentielle dans une thérapie par chélation. On a remplacé NADP par NTA, pour confirmer la préférence du béryllium pour une coordination tétraédrique de six atomes au lieu de cinq. NADP possède deux fonctions proprioniques et une fonction acétique, tandis que NTA possède trois fonctions acétiques.

Après ce survol bibliographique des différents agents complexants du béryllium, on conçoit qu'une relation existe entre la force d'interaction (constante d'association) du béryllium-ligand et les effets thérapeutiques observés dans les études physiologiques. Cette hypothèse, une fois confirmée, affirme d'avantage que le mécanisme de la sensibilisation au béryllium et du développement de la béryllose chronique est à la base une interaction de charge entre le récepteur cellulaire (CMH classe II allèle) chargé négativement et le béryllium-peptide (anticorps) chargé positivement. On prévoit que, plus l'affinité d'un agent complexant envers le béryllium est élevée, plus il doit démontrer une efficacité thérapeutique. De cela, on voit la nécessité de mettre au point une méthode analytique qui nous permette de déterminer les constantes d'associations entre les agents complexants prometteurs et le béryllium. Une revue des méthodes permettant la détermination des constants d'association est présentée dans le chapitre suivant.

Chapitre 3

Méthodes de mesure des constantes d'associations

3.1 Revue des méthodes de détermination des constantes d'associations

Différentes méthodes expérimentales sont utilisées pour mesurer les constantes d'associations. Selon leurs fonctionnements, ces méthodes sont divisées en deux catégories: ceux qui comptent sur la détermination directe de la concentration du complexe formé ou du métal libre et ceux qui exigent une séparation du métal libre de son complexe avant la quantification (Kantar *et al.*, 2005).

Les méthodes traditionnelles de mesure des constantes d'associations sont: la potentiométrie (Sancenon *et al.*, 2002), la polarographie (Witter *et al.*, 2000) et la spectrophotométrie (Castro and Blanco, 2004). Plusieurs autres méthodes plus avancées sont présentement utilisées tel que le titrage fluorimétrique (Tarazi *et al.*, 2002), la voltampérométrie cyclique (Crouch *et al.*, 2001), l'isotachophorèse capillaire (Koudelkova *et al.*, 2003), la résonance magnétique nucléaire (RMN) (Alderighi *et al.*, 1998; Fielding, 2000), la spectrométrie de masse en mode électrospray (SM-ES) (Kempen and Brodbelt, 2000) ainsi que tous autres méthodes de séparations (chromatographie ionique, extraction solide-liquide, extraction liquide-liquide) couplés à un détecteur universel (UV-Vis, spectrométrie de masse, absorption atomique, émission atomique) ou spécifique (électrode sélective, fluorimétrie) qui permet la quantification du complexe formé ou du métal libre (Huang and Beauchemin, 2006a; Huang and Beauchemin, 2006b; Chekmeneva *et al.*, 2008). Ces méthodes plus avancées ont été considérées du fait que les méthodes traditionnelles sont bien simples et peu dispendieuses mais manquent de sélectivité et de sensibilité, primordiales dans beaucoup d'applications. Cependant, les méthodes avancées, eux aussi ont des limitations. Par exemple, le titrage fluorimétrique n'est applicable qu'à des espèces fluorescentes tandis que la spectrométrie de masse en mode électrospray n'est applicable qu'à des espèces chargées.

La méthode de choix dans ce projet est le titrage calorimétrique isothermique (TCI) (Griko, 1999; Sigurskjold, 2000; Turnbull and Daranas, 2003; Tellinghuisen, 2005), cette technique permet de déterminer non seulement la constante d'association du complexe mais aussi la stœchiométrie, l'enthalpie et l'entropie et cela à un pH fixe (Smith and Windsor, 2007; Talmard *et al.*, 2007). Cette méthode est plus avantageuse que les autres mentionnées auparavant vu sa simplicité, ses données thermodynamiques et son large domaine d'application.

3.2 Théorie du titrage calorimétrique isothermique

3.2.1 Titrage calorimétrique isothermique directe

Le titrage calorimétrique isothermique (TCI) est une méthode biophysique utilisée pour déterminer les paramètres thermodynamiques. Elle est souvent utilisée pour étudier l'association des petites molécules (composés thérapeutiques) aux plus grandes macromolécules (les protéines, l'acide désoxyribonucléique (ADN), etc.). Cette méthode offre beaucoup d'avantages par rapport aux méthodes traditionnelles et avancées puisque la chaleur est une propriété universelle des réactions d'association chimique. À partir d'un seul titrage, on peut mesurer la constante d'association (K'), l'enthalpie ($\Delta H'$), l'entropie ($\Delta S'$) et la stœchiométrie de l'interaction (n) entre deux ou plusieurs molécules présentes dans la cellule calorimétrique (Wiseman *et al.*, 1989). Deux types de titrage peuvent être faits par TCI : le titrage direct pour les constantes d'affinités dont la magnitude varie entre 10^3 et 10^8 M^{-1} et le titrage par compétition pour les constantes d'affinités dont la magnitude se trouve à l'extérieur de cette fenêtre de détection. Cette notion de fenêtre de détection, introduite par (Wiseman *et al.*, 1989), définie par le paramètre « c » ($10 < c < 100$; $c = [L] * K'_{ML}$), a été par la suite contestée par (Turnbull and Daranas, 2003). Ils ont démontré la possibilité d'étudier des systèmes de base affinité ($c < 10$ ou $K' < 10^3 \text{ M}^{-1}$) à conditions de

connaître la stœchiométrie d'association, les concentrations des réactifs (ligand ; métal) avec grande précision et avoir un rapport suffisant de signal sur bruit. Tellinghuisen, (2005), a déclaré que les titrages calorimétriques où c est inférieur à 10 sont à éviter à moins que la stœchiométrie d'association soit connue. Dans ce projet, nous utilisons le titrage par compétition proposé par (Zhang and Zhang, 1998), pour les systèmes de faible affinité conditionnelle comme méthode standard pour mesurer les constantes d'associations inférieures à $10^3 M^{-1}$. Cette méthode est basée sur la compétition d'un ligand de forte affinité avec un autre de faible affinité envers une protéine. Nous adapterons cette méthode de titrage par compétition pour étudier les interactions entre des ligands et des métaux tout en utilisant le système de traitement de données proposé par (Christensen *et al.*, 2003).

3.2.2 Théorie du titrage calorimétrique isothermique par compétition

Considérons deux métaux, A et B , qui ont une tendance à se relier à un agent complexant L sous une stœchiométrie de 1:1 dont l'affinité du premier métal (A) envers le ligand (L) est supérieure à celle du deuxième (B) ($K'_{AL} > K'_{BL}$). Les réactions d'interaction sont les suivantes :



et



Durant un titrage calorimétrique par compétition, le métal à faible affinité (B) et le ligand (L) se trouvent dans la cellule calorimétrique et seront titrés par le métal de forte affinité (A). En utilisant une concentration de B qui est au moins vingt fois plus élevée que celle du

ligand, on peut considérer que la concentration libre du métal B (non complexé) reste inchangée, ne varie donc pas durant le titrage, et est toujours égale à la concentration initiale de $[B]_{init}$. En réarrangeant les constantes de formations des deux métaux tout en employant la conversion de masse, nous obtenons (Sigurskjold, 2000):

$$K'_{app} = \frac{K'_{AL}}{1 + K'_{BL} [B]_{init}} \quad (3.3)$$

où K'_{app} est la constante apparente conditionnelle de formation du complexe AL en présence du métal B . K'_{AL} et K'_{BL} sont les constantes conditionnelles de formation des complexes AL et BL . Par conséquent, la constante de formation du métal à faible affinité K'_{BL} devient calculable une fois que K'_{app} et K'_{AL} sont connues.

Durant un titrage calorimétrique par compétition, il va y avoir la formation du complexe AL (plus stable) et la dissociation du complexe BL (moins stable). Par conséquent, la chaleur absorbée ou libérée pendant le titrage, δQ , est proportionnelle aux changements des concentration des complexes AL et BL dans la cellule calorimétrique et varie en fonction de leur enthalpie molaire de formation. δQ est donc égale à

$$\delta Q = \Delta H'_{AL} \times V_0 \times \delta[AL] + \Delta H'_{BL} \times V_0 \times \delta[BL] = \Delta H'_{app} \times V_0 \times \delta[AL] \quad (3.4)$$

d'où $\Delta H'_{AL}$ et $\Delta H'_{BL}$ sont les enthalpies molaires conditionnelles de formation des deux complexes, V_0 est le volume de la cellule calorimétrique, $\delta[AL]$ et $\delta[BL]$ représentent la

variation de la concentration des deux complexes durant le titrage et $\Delta H'_{app}$ est l'enthalpie molaire apparente conditionnelle de la formation du complexe AL en présence du métal B dans la cellule calorimétrique et peut être obtenue par l'équation suivante (Sigurskjold, 2000) :

$$\Delta H'_{app} = \Delta H'_{AL} - \left(\frac{1}{1 + \frac{1}{K'_{BL} \times [B]_{init}}} \right) \times \Delta H'_{BL} \quad (3.5)$$

En réarrangeant l'équation 3.5, on peut déterminer l'enthalpie molaire conditionnelle de formation du complexe BL ($\Delta H'_{BL}$) selon l'équation suivante :

$$\Delta H'_{BL} = (\Delta H'_{AL} - \Delta H'_{app}) \left(1 + \frac{1}{K'_{BL} \times [B]_{init}} \right) \quad (3.6)$$

Les données calorimétriques obtenues lors d'un titrage sont conditionnelles, elles dépendent du pH, de la force ionique et de la température. En effectuant les titrages calorimétriques à une température et force ionique constante, les constantes conditionnelles (K'_{cond}) obtenues doivent être corrigées seulement en fonction du pH pour obtenir des valeurs intrinsèques (K_{int}), qui correspondent à la constante de formation du complexe en absence de toute compétition protonique et en considérant que le ligand se trouve sous sa

forme déprotonée. D'où le rapport entre K_{int} et K'_{cond} qui dépend des constantes de protonation ($K_1, K_2, K_3, K_4...$) de l'agent complexant en question (Griko, 1999)

$$\frac{K_{int}}{K'_{cond}} = 1 + K_1[H^+] + K_1K_2[H^+]^2 + K_1K_2K_3[H^+]^3 + K_1K_2K_3K_4[H^+]^4 + \dots \quad (3.7)$$

Similairement à la constante de formation, l'enthalpie de formation d'un complexe obtenue par titrage calorimétrique est aussi conditionnelle ($\Delta H'_{cond}$) et doit être corrigée en fonction de l'enthalpie de protonation du tampon et de l'agent complexant afin d'obtenir l'enthalpie de formation intrinsèque (ΔH_{int}). Cette dernière correspond à la mesure de l'énergie absorbée ou libérée résultante de l'interaction entre le métal et l'agent complexant complètement déprotoné et est calculée par la relation suivante (Fukada and Takahashi, 1998) :

$$\Delta H_{int} = \Delta H'_{cond} - (n\Delta H_{ion}^{tampon} + n_1\Delta H_L^{HL} + n_2\Delta H_{HL}^{H_2L} + n_3\Delta H_{H_2L}^{H_3L} + n_4\Delta H_{H_3L}^{H_4L} + \dots) \quad (3.8)$$

Où ΔH_{ion}^{tampon} est l'enthalpie de protonation conditionnelle du tampon, n est le nombre de proton transférés de l'agent complexant vers le tampon lors de la complexation de ce dernier avec le métal. Où n est égal à la somme de $n_1, n_2, n_3, n_4...$ qui représentent le nombre de proton libérés à chaque étape de déprotonation de l'agent complexant. ΔH_L^{HL} , $\Delta H_{HL}^{H_2L}$, $\Delta H_{H_2L}^{H_3L}$ et $\Delta H_{H_3L}^{H_4L}$ représentent les enthalpies de protonation de l'agent complexant. Dans ce projet, quatre agents complexants sont utilisés ; l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA), l'acide nitrilotriacétique (NTA), l'acide nitrilotripropionique (NTP) et l'acide 4,5-dihydroxy-1,3-benzènedisulfonique (tiron). Les valeurs des constantes de protonation des différents agents complexant sont présentées dans

le Tableau A-1 et les graphiques du fractionnement molaire en fonction du pH sont présentés dans l'annexe des figures (Figure A-1 ; Figure A-2 ; Figure A-3 ; Figure A-4) respectivement.

Connaissant la constante d'association intrinsèque ainsi que l'enthalpie intrinsèque d'association du métal à faible affinité (B) avec l'agent complexant (L), on peut par la suite calculer l'énergie de Gibbs ainsi que l'entropie molaire d'interaction selon l'équation suivante (Christensen and Toone, 2003):

$$-RT \ln(K) = \Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (3.9)$$

3.3 Matériels et méthodes

3.3.1 Instrumentation

Le calorimètre utilisé dans ce projet est un VP-ITC de Microcal, LLC. C'est un système ultrasensible de titrage calorimétrique isothermique qui utilise un réseau de rétrocontrôle de cellule (RCC). Ce réseau mesure et compense différentiellement toute variation de chaleur produite ou absorbée dans la cellule d'échantillon. Il est formé de deux cellules thermiques identiques (la cellule de référence et la cellule d'échantillon) entourées par une jaquette adiabatique (Figure 3-1). Pendant un titrage, le métal est injecté dans la cellule d'échantillon contenant le ligand à des aliquots précisément connus, causant une augmentation ou une réduction dans la température de la cellule (dépendamment de la nature de la réaction). Cette variation de température est automatiquement détectée et compensée par le RCC. On obtient un signal sous forme de $\mu\text{cal}\cdot\text{s}^{-1}$ en fonction du temps en s. Les données brutes d'un titrage calorimétrique consistent en une série de pics (flux de chaleur), dont chaque pic représente une injection. Ce flux de chaleur de chaque injection

est intégré en fonction du temps, donnant la variation totale de chaleur par injection. L'interprétation de cette dernière avec le ratio molaire des réactifs nous donne les paramètres thermodynamiques de l'interaction à l'étude. On note que le dégazage des différents réactifs est nécessaire afin d'éliminer les bulles d'air des cellules. Leur présence produit des pics anormaux qui génèrent des erreurs dans les résultats enregistrés.

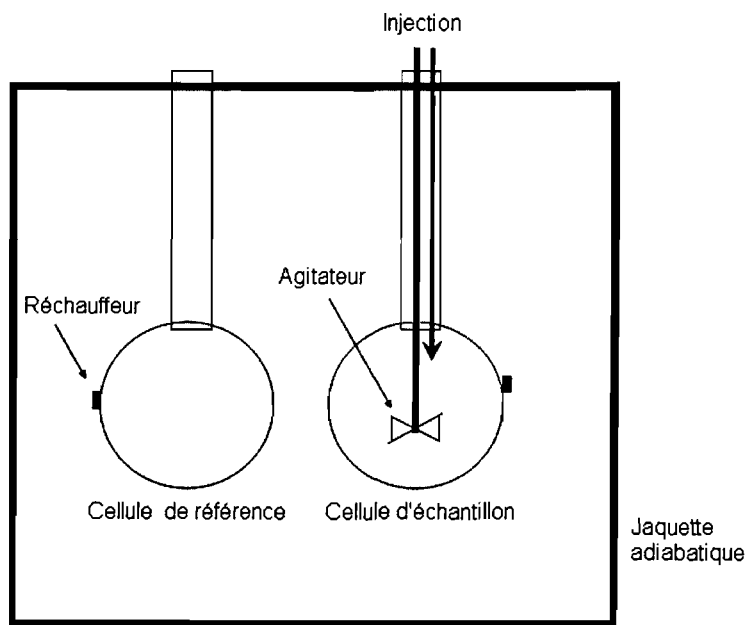


Figure 3-1. Schéma du calorimètre à titrage isothermique.

3.4 Résultats et discussions

3.4.1 Détermination de la constante d'association du béryllium, calcium et zinc avec le tampon MES

Dans un titrage calorimétrique isothermique, le changement de chaleur mesuré lors d'une injection est la somme de la chaleur de déprotonation du ligand, la chaleur de formation du complexe métal-agent complexant, la chaleur de protonation du tampon et la chaleur de dissociation du complexe métal-tampon. Pour cela, le choix du tampon dans ce type de titrage est très important. Il doit respecter deux conditions : avoir une faible enthalpie de protonation ainsi qu'une faible affinité envers le métal en question. Ces deux paramètres doivent être déterminés avec précision afin d'effectuer la correction des paramètres thermodynamiques de l'état conditionnel à l'état intrinsèque.

Dans ce projet, nous avons choisi de travailler avec l'acide 2-(N-morpholino) éthanesulfonique (MES) comme tampon. Le MES appartient à la famille de « Good's buffers », qui regroupe un certain nombre de tampons très utilisés dans les domaines biologique et biochimique. L'acide 2-(N-morpholino) éthanesulfonique est connu comme un tampon non-coordinant des métaux, contrairement à d'autres tampons utilisés en chimie (acétate, phosphate,...) qui présentent des tendances à complexer les métaux. En ce qui concerne la détermination de l'enthalpie de protonation du MES, nous avons titré le tampon avec une solution certifiée d'acide chlorhydrique (0.100 M). Les détails du titrage sont indiqués dans notre premier article. Pour la détermination des constantes d'associations des différents métaux (Be, Ca et Zn) avec MES, nous avons effectué plusieurs titrages par compétition, où on considère que le tampon compétitionne avec un agent complexant envers le métal en question. Nous avons choisi NTP comme agent complexant pour le béryllium (Figure 3-2) et EDTA pour le calcium (Figure 3-3) et le zinc (Figure 3-4). Les détails des titrages ainsi que les résultats sont indiqués dans notre premier article.

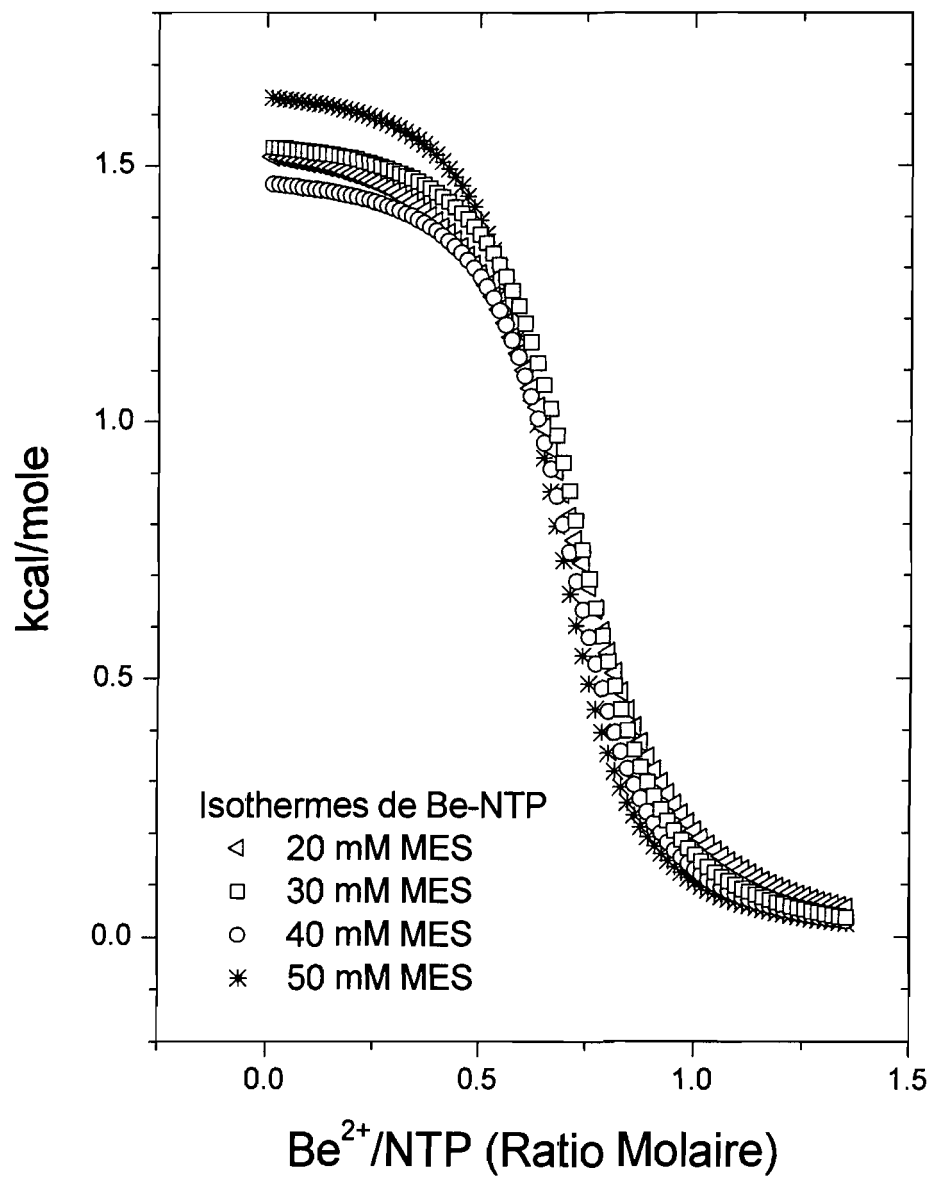


Figure 3-2. Variation des isothermes de Be-NTP en fonction de la concentration du MES.

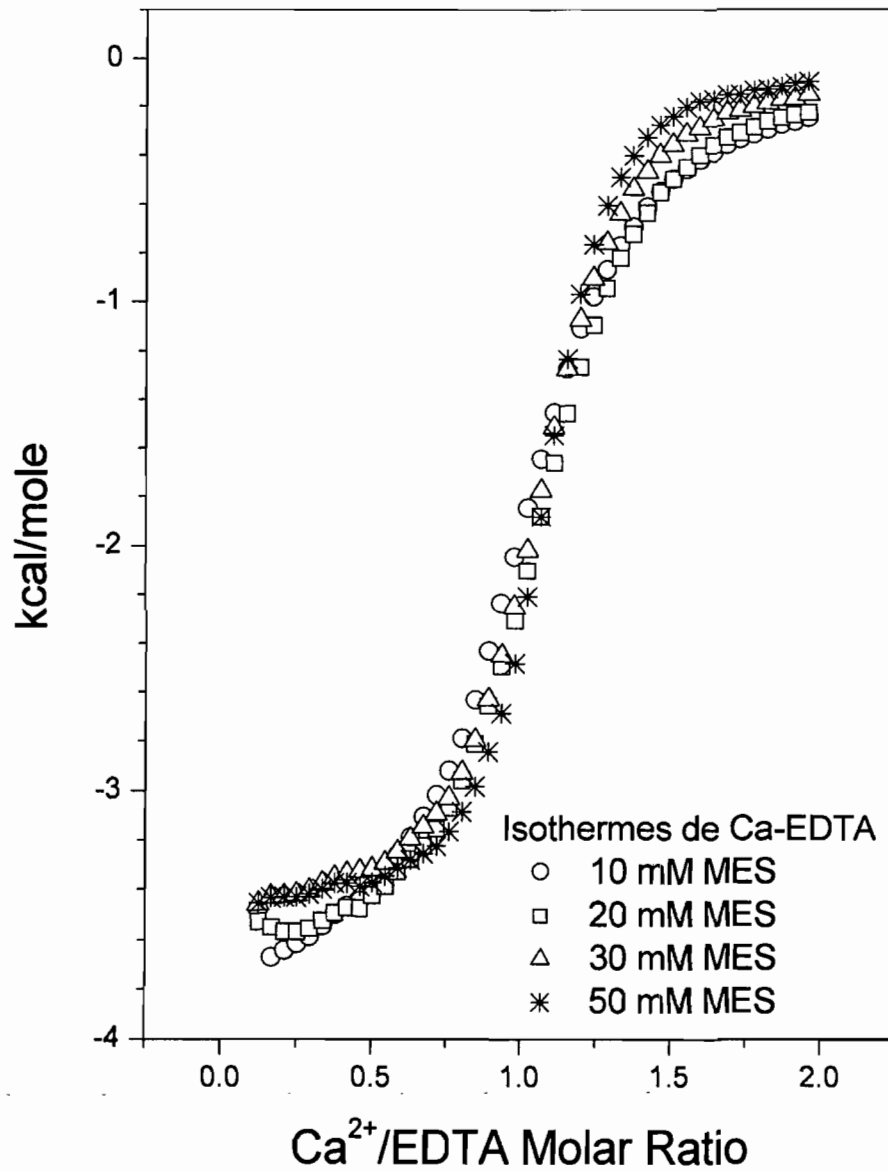


Figure 3-3. Variation des isothermes de Ca-EDTA en fonction de la concentration du MES.

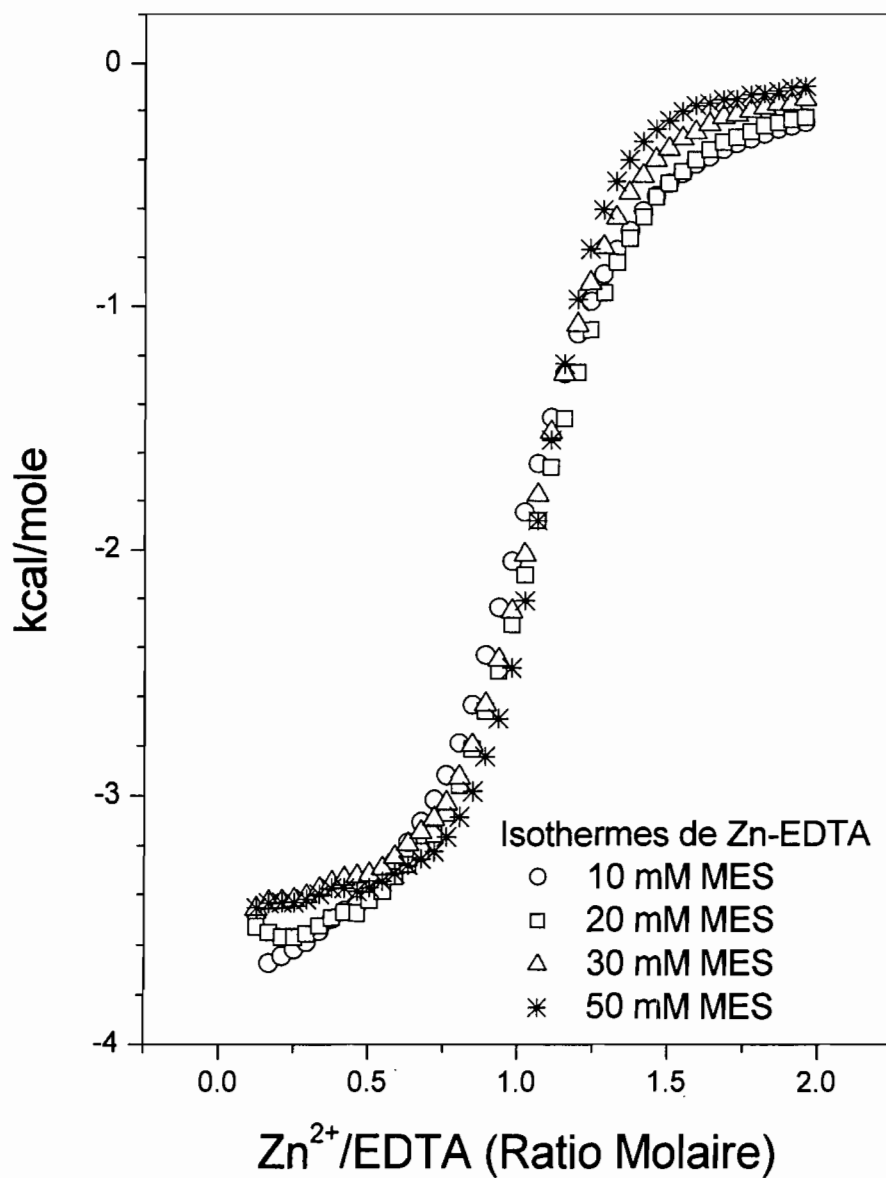


Figure 3-4. Variation des isothermes de Zn-EDTA en fonction de la concentration du MES.

3.4.2 Étude de sélectivité du NTP et du tiron envers le béryllium en présence du magnésium

Le titrage calorimétrique par compétition nous permet de mesurer la sélectivité d'un agent complexant pour un métal en présence d'un autre. Comme application, nous avons exploré l'affinité du NTP et du tiron envers le béryllium en présence du magnésium. Le béryllium inhibe la réaction d'hydrolyse de l'adénosine triphosphate en adénosine diphosphate en déplaçant le magnésium qui catalyse cette réaction exergonique responsable de l'apport en énergie chez les êtres vivants (Boukhalfa *et al.*, 2004). Le béryllium possède, en présence du magnésium, une plus forte affinité à s'associer à l'ATP (Jonathan *et al.*, 2002). Afin d'exploiter la sélectivité de ces agents complexants envers le béryllium, nous avons conduit des titrages entre chacun de ces agents et le béryllium en présence et en absence du magnésium. L'acide nitrilotripropionique (Figure 3-5) ainsi que l'acide 4,5-dihydroxy-1,3-benzènedisulfonique (Figure 3-6) ont montré une forte sélectivité envers le béryllium. On n'a pas mesuré une différence significative ($p < 0.05$) entre les constantes d'associations conditionnelles de Be-NTP et de Be-tiron déterminées en présence et en absence du magnésium, qui confirme que le NTP et le tiron sont sélectifs envers le Be avec un intervalle de confiance de 95 %.

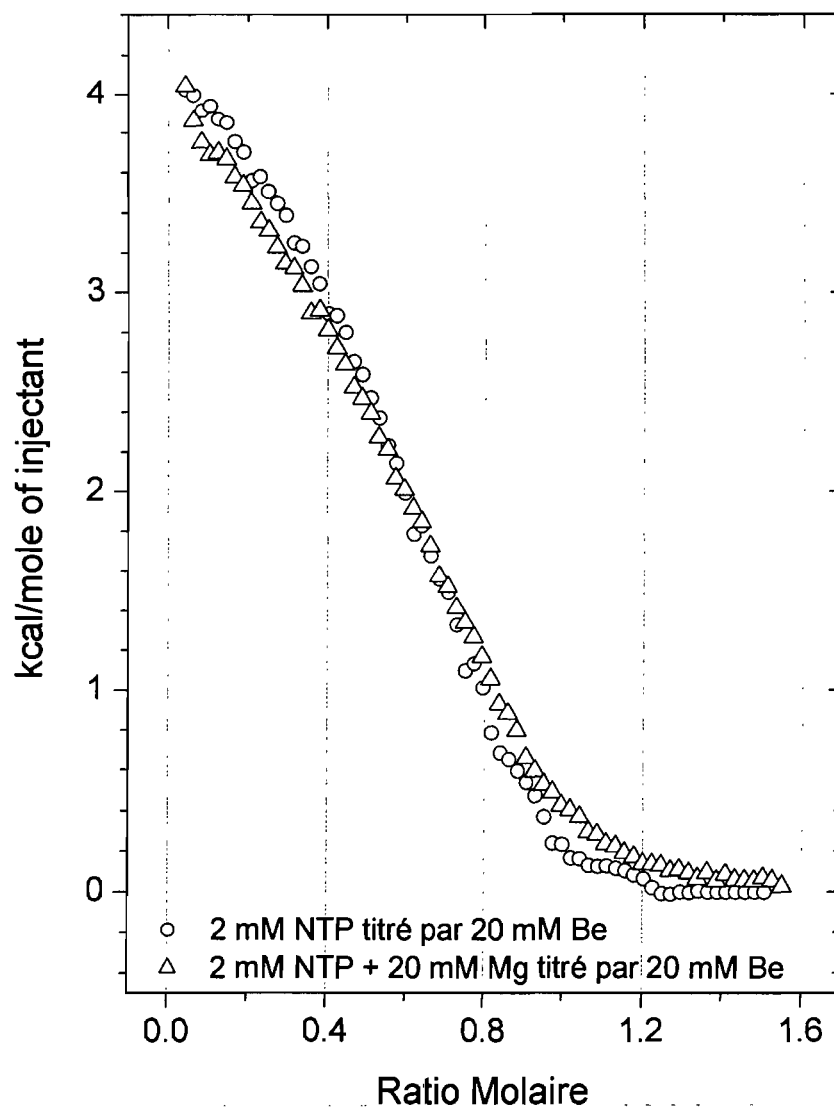


Figure 3-5. Isothermes du titrage de NTP par le béryllium en présence et en absence du magnésium.

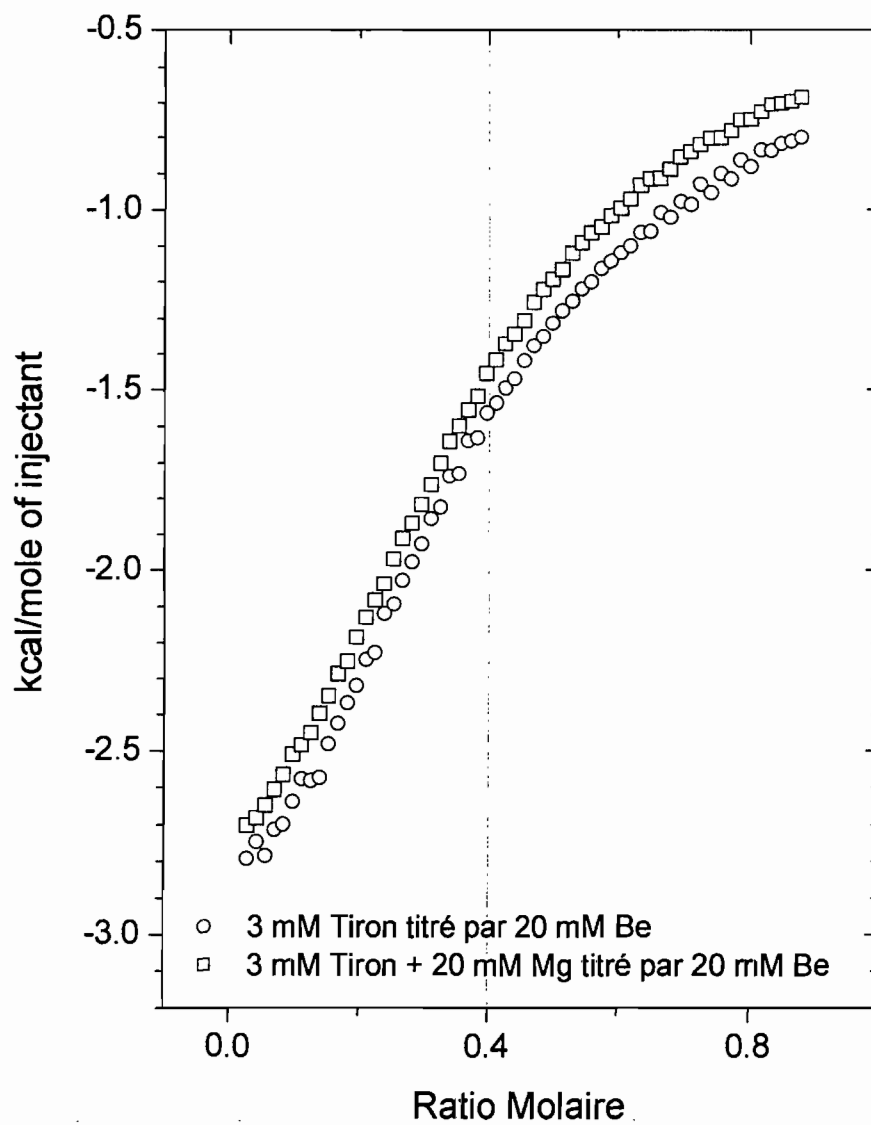


Figure 3-6. Isothermes du titrage de NTP par le béryllium en présence et en absence du magnésium.

3.5 Conclusion

Le titrage calorimétrique isothermique par compétition est une méthode efficace utiliser pour la détermination des constantes d'associations conditionnelle se trouvant hors de la fenêtre de détection du titrage calorimétrique isothermique direct (10^3 à 10^8 M). Elle est aussi une méthode très fiable pour déterminer l'affinité d'un métal envers un tampon et étudier la sélectivité d'un agent complexant envers un métal en présence d'un autre. La mise au point de cette méthode de titrage calorimétrique isothermique par compétition est discutée en détail dans le premier article : « Evaluation of three beryllium sequestering agents by isothermal titration calorimetry ».

Chapitre 4

Méthodes de détermination du béryllium

4.1 Revue des méthodes de détermination du béryllium dans le sang et le sérum

Une méthode analytique permettant de quantifier le béryllium dans des micro volumes d'échantillons est nécessaire. Cette méthode aura pour but de vérifier le potentiel chélatant des agents complexants auprès des humains. L'effet de ses agents complexants sur la répartition du béryllium dans le sérum humain sera étudié. Plusieurs méthodes analytiques se présentent: la fluorométrie (Claude *et al.*, 1961), la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Taylor and Arnold, 1971; Wolf *et al.*, 1972; Ross *et al.*, 1977), l'émission atomique à plasma couplé inductivement (ICP-AES) (Schramel and Li-Qiang, 1982; Recknagel *et al.*, 1997), la spectrométrie de masse à plasma couplé inductivement (Gouille *et al.*, 2005; Heitland and Koster, 2006) et l'absorption atomique à four de graphite (GF-AAS) (Paschal and Bailey, 1986; Peng and Kuo, 2000; Wang *et al.*, 2001).

4.1.1 Fluorométrie

La fluorométrie a été récemment introduite comme méthode analytique standard d'analyse du béryllium dans les projets de surveillance d'hygiène industrielle. Elle permet d'analyser le béryllium récolté par les lingettes celluloses utilisées dans l'échantillonnage de surface. En bref, les lingettes sont digérées par une solution bifluorure d'ammonium, le tout est filtré et le béryllium est complexé par le 10-Hydroxybenzo[h]quinoline-7-sulfonate (HBQS) suite à l'ajout d'une solution contenant le HBQS et de l'EDTA pour éliminer les interférences des autres métaux. La limite de détection de la méthode est de l'ordre de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ et la détection se fait à 380 nm (Matsumiya *et al.*, 2001; Ashley *et al.*, 2007). Il a été démontré que cette méthode fluorométrique éprouve des difficultés dans la quantification du béryllium dans des

matrices riches en fer et en zinc (Ashley *et al.*, 2005). Cette méthode n'a pas été retenue pour la détermination du béryllium simplement parce que le sang ainsi que le sérum sont des matrices complexes, chargées d'une multitude de molécules et métaux (dont le fer) qui interfèrent la détection du béryllium. L'élimination de l'effet de matrice est possible, mais nécessite l'introduction de plusieurs étapes de préparation des échantillons ce qui rend cette méthode laborieuse et diminue sa sensibilité.

4.1.2 Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CG-SM)

La chromatographie gazeuse est une des premières méthodes analytiques utilisées pour analyser le béryllium à des quantités ultra-traces (limite de détection de l'ordre de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ (Taylor and Arnold, 1971; Wolf *et al.*, 1972). Cette méthode couplée avec un spectromètre de masse permet de mesurer le béryllium complexé avec le trifluoroacétylacétone (TFAA). En générale, le TFAA est ajouté à l'échantillon, le mélange est agité pour un certain temps permettant la formation du complexe béryllium-TFAA. Le complexe formé est récupéré dans un solvant organique par extraction de phase avant de procéder à l'analyse. L'efficacité d'extraction ainsi que le taux de recouvrement sont vérifiés par l'utilisation d'un étalon interne : le tribromoéthane (TBE).

4.1.3 Émission atomique à source plasma (Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES))

L'ICP-AES est une méthode spectroscopique multi-élémentaire qui permet la détection de plusieurs éléments en une seule acquisition de signal. Elle est très sensible et possède une large marge de linéarité ($\approx 10^4$). C'est une méthode très précise pour la

détection d'éléments métalliques et non métalliques à l'état de traces dont les limites de détections varient du ng L^{-1} au $\mu\text{g L}^{-1}$, dépendement de l'élément en question et de la matrice de l'échantillon.

4.1.4 Spectrométrie de masse à plasma couplé inductivement (ICP-MS)

La spectrométrie de masse à plasma couplé inductivement est une méthode multi-élémentaire qui permet la détermination simultanée de nombreux éléments. C'est une méthode grandement avantageuse pour étudier une vaste gamme d'éléments métalliques et non métalliques en une seule analyse à des concentrations de l'ordre du ng L^{-1} . Cette méthode repose sur couplage du plasma couplé inductivement (ICP) comme source d'ionisation avec la spectrométrie de masse comme méthode de séparation et de détection. Ce couplage a fait de l'ICP-MS une des méthodes les plus sélectives et précises pour la détermination des métaux dans une variété de matrices et spécialement dans le sang et le sérum. Gouille *et al.*, (2005), ont utilisé cette méthode pour déterminer 27 à 32 éléments simultanément dont le béryllium dans différentes matrices biologiques (sang, sérum, urine et cheveux). Les limites de détection du béryllium publiées par ce travail variaient entre 42 ng L^{-1} dans du sang, 30 ng L^{-1} dans du sérum, 15 ng L^{-1} dans l'urine et 2 ng L^{-1} dans les cheveux. Similairement, (Heitland and Koster, 2006) ont utilisé l'ICP-MS comme outil de surveillance de 37 éléments dans le sang des habitants de l'Allemagne du nord. Ils ont publié une limite de détection pour le béryllium de 8 ng L^{-1} .

4.1.5 Spectrométrie d'absorption atomique à four de graphite (SAA-FG)

Tous les détails de l'application, du fonctionnement et du développement méthodologique de cette méthode sont discutés dans le troisième article « Graphite furnace

atomic absorption spectrometry as a routine method for the quantification of beryllium in blood and serum ».

4.2 Matériels et méthodes

4.2.1 Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CG-SM)

4.2.1.1 Instrumentation

Un système de chromatographie gazeuse de Hewlett Packard (HP 6890 series) équipé d'une colonne DB1 (0.32 mm diamètre interne de J & W Scientific) couplée à un détecteur de spectrométrie de masse de Hewlett Packard (HP 5973 series, mass selective detector) a été utilisé pour la détermination du béryllium dans le sang humain. Les analyses ont été effectuées sous les conditions suivantes : température de l'injecteur, 200 °C; température du four, 180 °C; température du détecteur, 300 °C; gaz vecteur, hélium; débit, 60 mL min⁻¹.

4.2.1.2 Préparation du complexe béryllium trifluoroacétylacétone (Be(TFAA)₂)

Dans un ballon à fond rond contenant 0.45 g de poudre de béryllium (0.05 mole), on ajoute 30 g de trifluoroacétylacétone (0.2 mole). Le mélange est chauffé à reflux pendant une heure et demie. Après chauffage, le mélange est gardé pendant 12 heures à la température de la pièce pour équilibration ($\text{Be}^{2+} + 2 \text{TFAA} \leftrightarrow \text{Be}(\text{TFAA})_2$). Le mélange est concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu solide est recristallisé avec de l'hexane. La suspension de cristaux est par la suite filtrée sous vide, suivi d'un lavage avec des portions d'hexane (5 mL) pour se débarrasser du trifluoroacétylacétone en excès. Le

complexe formé, béryllium trifluoroacétylacétone ($\text{Be}(\text{TFAA})_2$) ($\text{MM} = 315 \text{ g mol}^{-1}$), est séché dans un dessiccateur pendant 24 heures. Ce complexe est purifié deux fois par sublimation à $80 \text{ }^\circ\text{C}$ et 0.03 mm Hg (Ross and Sievers, 1968). Il servira à préparer les solutions standard.

4.2.1.3 Préparation des échantillons

Dans un vial en verre, on combine 0.5 mL du sang avec 0.5 mL d'une solution contenant 0.005 M de TFAA et $100 \mu\text{g L}^{-1}$ du TBE ($\text{MM} = 345 \text{ g mol}^{-1}$) dans du benzène. On bouche le vial, on l'agite et on le dépose dans une étuve à $100 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 30 minutes. Une fois que la période d'incubation est écoulée, on sort le vial de l'étuve et on attend qu'il retourne à la température ambiante avant de l'ouvrir pour ajouter $50 \mu\text{L}$ d'une solution d'hydroxyde de sodium (0.1 M) qui sert à éliminer l'excès du tfa. On brasse le mélange et on le centrifuge pour 10 minutes à 500 rpm pour bien séparer les deux phases. On procède à l'injection de 0.5 ou $1.0 \mu\text{L}$ de la phase organique dans l'injecteur de la chromatographie gazeuse.

4.2.2 Émission atomique à source plasma (Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES))

4.2.2.1 Instrumentation

L'appareil d'ICP-AES utilisé, est un Iris Advantage-1000 de Jarrell Ash Corporation (Franklin, MA). Il est divisé en quatre parties. La première partie est l'introduction de l'échantillon. L'échantillon liquide est aspiré dans un tube en polyéthylène par une pompe péristaltique, qui arrive au nébuliseur qui forme la deuxième partie. Le nébuliseur est constitué de deux capillaires en verre, l'un à l'intérieur de l'autre. Dans ce

projet, nous avons utilisé un nébuliseur de Glass Expansion (Ezylok Seaspray Nebulizer, Australie) avec un diamètre interne de 0.75 mm, qui nous permet de faire analyser les échantillons de sang et sérum sans digestion préalable. Le capillaire interne fait passer l'échantillon tandis que le capillaire extérieur fait passer un débit d'argon (gaz vecteur). Ces deux capillaires se rencontrent dans une partie du nébuliseur qui s'appelle le nozzle (bout du nébuliseur). Le flux d'argon arrivant au bout du nébuliseur crée une région de faible pression qui va forcer le liquide à exploser pour former des aérosols. Les aérosols formés sont projetés dans une chambre conique où les gros aérosols vont se déposer sur les parois et seulement les aérosols de la taille voulue sont conduits par un courant d'argon pour arriver à la troisième partie qui est la torche à plasma. La température à l'intérieur de la torche varie entre 6000 et 10000 °C. Dans cette gamme de température, la presque totalité des éléments se trouvant dans l'échantillon à analyser sont atomisés, ionisés et excités. À la sortie de la torche, les éléments excités vont revenir à leur niveau énergétique de base en émettant de la lumière sous forme de longueur d'onde spécifique à chaque élément. C'est cette lumière émise qui va servir à leur détection. La quatrième partie de cet instrument est le détecteur. Le détecteur utilisé est le « charge injection device » (CID) qui est un détecteur intégré, solide, et bidimensionnel, formé par des éléments de résolution indépendants (pixels), accessibles électroniquement. Les paramètres de fonctionnement de l'ICP-AES sont représentés dans le Tableau 3-1.

4.2.2.2 Préparation et analyse des échantillons

Les échantillons de sang et de sérum sont préparés par simple dilution de dix et cinq fois respectivement avec une solution contenant 5 g L⁻¹ d'hydroxide d'ammonium (Fisher scientific, NJ, USA), 0.5 g L⁻¹ de Triton X-100 (Acros, NJ, USA) et 0.5 g L⁻¹ d'EDTA (Fluka Chemika, Switzerland) préparée dans de l'eau distillée et déionisée (Millipore S.A., Molsheim, France) (Barany *et al.*, 1997).

Tableau 3-1. Paramètres de fonctionnement de l'ICP-AES.

Puissance de la radiofréquence	1350 watts
Débit d'argon auxiliaire	0.5 L min ⁻¹
Débit plasmagène	15 L min ⁻¹
Pression du nébuliseur	32.00 psi
Vitesse de la pompe péristaltique	100 rpm
Débit d'échantillon	1.85 mL min ⁻¹
Température du CID	-46 ± 1 °C

4.2.3 Spectrométrie d'absorption atomique à four de graphite (SAA-FG)

Les détails de l'analyse du béryllium par spectrométrie d'absorption atomique à four de graphite sont discutés en détails dans le troisième article. En bref, les échantillons du sang et du sérum sont préparés par dilution de huit et cinq fois respectivement, avec une solution contenant d'acide nitrique, d'hydroxyde d'ammonium, du Triton X-100, de l'EDTA et un agent anti-moussant (antifoam B silicone emulsion) préparée dans de l'eau distillée et déionisée. Le volume d'échantillon nécessaire est de 0.5 mL et le volume d'une injection est de 20 µL.

4.3 Résultats et discussion

4.3.1 Détermination du béryllium par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse

La détection du complexe de $\text{Be}(\text{TFAA})_2$ est faite à une masse sur charge (m/z) de 315.0 (fragment mère) et de 246.0 (fragment fille) suite à une perte de CF_3 ($\text{MM} = 68.9 \text{ g mol}^{-1}$). La détection du TBE est faite à une masse sur charge de 265.0 après une perte d'un bromure ($\text{MM} = 79.9 \text{ g mol}^{-1}$). La limite détection de la méthode est de l'ordre de $45 \mu\text{g L}^{-1}$ (3 fois l'écart type du plus faible standard) avec un taux de recouvrement de $70 (\pm 10) \%$ (Figure 4-1). Avec cette limite détection, la chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse n'est pas capable de détecter le béryllium dans le sang d'individus non exposés.

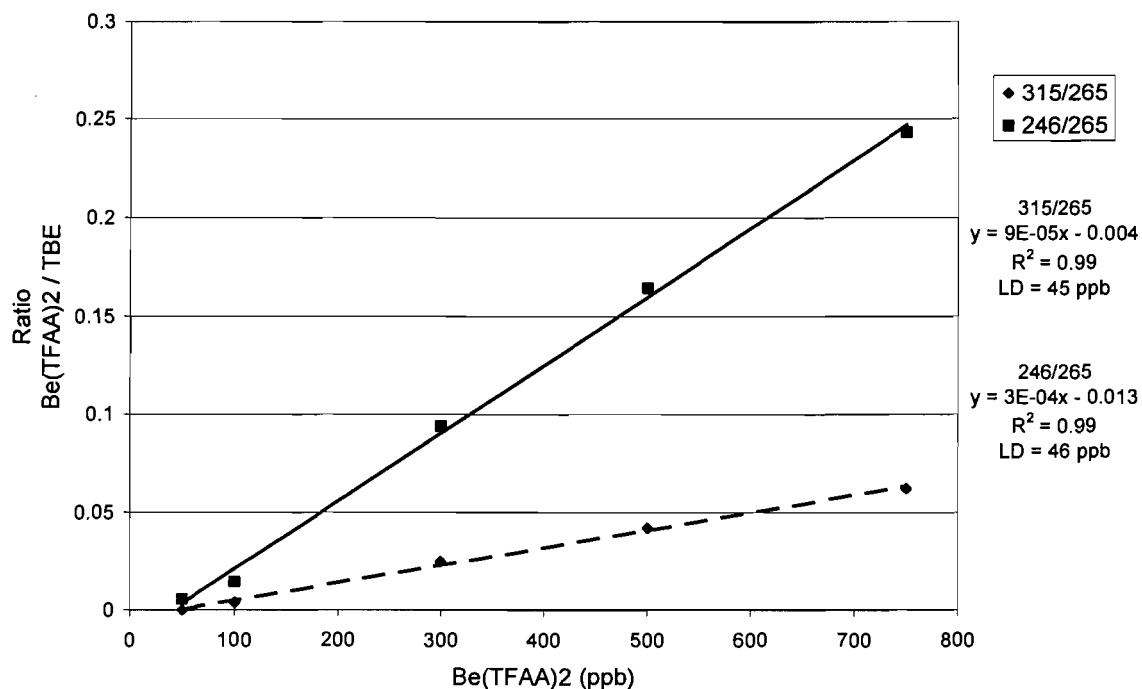


Figure 4-1. Détermination du béryllium par chromatographie gazeuse couplée avec un spectromètre de masse; courbes de calibrations et limites de détections (3 fois l'écart type du plus faible standard).

4.3.2 Détermination du béryllium par émission atomique à source plasma (ICP-AES)

La détermination du béryllium par ICP-AES se fait principalement à $\lambda = 313.042$ nm (II-ionique), 234.861 (I-atomique) et 313.107 (II-ionique). La limite de détection de cette méthode est de l'ordre de $1.4 (\pm 0.2)$ ng L⁻¹ (3 fois l'écart type du blanc) avec un taux de

recouvrement qui se situe autour de 85 (± 8) % (Figure 4-2). Sous ces conditions, le béryllium n'a pas pu être mesuré dans le sang ou le sérum des individus non exposés avec émission atomique à source plasma.

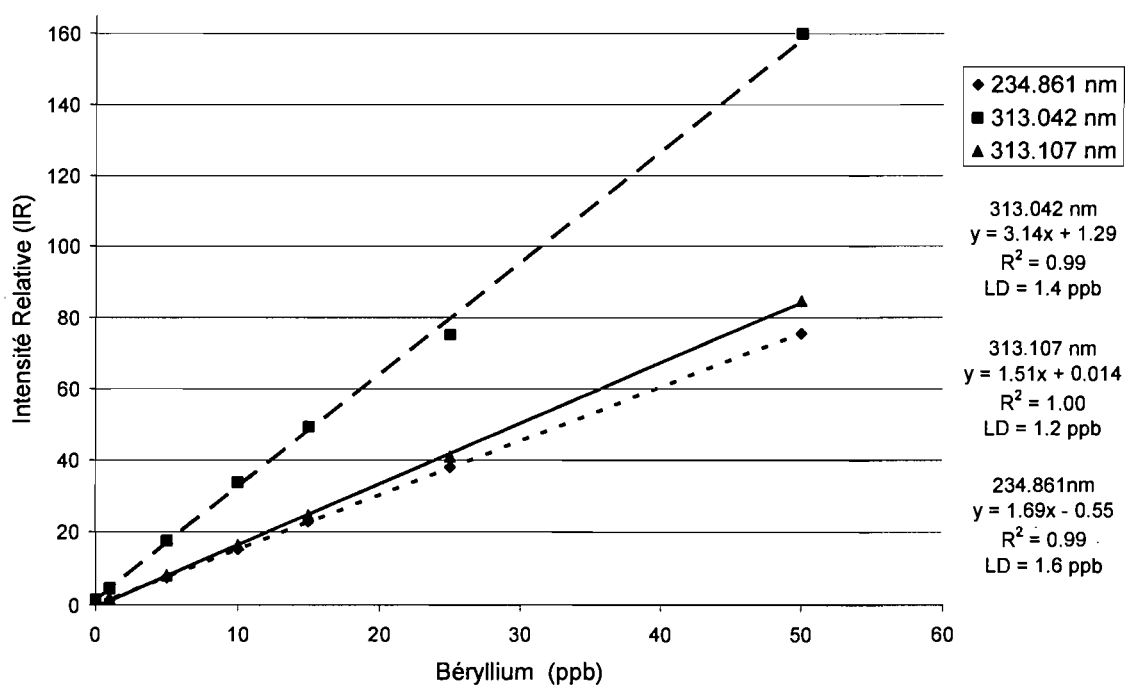


Figure 4-2. Détermination du béryllium par ICP-AES; courbes de calibrations avec limites de détections (3 fois l'écart type du blanc) pour chacune des raies du béryllium.

4.3.3 Détermination du béryllium par spectrométrie d'absorption atomique à four de graphite (SAA-FG)

L'analyse du béryllium par SAA-FG est simple, rapide et ne demande aucune étape de séparation. La limite de détection de cette méthode est 2 ng L^{-1} qui est de trois ordres de grandeur plus sensible que l'ICP-AES, de quatre ordres de grandeur plus sensible que la GC-MS (Figure 4-3). Les détails de l'analyse du béryllium par SAA-FG, sont discutés en détails dans le troisième article.

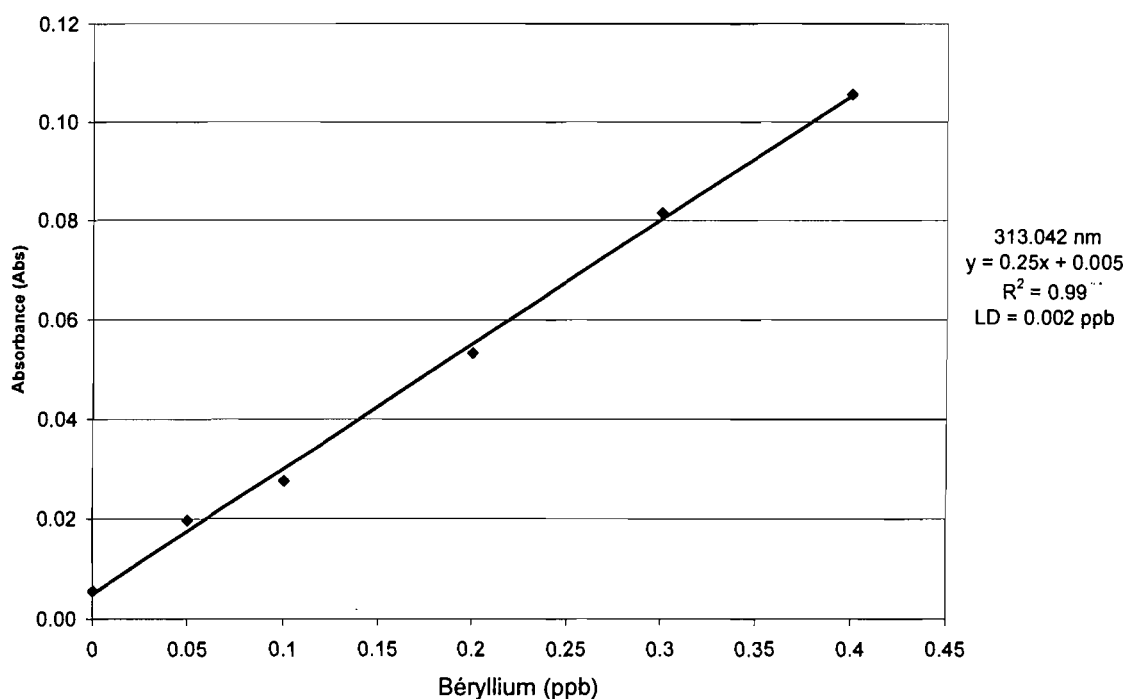


Figure 4-3. Analyse du béryllium par spectrométrie d'absorption atomique à four de graphite; courbe de calibration et limite de détection (3 fois l'écart type du blanc).

4.4 Conclusion

En ce basant sur ce survole de méthodes analytiques d'analyse du béryllium. La spectrométrie d'absorption atomique à four de graphite a été retenue comme méthode standard d'analyse du béryllium dans le sang et le sérum humain.

Chapitre 5

Evaluation of three beryllium sequestering agents by isothermal titration calorimetry

Stephan, C. H., Fournier, M., Brousseau, P., Lafleur, M. and Sauvé, S. (2008). Evaluation of three beryllium sequestering agents by isothermal titration calorimetry. *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy*. Sous presse.

5.1 Abstract

Occupational exposure to beryllium may cause Chronic Beryllium Disease (CBD), a granulomatous interstitial pneumonitis. Molecular epidemiological studies indicate charge interaction between beryllium and a specific MHC class II human leukocyte antigen as a factor in disease susceptibility. Therefore, increased research efforts are focusing on the development of a CBD treatment by chelation therapy. In this work, we use direct and competitive isothermal titration calorimetry methods to evaluate the chelation potential of three organic chelators: nitrilotriacetic acid (NTA), nitrilotripropionic acid (NTP) and 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulphonate (tiron). We first validate the use of competitive ITC to measure association constants $\leq 10^3 \text{ M}^{-1}$ using a Be^{2+} - Ca^{2+} - EDTA^{4-} system. Data of direct and competitive titrations were analyzed using the Origin® scientific plotting software. We obtained an intrinsic association constant of $3.2 (\pm 1.6) \cdot 10^{12} \text{ M}^{-1}$ for the beryllium-tiron complex, $9.4 (\pm 1.2) \cdot 10^{13} \text{ M}^{-1}$ for beryllium-NTP and $1.1 (\pm 1.1) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ for beryllium-NTA. NTP and tiron form more stable complexes with beryllium than NTA.

5.2 Résumé

L'exposition au béryllium en milieu de travail peut causer la béryllose chronique (CBD), une granulomatose interstitielle. Des études épidémiologiques moléculaires indiquent qu'une interaction de charge entre le béryllium et une famille spécifique du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) classe II est un facteur déterminant dans la susceptibilité à la maladie. En conséquence, la recherche sur le développement d'un traitement par la thérapie de chélation est en plein essor. Dans ce travail, nous utilisons le titrage calorimétrique direct ou compétitif pour évaluer le potentiel chélateur de trois agents complexants : l'acide nitrilotriacétique (NTA), l'acide nitrilotripropionique (NTP) et le 4,5-dihydroxy-1,3-benzène disulphonate (tiron). Nous validons le titrage calorimétrique compétitif qui sert à mesurer les constantes d'associations conditionnelles inférieures à 10^3 M^{-1} en étudiant la compétition du Be^{2+} - Ca^{2+} -EDTA⁴⁻. Les données du titrage direct et compétitif sont analysées par le logiciel Origin®. Nous avons obtenu une constante d'association intrinsèque de $3,2 (\pm 1,6) \cdot 10^{12} \text{ M}^{-1}$ pour le complexe de béryllium-tiron, $9,4 (\pm 1,2) \cdot 10^{13} \text{ M}^{-1}$ pour béryllium-NTP et $1,1 (\pm 1,1) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ pour béryllium-NTA. L'NTP et le tiron forment des complexes plus stables avec le béryllium que NTA.

5.3 Introduction

Beryllium is the most toxic non-radioactive element in the periodic table, the second lightest after lithium and possesses unique properties that make it a great asset in today's nuclear, aerospace, ceramics and high technology industries (Greenfield, 1971; ATSDR, 2002). Beryllium may cause chronic beryllium diseases (CBD), a granulomatous interstitial pneumonitis caused by cell mediated immune response with delayed hypersensitivity (Rossman, 1996; Shukla *et al.*, 1998). CBD is associated with bronchitis, granulomatosis, congestive heart failure, cyanosis and enlargement of liver and spleen (Mathur *et al.*, 1991). It also interacts with DNA, causing gene mutation, chromosomal aberration and sister chromatic exchanges in cultured somatic cells (ATSDR, 2002).

Beryllium interacts with the major histocompatibility complex (MHC) class II, specifically with HLA-DP alleles family (HLA-DPB1^{Glu69}) (Saltini *et al.*, 1989; Fontenot *et al.*, 1999a). The MHC-Be antigen complex is then presented to T cells bearing the appropriate receptor, and these T cells proliferate and differentiate into Be-committed T cells causing the development of CBD (Lombardi *et al.*, 2001; Sawyer *et al.*, 2002). A significant correlation ($p < 0.05$) is found between the surface charge of HLA-DP alleles and the risk of beryllium sensitization which leads to the development of CBD (McCanlies *et al.*, 2003). One of the approaches to circumvent this interaction of beryllium with the T cell receptors is the formation of a nontoxic complex either by chelation with organic substrates or by metal encapsulation (Price and Joshi, 1984). Chelating agents have to be selective and demonstrate a high affinity towards beryllium. This affinity is quantified by measuring the magnitude of the association constant, a first indicator of the potential efficiency of the chelator. Potential sequestering agents could therefore be screened using the determination of their binding affinity.

In the present work, we use direct and competitive Isothermal Titration Calorimetry (ITC) as a standard method to quantify the beryllium interaction with three sequestering

agents: nitrilotriacetic acid (NTA), nitrilotripropionic acid (NTP) and 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulphonate (tiron) (Figure 5-1).

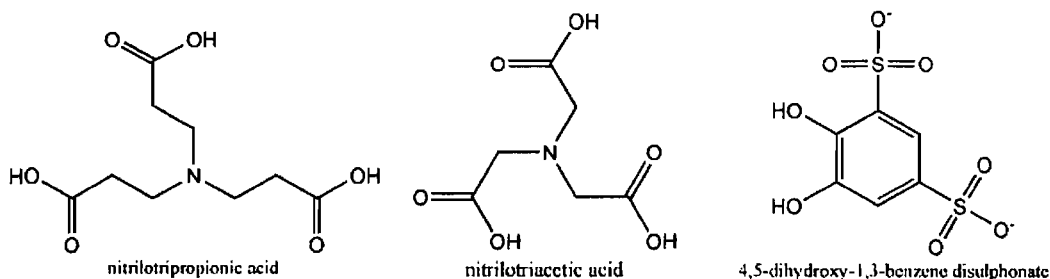


Figure 5-1. Nitrilotriacetic acid (NTA), nitrilotripropionic acid (NTP) and 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulphonate (tiron) structures.

We selected these sequestering agents from an in-depth literature review (Price and Joshi, 1984; Scarrow *et al.*, 1985; Clevette *et al.*, 1989; Mathur *et al.*, 1993; Chinae *et al.*, 1995; Kontoghiorghes, 1995; Shukla *et al.*, 1998; Sharma *et al.*, 2000; Cecconi *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2002). NTP and NTA are selected based on their coordination preferences (tetradentate) and the basicity of their donor groups. NTA has the same structure, donor groups, coordination preferences as NTP and is selected to study the beryllium preference towards ligands that form five-membered ring chelates (acetic groups, NTA) and ligands that form six-membered ring chelates (propionic groups, NTP). Tiron selection is based on physiological studies showing its high efficiency in mobilizing beryllium from the liver and restoring the altered biochemical parameters (Domingo *et al.*, 1993; Shukla *et al.*, 1998; Sharma *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2002). ITC experiments must be performed at a pH lower than 6, where insoluble beryllium hydroxides or hydrated complexes are negligible and conditional binding constants smaller than 10^{-3} M^{-1} are frequently obtained due to proton competition (ATSDR, 2002).

ITC offers many advantages over other techniques (potentiometric, spectrometric). From a single titration, one can determine the binding constant (K'), the stoichiometry of the complex (n), the enthalpy of binding ($\Delta H'$) and the entropy of binding ($\Delta S'$). ITC's major limitation is its detection window; binding constants with a magnitude greater than 10^8 M^{-1} or inferior to 10^3 M^{-1} cannot be measured directly by ITC titration (Wiseman *et al.*, 1989). This detection window set by the Wisman "c" parameter was then contested demonstrating the possibility of working on low affinity systems ($c < 10$ or $K' < 10^3 \text{ M}^{-1}$) within some specific conditions; the binding stoichiometry should be known from another source, the concentration of both reactants are known with accuracy and an adequate level of signal to noise (Turnbull and Daranas, 2003; Tellinghuisen, 2005). Otherwise, if these conditions are not met, competitive ITC should be used according to the model proposed by (Zhang and Zhang, 1998). We validated this model for metal-ligand interaction by studying a Be^{2+} - Ca^{2+} -EDTA system, where we measured the binding constant and the binding enthalpy of Be-EDTA, using calcium as a competing metal and compared our results to those published by the National Institute of Standards and Technology (NIST) (Smith and Martell, 2001). Calorimetric experiments measure the total contribution of every sources of heat during a titration, so corrections should be made to take into account other phenomena than the ligand-substrate binding such as: heat of dilutions, metal ion binding to buffer molecules, and proton transfer between the sequestering agent and the buffer (Zhang and Zhang, 1998; Christensen *et al.*, 2003).

5.3.1 Competitive ITC

We know that calcium and beryllium compete for EDTA in a 1:1 stoichiometry. By using a beryllium concentration that is much larger than that of EDTA, the free concentration of beryllium can be approximated by its total concentration $[\text{Be}]_T$. By combining the formation of the high-affinity metal-complexing agent (Ca-EDTA) and the

displacement/dissociation of the low-affinity metal-complexing agent (Be-EDTA), and rearranging the equilibrium constants using the mass conversion, we obtain:

$$K'_{app} = \frac{K'_{Ca^{2+}}}{1 + K'_{Be^{2+}} [Be]_T} \quad (5.1)$$

$K'_{Ca^{2+}}$ is the conditional binding constant of Ca-EDTA, $K'_{Be^{2+}}$ is the conditional binding constant of Be-EDTA, and K'_{app} is the conditional apparent binding constant of Ca-EDTA in the presence of beryllium. Therefore, the conditional binding constant of Be-EDTA can be determined once $K'_{Ca^{2+}}$, and K'_{app} are known.

During the competitive binding, there is the formation of Ca-EDTA complexes and the dissociation of Be-EDTA complexes. Therefore, the heat evolved during titration, Q , is proportional to the change in the concentrations of the Be-EDTA, Ca-EDTA complexes, and their respective molar binding enthalpies. The Be-EDTA molar binding enthalpy can then be determined by solving the following equation:

$$\Delta H'_{Be^{2+}} = (\Delta H'_{Ca^{2+}} - \Delta H'_{app}) \left(1 + \frac{1}{K'_{Be^{2+}} * [Be]_T} \right) \quad (5.2)$$

Where $\Delta H'_{app}$ is the apparent standard molar binding enthalpy of Ca-EDTA in the presence of beryllium, $\Delta H'_{Ca^{2+}}$ and $\Delta H'_{Be^{2+}}$ are the standard molar binding enthalpy for Ca-EDTA, and Be-EDTA, respectively.

ITC thermodynamic parameters (ΔH , K) are state functions. They vary with pH, ionic strength and temperature. By performing the titrations at a fixed ionic strength and temperature, the resulting conditional stability constants, K'_{cond} , have to be corrected for pH dependency to obtain intrinsic binding constants, K_{int} , which correspond to the binding constants where all the groups involved are ionized. The ratio of the two constants is equal to (Griko, 1999) :

$$\frac{K_{int}}{K'_{cond}} = 1 + K_1[H^+] + K_1K_2[H^+]^2 + K_1K_2K_3[H^+]^3 + K_1K_2K_3K_4[H^+]^4 \quad (5.3)$$

where K_1 , K_2 , K_3 , K_4 represent the protonation constants of EDTA^{4-} (Smith and Martell, 2001). Similarly, the ITC-determined enthalpies include contributions from the buffer and the complexing agent protonation/deprotonation. The intrinsic enthalpy, ΔH_{int} , which corresponds to the binding enthalpy where EDTA is fully ionized (EDTA^{4-}), is calculated using the following equation (Fukada and Takahashi, 1998).

$$\Delta H'_{obs} = \Delta H_{int} + n\Delta H_{ion}^{Buffer} + n_1\Delta H_L^{HL} + n_2\Delta H_{HL}^{H_2L} + n_3\Delta H_{H_2L}^{H_3L} + n_4\Delta H_{H_3L}^{H_4L} \quad (5.4)$$

where $\Delta H'_{obs}$ is the observed enthalpy of binding, n is the number of protons released by EDTA upon metal binding that are transferred to the buffer molecules ($n = n_1 + n_2 + n_3 + n_4$). ΔH_{ion}^{Buffer} is the buffer protonation molar enthalpy arising from proton transfer to buffer. Also, n_1 is the fraction of EDTA with at least 1 protonated group, going from HEDTA^{3-} to EDTA^{4-} upon metal binding and ΔH_L^{HL} is the first ionization molar

enthalpy of EDTA (Smith and Martell, 2001). Along the same lines, n_2 is the fraction of EDTA with at least 2 protonated groups, going from $\text{H}_2\text{EDTA}^{2-}$ to EDTA^{4-} upon metal binding and $\Delta H_L^{H_2L}$ is the second ionization molar enthalpy of EDTA.

5.4 Materials and methods

5.4.1 Chemicals and reagents

Nitrilotripropionic acid (NTP) was purchased from MP Biomedicals (Ohio, USA), nitrilotriacetic acid (NTA) from Fisher Biotech (New Jersey, USA) and tiron from Acros Organics (New Jersey, USA). Tetrasodium ethylenediamine tetraacetate (Na_4EDTA) ultrapure grade was purchased from Sigma (St Louis, MO, USA); beryllium sulfate (BeSO_4) from Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA), sodium chloride (NaCl) from Anachemia (Mississauga, ON, Canada); nitrilotripropionic acid (NTP) was purchased from MP Biomedicals (Ohio, USA); calcium chloride (CaCl_2), sodium hydroxide (NaOH), zinc nitrate ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$), nitric acid (HNO_3) and hydrochloric acid (HCl) were of trace metal grade quality and purchased from Fischer Scientific (New Jersey, USA) and (2-[N-morpholino]ethane-sulfonic acid) hydrate (MES) from Sigma (St Louis, MO, USA). All chemicals were used without further purification. Stock solutions of 0.1 M NTP, NTA, tiron, Na_4EDTA , $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, CaCl_2 , HCl and 1 M of BeSO_4 , NaCl and MES were prepared using deionised water from a Millipore system (resistance 18 $\text{M}\Omega/\text{cm}$). Concentrated solutions of NaOH and HNO_3 were used to adjust pH. All experiments were performed at a pH of 5.5 and an ionic strength of 0.1 adjusted by addition of sodium chloride.

5.4.2 Isothermal titration calorimetry

Isothermal titrations were performed using a VP-ITC isothermal titration calorimeter from MicroCal, Inc. (Northampton, MA) with a cell volume of 1.4527 mL. The stirring rate was fixed at 300 rpm, the volume of each injection was 3 μL and the time between injections was 5 min. Titrations were carried at 25.0 ± 0.1 °C and 0.1 ionic strength. Data analysis was performed using the Origin[®] MicroCal Software, Inc. (OriginLab Corporation, 2002) where the apparent calorimetric enthalpy ($\Delta H'_{app}$) in cal mol⁻¹, the apparent entropy ($\Delta S'_{app}$) in cal mol⁻¹ deg⁻¹, the apparent association constant (K'_{app}) in M⁻¹, and the stoichiometry (n) can be obtained from a single titration. If the apparent association constant fell outside the detection window (10^3 to 10^8 M⁻¹) a competitive binding method was used (Zhang and Zhang, 1998; Sigurskjold, 2000). All ITC signals were corrected for the heat of dilution of the various chemicals determined by performing titrations in the absence of one or the other reacting agents. The heat of the metal interaction with the buffer was determined by competitive titration while varying the buffer concentration (Christensen and Toone, 2003) and the heat of buffer ionization was determined by titrating the buffered solution with HCl to obtain the conditional binding constant (Fukada and Takahashi, 1998). The obtained conditional binding constants, enthalpy and entropy were corrected for protonation dependency to obtain intrinsic values (Griko, 1999). Experimental uncertainties were quoted as the standard deviation of triplicate measurements.

5.5 Results and discussion

5.5.1 Metal binding to buffer

The buffer interaction with any metal used in the direct or competitive ITC should be minimal, should not influence the metal-ligand association and must therefore be measured accurately to correct the conditional values. We measured the Be-MES, Ca-MES and Zn-MES conditional binding constants by performing different titrations at varied buffer concentrations keeping the metal and ligand concentrations fixed. We used NTP for beryllium and ETDA for zinc and calcium as competing ligands against MES. We obtained conditional binding constants equal to $4 (\pm 1) \text{ M}^{-1}$ for Be, $15 (\pm 3) \text{ M}^{-1}$ for Ca and $15 (\pm 2) \text{ M}^{-1}$ for Zn, calculated using Eq. (5.1) by plotting $1/K'_{app}$ as function of MES concentration.

5.5.2 Heat of buffer ionization

The ionization heat of MES has to be determined accurately to convert conditional binding enthalpies to intrinsic binding enthalpies (Eq. 5.4). We obtained a MES ionization enthalpy equal to $3.1 (\pm 0.1) \text{ kcal mol}^{-1}$, in good agreement with $3.0 (\pm 0.1) \text{ kcal mol}^{-1}$ reported by (Christensen and Toone, 2003) (independent sample T test; $P < 0.05$).

5.5.3. Be^{2+} - Ca^{2+} -EDTA validation system

We first determined the conditional binding constant and the conditional enthalpy change of Ca-EDTA in the absence of beryllium by direct titration and we obtained $1.0 (\pm 0.4) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ and $-3.7 (\pm 0.2) \text{ kcal mol}^{-1}$ respectively. The molar ratio at saturation was $1.03 (\pm 0.03)$, indicating the absence of any ternary species. The same experiment was repeated

in the presence of 1 mM BeSO₄ as a competing metal. We obtained a Ca²⁺-EDTA conditional apparent binding constant (K'_{app}) and apparent binding enthalpy equal to $3.6 (\pm 0.9) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ and $-8.7 (\pm 0.7) \text{ kcal mol}^{-1}$, respectively. The molar ratio at saturation was equal to $0.98 (\pm 0.04)$ (Figure 5-2). By solving equations 5.1 and 5.2 for the above titrations, we obtain a Be-EDTA conditional binding constant equal to $3.1 (\pm 0.8) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ and conditional binding enthalpy equal to $7.3 (\pm 0.6) \text{ kcal mol}^{-1}$. All conditional values have to be corrected for the metal-buffer interactions and pH dependency to obtain intrinsic thermodynamic data. We obtained $5.7 (\pm 1.3) \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ and $1.0 (\pm 1.4) \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ as intrinsic binding constants for Ca-EDTA and Be-EDTA respectively, in good agreement with the NIST compilation (independent sample T test; $P < 0.05$) (Table 5-1) (Smith and Martell, 2001). By validating the competitive ITC method for beryllium-ligand interaction, ITC becomes a promising method for screening potential sequestering agents for beryllium.

Table 5-1. Complete thermodynamic data of the Be²⁺-Ca²⁺-EDTA calibration system.

Averages of triplicate measurements are given with standard deviations.

(25 °C ; $\mu = 0.1$)	K_{int} (M^{-1})	ΔH_{int} (kcal mol^{-1})	ΔS_{int} ($\text{cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)
Ca-EDTA [†]	$5.7 (\pm 1.3) \times 10^{10}$	$-6.9 (\pm 0.8)$	$26 (\pm 2)$
Ca-EDTA [‡]	$4.5 (\pm 1.5) \times 10^{10}$	$-6.1 (\pm 0.6)$	$29 (\pm 1)$
Be-EDTA [†]	$1.0 (\pm 1.4) \times 10^9$	$10.1 (\pm 0.9)$	$74 (\pm 3)$
Be-EDTA [‡]	$3.9 (\pm 1.0) \times 10^9$	$10.0 (\pm 0.7)$	$78 (\pm 3)$

[†] This study; [‡] NIST compilation (Smith and Martell, 2001); int: intrinsic; (\pm SD)

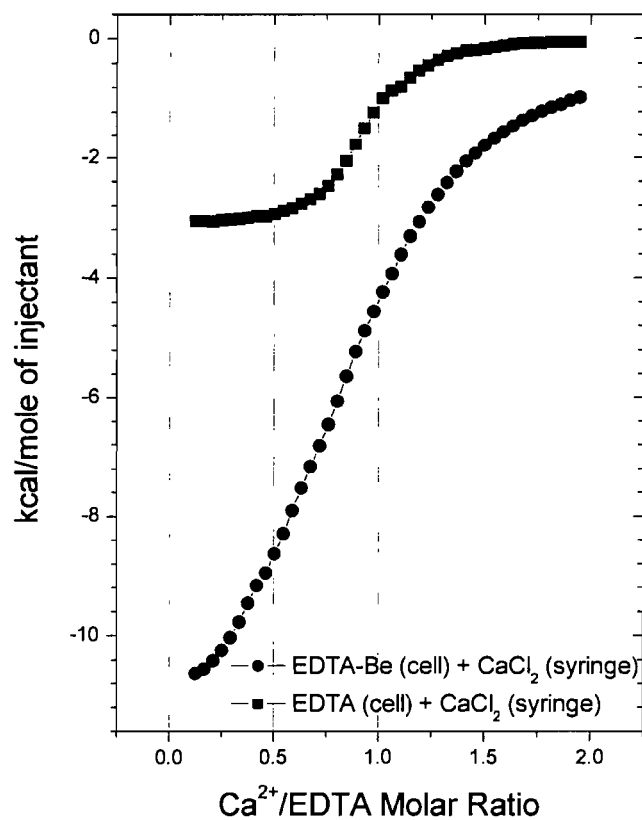


Figure 5-2. Comparison between binding isotherms. The circles show the displacement titration of 500 μM of EDTA by 10 mM Ca(II) in the presence of 1 mM Be(II) while the squares show the same titration without Be(II) in 50 mM MES at pH 5.5, 25 $^{\circ}\text{C}$.

5.5.4 Beryllium-Nitrilotriacetic acid

ITC direct titration of Be-NTA resulted in a conditional stability constant below the detection window (10^3 to 10^8 M⁻¹). Therefore, we used zinc as a competing metal. The conditional binding constants for Zn-NTA in the absence and presence of beryllium are $4.7 (\pm 0.6) \cdot 10^5$ M⁻¹ and $1.8 (\pm 0.5) \cdot 10^6$ M⁻¹ respectively. Knowing both conditional binding constants of Zn-NTA in the presence (K_{app}) and in the absence of Be (K_{Zn-NTA}), one can determine the conditional binding constant of Be-NTA (K_{Be-NTA}). We obtained a Be-NTA conditional binding constant of $7.5 (\pm 1.2) \cdot 10^2$ M⁻¹, a conditional binding enthalpy of $2.8 (\pm 0.9)$ kcal mol⁻¹ and a conditional binding entropy of $22.5 (\pm 2)$ cal K⁻¹ mol⁻¹. Using the competitive titration method, only the stoichiometry of the metal with the high affinity (Zn) can be obtained. Therefore, we treated the raw data of Be-NTA direct titration by Scatchard linearization using the following equation (Alberty, 1994):

$$\frac{y}{[Be]_{Free}} = \frac{n}{K'_d} - \frac{y}{K'_d} \quad (5.5)$$

Where y is the fractional saturation of sites, $[Be]_{Free}$ is the free concentration of beryllium in M, n is the stoichiometry of binding and K'_d is the conditional dissociation constant in M. We obtained a Be-NTA stoichiometry of $0.50 (\pm 0.01)$. It is therefore compelling that the complexation of beryllium by NTA requires two molecules of the ligand for each molecule of beryllium. The intrinsic enthalpy of binding is endothermic and therefore the formation of Be-NTA is entropy driven (Table 5-2). All conditional thermodynamic data are corrected for protonation dependency to obtain intrinsic thermodynamic data where ligand protonation constants and enthalpies are taken from the NIST compilation (Smith and Martell, 2001).

Table 5-2. Complete thermodynamic data of Be-NTA, Be-NTP and Be-tiron complexes (25 °C ; $\mu = 0.1$). Averages of triplicate measurements are given with standard deviations.

System	N	$K_{\text{int}} (\text{M}^{-1})$	$\Delta H_{\text{int}} (\text{kcal mol}^{-1})$	$\Delta S_{\text{int}} (\text{cal K}^{-1} \text{mol}^{-1})$
Be-(NTA) ₂	0.50 (± 0.01)	1.1 (± 1.1)*10 ⁷	10.5 (± 0.8)	68 (± 2)
Be-NTP	0.70 (± 0.03)	9.4 (± 1.2)*10 ¹³	- 3.9 (± 0.7)	51 (± 2)
Be-(tiron) ₂	0.49 (± 0.01)	3.2 (± 1.6)*10 ¹²	- 1.4 (± 0.3)	53 (± 2)

int: intrinsic; (\pm SD)

5.5.5 Beryllium-Nitrilotripropionic acid

The conditional binding constant of Be-NTP determined by ITC direct titration is equal to $2.4 (\pm 0.7) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. The conditional enthalpy and entropy are equal to $1.9 (\pm 0.6) \text{ kcal mol}^{-1}$ and $26.4 (\pm 1.3) \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ respectively. The stoichiometry of binding was found to be $0.70 (\pm 0.03)$. Such stoichiometry suggests the formation of both Be-NTP and Be-(NTP)₂ species in the calorimetric cell under the experimental conditions. By interpreting the titration data by a single site model, it is implied that the presence of Be-(NTP)₂ is minimal and Be-NTP is the dominant complex. The intrinsic enthalpy of formation is exothermic with a large favorable entropy contribution (Table 5-2). By comparing both aminocarboxylic acids, we notice that beryllium is better complexed by a six-membered ring chelate (NTP) rather than a five-membered ring (NTA). The formation of Be-NTP is more favorable due to the change from endothermic enthalpy (Be-NTA) to exothermic enthalpy (Be-NTP). We also measured a smaller entropy for Be-NTP than Be-NTA. This contradicts the membered rings theory but is justified by the stoichiometry of binding since it takes two molecules of NTA to complex one beryllium ion whereas it only takes one molecule of NTP.

5.5.6 Beryllium-tiron

The ITC direct titration of tiron with Be resulted in a conditional binding constant of $2.4 (\pm 0.5) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$, an enthalpy of $-4.5 (\pm 0.8) \text{ kcal mol}^{-1}$ and an entropy of $0.4 (\pm 0.1) \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. The stoichiometry of binding is equal to $0.49 (\pm 0.01)$, thus confirming that beryllium is complexed by two molecules of tiron. The intrinsic thermodynamic values corrected for protonation dependency are presented in Table 5-2. The enthalpy of binding is exothermic with a favorable entropic contribution.

5.6 Conclusion

Isothermal Titration Calorimetry by its direct and competitive methods is a standard method for screening metal sequestering agents. From the equilibrium data, we confirm that NTP and tiron are better beryllium complexing agents than NTA which should be omitted from the list of potential beryllium sequestering agents due to its small affinity towards beryllium and its higher selectivity towards zinc (an essential micro-nutrient).

5.7 Acknowledgements

We thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Institut de Recherche Robert-Sauvé en Santé et en Sécurité du Travail for financial support.

Chapitre 6

Use of proliferation tests to evaluate the effects of complexing agents on beryllium toxicity

Stephan, C. H., Fournier, M., Brousseau, P. and Sauvé, S. (2008). Use of proliferation tests to evaluate the effects of complexing agents on beryllium toxicity. *Journal of Applied Toxicology*. Sous presse.

6.1 Abstract

Occupational exposure to beryllium may cause Chronic Beryllium Disease (CBD), a granulomatous interstitial pneumonitis caused by a cell-mediated immune response with delayed hypersensitivity initiated by an electrostatic interaction with the MHC class II human leukocyte antigen (HLA). Increased research efforts focus on the development of a CBD treatment by chelation therapy. This work presents an *in vitro* evaluation of the beneficial effects of beryllium chelation with different organic substrates. We have used a standard beryllium lymphocyte proliferation test (BeLPT) adapted for mouse splenocytes. Three complexing agents, 4,5-dihydroxy-1,3-benzenedisulfonic acid (tiron), nitrilotripropionic acid (NTP) and nitrilotriacetic acid (NTA) were tested using different protocols of the splenocyte proliferation test (SPT). We studied their corrective effect (beryllium pre-exposed splenocytes), their protective effect (ligand pre-exposed splenocytes) and their combined effects at fixed Be:L ratio of 1:2, at fixed Be concentration and at fixed L concentration. We also studied the effect of tiron in preventing splenocyte sensitization to beryllium. All three complexing agents showed a corrective effect and proved efficient in the combined effects, except NTA in the fixed Be:L ratio. Only NTP and tiron showed a significant protection at lower beryllium concentrations while NTA was not significant. Splenocytes pre-exposed to chelated beryllium did not show sensitization while splenocytes pre-exposed to beryllium were sensitized. We observed a strong correlation between the efficiency of the complexing agent and its affinity towards beryllium. Both tiron and NTP showed a similar affinity towards the beryllium ion that is 10^7 higher than that of NTA.

Keywords: Splenocyte proliferation test, Beryllium, NTP, NTA, tiron, chelation therapy.

6.2 Introduction

Beryllium, one of the most toxic non-radioactive elements of the periodic table (Reeves, 1989), possesses unique chemical, physical and metallurgical properties that make it a great asset in today's nuclear, aerospace and high technology industries. The potential hazards of exposure to beryllium and beryllium compounds were first reported in the 1930s (Sanchiz *et al.*, 2002). The clinical syndrome of chronic beryllium disease (CBD) was first described in 1946 and the first *in vitro* observation of beryllium-specific cell proliferation was demonstrated 20 years later (Frome *et al.*, 2003). Chronic beryllium disease mainly affects the lungs and occurs in 1 to 15 % of exposed individuals. It is a granulomatous lung disease that develops from the cell-mediated immune response, characterized by a delayed hypersensitivity with no clear relationship between the extent of exposure and the severity of the resultant disease (Newman *et al.*, 1989; Scott *et al.*, 2003). Chronic beryllium disease is associated with bronchitis, congestive heart failure, cyanosis and enlargement of liver and spleen (Mathur *et al.*, 2006). Beryllium is highly cytotoxic (Mathur *et al.*, 1993; Wong and Woollins, 1994), impacts enzyme function, DNA synthesis, protein phosphorylation and cell division (Messer *et al.*, 1999; Sawyer *et al.*, 2000; Lehnert *et al.*, 2001). It is categorized as a Class A carcinogen (Finch *et al.*, 1996). It is estimated that between 20 000 and 800 000 people have been exposed to beryllium and those individuals are stigmatized with a lifetime risk of developing CBD (McCanlies *et al.*, 2003).

Immune hypersensitivity to beryllium is the criterion most used to diagnose patients with beryllium sensitization and CBD (Rossman, 1996). The beryllium lymphocyte proliferation test (BeLPT) is used to diagnose beryllium sensitization and CBD. It is based on *in vitro* proliferation of blood mononuclear cells exposed to beryllium and is recognized as a to be extremely sensitive test to detect beryllium sensitization and CBD (Stokes and Rossman, 1991).

When workers are exposed, beryllium is absorbed into the blood through the alveoli and phagocytized by the macrophages. This generates an exogenous antigen that reappears on the surface of the antigen-presenting macrophage which couples to the major histocompatibility (MHC) class II antigen (Saltini *et al.*, 1989; Sawyer *et al.*, 2002). The MHC-Be antigen complex is then presented to the T-cells bearing the appropriate T-cell receptor (TCR), and these T-cells proliferate and differentiate into Be-committed T cells (Fontenot *et al.*, 1999a; Lombardi *et al.*, 2001). A significant correlation was found between the risk of developing CBD and the predicted surface electrostatic potential of the human leucocyte antigen (HLA)-DP alleles, suggesting that individuals who carry the most negatively charged alleles are at greater risk of beryllium sensitization and CBD (McCanlies *et al.*, 2003). A molecular epidemiological study highlighted that charge interaction between beryllium and a specific HLA-DP allele is a significant factor in disease susceptibility (Berretta *et al.*, 2003). Increased research efforts are targeted towards the development of a CBD treatment through chelation therapy or metal encapsulation (Seiler *et al.*, 1988; Wong and Woollins, 1994; Sharma *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2002; Nirala *et al.*, 2007)

In this paper, we looked into the therapeutic potential of three organic ligands, nitrilotripropionic acid (NTP), nitrilotriacetic acid (NTA) and 4,5-dihydroxy-1,3-benzenedisulfonic acid (tiron) using an adapted version of the human BeLPT performed on mouse splenocytes, hereafter named splenocyte proliferation test (SPT). These chelators were selected from an indepth literature search on appropriate beryllium complexing agents (Price and Joshi, 1984; Scarrow *et al.*, 1985; Clevette *et al.*, 1989; Mathur *et al.*, 1993; Chinae *et al.*, 1995; Shukla *et al.*, 1998; Cecconi *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2002; Kontoghiorghes, 1995). Based on coordination chemistry and basicity of the donor groups, we selected NTP given that the beryllium cation in the $[\text{Be}(\text{NTP})]^+$ complex lies at the center of a slightly distorted tetrahedron towards C_{3v} symmetry with a longer Be-N bond and three equal Be-O bonds. NTA belongs to the same family of amino carboxylic acids as NTP and was selected to evaluate the potential preference of beryllium towards ligands that

form five-membered ring chelates (acetic groups) or six-membered ring chelates (propionic groups) (China *et al.*, 1995). From immunotoxicological studies, tiron was also chosen because it has been shown to reduce beryllium-induced hematological alterations and histopathological lesions in liver (Shukla *et al.*, 1998). Tiron was also shown to mobilize beryllium and restore the altered biochemical parameters in different rat tissues and organs (Sharma *et al.*, 2000; Nirala *et al.*, 2007).

The SPT used in this study is a modified version of the human BeLPT with added Concanavalin A (Con A) as mitogenic agent. Beryllium is a weak mitogenic agent to mouse splenocytes and tends to inhibit their proliferative response at concentrations higher than 10^{-7} M (Price and Skilleter, 1985). Different SPT protocols were conducted to study: *i*) the corrective effect on pre-exposed splenocytes to beryllium (10^{-5} M) at varied ligand concentrations (L-SPT), *ii*) the protective effect on pre-exposed splenocytes to each of the ligands independently (10^{-5} M) at varied beryllium concentrations (Be-SPT), *iii*) the combined effect on pre-incubated splenocytes at fixed (Be:L) ratio of (1:2), fixed beryllium with varied ligands concentrations (L-SPT) and fixed ligand concentrations with varied beryllium concentrations (Be-SPT), *iv*) the sensitization effect where a Be-SPT was performed on pre-exposed splenocytes to beryllium (10^{-5} M) and to the tiron-beryllium complex. The efficiency of the treatments was calculated as the percentage improvement calculated from the deviation of the effective concentration causing 50 % inhibition (EC_{50}) relative to the appropriate control.

The data for the effects of SPT combinations were further analyzed by Bliss independence for independence criteria and Loewe additivity for dose-additivity, as recommended by the so-called Saariselkä agreement for mixed agents (Greco *et al.*, 1995). Loewe/Bliss synergism/antagonism terminologies were used to evaluate according to which criteria the combined SPT results deviated from the zero interaction effect. The independence criterion (Bliss) originally derived from a probability theory that two agents act in such a manner that neither interferes with the other, but each contributes to the

common results (Bliss, 1939). In other words, the expected effect for a combination of two agents can be calculated from the effect of each single-agent independently using the following equation:

$$E_{Be-L} = E_{Be} + E_L - E_{Be}E_L \quad (6.1)$$

where E_{Be-L} is the calculated combined effect, E_{Be} is the effect of beryllium at a fixed dose d_{Be} and E_L is the effect of the ligand at a fixed dose d_L . If the calculated effect is higher than the measured effect, we have a Bliss antagonism, if it is smaller, we have a Bliss synergism and if they are equal, we have Bliss independence. The dose additivity criterion defines zero-interaction, which presumes that an agent cannot interact with itself and the effect follows the concept of additivity (one dose produces x effect, double the dose should produce 2x) (Loewe, 1926). Dose additivity can be calculated using the following equation:

$$\frac{d_{Be}}{D_{Be}} + \frac{d_L}{D_L} = I \quad (6.2)$$

where I is the interaction index. When $I = 1$, there is no interaction (Loewe additivity). When $I < 1$, there is a Loewe synergism is found whereas $I > 1$, indicate a Loewe antagonism. In Eq. 6.2, d_{Be} and d_L are the doses of beryllium and ligand in the mixture that produce the same effect that would be expected for each respective agents used independently (D_{Be} and D_L).

6.3 Materials and methods

6.3.1 Animals

Splenocyte suspensions were prepared from the spleens of young female mice (20-25 g; 8-10 weeks). C57BL/6 mice were purchased from Charles River Canada (St. Constant, Québec), placed in the vivarium with an automatic 12hr light/dark cycle, fed with a standard rodent diet and tap water *ad libitum* for the acclimatizing period (two weeks). The temperature was maintained at 20°C while humidity varied between 40 and 60 %.

6.3.2 Cell preparation and culture

As soon as the mice were sacrificed, the spleens were collected in RPMI 1640, (Gibco, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10 % fetal calf serum, 1 % of penicillin, and 10 mM of HEPES sodium salt (hereafter called complete RPMI medium). The spleens were minced with forceps into complete RPMI medium and the obtained suspension was filtered through nylon wool within a Pasteur pipette. The cell concentration was determined by introducing a mixture of 10 μL of the cell suspension and 10 μL of trypan blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) into a hemocytometer. The concentration of splenocyte in the suspension was adjusted to a working suspension of 5×10^6 cells mL^{-1} . The working suspension was further divided into sub-suspensions and each of those was treated differently according to the effect studied (corrective, protective, combined and sensitization). Complete details of sub-suspensions treatments are given later. After the exposure or the incubation period, the splenocytes were distributed in flat-bottom 96-well plates (Falcon, Mississauga, ON, Canada), and the cells were exposed to beryllium in Be-SPT, each ligand independently in L-SPT or a mixture of the beryllium-ligand (fixed (Be:L) ratio of (1:2), fixed beryllium in L-SPT and fixed ligands in Be-SPT)

depending on the effect studied. Cells were stimulated using $1.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ of Conavalin A (Con A) (Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA). Negative controls were cultured without mitogen or any agent.

6.3.3 Splenocytes Proliferation Test (SPT)

In flat bottom 96-well plates, the treated sub-suspension of splenocytes (5×10^6 cells mL^{-1}) is distributed in triplicates; negative control (100 μL of the splenocyte sub-suspension + 110 μL of complete RPMI), positive control (100 μL of the splenocyte sub-suspension + 100 μL of $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ of Con A + 10 μL of complete RPMI) and samples (100 μL of the splenocyte sub-suspension + 100 μL of $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ of Con A + 10 μL of the different chemicals). Chemical concentrations in the samples ranged from 10^{-9} up to 10^{-3} M. The plates were then incubated for 48 h at 37°C with 5 % CO_2 in a humidified atmosphere and for another 18 h with 0.5 μCi of [^3H]thymidine (ICN, Mississauga, ON, Canada) in each well. The cells were then harvested using a Titerteck cell harvester (Flow laboratories, Scotland, UK), and the incorporated radioactivity was measured with a Beckman scintillation counter (Beckman instruments, Inc., Fullerton, California, USA). Each SPT was replicated three times.

6.3.3.1 Controls: sub-suspensions of splenocytes were pre-incubated for 20 h at 37°C with 5 % CO_2 in a humidified atmosphere. After incubation, the splenocytes were washed by centrifugation, re-suspended in a fresh complete RPMI and used to conduct SPTs with each of the chemicals independently.

6.3.3.2 Corrective effect protocol: the sub-suspensions of splenocytes were exposed to beryllium (10^{-5} M) for 20 h at 37°C with 5 % CO_2 in a humidified atmosphere. After exposure, the splenocytes were washed by centrifugation and re-suspended in fresh

complete RPMI medium to eliminate excess beryllium. A L-SPT was performed with each ligand independently.

6.3.3.3 Protective effect protocol: sub-suspensions of splenocytes were exposed to each of the ligand (10^{-5} M) independently for 20 h at 37 °C with 5 % CO₂ in a humidified atmosphere. After exposure, the splenocytes were washed by centrifugation and re-suspended in fresh complete RPMI medium to eliminate excess ligand and Be-SPTs were performed.

6.3.3.4 Combined effect protocols: we assessed the combined effect using three different SPT protocols. At fixed (Be:L) ratio, sub-suspensions of splenocytes incubated without any chemical for 20 h at 37 °C with 5 % CO₂ in a humidified atmosphere were then washed by centrifugation and re-suspended in a fresh complete RPMI medium to normalize the splenocyte treatments. The resulted sub-suspensions were then used to conduct a SPT with varied beryllium and ligand concentrations at a fixed ratio of 0.5 (ie: 10^{-9} M of Be : 2×10^{-9} M of L). At fixed ligand concentration (10^{-5} M), sub-suspensions of splenocytes were incubated, washed and re-suspended before conducting a Be-SPT with each of the ligand independently. At fixed beryllium concentration (10^{-5} M), sub-suspension of splenocytes were incubated, washed and re-suspended before performing a L-SPT with each ligand independently.

6.3.3.5 Sensitizing effect: sub-suspensions of splenocytes were exposed to a mixture of Be:Tiron in a 1:2 ratio for 20 h at 37 °C with 5 % CO₂ in a humidified atmosphere. The splenocytes were then washed by centrifugation and re-suspended in a fresh complete RPMI medium before performing a Be-SPT.

6.3.4 Viability and exposure time

Splenocyte viability was assessed after 20 h of pre-exposure to each of the chemicals used in this study (10^{-5} M), beryllium sulfate (Alfa Aesar, Ward Hill, MA, USA), NTP (MP Biomedicals, Ohio, USA), NTA (Fisher Biotech, New Jersey, USA), tiron (Acros Organics, New Jersey, USA) and after 48 h of culture with beryllium in Be-SPT and each of the ligand independently in L-SPTs. Propidium iodide (PI), a non-permeant dye that penetrates the membranes of dead cells, was used to differentiate viable from dead splenocytes. A 1-mL aliquot of the exposed (20 h) or cultured (48 h) splenocytes was transferred into separate polystyrene round-bottom tubes and was supplemented with 1 mL of FACS solution (Fluorescence Activated Cell Sorter, Falcon, Mississauga, ON, Canada). To each tube, 2 μ L of PI (1 mg mL⁻¹) were added to obtain a final concentration of 1 μ g mL⁻¹. The tubes were mixed gently and incubated for 1 min at room temperature before being analyzed using a FACScan flow cytometer (Becton-Dickinson, San Jose, California, USA, 488 nm excitation wavelength, 617 nm emission wavelength).

6.3.5 Data analysis

Dose-response relationships were fitted using the following logistic model when no hormesis trend was found (Greco *et al.*, 1995).

$$y = A_{\min} + \frac{A_{\max} - A_{\min}}{1 + 10^{(\log X_0 - X)p}} \quad (6.3)$$

Otherwise, in the presence of hormesis (opposite effect in small doses than in large doses), a biphasic sigmoid model was used (Chaperon and Sauve, 2007)

$$y = A_{\min} + \frac{A_{\max 1} - A_{\min}}{1 + 10^{(X - X_{0.1})p_1}} + \frac{A_{\max 2} - A_{\min}}{1 + 10^{(X_{0.2} - X)p_2}} \quad (6.4)$$

Where y is the measured response, A_{min} and A_{max} are the minimum and maximum response, p is the slope, X is the applied dose, $\log X_{50}$ is the EC_{50} , $X_{0.1}$ and $X_{0.2}$ are the first and second medians. These non-linear models were fitted using Origin 7 (OriginLab Corporation, 2002). One-way ANOVA, Tukey HSD and Dunnett t (2-sided) tests were used to validate significant differences among samples and treatments. Treatment efficiency was reported as improvement ratio (treatment EC_{50} / beryllium control EC_{50}). Combined SPT results were analyzed using Loewe additivity for dose-additivity and Bliss independence for independence criterion (Greco *et al.*, 1995). Bliss synergism/antagonism were calculated by replacing the appropriate effect generated at 10^{-6} M in Eq. 6.1. Loewe synergism/antagonism was calculated by replacing the appropriate dose that causes EC_{50} in Eq. 6.2.

6.4 Results

6.4.1 Viability

Splenocytes viability was assessed at two different periods, after the 20 h pre-exposure/pre-incubation and after the 48 h of incubation in the SPT protocol. Splenocyte viability was measured to exclude any possible interference with SPT inhibition that could be caused by an increased splenocyte mortality. After 20 h of pre-exposure/pre-incubation, splenocytes viability was assessed and we found no significant differences between the pre-exposed (to Be, NTA, NTP and tiron independently) and pre-incubated (no chemical) splenocytes ($p > 0.05$; one-way ANOVA). Viability varied from 95 % to 99 % for the different chemicals. After 48 h of incubation in Be-SPT or L-SPT, splenocyte viability was measured and we also found no significant differences between the positive control (no chemicals) and the range of chemical concentration tested (Be-SPT or L-SPT; $p > 0.05$; one-way ANOVA). Figure 6-1 shows the variation of the viability calculated as a deviation

percentage from the positive control as a function of increasing chemical concentrations. These observations confirmed that splenocyte viability was not influenced by the 20-h pre-exposure or pre-incubation, and did not change with the increasing chemical concentrations in the 48 h of incubation (Be-SPT or L-SPT). This lead us to conclude that splenocyte mortality did not interfere with the splenocyte inhibition response.

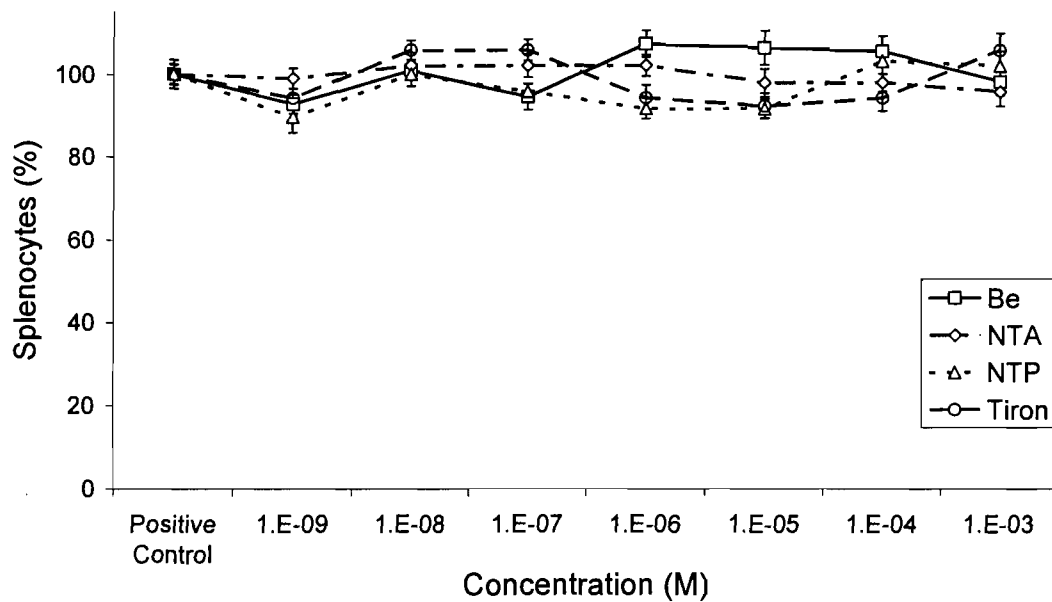


Figure 6-1. Viability of splenocytes assessed after 48 hours of incubation (SPT protocol) with each of the chemicals (Be, NTA, NTP and tiron) calculated as a deviation in percentage from the positive control.

6.4.2 Splenocyte proliferation test

6.4.2.1 Control

Control plates were prepared using pre-incubated splenocytes to study the proliferation response in the presence of beryllium and each of the ligands separately. Beryllium continuously inhibited the proliferation of splenocytes; this inhibition was significant ($p < 0.05$; one-way ANOVA) at concentrations higher than 10^{-8} M and reached a maximum of 85 % at the highest concentration (10^{-3} M). Tiron did not show any significant inhibition at each concentration tested except the highest one (10^{-3} M) where tiron did show a significant 90 % inhibition ($p < 0.05$; one-way ANOVA). NTA and NTP marked a linear inhibition with increasing concentrations reaching a maximum of 58 % and 50 % respectively (Figure 6-2). The NTA and NTP inhibition of the splenocyte proliferation were not statistically significant before they reached 10^{-3} and 10^{-4} M respectively ($p < 0.05$; one-way ANOVA). The obtained dose-response relationships were fitted using Eq. 6.3 and the obtained EC_{50} are presented in Table 6-1.

Table 6-1. EC₅₀ threshold values of the different splenocyte proliferation test for the control, corrective and protective assays with the resulting improvement ratio.

Treatment	Chemical	-Log(EC ₅₀) *		Improvement ratio [‡]
Control	Be-Con	6.2	± 0.1	
	NTA-Con	3.8	± 0.6	
	NTP-Con	2.4	± 0.4	
	Tiron-Con	3.6	± 0.5	
Corrective	Be-NTA	3.6	± 0.9	398 [†]
	Be-NTP	2.8	± 0.1	2521 [†]
	Be-tiron	3.3	± 0.2	794 [†]
Protective	NTA-Be	5.5	± 0.9	5.0
	NTP- Be	6.1	± 0.1	1.3
	Tiron- Be	6.2	± 0.1	1.0

* means ± standard deviation of three replicate of the dose-response assays.

[†] Significant variation ($p < 0.05$)

[‡] (treatment EC₅₀ / beryllium control EC₅₀)

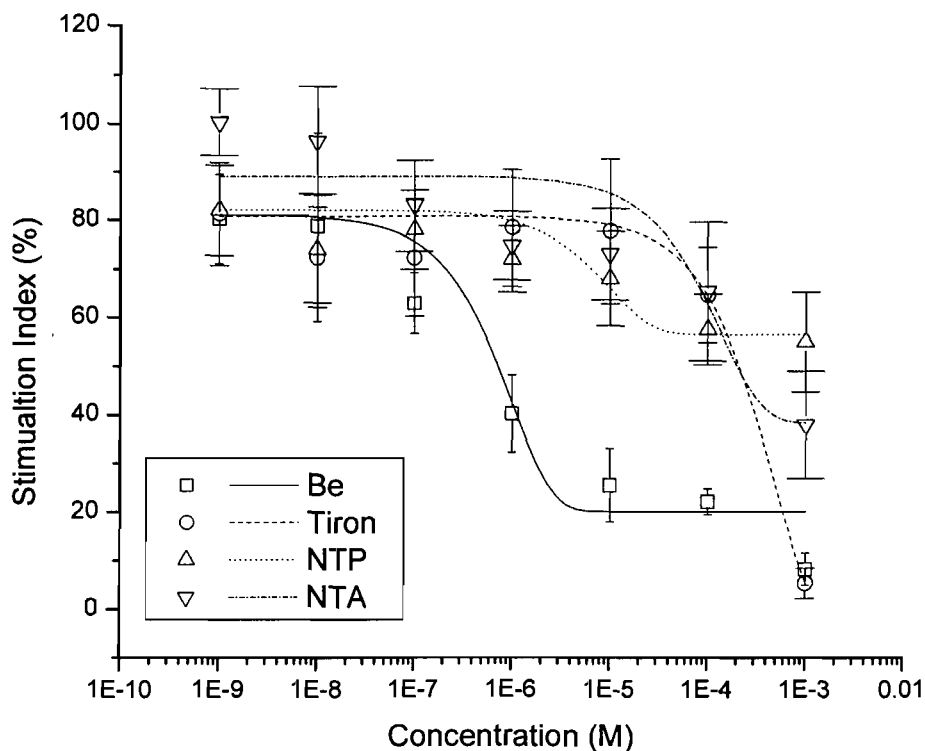


Figure 6-2. Control SPT dose-response curves performed on pre-incubated (20 h) splenocytes showing the inhibition of splenocytes expressed in stimulation index as a function of increasing concentrations of the different chemicals.

6.4.2.2 Corrective effect

All three complexing agents stopped the inhibition of splenocyte proliferation caused by beryllium at almost all the concentrations tested except 10^{-3} M, where significant inhibitions were noted ($p < 0.05$; one-way ANOVA) : 90, 50 and 30 % for tiron, NTA and NTP, respectively (Figure 6-3). No significant changes were found between the control curves (Figure 6-2) and the obtained corrective dose-response curves (Figure 6-3), fitted

using Eq. 6.3 for NTA and NTP and Eq. 6.4 for tiron (hormesis at 10^{-7} M). The obtained EC_{50} values are in good agreement with the control values. These findings show that splenocyte washing eliminates most of the beryllium from the culture medium and that the remained beryllium (either absorbed or adsorbed by/on the splenocytes) is complexed by the ligands, which prevented the beryllium from exerting its inhibition effect (Table 6-1).

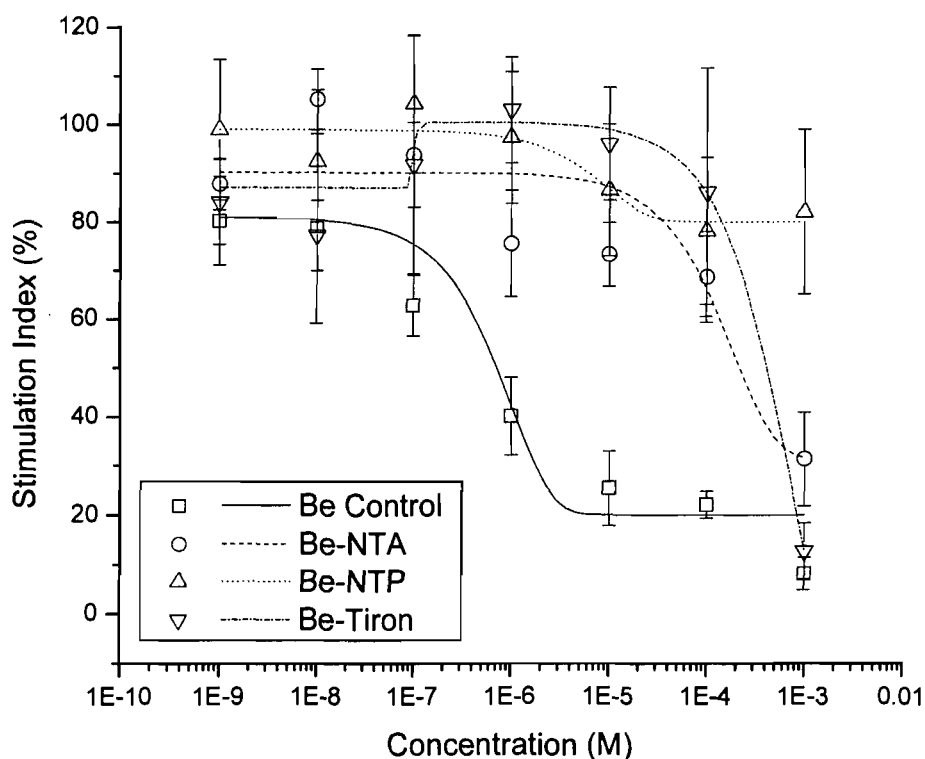


Figure 6-3. L-SPT dose-response curves performed on beryllium (10^{-5} M) pre-exposed splenocytes showing the potential corrective effect of the three ligands expressed as a stimulation index as a function of increasing ligand concentration.

6.4.2.3 Protective effect

Only splenocytes pre-exposed to NTP and tiron showed a significant reduction in the beryllium inhibition at both 10^{-9} and 10^{-8} M ($p < 0.05$; one-way ANOVA). Splenocytes pre-exposed to NTP showed a dose-response curve marked by a stimulation of 20 and 5 % at 10^{-9} and 10^{-8} M, respectively. On the other hand, the dose-response curve of splenocytes pre-exposed to tiron showed a stimulation of 15 % followed by an inhibition of 5 % at 10^{-9} and 10^{-8} M, respectively. Splenocytes pre-exposed to NTA did not show any deviation from the beryllium control dose-response curve (Figure 6-4). The obtained EC_{50} values for the different ligands did not show significant differences from the beryllium control (Table 6-1). This suggests that splenocyte washing eliminated most of the ligands from the culture medium, and only small quantities of NTP and tiron were absorbed by or adsorbed onto the splenocytes and may have caused this protection at the lowest two beryllium doses.

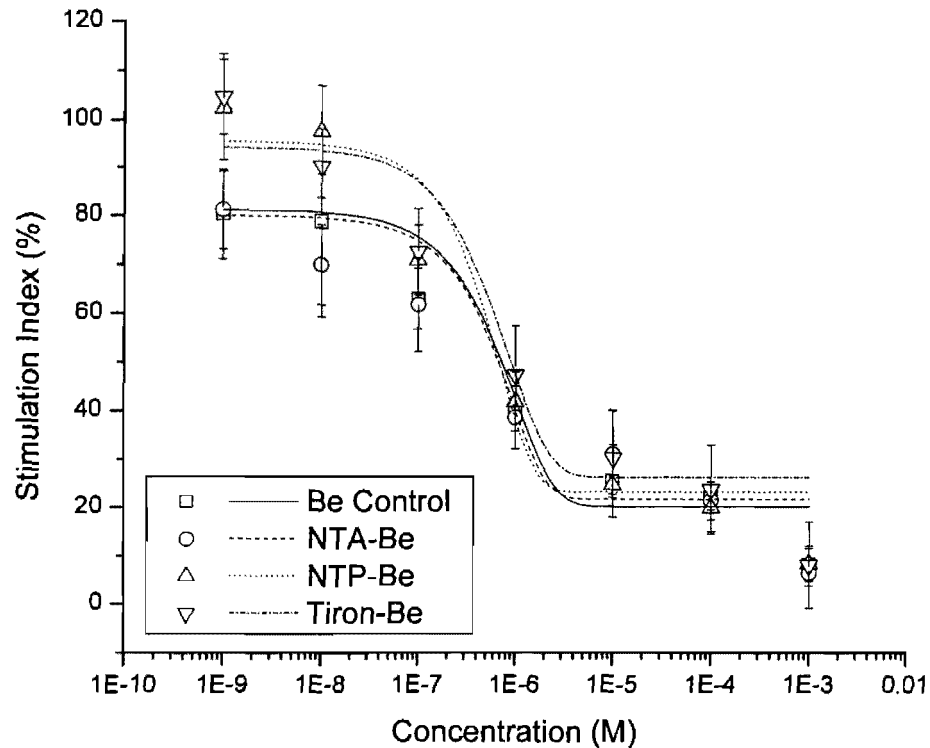


Figure 6-4. Be-SPT dose-response curves performed on ligand (10^{-5} M) pre-exposed splenocytes showing the potential protective effect of the three ligands expressed in stimulation index as a function of increasing beryllium concentration.

6.4.2.4 Combined effect

At fixed (Be:L) ratio of (1:2), tiron and NTP showed a significant shift ($p < 0.05$; one-way ANOVA) in the EC_{50} towards higher beryllium concentrations while NTA did not show any shift (Figure 6-5). These observed shifts in EC_{50} values were marked by an improvement ratio of 8 for both NTP and tiron (Table 6-2).

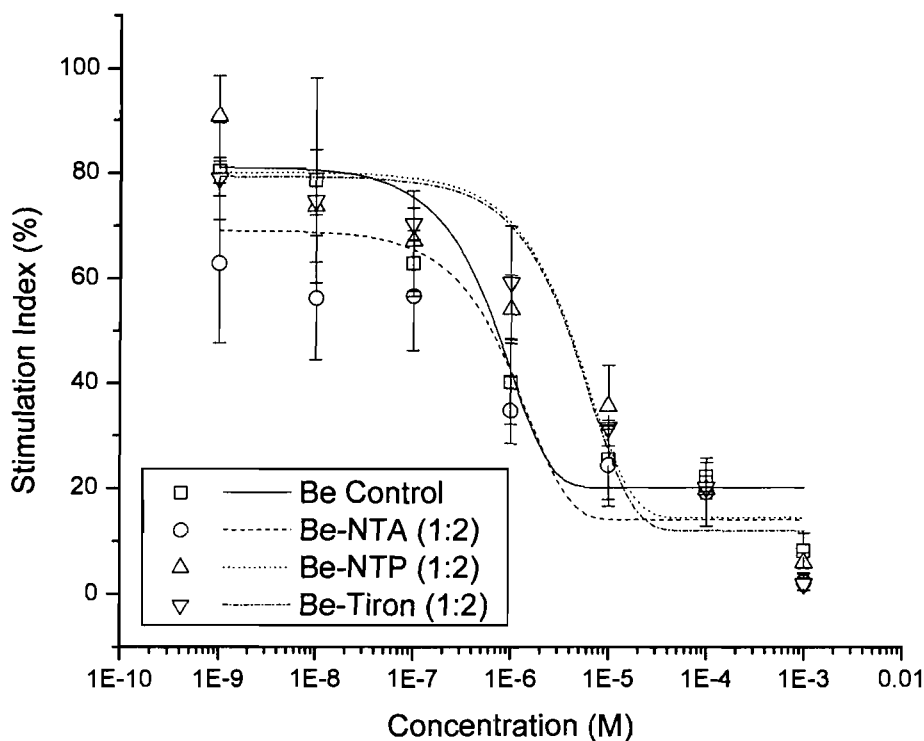


Figure 6-5. SPT dose-response curves performed on pre-incubated (20 h) splenocytes showing the combined effect of beryllium with each of the three ligands independently expressed in stimulation index as a function of increasing beryllium concentration in a fixed Be:L ratio of (1:2).

In the second combined effect experiment (at fixed [L]), significant improvements were obtained in the EC_{50} values as compared to the beryllium control. The presence of NTP resulted in an improvement ratio of 63, while NTA and tiron produced an improvement ratio of 79 and 200 respectively (Table 6-2). From the Figure 6-6, one can

conclude that beryllium complexation with any of these ligands prevented the inhibition of splenocytes. This inhibition does not resume until the beryllium concentration exceeds that of the ligand in the culture medium.

In the last combined effect experiment (at fixed [Be]), significant shifts in the EC₅₀ values towards higher concentrations were obtained for all three ligands (Figure 6-7). From the curve pattern of all three ligands in the low ligand concentration range (10⁻⁹ to 10⁻⁷ M), there were no significant differences between the obtained stimulation indexes and those of the beryllium control. At higher ligand concentrations, more specifically when the ligand concentrations exceed that of beryllium in the culture medium, deviations from the beryllium control curve confirm that beryllium complexation with the ligands stops its inhibition. An improvement ratio of 398 was observed for both NTA and tiron and a 1258 for NTP (Table 6-2). The combined experiments data were analyzed by Loewe additivity, for dose additivity and Bliss independence for the independence criterion (Table 6-3). All three ligands in the three different combined experiments resulted in a Loewe antagonism. Similarly, all three ligands in the three different combined experiments resulted in a Bliss antagonism except NTA in the fixed ratio experiment where a Bliss synergism was obtained.

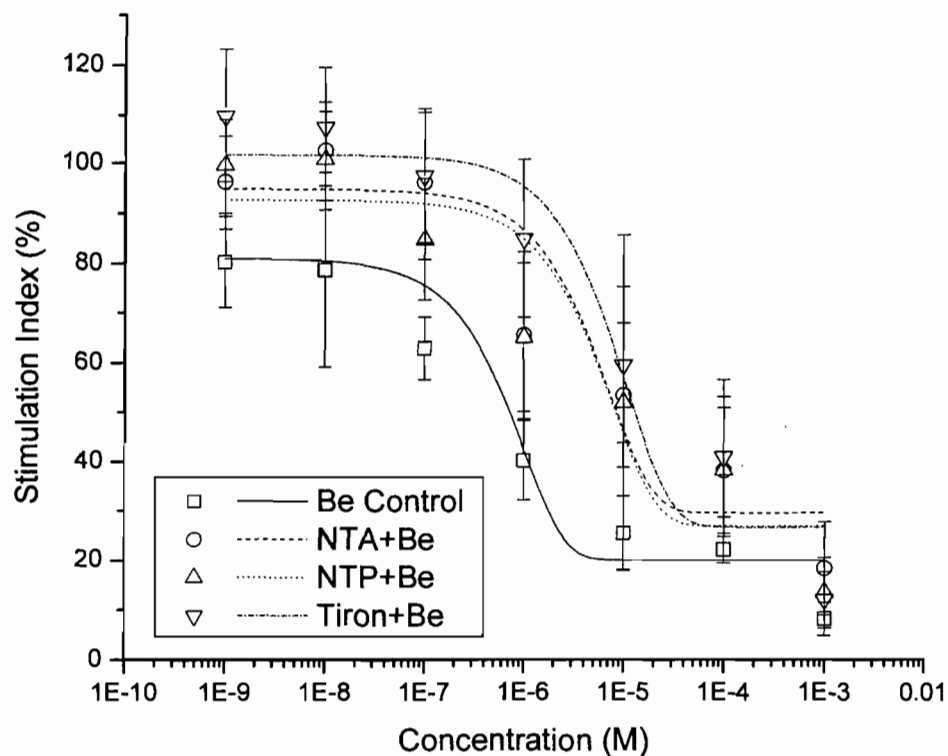


Figure 6-6. Be-SPT dose-response curves performed on pre-incubated (20 h) splenocytes showing the combined effect at fixed ligand concentration (10^{-5} M) (each ligand independently) expressed in stimulation index as a function of increasing beryllium concentration.

Table 6-2. EC₅₀ threshold values of the different splenocyte proliferation tests for the combined assays with the resulting improvement ratio.

Treatment	Chemical	-Log(EC ₅₀) *		Improvement ratio [‡]
Fixed ratio	NTA+Be	6.2	± 0.2	1
	NTP+Be	5.3	± 0.3	8 [†]
	Tiron+Be	5.3	± 0.2	8 [†]
Fixed [Be]	NTA+Be	3.6	± 0.9	398 [†]
	NTP+Be	3.1	± 0.1	1258 [†]
	Tiron+Be	3.6	± 0.4	398 [†]
Fixed [ligand]	NTA+Be	4.3	± 0.9	79 [†]
	NTP+Be	4.4	± 0.4	63 [†]
	Tiron+Be	3.9	± 0.5	200 [†]

* Means ± standard deviations of three replicate of the dose-response assays.

† Significant variation (p < 0.05)

‡ (treatment EC₅₀ / beryllium control EC₅₀)

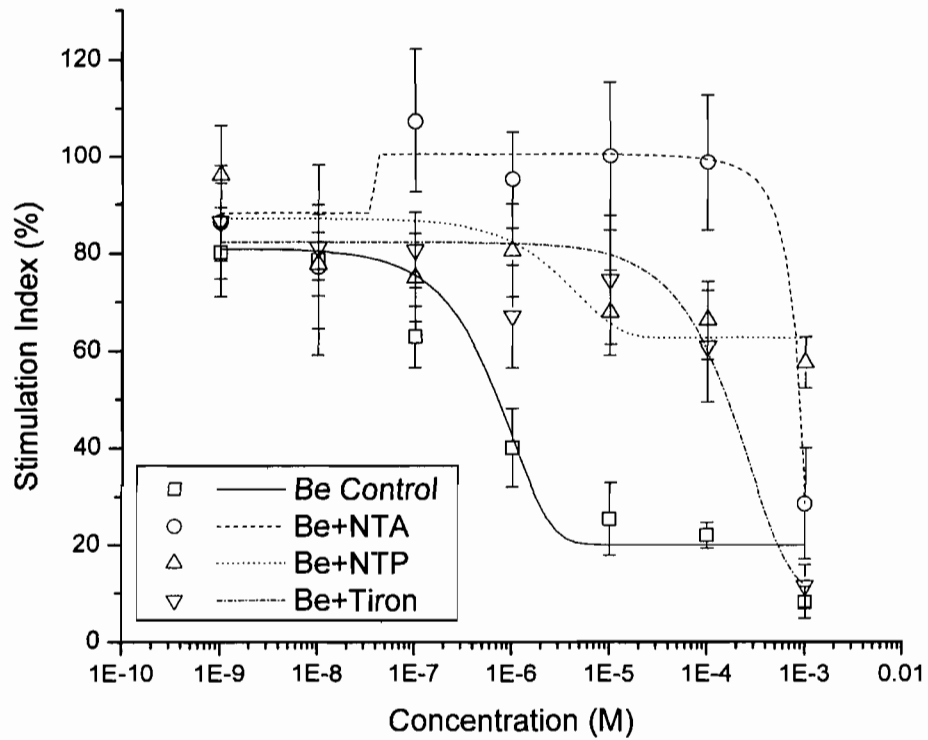


Figure 6-7. Be-SPT dose-response curves performed on pre-incubated (20 h) splenocytes showing the combined effect at fixed ligand concentration (10^{-5} M) (each ligand independently) expressed in stimulation index as a function of increasing beryllium concentration.

Table 6-3. Results of Loewe additivity and Bliss independent for the combined assays of splenocyte proliferation test.

	Chemical	Loewe		Bliss*		
		Interaction	Effect	Inhibition (expected)	Inhibition (measured)	Effect
Fixed Ratio	Be-NTA	3.40	Antagonism	0.64	0.70	Synergism
	Be-NTP	4.04	Antagonism	0.68	0.41	Antagonism
	Be-tiron	4.14	Antagonism	0.63	0.30	Antagonism
Fixed [Be]	Be-NTA	870	Antagonism	0.64	-0.27	Antagonism
	Be-NTP	1286	Antagonism	0.68	0.28	Antagonism
	Be-tiron	437	Antagonism	0.63	0.37	Antagonism
Fixed [Ligand]	Be-NTA	228	Antagonism	0.64	0.29	Antagonism
	Be-NTP	283	Antagonism	0.68	0.09	Antagonism
	Be-tiron	271	Antagonism	0.63	0.09	Antagonism

*Bliss independent calculations made at 10^{-6} M⁻¹.

6.4.2.5 Sensitization effect

A 400 improvement ratio was measured when a Be-SPT was performed on splenocytes that were pre-exposed to beryllium. This shift towards a higher EC₅₀ value confirms that pre-exposure to beryllium sensitized the mouse splenocytes which tend to proliferate upon a second exposure. Splenocytes were stimulated at concentrations ranging from 10⁻⁸ to 10⁻⁵ M and no significant inhibition was expressed before 10⁻⁴ M (Figure 6-8). On the other hand, splenocytes exposed to a 1:2 mixture of beryllium:tiron did not show an improved resistance against beryllium inhibition. On contrary, the EC₅₀ significantly decreased with a ratio of 0.032 and the obtained dose-response suggest that beryllium chelation with tiron stops its recognition by the splenocytes, which may therefore eliminate the beryllium sensitization effect.

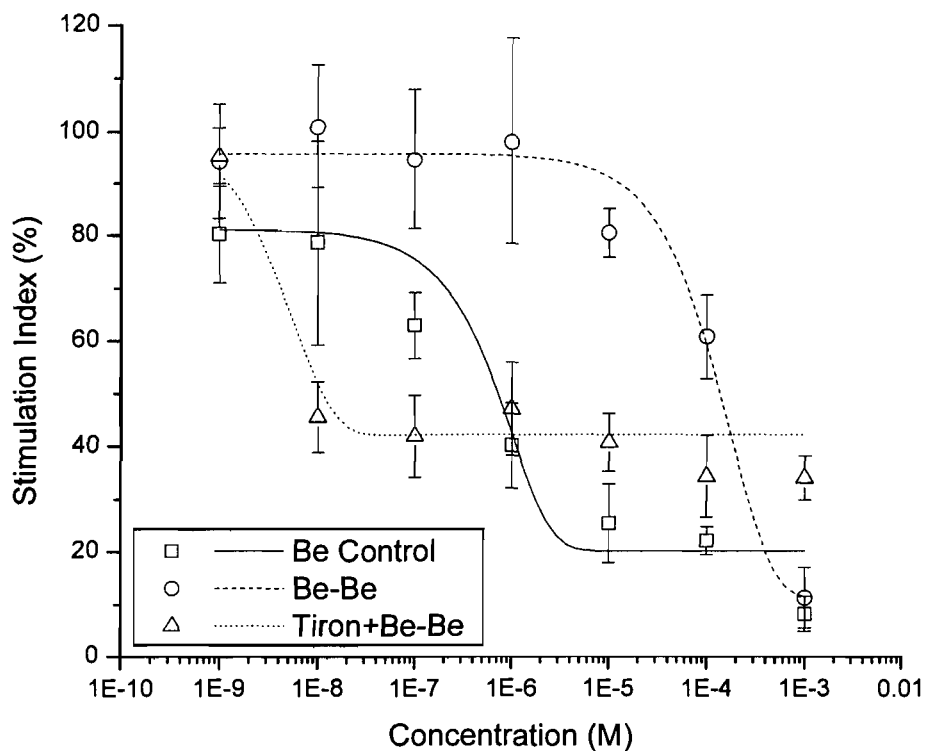


Figure 6-8. L-SPT dose-response curves performed on pre-incubated (20 h) splenocytes showing the combined effect at a fixed beryllium concentration (10^{-5} M) expressed in stimulation index as a function of increasing ligand concentration (each ligand independently).

6.5 Discussion

In this work, multiple SPT protocols were conducted on mouse splenocytes to study the corrective, protective and combined effects of three complexing agents (NTA, NTP and tiron) on the beryllium inhibition of the splenocyte proliferative response and to investigate the effect of tiron in preventing the beryllium splenocyte sensitization effect. Beryllium

sensitizes mouse splenocytes at low concentrations ($< 10^{-8}$ M) and inhibits them at concentrations higher than 10^{-7} M (Price and Skilleter, 1985). The 20 h pre-exposure/pre-incubation period did not influence splenocyte viability (95 % to 99 %) and found no significant differences between the pre-exposed (to Be, NTA, NTP and tiron independently) and pre-incubated (no chemicals) splenocytes ($p > 0.05$; one-way ANOVA). The viability was also measured after the 48-h incubation in a Be-SPT or L-SPT and no significant changes were observed between the positive control (no chemicals) and the range of chemical concentrations in the different SPTs (Be-SPT and L-SPT) ($p > 0.05$; one-way ANOVA - Figure 6-1). These findings reveal that any change in the proliferative response of the splenocytes (inhibition or stimulation) could be attributed to the effect of the chemical added to the culture medium and to the changes in splenocyte viability. All three ligands, NTA, NTP and tiron did not influence the proliferation of splenocytes up to the highest concentration (10^{-3} M) while beryllium continuously inhibited the splenocyte proliferation with an EC_{50} of $6.3 (\pm 0.8) 10^{-7}$ M (Figure 6-2). A positive treatment (therapeutic) will induce a shift in the EC_{50} towards a higher value while treatment efficiency was calculated from the deviation of EC_{50} values (control vs treatment) and was noted as an improvement.

In the corrective effect SPTs, all three chelators, NTA, NTP and tiron, showed a positive response by stopping beryllium inhibition of the mouse splenocyte proliferation (Figure 6-3). The similarity between the obtained dose-response curves and those of the chelator controls suggest that all three chelators are able to complex the residual beryllium that remained after the cellular wash either through an intracellular accumulation or by simple adsorption. This is also supported by the observation of an intracellular accumulation of Be(II) that is recognized to inhibit cell division (Price and Skilleter, 1985).

In the protective effect SPTs, only NTP and tiron were shown to be efficient in reducing the beryllium inhibition at low concentrations (10^{-9} and 10^{-8} M) while NTA did not (Figure 6-4). The experimental design might have caused a certain quantity of NTP and

tiron to be absorbed into or adsorbed onto the cells, thus overcoming the washing procedure. Those retained ligands would then have been able to complex the beryllium ions in the culture medium. This is supported by the return of the inhibition effect at higher beryllium concentrations. The inability of NTA to protect the mouse splenocytes from the beryllium inhibition is either because it is not accumulated or adsorbed by the cells or because beryllium complexation with NTA is not strong enough to stop its interaction with the splenocytes.

For the combined effect at a fixed Be:L ratio (1:2), tiron and NTP shifted the beryllium inhibition of the splenocyte proliferative response towards higher EC_{50} values, thus generating a significant improvement ratio whereas NTA did not show any improvement (Figure 6-5). These findings confirm that beryllium complexation with NTA is not strong enough to prevent the interaction of Be with the splenocytes while complexation with NTP and tiron is efficient.

In the combined experiment (at fixed [L]), all three ligands reduced the beryllium splenocyte inhibition effect (Figure 6-6). Tiron came first followed by NTA and NTP with respective improvements ratios of 200, 79 and 63. In the last combined experiment (at fixed [Be]), all three ligands also reduced the beryllium splenocyte inhibition. NTP offered a better protection than tiron at low concentrations ($< 10^{-5}$ M) while they shared the same effect at a higher concentrations (Figure 6-7). This is due to the complexation stoichiometry since it only takes one mole of NTP to complex one mole of beryllium while it takes two moles of tiron (China *et al.*, 1995; Sharma and Shukla, 2000). The deviation of the treatment dose-response curves from that of the beryllium control increases as a function of the concentration of NTP and tiron. NTA eliminates the inhibition effect of beryllium with a small stimulation observed at $6.5 (\pm 0.5) \cdot 10^{-7}$ M.

The treatment dose response curves more or less followed the chelator control patterns, suggesting that the beryllium splenocyte inhibition stops once the chelator is added to the culture medium. Overall, from the three combined experiments, we can note

that all three ligands reduced the beryllium inhibition of the splenocyte proliferative response. This resulted in an antagonist effect for all three ligands except for NTA in the fixed ratio combined experiment where a Bliss synergism was noted (Table 6-3).

In the sensitization effect experiment, splenocytes pre-exposed to beryllium showed a better defense against the inhibition effect of beryllium. The response of the beryllium-exposed splenocytes confirms that splenocytes exposed to beryllium will be sensitized and will therefore be stimulated upon a second exposure. Splenocytes pre-exposed to a beryllium-tiron mixture ratio (1:2) did not show any stimulation during the Be-SPT and the corresponding dose-response curve resembles that of the beryllium control. These observations suggest that tiron complexes the beryllium ion and prevents it from interacting with the splenocytes thus preventing their sensitization to beryllium.

We can infer that chelation therapy is a promising approach to stop or at least reduce beryllium toxicity (prevention and treatment). The effectiveness of the chelation therapy will be affected by three major ligand requirements; low toxicity, high selectivity and high affinity towards beryllium. Many examples can be taken from the literature about the effectiveness of chelation therapy, especially for iron (Sanchiz *et al.*, 1997; Breuer *et al.*, 2000; Breuer *et al.*, 2001) and lead (Cory-Slechta, 1988; Sanchiz *et al.*, 2002) intoxication.

6.6 Conclusion

Treatment of berylliosis or CBD by chelation therapy using appropriate complexing agents seems a promising approach. The complexing agents should selectively complex the beryllium ion and compete against cellular receptors (HLA-DP alleles). The efficiency of the chelation treatment strongly depends on the affinity (binding constant) of the complexing agent towards beryllium. Tiron and NTP proved to be more effective than NTA

in lowering beryllium toxicity in almost all the SPTs protocols. We attribute the higher effectiveness of tiron and NTP to their high affinity towards the beryllium ion that is 10^7 higher than that of NTA. Further work is needed to evaluate how the results we observed for the response of mouse splenocyte cells are transferable to the response of human lymphocyte cells.

6.7 Acknowledgment

We thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Institut de Recherche Robert-Sauvé en Santé et en Sécurité du Travail for financial support.

Chapitre 7

Graphite furnace atomic absorption spectrometry as a routine method for the quantification of beryllium in blood and serum

Stephan, C. H., Fournier, M., Brousseau, P., and Sauvé, S. (2008). Graphite furnace atomic absorption spectrometry as a routine method for the quantification of beryllium in blood and serum. *Chemistry Central Journal*. Sous presse.

7.1 Abstract

A routine method for the quantification of beryllium in biological fluids is essential for the development of a chelation therapy for Chronic Beryllium Disease (CBD). We describe a procedure for the direct determination of beryllium in undigested micro quantities of human blood and serum using graphite furnace atomic absorption spectrometry. Blood and serum samples are prepared respectively by a simple 8-fold and 5-fold dilution with a Nash Reagent. Three experimental setups are compared: using no modifier, using magnesium nitrate and using palladium/citric acid as chemical modifiers. In serum, both modifiers did not improve the method sensitivity. The optimal pyrolysis and atomization temperatures are 1000°C and 2900°C, respectively. The method detection limit is 2 ng L⁻¹, the characteristic mass is 0.22 (± 0.07) pg and an accuracy of 97.5 (± 2.5) %. In blood, 6 µg of magnesium nitrate was found to improve the method sensitivity. The optimal pyrolysis and atomization temperatures are 800 °C and 2800 °C respectively. The detection limit is 7 ng L⁻¹, the characteristic mass is 0.20 (± 0.02) pg and an accuracy of 100 (± 1) %.

7.2 Introduction

Beryllium is the 35th most abundant element in the earth's crust, with an average of 6 mg kg⁻¹ (Schmidt and Dietl, 1987). It has unique physical and chemical properties that improves the characteristics of alloys producing greater tensile strength, high electrical and thermal conductivity, along with good corrosion and fatigue resistance (USEPA, 1998a). Beryllium and its metal alloys have been widely used for electrical equipment, electronic instrumentation, structural components for aircraft, missiles, satellites and nuclear reactors (Okutani *et al.*, 1993; Manahan, 2000).

Beryllium and its compounds are very toxic. They can cause chronic beryllium disease (CBD), a lung disorder initiated by an electrostatic interaction with the MHC class II human leukocyte antigen (HLA) (Fontenot *et al.*, 2001). Recent molecular epidemiological studies found a significant correlation between the risk of developing CBD and the predicted surface electrostatic potential of the HLA-DP alleles, suggesting that individuals who carry the most negatively charged alleles are at greater risk of beryllium sensitization and CBD (McCanlies *et al.*, 2003). Because of these findings, increased research efforts are being targeted towards the development of a CBD treatment by chelation therapy (Seiler *et al.*, 1988; Wong and Woollins, 1994). For that purpose, a routine method is required to analyse beryllium in micro samples of biological fluids with high sensitivity, accuracy, and low detection limits.

The commonly used methods for the determination of beryllium in tissues and urine include fluorometric (Claude *et al.*, 1961; Garcia *et al.*, 1987), gas chromatographic (Ross and Sievers, 1968; Taylor and Arnold, 1971; Wolf *et al.*, 1972; Ross *et al.*, 1977), atomic emission (Fleet *et al.*, 1970; Minoia *et al.*, 1990; Rahil-Khazen *et al.*, 2000), inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (Forrer *et al.*, 2001a; Forrer *et al.*, 2001b; Gouille *et al.*, 2005; Heitland and Koster, 2006) and atomic absorption (Steifel *et al.*, 1980b; Zorn *et al.*, 1986; Paschal and Bailey, 1986; Peng and Kuo, 2000). Fluorometric methods

are sensitive (Be detection limit of $5 \sim 10 \mu\text{g L}^{-1}$) (Garcia *et al.*, 1987) but require extensive sample preparation, derivatization and relatively large sample volumes. Gas chromatographic methods have sufficient sensitivity and selectivity when coupled with mass spectrometry (Be detection limit of $30 \sim 40 \mu\text{g L}^{-1}$) (Ross *et al.*, 1977), but they require a laborious, multi-step derivatization. Atomic emission, either arc emission or inductively coupled plasma emission are sensitive and accurate (Be detection limit of $0.2 \sim 1 \mu\text{g L}^{-1}$) (Minoia *et al.*, 1990), but often require large sample volumes and multi-steps preparation often including digestion. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) recently became the method of choice for biomonitoring trace elements in biological matrices (blood, plasma, urine, etc). It is a multi-elementary method that offer outstanding sensitivity, accuracy and detection limit in the low ng L^{-1} with a reported beryllium detection limit in the range of 5 to 20 ng L^{-1} depending on the matrix (Gouille *et al.*, 2005). As for the atomic absorption methods, graphite furnace atomic spectrometry (GF-AAS) with a suitable chemical modifier (such as, lutetium (Burguera *et al.*, 1999), ammonium 12-molybdophosphate (Xiao-Quan *et al.*, 1989), palladium (Wei-Min and Zhe-Ming, 1994) and magnesium nitrate (Paschal and Bailey, 1986)) has been widely used for the analysis of beryllium in urine, environmental samples and tissue digests with detection limits in the range of 2 to 20 ng L^{-1} . Limited work is published on the determination of beryllium in human serum, blood or biological fluids. The objective of this study is to develop a simple procedure for the direct determination of beryllium in undigested micro quantities of human blood and serum using GF-AAS as a routine analytical method. The analyses were performed by simple 5-fold and 8-fold dilution of the serum and blood respectively with a Nash reagent (NR) containing nitric acid, ammonium hydroxide, Triton X-100, antifoam B and EDTA (Barany *et al.*, 1997; Heitland and Koster, 2006). We also compared three different experimental setups: using no modifier, using magnesium nitrate and using palladium/citric acid (reduced palladium) as chemical modifiers in order to study their effect on beryllium quantification in such complex matrices. We selected magnesium nitrate, known to improve beryllium sensitivity by a factor of 1.5 to 2 in matrices rich in

halide ions (e.g. urine and environmental samples (Paschal and Bailey, 1986; Xiao-Quan *et al.*, 1989)) and reduced palladium, one of the commonly-used modifiers in GF-AAS analysis known to stabilize the atomization process regardless of the matrix complexity (Voth-Beach and Shrader, 1987; Penninckx *et al.*, 1992; Alexiu and Vladescu, 2005) were evaluated. Optimal pyrolysis and atomization conditions, detection limits and characteristic mass (the mass of element generating 0.0044 absorbance) were determined in order to develop a rapid and precise method for beryllium analysis in human blood and serum. The accuracy of the analytical method is tested with a control sample (Seronorm trace elements whole blood (STEWB) Level 2).

7.3 Experimental

7.3.1 Instrumentation

A Varian AA280Z Zeeman atomic absorption spectrometer, equipped with a Zeeman background corrector, a GTA 120 graphite tube atomizer and a PSD 120 programmable sample dispenser was used for the atomic absorption measurement of beryllium at 234.9 nm with a spectral band width of 1.0 nm. A beryllium hollow cathode lamp (Varian, Part No. 5610100500) was used as a light source operated at 5 mA. Pyrolytic graphite-coated partitioned tubes (Varian partition tubes, Part No. 63-100012-00) were used in all experiments. High purity argon (99.99 %) was used as the carrier gas. Instrument control, sample results, signal graphics and data collection are controlled by the SpectrAA Worksheet software for Windows[®] XP operating system (Version 5.1, Varian, Australia 1997-2006). Peak areas were used for the optimisation of the furnace program, the choice of the appropriate experimental setup and the quantification of beryllium in blood and serum. The furnace programs for serum and blood analysis are listed in Table 7-1.

Table 7-1. Instrument conditions and furnace programme for the determination of beryllium.

Step	Temp (°C)	Time (s)	Argon flow rate (L min ⁻¹)
Drying	85	5	0.3
Drying	95	30	0.3
Drying	120	20	0.3
Pre-pyrolysis	450	22	0.3
Pyrolysis	1000 [†] ; 800 [‡]	17	0.3
Atomizing	2900 [†] ; 2800 [‡]	3	0
Cleaning	2900	2	0.3

[†] Serum analysis

[‡] Blood analysis

7.3.2 Reagents and solutions

All reagents are of analytical grade, unless otherwise stated. Antifoam B silicone emulsion (J.T. Baker, NJ, USA), ammonium hydroxide (certified A.C.S. Plus, Fisher scientific, NJ, USA), beryllium standard solution (Specpure, Alfa Aesar, MA, USA), palladium matrix modifier (Sigma-Aldrich, USA), ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA) (Fluka Chemika, Switzerland), nitric acid (trace metal grade, Fisher Scientific, Ontario, Canada), Triton X-100 (Acros, NJ, USA), citric acid and magnesium nitrate were purchased from Fisher-scientific (Ottawa, Ont, Canada). Seronorm

trace elements whole blood (STEWB) Level 2 (Ref # 201605; Lot # 0503109) was purchased from SERO (Billingstad, Norway).

Blood and serum samples were diluted with a Nash Reagent (NR) prepared weekly containing 5 % (v/v) nitric acid, 5 % (v/v) of ammonium hydroxide, 0.2 % (v/v) Triton X-100, 0.2 % (v/v) antifoam B and 0.5 % (w/v) of EDTA. A $50 \mu\text{g L}^{-1}$ working beryllium(II) solution was prepared by dilution of the beryllium stock solution ($1000 \mu\text{g L}^{-1}$) in 2 % (v/v) HNO_3 . Beryllium standard solution was prepared daily by dilution of the working beryllium(II) solution with the Nash Reagent to give a final concentration of $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$. A series of palladium working solutions containing 300, 600, 1000, 1200, 1500 and 2000 mg L^{-1} were prepared by dilution of the stock solution ($10\,000 \text{mg L}^{-1}$) in 2 % (v/v) HNO_3 and 2 % (w/v) citric acid aqueous solutions. Another series containing 300, 600, 1000, 1200, 1500 and 2000 mg L^{-1} magnesium nitrate was prepared by dissolving the appropriate mass in 2 % (v/v) HNO_3 aqueous solution. A 10- μL volume of the chemical modifier or Nash Reagent (when no modifier is used) was co-injected with 20- μL of the sample into the furnace.

7.3.3 Blood and serum Samples

Blood and serum samples of 10 individuals (8 females and 2 males) were collected respectively in BD Vacutaine (sodium Heparin) and BD Vacutaine (SST) respectively (BD Franklin lakes (NJ, USA)). All subjects live in the region of Montreal, Quebec, Canada with no previous history of occupational exposure to beryllium, from questionnaire-based interviews. Blood was diluted 8-fold and serum 5-fold with the Nash Reagent. Triplicates of blood and serum samples were refrigerated at 4 °C until analysis. All samples were analysed on the day of collection.

7.4 Results and discussion

7.4.1 Optimization of the furnace temperature program

Beryllium has a high boiling temperature of 2479 °C. In general, it should not be lost during the pyrolysis stage unless it is complexed with organic compounds or halide ions. In all experimental set-ups, a pre-pyrolysis stage at 450 °C was introduced in the temperature program to generate a slow pyrolysis of the blood and serum matrices. This pre-pyrolysis step was found necessary when using palladium as chemical modifier with citric acid as a reducing agent. It ensures the presence of reduced palladium at the very early stages of the temperature program (Zhuang *et al.*, 1991; Jackson and Qiao, 1992). It was also reported that the introduction of a pre-pyrolysis step in the temperature program helps the removal of smoke, especially when analysing matrices rich in organic matter (Voth-Beach and Shrader, 1987). In an attempt to optimize the temperature program for beryllium determination in serum, we first measured the relative absorbance of beryllium in a 5-fold diluted non spiked serum at a fixed atomization temperature (2900 °C) while varying the pyrolysis temperature from 700 to 1400 °C. We found that the optimal pyrolysis temperature generating the highest beryllium signal was 1000 °C. We then fixed the pyrolysis temperature at its optimal temperature and varied the atomization temperatures between 2300 and 2900 °C and found that the optimal atomization temperature was 2900 °C. The background signal was decreased by 79 % when pyrolysis temperature was increased from 800 to 1000 °C. The same optimization work was reproduced for beryllium in an 8-fold diluted non spiked blood. The optimal pyrolysis temperature was found to be 800 °C while the optimal atomization temperature was found at 2800 °C. Background signal decreased by 48 % when we ramped the pyrolysis temperature from 800 to 900 °C but the beryllium absorbance also decreased by 10 %. Figure 7-1 shows the complete pyrolysis and atomization diagram of beryllium in serum and blood.

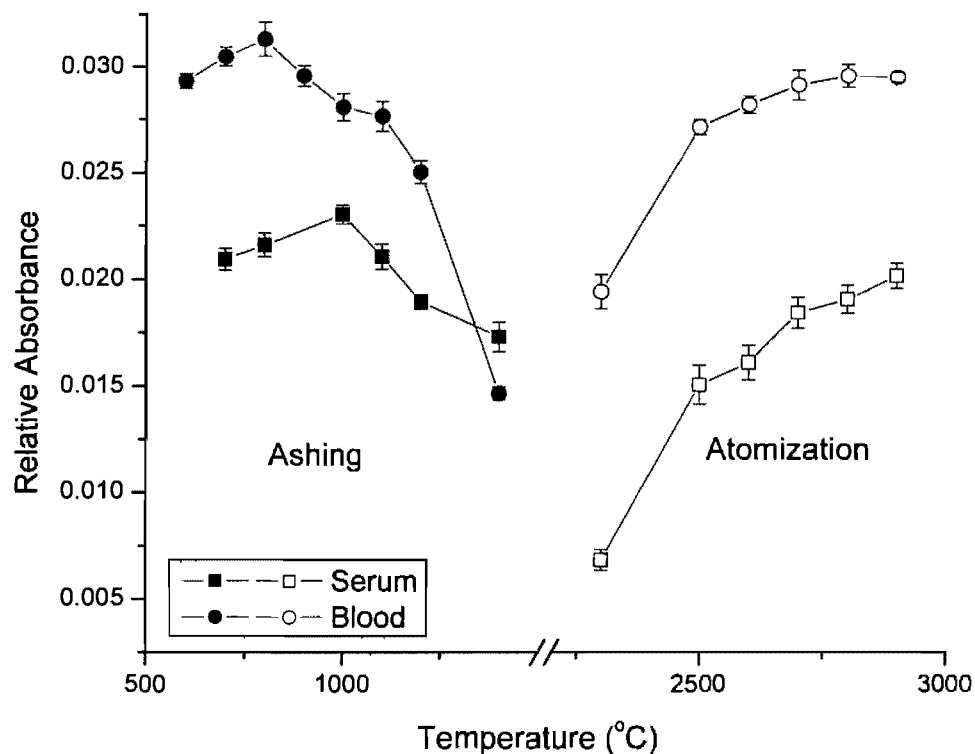


Figure 7-1. Thermal pre-treatment pyrolysis and atomization curves for 5-fold diluted, non spiked serum and 8-fold diluted, non spiked blood without the addition of any chemical modifier.

7.4.2 Palladium/citric acid as a chemical modifier

Reduced palladium is an excellent modifier for GFAAS. It decreases matrix interferences, prevents elements vaporization during pyrolysis. It also generates a reproducible signal at high atomization temperatures due to the formation of Pd-metal

compound (Styris *et al.*, 1991a; Styris *et al.*, 1991b; Volynsky and Kryvan, 1996). We used citric acid as a reducing agent over ascorbic acid in order to eliminate excess injection. Ascorbic acid needs to be prepared and injected separately because it instantly reduces the palladium at room temperature while nitric acid only reduces palladium at higher temperatures (Zhuang *et al.*, 1991). At their respective optimal pyrolysis and atomization temperatures, 10 μL of the working palladium/citric acid solutions was co-injected with 20 μL of either 5-fold diluted serum or 8-fold diluted blood. For beryllium in serum, no statistically significant changes (one-sample T-test, $p > 0.05$) were noticed in the relative absorbance when 3 or 6 μg of palladium were introduced in the graphite furnace (an increase of 1.8 and 1.9 % respectively). In contrast, the relative absorbance of beryllium continuously decreased when higher amounts of palladium were tested reaching a 14 % reduction at 20 μg (Figure 7-2). The background signal increased dramatically by 130 % when only 3 μg of palladium was used and continued to increase with increasing palladium mass introduced into the graphite furnace, reaching a maximum of 150 %. We also noticed a change in the appearance of a background signal on top of the beryllium signal (Figure 7-3) that kept increasing linearly with the increasing mass of palladium injected in the graphite tube ($y = 0.0091 x ; r^2 = 0.93$). For beryllium in blood, no statistically significant changes were observed in the relative absorbance measured following the addition of 3 μg of palladium, yielding a 1.6 % increase followed by a continuous decrease as the quantity of introduced palladium increased, up to an 8 % reduction at 20 μg (Figure 7-2). The background signal of blood also increased with increasing palladium quantities and had a similar pattern of that found for beryllium in serum with the appearance of a background signal on top on the beryllium signal (Figure 7-3). The increase in the background signal varied from 133 % at 3 μg , reaching a maximum of 165 % for 20 μg of injected palladium ($y = 0.0095 x ; r^2 = 0.94$). Since the obtained background signal increased linearly with an increasing mass of injected palladium into the graphite tube, it is likely that this was due the atomization of the reduced palladium itself (boiling temperature of 2963 °C). Because of the non-significant improvements in the relative absorbance and the increase in background

signal, palladium/citric acid was not retained as a chemical modifier for beryllium in blood or serum.

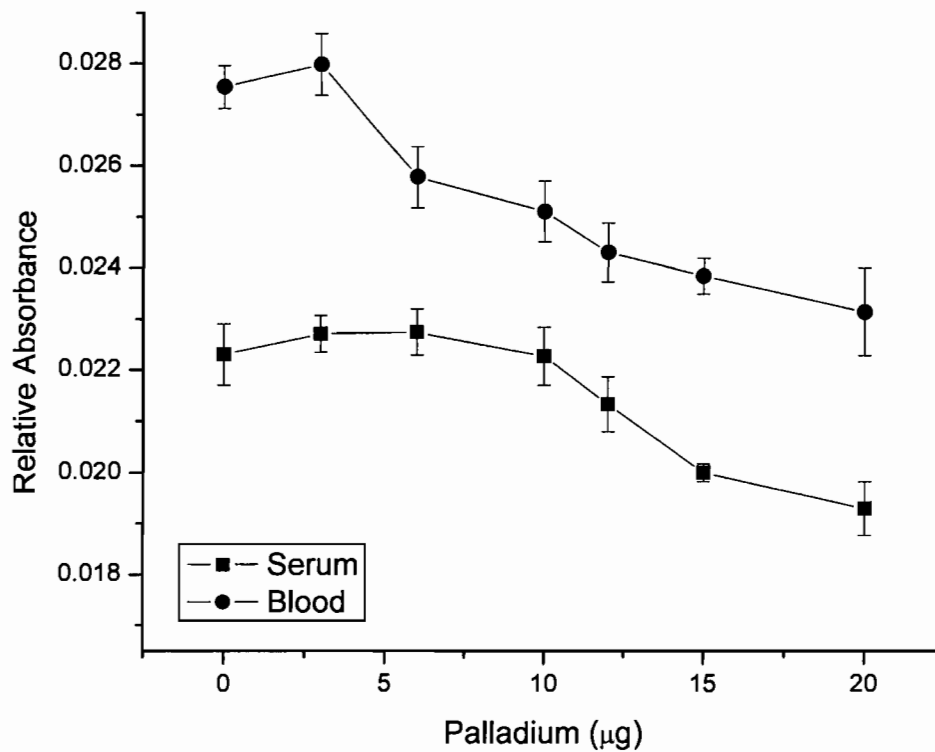


Figure 7-2. Influence of the mass of added palladium on the relative absorbance of beryllium in 8-fold diluted blood and 5-fold diluted serum samples.

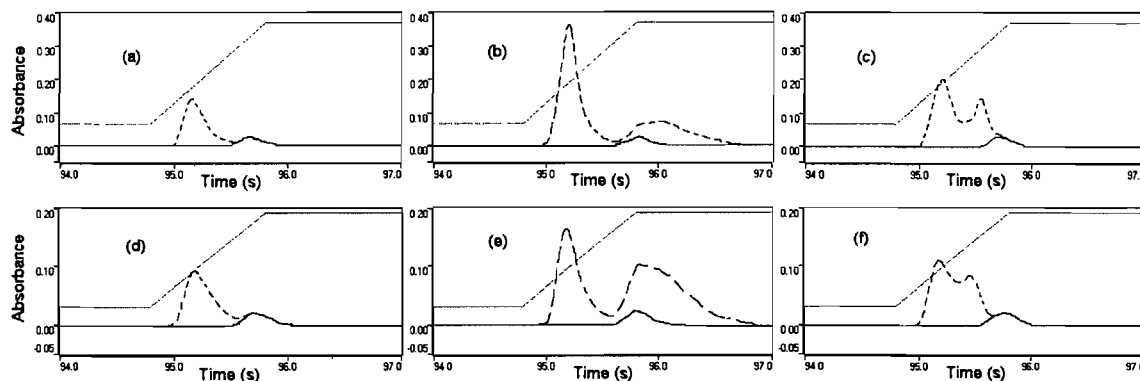


Figure 7-3. Variations in the background signal; (a) blood without modifier; (b) blood with 15 µg of palladium; (c) blood with 10 µg magnesium; (d) serum without modifier; (e) serum with 10 µg palladium; (f) serum with 12 µg magnesium.

7.4.3 Magnesium as chemical modifier

The same experimental set-up was used to study the effect of magnesium on the relative absorbance of beryllium in 5-fold diluted serum and 8-fold diluted blood samples at their optimal pyrolysis and atomization temperatures. In serum, magnesium suppressed the relative absorbance of beryllium. This suppression increased with the increasing mass of magnesium introduced into the graphite furnace and varied from 2.5 % at 3 µg to 23 % at 20 µg (Figure 7-4). The background signal increased significantly by 50 % when only 3 µg of Mg was introduced in the graphite furnace reaching a maximum of 80 % when 20 µg of Mg was used as chemical modifier. We also noticed a change in the pattern of the background signal. A second background peak was noticed at around 2000 °C (Figure 7-3), which increased linearly in intensity with increasing mass of magnesium injected into the graphite tube ($y = 0.0071 x ; r^2 = 0.93$). Such an observation confirms that the second background peak was caused by the atomization of magnesium. As for beryllium in blood, we found that the addition of magnesium nitrate as a chemical modifier tended to increase

the relative absorbance of beryllium. This increase is significant (T-test, $p < 0.05$) and reached a maximum of 12 % when 6 or 9 μg of magnesium were co-injected with the blood sample into the graphite furnace. The introduction of 3 μg also increased the relative intensity of beryllium by 6 %. At higher magnesium concentrations, the relative absorbance of beryllium tended to decrease (Figure 7-4). The background pattern was similar to that found with serum, with the appearance of a second background peak at ~ 2000 °C (Figure 7-3). The background intensity increased from 55 % to 81 % when we increased the concentration of introduced magnesium from 3 μg to 20 μg ($y = 0.0074 x$; $r^2 = 0.95$). 6- μg amount of magnesium was retained as a chemical modifier for beryllium in blood despite the increase in the background signal because it appears earlier in the temperature program and does not interfere with the beryllium signal (Figure 7-3).

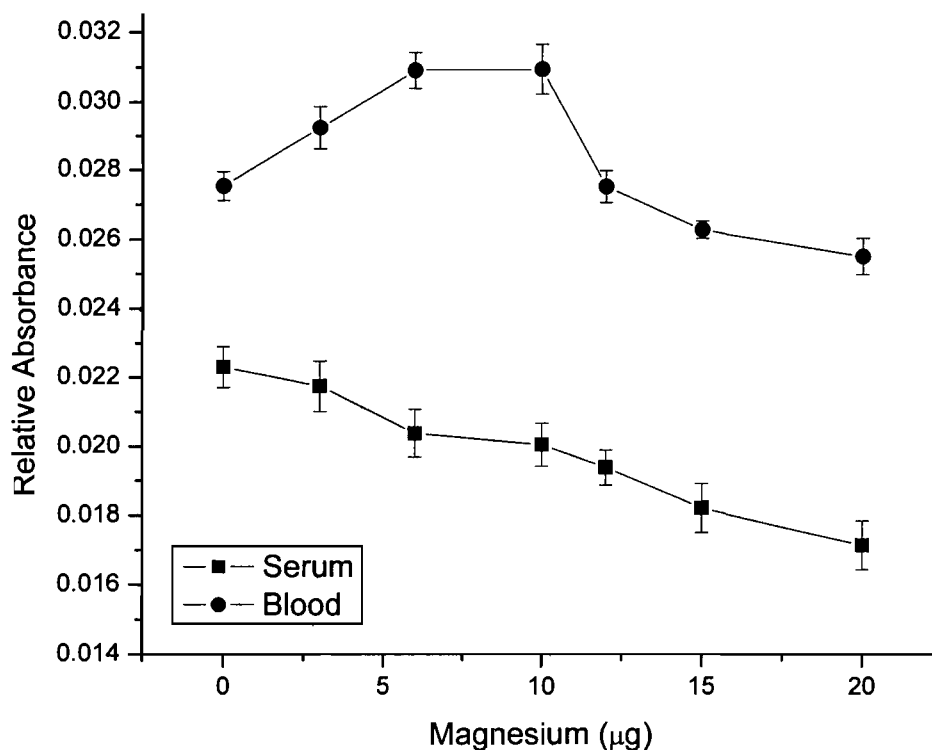


Figure 7-4. Influence of the mass of added magnesium mass on the relative absorbance of beryllium in 8-fold diluted blood and 5-fold diluted serum samples.

7.4.4 Analysis of blood

Analysing undigested blood by GFAAS could be problematic due to the build-up of carbon residues in the graphite tube. Therefore, an 8-fold dilution of blood with the Nash reagent coupled with an optimal temperature program eliminated the deposition of carbon. Neither the precision nor the sensitivity was affected after at least 100 injections, as verified by the analysis of the reconstituted blood control material (STEWB level 2). We also

performed a standard addition on the reconstituted blood control to validate the use of aqueous calibration and found no significant differences between both curves ($y = 0.0692x - 0.0019$; $r^2 = 0.99$ for the aqueous calibration and $y = 0.0682 - 0.0022x$; $r^2 = 0.99$ for the standard addition on the reconstituted blood control). Using the optimal temperature program for the 8-fold diluted blood and an aqueous beryllium standard with 6 μg of magnesium nitrate as chemical modifier, we measured the beryllium concentration in the blood of ten non-exposed individuals and found that it varied from 0.48 to 0.74 $\mu\text{g L}^{-1}$ with an average of $0.63 \pm 0.08 \mu\text{g L}^{-1}$ ($\pm\text{SD}$) (Table 7-2). We obtained a slightly lower mean beryllium concentration in blood than reported by (Steifel *et al.*, 1980b), ($0.94 \pm 0.38 \mu\text{g L}^{-1}$ ($n = 10$)). No significant differences were found between the two sets of data due to the large standard deviation reported in the previous study. Beryllium concentrations in blood of non-occupationally exposed individuals depend on a variety of factors such as smoking, eating and drinking habits, as those represent the main exposure routes for beryllium intake (ATSDR, 2002).

The method detection limit was determined as the concentration corresponding to three times the standard deviation of 8 replicates of the lowest standard ($0.05 \mu\text{g L}^{-1}$). We found a beryllium detection limit of 7 ng L^{-1} in blood. The beryllium characteristic mass was found to be 0.20 (± 0.02) pg , of the same order of magnitude as that reported by the manufacturer: 0.5 pg determined in 0.1 % nitric acid matrix. It was calculated as the mass of beryllium in 8-fold diluted blood that yields an absorbance equal to 0.0044 (1 % absorption) in the peak height mode, with a new pyrolytic coated graphite tube and under the optimal furnace temperature program (Varian, 1988). This similarity in the beryllium characteristic mass reassures us that our experimental conditions have eliminated signal suppression for the blood matrix. The accuracy of the method was verified by analysing the STEWB level 2 control sample with a beryllium concentration of 5.9 (± 0.5) $\mu\text{g L}^{-1}$. Accuracy values of four different control samples prepared by 10 or 20-fold dilution of STEWB level 2 with NR were found to be 100 (± 1) %. For the actual 10 samples we tested, neither sex nor smoking habit had a statistically significant influence on the

concentration of beryllium in blood (T-test, $p > 0.05$), but for the two smokers, data points were higher. A larger dataset would be necessary to properly explore exposure questions and may yield interesting differences.

Table 7-2. Beryllium contents in blood and serum of ten individuals. Averages of triplicate measurements with standard deviations are given.

Sample	Sex	Smoker	Blood ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Serum ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	F [†]	S [‡]	0.71 ± 0.09	0.49 ± 0.08
2	F	NS [†]	0.64 ± 0.09	0.43 ± 0.09
3	F	S	0.74 ± 0.06	0.45 ± 0.08
4	F	NS	0.67 ± 0.08	0.40 ± 0.08
5	F	NS	0.57 ± 0.06	0.46 ± 0.09
6	M	NS	0.68 ± 0.04	0.40 ± 0.05
7	F	NS	0.64 ± 0.08	0.41 ± 0.04
8	F	NS	0.67 ± 0.09	0.42 ± 0.04
9	F	NS	0.48 ± 0.06	0.43 ± 0.03
10	M [‡]	NS	0.55 ± 0.07	0.42 ± 0.06
	Mean		0.63 ± 0.08	0.43 ± 0.03

[†] Female; [‡] Male; [‡] Smoker; [†] non smoker.

7.4.5 Analysis of serum

We found that beryllium concentrations in the serum of ten non-exposed individuals, analysed under optimal temperature, using aqueous beryllium standards without any chemical modification, varied from 0.40 to 0.49 $\mu\text{g L}^{-1}$ with an average of 0.43 ± 0.03 $\mu\text{g L}^{-1}$ (\pm SD) (Table 7-2). The beryllium detection limit was found to be 2 ng L^{-1} determined as the concentration corresponding to three times the standard deviation of 12

replicates of the lowest calibration standard ($0.05 \mu\text{g L}^{-1}$). The beryllium characteristic mass in 5-fold diluted serum was found to be $0.22 (\pm 0.07)$ pg, slightly lower than that reported by the manufacturer: 0.5 pg determined in 0.1 % nitric acid matrix (Varian, 1988). This also confirms that no signal suppression was caused by the serum matrix under our experimental conditions. The accuracy of the method was verified using the same control material (STEWB level 2). We obtained an accuracy of $97.5 (\pm 2.5)$ % on four different control samples. As observed earlier for blood, no significant influence of beryllium concentration in serum is attributed to sex or smoking (T-test, $p > 0.05$).

7.5 Conclusion

We found a significant difference between the beryllium concentration in blood and serum ($p < 0.05$). We measured higher beryllium concentration in blood than in serum. On average, we noted a 30 ± 10 % increase in the blood beryllium concentration over serum. These findings suggest that roughly two thirds of the beryllium concentration in the blood stream is found in the serum and only one third is attached to the blood clot. Despite the complexity of serum and blood matrices, no signal suppression was noticed following our optimal conditions and our beryllium detection limits (2 to 7 ng L^{-1}) using the Varian AA280Z Zeeman atomic absorption spectrometer are among the lowest reported to date. (Wang *et al.*, 2001) and (Burguera *et al.*, 1999), reported a detection limit of 370 ng L^{-1} and 4.3 ng L^{-1} respectively for beryllium in urine by graphite furnace atomic absorption spectrometry. In a similar work, (Xiao-Quan *et al.*, 1989), and (Paschal and Bailey, 1986), reported a detection limit of 50 ng L^{-1} for beryllium in urine. In water, (Peng and Kuo, 2000) found 2.3 ng L^{-1} while (Cernohorsky and Kotrly, 1995), found 10 ng L^{-1} . The proposed method is ideally suited to evaluate occupational exposure and other factors contributing to beryllium risks.

7.6 Acknowledgements

We thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Institut de Recherche Robert-Sauvé en Santé et en Sécurité du Travail for financial support.

Chapitre 8

Study on the effects of nitrilotripropionic acid and 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulphonate on the fractionation of beryllium in human serum using graphite furnace atomic absorption spectrometry

Stephan, C. H., Fournier, M., Brousseau, P., and Sauvé, S. (2008). Study on the effects of nitrilotripropionic acid and 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulphonate on the fractionation of beryllium in human serum using graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Chemistry Central Journal*. doi:10.1186/1752-153X-2-10.

8.1 Abstract

8.1.1 Background

Occupational exposure to beryllium may cause Chronic Beryllium Disease (CBD), a lung disorder initiated by an electrostatic interaction with the MHC class II human leukocyte antigen (HLA). Molecular studies have found a significant correlation between the electrostatic potential at the HLA-DP surface and disease susceptibility. CBD can therefore be treated by chelation therapy. In this work, we studied the effect of two complexing agents, nitrilotripropionic acid (NTP) and 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulphonate (tiron), on the fractionation of beryllium in human serum analysed by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS).

8.1.2 Results

We found the average serum beryllium concentration of fourteen non-exposed individuals to be $0.53 (\pm 0.14) \mu\text{g L}^{-1}$, with $21 (\pm 3) \%$ of the beryllium mass bound to the low molecular mass fraction (LMM), and $79 (\pm 3) \%$ bound to the high molecular mass fraction (HMM). The addition of tiron increased the beryllium mass in the HMM fraction, while NTP was not seen to have any influence on the fractionation of beryllium between the two fractions. NTP was, however, shown to complex 94.5% of the Be mass in the LMM fraction. The beryllium GFAAS detection limit, calculated as three times the standard deviation of 10 replicates of the lowest standard ($0.05 \mu\text{g L}^{-1}$), was $6.0 (\pm 0.2) \text{ng L}^{-1}$.

8.1.3 Conclusions

The concentration of beryllium or its fractionation in human serum was not affected by sex or smoking habit. On average, three quarters of the beryllium in serum were found

within the HMM fraction. Of the two ligands tested, only tiron was effective to mobilize beryllium under physiological conditions, increasing the Be content in the HMM fraction.

8.2 Introduction

Beryllium, the first of the alkaline earth metals, is naturally found in mineral rocks, coal, soil, and volcanic dust (Wong and Woollins, 1994). Beryllium ore is mined and purified for its use in nuclear reactors, weapons, aircraft and space vehicle structures, x-ray machines, as well as telecommunication and high-tech devices (Jameson, 1996). Occupational exposure to beryllium may cause Chronic Beryllium Disease (CBD), a lung disorder characterised by a granulomatous inflammation initiated by an electrostatic interaction with the MHC class II human leukocyte antigen (HLA) (Fontenot *et al.*, 1999a; Amicosante *et al.*, 2001). Molecular epidemiological studies have shown that interaction between beryllium and specific HLA-DP alleles is a factor in disease susceptibility (Berretta *et al.*, 2003). Furthermore, molecular modelling has been used to investigate a potential mechanistic basis for these observations. A significant correlation was found between the risk of chronic beryllium disease associated with specific alleles, and the predicted electrostatic surface potential, suggesting that the alleles associated with the most negatively charged proteins carry the greatest risk of beryllium sensitisation and disease (McCanlies *et al.*, 2003).

At present, CBD can be treated but not cured. Adrenocortical steroids such as prednisone, prednisolone and dexamethasone act to reduce the inflammation and immune response to beryllium but cannot eliminate beryllium from organs or tissues, a key factor in stopping CBD (Rossman, 1996). Chelation therapy (Seiler *et al.*, 1988; Wong and Woollins, 1994; Flora *et al.*, 1995) or metal encapsulation (Kumberger *et al.*, 1992b) can eventually provide an alternative or adjunctive treatment to accelerate beryllium clearance from organs and tissues. In this work, we looked at the natural distribution of beryllium in serum and investigated the effect of two sequestering agents, nitrilotripropionic acid (NTP) and 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulphonate (tiron) (Figure 8-1), on the distribution of beryllium.

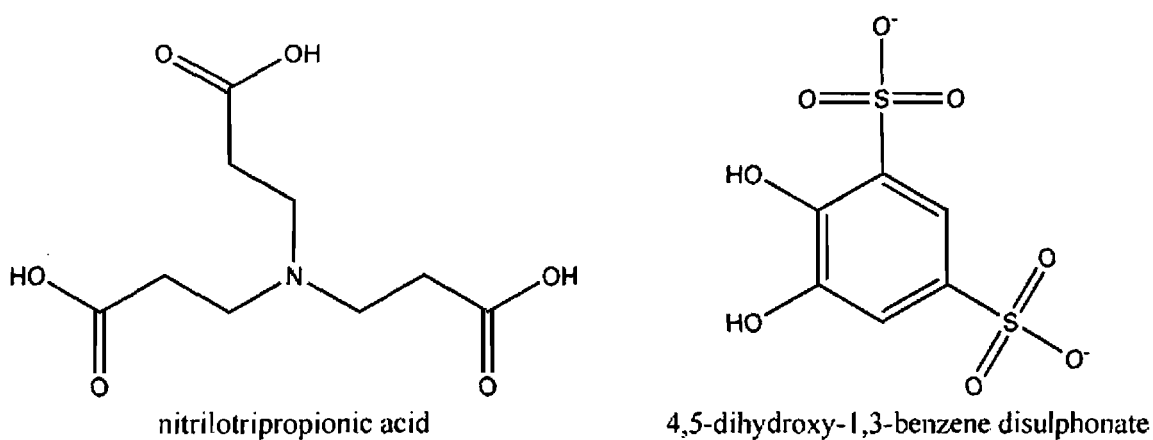


Figure 8-1. Chemical structures of nitrilotripropionic acid (NTP) and 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulphonate (tiron).

We used a mobilisation index (MI) (Jarvis *et al.*, 1995; May and Williams, 1977; Peter *et al.*, 1984) to represent the relative ability of a complexing agent to compete for the metal of interest and mobilise it under physiological conditions. The MI is defined as:

$$MI = \frac{\left(\begin{array}{l} \text{total concentration of low molecular weight beryllium} \\ \text{in the presence of the complexing agent} \end{array} \right)}{\left(\begin{array}{l} \text{total concentration of low molecular weight beryllium} \\ \text{in the absence of the complexing agent} \end{array} \right)} \quad (8.1)$$

Nitriolotripropionic acid was selected because of its physico-chemical properties: it complexes beryllium in a tetrahedral complex $[\text{Be}(\text{NTP})]^-$ where the beryllium cation lies at the centre of a slightly distorted tetrahedron of C_{3v} symmetry, with a longer Be-N bond and three equal Be-O bonds (China *et al.*, 1995). Tiron is a hydrophilic chelator and was selected because of its reported efficiency in mobilising beryllium (Sharma *et al.*, 2000; Nirala *et al.*, 2008), restoring the altered biochemical parameters (Mathur *et al.*, 1993) and improving the altered hepatorenal biochemistry and ultramorphology in different rat tissues and organs (Nirala *et al.*, 2007).

Beryllium, like any other metal ions in serum, can be fractionated into four distinct groups: rigidly bound to metalloproteins; loosely bound to other types of proteins (labile equilibrium); complexed by the so-called low-molecular-mass fraction (LMM); and occurring as free (or hydrated) metal ions (May and Williams, 1977).

In this work, we looked first at the natural distribution of beryllium in serum and the influence of either NTP or tiron on this distribution. We focused on two operationally-defined fractions; the first fraction combines the Be rigidly and loosely bound to proteins, and is called the high molecular mass fraction (HMM); while the second fraction, the low molecular mass fraction (LMM), combines the Be complexed to the low molecular-mass fraction and Be in its free ionic form. We separated the HMM and LMM fractions by ultrafiltration with Centricon centrifugal filter devices at a 10 000 nominal molecular mass limit (NMML) cut-off. Beryllium quantification in serum and serum fractions was carried out using an optimised graphite furnace atomic absorption spectrometer (GF-AAS). The accuracy of the analytical method was tested using Seronorm samples (Seronorm trace elements whole blood level 2, STEWB; Ref # 201605; Lot # 0503109).

8.3 Materials and methods

8.3.1 Reagents

All of the reagents used were of analytical grade or better. Antifoam B silicone emulsion (J.T. Baker, NJ, USA), ammonium hydroxide (certified A.C.S. Plus, Fisher scientific, NJ, USA), ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA) (Fluka chemika, Switzerland), Triton X-100 (Acros, NJ, USA), nitric acid (trace metal grade, Fisher Scientific, Ontario, Canada), beryllium plasma standard solution (Specpure, Alfa Aesar, MA, USA), nitrilotripropionic acid (NTP) (MP Biomedicals, Ohio, USA) and 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulphonate (tiron) (Acros Organics, New Jersey, USA).

8.3.2 Solutions

Serum samples were diluted with a Nash reagent (NR) solution prepared weekly and containing 5 % (v/v) nitric acid, 5 % (v/v) of ammonium hydroxide, 0.2 % (v/v) Triton X-100, 0.2 % (v/v) antifoam B and 0.5 % (w/v) of EDTA in distilled-deionised water. Solutions of NTP and tiron were prepared at 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} and 10^{-5} M by dissolving the appropriate mass in 2 % (v/v) HNO_3 aqueous solution. A $50 \mu\text{g L}^{-1}$ working Be (II) solution was prepared by dilution of the beryllium stock solution ($1000 \mu\text{g L}^{-1}$) in 2 % (v/v) HNO_3 . The Be standard solution was prepared daily by dilution of the working Be (II) solution with the Nash reagent to give a final concentration of $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$.

8.3.3 Sample preparation

Blood of unexposed individuals were collected in BD vacutaine SST tubes (BD Franklin lakes, New Jersey, USA). Tubes were left at room temperature for 30 minutes to allow clot formation and then centrifuged at 500 g for 10 minutes. Supernatants of each individual were collected and recombined to ensure sample homogenisation. Each sample was divided into twelve 2.5 mL sub-samples in borosilicate disposable culture tubes. Two served as controls, five were spiked with NTP and five were spiked with tiron at concentrations ranging from 10^{-7} to 10^{-3} M. Sub-samples were left to equilibrate for two hours. A 2-mL aliquot of each sub-sample was transferred to a Centricon centrifugal device with ultracel YM-10 (10,000 MWCO) (Millipore Corporation, Ireland) and centrifuged at 4500 g for 90 minutes. The LMM and HMM fractions obtained were analysed for beryllium by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) after respective 2-fold and 5-fold dilutions with NR. The same experimental procedure was repeated on serum samples that were spiked with $1 \mu\text{g L}^{-1}$ of beryllium. We also measured the beryllium concentration in fourteen individuals and looked at the natural distribution of beryllium between the HMM and LMM fractions. Serum was diluted 5-fold with NR before GFAAS analysis.

8.3.4 Graphite furnace atomic absorption spectrometer

A Varian AA280Z Zeeman atomic absorption spectrometer, equipped with a Zeeman background correction, GTA 120 graphite tube atomiser and PSD 120 programmable sample dispenser was used for the atomic absorption measurements of beryllium at 234.9 nm with a spectral bandwidth of 1.0 nm. A beryllium hollow cathode lamp (Varian, Part No. 5610100500) was used as a light source operated at 5 mA. Pyrolytic graphite coated partitioned tubes (Varian partition tubes, Part No. 63-100012-00) were used

for all experiments. High purity Argon (99.99 %) was used as the carrier gas. A beryllium hollow cathode lamp (Varian, Part No. 5610100500) was used as a light source. Instrument control, sample results, signal graphics and data collection were controlled by the SpectrAA Worksheet software for the Windows[®] XP operating system. Peak area values were used for beryllium signal and background (BG) measurements. The instrumental conditions and the furnace program are listed in Table 8-1.

Table 8-1. The furnace programme for the determination of beryllium in serum.

Step	Temp (°C)	Time (s)	Argon flow rate (L min ⁻¹)
Drying	85	5	0.3
Drying	95	30	0.3
Drying	120	20	0.3
Pre-pyrolysis	450	22	0.3
Pyrolysis	1000	17	0.3
Atomizing	2900	3	0
Cleaning	2900	2	0.3

8.3.5 Chemical Speciation

For the chemical speciation calculations, we used MINEQL+ (version 4.5 for Windows – Environmental Research Software, Hallowell, ME), a chemical equilibrium modelling system that can be used to perform calculations at low temperatures (0-50°C) and low to moderate ionic strength (< 0.5 M). MINEQL+ operates following three steps: creation of a system by selecting chemical components from a menu with the possibility of

adding new ligands, then scanning the thermodynamic database and finally running the calculations with actual measured concentrations included. The output data module yields the activity of each species of each component. Our chemical speciation calculations were made assuming the following parameters (unless specified otherwise): $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (fixed), ionic strength: $I = 0.01\text{M}$ (fixed), $\text{Log } p\text{CO}_2 = -3.5$ (open atmosphere). Different chemical equilibrium softwares should yield similar results in as much as the same stability constants are used. The following input data were added to the MINEQL+ thermodynamic database; $\text{Log } K_{\text{Be-Ox}} = 3.47$, $\text{Log } K_{\text{Be-(Ox)}_2} = 5.24$, $\text{Log } K_{\text{Be-NTP}} = 13.94$, $\text{Log } K_{\text{H}_3\text{-NTP}} = 11.54$, $\text{Log } K_{\text{H}_2\text{-NTP}^{-1}} = 10.31$ and $\text{Log } K_{\text{H-NTP}^{-2}} = 7.59$.

8.3.6 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS (version 13 for Windows, SPSS Inc, Chicago, IL) using independent sample T-tests to monitor significant differences among groups. We also used One-Way ANOVA tests with Fisher's LSD (least significant difference) to make pair wise comparisons of means to monitor significant changes within a group.

8.4 Results and discussion

8.4.1 Beryllium in serum

The average beryllium concentration in fourteen non-exposed individuals (9 females and 5 males; 9 non smokers and 5 smokers) found to be $0.53 (\pm 0.14) \mu\text{g L}^{-1}$. Neither sex nor smoking habit was shown to have a significant influence on the concentration of beryllium in serum (independent sample T-test, $p > 0.05$). The method detection limit, calculated as three times the standard deviation of 10 replicates of the lowest standard (0.05

$\mu\text{g L}^{-1}$), was $6.0 (\pm 0.2) \text{ ng L}^{-1}$. The accuracy of the method varied from 99 to 104 % and was verified by analysing a control sample (STEWB level 2 certified blood material with a concentration of $5.9 (\pm 0.5) \mu\text{g Be L}^{-1}$).

8.4.2 Beryllium distribution in serum

On average, $21 (\pm 3) \%$ of the beryllium mass was bound to the LMM fraction, with $79 (\pm 3) \%$ bound to the HMM fraction (Table 8-2). Neither sex nor smoking habit was shown to have a significant influence on the distribution of beryllium between the LMM and the HMM fractions (independent sample T-test, $p > 0.05$). These findings agree with the work of (Steifel *et al.*, 1980a), conducted on human and guinea pig blood. They reported that the corpuscular part of all samples contained from 2 to 10 % of the total Be, the LMM fraction contained between 17 and 33 %, with 60 to 73 % of the total Be bound to the HMM fraction - or more specifically bound to the pre-albumins and the γ -globulins fractions. They also reported that the Be distribution between the two protein regions depends on the absolute concentration of Be in blood. At concentrations lower than $1 \mu\text{g L}^{-1}$, most of the Be mass ($> 90 \%$) was bound to the γ -globulins fraction, while at higher concentrations most of the Be mass was found bound to the pre-albumins fraction. This is very similar to the chemical speciation of aluminium in human serum, where almost all the Al mass in the HMM fractions was bound to transferrin belonging to the γ -globulins protein fractions (Soldado Cabezuelo *et al.*, 1997; Soldado Cabezuelo *et al.*, 1998; Sanz-Medel *et al.*, 2002). Beryllium and aluminium have very similar chemical properties (Wong and Woollins, 1994).

Table 8-2. Concentration and natural distribution of beryllium in human serum in non-exposed individuals.

Sample	Sex	Smoking	Serum ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LMM (%)	HMM (%)
1	F	S	0.54 (0.08)	22 (2)	78 (3)
2	F	NS	0.46 (0.04)	24 (3)	76 (3)
3	F	S	0.47 (0.09)	19 (1)	81 (1)
4	F	NS	0.42 (0.05)	24 (2)	76 (2)
5	F	NS	0.49 (0.07)	21 (2)	79 (2)
6	M	NS	0.44 (0.02)	25 (3)	75 (3)
7	F	NS	0.45 (0.01)	25 (3)	75 (3)
8	F	NS	0.44 (0.01)	19 (1)	81 (1)
9	F	NS	0.46 (0.01)	24 (3)	76 (3)
10	M	NS	0.45 (0.01)	16 (3)	84 (3)
11	M	S	0.78 (0.03)	23 (4)	77 (4)
12	F	NS	0.69 (0.03)	21 (5)	79 (5)
13	M	S	0.45 (0.04)	20 (3)	80 (3)
14	M	S	0.86 (0.01)	21 (3)	79 (3)
Mean			0.53 (0.14)	21 (3)	79 (3)

F = female; M = male; S = smoking; NS = non smoking; (\pm SD)

In an attempt to better understand beryllium chemistry in human body fluids, Sutton and Burastero (Sutton and Burastero, 2003) have simulated the speciation of beryllium in plasma fluid (LMM fraction) and reported that most of the beryllium at pH 7.4 is shown to be aqueous BeCO_3 (49.4 %) and BeOH^+ (39.9 %). A reproduction of this speciation is presented in Figure 8-2, where in using the chemical equilibrium software Mineql+ (Schecher and McAvoy, 2003), we show that adding citrate and oxalate, should complex most of the Al in the LMM human serum (Ohman and Martin, 1994; Bantan *et al.*, 1998a; Bantan *et al.*, 1998b; Soldado Cabezuelo *et al.*, 1998; Sanz-Medel *et al.*, 2002). We

obtained similar results and found that most of the beryllium at pH 7.4 is shown to exist as aqueous $\text{Be}(\text{OH})^+$ (60.5 %), BeCO_3 (27.4 %) and $\text{Be}(\text{OH})_2$ (10.2 %). Neither citrate nor oxalate influenced the speciation of beryllium at serum pH, although both ligands complexed beryllium at acidic pH with maxima of 16.2 % (at pH = 3) and 9 % (at pH = 5.5) for $\text{Be}(\text{oxalate})$ and $\text{Be}(\text{citrate})$ respectively.

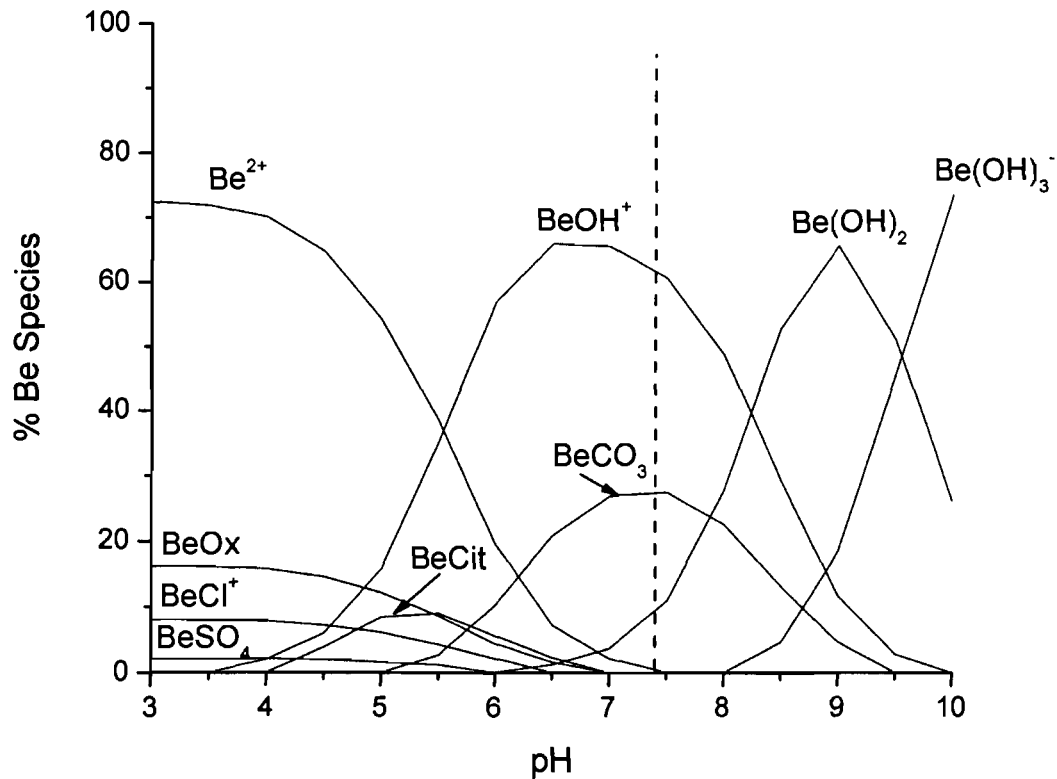


Figure 8-2. Speciation of Be in the LMM of serum fluid. ($[\text{Be}^{2+}] 5.8 \cdot 10^{-5} \text{ mM}$; $[\text{Ca}^{2+}] 1.3 \text{ mM}$; $[\text{Cl}^-] 108 \text{ mM}$; $[\text{CO}_3^{2-}] 24 \text{ mM}$; $[\text{K}^+] 4.2 \text{ mM}$; $[\text{Mg}^{2+}] 0.8 \text{ mM}$; $[\text{Na}^+] 142 \text{ mM}$; $[\text{PO}_4^{2-}] 2 \text{ mM}$; $[\text{SO}_4^{2-}] 0.5 \text{ mM}$; $[\text{Cit}^{3-}] 0.1 \text{ mM}$; $[\text{Ox}^{2-}] 0.01 \text{ mM}$)

In an attempt to investigate the chelation effect of tiron and NTP, as well as study their effect on the distribution of beryllium in human serum, dose-response experiments were conducted showing the influence of both complexing agents on the repartition of beryllium between the two serum fractions. We tested different equilibration times (2, 4 and 6 h), but found no differences for both ligands, suggesting that the exchange reaction rates are almost instantaneous and that equilibrium is reached within the 2 hour equilibration timeframe employed. This is similar to the Al-transferrin exchange reaction rate with desferrioxamine B (DFO) where the addition of DFO increased the amount of ultrafiltrable Al sharply up to 90 % of the total plasma Al content (Marques, 1991; Harris *et al.*, 1996). Due to the similarity between Be and Al “hard ions”, and DFO, NTP and tiron “complexing agents with soft oxygen donors”, we should expect quasi instantaneous exchange reaction rates for the Be-tiron-HMM and Be-NTP-HMM systems, thus confirming that the 2-h equilibration time is more than enough for the exchange to occur.

In spiked and non spiked samples, tiron showed an increasing beryllium mass in the HMM fraction. Such result contradicts the general behaviour of complexing agents, which usually tend to increase the metal concentration in the LMM fraction (May and Williams, 1977; Peter *et al.*, 1984). In the spiked samples (Figure 8-3), the addition of tiron increased the mass fraction of beryllium in the HMM from an average of 76 (± 4) % to reach a maximum of 93 (± 2) % at 10^{-3} M. Conversely, the average concentration of beryllium in the LMM fraction decreased from 24 (± 4) % to 7 (± 2) %. This increase in the Be-HMM fraction became significant at 10^{-5} M (One-Way Anova, Fisher's LSD, with $P < 0.05$). We observed the same pattern in non spiked samples (Figure 8-4). The HMM beryllium content increased from an average of 79 (± 3) % to 90 (± 4) % at 10^{-3} M while the LMM beryllium content decreased from 20 (± 3) % to 10 (± 4) %. This change in the Be-HMM fraction is only significant at 10^{-3} M.

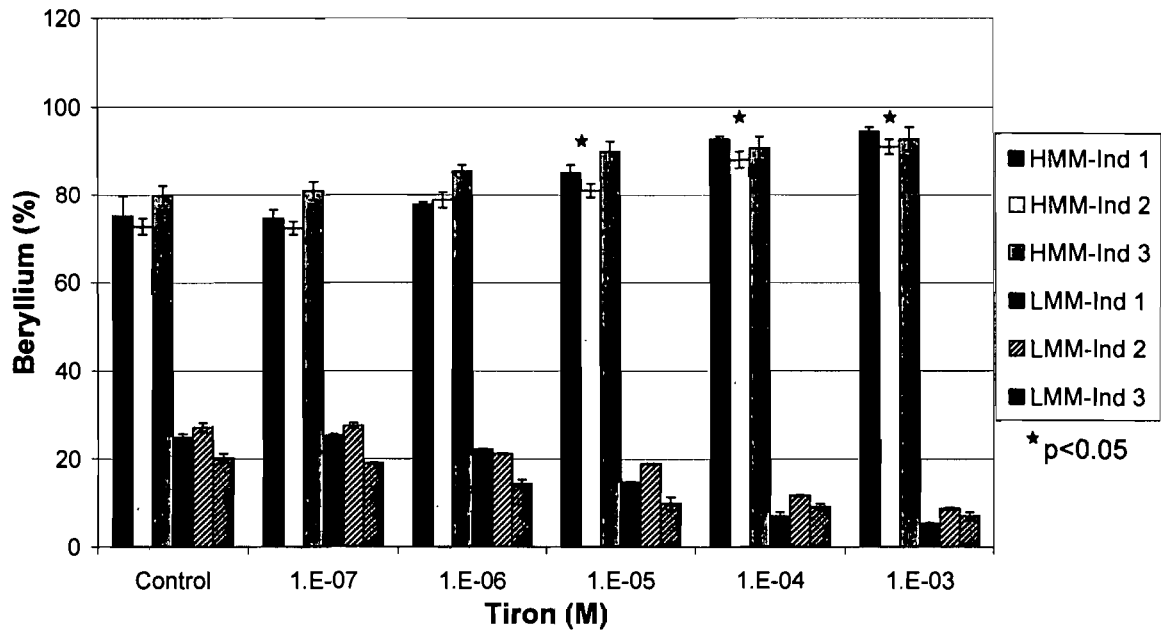


Figure 8-3. Influence of tiron on the distribution of beryllium between the HMM and the LMM fractions in three spiked individuals. * Significant difference calculated by One-Way Anova, Fisher's LSD; Ind (individual).

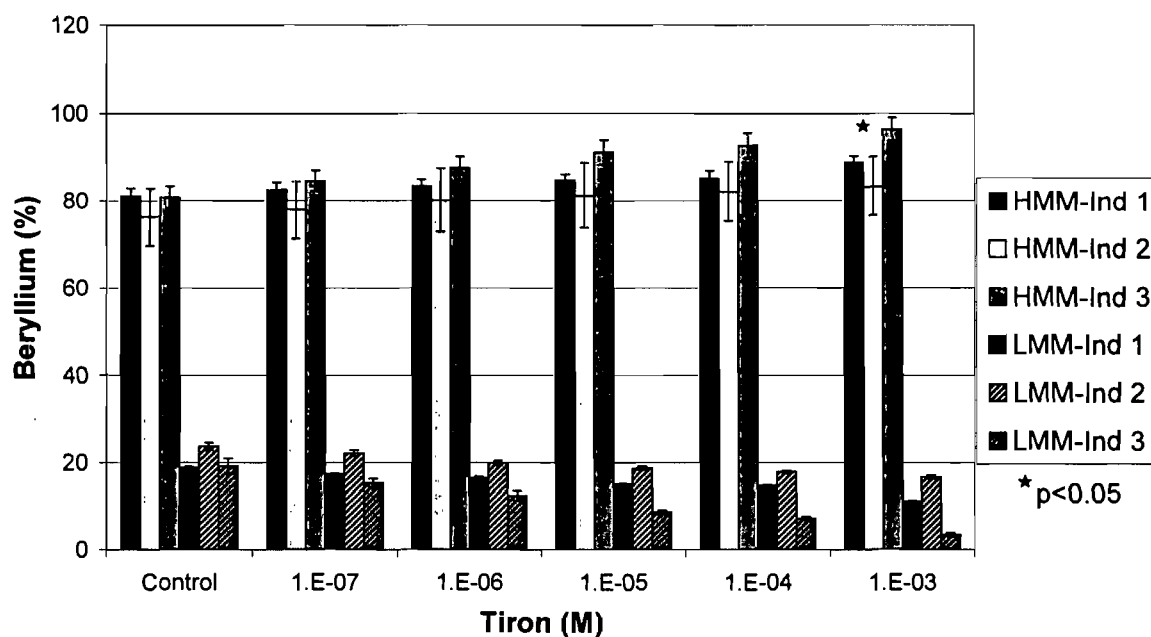


Figure 8-4. Influence of tiron on the distribution of beryllium between the HMM and the LMM fractions in three non spiked individuals. * Significant difference calculated by One-Way Anova, Fisher's LSD; Ind (individual).

These observations confirm that tiron complexes the Be under serum conditions; it increases the beryllium content in the HMM fraction by generating a mobilisation index that decreases with the increasing tiron concentration (Figure 8-5). Tiron (tiferron) complexes Be in a 2:1 ratio (Shukla *et al.*, 1998; Sharma *et al.*, 2002), most probably generating a less charged complex that tend to be more soluble in the HMM fraction than in the hydrophilic LMM fraction. We would suspect that such behaviour will increase the beryllium toxicity, but on the contrary, several recent studies have showed that tiron, with or without the aid of some adjuvants restored the altered biochemical parameters and oxidative stress in rats exposed to beryllium (Sharma *et al.*, 2002; Nirala *et al.*, 2007; Nirala *et al.*, 2008).

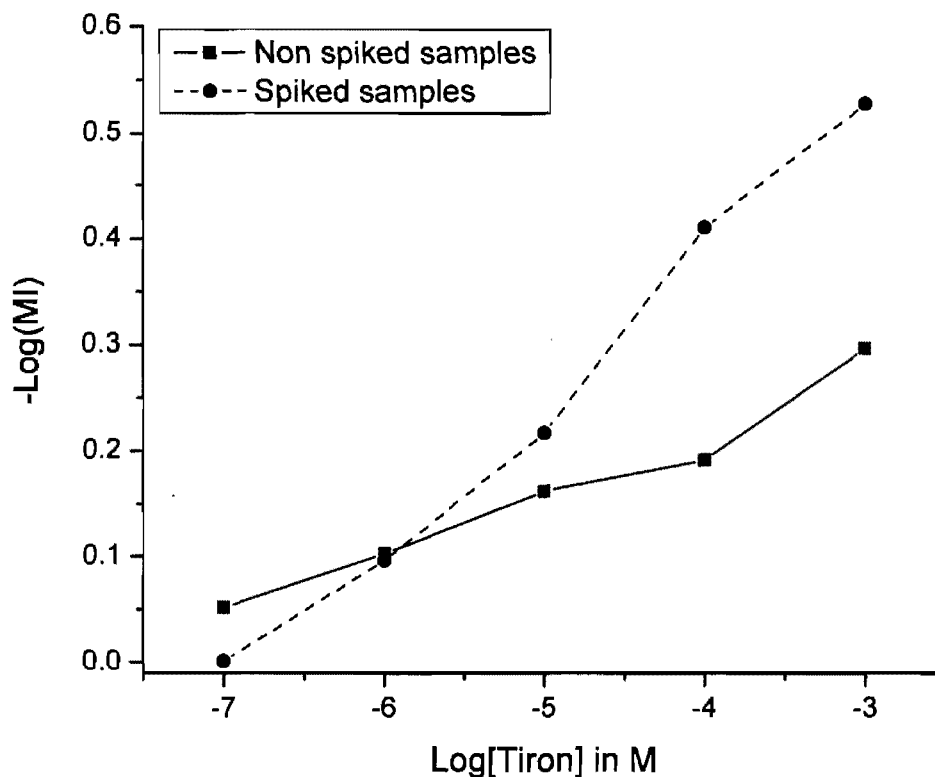


Figure 8-5. Mobilisation Index (MI) of Be as a function of tiron concentration.

NTP did not show any significant influence on the beryllium distribution, neither in spiked nor in non spiked samples. In spiked samples (Figure 8-6), the HMM average beryllium repartition did not change significantly (One-Way Anova, Fisher's LSD, with $P < 0.05$) with increasing NTP concentration. We obtained a stable pattern that varied from 76 (± 4) % for the control to 77 (± 5) % at 10^{-3} M. Similar observations were observed in non spiked samples (Figure 8-7). The HMM average beryllium content pattern varied from 77 (± 5) % for the control to 80 (± 4) % at 10^{-3} M.

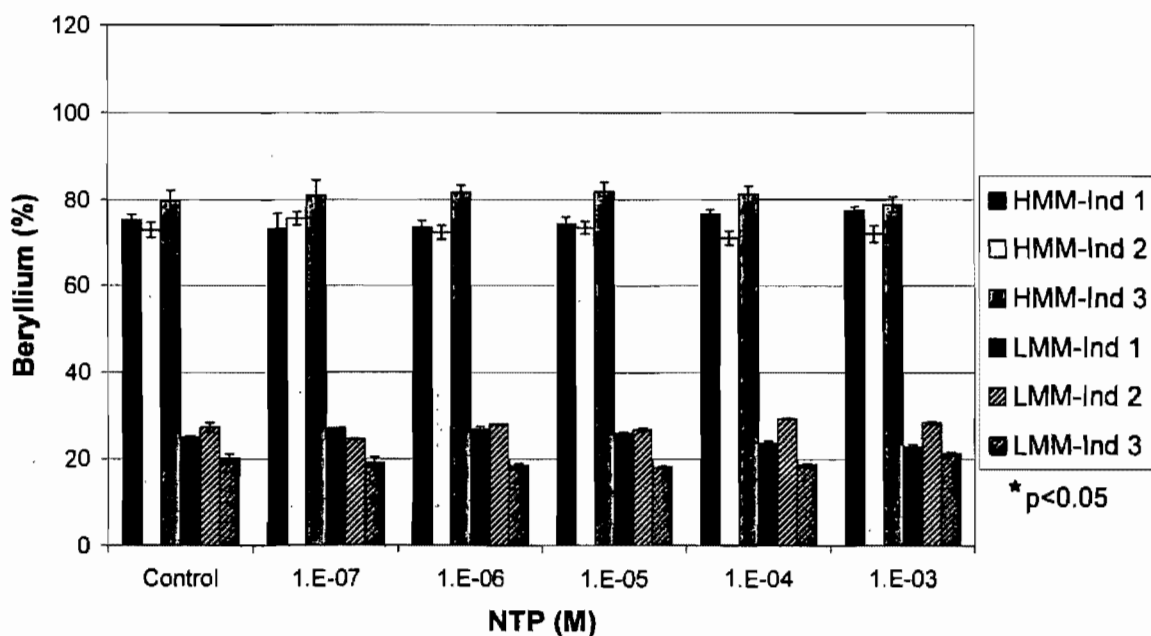


Figure 8-6. Influence of NTP on the distribution of beryllium between the HMM and the LMM fractions in three spiked individuals. * Significant difference calculated by One-Way Anova, Fisher's LSD; Ind (individual).

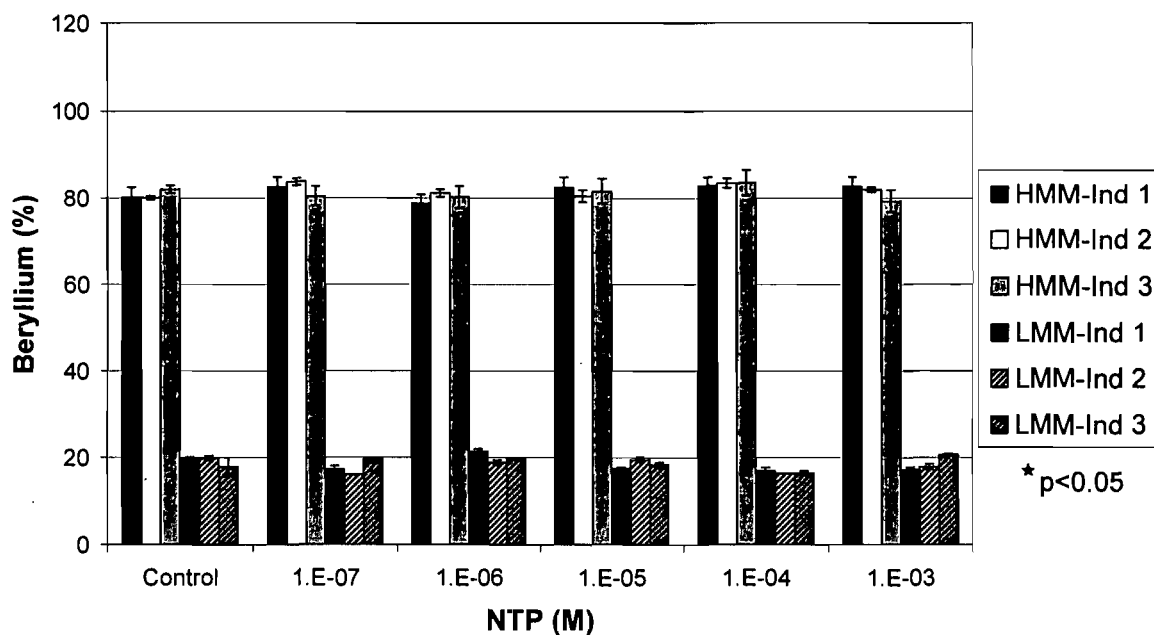


Figure 8-7. Influence of NTP on the distribution of beryllium between the HMM and the LMM fractions in three non spiked individuals. * Significant difference calculated by One-Way Anova, Fisher's LSD; Ind (individual).

Under physiological serum conditions, NTP did not influence the mass distribution of Be between the HMM and LMM fractions, but showed a capacity to complex most of the beryllium in the LMM using the MineqL+ simulation (Figure 8-8). At a concentration of 10^{-7} M, NTP was showed to complex 94.5 % of the Be in the LMM followed by 3.4 % and 1.1 % as $\text{Be}(\text{OH})^+$ and BeCO_3 respectively. These results support earlier findings suggesting that NTP would be a perfect Be complexing agent (Kumberger *et al.*, 1992a; Chinae *et al.*, 1995).

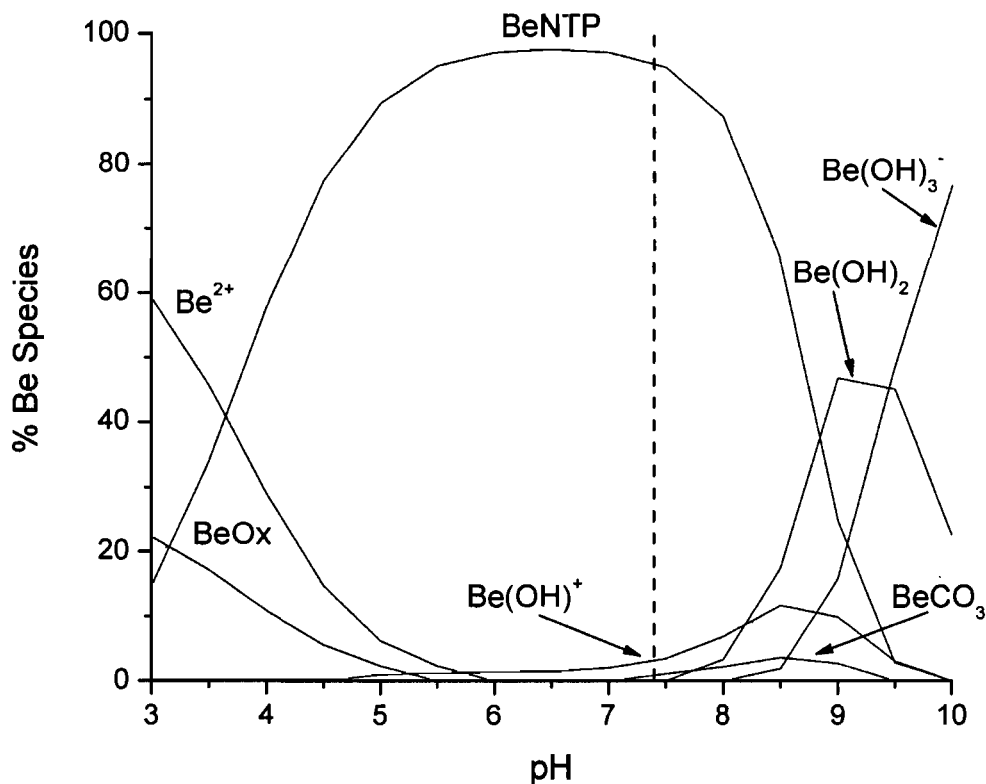


Figure 8-8. Influence of NTP on the speciation of Be in the LMM of serum fluid. ($[\text{Be}^{2+}]$ $5.8 \cdot 10^{-5}$ mM; $[\text{NTP}^{3-}]$ 10^{-4} mM; $[\text{Ca}^{2+}]$ 1.3 mM; $[\text{Cl}^-]$ 108 mM; $[\text{CO}_3^{2-}]$ 24 mM; $[\text{K}^+]$ 4.2 mM; $[\text{Mg}^{2+}]$ 0.8 mM; $[\text{Na}^+]$ 142 mM; $[\text{PO}_4^{3-}]$ 2 mM; $[\text{SO}_4^{2-}]$ 0.5 mM; $[\text{Cit}^{3-}]$ 0.1 mM; $[\text{Ox}^{2-}]$ 0.01 mM).

8.5 Conclusion

Neither sex nor smoking was shown to influence beryllium concentration or its distribution in human serum. On average, three quarters of the beryllium in serum were found to be bind to the HMM fraction. Tiron, unlike NTP, showed a significant interaction

with beryllium under physiological conditions by increasing the Be content in the HMM fraction – in contrast to what is usually observed for standard complexing agents used in chelation therapy. The addition of NTP did not affect the MW distribution between the two fractions but was shown to complex most of the Be in the LMM fraction. Further work could employ anion exchange fast protein liquid chromatography (FPLC) coupled with electrospray tandem mass spectrometry (ES-MS-MS) or inductively coupled plasma mass spectrometry, to confirm the nature of the ligands or proteins that complex Be in both serum fractions (Soldado Cabezuelo *et al.*, 1997; Bantan *et al.*, 1998b; Soldado Cabezuelo *et al.*, 1998; Sanz-Medel *et al.*, 2002).

8.6 Acknowledgments

We thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Institut de Recherche Robert-Sauvé en Santé et en Sécurité du Travail for financial support.

Chapitre 9

Conclusion et perspectives futures

Dans ce travail, nous avons développé et utilisé différents tests qui nous permettent de sélectionner et vérifier l'efficacité d'un agent complexant dans une thérapie par chélation au béryllium. Les trois agents complexant étudiés dans ce projet sont : l'acide nitrilotriacétique (NTA), l'acide nitrilotripropionique (NTP) et le 4,5-dihydroxy-1,3-benzène (tiron). Nous les avons sélectionné suite à une vaste revue de littérature sur la chimie de coordination du béryllium. Une autre approche qu'on a pu utiliser pour sélectionner les agents complexants est l'utilisation des logiciels de modélisation moléculaire qui dans le possible nous aide à bien choisir l'agent complexant. L'efficacité d'un agent complexant dans une thérapie par chélation dépend de deux facteurs : l'ordre d'interaction (grandeur de la constante d'association) et la sélectivité du ligand pour le métal en question. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser la méthode du titrage calorimétrique isothermique (TCI) plutôt que des méthodes potentiométrique et spectrométrique puisque la chaleur est une propriété universelle des réactions d'association chimiques. Avec cette méthode, nous pouvons à la fois mesurer la constante d'association et étudier la sélectivité de n'importe quel agent complexant pour le béryllium, et nous pouvons mesurer en plus la constante d'association (K_a), l'enthalpie (ΔH), l'entropie (ΔS) et la stœchiométrie de l'interaction (n).

Dans notre premier article « Evaluation of Three Beryllium Sequestering Agents by Isothermal Titration Calorimetry », nous avons utilisé le titrage calorimétrique isothermique (TCI) direct ou par compétition pour évaluer le pouvoir chélateur de nos trois agents complexants. Nous avons trouvé que NTP et tiron forment des complexes de plus grande stabilité avec du béryllium que NTA. Les constantes d'associations intrinsèques varient de $9.4 (\pm 1.2) * 10^{13} \text{ M}^{-1}$ pour Be-NTP, $3.2 (\pm 1.6) * 10^{12} \text{ M}^{-1}$ pour Be-tiron et $1.1 (\pm 1.1) * 10^7 \text{ M}^{-1}$ pour Be-NTA. De cela, on s'attend que le NTP et le tiron soient plus efficaces que NTA dans une thérapie par chélation au béryllium. En ce qui concerne la sélectivité des agents complexants, le titrage calorimétrique par compétition est une des méthodes les plus efficaces dans ce domaine. Elle permet une mesure directe de la compétition entre deux métaux envers un ligand. Comme application directe, nous avons

effectué quelques mesures de sélectivité et on a trouvé que le NTP ainsi que le tiron présente une sélectivité absolue pour le béryllium en présence du magnésium et que le NTA présente une plus grande sélectivité envers le zinc. Comme travail futur, une étude plus vaste pourrait être réalisée en utilisant cette méthode de titrage calorimétrique par compétition pour mesurer la sélectivité de nos agents complexants ou d'autres envers le béryllium en présence d'autres métaux essentiels pour la physiologie humaine. Une telle étude est nécessaire avant l'utilisation de ces agents complexants dans une thérapie par chélation pour éviter toutes carences en oligo-éléments.

Après avoir vérifié l'affinité et la sélectivité de nos agents complexants envers le béryllium, nous avons regardé leurs rôles sur l'immunotoxicité du béryllium. D'où notre deuxième article « Use of Proliferation Test to Evaluate the Effects of Complexing Agents on Beryllium Toxicity ». Dans ce travail, nous avons montré l'importance du test de prolifération splénocytaire dans l'évaluation des différents effets bénéfiques (correcteur, protecteur, et combiné) des agents complexants sur l'immunotoxicité du béryllium. Tous nos agents complexants ont montré un effet correctif avec un ratio d'amélioration qui varie de 398 à 2541. Ils ont aussi exhibé une efficacité dans les tests combinés avec un ratio d'amélioration qui varie de 1 à 1258. Le NTA a montré un effet synergique dans l'essai combiné à rapport fixe. En ce qui concerne l'effet protecteur, seul le NTP et le tiron ont montré un tel effet positif avec un ratio d'amélioration qui varie de 1 à 5. De même, nous avons trouvé que la complexation du béryllium par le tiron empêche la sensibilisation des splénocytes. En bref, l'utilisation des agents complexants dans le traitement de la MCB semble être une approche attrayante.

Dans le même ordre d'idée de vérification du potentiel chélateur, on a étudié *in vitro* l'effet de ces agents complexants sur la répartition du béryllium dans le sérum. Pour cela, on a optimisé une méthode analytique qui nous permet de quantifier le béryllium dans des microéchantillons de sang et de sérum avec une grande sensibilité. D'où notre troisième article, « Graphite furnace atomic absorption spectrometry as a routine method for the

quantification of beryllium in blood and serum ». Dans celui-ci, nous avons effectué la détermination directe du béryllium dans des microéchantillons non digérés de sang humain et de sérum par la spectrométrie d'absorption atomique à four de graphite (SAA-FG). Les échantillons de sang et de sérum sont préparés par une simple dilution de 8 fois et 5 fois respectivement avec un réactif de Nash. Nous avons également comparé trois procédures expérimentales : sans utilisation d'un modificateur, en utilisant le nitrate de magnésium ou le palladium/acide citrique en tant que modificateurs chimiques. Pour le sérum, aucun des modificateurs n'a amélioré la sensibilité de la méthode. Les températures optimales de pyrolyse et d'atomisation sont de 1000 et 2900 °C respectivement. La limite de détection de la méthode est 2 ng L⁻¹, la masse caractéristique est 0.22 (± 0.07) pg et un taux de recouvrement 97.5 (± 2.5) %. Dans le sang, l'utilisation de 6 µg de nitrate de magnésium a montré une amélioration de la sensibilité de la méthode. Les températures optimales de pyrolyse et d'atomisation sont de 800 et 2800 °C respectivement. La limite de détection est 7 ng L⁻¹, la masse caractéristique est 0.20 (± 0.02) pg et le taux de recouvrement est de 100 (± 1) %.

Finalement, dans notre dernier article «Effect of nitrilotripropionic acid and 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulphonate on the fractionation of beryllium in human serum by graphite furnace atomic absorption spectrometry », nous avons étudié l'effet du NTP et tiron sur la distribution du béryllium dans le sérum humain. Nous avons, en premier lieu, déterminé le seuil de base en mesurant la concentration moyenne du béryllium dans le sérum humain chez quatorze individus non exposés et étudié sa distribution entre la fraction de faible et lourde masses moléculaires. On a trouvé que la concentration moyenne du béryllium dans le sérum est de 0.53 (± 0.14) µg L⁻¹, réparti à 21 (± 3) % dans la fraction de faible masse moléculaire et 79 (±3) % dans la fraction de haute masse moléculaire. L'addition du tiron au sérum a augmenté la masse de béryllium dans la fraction de haute masse moléculaire jusqu'à un maximum de 95 % tandis que le NTP n'a pas montré un effet significatif sur la distribution du béryllium dans le sérum.

Pour conclure, le titrage calorimétrique isothermique direct ou concurrentiel, est une des meilleures techniques pour mesurer les constantes d'association des agents complexants avec du béryllium. C'est une méthode très efficace et très sensible pour les études de sélectivité. Elle peut être utilisée comme une méthode de présélection des agents complexants et pour bâtir une base de données des constantes d'associations du béryllium. Le titrage calorimétrique isothermique est une des méthodes reconnues pour ses applications dans le domaine pharmaceutique, elle est utilisée pour étudier les interactions des agents pharmaceutiques avec les macromolécules et les complexes peptidiques. De ce fait, elle sera très avantageuse pour étudier l'interaction du béryllium avec les différents allèles du complexe majeur d'histocompatibilité. Elle permet même d'effectuer des études de compétition directe entre le récepteur cellulaire et l'agent complexant.

L'essai de prolifération de splénocytes de souris (SPT), une version adaptée du test de lympho-prolifération au béryllium (BeLPT) s'avéré efficace pour étudier l'effet des agents complexants sur la prolifération de cellules en absence des échantillons de sang provenant d'individus exposés. Une des perspectives futures sera d'appliquer ces tests de proliférations cellulaires sur des souris sensibilisées au béryllium ou bien d'étudier les effets des agents complexants en utilisant du sang des patients sensibilisés ou atteints par la maladie chronique. Dans ce cas, en utilisera le test de BeLPT « beryllium lymphoproliferation test ».

La spectrométrie d'absorption atomique à four de graphite, est parmi les techniques les plus sensibles, rapides et économiques pour la détection de béryllium dans les fluides biologiques. Elle sera très efficace dans les études de surveillances, comme méthodes standard d'analyse du béryllium.

Des résultats obtenus de l'étude des effets des agents complexants sur la distribution du béryllium dans le sérum, peu d'informations sont obtenues sur le comportement du béryllium dans les deux fractions du sérum. Pour cela, je propose l'utilisation de la

chromatographie liquide, spécifiquement « *fast protein liquid chromatography-FPLC* » couplée à la spectrométrie de masse à plasma couplée inductivement pour déterminer avec précision la nature des protéines qui complexent le béryllium. La même approche est applicable pour le béryllium dans la fraction à faible masse moléculaire avec l'utilisation d'une colonne à échange anionique. Cela nous permet d'étudier en premier la distribution naturelle du béryllium dans le sérum et nous permet de vérifier avec précision l'effet des agents complexants sur cette distribution.

Bibliographie

- Al-Sarireh, B. & Eremin, O. (2000). Tumour-associated macrophages (TAMS): disordered function, immune suppression and progressive tumour growth. *Journal of the Royal College of Surgeons of Edinburgh*, 45, 1-16.
- Alberty, R. A. (1994). Biochemical thermodynamics. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1207, 1-11.
- Alderighi, L., Bianchi, A., Mederos, A., Midollini, S., Rodriguez, A., & Vacca, A. (1998). Thermodynamic and multinuclear NMR study of beryllium(II) hydrolysis and beryllium(II) complex formation with oxalate, malonate, and succinate anions in aqueous solution. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 1209-1215.
- Alexiu, V. & Vladescu, L. (2005). Optimization of a chemical modifier in the determination of selenium by graphite furnace atomic absorption spectrometry and its application to wheat and wheat flour analysis. *Analytical Sciences*, 21, 137-141.
- Amicosante, M., Sanarico, N., Berretta, F., Arroyo, J., Lombardi, G., Lechler, R. et al. (2001). Beryllium binding to HLA-DP molecule carrying the marker of susceptibility to berylliosis glutamate beta 69. *Human Immunology*, 62, 686-693.
- Ashby, J., Ishidate, M., Stoner, G. D., Morgan, M. A., Ratpan, F., & Callander, R. D. (1990). Studies on the genotoxicity of beryllium sulfate invitro and invivo. *Mutation Research*, 240, 217-225.

- Ashley, K., Agrawal, A., Cronin, J., Tonazzi, J., McClesky, T. M., Burrell, A. K. et al. (2007). Ultra-trace determination of beryllium in occupational hygiene samples by ammonium bifluoride extraction and fluorescence detection using hydroxybenzoquinoline sulfonate. *Analytica Chimica Acta*, 584, 281-286.
- Ashley, K., McClesky, T. M., Brisson, M. J., Goodyear, G., Cronin, J., & Agrawal, A. (2005). Interlaboratory evaluation of a portable fluorescence method for the measurement of trace beryllium in the workplace. *Journal of ASTM International*, 2, 1-8.
- ATSDR (2002). *Toxicological profile for beryllium*. Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Baes, C. F. & Mesmer, R. E. (1976). *The hydrolysis of cations*. New York: John Wiley.
- Banerjee, B. D., Pasha, S. T., & Koner, B. C. (1996). Hapten synthesis and production of rabbit antibodies with reactivity to DDT and its metabolites for the development of an immunoassay. *Medical Science Research*, 24, 553-555.
- Bantan, T., Milacic, R., & Pihlar, B. (1998a). Possibilities for speciation of Al-citrate and other negatively charged Al complexes by anion-exchange FPLC-ICP-AES. *Talanta*, 46, 227-235.
- Bantan, T., Milacic, R., & Pihlar, B. (1998b). Quantitative determination of trace amounts of Al-citrate by anion-exchange FPLC-ETAAS. *Talanta*, 47, 929-941.

- Barany, E., Bergdahl, I. A., Schutz, A., Skerfving, S., & Oskarsson, A. (1997). Inductively coupled plasma mass spectrometry for direct multi-element analysis of diluted human blood and serum. *Journal of analytical atomic spectrometry*, *12*, 1005-1009.
- Berretta, F., Butler, R. H., Diaz, G., Sanarico, N., Arroyo, J., Fraziano, M. et al. (2003). Detailed analysis of the effects of Glu/Lys beta 69 human leukocyte antigen-DP polymorphism on peptide-binding specificity. *Tissue Antigens*, *62*, 459-471.
- Bliss, C. I. (1939). The toxicity of poisons applied jointly. *Annals of Applied Biology*, *26*, 585-615.
- Bost, T. W., Riches, D. W. H., Schumacher, B., Carre, P. C., Khan, T. Z., Martinez, J. A. B. et al. (1994). Alveolar macrophages from patients with beryllium disease and sarcoidosis express increased levels of messenger-RNA for tumor-necrosis-factor- α and interleukin-6 but not interleukin-1- β . *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *10*, 506-513.
- Boukhalfa, H., Lewis, J. G., & Crumbliss, A. L. (2004). Beryllium(II) binding to ATP and ADP: Potentiometric determination of the thermodynamic constants and implications for *in vivo* toxicity. *Biometals*, *17*, 105-109.
- Brancaleone, P., Weynand, B., De Vuyst, P., Stanescu, D., & Pieters, T. (1998). Lung granulomatosis in a dental technician. *American Journal of Industrial Medicine*, *34*, 628-631.

- Breuer, W., Ermers, M. J. J., Pootrakul, P., Abramov, A., Hershko, C., & Cabantchik, Z. I. (2001). Desferrioxamine-chelatable iron, a component of serum non-transferrin-bound iron, used for assessing chelation therapy. *Blood*, *97*, 792-798.
- Breuer, W., Ronson, A., Slotki, I. N., Abramov, A., Hershko, C., & Cabantchik, Z. I. (2000). The assessment of serum nontransferrin-bound iron in chelation therapy and iron supplementation. *Blood*, *95*, 2975-2982.
- Burguera, J. L., Burguera, M., Rondon, C., & Carrero, P. (1999). Semi-permanent lutetium modifier for the determination of beryllium in urine by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, *54*, 1743-1753.
- Byrne, C. J. & Deleon, I. R. (1986). Trace-metal residues in biota and sediments from lake pontchartrain, Louisiana. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *37*, 151-158.
- Callahan, M. A., Slimak, M. W., Gabel, N. W., May, I. P., Fowler, C. F., Freed, J. R. *et al.* (1979). *Water-related environmental fate of 129 priority pollutants* (Rep. No. 29). Washington, DC: US Environmental Protection Agency.
- Cash, R., Shapiro, R. I., Levy, S. H., & Hopkins, S. M. (1959). Chelating agent in the therapy of beryllium poisoning. *New England Journal of Medicine*, *260*, 683-686.
- Castro, G. T. & Blanco, S. E. (2004). Structural and spectroscopic study of 5,7-dihydroxyflavone and its complex with aluminum. *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *60*, 2235-2241.

- Cecconi, F., Ghilardi, C. A., Ienco, A., Mariani, P., Mealli, C., Midollini, S. *et al.* (2002). Different complexation properties of some hydroxy keto heterocycles toward beryllium(II) in aqueous solutions: Experimental and theoretical studies. *Inorganic Chemistry*, *41*, 4006-4017.
- Cernohorsky, T. & Kotrly, S. (1995). Determination of beryllium in drinking and wastewater by tungsten furnace atomic-absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, *10*, 155-160.
- Chaperon, S. & Sauvé, S. (2007). Toxicity interaction of metals (Ag, Cu, Hg, Zn) to urease and dehydrogenase activities in soils. *Soil Biology & Biochemistry*, *39*, 2329-2338.
- Chekmeneva, E., Prohens, R., az-Cruz, J. M., Arino, C., & Esteban, M. (2008). Competitive binding of Cd and Zn with the phytochelatin (γ -Glu-Cys): Comparative study by mass spectrometry, voltammetry-multivariate curve resolution, and isothermal titration calorimetry. *Environmental Science & Technology*, *42*, 2860-2866.
- China, E., Dominguez, S., Mederos, A., Brito, F., Arrieta, J. M., Sanchez, A. *et al.* (1995). Nitrilotripropionic acid (NTP) and other polyamino carboxylic-acids as sequestering agents for beryllium(II) - X-ray crystal-structure of sodium (nitrilotripropionato)beryllate(II) trihydrate, $\text{Na}[\text{Be}(\text{NTP})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$. *Inorganic Chemistry*, *34*, 1579-1587.
- Chou, Y. K., Edwards, D. M., Weinberg, A. D., Vandebark, A. A., Kotzin, B. L., Fontenot, A. P. *et al.* (2005). Activation pathways implicate anti-HLA-DP and anti-

LFA-1 antibodies as lead candidates for intervention in chronic berylliosis. *Journal of Immunology*, 174, 4316-4324.

Christensen, T., Gooden, D. M., Kung, J. E., & Toone, E. J. (2003). Additivity and the physical basis of multivalency effects: A thermodynamic investigation of the calcium EDTA interaction. *Journal of the American Chemical Society*, 125, 7357-7366.

Christensen, T. & Toone, E. J. (2003). Calorimetric evaluation of protein-carbohydrate affinities. *Recognition of Carbohydrates in Biological Systems Pt A: General Procedures*, 362, 486-504.

Clarke, S. M. (1991). A novel enzyme-linked-immunosorbent-assay (Elisa) for the detection of beryllium antibodies. *Journal of Immunological Methods*, 137, 65-72.

Claude, W. S., Conrad, P. W., & Kenneth, F. J. J. (1961). Improvements in the fluorometric determination of submicrogram quantities of beryllium. *Analytical Chemistry*, 33, 1671.

Clevette, D. J., Nelson, W. O., Nordin, A., Orvig, C., & Sjoberg, S. (1989). Equilibrium and structural studies of silicon(IV) and aluminum(III) in aqueous-solution. 18. Complexation of aluminum with n-substituted 3-hydroxy-4-pyridinones. *Inorganic Chemistry*, 28, 2079-2081.

Cory-Slechta, D. A. (1988). Mobilization of lead over the course of DMSA chelation therapy and long-term efficacy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 246, 84-91.

- Covington, J. S., McBride, M. A., Slagle, W. F., & Disney, A. L. (1985). Beryllium localization in base metal dental casting alloys. *Journal of Biomedical Materials Research*, 19, 747-750.
- Crouch, A. M., Khotseng, L. E., Polhuis, M., & Williams, D. R. (2001). Comparative study of cyclic voltammetry with potentiometric analysis for determining formation constants for polyaminocarboxylate-metal ion complexes. *Analytica Chimica Acta*, 448, 231-237.
- Curtis, G. H. (1951). Cutaneous hypersensitivity due to beryllium: a study of thirteen cases. *Archives of Dermatology and Syphilology*, 64, 470-482.
- Domingo, J. L., Bosque, M. A., Luna, M., & Corbella, J. (1993). Prevention by tiron (sodium 4,5-dihydroxybenzene-1,3-disulfonate) of vanadate-induced developmental toxicity in mice. *Teratology*, 48, 133-138.
- Drury, J. S., Shriner, C. R., Lewis, E. B., Towill, L. E., & Hammons, A. S. (1978). *Reviews of the Environmental Effects of Pollutants: VI. Beryllium*, National Laboratory, Oak Ridge, USA.
- Eidson, A. F., Taya, A., Finch, G. L., Hoover, M. D., & Cook, C. (1991). Dosimetry of beryllium in cultured canine pulmonary alveolar macrophages. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 34, 433-448.
- Eisenbud, M. (1998). The standard for control of chronic beryllium disease. *Applied Occupational and Environmental Hygiene*, 13, 25-31.

- Eisenbud, M., Berghout, C. F., & Steadman, L. T. (1948). Environmental studies in plants and laboratories using beryllium: the acute disease. *Journal of Industrial Hygiene and Toxicology*, 30, 282-285.
- Eisenbud, M. & Lisson, J. (1983). Epidemiological aspects of beryllium-induced nonmalignant lung disease: A 30 year update. *Journal of Occupational Medicine*, 25, 196-202.
- Eisenbud, M., Wanta, C., & Dustan, L. T. (1949). Non-occupational berylliosis. *Journal of Industrial Hygiene and Toxicology*, 31, 282-294.
- Epstein, P. E., Dauber, J. H., Rossman, M. D., & Daniele, R. P. (1982). Bronchoalveolar lavage in a patient with chronic berylliosis - evidence for hypersensitivity pneumonitis. *Annals of Internal Medicine*, 97, 213-216.
- Fielding, L. (2000). Determination of association constants (K_a) from solution NMR data. *Tetrahedron*, 56, 6151-6170.
- Finch, G. L., Haley, P. J., Hoover, M. D., Snipes, M. B., & Cuddihy, R. G. (1994). Responses of rat lungs to low lung burdens of inhaled beryllium metal. *Inhalation Toxicology*, 6, 205-224.
- Finch, G. L., Hoover, M. D., Hahn, F. F., Nikula, K. J., Belinsky, S. A., Haley, P. J. *et al.* (1996). Animal models of beryllium-induced lung disease. *Environmental Health Perspectives*, 104, 973-979.

- Finch, G. L., Hoover, M. D., Mewhinney, J. A., & Eidson, A. F. (1989). Respirable particle density-measurements using isopycnic density gradient ultracentrifugation. *Journal of Aerosol Science*, 20, 29-36.
- Finch, G. L., Verburg, R. J., Mewhinney, J. A., Eidson, A. F., & Hoover, M. D. (1988). The effect of beryllium compound solubility on invitro canine alveolar macrophage cyto-toxicity. *Toxicology Letters*, 41, 97-105.
- Fishbein, L. (1981). Sources, transport and alterations of metal-compounds - An overview .1. Arsenic, beryllium, cadmium, chromium, and nickel. *Environmental Health Perspectives*, 40, 43-64.
- Fleet, B., Liberty, K. V., & West, T. S. (1970). A study of some matrix effects in the determination of beryllium by atomic absorption spectroscopy in the nitrous oxide-acetylene flame. *Talanta*, 17, 17.
- Flora, S. J. S., Mathur, S., & Mathur, R. (1995). Effects of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid or 2,3-dimercaptopropane 1-sulfonate on beryllium-induced biochemical-alterations and metal concentration in male-rats. *Toxicology*, 95, 167-175.
- Fontenot, A. P., Falta, M. T., Freed, B. M., Newman, L. S., & Kotzin, B. L. (1999a). Identification of pathogenic T cells in patients with beryllium-induced lung disease. *Journal of Immunology*, 163, 1019-1026.
- Fontenot, A. P., Kotzin, B. L., Comment, C. E., & Newman, L. S. (1998). Expansions of T-cell subsets expressing particular T-cell receptor variable regions in chronic

- beryllium disease. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 18, 581-589.
- Fontenot, A. P., Newman, L. S., & Kotzin, B. L. (1999b). Identification of pathogenic T cells in patients with chronic beryllium disease. *FASEB Journal*, 13, A959.
- Fontenot, A. P., Newman, L. S., & Kotzin, B. L. (2001). Chronic beryllium disease: T cell recognition of a metal presented by HLA-DP. *Clinical Immunology*, 100, 4-14.
- Fontenot, A. P., Torres, M., Marshall, W. H., Newman, L. S., & Kotzin, B. L. (2000). Beryllium presentation to CD4(+) T cells underlies disease-susceptibility HLA-DP alleles in chronic beryllium disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 12717-12722.
- Forrer, R., Gautschi, K., & Lutz, H. (2001a). Simultaneous measurement of the trace elements Al, As, B, Be, Cd, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Rb, Se, Sr, and Zn in human serum and their reference ranges by ICP-MS. *Biological Trace Element Research*, 80, 77-93.
- Forrer, R., Wenker, C., Gautschi, K., & Lutz, H. (2001b). Concentration of 17 trace elements in serum and whole blood of plains viscachas (*Lagostomus maximus*) by ICP-MS, their reference ranges, and their relation to cataract. *Biological Trace Element Research*, 81, 47-62.
- Fraser, A., Fearon, U., Billingham, R. C., Ionescu, M., Reece, R., Barwick, T. *et al.* (2003). Turnover of type II collagen and aggrecan in cartilage matrix at the onset of

inflammatory arthritis in humans - Relationship to mediators of systemic and local inflammation. *Arthritis and Rheumatism*, 48, 3085-3095.

Frome, E. L., Newman, L. S., Cragle, D. L., Colyer, S. P., & Wambach, P. F. (2003). Identification of an abnormal beryllium lymphocyte proliferation test (vol 183, pg 39, 2003). *Toxicology*, 188, 335-336.

Frome, E. L., Smith, M. H., Littlefield, L. G., Neubert, R. L., & Colyer, S. P. (1996). Statistical methods for the blood beryllium lymphocyte proliferation test. *Environmental Health Perspectives*, 104, 957-968.

Fukada, H. & Takahashi, K. (1998). Enthalpy and heat capacity changes for the proton dissociation of various buffer components in 0.1 M potassium chloride. *Proteins-Structure Function and Genetics*, 33, 159-166.

Garcia, S. F., Marquez, G. J., & Hernandez, L. M. (1987). Fluorimetric determination of aluminium and beryllium in mixtures by synchronous derivative spectrometry. *Analyst*, 112, 649-652.

Gladney, E. S. & Owens, J. W. (1976). Beryllium emissions from coal-fired power plant. *Journal of environmental science and health*, 11, 297-311.

Gouille, J. P., Mahieu, L., Castermant, J., Neveu, N., Bonneau, L., Laine, G. *et al.* (2005). Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair: Reference values. *Forensic Science International*, 153, 39-44.

- Greco, W. R., Bravo, G., & Parsons, J. C. (1995). The search for synergy - A critical review from a response-surface perspective. *Pharmacological Reviews*, 47, 331-385.
- Greenfield, P. G. (1971). *Engineering applications of beryllium*. London: Mills and Boon.
- Greenwood, N. N. & Ebinger, M. H. (1997). Beryllium, Magnesium, Calcium, Strontium, Barium and Radium. In *Chemistry of elements* (2 ed., pp. 107-140).
- Griffitts, W. R., Allaway, W. H., & Groth, D. H. (1977). *Geochemistry and the environment. Vol. II. The relation of other selected trace elements to health and disease*. Washington, DC.
- Griko, Y. V. (1999). Energetics of Ca²⁺-EDTA interactions: calorimetric study. *Biophysical Chemistry*, 79, 117-127.
- Haley, P. J., Finch, G. L., Hoover, M. D., Mewhinney, J. A., Bice, D. E., & Muggenburg, B. A. (1992). Beryllium-induced lung-disease in the dog following to exposures to BeO. *Environmental Research*, 59, 400-415.
- Haley, P. J., Finch, G. L., Mewhinney, J. A., Harmsen, A. G., Hahn, F. F., Hoover, M. D. *et al.* (1989). A canine model of beryllium-induced granulomatous lung-disease. *Laboratory Investigation*, 61, 219-227.
- Hall, R. H., Scott, J. K., & Laskin, S. (1950). Acute toxicity of inhaled beryllium. *Archives of Industrial Hygiene and Occupational Medicine*, 12, 25-48.

- Hanifin, J. M., Epstein, W. L., & Cline, M. J. (1970). In vitro studies on granulomatous hypersensitivity to beryllium. *Journal of Investigative Dermatology*.
- Hardy, H. L. & Tabershaw, I. R. (1946). Delayed chemical pneumonitis occurring in workers exposed to beryllium compounds. *Journal of Industrial Hygiene and Toxicology*, 28, 197-211.
- Harris, W. R., Berthon, G., Day, J. P., Exley, C., Flaten, T. P., Forbes, W. F. *et al.* (1996). Speciation of aluminum in biological systems. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 48, 543-568.
- Hart, B. A., Harmsen, A. G., Low, R. B., & Emerson, R. (1984). Biochemical, cytological, and histological alterations in rat lung following acute beryllium aerosol exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 75, 454-465.
- Heitland, P. & Koster, H. D. (2006). Biomonitoring of 30 trace elements in urine of children and adults by ICP-MS. *Clinica Chimica Acta*, 365, 310-318.
- Hoover, M. D., Finch, G. L., Mewhinney, J. A., & Eidson, A. F. (1990). Release of aerosols during sawing and milling of beryllium metal and beryllium alloys. *Applied Occupational and Environmental Hygiene*, 5, 787-791.
- Huang, C. Y. & Beauchemin, D. (2006a). A simple method based on IC-ICP-MS to determine conditional stability constants. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21, 317-320.

- Huang, C. Y. & Beauchemin, D. (2006b). Simultaneous determination of two conditional stability constants by IC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, *21*, 1419-1422.
- Infante, P. F., Wagoner, J. K., & Sprince, N. L. (1980). Mortality patterns from lung-cancer and nonneoplastic respiratory-disease among white males in the beryllium case registry. *Environmental Research*, *21*, 35-43.
- Jackson, K. W. & Qiao, H. (1992). Atomic-absorption, atomic emission, and flame emission-spectrometry. *Analytical Chemistry*, *64*, R50-R66.
- Jameson, C. W. (1996). Introduction to the conference on beryllium-related diseases. *Environmental Health Perspectives*, *104*, 935-936.
- Jarvis, N. V., Wagener, J. M., & Jackson, G. E. (1995). Metal-ion speciation in blood-plasma as a tool for elucidating the in-vivo behavior of radiopharmaceuticals containing Sm-153 and Ho-166. *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions*, 1411-1415.
- Johnson, N. R. (1983). Beryllium disease among workers in a spacecraft-manufacturing plant-California. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, *32*, 419-425.
- Johri, S., Shrivastava, S., Sharma, P., & Shukla, S. (2004). Analysis of time-dependent recovery from beryllium toxicity following chelation therapy and antioxidant supplementation. *Indian Journal of Experimental Biology*, *42*, 798-802.

- Johri, S., Shukla, S., & Sharma, P. (2002). Role of chelating agents and antioxidants in beryllium induced toxicity. *Indian Journal of Experimental Biology*, 40, 575-582.
- Jonathan, R. W., Dajani, R., Pearl, L., & Harwood, A. J. (2002). Glycogen synthase kinase-3 inhibition by lithium and beryllium suggests the presence of two magnesium binding sites. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 290, 967-972.
- Kantar, C., Gillow, J. B., Harper-Arabie, R., Honeyman, B. D., & Francis, A. J. (2005). Determination of stability constants of U(VI)-Fe(III)-citrate complexes. *Environmental Science & Technology*, 39, 2161-2168.
- Kaplan, D. I., Sajwan, K. S., Adriano, D. C., & Gettier, S. (1990). Phytoavailability and toxicity of beryllium and vanadium. *Water, Air, & Soil Pollution*, 53, 203-212.
- Kempen, E. C. & Brodbelt, J. S. (2000). A method for the determination of binding constants by electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 72, 5411-5416.
- Kenega, E. (1980). Predicted bioconcentration factors and soil sorption coefficients of pesticides and other chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 4, 26-38.
- Kimmerle, G. (1966). Beryllium. In *Handbook of Experimental Pharmacology* (pp. 102-105). Berlin: Springer-Verlag.
- Klöke, A., Sauerbeck, D. R., & Vetter, H. (1984). The contamination of plants and soils with heavy metals and the transport of metals in terrestrial food chains. In

- J.O.Nriagu (Ed.), *Changing Metal Cycles and Human Health* (pp. 113-141). Berlin: Springer-Verlag.
- Kontoghiorghes, G. J. (1995). Comparative efficacy and toxicity of desferrioxamine, deferiprone and other iron and aluminum chelating drugs. *Toxicology Letters*, 80, 1-18.
- Kotloff, R. M., Richman, P. S., Greenacre, J. K., & Rossman, M. D. (1993). Chronic beryllium disease in a dental laboratory technician. *American Review of Respiratory Disease*, 147, 205-207.
- Koudelkova, M., Vinsova, H., & Jedinakova-Krizova, V. (2003). Isotachophoretic determination of stability constants of Ho and Y complexes with diethylenetriaminepentaacetic acid and 1,4,7,10-tetraazadodecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid. *Journal of Chromatography A*, 990, 311-316.
- Kreiss, K., Mroz, M. M., Newman, L. S., Martyny, J., & Zhen, B. G. (1996). Machining risk of beryllium disease and sensitization with median exposures below 2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. *American Journal of Industrial Medicine*, 30, 16-25.
- Kreiss, K., Mroz, M. M., Zhen, B. G., Martyny, J. W., & Newman, L. S. (1993a). Epidemiology of beryllium sensitization and disease in nuclear workers. *American Review of Respiratory Disease*, 148, 985-991.
- Kreiss, K., Wasserman, S., Mroz, M. M., & Newman, L. S. (1993b). Beryllium disease screening in the ceramics industry - blood lymphocyte test-performance and

exposure-disease relations. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 35, 267-274.

Krivanek, N. & Reeves, A. L. (1972). The effect of chemical forms of beryllium on the production of the immunologic response. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 33, 45-52.

Kumberger, O., Riede, J., & Schmidbaur, H. (1992a). Beryllium coordination to bioligands - Isolation from aqueous-solution and crystal-structure of a hexanuclear complex of Be^{2+} with Glycolic Acid, $\text{Na}_4[\text{Be}_6(\text{Och}_2\text{Co}_2)_8]$. *Zeitschrift fur Naturforschung Section B-A Journal of Chemical Sciences*, 47, 1717-1720.

Kumberger, O., Riede, J., & Schmidbaur, H. (1992b). Metal-binding by amino-acids - preparation and crystal-structures of lithium, sodium, and potassium hydrogen bis-l-pyroglytamate. *Chemische Berichte-Recueil*, 125, 1829-1834.

Lehnert, N. M., Gary, R. K., Marrone, B. L., & Lehnert, B. E. (2001). Inhibition of normal human lung fibroblast growth by beryllium. *Toxicology*, 160, 119-127.

Lindenschmidt, R. C., Sendelbach, L. E., Witschi, H. P., Price, D. J., Fleming, J., & Joshi, J. G. (1986). Ferritin and in vivo beryllium toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 82, 344-350.

Loewe, S. (1926). Effect of combinations: mathematical basis of problem. *Archives of Experimental Pathology and Pharmacology*, 114, 313-326.

- Lombardi, G., Germain, C., Uren, J., Fiorillo, M. T., du Bois, R. M., Jones-Williams, W. *et al.* (2001). HLA-DP allele-specific T cell responses to beryllium account for DP-associated susceptibility to chronic beryllium disease. *Journal of Immunology*, 166, 3549-3555.
- Lum, K. R. & Gammon, K. L. (1985). Geochemical availability of some trace and major elements in surficial sediments of the Detroit river and western lake Erie. *Journal of Great Lakes Research*, 11, 328-338.
- Manahan, S. E. (2000). *Environmental Chemistry*. (7 ed.), CRC Lewis Publishers, Boca Raton, 850 pp.
- Mancuso, T. F. (1980). Mortality study of beryllium industry workers occupational lung-cancer. *Environmental Research*, 21, 48-55.
- Mancuso, T. F. & El-Attar, A. A. (1969). Epidemiological study of the beryllium industry. Cohort methodology and mortality studies. *Journal of Occupational Medicine*, 11, 422-434.
- Marques, H. M. (1991). Kinetics of the release of aluminum from human serum dialuminum transferrin to citrate. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 41, 187-193.
- Marx, J. J. & Burrell, R. (1973). Delayed hypersensitivity of beryllium compounds. *Journal of Immunology*, 111, 590-598.

- Mathur, R., Mathur, S., & Prakash, A. O. (1991). Effect of intramuscular administration of beryllium nitrate in the vital organ of rat. *Journal of Environmental Biology*, 12, 63-77.
- Mathur, R., Nirala, S., & Mathur, A. (2004). Comparative effectiveness of CaNa_3DTPA and tiron along with α -tocopherol against beryllium-induced biochemical alterations in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 42, 570-574.
- Mathur, S., Prakash, A. O., & Mathur, R. (2006). Biochemical and histopathological alterations in rats after intramuscular administration of beryllium nitrate. *Journal of Environmental Biology*, 12, 63-77.
- Mathur, S., Flora, S. J. S., Mathur, R., & Dasgupta, S. (1993). Mobilization and distribution of beryllium over the course of chelation-therapy with some polyaminocarboxylic acids in the rat. *Human & Experimental Toxicology*, 12, 19-24.
- Mathur, S., Flora, S. J. S., Mathur, R., Kannan, G. M., & Dasgupta, S. (1994). Beryllium-induced biochemical-alterations and their prevention following co-administration of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid or 2,3-dimercaptopropane sulfonate in rats. *Journal of Applied Toxicology*, 14, 263-267.
- Matsumiya, H., Hoshino, H., & Yotsuyanagi, T. (2001). A novel fluorescence reagent, 10-hydroxybenzo-h-quinoline-7-sulfonate, for selective determination of beryllium(II) ion at pg cm^{-3} levels. *Analyst*, 126, 2082-2086.

- May, P. M. & Williams, D. R. (1977). Computer simulation of chelation therapy Plasma mobilizing index as a replacement for effective stability constant. *FEBS Letters*, 78, 134-138.
- McCanlies, E. C., Kreiss, K., Andrew, M., & Weston, A. (2003). HLA-DPB1 and chronic beryllium disease: A huge review. *American Journal of Epidemiology*, 157, 388-398.
- Messer, R. L. W., Bishop, S., & Lucas, L. C. (1999). Effects of metallic ion toxicity on human gingival fibroblasts morphology. *Biomaterials*, 20, 1647-1657.
- Minoia, C., Sabbioni, E., Apostoli, P., Pietra, R., Pozzoli, L., Gallorini, M. *et al.* (1990). Trace-element reference values in tissues from inhabitants of the european community .1. A study of 46 elements in urine, blood and serum of italian subjects. *Science of the Total Environment*, 95, 89-105.
- Misra, U. K., Gawdi, G., Pizzo, S. V., & Lewis, J. G. (1999). Exposure of cultured murine peritoneal macrophages to low concentrations of beryllium induces increases in intracellular calcium concentrations and stimulates DNA synthesis. *Journal of Leukocyte Biology*, 65, 786-791.
- Newman, L. S. (1996). Immunology, genetics, and epidemiology of beryllium disease. *Chest*, 109, S40-S43.
- Newman, L. S. & Campbell, P. A. (1987). Comparison of phagocytic and bactericidal activity of resident and inflammatory mouse peritoneal and alveolar macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 42, 372.

- Newman, L. S., Kreiss, K., King, T. E., Seay, S., & Campbell, P. A. (1989). Pathologic and immunological alterations in early stages of beryllium disease: re-examination of disease definition and natural-history. *American Review of Respiratory Disease*, *139*, 1479-1486.
- Newman, L. S., Mroz, M. M., Maier, L. A., Daniloff, E. M., & Balkissoon, R. (2001). Efficacy of serial medical surveillance for chronic beryllium disease in a beryllium machining plant. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, *43*, 231-237.
- Nickellbrady, C., Hahn, F. F., Finch, G. L., & Belinsky, S. A. (1994). Analysis of K-Ras, P53 and C-Raf-1 mutations in beryllium-induced rat lung-tumors. *Carcinogenesis*, *15*, 257-262.
- Nirala, S., Bhadauria, M., Mathur, R., & Mathur, A. (2007). Amelioration of beryllium induced alterations in hepatorenal biochemistry and ultramorphology by co-administration of tiferron and adjuvants. *Journal of Biomedical Science*, *14*, 331-345.
- Nirala, S., Bhadauria, M., Mathur, R., & Mathur, A. (2008). Influence of tocopherol, propolis and piperine on therapeutic potential of tiferron against beryllium induced toxic manifestations. *Journal of Applied Toxicology*, *28*, 44-54.
- Ohman, L. O. & Martin, R. B. (1994). Citrate as the main small-molecule binding Al³⁺ in serum. *Clinical Chemistry*, *40*, 598-601.

- Okutani, T., Tsuruta, Y., & Sakuragawa, A. (1993). Determination of a trace amount of beryllium in water samples by graphite-furnace atomic-absorption spectrometry after preconcentration and separation as a beryllium acetylacetonate complex on activated carbon. *Analytical Chemistry*, 65, 1273-1276.
- OriginLab Corporation (2002). Origin (Version 7.0552), Northampton, MA, USA.
- Paschal, D. C. & Bailey, G. G. (1986). Determination of beryllium in urine with electrothermal atomic absorption using the L'vov platform and matrix modification. *Atomic Spectroscopy*, 7, 1.
- Peng, H. W. & Kuo, M. S. (2000). Determination of trace amounts of beryllium(II) in drinking water and of beryllium vapor in air by graphite-furnace atomic absorption spectrophotometry using acetylacetonate as a chelating agent. *Analytical Sciences*, 16, 157.
- Penninckx, W., Massart, D. L., & Verbeke, J. S. (1992). Effectiveness of palladium as a chemical modifier for the determination of lead in biological materials and foodstuffs by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 343, 526-531.
- Peter, M. M., Michael, J. W., David, R. W., & Andrew, M. C. (1984). Metal binding by pharmaceuticals. Part 5. Interaction of Cd(II), Ni(II) and Pb(II) with the intracellular hydrolysis products of the anti-tumour agent ICRF 159 and its inactive homologue ICRF 192. *Inflammation Research*, 15, 448-453.

- Price, D. J. & Joshi, J. G. (1984). Ferritin - protection of enzymatic-activity against the inhibition by divalent metal-ions invitro. *Toxicology*, 31, 151-163.
- Price, R. J. & Skilleter, D. N. (1985). Stimulatory and cytotoxic effects of beryllium on proliferation of mouse spleen lymphocytes in vitro. *Archives of Toxicology*, 56, 207-211.
- Rahil-Khazen, R., Bolann, B. J., & Ulvik, R. J. (2000). Trace element reference values in serum determined by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 38, 765-772.
- Recknagel, S., Chrissafidou, A., Alber, D., Rosick, U., & Bratter, P. (1997). Determination of beryllium in the primary cooling water of the Be(II) research reactor by inductively coupled plasma optical emission spectrometry and zeeman electrothermal atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 12, 1021-1025.
- Reeves, A. L. (1989). Beryllium - toxicological research of the last decade. *Journal of the American College of Toxicology*, 8, 1307-1313.
- Rhoads, K. & Sanders, C. L. (1985). Lung clearance, translocation, and acute toxicity of arsenic, beryllium, cadmium, cobalt, lead, selenium, vanadium, and ytterium oxides following deposition in rat lung. *Environmental Research*, 36, 359-378.
- Richeldi, L., Kreiss, K., Mroz, M. M., Zhen, B. G., Tartoni, P., & Saltini, C. (1997). Interaction of genetic and exposure factors in the prevalence of berylliosis. *American Journal of Industrial Medicine*, 32, 337-340.

- Richeldi, L., Sorrentino, R., & Saltini, C. (1993). HLA-DPB1 Glutamate-69 - A genetic marker of beryllium disease. *Science*, *262*, 242-244.
- Robinson, F. R., Schaffner, F., & Trachtenberg, E. (1968). Ultrastructure of lungs of dogs exposed to beryllium-containing dusts. *Archives of Environmental Health*, *17*, 193-203.
- Roitt, I. M. (1995). *Essential Immunology*. (Eighth ed.) Blackwell Scientific Publications, 243 pp.
- Ross, W. D., Pyle, J. L., & Sievers, R. E. (1977). Analysis for beryllium in ambient air particules by gas chromatography. *Environmental Science & Technology*, *11*, 467-471.
- Ross, W. D. & Sievers, R. E. (1968). Rapid ultra-trace determination of beryllium by gas chromatography. *Talanta*, *15*, 87-94.
- Rossman, M. D. (1996). Chronic beryllium disease: Diagnosis and management. *Environmental Health Perspectives*, *104*, 945-947.
- Rossman, M. D., Dauber, J. H., Epstein, P. E., Elias, J. A., & Daniele, R. P. (1982). Bronchoalveolar lavage in chronic berylliosis. *American Review of Respiratory Disease*, *125*, 52.
- Rossman, M. D., Kern, J. A., Elias, J. A., Cullen, M. R., Epstein, P. E., Preuss, O. P. *et al.* (1988). Proliferative response of bronchoalveolar lymphocytes to beryllium - A test for chronic beryllium disease. *Annals of Internal Medicine*, *108*, 687-693.

- Rossmann, R. & Barres, J. (1988). Trace element concentration in near-surface waters of the Great Lakes and methods of collection storage and analysis. *Journal of Great Lakes Research*, 14, 188-204.
- Saltini, C., Kirby, M., Trapnell, B. C., Tamura, N., & Crystal, R. G. (1990). Biased accumulation of lymphocytes-T with memory-type Cd45 leukocyte common antigen gene-expression on the epithelial surface of the human lung. *Journal of Experimental Medicine*, 171, 1123-1140.
- Saltini, C., Richeldi, L., Losi, M., Amicosante, M., Voorter, C., Van Den Berg-Loonen, E. *et al.* (2001). Major histocompatibility locus genetic markers of beryllium sensitization and disease. *European Respiratory Journal*, 18, 677-684.
- Saltini, C., Winestock, K., Kirby, M., Pinkston, P., & Crystal, R. G. (1989). Maintenance of alveolitis in patients with chronic beryllium disease by beryllium-specific helper T-cells. *New England Journal of Medicine*, 320, 1103-1109.
- Sancenon, F., Benito, A., Hernandez, F. J., Lloris, J. M., Martinez-Manez, R., Pardo, T. *et al.* (2002). Difunctionalised chemosensors containing electroactive and fluorescent signalling subunits. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 866-875.
- Sanchiz, J., Dominguez, S., Mederos, A., Brito, F., & Arrieta, J. M. (1997). Tetramethyl carboxylic acids derived from o-phenylenediamines as sequestering agents for iron(III): Thermodynamic studies. X-ray crystal structure of sodium aqua(4-chloro-1,2-phenylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetato)ferrate(III)-Water (1/1.5). *Inorganic Chemistry*, 36, 4108-4114.

- Sanchiz, J., Esparza, P., Villagra, D., Dominguez, S., Mederos, A., Brito, F. *et al.* (2002). Holo- and hemidirected lead(II) in the polymeric [Pb-4(μ -3,4-TDTA)₂(H₂O)₂]-4H₂O Complex. N,N,N',N'-tetraacetate ligands derived from o-phenylenediamines as sequestering agents for lead(II). *Inorganic Chemistry*, *41*, 6048-6055.
- Sanders, C. L., Cannon, W. C., & Powers, G. J. (1975). Toxicology of high-fired beryllium oxide inhaled by rodents. *Archives of Environmental Health*, *30*, 546-551.
- Sanderson, W. T., Ward, E. M., & Steenland, K. (2001a). Re: Response to criticisms of "Lung cancer case-control study of beryllium workers" Am. J. Ind. Med. 2001, 39:133-144. *American Journal of Industrial Medicine*, *40*, 286-288.
- Sanderson, W. T., Ward, E. M., Steenland, K., & Petersen, M. R. (2001b). Lung cancer case-control study of beryllium workers. *American Journal of Industrial Medicine*, *39*, 133-144.
- Sanz-Medel, A., Soldado Cabezuelo, A. B., Milacic, R., & Polak, T. B. (2002). The chemical speciation of aluminium in human serum. *Coordination Chemistry Reviews*, *228*, 373-383.
- Sawyer, R. T., Kittle, L. A., Hamada, H., Newman, L. S., & Campbell, P. A. (2000). Beryllium-stimulated production of tumor necrosis factor-alpha by a mouse hybrid macrophage cell line. *Toxicology*, *143*, 235-247.

- Sawyer, R. T., Maier, L. A., Kittle, L. A., & Newman, L. S. (2002). Chronic beryllium disease: a model interaction between innate and acquired immunity. *International Immunopharmacology*, 2, 249-261.
- Scarrow, R. C., Riley, P. E., Abudari, K., White, D. L., & Raymond, K. N. (1985). Ferric ion sequestering agents .13. Synthesis, structures, and thermodynamics of complexation of cobalt(III) and Iron(III) Tris complexes of several chelating hydroxypyridinones. *Inorganic Chemistry*, 24, 954-967.
- Schecher, W. D. & McAvoy, D. C. (2003). MINEQL+ (Version 4.5). Hallowell, ME.
- Schepers, G. W. H. (1964). Biological action of beryllium: Reaction of the monkey to inhaled aerosols. *Industrial Medicine and Surgery*, 33, 1-16.
- Schmidt, W. F. & Dietl, F. (1987). Determination of beryllium in soils by means of flameless atomic-absorption with zirconium-coated graphite tubes. *Fresenius Zeitschrift fur Analytische Chemie*, 326, 40-42.
- Schramel, P. & Li-Qiang, X. (1982). Determination of beryllium in the parts-per-billion range in three standard reference materials by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Analytical Chemistry*, 54, 1333-1336.
- Schroeder, H. A. & Mitchener, M. (1975). Life-term studies in rats: Effects of aluminium, barium, beryllium, and tungsten. *Journal of Nutrition*, 105, 421-427.
- Schubert, J. & Rosenthal, M. W. (1959). Chemical approaches to the treatment of beryllium poisoning. *A.M.A. Archives of Industrial Health*, 19, 87-96.

- Scott, B. L., Wang, Z. L., Marrone, B. L., & Sauer, N. N. (2003). Potential binding modes of beryllium with the class II major histocompatibility complex HLA-DP: a combined theoretical and structural database study. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 94, 5-13.
- Seiler, H. G., Sigel, H., & Sigel, A. (1988). *Handbook on toxicity of inorganic compounds*. New York: Marcel Dekker. 753 pp.
- Sendelbach, L. E., Tryka, A. F., & Witschi, H. (1989). Progressive lung injury over a one-year period after a single inhalation exposure to beryllium sulfate. *American Review of Respiratory Disease*, 139, 1003-1009.
- Sendelbach, L. E. & Witschi, H. P. (1987). Protection by parenteral iron administration against the inhalation toxicity of beryllium sulfate. *Toxicology Letters*, 35, 321-325.
- Sharma, P., Johri, S., & Shukla, S. (2000). Beryllium-induced toxicity and its prevention by treatment with chelating agents. *Journal of Applied Toxicology*, 20, 313-318.
- Sharma, P., Shah, Z. A., & Shukla, S. (2002). Protective effect of Tiron (4,5-dihydroxybenzene-1,3-disulfonic acid disodium salt) against beryllium-induced maternal and fetal toxicity in rats. *Archives of Toxicology*, 76, 442-448.
- Sharma, P. & Shukla, S. (2000). Comparative effectiveness of Tiron (4,5-Dihydroxy benzene 1,3-disulphonic acid disodium salt) and CaNa₂EDTA with time after beryllium poisoning. *Indian Journal of Experimental Biology*, 38, 785-790.

- Shrivastava, S., Mathur, S., Bharadwaj, S., & Mathur, R. (1995). Beryllium induced biochemical alterations and their prevention following administration of ethylene glycol bis (2-aminoethyl ether) tetraacetic acid in albino mice. *Proceedings of the Academy of Environmental Biology*, 4, 99-107.
- Shukla, S., Sharma, P., Johri, S., & Mathur, R. (1998). Influence of chelating agents on the toxicity and distribution of beryllium in rats. *Journal of Applied Toxicology*, 18, 331-335.
- Sigurskjold, B. W. (2000). Exact analysis of competition ligand binding by displacement isothermal titration calorimetry. *Analytical Biochemistry*, 277, 260-266.
- Smith, C. K. & Windsor, W. T. (2007). Thermodynamics of nucleotide and non-ATP-competitive inhibitor binding to MEK1 by circular dichroism and isothermal titration calorimetry. *Biochemistry*, 46, 1358-1367.
- Smith, R. M. & Martell, A. E. (2001). NIST critically selected stability constants of metal complexes (Version 6.0). Gaithersburg, MD.: National Institute of Standards and Technology.
- Snyder, J. A., Weston, A., Tinkle, S., & Demchuck, E. (2003). Electrostatic potential on human leukocyte antigen: implications for putative mechanism of chronic beryllium disease. *Environmental Health Perspectives*, 111, 1827-1834.
- Soldado Cabezuelo, A. B., Bayon, M. M., Gonzalez, E. B., Alonso, J. I., & Sanz-Medel, A. (1998). Speciation of basal aluminium in human serum by fast protein liquid

chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection. *Analyst*, 123, 865-869.

Soldado Cabezuelo, A. B., Gonzalez, E. B., & Sanz-Medel, A. (1997). Quantitative studies of aluminium binding species in human uremic serum by fast protein liquid chromatography coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analyst*, 122, 573-577.

Stange, A. W., Furman, F. J., & Hilmas, D. E. (1996). Rocky flats beryllium health surveillance. *Environmental Health Perspectives*, 104, 981-986.

Steenland, K. & Ward, E. (1992). Lung cancer incidence among patients with beryllium disease: a cohort mortality study. *Journal of National Cancer Institute*, 83, 1380-1385.

Stefaniak, A. B., Guilmette, R. A., Day, G. A., Hoover, M. D., Breysse, P. N., & Scripsick, R. C. (2005). Characterization of phagolysosomal simulant fluid for study of beryllium aerosol particle dissolution. *Toxicology in Vitro*, 19, 123-134.

Stefaniak, A. B., Hoover, M. D., Day, G. A., Dickerson, R. M., Peterson, E. J., Kent, M. S. *et al.* (2004). Characterization of physicochemical properties of beryllium aerosols associated with prevalence of chronic beryllium disease. *Journal of Environmental Monitoring*, 6, 523-532.

Steifel, Th., Schulze, K., & Tolg, G. (1980a). Analysis of trace elements distributed in blood. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 300, 189-196.

- Steifel, Th., Schulze, K., Zorn, H., & Tolg, G. (1980b). Toxicokinetic and toxicodynamic studies of beryllium. *Archives of Toxicology*, 45, 81-92.
- Sterner, J. H. & Eisenbud, M. (1951). Epidemiology of beryllium intoxication. *Archives of Industrial Hygiene and Occupational Medicine*, 4, 123-151.
- Stokes, R. F. & Rossman, M. D. (1991). Blood-cell proliferation response to beryllium - analysis by receiver-operating characteristics. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 33, 23-28.
- Stokinger, H. E., Sprague, G. F., & Hall, R. H. (1950). Acute inhalation toxicity of beryllium. I. Four definitive studies of beryllium sulfate at exposure concentration of 100, 50, 10 and 1 mg per cubic meter. *Archives of Industrial Hygiene and Occupational Medicine*, 1, 379-397.
- Stout, R. D. & Suttles, J. (1997). T cell signaling of macrophage function in inflammatory disease. *Frontiers in Bioscience.*, 2, d197-d206.
- Stubbs, J., Argyris, E., Lee, C. W., Monos, D., & Rossman, M. D. (1996). Genetic markers in beryllium hypersensitivity. *Chest*, 109, S45.
- Styris, D. L., Prell, L. J., & Redfield, D. A. (1991a). Mechanisms of palladium-induced stabilization of arsenic in electrothermal atomization atomic-absorption spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 63, 503-507.
- Styris, D. L., Prell, L. J., Redfield, D. A., Holcombe, J. A., Bass, D. A., & Majidi, V. (1991b). Mechanisms of selenium vaporization with palladium modifiers using

electrothermal atomization and mass-spectrometric detection. *Analytical Chemistry*, 63, 508-517.

Sutton, M. & Burastero, S. R. (2003). Beryllium chemical speciation in elemental human biological fluids. *Chemical Research in Toxicology*, 16, 1145-1154.

Talmard, C., Bouzan, A., & Faller, P. (2007). Zinc binding to amyloid-beta: Isothermal titration calorimetry and Zn competition experiments with Zn sensors. *Biochemistry*, 46, 13658-13666.

Tarazi, L., Choi, H., Mason, J. C., Sowell, J., Streckowski, L., & Patonay, G. (2002). Characterization of a novel crown ether-bearing near-infrared heptamethine cyanine dye. A study of fluorescence quenching by lithium. *Microchemical Journal*, 72, 55-62.

Taylor, M. L. & Arnold, E. L. (1971). Ultratrace determination of metals in biological specimens quantitative determination of beryllium by gas chromatography. *Analytical Chemistry*, 42, 1328-1332.

Tellinghuisen, J. (2005). Optimizing experimental parameters in isothermal titration calorimetry. *Journal of Physical Chemistry B*, 109, 20027-20035.

Tinkle, S., Kittle, L., Schwitters, P. W., Addison, J. R., & Newman, L. S. (1996). Beryllium stimulates release of T helper 1 cytokines interleukin-2 and interferon gamma from BAL cells in chronic beryllium disease. *Chest*, 109, S5-S6.

- Togna, G., Togna, A. R., Russo, P., & Caprino, L. (1997). Toxicological effects of beryllium on platelets and vascular endothelium. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 144, 262-267.
- Turnbull, W. B. & Daranas, A. H. (2003). On the value of c : can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? *Journal of the American Chemical Society*, 125, 14859-14866.
- USEPA (1987). *Health assessment document for beryllium* North Carolina: Environmental criteria and assessment office.
- USEPA (1998a). *Beryllium and Compounds*. North Carolina: Office of Air Quality Planning & Standards, Research Triangle Park.
- USEPA (1998b). *Toxicological review of beryllium and compounds* (Rep. No. 7440-41-7). Washington, DC: Environmental Protection Agency.
- VanOrdstrand, H. S., Hughes, R., & DeNardi, J. M. (1945). Beryllium poisoning. *Journal of American Medical Association*, 129, 1084-1090.
- Varian. (1988). Analytical methods for graphite tube atomizers. [85-100848-00]. Mulgrave, Victoria, Australia, Varian.
- Volynsky, A. B. & Kryvan, V. (1996). Comparison of various forms of palladium used as chemical modifiers for the determination of selenium by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 11.

- Voth-Beach, L. M. & Shrader, D. E. (1987). Investigations of a reduced palladium chemical modifier for graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2, 45-50.
- Wagner, W. D., Groth, D. H., & Holtz, J. L. (1969). Comparative chronic inhalation toxicity of beryllium ores, bertrandite and beryl, with production of pulmonary tumors by beryl. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 15, 10-29.
- Wagoner, J. K., Infante, P. F., & Apfeldorf, R. B. (1980). Toxicity of vinyl-chloride and polyvinyl-chloride as seen through epidemiologic observations. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 6, 1101-1107.
- Wang, H. C., Peng, H. W., & Kuo, M. S. (2001). Determination of beryllium and selenium in human urine and of selenium in human serum by graphite-furnace atomic absorption spectrophotometry. *Analytical Sciences*, 17, 527-532.
- Wang, Z. L., White, P. S., Petrovic, M., Tatum, O. L., Newman, L. S., Maier, L. A. *et al.* (1999). Differential susceptibilities to chronic beryllium disease contributed by different Glu(69) HLA-DPB1 and-DPA1 alleles. *Journal of Immunology*, 163, 1647-1653.
- Ward, E., Okun, A., Ruder, A., Fingerhut, M., & Steenland, K. (1992). A mortality study of workers at 7 beryllium processing plants. *American Journal of Industrial Medicine*, 22, 885-904.
- Wei-Min, Y. & Zhe-Ming, N. (1994). The possibility of standardless analysis in graphite furnace atomic absorption spectrometry: determination of beryllium in

environmental and biological samples. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 49, 1067-1079.

WHO (1990). *Beryllium international programme on chemical safety* (Rep. No. 106). Geneva: World Health Organization.

Williams, B. E. & Killeter, D. N. (1983). Inhibition of nuclear-protein phosphorylation in vitro by beryllium. *Bioscience Reports*, 3, 955-962.

Williams, W. J. & Kelland, D. (1987). The diagnosis of chronic beryllium disease by laser ion mass analysis. *Chest*, 91, 312.

Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F., & Lin, L. N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Analytical Biochemistry*, 179, 131-137.

Witter, A. E., Hutchins, D. A., Butler, A., & Luther, G. W. (2000). Determination of conditional stability constants and kinetic constants for strong model Fe-binding ligands in seawater. *Marine Chemistry*, 69, 1-17.

Wolf, W. R., Taylor, M. L., Hughes, B. M., & Sievers, R. E. (1972). Determination of chromium and beryllium at the picogram level by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 44, 616.

Wong, C. Y. & Woollins, J. D. (1994). Beryllium coordination chemistry. *Coordination Chemistry Reviews*, 130, 243-273.

- Xiao-Quan, S., Zheng, Y., & Zhe-Ming, N. (1989). Determination of beryllium in urine by graphite-furnace atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 217, 271-280.
- Zhang, Y. L. & Zhang, Z. Y. (1998). Low-affinity binding determined by titration calorimetry using a high-affinity coupling ligand: A thermodynamic study of ligand binding to protein tyrosine phosphatase 1B. *Analytical Biochemistry*, 261, 139-148.
- Zhuang, Z. X., Yang, P. G., Luo, J., Wang, X. R., & Huang, B. L. (1991). Study of palladium and citric-acid as a mixed matrix modifier for the determination of the volatile elements zinc and cadmium by graphite-furnace atomic-absorption spectrometry. *Canadian Journal of Applied Spectroscopy*, 36, 9-14.
- Zissu, D., Binet, S., & Cavelier, C. (1996). Patch testing with beryllium alloy samples in guinea pigs. *Contact Dermatitis*, 34, 196-200.
- Zorn, H., Stiefel, T., & Porcher, H. (1986). Clinical and analytical follow-up of 25 persons exposed accidentally to beryllium. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 12, 163-171.

Annexe des figures

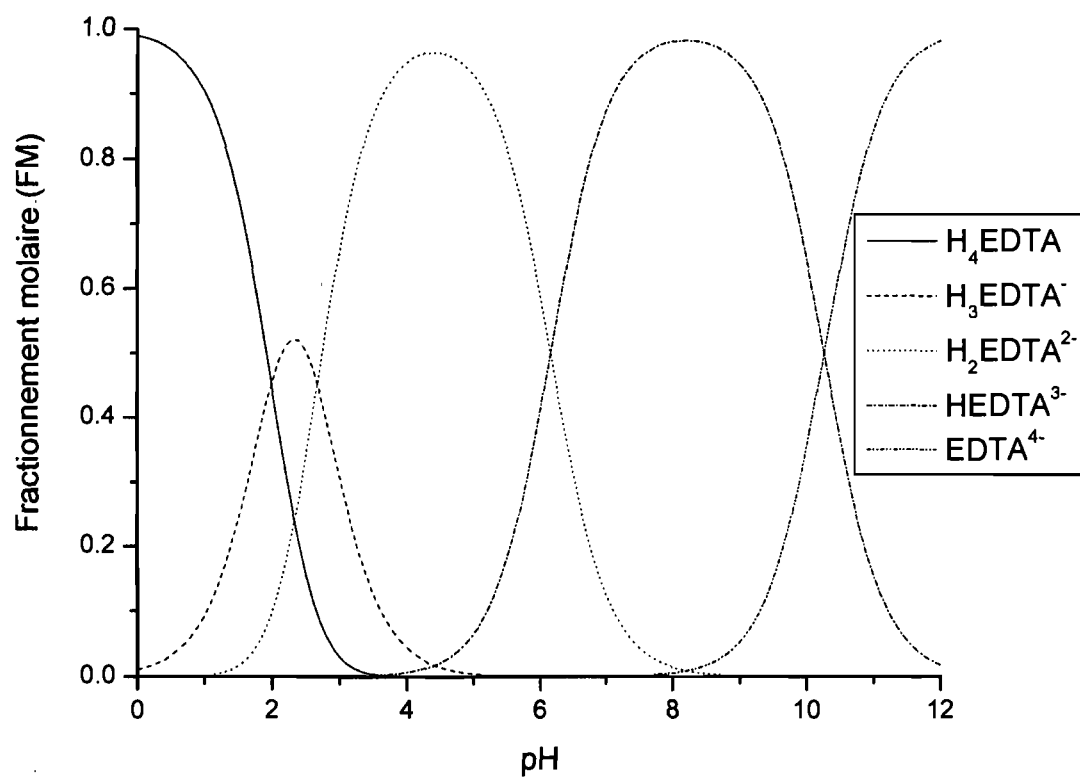


Figure A-1. Fractionnement molaire de l'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA) en fonction du pH.

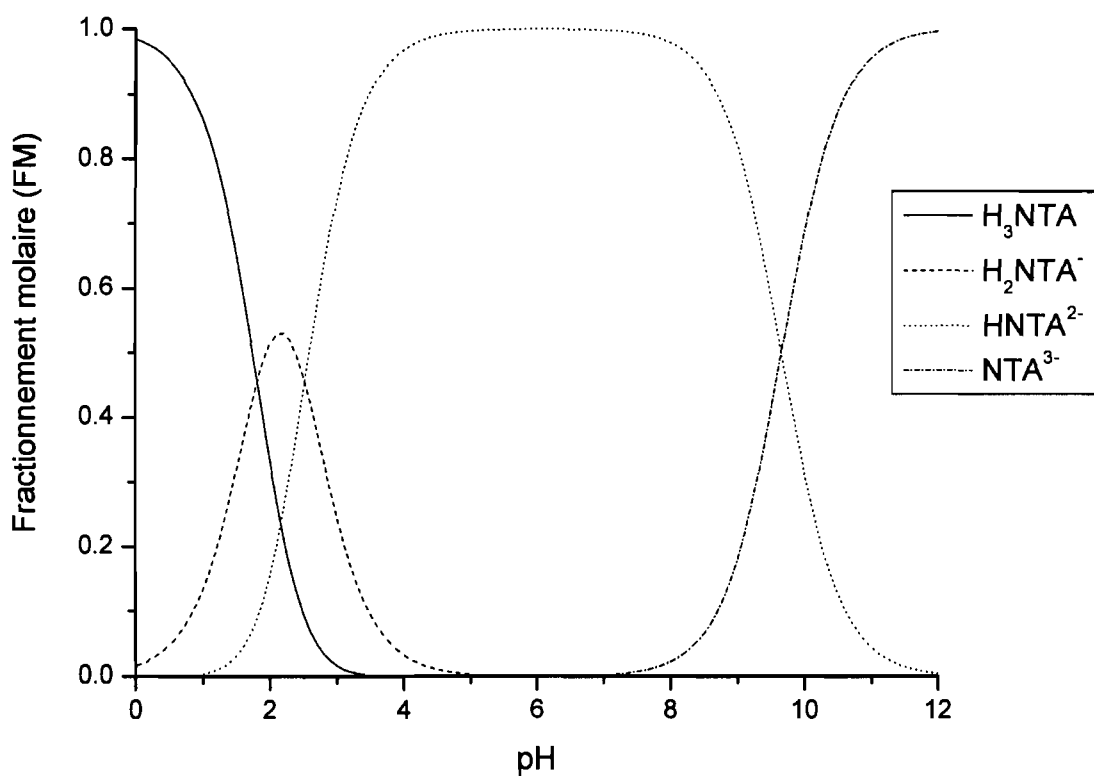


Figure A-2. Fractionnement molaire de l'acide nitrilotriacétique (NTA) en fonction du pH.

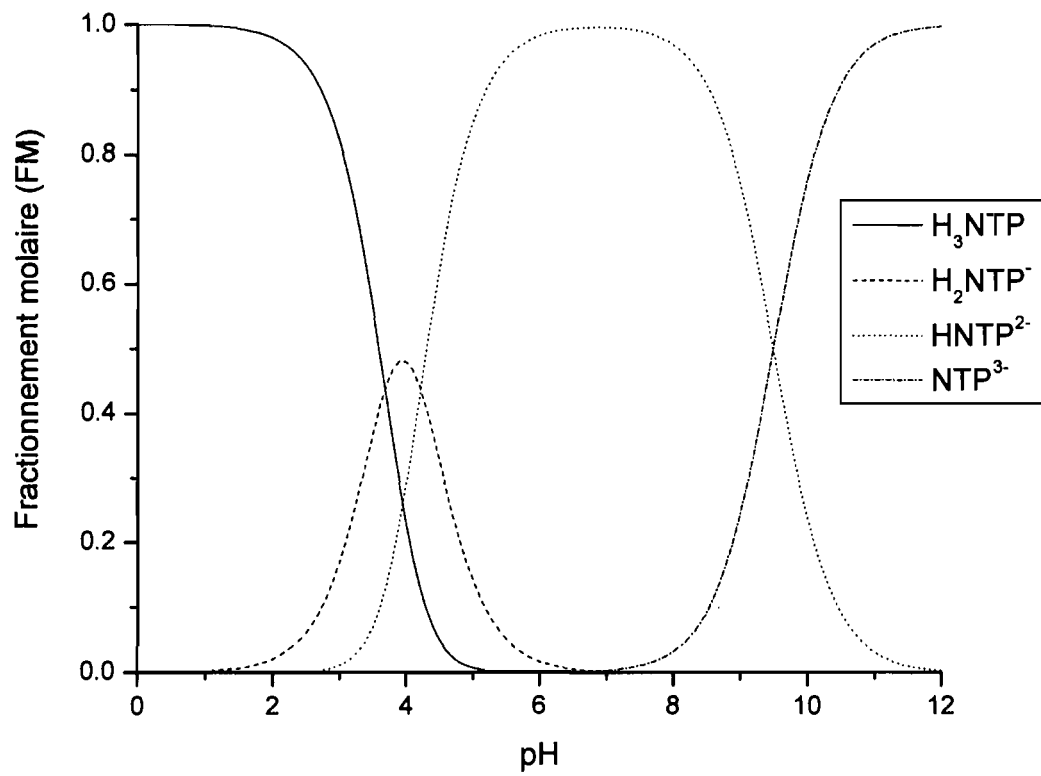


Figure A-3. Fractionnement molaire de l'acide nitrilotripropionique (NTP) en fonction du pH.

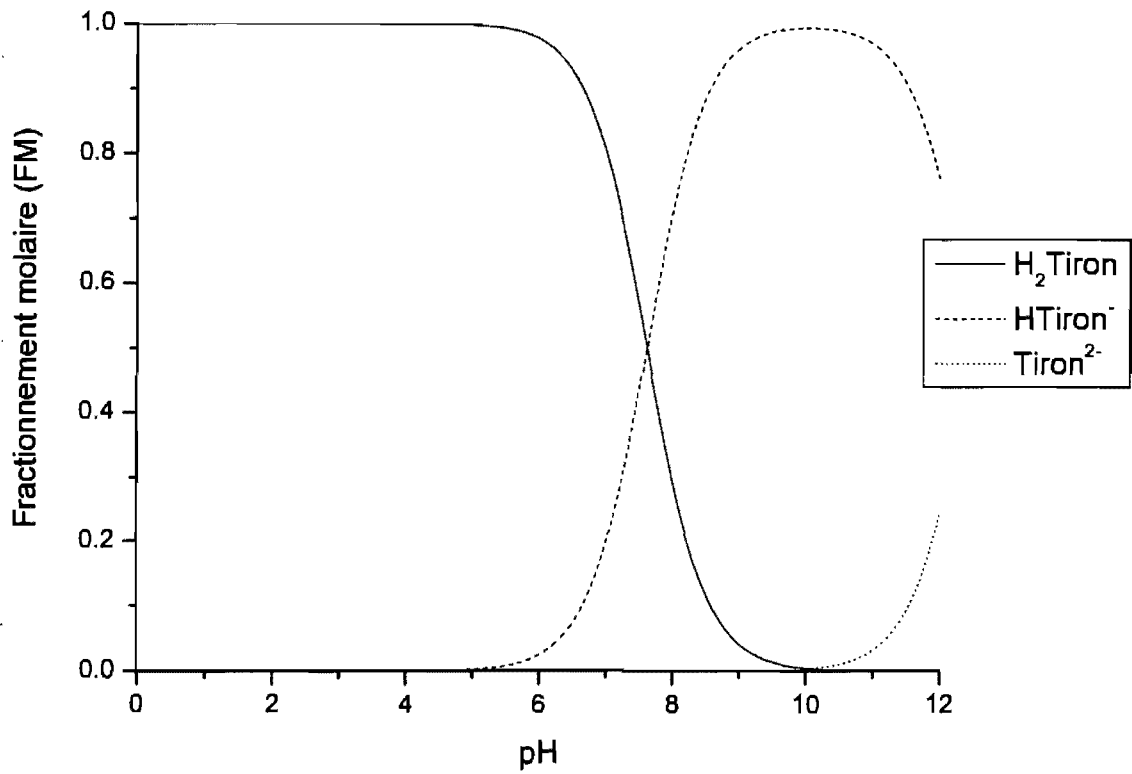


Figure A-4. Fractionnement molaire de l'acide 4,5-dihydroxy-1,3-benzènedisulfonique (tiron) en fonction du pH.

Annexe des Tableaux

Tableau A-1. Données thermodynamiques des agents complexants EDTA, NTA, NTP et tiron.

	Constante de protonation (M ⁻¹) [†]		Enthalpie de protonation (kcal mol ⁻¹) [†]	
EDTA	K1	2.3E+10	H1	-5.6
	K2	1.4E+06	H2	-4.2
	K3	4.9E+02	H3	+1.5
	K4	1.0E+02	H4	+0.3
	K5	3.2E+01	H5	+0.5
	K6	2.5E+00	H6	+0.2
NTA	K1	4.6E+09	H1	-4.6
	K2	3.3E+02	H2	+0.2
	K3	6.5E+01	H3	+0.4
	K4	1.0E+01	H4	+0.4
NTP	K1	5.0E+12	H1	-8.9
	K2	2.0E+07	H2	+1.5
	K3	7.9E+05	H3	+1.6
	K4	4.2E+04	H4	+1.1
tiron	K1	3.2E+12	H1	-0.1
	K2	2.3E+10	H2	-5.0

[†] Les valeurs des constantes et enthalpie de protonation sont obtenues du National Institut of Standard and Technology (NIST).