

**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

***Détermination du béryllium dans les cheveux humains non exposés,  
les poils et les os de souris exposées à des poussières de béryllium***

par

Katherine Drolet-Vives

Département de chimie

Faculté des Arts et Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de  
l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.) en chimie

Mars 2009

© Katherine Drolet-Vives, 2009



Université de Montréal  
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé : *Détermination du béryllium dans les cheveux humains non exposés, les poils et les os de souris exposées à des poussières de béryllium.*

présenté par :

Katherine Drolet-Vives

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

**Kevin James Wilkinson**  
président-rapporteur  
(Département de chimie, Université de Montréal)

**Sébastien Sauvé**  
directeur de recherche  
(Département de chimie, Université de Montréal)

**Joseph Zayed**  
codirecteur de recherche  
(Département de santé environnementale et santé au travail, Université de Montréal)

**Marius D'Amboise**  
membre du jury  
(Département de chimie, Université de Montréal)

## Résumé du mémoire

L'exposition de travailleurs à des poussières de béryllium (Be) peut entraîner des problèmes de santé. Malheureusement, il n'y a pas d'indicateur biologique qui permette de mesurer adéquatement l'exposition au Be. Cette étude évalue donc le potentiel des cheveux et des os à cette fin. La première partie de cette recherche a été d'optimiser la méthode de préparation des cheveux puisque la grande variabilité des résultats est principalement due à l'absence de méthode standardisée pour leur nettoyage. Le protocole proposé a démontré l'efficacité de la méthode proposée puisque la teneur en Be dans les cheveux lavés correspond aux concentrations présentées dans la littérature pour des populations non exposées et urbaines. Dans la deuxième partie de cette recherche, nous avons vérifié le niveau d'accumulation de Be dans les poils et les os de souris exposées durant trois semaines par voie oronasale à environ  $250 \mu\text{g m}^{-3}$  de Be. Un groupe ( $n = 40$ ) a été exposé à des particules dont le diamètre massique médian (MMAD) était de  $1,5 \mu\text{m}$  et un autre ( $n = 35$ ) l'a été à des particules dont le MMAD était de  $4,1 \mu\text{m}$ . Les résultats obtenus ont été comparés à ceux d'un groupe contrôle, les poils et les os des souris exposées étaient significativement différents des contrôles ( $p < 0,0001$  et  $p < 0,001$  respectivement). Les teneurs de Be dans les os ont également permis de démontrer que plus les particules inhalées sont petites, plus elles s'accumulent. L'ensemble des résultats confirme le potentiel des poils et des os comme indicateurs biologiques de l'exposition au Be.

**Mots-clés :**

béryllium, cheveux humains, nettoyage, digestion, poils et os de souris,  
exposition par inhalation, ICP-AES

### Summary of the master's thesis

Occupational exposure to beryllium (Be) powder may lead to health problem. Unfortunately, there is no suitable biological indicator to monitor the Be exposure. This study evaluates the potential of hair and bones in this respect. The first part of this study is to optimize the hair preparation since the large variability of the results is mainly due to the lack of standardized method for the washing procedure. The proposed protocol has demonstrated the effectiveness of the proposed method because the Be content in washed hair corresponds to the concentration found in the literature for non-exposed and urban population. The second part of this study we have verified the accumulation's level of Be in the hair and the bones of mice exposed oronasally over three weeks to approximately  $250 \mu\text{g m}^{-3}$  of Be. A group ( $n = 40$ ) was exposed to particles with a mass median aerodynamic diameter (MMAD) of  $1.5 \mu\text{m}$  and another group ( $n = 35$ ) was to particles with MMAD of  $4.1 \mu\text{m}$ . The obtained results were compared to a control group. The hair and the bones of exposed mice were significantly different from the controls ( $p < 0.0001$  and  $p < 0.001$  respectively). The beryllium content in the bones has also proven that when the inhaled particles are smaller, the accumulation will be more important ( $p < 0.01$ ). The set of results confirm the potential of hair and bones as suitable biological indicators of Be exposure.

#### Keywords :

Beryllium, human hair, washing, digestion, mice hair and bones,  
inhalation exposure, ICP-AES

**Table des matières:**

Identification du jury.....	ii
Résumé du mémoire.....	iii
Mots-clés.....	iv
Summary of the master's thesis.....	v
Keywords.....	v
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xi
Dédicace.....	xiv
Remerciements.....	xv
Avant-propos.....	xvi
<b><u>Chapitre 1</u> : Introduction</b>	
1.1 Béryllium.....	1
1.2 Le modèle animal.....	6
1.3 Cheveux.....	7
1.4 Les os.....	13
1.5 Objectifs et Applications.....	14
<b><u>Chapitre 2</u> : Méthodologie</b>	
2.1 Le modèle animal.....	16
2.2 Les cheveux.....	19

2.3 Les os.....	21
2.4 Méthode d'analyse chimique du Be.....	21
<b><u>Chapitre 3</u> : Using hair as an indicator of beryllium exposure.....</b>	<b>23</b>
Notes sur l'article.....	24
Abstract.....	25
Keywords.....	25
1. Introduction.....	26
2. Materials and methods.....	32
2.1 Sample preparation.....	32
2.2 Analysis.....	34
3. Results and discussion.....	36
4. Conclusion.....	43
Acknowledgments.....	44
<b><u>Chapitre 4</u> : Assessment of hair and bone as potential bioindicators of beryllium exposure.....</b>	<b>45</b>
Notes sur l'article.....	46
Abstract.....	47
Keywords.....	48
Introduction.....	49
Methods.....	53
Animals & exposure.....	53
Hair & Bones preparation.....	54
Analysis.....	56



Statistical analysis.....	57
Results and discussion.....	58
Cóncclusion.....	63
Acknowledgments.....	64
<u>Chapitre 5</u> : Conclusion.....	65
<u>Références</u> .....	68
<u>Annexe 1</u> : Données brutes des concentrations ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) de Be dans les cheveux humains.....	Annexe - i
<u>Annexe 2</u> : Le recouvrement et la concentration ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) de Be dans le CRM de cheveux.....	Annexe - v
<u>Annexe 3</u> : Données brutes des concentrations ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) de Be dans les poils de souris.....	Annexe - vii
<u>Annexe 4</u> : Données brutes des concentrations ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) de Be dans les os de souris.....	Annexe - ix
<u>Annexe 5</u> : La concentration ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) de Be et le recouvrement dans le CRM de calcaire synthétique.....	Annexe - xi

## Liste des tableaux

<u>Table 1</u> : Instrument operating conditions.....	35
<u>Table 2</u> : The method detection limit and limit of quantitation in solution and in hair.....	37
<u>Table 1</u> : Instrument operating conditions.....	57
<u>Table 2</u> : Average Be concentration ( $\mu\text{g Be kg}^{-1}$ hair $\pm$ Standard Deviation) in washed and unwashed mice hair (control n = 7, unwashed Be-I n = 5, unwashed Be-F n = 5, washed Be-I n = 20, washed Be-F n = 28, washed Be-F (3w) n = 5) and bones (control n = 9, Be-I n = 30, Be-F n = 31, Be-F (3w) n = 5) .....	59
<u>Table 3</u> : Be concentration ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) in CRM of hair (GBW 07601 n = 58) and synthetic limestone (GBW 07712 n = 15, GBW 07713 n = 15).....	58

**Liste des figures :**

<u>Figure 1</u> : Chambre d'inhalation.....	18
<u>Figure 2</u> : Combinaison complète.....	18
<u>Figure 1</u> : Concentration of Be ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) with their relative standard deviation (Person A: n = 13 for washed hair samples, n = 1 for unwashed hair sample) (Person B: n = 11 for washed hair samples, n = 1 for unwashed hair sample).....	36
<u>Figure 2</u> : Frequency distribution of each washed hair Be concentration for the 2 individuals (Person A n = 13; Person B n = 11).....	38
<u>Figure 3</u> : Average concentration of Be in natural hair with their standard deviation (Person A: n = 13; Person B: n = 11) compared to values obtained in two references.....	39
<u>Figure 5</u> : The recovery of beryllium for the sample addition in the hair digests. Hair samples from 5 individuals were employed randomly total of 114 samples were digested in 1.000 mL $\text{HNO}_3$ and 1.000 mL $\text{H}_2\text{O}_2$ 30% (v/v).....	40

**Liste des abréviations**

<b>ABD :</b>	béryllose aiguë / <i>Acute Beryllium Disease</i>
<b>ACGIH :</b>	<i>American Conference of Governmental Industrial Hygienists</i>
<b>AIEA / IAEA :</b>	Agence Internationale de l'Énergie Atomique / <i>International Atomic Energy Agency</i>
<b>BALFs :</b>	fluide recueilli par un lavage bronchoalvéolaire / <i>BronchoAlveolar Lavage Fluids</i>
<b>Be :</b>	Béryllium / <i>Beryllium</i>
<b>Be-F :</b>	Béryllium fin / <i>fine Beryllium</i>
<b>Be-I :</b>	Béryllium inhalable / <i>inhalable Beryllium</i>
<b>BeLPT :</b>	Test de prolifération lymphocytaire / <i>Beryllium Lymphocyte Proliferation Test</i>
<b>BeS :</b>	sensibilisation au Be / <i>Be Sensitization</i>
<b>CBD :</b>	béryllose pulmonaire chronique / <i>Chronic Beryllium Disease</i>
<b>CIRC / IARC :</b>	Centre International de Recherche sur le Cancer / <i>International Agency for Research on Cancer</i>
<b>CRM :</b>	matériel de référence certifié / <i>Certified Reference Material</i>
<b>CT-scan :</b>	tomographie axiale calculée par ordinateur / <i>Computed Tomography</i>
<b>dd-H<sub>2</sub>O :</b>	eau distillée-déminéralisée ultra pure / <i>ultra pure Distilled-Deionized water</i>
<b>EPA :</b>	<i>United States Environmental Protection Agency</i>

<b>GF-AAS :</b>	Spectroscopie d'absorption atomique à fournaise graphite / <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy</i>
<b>HDPE :</b>	polyéthylène à haute densité / <i>High-Density PolyEthylene</i>
<b>IARC :</b>	Centre International de Recherche sur le Cancer / <i>International agency for research on cancer</i>
<b>ICP-AES :</b>	spectrométrie d'émission atomique à plasma induit / <i>Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry</i>
<b>ICP-MS :</b>	spectrométrie de masse à plasma induit / <i>Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry</i>
<b>IRSST :</b>	Institut de Recherche Robert-Sauvé en Santé et en Sécurité au Travail
<b>LOAEL :</b>	la plus faible dose qui produit un effet observable / <i>Lowest Observed Adverse Effect Level</i>
<b>LOD / MDL :</b>	limite de détection / <i>Method Limit of Detection</i>
<b>MMAD :</b>	diamètre aérodynamique massique médian / <i>Mass Median Aerodynamic Diameter</i>
<b>MQL :</b>	limite de quantification / <i>Method limit of quantitation</i>
<b>OMS / WHO :</b>	Organisation Mondiale de la Santé / <i>World Health Organisation</i>
<b>OSHA :</b>	<i>Occupational Safety and Health Association</i>
<b>% RSD :</b>	Coefficient de variation exprimé en pourcentage / <i>Relative Standard Deviation expressed as a percentage</i>
<b>-SH :</b>	groupements sulfhydriles

**TLV<sup>®</sup>**: Valeur limite d'exposition professionnelle /  
*Threshold Limit Value*

*À Simon et à ma famille sans qui ce  
mémoire n'aurait pas vu le jour.*

## Remerciements

Je voudrais remercier en tout premier lieu M. Sébastien Sauvé, le directeur de cette recherche, pour son aide, ses conseils et ses bonnes idées fournis tout au long de la réalisation de ce projet.

Je tiens également à remercier M. Joseph Zayed, le codirecteur de cette recherche, pour tout le soutien qu'il m'a apporté tout au long de cette recherche et plus particulièrement durant la rédaction. Son aide a été grandement appréciée.

Je tiens aussi à remercier tout le groupe de recherche de chimie environnementale de l'Université de Montréal, et plus particulièrement Chadi Stephan, Pedro Alejandro Segura et Lucie Laforte. Je souhaite souligner l'excellent travail de l'équipe du groupe de recherche de santé et sécurité au travail, Lise Gareau, Julienne Lama, Louis Zayed et Caroline Muller.

Je désire ardemment remercier mes parents, Marta Vives et Roger Drolet, pour leur confiance ainsi que leur soutien moral et financier.

J'aimerais aussi remercier Simon Landry pour son soutien, sa compréhension, sa patience et son amour tout au long de mes études.

Finalement, je remercie Yvonne Jost, Montserrat Gaba Carbonell, Alexandre Drolet-Vives, Fernando Vives et Joz e Plante pour tout le soutien et les encouragements qu'ils m'ont apportés tout au long de ce projet.



## **Avant-propos**

Cette étude a débuté par une recherche bibliographique approfondie des études effectuées dans mon domaine d'étude et en toxicologie. Les principaux sujets recherchés ont été : les procédures de nettoyage des poils d'animaux ou des cheveux humains les plus utilisées, les protocoles de digestion des cheveux et des os et tout ce qui a trait au béryllium. Mon travail de recherche a inclus : la conception de la procédure expérimentale, la réalisation de toutes les étapes de préparation des échantillons (de la collecte des cheveux, des poils et des os à l'analyse des échantillons), la compilation et le traitement des résultats obtenus et, finalement, la rédaction des articles et du mémoire.

Cette étude s'intègre à un projet plus vaste où le fluide du lavage bronchoalvéolaire, les poumons et la rate ont été utilisés pour déterminer s'il y avait une réponse immunologique spécifique au Be par la cytométrie en flux.

La contribution de Sébastien Sauvé et de Joseph Zayed a été de fournir les ressources financières ainsi que le matériel nécessaire, en plus de me conseiller et de corriger les articles et le mémoire.

## Chapitre 1 : Introduction

### 1.1 Béryllium

Le béryllium (numéro CAS : 7440-41-7) est un élément très utile dans plusieurs industries parce qu'il a plusieurs propriétés exceptionnelles [Newman, 1998]. Tout d'abord, c'est le métal stable dans l'air qui a le plus petit numéro atomique [Rayner-Canham, 2001]. Il a aussi une très grande résistance puisqu'il est six fois plus dur que l'acier ; de plus, sa densité est faible : il est trois fois plus léger que l'aluminium [Taylor *et al.*, 2002]. Parmi ses propriétés extraordinaires, il y a une grande conductivité électrique et thermique, il a la température de fusion la plus élevée de tous les métaux, il résiste bien à la corrosion, il est perméable aux rayons X, il a la plus faible absorption de neutron par section transversale de tous les métaux, une constante d'élasticité élevée et il est non-magnétique [Bruce *et al.*, 1998; Bruce *et al.*, 2001; Newman, 1998; Rossman *et al.*, 1991; Stokinger, 1966]. Ces propriétés rendent le Be indispensable dans plusieurs industries telles que l'aérospatiale, l'électronique, le nucléaire, la télécommunication, l'informatique, l'automobile, l'odontologie (discipline médicale consacrée à l'étude des dents et à leur pathologie), la joaillerie, la céramique et la métallurgie [Bruce *et al.*, 2001; Kotloff *et al.*, 1993; Sawyer *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2002]. Ce métal est le 35<sup>e</sup> plus abondant de la croûte terrestre avec une concentration moyenne de 6 mg kg<sup>-1</sup> [Sharma *et al.*, 2000].

Plusieurs organismes internationaux et nationaux, tels que l'Organisation mondiale de la santé (OMS) [Bruce *et al.*, 2001], l'*Environmental Protection Agency* (EPA) des États-Unis [Bruce *et al.*, 1998], l'*American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) [ACGIH, 1999], l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité au travail (IRSST) [Brousseau *et al.*, 2007; Dion *et al.*, 2003; Fournier *et al.*, 2008; Zayed *et al.*, 2005], se sont penchés sur la problématique relative à la toxicité du Be et de ses composés. Ceux-ci sont reconnus pour causer des maladies pulmonaires dues à l'exposition environnementale et plus particulièrement occupationnelle. Ces maladies englobent la sensibilisation au Be (BeS) qui peut évoluer vers la béryllose pulmonaire chronique (CBD), la béryllose aiguë qui correspond à une pneumonie chimique, l'hépatomégalie, la bronchite, les tumeurs pulmonaires et les sarcomes osseux [Sharma *et al.*, 2000]. De plus, le béryllium est classé dans la liste des cancérigènes de classe A par l'EPA [Bruce *et al.*, 1998]. L'*American Conference of Governmental Industrial Hygienists* l'a aussi classé comme un cancérigène pour l'humain A1 [ACGIH, 1999] et le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) l'a assigné au groupe 1 des cancérigènes [WHO *et al.*, 1993]. Il est donc clair que le Be est considéré comme un cancérigène chez l'homme.

La toxicité du Be et de ses composés pour l'humain a été observée pour la première fois en Europe dans les années 30 [Finch *et al.*, 1996; Newman, 1998; Rossman *et al.*, 1991]. À cette époque, il était reconnu pour causer une maladie pulmonaire du travail ou environnementale, mais la reconnaissance officielle a été faite seulement

à la fin des années 40 [Paustenbach *et al.*, 2001]. C'est en 1949 qu'une valeur limite d'exposition professionnelle (TLV<sup>®</sup>) a été établie à 2,0 µg de Be m<sup>-3</sup> d'air par la Commission de l'énergie atomique des États-Unis [Stokinger, 1966; Zayed *et al.*, 2005]; cette TLV<sup>®</sup> avait pour but d'éradiquer les maladies pulmonaires reliées au Be. Cette valeur limite a aussi été adoptée par plusieurs autres organismes de protection des travailleurs tels que l'ACGIH, l'*Occupational Safety and Health Association* (OSHA) et l'IRSST [Taylor *et al.*, 2002]. Cette limite a pratiquement permis de supprimer la béryllose aiguë, mais la CBD continuait à se développer chez les travailleurs exposés, même à des doses inférieures à la TLV<sup>®</sup> [Finch *et al.*, 1998]. Les recherches scientifiques actuelles ne permettent pas de déterminer une TLV<sup>®</sup> adéquate pour éliminer la CBD [Zayed *et al.*, 2005]. De plus, la toxicité du Be semble être influencée par la solubilité des composés, la granulométrie, la forme chimique et l'aire de la surface des particules inspirées [Dweik; Kent *et al.*, 2001; Paustenbach *et al.*, 2001; Stefaniak *et al.*, 2007; Stiefel *et al.*, 1980; Sutton *et al.*, 2003]; par conséquent, une valeur limite devrait peut-être tenir compte de l'espèce chimique et de ses propriétés. En ce qui attrait aux espèces chimiques, l'oxyde de béryllium est plus toxique que le métal de béryllium, qui sont les espèces les plus répandues dans l'industrie. De plus, le fluorure de béryllium est plus toxique que le sulfate de béryllium et le phosphate de béryllium. [Bruce *et al.*, 1998; Paustenbach *et al.*, 2001; Zayed *et al.*, 2005]

La source d'émission anthropique principale de Be est la combustion du charbon et des combustibles fossiles, ceux-ci relâchant dans l'air des particules contenant du

Be et des cendres en suspension [Bruce *et al.*, 1998]. Ce qui signifie que la population en général est exposée aux poussières de Be par l'inhalation de l'air. La concentration de Be atmosphérique aux États-Unis dans les secteurs ruraux varie entre 0,03 et 0,06 ng m<sup>-3</sup>; pour ce qui est des secteurs urbains et industrialisés comme Dayton, Ohio, elle varie entre 0,1 et 0,2 ng m<sup>-3</sup> [Bruce *et al.*, 2001]. Par contre, des concentrations beaucoup plus élevées ont été observées à proximité d'usines qui traitent le Be : les concentrations atmosphériques de Be peuvent y atteindre 82,7 ng m<sup>-3</sup> d'air [Bruce *et al.*, 2001]. De plus, tout le monde est exposé au Be par l'ingestion de nourriture et d'eau [Bruce *et al.*, 2001; WHO *et al.*, 1993]. L'inhalation de la fumée du tabac, les prothèses dentaires et les amalgames des plombages sont aussi des sources non négligeables de Be [Bruce *et al.*, 2001; Kotloff *et al.*, 1993]. Toutefois, il semble que ces quantités soient trop faibles pour induire un véritable risque toxique pour la population en général.

Les travailleurs qui sont exposés à des poussières de Be soit par les voies respiratoire, orale et/ou dermale sont à risque de développer plusieurs maladies [Bruce *et al.*, 1998]. Par contre, c'est essentiellement l'inhalation qui engendre des problèmes de santé qui peuvent évoluer vers la CBD ; maladie incurable [Taylor *et al.*, 2002]. L'exposition chronique ou sub-chronique au Be peut produire une réaction immunitaire qui est provoquée par l'antigène, Be, en déclenchant la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, tout comme une réaction allergique [Klaassen, 2001]. La BeS est considérée comme une hypersensibilité au Be, présente chez 1% à 20% des travailleurs exposés [Fournier *et al.*, 2008]. De ce

nombre, seulement 1% à 10% développeraient la CBD [Fournier *et al.*, 2008], qui peut apparaître jusqu'à 40 ans après l'exposition [Marchand-Adam *et al.*, 2005]. L'apparition de la CBD ne se manifeste pas selon une relation dose-réponse classique [Laparé, 2005; Newman, 1998; Paustenbach *et al.*, 2001; Rossman, 2005; Wang *et al.*, 2001], ce qui signifie qu'une seule exposition peut causer des problèmes de santé. La béryllose pulmonaire chronique est une maladie pulmonaire caractérisée par une inflammation sous forme de granulomes non caséeux avec des cellules géantes à plusieurs noyaux qui provoquent divers degrés de fibrose [Apostoli *et al.*, 2001; Benson *et al.*, 2000; Finch *et al.*, 1998; Lehnert *et al.*, 2001; Rossman, 2001].

Le diagnostic de la CBD est difficile à établir puisque la majorité des symptômes sont similaires à la sarcoïdose [Marchand-Adam *et al.*, 2005; Rossman, 2001]. Cette maladie pulmonaire est caractérisée par une inflammation granulomateuse non-caséuse d'origine inconnue. Le seul test qui permet la différenciation est le test de prolifération lymphocytaire (BeLPT) soit dans le sang ou dans le fluide recueilli par un lavage bronchoalvéolaire (BALFs) qui est spécifique au Be. Ce test *in-vitro* est positif lorsque l'ajout de Be dans le sang ou le BALFs provoque la prolifération des lymphocytes T. Ce test présente deux inconvénients principaux. Premièrement, il y a le manque de concordance inter-laboratoire, dû à des différences dans la méthode analytique [Brousseau *et al.*, 2007]. Deuxièmement, il est positif pour les gens sensibilisés et pour ceux atteints de CBD, si bien qu'il est nécessaire de faire d'autres tests pour les distinguer. Enfin ces tests peuvent mener à de faux-positifs

[Brousseau *et al.*, 2007]. On observe les granulomes non caséux par des radiographies thoraciques [Finch *et al.*, 1998] ou par la tomographie axiale calculée par ordinateur (CT-scan), qui est plus exacte [Newman *et al.*, 1996]. Les tests de spirométrie sont souvent utilisés pour confirmer l'insuffisance respiratoire [Marchand-Adam *et al.*, 2005; Newman *et al.*, 1996; Wright, 1949]. Les tests urinaires ne sont d'aucune utilité pour le diagnostic puisqu'ils donnent des taux de Be élevés seulement après une exposition récente [Apostoli *et al.*, 2001].

## **1.2 Le modèle animal**

Plusieurs modèles d'animaux ont été utilisés pour évaluer la toxicité du Be et de ses composés, mais les rongeurs de la sous-famille des murinés sont les plus souvent utilisés [Finch *et al.*, 1996]. Ce modèle est privilégié parce que les réponses observées sont analogues à celle de l'humain : notamment par le développement de granulomes et/ou d'infiltrats mononucléiques, qui sont principalement composés de lymphocytes T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> [Finch *et al.*, 1996; Finch *et al.*, 1998]. Ces petits rongeurs ont aussi l'avantage d'être peu dispendieux et petits, ce qui permet d'augmenter le nombre d'animaux dans un espace restreint comparativement à des macaques crabiers [Haley *et al.*, 1994], des chiens beagle [Finch *et al.*, 1990; Haley *et al.*, 1989] ou des lapins [Hoagland *et al.*, 1950; Kelly *et al.*, 1961]. Pour les travaux présentés dans ce mémoire, les souris de souche C3H/HeJ ont été choisies puisqu'elles imitent la réponse pulmonaire observée chez l'humain [Benson *et al.*, 2000; Finch *et al.*, 1998]. La recherche toxicologique de ce vaste projet a permis de

confirmer que les souris C3H/HeJ sont un bon modèle pour étudier les réponses immunologiques spécifiques à la CBD [Salehi *et al.*, 2009].

### **1.3 Cheveux**

Les cheveux sont des organes d'excrétion mineurs [Chojnacka *et al.*, 2005; Cortes Toro *et al.*, 1993; Ho *et al.*, 2001] donc ils peuvent servir de marqueur d'exposition de plusieurs métaux toxiques tels que le mercure, l'arsenic, le plomb et le cadmium [Ali *et al.*, 1997; Ali *et al.*, 2003; Batista *et al.*, 1996; Bencko, 1995; Bencze, 1990a; Bermejo-Barrera *et al.*, 2002; Borella *et al.*, 1996; Chyla *et al.*, 2000; Cortes Toro *et al.*, 1993; Dombovári *et al.*, 2000; Goullé, 2007; Goullé *et al.*, 2005; Hać *et al.*, 1997; Heller-Zeisler *et al.*, 1998; Menezes *et al.*, 2004; Morton *et al.*, 2002a; Nowak, 1998; Peach *et al.*, 1998; Puchyr *et al.*, 1998; Rodushkin *et al.*, 2000b; Samanta *et al.*, 2004; Screenivasa Rao *et al.*, 2002; Teresa *et al.*, 1997; Violante *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1995; Wright *et al.*, 2006]. En dépit de la contamination externe et du manque de méthodes normalisées pour le nettoyage des cheveux, l'OMS, l'EPA et l'Agence Internationale de l'Énergie Atomique (AIEA) ont recommandé l'usage des cheveux, considérés comme un important indicateur de l'exposition environnementale mondiale [Morton *et al.*, 2002a; Puchyr *et al.*, 1998; Samanta *et al.*, 2004]. De plus, on peut utiliser les cheveux pour évaluer la condition médicale d'un patient [Ciszewski *et al.*, 1997; Ho *et al.*, 2001; Kempson *et al.*, 2006; Morton *et al.*, 2002a], en mesurant la concentration des éléments traces essentiels et des contaminants. La mesure des éléments traces essentiels peut



permettre de détecter des déséquilibres métaboliques [Chojnacka *et al.*, 2005; Fido *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2001; Morton *et al.*, 2002a; Puchyr *et al.*, 1998; Rodushkin *et al.*, 2000a; Srogi, 2006; Wang *et al.*, 1995]. Les éléments traces en excès seront toxiques et peuvent être évalués pour diagnostiquer des maladies dues à l'exposition ou des empoisonnements [Chojnacka *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2001; Morton *et al.*, 2002b; Puchyr *et al.*, 1998; Srogi, 2006; Wang *et al.*, 1995]. Les cheveux peuvent aussi être utilisés pour la détection de l'abus de drogues [Cairns *et al.*, 2007; Chèze *et al.*, 2007; Cirimele, 2007; Jurado, 2007; Kidwell *et al.*, 2007; Kintz, 2007; Kronstrand, Druid, 2007; Kronstrand, Scott, 2007; Moeller *et al.*, 2007; Morton *et al.*, 2002a; Pichini *et al.*, 2007; Pragst *et al.*, 2007; Sachs, 2007; Srogi, 2006; Uhl, 2007; Vilain, 2007; Yegles *et al.*, 2007].

Les cheveux possèdent plusieurs avantages par rapport aux marqueurs d'exposition conventionnels comme le sang et l'urine. Premièrement, les cheveux permettent une évaluation chronologique de l'historique d'exposition [Ali *et al.*, 1997; Hać *et al.*, 1997; Ho *et al.*, 2001; Menezes *et al.*, 2004; Screenivasa Rao *et al.*, 2002] puisqu'ils poussent lentement, soit environ 1 à 1,5 cm par mois [Ho *et al.*, 2001]. Deuxièmement, les concentrations mesurées dans les cheveux sont au moins dix fois plus élevées que celles mesurées dans le sang ou l'urine et elles représentent une moyenne dans le corps intégrée sur une longue période de temps [Bass *et al.*, 2001; Bermejo-Barrera *et al.*, 2002; Borella *et al.*, 1996; Caroli *et al.*, 1992; Chojnacka *et al.*, 2005; Dombovári *et al.*, 1998; Passwater *et al.*, 1983; Rodushkin *et al.*, 2000a; Teresa *et al.*, 1997]. Troisièmement, ils peuvent être prélevés

facilement et sans douleur et ils peuvent être conservés à la température de la pièce pour une longue période de temps sans que leur composition soit affectée [Bass *et al.*, 2001; Bencko, 1995; Borella *et al.*, 1996; Caroli *et al.*, 1992; Ciszewski *et al.*, 1997; Dombovári *et al.*, 1998; Passwater *et al.*, 1983; Schuhmacher *et al.*, 1993; Screenivasa Rao *et al.*, 2002; Srogi, 2006].

L'analyse des cheveux est tout de même très controversée. Plusieurs publications citent le manque de méthode standardisée pour la préparation des échantillons [Bass *et al.*, 2001; Chyla *et al.*, 2000; Cortes Toro *et al.*, 1993; Morton *et al.*, 2002a; Seidel *et al.*, 2001], la grande variabilité inter-laboratoire [Kruse-Jarres, 2000; Seidel *et al.*, 2001], l'impossibilité de distinguer les dépôts exogènes et endogènes [Kruse-Jarres, 2000] et la différence entre les concentrations trouvées dans les cheveux et celles obtenues dans les fluides ou organes [Miekeley *et al.*, 1998]. Il est important de ne pas comparer les valeurs d'une prise de sang ou d'un échantillon d'urine avec les concentrations observées dans les cheveux puisque les cheveux représentent l'accumulation de l'élément mesurée sur une longue période. Pour faire une comparaison valable, il faudrait échantillonner les fluides sur une période d'un mois tous les jours et comparer le total à la concentration obtenue dans un centimètre de cheveux [Bencze, 1990a]. De plus, des cheveux adjacents possèdent un cycle de croissance indépendant qui est divisé en trois phases: anagène, catagène et télogène [Kronstrand, Scott, 2007]. La phase anagène est la période de croissance, et la seule phase où il y a accumulation des éléments traces. Elle peut varier de deux à six ans ou encore plus longtemps, selon la région

anatomique où le poil croît. La phase catagène est une étape de transition qui peut durer d'une à deux semaines avant la phase de repos, télogène. Cette dernière peut durer de un à six mois avant que la racine morte du cheveu se détache du cuir chevelu et qu'un nouveau cheveu commence à pousser [Bencze, 1990a]. Cela rend les analyses chronologiques plus complexes puisque pour évaluer la phase de croissance du cheveu, il faut observer la racine [Bencze, 1990a]. La variation de la concentration de l'élément analysé dans les cheveux dépend de plusieurs facteurs comme: l'âge, le sexe, la couleur des cheveux, les habitudes alimentaires, l'état de santé, le nombre de plombages, ponts et/ou couronnes, l'exposition environnementale et/ou occupationnelle, l'origine ethnique et les habitudes de consommation des produits du tabac [Batista *et al.*, 1996; Bosque *et al.*, 1991; Chojnacka *et al.*, 2005; Goullé, 2007; Hać *et al.*, 1997; Miekeley *et al.*, 1998; Samanta *et al.*, 2004; Schuhmacher *et al.*, 1993]. Ces facteurs doivent donc être évalués statistiquement pour déterminer l'apport de l'élément analysé dans l'organisme de la personne dont les cheveux sont analysés et permettre la détermination du niveau « normal » d'exposition. De plus, les cheveux doivent être naturels sans traitement comme la permanente, la décoloration ou la coloration [Bass *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2001; Morton *et al.*, 2002a; Passwater *et al.*, 1983; Rodushkin *et al.*, 2000b].

L'insertion des éléments traces dans la structure du cheveu se fait lors de la phase anagène par l'afflux de sang vers la racine [Ho *et al.*, 2001; Srogi, 2006]. L'élément trace se lie aux groupements sulfhydriles (-SH) qui sont présents dans les protéines

folliculaires, telles que la kératine [Bencze, 1990a; Caroli *et al.*, 1992]. Cette protéine contient un grand nombre d'acides aminés, dont la cystéine qui compose environ 14 % des cheveux et qui contient un groupement sulfhydryle [Chojnacka *et al.*, 2005; Morton *et al.*, 2002a]. Cet acide aminé provoque une forte affinité pour le métal ; il se retrouve principalement dans le cortex du cheveu, puisqu'il y a énormément de ponts disulfures, ou dans le canal médullaire à cause des ponts isodipeptidiques [Bencze, 1990a]. La kératine est l'unité de base de la structure du cheveu, et elle se présente sous la forme d'une hélice alpha [Bencze, 1990a]. Elle est aussi associée à la molécule de mélanine qui donne la couleur aux cheveux [Morton *et al.*, 2002a]. La mélanine est un polymère polyanionique qui permet la liaison de cations principalement par des liaisons ioniques qui peuvent être renforcées par d'autres types attractions [Larsson, 1993; Morton *et al.*, 2002a]. La mélanine existe sous deux formes, soit la phéomélanine qui est responsable des pigments rouges et jaunes et l'eumélanine qui donne les colorations brunes et noires [Uhl *et al.*, 2005]. L'importance de la coloration des cheveux réside dans le fait que la mélanine est incorporée à la kératine, et que la phéomélanine contient un élément de soufre où les éléments traces se lient à la chaîne polymérique. De plus, la coloration blanche (grise) du cheveu indique un changement de sa structure qui résulte en une concentration des éléments traces plus faible que dans des cheveux colorés [Bencze, 1990b]. Il est donc très important d'utiliser des cheveux de pigmentation semblable [Bencze, 1990b].

Lors des analyses de cheveux, la principale source de variabilité est la préparation qui inclut: la collecte des échantillons, la procédure de nettoyage, le séchage, la digestion et la dilution. Par contre, l'étape décisive est le nettoyage qui permet d'enlever les dépôts exogènes, qui englobent le gras, la sueur, la poussière et les cosmétiques, lesquels pourraient contenir l'élément d'intérêt [Hilderbrand *et al.*, 1974]. Cette déposition a lieu puisque les cheveux sont hygroscopiques [Bencze, 1990a]. Plusieurs méthodes de nettoyage sont proposées dans la littérature, mais il n'existe pas de méthode normalisée [Bass *et al.*, 2001; Borella *et al.*, 1996; Chyla *et al.*, 2000; Cortes Toro *et al.*, 1993; Morton *et al.*, 2002a; Seidel *et al.*, 2001]. La méthode la plus souvent utilisée est celle proposée par l'Agence Internationale de l'Énergie Atomique (AIEA) [Ryabukhin, 1978], qui a donné des résultats exacts. Le seul problème de ce protocole est l'importante différence inter laboratoire [Goullé, 2007].

Le séchage est aussi essentiel puisqu'il permet de mesurer la masse exacte de cheveux sans calculer l'humidité présente naturellement dans les cheveux [Bencze, 1990b]. L'humidité présente dans le cheveu est variable et peut atteindre 32 % de son poids total [Uhl *et al.*, 2005]. La vapeur d'eau présente dans l'air peut pénétrer l'intérieur du cheveu et se lier chimiquement ou physiquement puisque le cheveu est hygroscopique [Bencze, 1990a].

La digestion des cheveux est aussi une étape marquante de la préparation de l'échantillon avant l'analyse. Dans la littérature, il y a plusieurs solvants utilisés,

mais les plus souvent employés sont l'acide nitrique et le peroxyde d'hydrogène 30 % (v/v) [Bencze, 1990b; Goullé, 2007; Miekeley *et al.*, 1998; Rodushkin *et al.*, 2000a; Samanta *et al.*, 2004; Screenivasa Rao *et al.*, 2002; Srogi, 2006]. Il est essentiel de déterminer un rapport suffisant pour solubiliser tout l'échantillon, tout en étant minimal, pour réduire au maximum la dilution des échantillons pour permettre l'analyse. La digestion a été effectuée sur un bloc de digestion puisqu'il a l'avantage par rapport au système de four à micro-ondes à pression atmosphérique d'être plus simple et plus économique. De plus, il n'y a pas de différence statistique quant à l'exactitude entre des échantillons préparés avec les deux méthodes [Ming *et al.*, 1998]. Le seul inconvénient est que cette méthode est relativement dangereuse puisqu'il y a dégagement de vapeur qui pourrait contenir l'élément d'intérêt [Ho *et al.*, 2001]. Cette hypothèse a été écartée puisque le Be a une température d'ébullition beaucoup plus élevée, 2970 °C [Bruce *et al.*, 2001], que la température de digestion. La possibilité que du Be soit perdu par l'entraînement à la vapeur a été vérifiée expérimentalement par l'ajout dosé de Be avant la digestion.

#### 1.4 Les os

Le choix d'analyser les os découle de la capacité du squelette à agir comme l'un des derniers sites de déposition du Be avec les ganglions lymphatiques trachéobronchiques, le foie et le sang [Finch *et al.*, 1990; Forbes *et al.*, 1954; Kelly *et al.*, 1961]. Cette déposition dans les os peut engendrer des sarcomes osseux, c'est-à-dire un cancer des os [Hoagland *et al.*, 1950; Kelly *et al.*, 1961]. De plus, le

Be étant un élément de la famille des alcalino-terreux tout comme le calcium, les deux ont un nombre d'oxydation de 2+, ce qui permet d'émettre l'hypothèse qu'il y aura substitution dans la structure même de l'os. Le principal avantage de l'analyse des os est le temps de résidence élevé, ce qui permet d'évaluer l'exposition et l'absorption des métaux sur des années et même des décennies [Kuo *et al.*, 2000]. Par contre, le principal désavantage est la difficulté à obtenir l'échantillon puisqu'une biopsie des os est très douloureuse et invasive. Les os ont déjà été utilisés pour l'évaluation du rapport entre une maladie et la concentration qu'on y retrouve, notamment pour le plomb, l'aluminium ou le cadmium [Baranowska *et al.*, 1995; Gil *et al.*, 1993; Gulson *et al.*, 1999; Kuo *et al.*, 2000; Ščančar *et al.*, 2000; Todd *et al.*, 2001].

### **1.5 Objectifs et Applications**

L'objectif principal de notre étude consiste à évaluer le potentiel des poils et des os de souris comme indicateurs de l'exposition au Be.

La principale application de cette étude est l'utilisation des cheveux comme indicateur biologique de l'exposition au Be. Ils pourraient permettre de déterminer le niveau d'intoxication des gens exposés, en identifiant la BeS, ou la CBD chez les patients démontrant une hypersensibilité au Be. Cette analyse serait donc complémentaire aux tests *in-vitro*, BeLPT, du sang et des BALFs.

Un autre objectif de cette recherche est de déterminer la méthode de nettoyage la plus efficace pour éliminer le Be exogène, qui est le Be déposé sur le cheveu, sans déloger le Be endogène, qui correspond au Be absorbé par le système et qui c'est lié à la structure même du cheveu, ce qui sera vérifié par l'analyse d'échantillons lavés et non lavés [Bencze, 1990b; Srogi, 2006] par spectrométrie d'émission atomique à plasma couplé inductivement (ICP-AES).

L'application découlant de cet objectif est l'utilisation du protocole de nettoyage des cheveux pour la quantification précise et exacte du Be endogène. Ce qui pourrait aider à l'utilisation des cheveux humains pour le dépistage des intoxications dues à l'exposition à des métaux toxiques ou le dépistage des déséquilibres des nutriments essentiels. L'analyse de cheveux a démontré sa capacité à identifier les maladies chroniques asymptomatiques [Passwater *et al.*, 1983].

La limitation de cette étude est le manque de cheveux de travailleurs exposés à des poussières de Be. Il nous était impossible de recueillir des cheveux humains exposés à des poussières de Be pour des raisons éthiques.



## Chapitre 2: Méthodologie

### 2.1 Le modèle animal

Notre étude consiste à évaluer le potentiel des poils et des os de souris comme indicateurs de l'exposition au Be. Pour ce faire, les souris ont été soumises à une exposition sub-chronique. Il y avait un groupe contrôle ( $n = 9$ ), qui a été mis en contention selon les mêmes conditions que les deux groupes de souris exposées, où les poussières de Be ont été remplacées par de l'air filtré HEPA. Deux groupes de souris ont été exposés à des poussières de Be de taille différente puisque la toxicité du Be dépend de la taille des particules, de la forme chimique et de la solubilité [Dweik; Finch *et al.*, 1990; Kent *et al.*, 2001; Paustenbach *et al.*, 2001; Stefaniak *et al.*, 2007; Stiefel *et al.*, 1980; Sutton *et al.*, 2003]. La taille des particules est très importante puisque les plus petites particules ( $< 5 \mu\text{m}$ ) peuvent pénétrer plus profondément dans le poumon et atteindre les alvéoles [Klaassen, 2001], où le transfert est possible vers le système sanguin. La forme chimique et la solubilité sont aussi des facteurs très importants parce qu'elles affectent aussi la déposition du Be dans l'arbre trachéobronchique, mais elles n'ont pas été évaluées dans cette étude. Le premier groupe de souris a été exposé à des poussières de Be inhalable ou Be-I ( $n = 35$ ), qui avaient une grosseur de particule plus petite que  $10 \mu\text{m}$ . Le second groupe, Be fin ou Be-F ( $n = 40$ ), a été exposé à des particules d'une grosseur inférieure à  $2,5 \mu\text{m}$ . Toutes les souris ont été exposées aux aérosols de Be à une concentration cible de  $250 \mu\text{g m}^{-3}$  durant trois semaines, à raison de cinq

jours par semaine et six heures par jour. Cette concentration a été choisie parce qu'elle correspond à la LOAEL (la plus faible dose qui produit un effet observable) [Stiefel *et al.*, 1980]. Toutes les souris ont été sacrifiées une semaine après l'exposition, sauf 5 souris du groupe Be-F qui ont été sacrifiées 3 semaines après l'exposition. Ces souris ont été sacrifiées plus tard pour vérifier si l'accumulation augmente après l'exposition, contrairement au taux observé dans l'urine. Le but de l'étude est donc de déterminer s'il y a une différence statistiquement significative entre les souris contrôles et les souris exposées à des poussières de Be. De plus, l'analyse statistique a été effectuée entre les deux groupes de souris exposées pour vérifier que la granulométrie des particules a une influence réelle sur la toxicité des aérosols de Be. La dernière analyse statistique a été effectuée entre les souris sacrifiées à des temps différents.

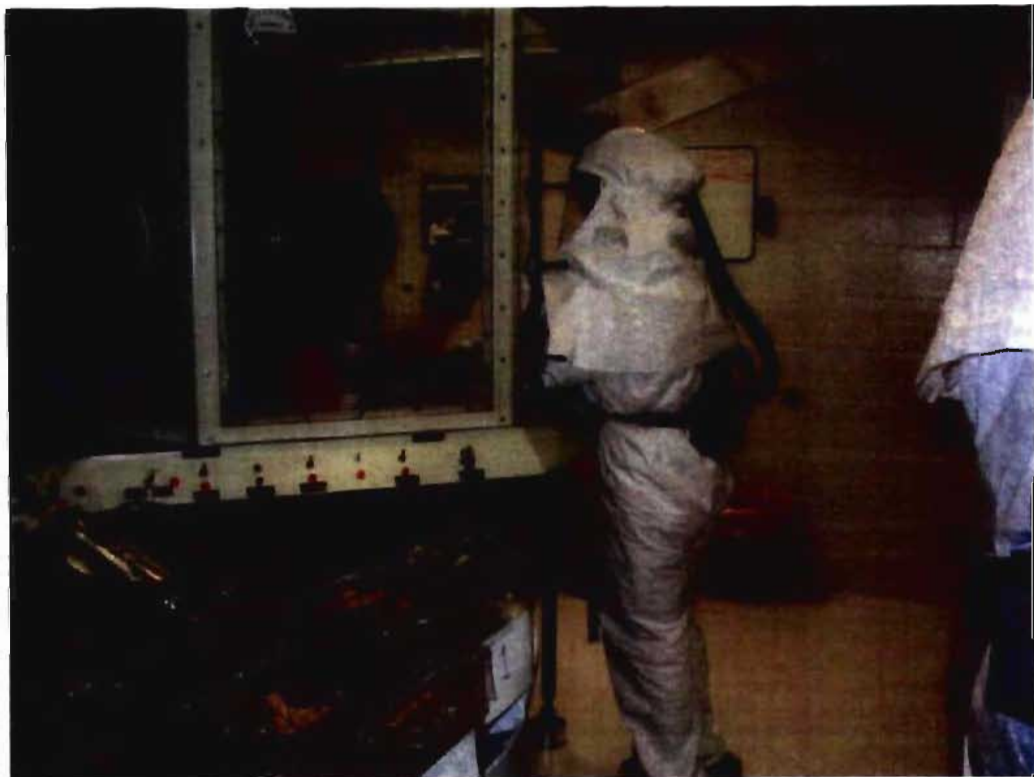
De plus, cette étude a nécessité une grande surveillance en santé et sécurité des intervenants qui devaient travailler dans la salle d'exposition. Ce laboratoire est classé de niveau 3. La Figure 1 montre la chambre d'inhalation. La collecte des poils et des os a été effectuée dans ce laboratoire. Pour y entrer, il était nécessaire de porter une combinaison couvrant tout le corps avec un masque équipé d'une cartouche permettant la filtration de l'air et des gants de nitrile doubles collés avec du ruban adhésif (Figure 2). Avant de sortir du laboratoire, nous devons jeter la première paire de gants et laver la combinaison ainsi que tout ce qui sortait de la salle avec des lingettes humides pour ne pas contaminer le sas, où l'équipement de protection est entreposé. Pour s'assurer de la bonne santé des personnes qui ont eu

à travailler dans ce laboratoire, des tests de BeLPT dans le sang ont été effectués à intervalles réguliers sur les gens travaillant dans la salle d'exposition.

**Figure 1 : Chambre d'inhalation**



**Figure 2 : Combinaison complète**



## **2.2 Les cheveux**

La méthode proposée par l'Agence Internationale de l'Énergie Atomique (AIEA) [Ryabukhin, 1978], a été appliquée en y ajoutant un nettoyage avec un détergent non ionique, comme le Triton X-100 [Wright *et al.*, 2006]. Ce détergent a été employé puisqu'il permet d'éliminer rapidement les éléments exogènes sans affecter la composition endogène [Ho *et al.*, 2001], tout en étant sécuritaire et peu coûteux [Borella *et al.*, 1996]. Cette décontamination des cheveux par le Triton X-100 a été accomplie dans un bain ultrasonique [Schuhmacher *et al.*, 1993] puisque les vibrations permettent de déloger les dépôts exogènes qui pourraient être coincés entre les différentes couches formant le cuticule [Bencze, 1990a]. De plus, le choix de la méthode de nettoyage doit être fait selon l'élément trace à analyser [Bencze, 1990b; Borella *et al.*, 1996; Morton *et al.*, 2002a]. La méthode de nettoyage utilisée pour cette recherche est donc un hybride de deux méthodes qui se retrouvent dans ces références [Bass *et al.*, 2001; Borella *et al.*, 1996; Ho *et al.*, 2001; Puchyr *et al.*, 1998; Rodushkin *et al.*, 2000a]. Toutes ces références ont utilisées les mêmes solvants ; la seule différence est le nombre de fois que chaque solvant est employé. Le nombre de fois a été augmenté à trois selon une recherche qui a évalué plusieurs procédures et le nombre de répétition [Huihui *et al.*, 1990].

Pour cette recherche, le séchage a été effectué dans une étuve à 70 °C [Bass *et al.*, 2001; Schuhmacher *et al.*, 1993; Wright *et al.*, 2006] pendant 48 heures. La mesure

de la masse a été effectuée à l'aide d'une balance analytique ayant une précision de 0,0001g.

La quantité d'acide nitrique et de peroxyde d'hydrogène 30 % (v/v) a été déterminée expérimentalement en digérant la même quantité de cheveux avec plusieurs proportions de chacun des solvants. Le volume minimal pour permettre la digestion complète de 250,0 mg de cheveux est de 1,000 mL d'acide nitrique et de peroxyde d'hydrogène 30 % (v/v). Les solutions ont été laissées couvertes durant 48 heures pour enclencher la digestion, ce qui permet de diminuer la température et le temps de digestion. Le choix de la température a été déterminé en évaluant l'efficacité de différentes températures : celle de 170°C a été la plus efficace [Ho *et al.*, 2001]. La digestion a été effectuée sur un bloc de digestion pour permettre l'évaporation d'une portion de l'acide pendant 20 minutes.

L'utilisation d'un matériel de référence certifié (CRM) a permis de vérifier la précision et l'exactitude de la méthode analytique puisque le CRM a été soumis à la même préparation que les cheveux. Le CRM, GBW 07601 (Institute of Geophysical and geochemical exploration, Chinese National Research Centre for CRM, Langfang, China) [Institute of Geophysical and Geochemical Exploration, July 1990], est une poudre de cheveux humains.

### **2.3 Les os**

Pour évaluer l'exactitude et la précision de l'analyse des os deux CRM de calcaire synthétique, GBW 07712 et GBW 00713 (Institute of Geophysical and geochemical exploration, Chinese National Research Centre for CRM, Langfang, China), ont été utilisés. La préparation du CRM a été soumise au même protocole que les os, ce qui permet d'évaluer la méthode analytique. Cette matrice a été choisie parce que c'est celle qui se rapproche le plus des os, en raison de la grande quantité de calcium. Ce choix a dû être fait puisqu'il n'y avait aucun CRM d'os qui donnait une valeur certifiée pour le Be.

### **2.4 Méthode d'analyse chimique du Be**

Tous les échantillons ont été analysés avec la même méthode, soit l'ICP-AES [Chyla *et al.*, 2000; Dombovári *et al.*, 1998; Screenivasa Rao *et al.*, 2002; Seidel *et al.*, 2001]. Cette technique a été choisie parce qu'elle a une bonne limite de détection (LOD) pour le Be et elle offre une bonne linéarité sur une large gamme dynamique de concentrations. Malgré l'augmentation de son utilisation, la technique de la spectrométrie de masse à plasma couplé inductivement (ICP-MS) [Goullé, 2007; Goullé *et al.*, 2005; Puchyr *et al.*, 1998; Rodushkin *et al.*, 2000a; Seidel *et al.*, 2001], n'a pas été retenue puisque la LOD pour le Be était insatisfaisante en raison des interférences spectrales et de la masse très faible de l'ion de Be, qui nécessite un détecteur à haute résolution.

La calibration a été effectuée par calibration externe tous les jours. Les solutions standard ont été préparées à l'aide d'eau distillée-déminéralisée ultra pure et elles ont été acidifiées avec de l'acide nitrique à 2 %, tout comme les échantillons. Les conditions de l'instrument ont été optimisées et gardées constantes pour toutes les analyses. Le choix de la longueur d'onde a été fait en évaluant trois différentes longueurs d'onde : 234,861 nm, 313,107 nm et 313,042 nm. La seule longueur d'onde qui a été gardée est celle de 234,861 nm ; les deux autres ont été rejetées à cause des interférences spectrales.

**Chapitre 3 : Hair washing protocol for using human hair as an indicator of  
beryllium exposure**

**La procédure de nettoyage des cheveux pour permettre l'utilisation des  
cheveux comme indicateur de l'exposition au béryllium**

Katherine Drolet-Vives<sup>1</sup>, Joseph Zayed<sup>2</sup>, Sébastien Sauvé<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>2</sup>Department of Environmental and Occupational Health, and GRIS  
(Interdisciplinary Health Research Group), Faculty of Medicine, Université de  
Montréal, Montréal, Québec, Canada

Soumis le 25 mars 2009

Texte original soumis à *Chemistry Central Journal*



### Notes sur l'article

L'**introduction** de l'article reprend plusieurs éléments discutés dans les sections précédentes de ce mémoire, mais approfondit la théorie sur le nettoyage des cheveux. La **partie expérimentale** décrit en détails toutes les étapes du travail effectué en laboratoire, ce qui comprend la collecte des échantillons, le nettoyage des cheveux, le séchage, la digestion, la filtration, la dilution et l'analyse. Les **résultats et la discussion** démontrent que la procédure de nettoyage est efficace dans l'élimination des dépôts exogènes puisque la concentration de Be mesurée concorde avec celles répertoriées dans la littérature. La méthode de préparation et d'analyse donne des résultats précis et exacts puisque le RSD du CRM est de 6.6%. Une deuxième vérification de la précision et de l'exactitude de la méthode a été faite par l'analyse d'ajout dosé. La **conclusion** de cet article est que les cheveux sont de bons indicateurs biologiques de l'exposition au Be, bien que d'autres études soient nécessaires pour déterminer la gamme de concentration normale de Be, tout en évaluant les différents facteurs qui peuvent l'influencer. Les **références** sont disponibles à la fin du mémoire.

**Abstract**

Beryllium (Be) exposure can cause a granulomatous lung disease in workers. Cases of workers with sensitization (BeS) or chronic beryllium disease (CBD) challenge the scientific community for a better understanding of Be toxicity. Unfortunately, no biological indicator offers much potential for use as a monitoring tool for workers' exposure. Our study aims to assess the potential of human hair as an indicator of Be exposure. To insure that the measured Be hair concentrations truly reflect hair content and not particles adsorbed onto its surface, we developed a washing procedure which used in sequence; acetone, triton X-100 and MilliQ distilled water. A nitric acid digestion was performed and combined with a sample pre-concentration through evaporation of a portion of the acid. We used standard additions to verify recoveries of this method. Quantifications in the acid digest were made using inductively coupled plasma – atomic emission spectrometry. To ensure that the method is accurate, we also analyzed a certified hair reference material. The detection limit of this method is  $0.020 \mu\text{g L}^{-1}$ , which corresponds to  $2.4 \mu\text{g}$  of Be per kg of hair, and the limit of quantitation was determined to be  $0.067 \mu\text{g L}^{-1}$ , corresponding to  $8.1 \mu\text{g}$  of Be per kg of hair. These results suggest that human hair can be used as a low intrusion biologic indicator of Be exposure. If this potential is confirmed, this would be a powerful tool to monitor Be-exposed workers.

**Keywords:** Beryllium; ICP-AES; Human hair; washing; digestion; pre-treatment

## 1. Introduction

Beryllium (Be) is a steel gray, hard metal with atypical metallic properties [Newman, 1998]. Be is the air-stable metal that has the lowest atomic number [Rayner-Canham, 2001]. It exhibits a high electric and thermal conductivity, a high melting temperature of 1278°C [Bruce *et al.*, 1998], a high strength, a good resistance to corrosion, a low density, a high permeability to X-rays, the lowest neutron absorption cross section of any metal, a high modulus of elasticity, and it is nonmagnetic [Bruce *et al.*, 1998; Bruce *et al.*, 2001; Newman, 1998; Schuler *et al.*, 2005]. Those unique properties make Be suitable for extensive use in high technology industries such as aerospace, electronics, nuclear industries, telecommunications, computer industries, dentistry and also ceramics [Benson *et al.*, 2000; Bruce *et al.*, 1998; Bruce *et al.*, 2001; Finch *et al.*, 1998; Kotloff *et al.*, 1993; Newman, 1998; Schuler *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2002]. Be is an abundant element in the Earth's crust; it has the 35<sup>th</sup> rank, with a concentration averaging 6 mg kg<sup>-1</sup> [Sharma *et al.*, 2000]. The main anthropogenic emission sources of Be are the combustion of coal and fuel oil, which results in particulates and fly ash [Bruce *et al.*, 1998].

Beryllium exposure can occur through various routes: ingestion, inhalation or dermal exposure [Bruce *et al.*, 1998; Emond *et al.*, 2007]. Exposure may cause Be sensitization (BeS) but only the inhalation of particulate Be can lead to chronic beryllium disease (CBD) [Chiarappa-Zucca *et al.*, 2004], a lung disease that can be

fatal [Taylor *et al.*, 2002]. CBD is a progressive lung disease characterized by noncaseating granulomatous inflammation, mononuclear cell infiltrates, and varying degrees of fibrosis [Benson *et al.*, 2000; Finch *et al.*, 1998; Newman *et al.*, 1996]. After chronic or subchronic exposure to Be, some workers will develop an immune response that is stimulated by Be and mediated by the lymphocyte, [Klaassen, 2001] not unlike an allergic reaction. When this happens, the individual is sensitized to Be and may eventually develop the chronic condition (CBD). If exposed to a concentration greater than  $100 \mu\text{g Be m}^{-3}$  of air, [Fournier *et al.*, 2008] they can also suffer from an acute beryllium disease (ABD), which is also known as a chemical pneumonitis. The severity of ABD appears to be directly related to the magnitude of the exposure [Bruce *et al.*, 2001]. Beryllium is also associated with numerous diseases such as pulmonary tumours, bone sarcoma, bronchitis, granulomatosis, and hepatomegaly [Sharma *et al.*, 2002]. Beryllium is a known carcinogenic for human due to the sufficient epidemiologic indications. It is on the class A carcinogen list by the United States Environmental Protection Agency (EPA) [Bruce *et al.*, 1998]. The American Conference of Industrial Hygienists (ACGIH) has also classified Be as an A1 human carcinogen; [ACGIH, 1999] the International Agency for Research on Cancer (IARC) has listed it as a group 1 carcinogen [WHO *et al.*, 1993].

For the medical surveillance of individuals with occupational history, the tests most commonly used are Beryllium Lymphocyte Proliferation Test (BeLPT) screening, urine test, bronchoalveolar lavage, chest X-rays and pulmonary function tests.

However, except for BeLPT, these tests are used for all types of lung or medical problems so they are not specific to BeS and CBD. BeLPT is an immunologic response to Be exposure by the proliferation of CD4<sup>+</sup>T lymphocyte in the blood or the bronchoalveolar cells of the sensitized individuals [Kreiss *et al.*, 1994]. This test is the only one that can differentiate BeS/CBD from sarcoidosis [Brousseau *et al.*, 2007; Marchand-Adam *et al.*, 2005] but laboratories do not always agree on the results, given the large number of false positives [Brousseau *et al.*, 2007; Fournier *et al.*, 2008]. To improve the accuracy of the diagnosis, it is mandatory to do at least two tests [Newman, 2000]. Urine test is used to assess recent exposure, but it does not give information of the health status of the individual with occupational exposure to Be [Apostoli *et al.*, 2001]. Therefore it will be interesting to find a suitable exposure indicator. *A priori*, hair seems to be a good tracer since it gives chronological information on exposure history [Screenivasa Rao *et al.*, 2002] and it is a minor excretory route [Ho *et al.*, 2001]. Moreover, the concentrations found in hair are often at least ten times greater than those found in blood or urine, and it represents the mean concentration in the body over a long period of time, given that hair grows approximately 1 to 1.5 cm/month [Ho *et al.*, 2001; Passwater *et al.*, 1983]. Hair also has other advantages over blood and urine, since it is easily and painlessly sampled; the samples can be stored at room temperature for extended periods without affecting their composition [Borella *et al.*, 1996; Dombovári *et al.*, 1998]. Hair has demonstrated very well its potential to monitor the exposure to toxic metals like: mercury, arsenic, lead, or cadmium [Ali *et al.*, 1997; Ali *et al.*, 2003; Batista *et al.*, 1996; Bencko, 1995; Bencze, 1990a; Bermejo-Barrera *et al.*,

2002; Borella *et al.*, 1996; Chyla *et al.*, 2000; Cortes Toro *et al.*, 1993; Dombovári *et al.*, 2000; Goullé, 2007; Goullé *et al.*, 2005; Hać *et al.*, 1997; Heller-Zeisler *et al.*, 1998; Menezes *et al.*, 2004; Morton *et al.*, 2002a; Nowak, 1998; Peach *et al.*, 1998; Puchyr *et al.*, 1998; Rodushkin *et al.*, 2000b; Samanta *et al.*, 2004; Screenivasa Rao *et al.*, 2002; Teresa *et al.*, 1997; Violante *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1995; Wright *et al.*, 2006]. It is well documented that: age, gender, dietary habits, environmental exposure, hair color, dental amalgam and fillings, and smoking habits are all factors that could affect the Be content in hair, and should be reported for the statistical analysis of the different hair samples [Bosque *et al.*, 1991; Chojnacka *et al.*, 2005; Kempson *et al.*, 2006; Miekeley *et al.*, 1998].

When hair analysis is performed, the common source of variance is the preparation step which includes the washing procedure and the digestion. The washing procedure is a decisive step, since it removes the exogenous deposits off the hair strand [Borella *et al.*, 1996]. The exogenous deposits include: fat, sweat, sebum, dust and cosmetics, which can all contribute trace elements [Hilderbrand *et al.*, 1974]. Various techniques are suggested, but there is no standardized protocol for hair washing. Notwithstanding the external contamination and the absence of normalized methodology, the World Health Organization (WHO), EPA, and International Atomic Energy Agency (IAEA) have recommended hair analysis as an important biological indicator of worldwide environmental exposition [Druyan *et al.*, 1998; Goullé, 2007; Morton *et al.*, 2002a; Samanta *et al.*, 2004]. Hair analysis should always be made before and after cleaning procedure, [Bencze,

1990b; Srogi, 2006] to ensure the ability to remove the element(s) of interest. The most frequently used washing procedure is the one proposed by the IAEA [Ryabukhin, 1978]. This method gave accurate results, but there were indications that the washing steps used led to significant variances between laboratories [Ali *et al.*, 2003]. According to many authors, there should be consistent methodology, fixed reference and correlation ranges for the elements present in hair [Bencze, 1990b; Borella *et al.*, 1996; Chyla *et al.*, 2000; Cortes Toro *et al.*, 1993; Druyan *et al.*, 1998; Srogi, 2006]. Since there is no standardized washing procedure, [Bass *et al.*, 2001; Borella *et al.*, 1996; Chyla *et al.*, 2000; Cortes Toro *et al.*, 1993; Morton *et al.*, 2002a; Seidel *et al.*, 2001] we have used a hybrid of different protocols [Bass *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2001; Puchyr *et al.*, 1998; Rodushkin *et al.*, 2000a]. All these protocols have used the same solvents; the only differences are the number of times each solvent is employed. We have used the washing procedure proposed by Rodushkin and Axelsson, [Rodushkin *et al.*, 2000a] but we have increased the number of washings to three instead of one or two based on the research done by Huihui who used different washing procedures and number of repetitions [Huihui *et al.*, 1990]. The non-ionic detergent Triton X-100 was used, as reported in all the references mentioned above, because it is reported to rapidly eliminate the exogenous deposits without altering the endogenous content, [Ho *et al.*, 2001] and it is inexpensive and safe [Borella *et al.*, 1996]. Three rinses with water were used to get rid of all the detergent [Ho *et al.*, 2001]. The final rinses were done according to IAEA [Passwater *et al.*, 1983; Ryabukhin, 1978].

The aim of this study is to propose a hair washing procedure, and determine if hair is a suitable biological indicator for Be exposure.

For this study, we elected to use inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES) for the analysis of Be because both inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) and graphite furnace atomic absorption spectroscopy (GF-AAS) caused some interferences and did not allow us to reach the required detection limits (MDL). The main reasons why the ICP-AES technique was used are that it exhibits a linear correlation over a wide range of concentration, and it also has a low MDL.



## **2. Materials and methods**

### **2.1 Sample preparation**

The hair samples were obtained from non-occupationally exposed volunteers clients ( $n = 2$ ) of the Hair Salon Serge Laroque (Montreal, QC, Canada). The hair is untreated and corresponds to the tips only (no scalp hair). The untreated hair samples were previously washed with regular shampoo and cut with stainless steel scissors. The mass of collected hair varied from 1 to 10 g.

All the glassware and Teflon bottles, used for storage, and sample preparation were initially decontaminated in 10% nitric acid ( $\text{HNO}_3$ ) for 12 hours and carefully rinsed with dd- $\text{H}_2\text{O}$  (ultra pure distilled-deionized water - Millipore Milli-Q).

The hair samples were placed on a funnel with a filter paper Q5 (Fisherbrand), which allows a medium speed gravity filtration. The first solvent used is acetone (HPLC grade - Fisher chemical, Canada), the hair is immersed for three consecutive times, followed by three rinses with dd- $\text{H}_2\text{O}$ . Then, the filter paper containing the hair was placed in a closed HDPE vessel with a 1:200 (v/v) Triton X-100 detergent solution (Acros, Geel, Belgium) in an ultrasonic bath for 10 minutes. The use of the ultrasonic bath is essential for an effective cleaning, since it can dislodge the exogenous deposits between the different layers of the cuticle [Bencze, 1990a]. Finally, the filter paper and the hair were replaced in the funnel

for another three rinses with dd-H<sub>2</sub>O, one rinse with acetone, another three rinses with dd-H<sub>2</sub>O, and two final rinses with acetone. The funnel was then covered with a laboratory tissue (Kimwipes) to protect the hair from further dust deposition. It was then dried in an oven at 70°C [Bass *et al.*, 2001; Chongqiu *et al.*, 2003; Schuhmacher *et al.*, 1993; Wright *et al.*, 2006] for 48 hours.

The digestion of approximately 250.0 mg of hair was done with 1.000 mL of concentrated nitric acid (67-70% - trace metal grade, Fisher Scientific) and 1.000 mL of 30% (v/v) hydrogen peroxide (trace select ultra grade, Fluka: Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Switzerland). To determine the minimal amount of reagents necessary to digest the entire hair sample, several digestions were done with different ratios of reagents. To insure that all hair is wetted by the solution, the tube was placed on a vortex for a few seconds. The mixture was covered with laboratory wrap (Parafilm "M") and placed under a fume hood for 48 hours. The digestion was done in a digestion block equipped with 110-mL Pyrex tubes. The temperature was set to 170°C for 20 minutes to allow a pre-concentration by evaporating half of the digest volume. The solution was then kept under the fume hood to cool down to room temperature. The digested solutions were then filtered using 30-mL HDPE syringe (Becton Dickinson & CO, Franklin Lakes, NJ, U.S.A.) equipped with 25-mm mixed esters of cellulose sterile syringe filters (0.45- $\mu$ m pore size) (Fisherbrand). The volume was adjusted to 25.0 mL in a class A volumetric flask with dd-H<sub>2</sub>O, which gives a final concentration of 2% nitric acid for the hair

digests. The solution was then transferred to a polyethylene bottle and stored at room temperature until analysis.

## **2.2 Analysis**

The sample digests were analyzed for Be by ICP-AES (Thermo Electron corporation, iCAP 6300 Duo, Cambridge, UK) using standard instrument operating conditions (Table 1). The optimization of the analysis was done with  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  solution of Be in 2% nitric acid solution. Multiple wavelengths such as 234.861 nm, 313.107 nm and 313.042 nm, were used to determine the most precise and accurate measurements. The 313.107 nm and 313.042 nm were rejected due to spectral interferences. The calibration was performed daily by external calibration with standard solutions of Be in 2% nitric acid. The standard solutions and the standard addition of Be were done using the Be ICP standard solution ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  in 5% nitric acid - Specpure Alfa Aesar, Ward Hill, USA)

The method detection limit was determined by calculating 3 times the standard deviation for ten measures of a washed hair digest solution. The limit of quantitation was determined with the same analysis, but the standard deviation was multiplied by ten.

A human hair certified reference material (GBW 07601, Institute of Geophysical and geochemical exploration, Chinese National Research centre for CRM,

Langfang, China), was used to verify the accuracy and the repeatability of the method.

**Table 1: Instrument operating conditions**

Nebulizer	Concentric
Spray Chamber	Cyclonic
Nebulizer and auxiliary gas	Argon
Nebulizer flow	0.65 L/min
Auxiliary flow	0.50 L min <sup>-1</sup>
Pump winding	Tygon (orange-white)
Pump speed	45 rpm
Sample flow rate	1.50 mL min <sup>-1</sup>
RF power	1150 W
Integration time	25 s
Flush time	20 s
Wavelength	234.861 nm

### 3. Results and Discussion

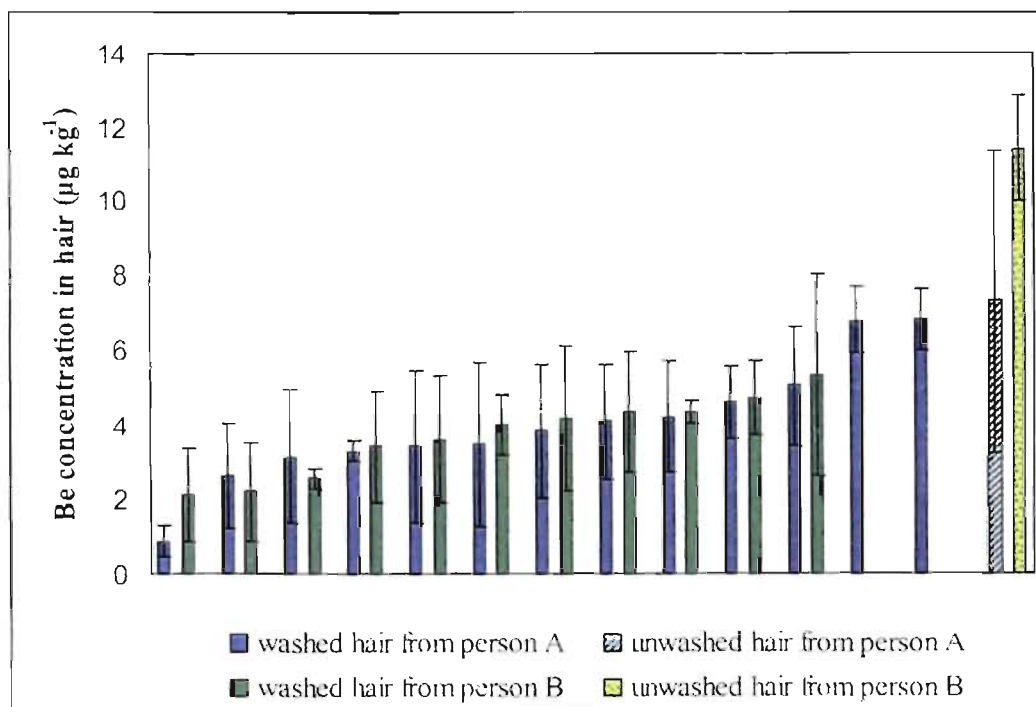
This study aims to assess the potential of hair as an indicator for Be exposure. The hair used was all distal ends, which is subject to more exogenous deposition because it was exposed to the environment for a longer period than the proximal end. This is the main reason why the hair is usually collected as close as possible to the scalp and at the occipital region [Bencze, 1990b; Morton *et al.*, 2002a; Rodushkin *et al.*, 2000a; Society of Hair Testing, 2004] .

The combination of different washing procedures gave good results, the difference of unwashed hair sample (n = 2) and washed hair sample (n = 24) are shown in Figure 1. The average Be concentration in washed hair is  $3.9 \pm 1.3 \mu\text{g kg}^{-1}$ , and in unwashed hair is  $8.3 \pm 2.4 \mu\text{g kg}^{-1}$ . A major disadvantage of evaluating the efficiency of the technique is that it was done on blank sample which gave results around the limit of quantitation (MQL) reported in Table 2, whereas all values of the washed hair sample and half of the unwashed hair are under the MQL. It would be interesting to assess the efficiency of the washing procedure with samples that have been exposed to Be-containing dusts.

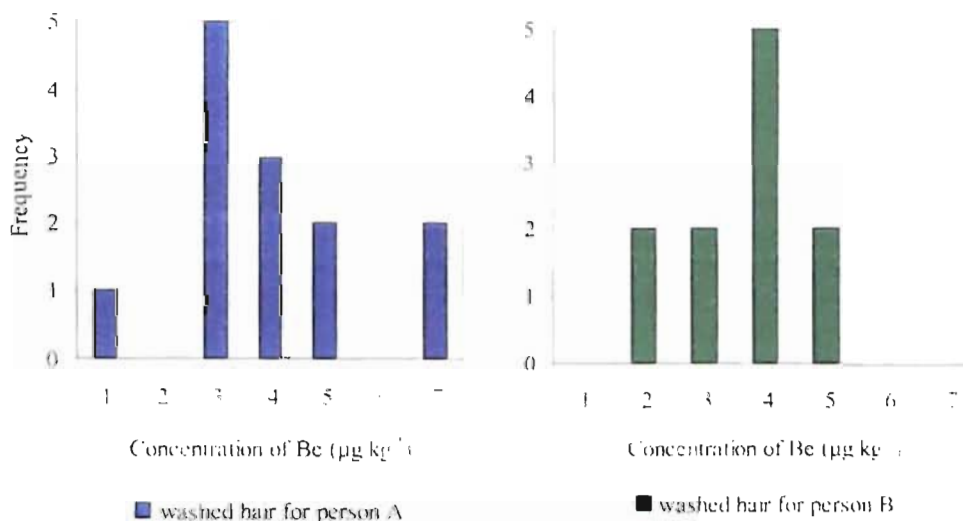
Table 2: The method detection limit and limit of quantitation in solution and in hair

Measured [Be]	Standard deviation	Detection limit	Limit of Quantitation
$0.048 \mu\text{g L}^{-1}$	$0.0067 \mu\text{g L}^{-1}$	$0.020 \mu\text{g L}^{-1}$	$0.067 \mu\text{g L}^{-1}$
$5.8 \mu\text{g kg}^{-1}$	$0.81 \mu\text{g kg}^{-1}$	$2.4 \mu\text{g kg}^{-1}$	$8.1 \mu\text{g kg}^{-1}$

Figure 1: Concentration of Be ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) with their relative standard deviation (Person A:  $n = 13$  for washed hair samples,  $n = 1$  for unwashed hair sample) (Person B:  $n = 11$  for washed hair samples,  $n = 1$  for unwashed hair sample)



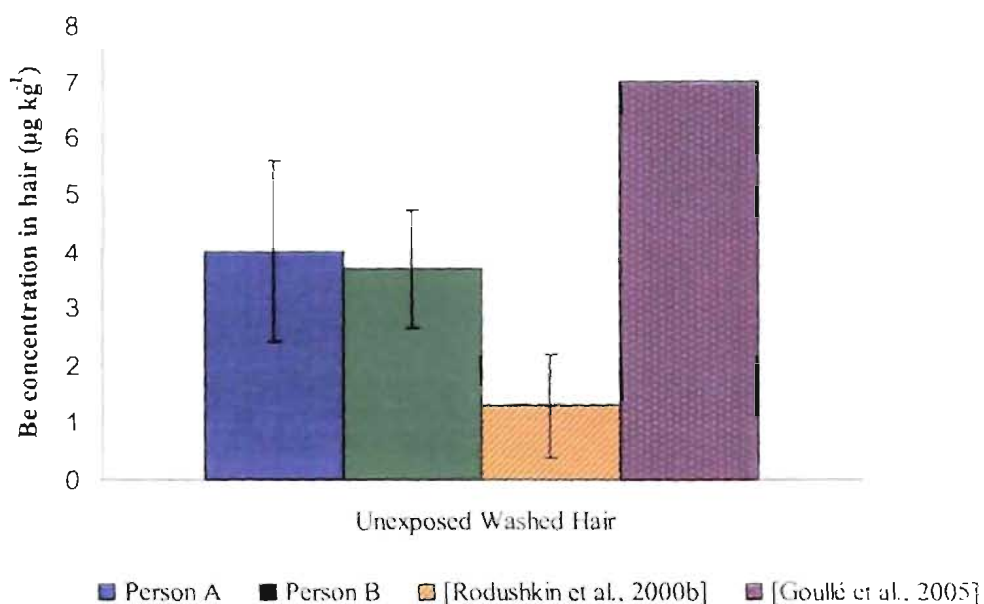
**Figure 2: Frequency distribution of each washed hair Be concentration for the 2 individuals (Person A n = 13; Person B n = 11)**



The open-vessel wet digestion was chosen because it gives a better recovery than dry ashing [Srogil, 2006]. There is no risk of losing Be by evaporation since the temperature is at least an order of magnitude below the boiling point of Be (2970°C [Bruce *et al.*, 2001]). In the literature, the amount of nitric acid and 30% (v/v) hydrogen peroxide used is often higher, [Bass *et al.*, 2001; Chyla *et al.*, 2000; Dombovári *et al.*, 2000; Goullé *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2002; Mickleley *et al.*, 1998; Morton *et al.*, 2002a; Morton *et al.*, 2002b; Puchyr *et al.*, 1998; Rodushkin *et al.*, 2000a; Srogil, 2006; Teresa *et al.*, 1997] but this would lead to a greater dilution of the digests, which would then yield a sub-µg L<sup>-1</sup> concentration of Be, that would be difficult to measure with the available instruments. The selected ratio of reagents used for this research was based on the minimum that enabled the digestion of the entire sample.

We estimated the normal range of Be concentrations in washed hair for non-occupationally exposed individuals by measuring the hair concentration of 24 samples of two distinct people, person A  $n = 13$ , and person B  $n = 11$ . The average Be concentration of the two individuals with the corresponding standard deviation, with comparative values for two other references [Goullé *et al.*, 2005; Rodushkin *et al.*, 2000b] are shown in Figure 3.

**Figure 3: Average concentration of Be in natural hair with their standard deviation (Person A:  $n = 13$ ; Person B:  $n = 11$ ) compared to values obtained in two references**



The values reported in reference [Rodushkin *et al.*, 2000b] study are for 114 urban citizens of the North-East of Sweden. It was concluded in another paper that the



population under study was environmentally exposed [Chojnacka *et al.*, 2005]. The 45 volunteers reported in the reference [Goullé *et al.*, 2005] study were also non-occupationally exposed individuals, but there is no further information available.

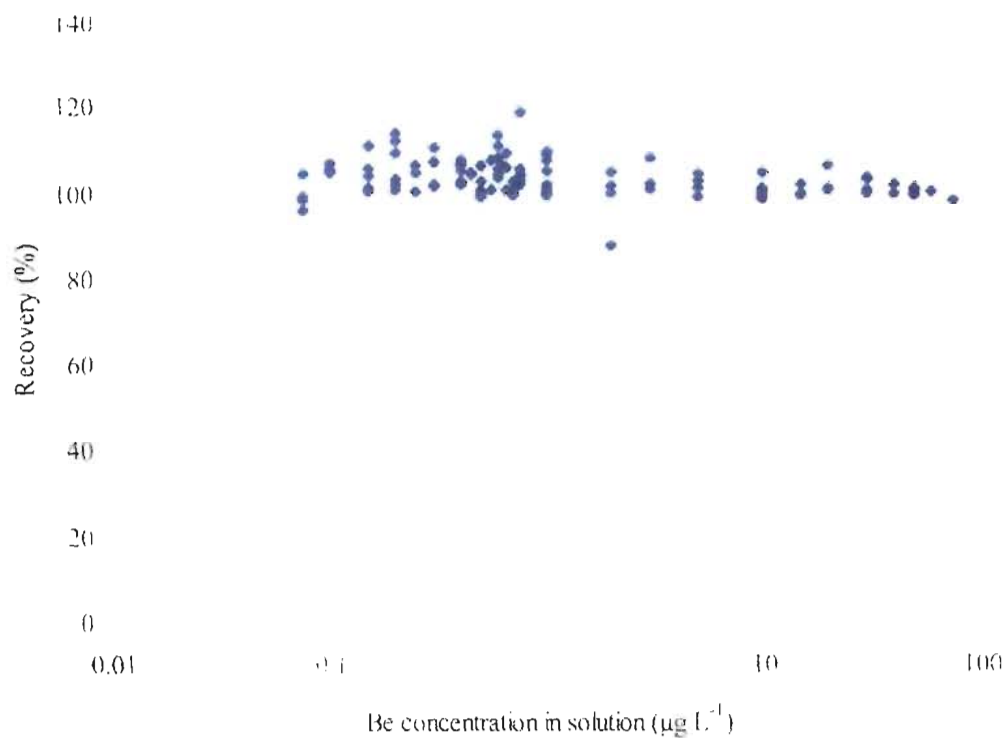
All the samples we have analyzed do show comparable Be concentration to what previous studies have shown, considering that the concentrations we found are between the average found in both references and in the same order of magnitude. Our results also suggest that the volunteers we tested were environmentally exposed, mainly because they inhabit an urban environment. This reiterates the fact that monitoring environmental factors is important. For example, the atmospheric Be concentration in U.S.A. for rural sites ranged 0.03 to 0.06 ng m<sup>-3</sup> compared to the urban areas which were 0.1 to 0.2 ng m<sup>-3</sup>, and as high as 83 ng m<sup>-3</sup> near industries using Be [Bruce *et al.*, 2001].

To ensure the accuracy of our method, a certified hair reference material, GBW 07601 (Chinese National Research centre for CRM), was analyzed using the same experimental procedure. The certified value for Be was  $63 \pm 20 \mu\text{g kg}^{-1}$ , [Institute of Geophysical and Geochemical Exploration, July 1990] and the value we measured was  $61 \pm 4 \mu\text{g kg}^{-1}$  ( $n = 58$ ). The measure of the CRM is in good agreement with the certified value with an average recovery of  $97\% \pm 6$ . Other studies have analysed the same CRM and have obtained similar results. The relative standard deviation (RSD) of our protocol is 6.6%, better than the 32% reported for the CRM. The large differences between the standard deviations are

probably due to the number of analysis (total = 7) done with different instruments, since the CRM concentration was certified with 3 different techniques: flameless atomic absorption spectrometry, inductively coupled plasma atomic emission spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry.

The standard addition method was used to verify the recovery of Be. To ensure that there were no losses in the digestion, Be was spiked prior to the digestion for hair samples already analyzed for their endogenous Be concentration. The average for the corresponding hair endogenous concentration was not used. Given its low concentration and high RSD (39%), it was not employed in recovery calculation. Figure 4 shows the recovery as a function of the added concentration. It also shows that the recovery ranged between 89% and 119%, with an average recovery of  $104\% \pm 4$  (only values over the MDL are illustrated).

**Figure 4: The recovery of beryllium for the sample addition in the hair digests. Hair samples from 5 individuals were employed randomly total of 114 samples were digested in 1.000 mL HNO<sub>3</sub> and 1.000 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (v/v)**



These data confirm the possibility of determining trace amounts of Be in hair with a good precision and accuracy.

#### 4. Conclusion

We have determined the endogenous concentration of Be in washed hair with ICP-AES with good precision and accuracy. The analysis of a hair CRM showed that our protocol gave comparable results and standard recoveries were  $97\% \pm 6$ .

The washing procedure was the step that had the greatest influence on the Be concentration, so further studies are necessary to test the efficiency of the protocol depending on the analyte of interest. The analysis of washed and unwashed samples of occupationally-exposed individuals would be more conclusive since the Be concentration would be higher than the MQL.

The range of hair concentrations of Be found to be similar to previously published data. However, more research on what constitutes a '*normal*' range would be needed. The statistical analysis of the influencing factor such as: age, gender, dietary habits, environmental exposure, occupational exposure, hair color, dental amalgams and fillings, and smoking habits [Rodushkin *et al.*, 2000b] would also be essential to properly assess this *normal* range.

The potential of human hair as a biological indicator needs further investigation on occupationally-exposed individuals to finally state if it is more accurate and or also more efficient than other biological matrices.

### **Acknowledgments**

The authors would like to thank the IRSST for their financial support. The Thermo electron staff (Weimin Yang, Michel Alsayegh, Mark A.Wingerd) for analytical support. The Polytechnique de Montréal for giving us access to their ICP instrument. We also thank Jozée Plante for the valuable comments on this manuscript.

**Chapitre 4 : Assessment of hair and bone accumulation of beryllium by mice  
exposed to contaminated dusts**

**Évaluation du potentiel d'accumulation de béryllium dans les poils et les os de  
souris exposées à des poussières contaminées**

Katherine Drolet-Vives<sup>1</sup>, Joseph Zayed<sup>2</sup>, Sébastien Sauvé<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>2</sup>Department of Environmental and Occupational Health, and GRIS  
(Interdisciplinary Health Research Group), Faculty of Medicine, Université de  
Montréal, Montréal, Québec, Canada

Accepté le 22 avril 2009

Texte original accepté par la revue *Journal of Applied Toxicology*  
avec quelques modifications

## Notes sur l'article

L'**introduction** de l'article reprend plusieurs éléments discutés dans la section introduction de ce mémoire. La **partie expérimentale** décrit en détails toutes les étapes du travail effectué en laboratoire, ce qui comprend l'exposition des souris, la collecte des échantillons, le nettoyage des poils et des os, le séchage, la digestion, la filtration, la dilution, l'analyse et l'analyse statistique. Les **résultats et la discussion** démontrent que les souris exposées à des poussières de béryllium accumulent le béryllium dans les poils et les os. De plus, les os permettent de confirmer que la granulométrie des particules influence la toxicité du Be puisque l'accumulation de Be était statistiquement plus élevée pour le groupe exposé à des particules de plus petite taille. La méthode de préparation et d'analyse a été vérifiée à l'aide de trois CRM différents qui ont donné des résultats précis et exacts. La **conclusion** de cet article est que les poils et les os sont de bons indicateurs biologiques de l'exposition au Be. Toutefois, il est nécessaire de poursuivre des études pour caractériser la relation entre la concentration de Be dans ces deux matrices et les effets immunologiques. Les **références** sont disponibles à la fin du mémoire.

## Abstract

This study looks at the accumulation of Be in the hair and bones of mice to both understand the use of hair as a bioindicator of exposure to Be and accumulation in bones as a means to evaluate the translocation of Be. We exposed two groups of mice (C3H/HeJ) to two different particles sizes of Be metal (mass median aerodynamic diameter (MMAD) = 1.5  $\mu\text{m}$ , identified here as Be-F and MMAD = 4.1  $\mu\text{m}$ , identified here as Be-I) during three weeks of nose-only inhalation exposure at a target concentration of 250  $\mu\text{g m}^{-3}$ . Another group exposed to HEPA-filtered air was used as a control group. Mice were sacrificed either 1 or 3 weeks after the end of exposure. Mice were shaved and the bones were extracted. Hair and bones were wet digested and analyzed by ICP-OES. For washed hair, results of mice sacrificed one week after the end of exposure were  $8.3 \pm 1.4 \mu\text{g Be kg}^{-1}$  hair for the control group,  $114 \pm 42 \mu\text{g Be kg}^{-1}$  hair for Be-I group, and  $159 \pm 65 \mu\text{g Be kg}^{-1}$  hair for Be-F group. Results for Be-F mice sacrificed three weeks after the end of exposure showed an average Be concentration in washed hair of  $419 \pm 100 \mu\text{g Be kg}^{-1}$  hair. We can hypothesize that excretion of Be in hair increases with time. Beryllium concentration in bones were  $6 \pm 3 \mu\text{g Be kg}^{-1}$  dry bone tissues for the control group, compared to  $24 \pm 7 \mu\text{g Be kg}^{-1}$  dry bone tissues for Be-I and  $34 \pm 6 \mu\text{g Be kg}^{-1}$  dry bone tissues or  $43 \pm 8 \mu\text{g Be kg}^{-1}$  dry bone tissues for Be-F sacrificed one or three weeks after the end of exposure respectively. These results demonstrate the potential of using hair and bone as bioindicators of Be exposure.

**Keywords:** beryllium, mice hair, mice bone, ICP-AES, inhalation exposure



## Introduction

Beryllium (Be) is a unique steel grey metal with extraordinary chemical and physical properties. It is six times harder than steel and it is also three times lighter than aluminum [Taylor *et al.*, 2002]. It has other exceptional properties, such as a high electric and thermal conductivity, a high melting point of 1278°C [Bruce *et al.*, 1998], a good resistance to corrosion, a high permeability to X-rays, the lowest neutron absorption cross section of any metal, a high modulus of elasticity and it is nonmagnetic [Rayner-Canham, 2001]. Those unique properties make Be essential in a lot of different industries such as aerospace, electronics, nuclear, automotive, telecommunication, computer, jewellery, and ceramics [Bruce *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2000]. It is also present in the dental laboratory as a component of dental amalgams and prostheses [Kotloff *et al.*, 1993].

The main problem with Be and its compounds is their extreme toxicity to human health. Lung disease was first observed in the 1930s in Europe [Newman, 1998], but the official recognition came only in the late 1940s [Paustenbach *et al.*, 2001]. At that time, the threshold limit value (TLV) was 2.0  $\mu\text{g Be m}^{-3}$  of air for occupational exposure [Paustenbach *et al.*, 2001; Zayed *et al.*, 2005]. The workplace TLV had led to a near eradication of the acute chemical pneumonitis also known as the acute beryllium disease [Newman *et al.*, 1996], but the chronic condition known as the chronic beryllium disease (CBD) was still occurring [Finch *et al.*, 1998]. In fact, the severity of ABD seems to be directly related to the dose, while the occurrence of CBD does not exhibit a linear dose-response relationship

[Paustenbach *et al.*, 2001], and exposure to Be can lead to CBD years after exposure cessation. Moreover, the physiological response to Be is immunological and a single exposure can lead to sensitization to Be [Fournier *et al.*, 2008].

Exposure to beryllium is routinely assessed by measuring atmospheric concentrations. In addition, some biological indicators such as hair can be used to evaluate exposure. In fact, hair is commonly used for several toxic metals such as: mercury, arsenic, lead or cadmium, e.g., [Loranger *et al.*, 2002; Morton *et al.*, 2002a; Puchyr *et al.*, 1998; Rodushkin *et al.*, 2000b; Samanta *et al.*, 2004]. There are several advantages of using hair to monitor exposure history, since hair is a minor excretory organ [Ho *et al.*, 2001]. Hair can also give chronological information, because it grows slowly, approximately 1 to 1.5 cm per month [Ho *et al.*, 2001]. Hair has the advantage of exhibiting toxic metal concentrations greater than an order of magnitude over blood and urine [Passwater *et al.*, 1983]. There are other advantages: it can be sampled easily, painlessly and it can be stored at room temperature without a measurable alteration of its trace element content [Dombovári *et al.*, 1998]. The main problem of hair analysis is the absence of standard methodology for hair washing. The washing procedure is essential, since it removes the exogenous deposits without touching the endogenous content. The most commonly used method is the one proposed by the International Atomic Energy Agency (IAEA) [Ryabukhin, 1978]. This method has proven its potential to give accurate results, but there is evidence that it led to significant variances between laboratories [Goullé, 2007]. To ensure the efficiency of the washing

procedure, it is essential to analyze samples before and after the washing procedure [Bencze, 1990b; Srogi, 2006]. Regardless of the external contamination and absence of normalized washing methodology, the World Health Organisation (WHO), the Environmental Protection Agency (EPA), and the IAEA have recommended the use of hair as an important biological indicator of worldwide environmental exposure [Goullé, 2007; Morton *et al.*, 2002a; Puchyr *et al.*, 1998; Samanta *et al.*, 2004].

Beryllium is also associated with numerous diseases such as pulmonary tumours, bone sarcoma, bronchitis, granulomatosis, and hepatomegaly [Sharma *et al.*, 2000]. Be has recently been added to the class A carcinogen list by the EPA [Bruce *et al.*, 1998]. The *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) has also classified Be as an A1 human carcinogen; the International Agency for Research on Cancer has listed it as a carcinogen of group 1 [WHO *et al.*, 1993]. These classifications mean that beryllium is carcinogenic to humans due to sufficient epidemiologic evidence. Since bones are the last deposition site of Be [Finch *et al.*, 1990], and since Be can cause bone cancer also known as osteogenic sarcoma [Kelly *et al.*, 1961], it would be interesting to assess its potential as a bioindicator. The advantage of bone is the high residence time of metals, which makes it possible to assess the exposure and the accumulation over years or even decades [Kuo *et al.*, 2000]. It has been used for toxic metals like lead [Baranowska *et al.*, 1995; Gil *et al.*, 1993; Kuo *et al.*, 2000; Ščančar *et al.*, 2000; Todd *et al.*, 2001], aluminum [Kuo *et al.*, 2000; Ščančar *et al.*, 2000], or cadmium [Baranowska

*et al.*, 1995; Kuo *et al.*, 2000]. The main disadvantage is the difficulty to obtain samples, since bone biopsy is painful and invasive.

The beryllium concentration in human hair and bones can be affected by several factors like: gender, age, race, dietary habits, environmental exposure, smoking habits, dental amalgam and fillings [Bosque *et al.*, 1991; Kuo *et al.*, 2000; Miekeley *et al.*, 1998]. To overcome these factors in animal studies, it is appropriate to use individuals of the same age.

The aim of this study is to assess the potential of hair and bone as biological indicators of beryllium exposure and to better understand bone deposition. We do not envision that beryllium bone concentrations would be likely to be used to monitor Be exposure, but this provides interesting information on the translocation of Be in mammals.

## Methods

### *Animals & exposure*

In order to reach the objective of this study, a toxicological inhalation experiment using a murine model was performed in our laboratory. We used 9-week old male mice C3H/HeJ (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) divided into three groups: a control group (n = 7), a group exposed to beryllium metal (Be S-200F with a blended powder purity of 99.1% minus 325 mesh; Brush-Wellman, Cleveland, OH, U.S.A.) with a mass median aerodynamic diameter (MMAD) of  $4.1 \pm 0.6 \mu\text{m}$  (Be-I group, n = 35) and a group exposed to Be particles with an MMAD of  $1.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$  (Be-F group, n = 40).

Exposure was carried in an inhalation chamber (Model 04-1100; In-Tox Products, Albuquerque, NM) at the *Université du Québec à Montréal*, over 3 weeks (5d/w, 6h/d) using HEPA-filtered air for the control group and at a target concentration of  $250 \mu\text{g Be m}^{-3}$  of air for the two exposed groups [Stiefel *et al.*, 1980]. Mice were sacrificed either one or three weeks (for a sub-group (n = 5) of Be-F group only) after the end of exposure. More details on the methodology are available in the paper of [Salehi *et al.*, 2009] and in the chapter 2 and 3 of this thesis.

### *Hair & Bone preparation*

All the sacrificed mice were shaved (not the head), and the hair was placed in sterile HDPE closed vessels in the freezer up to the washing procedure. The two legs (from hip to toe) and the two arms (from scapula to fingers) of the mice were collected and placed in sterile HDPE closed vessel, and the extraction of the tissue was done just after the collection. All the glassware and Teflon bottles, used for storage, and sample preparation were initially decontaminated in 10% nitric acid for 12 hours and carefully rinsed with dd-H<sub>2</sub>O (ultra pure distilled-deionized water, Millipore Milli-Q, Molsheim, France).

The washing procedure is important because mice were shaved in the inhalation exposure room, which meant a higher probability of exogenous deposition of Be on the hair strand. The details of the washing and the digestion protocol were given in Chapter 3 of this thesis. The hair samples were washed with acetone (HPLC grade - Fisher chemical, Canada) and dd-H<sub>2</sub>O, where each solvent was used in triplicate [Huihui *et al.*, 1990]. Then, hair was cleaned with a non-ionic detergent, 1:200v/v Triton X-100 (Acros, Geel, Belgium), in an ultrasonic bath for 10 minutes. The use of the ultrasonic bath is essential for an effective cleaning, since it dislodges the exogenous trace metal retained between the different layers of the cuticle [Bencze, 1990a; Kempson *et al.*, 2006]. Finally, the hair was rinsed three times with dd-H<sub>2</sub>O, once with acetone, another three times with dd-H<sub>2</sub>O, and two final rinses with acetone. The hair was then dried in an oven at 70°C for 48 hours.

The digestion was done for approximately 0.2500 g of hair weighted accurately, placed in a Pyrex tube with 1.000 mL concentrated nitric acid (67-70% - trace metal grade, Fisher Scientific, Ottawa, Canada) and 1.000 mL 30% (v/v) hydrogen peroxide (trace select ultra grade, Fluka: Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Switzerland). The tube was placed on a vortex for a few seconds, and the mixtures were covered with laboratory wrap (Parafilm "M", Pechiney plastic packaging, Chicago, IL, U.S.A.) and placed under a fume hood for 48 hours. The digestion was performed in a digestion block (VELP scientifica, Usmate, Italy) at a target temperature of 170°C for 20 minutes. The solutions were then kept under the fume hood to cool down to room temperature. A filtration of the digested solution was done with a 30-mL HDPE syringe (Becton Dickinson & CO, Franklin Lakes, NJ, U.S.A.) equipped with a 25-mm mixed esters of cellulose sterile syringe filter (0.45- $\mu$ m pore size) (Fisherbrand, Ireland). The volume was adjusted to 25.00 mL in a class A volumetric flask with dd-H<sub>2</sub>O, which gave an approximately 2% nitric acid hair's digest solution. The solution was then transferred to a polyethylene bottle and stored at room temperature until analysis.

The bone preparation includes the extraction of the tissue. It was done by immersing the four limbs in methanol (reagent grade, Fisher chemical, Canada) for 12 hours, rinsing with dd-H<sub>2</sub>O, soaked in 30% (v/v) hydrogen peroxide (reagent grade, Fisher, Fair Lawn, NJ, U.S.A.) solution for 24 hours and a final rinse in dd-H<sub>2</sub>O [Todd *et al.*, 2001]. The tissue was then easily removed from the bone. All the

bones were put in clean glass test tubes covered with laboratory wrap, which were then let to dry in an oven for 48 hours at 60°C [Ščančar *et al.*, 2000].

The digestion was done with all the bones available, which had a mass between 0.2000 g and 0.3200 g. The bones of each mouse were placed in a Pyrex tube with 2.000 mL of concentrated nitric acid (67-70% - trace metal grade, Fisher Scientific, Ottawa, Canada) [Gil *et al.*, 1993; Ščančar *et al.*, 2000]. The blends were then covered with laboratory wrap and placed under the fume hood for 48 hours. The digestion was done on a digestion block at 170°C for 20 minutes. The rest of the solution preparation was the same as for hair.

### *Analysis*

The samples were analyzed for Be by ICP-AES (Thermo Electron corporation, iCAP 6300 Duo, Cambridge, UK) using standard instrument operating conditions (Table 1). The maximization of the analysis was done with 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  solution of Be in 2% nitric acid solution. Multiple wavelengths, 234.861 nm, 313.107 nm and 313.042 nm, were used to determine the most precise and accurate. The 313.107 nm and 313.042 nm were rejected due to spectral interferences. The calibration was performed daily by external calibration with standard solutions (0, 5, 20, 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) of Be in 2% nitric acid. The standard solutions of Be were prepared using the Be ICP standard solution (1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in 5% nitric acid - Specpure Alfa Aesar, Ward Hill, USA).



**Table 1 : Instrument operating conditions**

Nebulizer	Concentric
Spray Chamber	Cyclonic
Nebulizer and auxiliary gas	Argon
Nebulizer flow	0.65 L/min
Auxiliary flow	0.50 L min <sup>-1</sup>
Pump winding	Tygon (orange-white)
Pump speed	45 rpm
Sample flow rate	1.50 mL min <sup>-1</sup>
RF power	1150 W
Integration time	25 s
Flush time	20 s
Wavelength	234.861 nm

To evaluate the accuracy of the method, a certified reference material (CRM) of hair powder, GBW 07601 (Institute of Geophysical and geochemical exploration, Chinese National Research centre for CRM, Langfang, China), was analyzed. Since there was no bone CRM with certified value for Be, we validated the method using synthetic limestone, GBW 07712 and GBW 07713 (Institute of Geophysical and geochemical exploration, Chinese National Research centre for CRM, Langfang, China) which, like bones, is also calcium-rich. The CRM preparation and analysis was the same as for the bone samples.

#### *Statistical analysis*

Comparisons between the groups were done with SPSS/PC program, using the one-way analysis of variance ANOVA and the post hoc Tukey B's test. The level of significance was set at a risk of 0.05.

## Results and discussion

The purpose of this study was to quantify Be in hair and bones of exposed mice. The measurements were done with an ICP-AES which exhibits a good sensitivity and an excellent reproducibility. The average measure of the blank (ten replicates), the standard deviation, the method limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were calculated using the procedure proposed by the Quebec Ministry of the Environment laboratory manual [ Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2007]. This method calculates the LOD by multiplying the standard deviation of seven or more replicates by three and the LOQ is obtained by multiplying the same standard deviation by ten. For the digests, the LOD was  $0.020 \mu\text{g Be L}^{-1}$ , which correspond to  $2.4 \mu\text{g Be kg}^{-1}$  of hair, and the LOQ was  $0.067 \mu\text{g Be L}^{-1}$ , which correspond to  $8.1 \mu\text{g Be kg}^{-1}$  of hair.

As already mentioned, determination of Be was done after three weeks of exposure to approximately  $250 \mu\text{g m}^{-3}$ ; mice were then sacrificed one week after the last exposure except for five mice of the Be- $\bar{F}$  group. Some of the hair were digested without washing ( $n = 10$ ) and some were washed ( $n = 59$ ) prior to the digestion. Table 2 shows the overall results obtained for the 6 controls, and the 63 exposed mice.

**Table 2: Average Be concentration ( $\mu\text{g Be kg}^{-1}$  of hair  $\pm$  Standard Deviation) in washed and unwashed mice hair (control  $n = 7$ , unwashed Be-I  $n = 5$ , unwashed Be-F  $n = 5$ , washed Be-I  $n = 20$ , washed Be-F  $n = 28$ , washed Be-F (3w)  $n = 5$ ) and bones (control  $n = 9$ , Be-I  $n = 30$ , Be-F  $n = 31$ , Be-F (3w)  $n = 5$ ).**

<b>Control group</b>	<b>Exposed Be-I group</b> (sacrificed 1 w after the end of exposure)		<b>Exposed Be-F group</b> (sacrificed 1 w after the end of exposure)		<b>Exposed Be-F group</b> (sacrificed 3 w after the end of exposure)
<b>Hair</b>					
<b>washed</b>	<b>unwashed</b>	<b>washed</b>	<b>unwashed</b>	<b>washed</b>	<b>washed</b>
$8 \pm 1$	$(6 \pm 8) 10^2$	$110 \pm 40$	$(7 \pm 4) 10^2$	$160 \pm 60$	$400 \pm 100$
<b>Bone</b>					
$6 \pm 3$	$24 \pm 7$		$34 \pm 6$		$43 \pm 8$

The variance of the Be concentration from mouse to mouse is important, most mean concentrations have a standard deviations in the same order of magnitude. This high standard deviation is due to the naturally occurring differences among individuals, genetic polymorphism, and the effect of the different phases of hair growth. Since only the hair in the anagen growth phase can incorporate trace elements and that all hair has its own individual growth cycle. If some hair were in the catagen phase, which is a transient step, or the telogen phase, which corresponds to the resting phase, there is no incorporation of trace elements in hair, and those phases can last between one to six months [Bencze, 1990a].

There are three major observations resulting from this. The first is that there is a statistical difference between exposed mice and controls ( $p < 0.0001$ ), which suggests that it is possible to detect inhalation exposure to Be powder in the hair. The second observation is the meaningful difference ( $p < 0.05$ ) between washed

and unwashed hair, which implies that the washing procedure significantly washed off the exogenous deposits. The third observation is the increased deposition over time [Finch *et al.*, 1990], as shown by the significant difference ( $p < 0.05$ ) between Be concentrations in hair of mice sacrificed three weeks and one weeks after the end of exposure. Thus, the deposition of Be in hair will continue even if the exposure to Be powder has stopped, which could in some cases be an interesting advantage over other classical bioindicators, such as urine or blood.

The results for the bones of the 9 controls and of the 70 exposed mice are presented in Table 2. These results are much more significant than for the hair samples, as there is less variance among mice. This is probably due to the fact that the skeleton is one of the terminal deposition sites for Be [Bruce *et al.*, 2001]. It was observed in the animal models, such as beagle dogs [Finch *et al.*, 1990] and rabbits [Kelly *et al.*, 1961], that the Be cleared from the lungs through blood undergoes deposition mainly in the tracheobronchial lymph nodes, the liver and the bones [Finch *et al.*, 1990]. These results also show a significant difference ( $p < 0.01$ ) between Be-*I* and Be-*F* groups. This difference is explainable by the evidence that smaller particles of Be can penetrate deeper into the lungs [Stefaniak *et al.*, 2007], and then more easily transferred to the blood stream and deposited into the skeleton. There is also a possibility that the bigger size particles will be expelled from the respiratory tract by the mucociliary escalator, where the particle will be ejected to the gastrointestinal tract, or through coughing and sneezing, which is the only way to immediately eject it out of the body. There is also a meaningful difference,

$p < 0.001$ , between the control group and the exposed mice which suggests that bone can be considered as a good biological indicator. Finally, it is also possible to state that deposition in the bone increases over time since the difference between the mice sacrificed one week and three weeks after the end of exposure show significant difference,  $p < 0.01$ .

The values for the control mice are higher than the LOD, but lower than the LOQ. This means that the amount of Be in the unexposed mice's bone is subject to a lot of variance as expressed by the standard deviation which is in the same order of magnitude than the mean values. However, it is obvious that the exposed mice exhibit significant deposition of Be in their skeleton.

To verify the accuracy of the analytical method; three different CRM were used. Since there was no bone CRM with certified value of Be, a synthetic limestone was used because it has high calcium content as observed in bones. The values measured and certified are reported in Table 3.

**Table 3: Be concentration ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) in CRM of hair (GBW 07601 n = 58) and synthetic limestone (GBW 07712 n = 15, GBW 07713 n = 15)**

	<b>GBW 07601</b>	<b>GBW 07712</b>	<b>GBW 07713</b>
<i>Measured</i>	$61 \pm 7$	$218 \pm 8$	$516 \pm 20$
<i>Certified</i>	$63 \pm 20$	$220 \pm 50$	$520 \pm 70$

To certify the accuracy of our method, CRM were prepared and analyzed using the same experimental procedure for both matrices. The measured values (n = 58) for hair CRM, GBW 07601, are precise and accurate. For the synthetic limestone CRM, GBW 07712 (n = 15) and GBW 07713 (n = 15), the measured value are also precise and accurate. The relative standard deviation (RSD) of our protocol is 11% for GBW 07601. The RSD of GBW 07712 and GBW 07713 are 4% for both. Overall, given the challenge of the washing and digestion of minutes amounts of hair and bones, the above results are excellent.

## **Conclusions**

The goal of this study was to determine if hair and bones can be considered as good bioindicators for Be exposure. The overall results clearly show their good potential. They also demonstrate that the murine model has been quite useful. These findings may help to initiate further research efforts to characterize the relation between hair and bone concentrations and immunological effects. It would be also very interesting to evaluate the dose-response relationship between different exposure concentrations and the hair and bone concentrations.

## Acknowledgments

This research was supported by the *Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail* (IRSST). The authors are grateful to the technical support of Lise Gareau, Julienne Lama, Louis Zayed and Caroline Muller. The Thermo Electron staff (Weimin Yang, Michel Alsayegh and Mark A. Wingerd) for analytical support. The École Polytechnique de Montréal for giving us access to their ICP instrument. We also thank Jozée Plante for the valuable comments.



## Chapitre 5 : Conclusion

Cette étude a démontré le potentiel des cheveux et des os comme indicateurs d'exposition pour le Be. De plus, elle a témoigné de l'efficacité de la technique de nettoyage des cheveux pour éliminer les dépôts exogènes de Be sur le follicule pileux puisqu'elle a permis de grandement diminuer la variabilité des mesures de concentration de Be. Par contre, aucune preuve ne permet de déterminer que ce protocole n'élimine pas le Be endogène. Aux fins de l'étude, nous avons également déterminé le taux de Be « normal » chez l'humain qui n'est pas exposé professionnellement. Une étude plus élaborée sur ce sujet serait nécessaire pour évaluer statistiquement tous les facteurs qui peuvent influencer sur la concentration de Be, mais le plus important serait de déterminer les taux de Be dans les cheveux de personnes atteintes de BeS ou de CBD. La méthode analytique a été évaluée avec des échantillons de cheveux où des ajouts dosés, couvrant une large gamme dynamique, ont été faits ainsi que des échantillons de CRM, ce qui prouve la précision et l'exactitude de ce protocole. Cette étude révèle donc la grande efficacité de la méthode analytique, malgré le fait que l'ICP-AES ait une limite de quantification dans le même ordre de grandeur que la concentration endogène de Be. Il serait donc intéressant d'évaluer la concentration du Be avec un ICP-MS équipé d'un détecteur à haute résolution.

L'évaluation des concentrations de Be dans les poils et les os de souris exposées a permis de déterminer qu'il y a effectivement accumulation significative de Be dans

ces deux matrices. De plus, cette recherche a permis de confirmer que plus les particules de Be sont petites, plus elles sont accumulées. Il serait très intéressant d'évaluer la toxicité de différentes formes chimiques de Be puisque les particules solubles seront excrétées plus rapidement que celles qui sont insolubles. De surcroît, l'évaluation de l'aire de la surface serait aussi nécessaire puisque certaines formes peuvent se déposer dans l'arbre respiratoire avant d'atteindre la région alvéolaire. Cette étude a aussi permis de démontrer que malgré la cessation de l'exposition au Be, l'accumulation de Be dans ces deux matrices continue d'augmenter. L'analyse des cheveux est donc un indicateur biologique intéressant pour l'évaluation de l'exposition au Be même si celle-ci a cessé. Les os aussi sont intéressants, mais non applicables à l'humain puisqu'une biopsie osseuse est invasive et douloureuse et que la technique de la spectrométrie de fluorescence X ne fonctionne pas pour le Be.

Les cheveux humains sont des matrices intéressantes pour l'évaluation de l'impact de l'environnement sur l'homme, mais d'autres recherches sont nécessaires pour diminuer la variabilité des valeurs mesurées. Par exemple, l'évaluation de la phase de croissance du cheveu en observant la racine pour permettre les évaluations chronologiques. De plus, si l'extraction du cheveu est faite avec la racine, l'étude de l'ADN [Srogi, 2006] pourrait permettre d'évaluer la présence de marqueurs génétiques tels que HLADP $\beta$ 1<sup>E69</sup> [Amicosante *et al.*, 2001; Cai *et al.*, 2000; Kreiss *et al.*, 1994; Maier *et al.*, 2002; McCanlies *et al.*, 2003; Newman, 2000; Rossman,

2001; Rossman *et al.*, 2001; Sawyer *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2001; Weston *et al.*, 2002].

### Références:

- ACGIH. 1999. Effects on workers health. In *Symposium on Beryllium*. Washington, D.C.
- Ali M, Khan AH, Wahiduzzaman AKM, Malek MA. 1997. Trace element concentration in hair of Bangladesh children under normal and malnutrition conditions. *Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **219** (1): 81-87.
- Ali M, Tarafdar SA. 2003. Arsenic in drinking water and in scalp hair by EDXRF: A major recent health hazard in Bangladesh. *Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **256** (2): 297-305.
- Amicosante M, Sanarico N, Berretta F, Arroyo J, Lombardi G, Lechler R, Colizzi V, Saltini C. 2001. Beryllium binding to HLA-DP molecule carrying the marker of susceptibility to berylliosis glutamate  $\beta$ 69. *Human Immunology* **62**: 686-693.
- Apostoli P, Schaller KH. 2001. Urinary beryllium - a suitable tool for assessing occupational and environmental beryllium exposure? *International Archives of Occupational and Environmental Health* **74**: 162-166.
- Baranowska I, Czernicki K, Aleksandrowicz R. 1995. The analysis of lead, cadmium, zinc, copper and nickel content in human bones from the Upper Silesian industrial district. *The Science of the Total Environment* **159**: 155-162.
- Bass DA, Hickok D. 2001. Trace Element Analysis in Hair: Factors Determining Accuracy, Precision, and Reliability. *Alternative Medicine Review* **6** (No. 5): 472-481.
- Batista J, Schuhmacher M, Domingo JL, Corbella J. 1996. Mercury in hair for a child population from Tarragona Province, Spain. *The Science of the Total Environment* **193**: 143-148.
- Bencko V. 1995. Use of human hair as a biomarker in the assessment of exposure to pollutants in occupational and environmental settings. *Toxicology* **101**: 29-39.
- Bencze K. 1990a. What contribution can be made to biological monitoring by hair analysis? Part 1. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **337**: 867-876.
- Bencze K. 1990b. What contribution can be made to biological monitoring by hair analysis? Part 2. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **338**: 58-61.
- Benson JM, Holmes AM, Barr EB, Nikula KJ, March TH. 2000. Particle clearance and histopathology in lungs of C3H/HeJ mice administered beryllium/copper alloy by intratracheal instillation. *Inhalation Toxicology* **12**: 733-749.
- Bermejo-Barrera P, Moreda-Piñeiro A, Bermejo-Barrera A, Bermejo-Barrera AM. 2002. Application of multivariate methods to scalp hair metal data to distinguish between drug-free subjects and drug abusers. *Analytica Chimica Acta* **455**: 253-265.
- Borella P, Rovesti S, Caselgrandi E, Bargellini A. 1996. Quality control in hair analysis: a systematic study on washing procedures for trace element determinations. *Mikrochimica Acta* **123**: 271-280.

- Bosque MA, Domingo JL, Llobet JM, Corbella J. 1991. Cadmium in hair of school children living in Tarragona, Spain. Relationship to age, sex, and environmental factors. *Biological Trace Element Research* **28** (2): 147-155.
- Brousseau P, Rossignol M, Dion C, Sicard N, Audusseau S, Mazer B. 2007. Concordance interlaboratoire des tests de prolifération induite par le béryllium (BeLPT). Montréal: IRSST.
- Bruce RM, Ingerman L, Jarabek A. 1998. Toxicological review of beryllium and compounds (7440-41-7) In support of summary information on the integrated risk information system (IRIS). Washington: U.S. Environmental Protection Agency.
- Bruce RM, Odin M. 2001. Concise International Chemical Assessment Document 32: Beryllium and beryllium compounds. Geneva: United Nations Environment programme, International Labour Organization, World Health Organisation.
- Cai H, White PS, Torney D, Deshpande A, Wang Z, Marrone B, Nolan JP. 2000. Flow cytometry-based minisequencing: a new platform for high-throughput single-nucleotide polymorphism scoring. *Genomics* **66**: 135-143.
- Cairns T, Schaffer M, Hill V. 2007. Workplace drug testing using hair samples. *Forensic Science Series: Analytical and practical aspects of drug testing in hair*: 325-342.
- Caroli S, Senofonte O, Violante N, Fornarelli L, Powar A. 1992. Assessment of reference values for elements in hair of urban normal subjects. *Microchemical* **46**: 174-183.
- Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. 2007. Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie. In *DR-12-VMC; Les Publications du Québec*: Québec; 7-14.
- Chèze M, Deveaux M, Duffort G, Billault F, Pépin G. 2007. Pharmaceuticals in hair. *Forensic Science Series: Analytical and practical aspects of drug testing in hair*: 163-185.
- Chiarappa-Zucca M, Finkel RC, Martinelli RE, McAninch JE, Nelson DO, Turteltaub KW. 2004. Measurement of beryllium in biological samples by accelerator mass spectrometry: Applications for studying chronic beryllium disease. *Chemical Research in Toxicology* **17**: 1614-1620.
- Chojnacka K, Górecka H, Chojnacki A, Górecki H. 2005. Inter-element interactions in human hair. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **20**: 368-374.
- Chongqiu J, He F. 2003. Spectrofluorimetric determination of trace amounts of beryllium in mineral water and human's hair. *Spectrochimica Acta Part A* **59**: 1321-1328.
- Chyla MA, Zyrnicki W. 2000. Determination of Metal Concentrations in Animal Hair by the ICP Method Comparison of Various Washing Procedures. *Biological Trace Element Research* **75**: 187-194.
- Cirimele V. 2007. Amphetamine determination in hair. *Forensic Science Series: Analytical and practical aspects of drug testing in hair*: 143-162.
- Ciszewski A, Wasiak W, Ciszewska W. 1997. Hair analysis. Part 2. Differential pulse anodic stripping voltammetric determination of thallium in human

- hair samples of persons in permanent contact with lead in their workplace. *Analytica Chimica Acta* **343**: 225-229.
- Cortes Toro E, De Goeij JJM, Basco J, Cheng Y-D, Kinova L, Matsubara J, Niese S, Sato T, Wesenberg GR, Muramatsu Y, Parr RM. 1993. The significance of hair mineral analysis as a means for assessing internal body burdens of environmental pollutants: results from an IAEA co-ordinated research programme. *Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **167** (2): 413-421.
- Dion C, Perrault G. 2003. Nettoyage et décontamination des lieux de travail où il y a présence de Beryllium: Synthèse des bonnes pratiques. Montréal: IRSST.
- Dombovári J, Becker JS, Dietze H-J. 2000. Multielemental analysis in small amounts of environmental reference materials with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **367**: 407-413.
- Dombovári J, Papp L. 1998. Comparison of sample preparation methods for elemental analysis of human hair. *Microchemical* **59**: 187-193.
- Druyan ME, Bass D, Puchyr R, Urek K, Quig D, Harmon E, Marquardt W. 1998. Determination of reference ranges for elements in human scalp hair. *Biological Trace Element Research* **62**: 183-197.
- Dweik RA. *Berylliosis*, oct 19 2007 [cited June 30 2008. Available from [www.emedicine.com/med/topic222.htm](http://www.emedicine.com/med/topic222.htm).
- Emond C, Robin J-P, Philippe S, Zayed J. 2007. Dermal exposure to beryllium: a pilot case study. *Toxicology and Environmental Health, Part A* **70**: 529-533.
- Fido A, Al-Saad S. 2005. Toxic trace elements in the hair of children with autism. *SAGE Publications and The National Autistic Society* **9** (3): 290-298.
- Finch GL, Hoover MD, Hahn FF, Nikula KJ, Belinsky SA, Haley PJ, Griffith WC. 1996. Animal models of beryllium-induced lung disease. *Environmental Health Perspectives Supplements* **104** (S5): 973-979.
- Finch GL, Mewhinney JA, Hoover MD, Eidson AF, Haley PJ, Bice DE. 1990. Clearance, translocation, and excretion of beryllium following acute inhalation of beryllium oxide by beagle dogs. *Fundamental and Applied Toxicology* **15**: 231-241.
- Finch GL, Nikula KJ, Hoover MD. 1998. Dose-response relationships between inhaled beryllium metal and lung toxicity in C3H mice. *Toxicological Sciences* **42**: 36-48.
- Forbes RM, Cooper AR, Mitchell HH. 1954. On the occurrence of beryllium, boron, cobalt, and mercury in human tissues. *Biological Chemistry*: 857-865.
- Fournier M, Bernier J, Brousseau P, Cyr D, Viel G, Sauvé S. 2008. Développement de marqueurs et validation d'outils de diagnostic pour le dépistage de l'hypersensibilité induite par le béryllium. Montréal: Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST).
- Gil F, Pérez ML, Facio A, Villanueva E, Tojo R, Gil A. 1993. Microwave oven digestion procedure for atomic absorption spectrometry analysis of bone and teeth. *Clinica Chimica Acta* **221**: 23-31.
- Goullé J-P. 2007. Metals. In *Forensic Science Series: Analytical and practical aspects of drug testing in hair*, edited by Kintz P. CRC Press Taylor & Francis Group: New York; 343-369.

- Goullé J-P, Mathieu L, Castermant J, Neveu N, Bonneau L, Lainé G, Bouige D, Lacroix C. 2005. Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair Reference values. *Forensic Science International* **153**: 39-44.
- Gulson BL, Mahaffey KR, Jameson CW, Patison N, Law AJ, Mizon KJ, Korsch MJ, Pederson D. 1999. Impact of diet on lead in blood and urine in female adults and relevance to mobilization of lead from bone stores. *Environmental Health Perspectives* **107** (4): 257-263.
- Hać E, Czarnowski W, Gos T, Krechniak J. 1997. Lead and fluoride content in human bone and hair in the Gdansk region. *The Science of the Total Environment* **206**: 249-254.
- Haley PJ, Finch GL, Mewhinney JA, Harmsen AG, Hahn FF, Hoover MD, Muggenburg BA, Bice DE. 1989. A canine model of beryllium-induced granulomatous lung disease. *Laboratory Investigation* **61** (2): 219-227.
- Haley PJ, Pavia KF, Swafford DS, Davila DR, Hoover MD, Finch GL. 1994. The comparative pulmonary toxicity of beryllium metal and beryllium oxide in cynomolgus monkeys. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* **16** (4): 627-644.
- Heller-Zeisler SF, Parr RM, Zeisler R. 1998. Certification of two human hair reference materials issued by the International Atomic Energy Agency. *Fresenius Journal of Analytical chemistry* **360**: 419-422.
- Hilderbrand DC, White DH. 1974. Trace-Element Analysis in Hair: An Evaluation. *Clinical Chemistry* **20** (No. 2): 148-151.
- Ho J, Boenheim F, Pangborn J, Spitz J, Smith B. 2001. Hair element testing, Clinical utility and reliability. *Referenced White Paper by Great Smokies Laboratory*
- Hoagland MB, Grier RS, Hood AB. 1950. Beryllium and growth. I. Beryllium-induced osteogenic sarcomata. *Cancer Research* **10** (10): 629-635.
- Huihui Y, Shuxi Z, Yi Z. 1990. Discussion on the Effect of Washing Procedures on Human Hair Samples. *Fenxi Huaxue (Analytical Chemistry)* **18** (No.12): 1134-1137.
- Institute of Geophysical and Geochemical Exploration. July 1990. Certificate of Certified Reference Material: Vegetable and Human Hair (GBW 07601), edited by CRM's NRCf. Langfang, China: General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of People's Republic of China.
- Jurado C. 2007. Hair analysis for cocaine. *Forensic Science Series: Analytical and practical aspects of drug testing in hair*: 95-125.
- Kelly PJJ, Joseph M., Peterson LFA. 1961. The effect of beryllium on bone. A morphological study of the progressive changes observed in rabbit bone. Rochester: Orthopedic Surgery, Mayo Clinic.
- Kempson IM, Skinner WM. 2006. Advanced analysis of metal distributions in human hair. *Environmental Science & Technology* **40** (10): 3423-3428.
- Kent MS, Robins TG, Madl AK. 2001. Is total mass or mass of alveolar-deposited airborne particles of beryllium a better predictor of the prevalence of

- disease? A preliminary study of a beryllium processing facility. *Applied Occupational and Environmental Hygiene* **16** (5): 539-558.
- Kidwell DA, Smith FP. 2007. Passive exposure, decontamination, cutoffs, and bias: pitfalls in the interpretation of hair analysis results for cocaine use. *Forensic Science Series: Analytical and practical aspects of drug testing in hair*: 25-72.
- Kintz P. 2007. Detection of doping agents in human hair. *Forensic Science Series: Analytical and practical aspects of drug testing in hair*: 241-254.
- Klaassen CD. 2001. *Casarett & Doull's Toxicology: The basic science of poisons*. 6th ed. McGraw-Hill, Medical Publishing division: New York; 1236.
- Kotloff RM, Richman PS, Greenacre JK, Rossman MD. 1993. Chronic beryllium disease in a dental laboratory technician. *The American Review of Respiratory Disease* **147**: 205-207.
- Kreiss K, Miller F, Newman LS, Ojo-Amaize EA, Rossman MD, Saltini C. 1994. Chronic Beryllium Disease-From the Workplace to Cellular Immunology, Molecular Immunogenetics, and Back. *Clinical Immunology and Immunopathology* **71** (2): 123-129.
- Kronstrand R, Druid H. 2007. Hair in postmortem toxicology. *Forensic Science Series: Analytical and practical aspects of drug testing in hair*: 223-239.
- Kronstrand R, Scott K. 2007. Drug incorporation into hair. *Forensic Science Series: Analytical and practical aspects of drug testing in hair*: 1-23.
- Kruse-Jarres J. 2000. Limited usefulness of essential trace element analyses in hair. *Clinical Note*: 8-10.
- Kuo H-W, Kuo S-M, Chou C-H, Lee T-C. 2000. Determination of 14 elements in Taiwanese bones. *The Science of the Total Environment* **255**: 45-54.
- Laparé S. 2005. *Mesure et prévention de l'exposition au béryllium dans les installations où on retrouve ce produit*. Paper read at International beryllium research conference, at Montréal.
- Larsson BS. 1993. Interaction between chemicals and melanin. *Pigment Cell Research* **6** (3): 127-133.
- Lehnert NM, Gary RK, Marrone BL, Lehnert BE. 2001. Inhibition of normal human lung fibroblast growth by beryllium. *Toxicology* **160**: 119-127.
- Li C-C, Kuo M-S. 2002. Application of the acetylacetone chelation solid-phase extraction method to measurements of trace amounts of beryllium in human hair. *Analytical Sciences* **18**: 607-609.
- Loranger S, Schetagne R, Plante M, Carrier G, Sauvé S, Émard B, Piché L, Babo S. 2002. Evaluation of a questionnaire-based method for the estimation of methylmercury exposure of recreational anglers in the James Bay Territory (Québec, Canada). *Human and Ecological Risk Assessment* **8** (3): 559-571.
- Maier L, Mroz M, Lympany P, Zhang L, Newman LS. 2002. Genetic and environmental risk factors in beryllium sensitization and chronic beryllium disease. *Chest* **121** (3): 81S.
- Marchand-Adam S, Guillon F, Brauner M, Valeyre D. 2005. Chronic beryllium disease: a model of interaction between environmental exposure and genetic predisposition. Pathogenesis and clinical features (Part2). *Revue des Maladies Respiratoires* **22** (2-C1): 271-287.



- McCanlies E, Kreiss K, Andrew M, Weston A. 2003. Human genome epidemiology (HuGE) review: HLA-DPB1 and chronic beryllium disease: A HuGE review. *American Journal of Epidemiology* **157** (5): 388-398.
- Menezes MÂBC, Maia ECP, Albinati CCB, Sabino CVS, Batista JR. 2004. How suitable are scalp hair and toenail as biomonitors. *Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **259**: 81-86.
- Miekeley N, Dias Carneiro MTW, Porto da Silveira CL. 1998. How reliable are human hair reference intervals for trace elements? *The Science of the Total Environment* **218**: 9-17.
- Ming Y, Bing L. 1998. Determination of rare earth elements in human hair and wheat flour reference materials by inductively coupled plasma mass spectrometry with dry ashing and microwave digestion. *Spectrochimica Acta Part B* **53**: 1447-1454.
- Moeller MR, Sachs H, Pragst F. 2007. Application of hair in driving-license regranting. *Forensic Science Series: Analytical and practical aspects of drug testing in hair*: 273-285.
- Morton J, Carolan VA, Gardiner PHE. 2002a. Removal of exogenously bound elements from human hair by various washing procedures and determination by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **455**: 23-34.
- Morton J, Carolan VA, Gardiner PHE. 2002b. The speciation of inorganic and methylmercury in human hair by high-performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Atomic Spectrometry* **17**: 377-381.
- Newman L. 2000. Lee Newman on beryllium disease, edited by Energy USDo: Office of biological and environmental research.
- Newman LS. 1998. Beryllium. In *Immunotoxicology of Environmental and Occupational Metals*, edited by Zelikoff JT, Thomas PT. CRC Press Taylor & Francis: New York; 27-40.
- Newman LS, Lloyd J, Daniloff E. 1996. The natural history of beryllium sensitization and chronic beryllium disease. *Environmental Health Perspectives* **104** (Supplement 5): 937-943.
- Nowak B. 1998. Contents and relationship of elements in human hair for a non-industrialised population in Poland. *The Science of the Total Environment* **209**: 59-68.
- Passwater RA, Cronton EM. 1983. *Trace elements, hair analysis and nutrition*. Keats Publishing, inc.: New Canaan; 385.
- Paustenbach DJ, Madl AK, Greene JF. 2001. Identifying an appropriate occupational exposure limit (OEL) for beryllium: Data gaps and current research initiatives. *Applied Occupational and Environmental Hygiene* **16** (5): 527-528.
- Peach DF, Lane DW. 1998. A preliminary study of geographic influence on arsenic concentration in human hair. *Environmental Geochemistry and Health* **20**: 231-237.

- Pichini S, García-Algar Ó, de la Torre R. 2007. Clinical applications of hair analysis. *Forensic Science Series: Analytical and practical aspects of drug testing in hair*: 201-222.
- Pragst F, Yegles M. 2007. Alcohol markers in hair. *Forensic Science Series: Analytical and practical aspects of drug testing in hair*: 287-323.
- Puchyr RF, Bass DA, Gajewski R, Calvin M, Marquardt W, Urek K, Druyan ME, Quig D. 1998. Preparation of hair for measurement of elements by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). *Biological Trace Element Research* **62**: 167-182.
- Rayner-Canham G, ed. 2001. *Descriptive inorganic chemistry*. Edited by company WHFa. 2nd ed. New York: Michelle Russel Julet.
- Rodushkin I, Axelsson MD. 2000a. Application of double focusing sector field ICP-MS for multielemental characterization of human hair and nails. Part I. Analytical methodology. *The Science of the Total Environment* **250**: 83-100.
- Rodushkin I, Axelsson MD. 2000b. Application of double focusing sector field ICP-MS for multielemental characterization of human hair and nails. Part II. A study of the inhabitants of northern Sweden. *The Science of the Total Environment* **262**: 21-36.
- Rossmann MD. 2001. Chronic beryllium disease: a hypersensitivity. *Applied Occupational and Environmental Hygiene* **16** (5): 615-618.
- Rossmann MD. 2005. *History of beryllium disease*. Paper read at International beryllium research conference, at Montréal.
- Rossmann MD, Preuss OP, Powers MB, eds. 1991. *Beryllium: biomedical and environmental aspects*. Edited by Minton GT. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Rossmann MD, Stubbs J, Lee CW, Argyris E, Magira E, Monos D. 2001. Human leukocyte antigen class II amino acid epitopes: susceptibility and progression markers for beryllium hypersensitivity. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine* **165**: 788-794.
- Ryabukhin YS. 1978. Activation analysis of hair as an indicator of contamination of man by environmental trace element pollutants. Vienna: IAEA.
- Sachs H. 2007. Screening strategies in hair analysis on drugs. *Forensic Science Series: Analytical and practical aspects of drug testing in hair*: 187-200.
- Salehi F, Zayed J, Audusseau S, Muller C, Truchon G, Plamondon P, L'Espérance G, Chevalier G, Mazer B. 2009. Immunological responses in C3H/HeJ mice following nose-only inhalation exposure to different sizes of beryllium metal particles. *Journal of Applied Toxicology* **29**: 61-68.
- Samanta G, Sharma R, Roychowdhury T, Chakraborti D. 2004. Arsenic and other elements in hair, nails, and skin-scales of arsenic victims in West Bengal, India. *The Science of the Total Environment* **326**: 33-47.
- Sawyer RT, Maier LA, Kittle LA, Newman LS. 2002. Review: Chronic beryllium disease: a model interaction between innate and acquired immunity. *International Immunopharmacology* **2**: 249-261.
- Sawyer RT, Parsons CE, Fontenot AP, Maier LA, Gillespie MM, Gottschall EB, Silveira L, Newman LS. 2004. Beryllium-induced tumor necrosis factor- $\alpha$

- production by CD4+ T cells is mediated by HPA-DP. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **31**: 122-130.
- Ščančar J, Milačič R, Benedik M, Bukovec P. 2000. Determination of trace elements and calcium in bone of the human iliac crest by atomic absorption spectrometry. *Clinica Chimica Acta* **293**: 187-197.
- Schuhmacher M, Domingo JL, Llobet JM, Corbella J, Marti JB. 1993. Chromium, copper and zinc concentrations in hair of school children from Southern Catalonia, Spain. *Trace Elements in Medicine* **10** (1): 21-26.
- Schuler CR, Kent MS, Deubner DC, Berakis MT, McCawley M, Henneberger PK, Rossman MD, Kreiss K. 2005. Process-related risk of beryllium sensitization and disease in a copper-beryllium alloy facility. *American Journal of Industrial Medicine* **47**: 195-205.
- Screenivasa Rao K, Balaji T, Prasada Rao T, Badu Y, Naidu GRK. 2002. Determination of iron, cobalt, nickel manganese, zinc, copper, cadmium and lead in human hair by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B* **57**: 1333-1338.
- Seidel S, Kreutzer R, Smith D, McNeel S, Gilliss D. 2001. Assessment of commercial laboratories performing hair analysis. *JAMA (Special communication)* **285** (1): 67-72.
- Sharma P, Johri S, Shukla S. 2000. Beryllium-induced toxicity and its prevention by treatment with chelating agents. *Applied Toxicology* **20**: 313-318.
- Sharma P, Shah ZA. 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.
- Smith C, Ingerman L, Amata R. 2002. Toxicological profile for beryllium, edited by service USDohahsPh. Atlanta: Agency for toxic substance and disease registry.
- Society of Hair Testing. 2004. Recommendations for hair testing in forensic cases. *Forensic Science International* **145**: 83-84.
- Srogi K. 2006. Hair Analysis – a Tool in Biomedical, Environmental and Forensic Sciences: a Review of Literature Published After 1989. *Chem. Anal. (Warsaw)* **51**: 3-34.
- Stefaniak AB, Hoover MD, Dickerson RM, Day GA, Breysse PN, Scripsick RC. 2007. Differences in estimates of size distribution of beryllium powder materials using phase contrast microscopy, scanning electron microscopy, and liquid suspension counter techniques. *Particle and Fibre Toxicology* **4**: 3.
- Stiefel T, Schulze K, Zorn H, Tölg G. 1980. Toxicokinetics and toxiodynamics studies of beryllium. *Archives of Toxicology* **45** (2): 81-92.
- Stokinger HE, ed. 1966. *Beryllium: its industrial hygiene aspects*. Edited by Clayton GD. American Industrial Hygiene Association for the division of technical information
- United States Atomic Energy Commission ed. Vol. 2, *Industrial hygiene*. New York: Academic Press Inc.
- Sutton M, Burastero SR. 2003. Beryllium chemical speciation in elemental human biological fluids. *Chemical Research in Toxicology* **16**: 1145-1154.

- Taylor TP, Sauer NN. 2002. Beryllium colorimetric detection for high speed monitoring of laboratory environments. *Hazardous Materials* **93** (3): 271-283.
- Teresa M, Vasconcelos SD, Tavares MF. 1997. Trace element concentrations in blood and hair of young apprentices of a technical-professional school. *The Science of the Total Environment* **205**: 189-199.
- Todd AC, Parsons PJ, Tang S, Moshier EL. 2001. Individual variability in human tibia lead concentration. *Environmental Health Perspectives* **109** (11): 1139-1143.
- Uhl M. 2007. Determination of cannabinoids in human hair. *Forensic Science Series: Analytical and practical aspects of drug testing in hair*: 127-141.
- Uhl M, Scheufler F. 2005. Effets de la couleur des cheveux sur l'incorporation de drogues dans les cheveux humains. *Annales de Toxicologie Analytique* **17** (4): 279-283.
- Vilain M. 2007. Applications of hair in drug-facilitated crime evidence. *Forensic Science Series: Analytical and practical aspects of drug testing in hair*: 255-272.
- Violante N, Senofonte O, Marsili G, Meli P, Soggiu ME, Caroli S. 2000. Human hair as a marker of pollution by chemical elements emitted by a thermoelectric power plant. *Microchemical* **67**: 397-405.
- Wang X, Zhuang Z, Zhu E, Yang C, Wan T, Yu L. 1995. Multielement ICP-AES analysis of hair samples and a chemometrics study for cancer diagnosis. *Microchemical* **51**: 5-14.
- Wang Z, Farris GM, Newman LS, Shou Y, Maier LA, Smith HN, Marrone BL. 2001. Beryllium sensitivity is linked to HLA-DP genotype. *Toxicology* **165**: 27-38.
- Weston A, Ensey J, Kreiss K, Keshava C, McCanlies E. 2002. Racial differences in prevalence of a supratypic HLA-Genetic marker immaterial to pre-employment testing for susceptibility to chronic beryllium disease. *American Journal of Industrial Medicine* **41**: 457-465.
- WHO, IARC. 1993. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry., edited by IARC. Lyon: IARC.
- Wright GW. 1949. Chronic pulmonary granulomatosis of beryllium workers. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* **61**: 166-180.
- Wright RO, Amarasiriwardena C, Woolf AD, Jim R, Bellinger DC. 2006. Neuropsychological correlates of hair arsenic, manganese and cadmium levels in school-age children residing near a hazardous waste site. *NeuroToxicology* **27**: 210-216.
- Yegles M, Wennig R. 2007. Opineoids testing in hair. *Forensic Science Series: Analytical and practical aspects of drug testing in hair*: 73-94.
- Zayed J, L'Espérance G, Plamondon P, Rouleau M, Philippe S. 2005. Spéciation et caractérisation de poussières de béryllium. Montréal: IRSST.

**Annexe 1 : Données brutes des concentrations ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) de Be dans les cheveux humains**

(la lettre représente un individu – et le nombre représente un échantillon)

non lavé		lavé	
A-11	$7 \pm 4$	A-26	$0.9 \pm 0.4$
B-2	$11 \pm 1$	A-31	$3 \pm 1$
		A-25	$3 \pm 1$
		A-23	$3.3 \pm 0.3$
		A-27	$3 \pm 1$
		A-29	$3 \pm 2$
		A-33	$3.8 \pm 0.3$
		A-32	$4 \pm 2$
		A-34	$4 \pm 1$
		A-28	$5 \pm 2$
		A-24	$5 \pm 2$
		A-30	$7 \pm 2$
		A-31	$6.8 \pm 0.8$
		B-7	$2 \pm 2$
		B-3	$2 \pm 2$
		B-12	$3 \pm 2$
		B-8	$3 \pm 2$
		B-6	$3.6 \pm 0.3$
		B-13	$4 \pm 1$
		B-9	$4 \pm 1$
		B-10	$4 \pm 2$
		B-4	$4 \pm 3$
		B-5	$4.7 \pm 0.9$
		B-11	$5.3 \pm 0.8$

$[Be]_{\text{nominale}} = [Be]_{\text{ajoutée à la solution de cheveux à digérer}} (\mu\text{g L}^{-1})$

$[Be]_{\text{mesurée}} = [Be]_{\text{mesurée}} - [Be]_{\text{mesurée dans le blanc de cheveux du même individu}}$

$$\text{Recouvrement} = \frac{[Be]_{\text{mesurée}}}{[Be]_{\text{nominale}}} \times 100$$

ajout dosé recouvrement		nominale	mesurée
D-31	100	0.0750	0.075 ± 0.009
E-10	106	0.10	0.11 ± 0.02
E-11	102	0.15	0.15 ± 0.01
E-30	103	0.200	0.205 ± 0.008
D-34	101	0.25	0.25 ± 0.01
E-29	103	0.30	0.31 ± 0.02
D-26	106	0.40	0.42 ± 0.02
C-54	107	0.50	0.54 ± 0.01
A-30	100	0.50	0.50 ± 0.02
C-56	104	0.600	0.626 ± 0.007
A-21	107	0.63	0.67 ± 0.01
E-28	107	0.65	0.69 ± 0.01
C-57	103	0.70	0.72 ± 0.01
E-25	105	0.75	0.79 ± 0.01
B-5	103	1.00	1.03 ± 0.01
A-26	108	1.00	1.08 ± 0.02
B-6	105	2.00	2.11 ± 0.02
A-24	109	3.00	3.27 ± 0.01
D-38	105.4	10.00	10.54 ± 0.04
E-14	102.5	15.00	15.37 ± 0.03
E-15	102.0	20.00	20.39 ± 0.04
E-16	101.3	30.00	30.39 ± 0.04
A-15	102.6	40.00	41.05 ± 0.08
A-16	100.7	50.00	50.35 ± 0.08
E-18	101.5	50.00	50.75 ± 0.06
E-20	110	0.2000	0.22 ± 0.01
E-23	103	0.4000	0.41 ± 0.01
A-1	101.7	1.000	1.017 ± 0.005
D-37	102	5.000	5.09 ± 0.03
D-31	97	0.075	0.07 ± 0.03

ajout dosé recouvrement		nominale	mesurée
E-10	107	0.100	0.107 ± 0.02
E-11	101	0.150	0.152 ± 0.005
E-30	101	0.200	0.203 ± 0.007
D-34	107	0.25	0.27 ± 0.03
E-29	102	0.30	0.31 ± 0.01
D-26	107	0.40	0.43 ± 0.03
C-54	102	0.50	0.51 ± 0.02
A-30	100	0.500	0.500 ± 0.009
C-56	105	0.600	0.630 ± 0.004
A-21	107	0.625	0.666 ± 0.004
E-28	101	0.650	0.659 ± 0.009
C-57	101	0.70	0.70 ± 0.01
E-25	119	0.750	0.896 ± 0.008
B-5	101.1	1.000	1.011 ± 0.02
A-26	101	1.00	1.01 ± 0.03
B-6	102	2.00	2.05 ± 0.03
A-24	103	3.00	3.08 ± 0.02
D-38	101.8	10.00	10.18 ± 0.04
E-14	100.7	15.00	15.10 ± 0.05
E-15	101.3	20.00	20.26 ± 0.03
E-16	104.1	30.00	31.23 ± 0.09
A-15	103	40.0	41.1 ± 0.1
A-16	101.9	50.00	50.95 ± 0.08
E-18	100.2	50.00	50.11 ± 0.02
E-20	104	0.200	0.21 ± 0.01
E-23	103	0.400	0.411 ± 0.008
A-1	100	1.00	1.00 ± 0.01
D-37	104	5.00	5.18 ± 0.02
D-22	99	0.0750	0.0744 ± 0.0004
D-32	106	0.10	0.11 ± 0.02
E-11	105	0.150	0.157 ± 0.007
E-30	113	0.20	0.23 ± 0.01
E-21	106	0.25	0.26 ± 0.01
E-29	111	0.30	0.33 ± 0.03
D-26	107	0.40	0.43 ± 0.01
A-30	101	0.500	0.504 ± 0.004
E-27	102	0.55	0.56 ± 0.01

ajout dosé recouvrement		nominale	mesuré
C-56	106	0.600	0.639 ± 0.004
A-21	107	0.62 <sub>5</sub>	0.67 ± 0.01
C-57	101	0.70	0.71 ± 0.02
D-35	105	0.750	0.788 ± 0.005
E-25	103	0.75	0.78 ± 0.02
B-5	110	1.00	1.10 ± 0.03
A-26	109.6	1.000	1.096 ± 0.009
B-6	100	2.00	2.01 ± 0.03
A-24	101.3	3.000	3.038 ± 0.007
D-38	101.2	10.00	10.12 ± 0.01
E-14	100.2	15.00	15.02 ± 0.05
E-16	100.8	30.00	30.24 ± 0.07
A-14	103.7	30.00	31.10 ± 0.07
E-17	100.8	40.00	40.30 ± 0.01
E-18	100	50.0	50.0 ± 0.1
A-10	101.1	60.00	60.65 ± 0.09
C-52	103	0.40	0.41 ± 0.01
C-53	105	0.45	0.47 ± 0.02
A-1	101	1.00	1.01 ± 0.01
E-13	100.6	10.00	10.06 ± 0.01
D-22	105	0.07 <sub>5</sub>	0.07 <sub>9</sub> ± 0.01
D-32	106	0.10	0.11 ± 0.03
E-11	106	0.150	0.159 ± 0.007
E-30	114	0.20	0.23 ± 0.01
E-21	107	0.25	0.27 ± 0.03
E-29	108	0.300	0.324 ± 0.007
D-26	109	0.400	0.434 ± 0.006
C-56	114	0.60	0.68 ± 0.02
C-57	100	0.70	0.70 ± 0.02
C-53	105	0.45	0.47 ± 0.03
E-25	107	0.75	0.80 ± 0.04
B-5	106	1.00	1.06 ± 0.01
B-13	105.1	5.000	5.253 ± 0.009
B-14	100.0	10.00	10.00 ± 0.02



**Annexe 2** : Le recouvrement et la concentration ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) de Be dans le CRM de cheveux

$$[\text{Be}]_{\text{certifiée}} = \frac{[\text{Be}]_{\text{certifiée}} \times \text{masse de CRM}}{\text{Volume de la solution}}$$

$$\text{Recouvrement} = \frac{[\text{Be}]_{\text{mesurée}}}{[\text{Be}]_{\text{certifiée}}} \times 100$$

GBW 07601	Recouvrement	certifiée	mesurée
1	94	63	59 ± 2
2	101	63	63 ± 2
3	100	63	63.0 ± 0.9
4	95.4	63	60.1 ± 0.8
5	96	63	60 ± 1
6	98	63	62 ± 2
7	97.3	63	61.3 ± 0.9
8	95.6	63	60.2 ± 0.7
9	102	63	64 ± 2
10	109	63	69 ± 2
11	98	63	62 ± 2
12	104	63	65 ± 1
13	112	63	71 ± 3
14	96	63	60 ± 2
15	106	63	67 ± 1
16	100	63	63 ± 2
17	108	63	68 ± 2
18	96	63	61 ± 2
19	93	63	58 ± 2
20	104	63	65.5 ± 0.7
21	95.9	63	60.4 ± 0.7
22	94	63	59 ± 0.8
23	102	63	64 ± 2
24	106	63	67 ± 2
25	101	63	64 ± 2
26	91	63	58 ± 2
27	98.0	63	61.7 ± 0.8
28	93	63	58 ± 2
29	103	63	65 ± 3
30	100	63	63 ± 2

GBW 07601	Recouvrement	certifiée	mesurée
31	94	63	59 ± 3
32	102	63	64.1 ± 0.6
33	100	63	63 ± 1
34	104	63	65 ± 2
35	97	63	61 ± 2
36	103	63	65 ± 1
37	94	63	59 ± 1
38	103	63	65 ± 1
39	97.16	63	61.21 ± 0.04
40	98	63	62 ± 2
41	97	63	61 ± 2
42	96	63	60 ± 1
43	92	63	58 ± 3
44	88.0	63	55.4 ± 0.5
45	90.3	63	56.9 ± 0.5
46	91.1	63	57.4 ± 0.5
47	88.6	63	55.8 ± 0.5
48	87.0	63	54.8 ± 0.5
49	87.3	63	55.0 ± 0.5
50	93.4	63	58.8 ± 0.5
51	91.8	63	57.8 ± 0.5
52	87.0	63	54.8 ± 0.5
53	91.0	63	57.3 ± 0.5
54	90.7	63	57.2 ± 0.5
55	87.6	63	55.2 ± 0.5
56	100.5	63	63.3 ± 0.5
57	101.6	63	64.0 ± 0.5
58	78.0	63	49.1 ± 0.4

**Annexe 3** : Données brutes des concentrations ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) de Be dans les poils de souris

(N, A, R, V, B  $\equiv$  groupe de souris) (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8  $\equiv$  chacune des souris)

lavé		lavé & sacrifié 1 semaine post-exposition	
Contrôle 1	6.8 $\pm$ 0.5	BeF R1	244 $\pm$ 2
Contrôle 2	8.8 $\pm$ 0.6	BeF R2	128 $\pm$ 3
Contrôle 3	8 $\pm$ 2	BeF R3	207 $\pm$ 3
Contrôle 4	9 $\pm$ 2	BeF R4	130 $\pm$ 3
Contrôle 5	6 $\pm$ 3	BeF R6	130 $\pm$ 2
Contrôle 6	10 $\pm$ 3	BeF A1	179 $\pm$ 1
Contrôle 7	8 $\pm$ 1	BeF A2	81 $\pm$ 2
BeI N1	94 $\pm$ 1	BeF A3	132 $\pm$ 3
BeI N2	131 $\pm$ 3	BeF A4	105 $\pm$ 1
BeI N3	60 $\pm$ 3	BeF A7	184 $\pm$ 1
BeI N4	58 $\pm$ 3	BeF N1	221 $\pm$ 1
BeI N7	87 $\pm$ 4	BeF N2	149.0 $\pm$ 0.9
BeI A2	115 $\pm$ 1	BeF N3	117 $\pm$ 1
BeI A3	162 $\pm$ 3	BeF N4	106 $\pm$ 1
BeI A4	63 $\pm$ 1	BeF N5	145 $\pm$ 1
BeI A7	124 $\pm$ 1	BeF N6	168 $\pm$ 2
BeI R1	194 $\pm$ 3	BeF N7	66 $\pm$ 1
BeI R2	184 $\pm$ 2	BeF V1	134.3 $\pm$ 0.5
BeI R3	124 $\pm$ 3	BeF V3	140 $\pm$ 2
BeI R7	57 $\pm$ 1	BeF V4	85 $\pm$ 2
BeI V1	122.8 $\pm$ 0.2	BeF V5	223 $\pm$ 2
BeI V2	110 $\pm$ 3	BeF V6	66 $\pm$ 1
BeI B1	108.7 $\pm$ 0.7	BeF B1	216 $\pm$ 2
BeI B2	142 $\pm$ 4	BeF B2	133 $\pm$ 2
BeI B3	103.4 $\pm$ 0.7	BeF B3	111.3 $\pm$ 0.9
BeI B5	169.3 $\pm$ 0.4	BeF B4	244 $\pm$ 2
BeI B7	62 $\pm$ 1	BeF B6	315 $\pm$ 1
		BeF B7	287.1 $\pm$ 0.8

lavé & sacrifié 3 semaines post-exposition	
BeF R8	469 ± 1
BeF A8	420 ± 3
BeF N8	382 ± 2
BeF V8	278 ± 2
BeF B8	547 ± 4

non lavé & sacrifié 1 semaine post-exposition	
BeI N6	582 ± 3
BeI A5	242 ± 3
BeI N5	155 ± 2
BeI B6	2068 ± 5
BeI V6	222 ± 2
BeF A5	871 ± 2
BeF A6	217 ± 2
BeF V7	597 ± 2
BeF R5	817 ± 2
BeF B5	1269 ± 6

**Annexe 4 : Données brutes des concentrations ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) de Be dans les os de souris**

Contrôle 1	$5 \pm 1$
Contrôle 2	$3 \pm 2$
Contrôle 3	$2 \pm 2$
Contrôle 4	$5 \pm 3$
Contrôle 5	$8 \pm 1$
Contrôle 6	$9 \pm 2$
Contrôle 7	$10.1 \pm 0.6$
Contrôle 8	$7 \pm 2$
Contrôle 9	$7.9 \pm 0.5$

sacrifié 3 semaines post-exposition	
<b>BeF B8</b>	$47.5 \pm 0.3$
<b>BeF V8</b>	$47.3 \pm 0.7$
<b>BeF N8</b>	$38 \pm 1$
<b>BeF R8</b>	$32 \pm 3$
<b>BeF A8</b>	$52 \pm 2$

sacrifié 1 semaine post-exposition			
BeI A2	22 ± 1	BeF B1	32 ± 3
BeI A3	10 ± 2	BeF B3	37 ± 2
BeI A4	20 ± 1	BeF B4	47 ± 2
BeI A5	27 ± 2	BeF B5	35 ± 1
BeI A7	20 ± 1	BeF B6	36 ± 2
BeI R1	24.4 ± 0.9	BeF B7	24 ± 1
BeI R2	21.3 ± 0.8	BeF V1	41 ± 2
BeI R3	49 ± 0.7	BeF V2	40 ± 2
BeI R4	23.1 ± 0.8	BeF V3	38 ± 2
BeI R6	23 ± 1	BeF V4	38 ± 2
BeI R7	25 ± 2	BeF V5	48 ± 2
BeI N1	23 ± 2	BeF V6	36.7 ± 0.7
BeI N2	20.3 ± 0.7	BeF V7	44 ± 2
BeI N3	16 ± 2	BeF N1	24 ± 2
BeI N4	20 ± 2	BeF N2	29 ± 2
BeI N5	24 ± 1	BeF N3	35 ± 3
BeI N6	17 ± 1	BeF N4	36.8 ± 0.9
BeI N7	22 ± 1	BeF N5	32 ± 2
BeI V1	28 ± 2	BeF N6	26 ± 2
BeI V2	25.2 ± 0.7	BeF N7	34 ± 2
BeI V4	24 ± 3	BeF R1	27 ± 1
BeI V5	23 ± 1	BeF R2	39.0 ± 0.9
BeI V6	32 ± 1	BeF R3	29.0 ± 0.9
BeI B1	42 ± 2	BeF R5	29.8 ± 0.8
BeI B2	31 ± 2	BeF R6	37 ± 1
BeI B3	25 ± 1	BeF A2	32 ± 3
BeI B4	24 ± 2	BeF A3	31 ± 1
BeI B5	27.5 ± 0.7	BeF A4	30.1 ± 0.4
BeI B6	24 ± 2	BeF A5	25 ± 2
BeI B7	20 ± 1	BeF A6	32 ± 4
		BeF A7	31 ± 1

**Annexe 5** : La concentration ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) de Be et le recouvrement dans le CRM de calcaire synthétique

$$\text{Recouvrement} = \frac{[\text{Be}]_{\text{mesurée}}}{[\text{Be}]_{\text{certifiée}}} \times 100$$

	<b>GBW 07712</b>	<b>GBW 07713</b>
<b>[Be] certifiée</b>	220	520

<b>GBW 07712</b>	mesurée	Recouvrement
1	215 ± 1	97.6
2	213 ± 2	96.7
3	226 ± 1	103
4	222 ± 4	101
5	213 ± 3	96.7
6	221 ± 3	101
7	205 ± 2	93.2
8	207 ± 1	94.1
9	208 ± 3	94.7
10	222.5 ± 0.6	101.1
11	226.0 ± 0.5	102.7
12	224 ± 2	102
13	229 ± 2	104
14	212 ± 4	96.3
15	230.7 ± 0.9	104.9

<b>GBW 07713</b>	mesurée	Recouvrement
1	514 ± 2	98.9
2	519 ± 3	99.9
3	515 ± 2	99.0
4	533 ± 2	103
5	514 ± 1	98.9
6	512.7 ± 0.7	98.60
7	498 ± 1	95.7
8	522 ± 2	101
9	506 ± 2	97.4
10	568 ± 3	109
11	528 ± 1	102
12	496.0 ± 0.4	95.39
13	533 ± 3	103
14	507 ± 2	97.5
15	479.2 ± 0.7	92.16