

Substances chimiques et agents biologiques

# Études et recherches

RAPPORT R-556



**Développement de marqueurs et validation  
d'outils de diagnostic pour le dépistage  
de l'hypersensibilité induite par le béryllium**

*Michel Fournier  
Jacques Bernier  
Pauline Brousseau  
Daniel Cyr  
Guy Viel  
Sébastien Sauvé*



Solidement implanté au Québec depuis 1980, l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) est un organisme de recherche scientifique reconnu internationalement pour la qualité de ses travaux.

## NOS RECHERCHES

### Mission *travaillent pour vous !*

Contribuer, par la recherche, à la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles ainsi qu'à la réadaptation des travailleurs qui en sont victimes.

Offrir les services de laboratoires et l'expertise nécessaires à l'action du réseau public de prévention en santé et en sécurité du travail.

Assurer la diffusion des connaissances, jouer un rôle de référence scientifique et d'expert.

Doté d'un conseil d'administration paritaire où siègent en nombre égal des représentants des employeurs et des travailleurs, l'IRSST est financé par la Commission de la santé et de la sécurité du travail.

### Pour en savoir plus

Visitez notre site Web ! Vous y trouverez une information complète et à jour.

De plus, toutes les publications éditées par l'IRSST peuvent être téléchargées gratuitement. [www.irsst.qc.ca](http://www.irsst.qc.ca)

Pour connaître l'actualité de la recherche menée ou financée par l'IRSST, abonnez-vous gratuitement au magazine Prévention au travail, publié conjointement par l'Institut et la CSST. Abonnement : 1-877-221-7046

### Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales  
2008

ISBN : 978-2-89631-251-1 (version imprimée)

ISBN : 978-2-89631-252-8 (PDF)

ISSN : 0820-8395

IRSST - Direction des communications  
505, boul. De Maisonneuve Ouest  
Montréal (Québec)  
H3A 3C2  
Téléphone : 514 288-1551  
Télécopieur : 514 288-7636  
[publications@irsst.qc.ca](mailto:publications@irsst.qc.ca)  
[www.irsst.qc.ca](http://www.irsst.qc.ca)  
Institut de recherche Robert-Sauvé  
en santé et en sécurité du travail,  
avril 2008



Substances chimiques et agents biologiques

# Études et recherches

■ RAPPORT R-556

## Développement de marqueurs et validation d'outils de diagnostic pour le dépistage de l'hypersensibilité induite par le béryllium

### Avis de non-responsabilité

L'IRSST ne donne aucune garantie relative à l'exactitude, la fiabilité ou le caractère exhaustif de l'information contenue dans ce document. En aucun cas l'IRSST ne saurait être tenu responsable pour tout dommage corporel, moral ou matériel résultant de l'utilisation de cette information.

Notez que les contenus des documents sont protégés par les législations canadiennes applicables en matière de propriété intellectuelle.

*Michel Fournier<sup>1</sup>, Jacques Bernier<sup>1</sup>, Pauline Brousseau<sup>1,2</sup>,  
Daniel Cyr<sup>1</sup>, Guy Vie<sup>3</sup> et Sébastien Sauv<sup>4</sup>*

<sup>1</sup>*INRS-Institut Armand-Frappier*

<sup>2</sup>*Biophage*

<sup>3</sup>*CRBM Centre de Recherche sur les biotechnologies marines*

<sup>4</sup>*Université de Montréal*

Cliquez recherche  
[www.irsst.qc.ca](http://www.irsst.qc.ca)



Cette publication est disponible  
en version PDF  
sur le site Web de l'IRSST.

**CONFORMÉMENT AUX POLITIQUES DE L'IRSS**

Les résultats des travaux de recherche publiés dans ce document  
ont fait l'objet d'une évaluation par des pairs.

## Résumé

Le béryllium est connu pour sa grande toxicité. Il provoque, suite à l'inhalation de poussières ou de vapeurs des pneumopathies sévères (béryllose) et des atteintes chroniques dite maladie chronique du béryllium (MCB). En moyenne, 1 à 20% des travailleurs exposés deviennent sensibilisés, desquels 1 à 10 % développent la MCB. Il existe un test de laboratoire couramment utilisé pour déceler la sensibilisation d'un travailleur au béryllium; il s'agit du test de prolifération des lymphocytes en présence de béryllium le "Beryllium Lymphocyte Proliferation Test" (BeLPT). Bien que ce test permette de détecter la sensibilisation, il offre peu de valeur prédictive quant aux risques de développer une béryllose. En effet, un travailleur pourra avoir un BeLPT positif sans être nécessairement porteur d'une béryllose. Sachant qu'une béryllose peut prendre jusqu'à 30 ans à se développer chez un travailleur sensibilisé, il est évident que la comparaison BeLPT et béryllose chronique n'est pas acceptable. Il devient donc primordial de développer un autre outil pour déceler la sensibilisation au béryllium ce qui permettra d'une part de rassurer les travailleurs quant à la détection efficace de la sensibilisation et d'autre part de faire une étude scientifiquement plus acceptable de la valeur prédictive du BeLPT.

Dans le cadre du présent devis de recherche, notre équipe a exploré l'applicabilité de certaines nouvelles approches expérimentales au problème de l'exposition au béryllium, Nous avons ainsi pu déterminer que des méthodes de caractérisation sélective des cellules cibles (Immuno LPT) et l'utilisation de signatures protéiniques étaient réalisables sur des échantillons de sang. Nous avons aussi pu mettre au point une technique de quantification du béryllium dans le plasma sanguin, fraction non utilisée des échantillons de sang prélevés chez les travailleurs pour les épreuves de diagnostic. Nous avons aussi pu tester le potentiel d'agents complexant à déplacer le béryllium et à renverser la toxicité de ce métal dans des cultures de cellules.

Nous nous sommes ainsi doter d'outils permettant de mettre en place un programme de suivi des travailleurs qui en plus de fournir un diagnostic plus adéquat permettra de lier celui-ci à la détermination des expositions à la cible. Le tout permettra de valider les normes d'exposition actuelle ou d'en déterminer de nouvelles sur des bases solides.



## Table des matières

1-	Rappel de la problématique de santé et sécurité du travail et objectifs spécifiques.....	1
2-	Progrès réalisé sur l'objectif 1 : Améliorer le dépistage de l'hypersensibilité chez les individus exposés par le développement d'un outil sensible sur des sous-populations cellulaires ciblées, mettant à contribution la cytométrie de flux .....	2
2.1	Introduction.....	2
2.2	Matériel et méthodes.....	2
2.3	Résultats.....	3
2.3.1	Identification par cytométrie de flux des cellules en prolifération .....	3
2.3.2	Détermination du niveau d'autofluorescence .....	4
2.3.3	Synthèse d'ADN .....	5
2.3.4	Simple marquage avec un anti-CD3-PE et un anti-CD4-APC .....	5
2.3.5	Double marquage CFSE-CD3 et CFSE-CD4 .....	6
2.3.6	Triple marquage CFSE-CD3-CD4.....	7
2.4	Suite des travaux.....	7
3.	Progrès réalisé sur l'objectif 2 : Bien caractériser les interactions Be et cibles cellulaires afin d'identifier une (des) composante(s) protéomique(s) associé(es) à la sensibilité au Be .....	10
3a-	Interactions entre le béryllium et les cellules immunitaires.....	10
3b-	Études de déplacement du béryllium .....	11
4-	Progrès réalisé sur l'objectif 3 : déterminer les niveaux de Be dans le sérum et le plasma des travailleurs exposés, hypersensibles et ayant développés la béryllose afin d'établir une courbe dose-réponse pour l'établissement de normes d'exposition .....	13
4a-	Dosage du Be plasmatique.....	13
4b-	Sites plasmatiques d'attachement du béryllium.....	14
5-	Progrès sur l'objectif 4 : étudier les événements moléculaires impliqués dans le développement de l'hypersensibilité et dans l'induction de la béryllose afin de mettre au point un protocole de dépistage précoce de l'hypersensibilité et de la béryllose.....	15
5a-	Protéomique .....	15
5b	Génomique.....	16
6-	Conclusions.....	17
7-	Articles scientifiques découlant du présent travail .....	18
8-	Références.....	19





## Liste des figures

Figure 1 Prolifération de base des lymphocytes dans le milieu seul .....	3
Figure 2 Prolifération des lymphocytes avec la PHA (A) et <i>Candida albicans</i> (B) .....	3
Figure 3 Autofluorescence FL4 vs FL1 (3A) et FL2 vs FL1 (3B) des lymphocytes cultivés pour 6 jours en présence du milieu de culture seul. ....	4
Figure 4 Coloration de l'ADN avec le CFSE de lymphocytes en prolifération .....	5
Figure 5 Coloration de lymphocytes non stimulés avec un anti-CD3-PE et un anti-CD4-APC.....	5
Figure 6 Double marquage avec CFSE : CD3 et CFSE : CD4.....	6
Figure 7 Triple marquage CFSE, CD3 et CD4.....	6
Figure 8 Prolifération des lymphocytes avec la PHA.....	7
Figure 9 Autofluorescence FL4 vs FL1 (A) et FL2 vs FL1 (B) des lymphocytes cultivés pour 6 jours en présence du milieu de culture seul avec un travailleur sensibilisé. ....	8
Figure 10 Double marquage avec CFSE : CD3 et CFSE : CD4 d'un travailleur sensibilisé. ....	8
Figure 11 Exemple de profils protéiques obtenus par CM10 .....	14



## **1- Rappel de la problématique de santé et sécurité du travail et objectifs spécifiques**

Une exposition au béryllium (Be) et à ses poussières a longtemps été associée à des maladies pulmonaires. Une forte exposition au Be (excédant  $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) peut causer de graves pneumopathies alors qu'une exposition chronique cause des désordres pulmonaires appelés maladies chroniques causées par le Be (MCB) ou béryllose. Depuis la fin des années 80 un test de laboratoire est couramment utilisé pour déceler la sensibilisation d'un travailleur au béryllium; il s'agit du test de prolifération des lymphocytes en présence de béryllium le "Beryllium Lymphocyte Proliferation Test" (BeLPT)[1]. Malheureusement, il existe toujours une grande controverse au sein de la communauté scientifique quant à la validité du test en ce qui concerne sa valeur prédictive de béryllose[2]. En effet, un travailleur pourra avoir un BeLPT positif sans être nécessairement porteur d'une béryllose. Sachant qu'une béryllose peut prendre jusqu'à 30 ans à se développer chez un travailleur sensibilisé, il est évident que la comparaison BeLPT et béryllose chronique n'est pas acceptable. Il devient donc primordial de développer un autre outil pour déceler la sensibilisation au béryllium ce qui permettra d'une part de rassurer les travailleurs quant à la détection efficace de la sensibilisation et d'autre part de faire une étude scientifiquement plus acceptable de la valeur prédictive du BeLPT. Les objectifs du programme de recherche que veut poursuivre notre équipe sont donc :

- 1- Améliorer le dépistage de l'hypersensibilité chez les individus exposés par le développement d'un outil sensible sur des sous-populations cellulaires ciblées, mettant à contribution la cytométrie de flux,
- 2- Bien caractériser les interactions Be et cibles cellulaires afin d'identifier une (des) composante(s) protéomique(s) associé(es) à la sensibilité au Be
- 3- Déterminer les niveaux de Be dans le sérum et le plasma des travailleurs exposés, hypersensibles et ayant développés la béryllose afin d'établir une courbe dose-réponse pour l'établissement de normes d'exposition.
- 4- Étudier les événements moléculaires impliqués dans le développement de l'hypersensibilité et dans l'induction de la béryllose afin de mettre au point un protocole de dépistage précoce de l'hypersensibilité et de la béryllose.

Le présent devis d'activité visait plus spécifiquement à développer la méthodologie afin de valider certaines hypothèses de recherche,

## **2- Progrès réalisé sur l'objectif 1 : Améliorer le dépistage de l'hypersensibilité chez les individus exposés par le développement d'un outil sensible sur des sous-populations cellulaires ciblées, mettant à contribution la cytométrie de flux**

### **2.1 Introduction**

L'exposition au béryllium peut mener à une réaction immunitaire de type cellulaire, la sensibilisation au béryllium (BeS) qui précéderait le développement de la béryllose chronique dans les poumons. Cette sensibilisation peut être mise en évidence par un test de prolifération lymphocytaire induite par le béryllium (BeLPT), utilisé depuis une vingtaine d'années comme outil de dépistage précoce des effets du béryllium sur la santé[3]. Malgré que le test soit considéré comme étant efficace et performant pour identifier les individus à risque de développer une béryllose, une controverse persiste autour du BeLPT. Des interrogations à-propos entre autre de la sensibilité du test sont toujours invoquées.

Dans cette recherche préliminaire, nous avons voulu étudier plus attentivement une alternative du test de BeLPT soit l'immuno LPT qui met en relation la prolifération des lymphocytes T mémoire spécifiques au béryllium avec le phénotypage de ces lymphocytes par cytométrie de flux. La technique de la culture cellulaire qui a été validée n'est pas remise en question, le travail se concentre sur la mise en évidence des lymphocytes en prolifération par cytométrie de flux.

### **2.2 Matériel et méthodes**

La mise en culture peut se résumer ainsi : à partir d'un échantillon sanguin, les cellules mononucléées sont purifiées avec l'aide d'un gradient de densité. Après quelques lavages, le nombre de cellules est évalué en utilisant un compteur automatique de cellules. La concentration est ajustée à  $2,5 \times 10^6$  cellules/ml. Les cellules sont ensuite mises en plateau en présence de phytohémagglutinine (PHA), *Candida albicans* qui représentent les témoins positifs des jours 4 et 6 respectivement. Pour chaque temps d'incubation, les cellules sont aussi incubées en présence de sulfate de béryllium à  $10^{-4}$ M,  $10^{-5}$ M et  $10^{-6}$ M. Des puits sont préparés avec le milieu de culture seul, ces puits servent de témoin négatif. Les cellules sont ainsi incubées dans une atmosphère humide à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> [4].

Aux jours 4 et 6 les cellules sont récoltées lavées puis mises en contact avec des sondes pour mettre en évidence des marqueurs de surface dont le CD3, CD4 et CD8 en parallèle avec une coloration de l'ADN avec l'ester de 5,6-carboxyfluorescéine diacétate succinimidyl (CFSE) pour révéler la prolifération cellulaire. Les acquisitions ont faites au cytomètre de flux (FACScalibur, Becton-Dickinson, San Jose, CA) en utilisant une barrière

basée sur la complexité des cellules (SSC) versus leur taille (FSC), les acquisitions et les analyses sont faites avec le programme CellQuest (Becton-Dickinson, San Jose, CA) [5,6,7].

Dans le test classique qui donne comme résultat l'incorporation de thymidine suite à la synthèse d'ADN, la méthodologie est la suivante : dix-huit heures avant la fin de chacune des incubations, 1 $\mu$ Ci de  $^3$ H-thymidine est ajouté dans chaque puits. L'incubation se poursuit et à la fin, les plateaux sont congelés à -20°C. Les cellules sont par la suite récoltées sur un filtre et lysées pour ne conserver que l'ADN sur le filtre. L'incorporation de  $^3$ H-thymidine suite à la division cellulaire est analysée par scintillation. Les résultats sont obtenus en coups par minute (CPM).

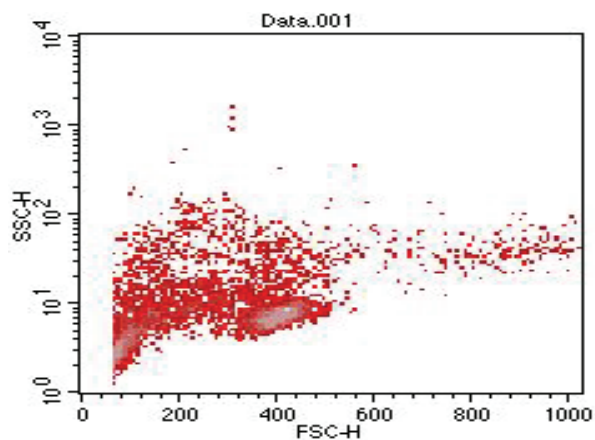
## 2.3 Résultats

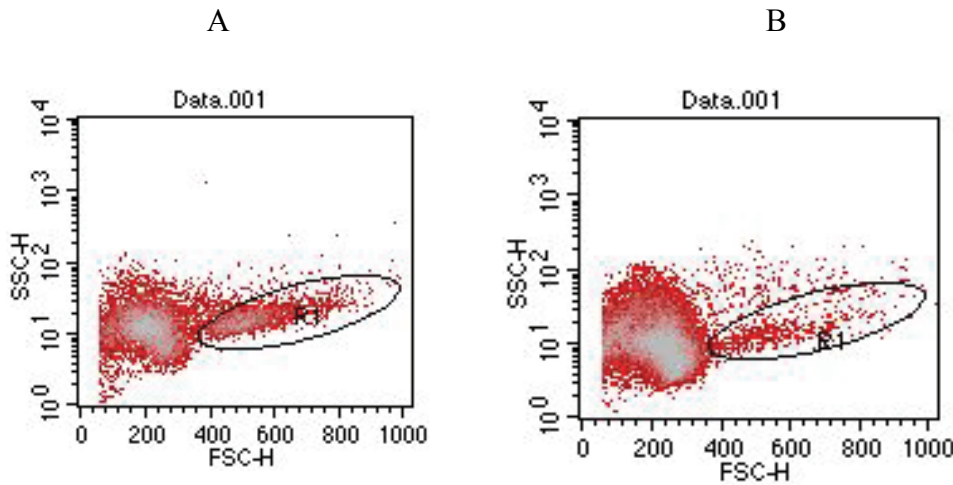
Étant donné l'enjeu important de remplacer le test classique de BeLPT par une alternative en cytométrie de flux, nous avons voulu revoir en détail chacun des paramètres brièvement décrit dans la littérature afin de s'assurer que chacun d'eux étaient utilisés dans des conditions optimales. Dans un premier temps nous avons utilisé des volontaires sains qui n'avaient pas eu d'expositions connues au béryllium.

### 2.3.1 Identification par cytométrie de flux des cellules en prolifération

Pour identifier les cellules en prolifération par cytométrie de flux nous avons utilisé les cellules incubées avec le milieu seul (Figure 1) et les témoins positifs soit la réponse à la PHA (Figure 2A) au jour 4 et celle à *Candida albicans* au jour 6 (Figure 2B).

**Figure 1 Prolifération de base des lymphocytes dans le milieu seul**

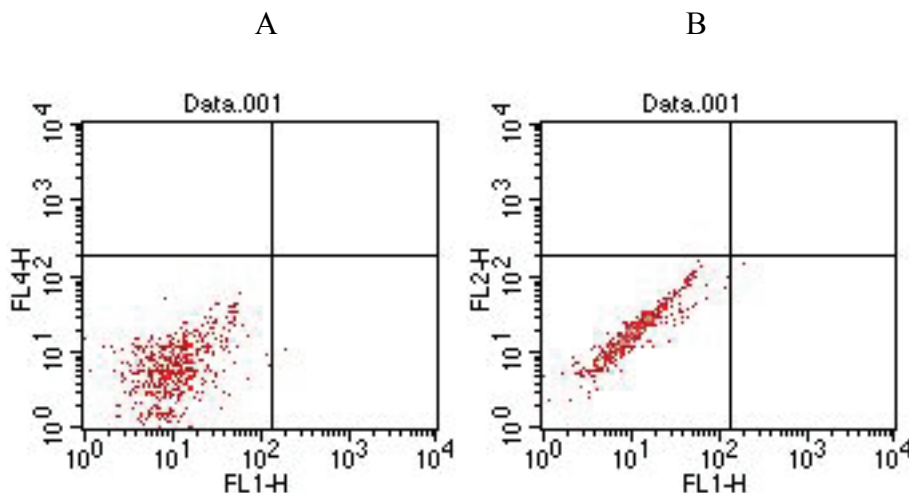


**Figure 2 Prolifération des lymphocytes avec la PHA (A) et *Candida albicans* (B)**

En comparant les graphiques de dispersion de points entre des cellules non stimulées et celles stimulées avec la PHA ou *Candida albicans*, nous avons observé une augmentation de la taille (FSC) des cellules de même qu'une augmentation de leur granularité (SSC), conséquence typique de cellules en prolifération. Les barrières d'analyse seront donc faites comme celles représentées aux figures 2A et 2B.

### 2.3.2 Détermination du niveau d'autofluorescence

Afin de bien fixer les marqueurs pour l'étude de la fluorescence, il fallait d'abord déterminer le niveau d'autofluorescence des cellules. Pour ce faire nous avons utilisé des cellules incubées pendant 4 et 6 jours avec le milieu seul. Les résultats pour une culture de 6 jours sont présentés pour les détecteurs FL1, FL2 et FL4 qui seront utilisés pour obtenir les résultats avec le CFSE, le CD3 et le CD4 respectivement.

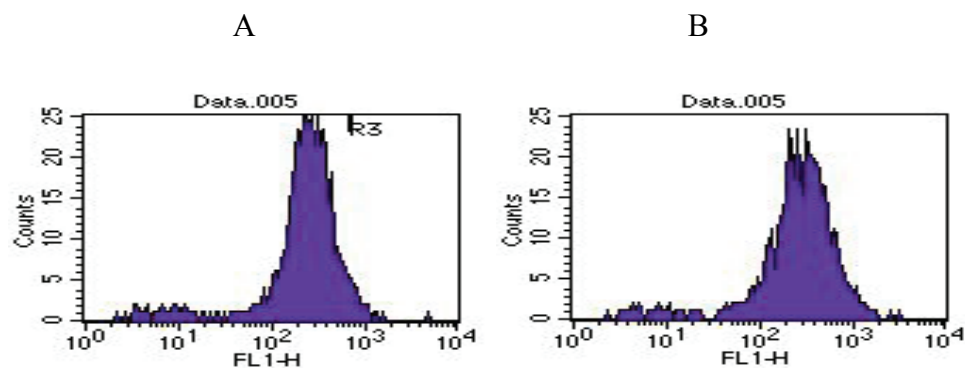
**Figure 3 Autofluorescence FL4 vs FL1 (3A) et FL2 vs FL1 (3B) des lymphocytes cultivés pour 6 jours en présence du milieu de culture seul.**

Il est facile de constater que l'ajustement pour éliminer l'interférence de l'autofluorescence dans les détecteurs sélectionnés est adéquat, étant donné que la population de lymphocytes dans les deux cas se retrouve dans le coin inférieur gauche, ce qui reflète l'absence de bruit de fond dans les quadrants dans lesquels nous allons analyser la synthèse d'ADN et les marqueurs de surface.

### 2.3.3 Synthèse d'ADN

Un des éléments clé de cette méthode est la détermination de la synthèse d'ADN par des lymphocytes mémoires en prolifération qui sont spécifiques au béryllium. Pour ce faire, nous avons utilisé le CFSE. Afin de sélectionner la concentration optimale de CFSE, nous avons utilisé les deux témoins positifs. Les deux figures suivantes nous donnent les résultats pour les cellules stimulées avec *Candida albicans* (Figure 4A) et la PHA (Figure 4B). Une titration du CFSE a été faite dans les deux cas et la coloration optimale a été obtenue avec 0,05µM pour 500,000 cellules et les résultats ont été obtenus en FL1.

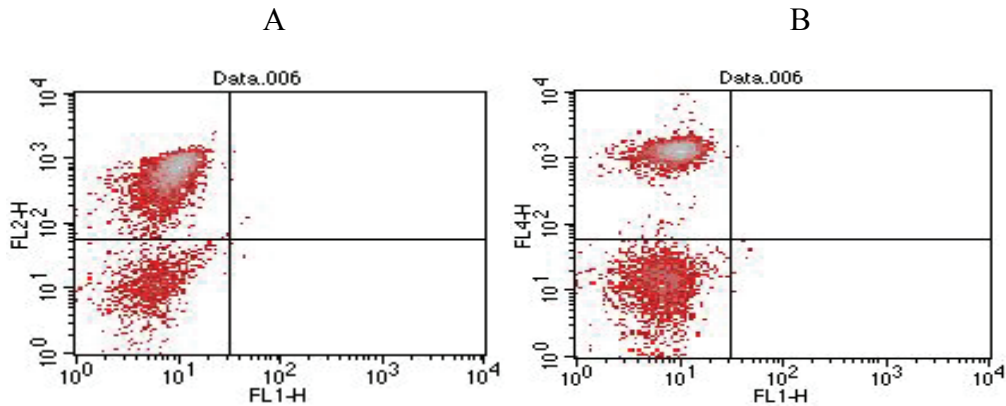
**Figure 4 Coloration de l'ADN avec le CFSE de lymphocytes en prolifération**



### 2.3.4 Simple marquage avec un anti-CD3-PE et un anti-CD4-APC

Dans un premier temps, nous avons voulu optimiser la coloration avec les marqueurs de surface et déterminer la compensation avec les deux anticorps utilisés individuellement, sur des cellules mononucléées purifiées mais non stimulées. Les phénotypages avec l'anti-CD3-PE (FL-2) et l'anti-CD4-APC (FL-4) sont représentés dans les Figures 5A et 5B respectivement.

**Figure 5 Coloration de lymphocytes non stimulés avec un anti-CD3-PE et un anti-CD4-APC**

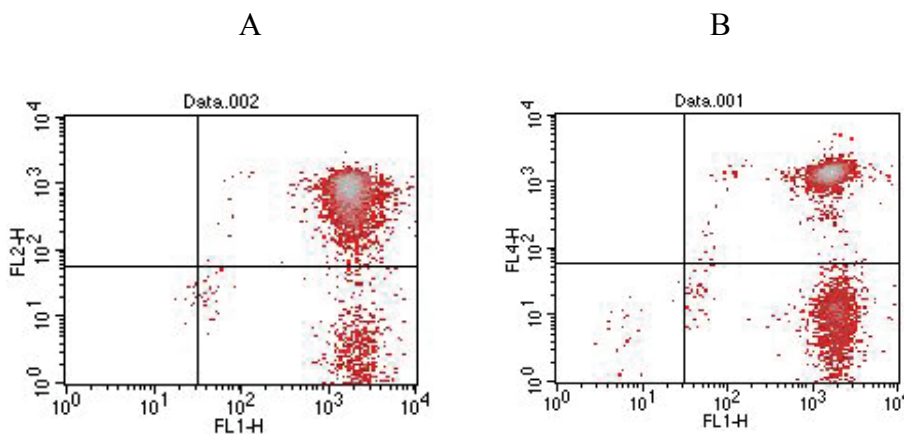


Le pourcentage de lymphocytes T dans le graphique A est de 82% (cadrant supérieur gauche) versus les lymphocytes B de 18% (cadrant inférieur gauche) et pour les lymphocytes CD4<sup>+</sup> nous avons obtenu 50%. Ces résultats sont en accord avec ceux que nous retrouvons dans la littérature [8].

### 2.3.5 Double marquage CFSE-CD3 et CFSE-CD4

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé des marquages doubles de cellules CD3 et CD4 positives afin de vérifier l'efficacité de la compensation entre les détecteurs (FL1 et FL2 pour le CD3-PE et FL1 et FL4 pour le CD4-APC). Les résultats pour le CD3 et le CD4 sont montrés dans les Figures 6A et 6B respectivement.

**Figure 6 Double marquage avec CFSE : CD3 (A) et CFSE : CD4 (B)  
(FL-1 = CFSE; FL-2 = CD3; FL-4 = CD4)**



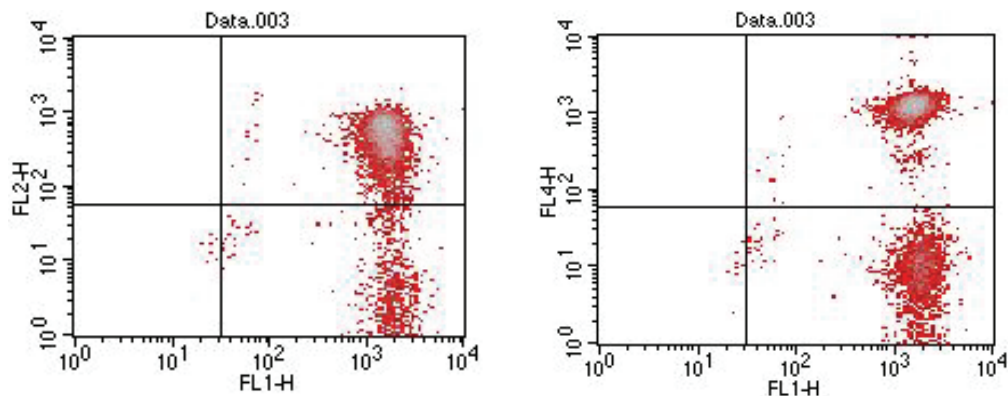
Dans ce cas-ci nous avons obtenu 84% pour les lymphocytes CD3<sup>+</sup> en prolifération avec la PHA et un taux de 62% pour les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.



### 2.3.6 Triple marquage CFSE-CD3-CD4

À cette étape nous avons combiné les trois marquages. La barrière d'analyse a été faite sur les cellules en division (CFSE<sup>+</sup>) puis les pourcentages de cellules CD3<sup>+</sup> (Figure 7A) et CD4<sup>+</sup> (Figure 7B) ont été déterminés avec des cellules stimulées avec la PHA..

**Figure 7 Triple marquage CFSE, CD3 et CD4**  
(FL-1 = CFSE; FL-2 = CD3; FL-4 = CD4)



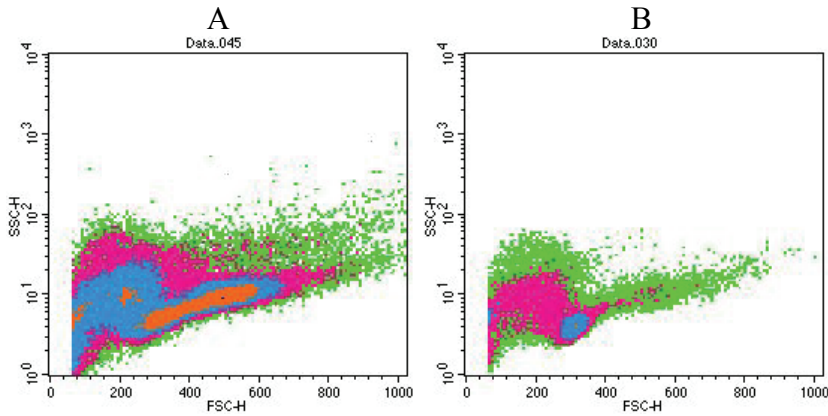
Ces résultats montrent que les paramètres de coloration de même que d'acquisition sont optimaux pour des lymphocytes normaux stimulés par la phytohémagglutinine.

## 2.4 Suite des travaux

Durant cette première étape nous avons établie les conditions optimales de détection par cytométrie de flux de la prolifération de lymphocytes normaux stimulés par la PHA et *Candida albicans* et de marqueurs de surface. La deuxième étape est d'éprouver ces conditions en utilisant des échantillons sanguins provenant d'individus sensibilisés au béryllium pour lesquels deux tests de BeLPT ont été positifs. En parallèle à la détection par cytométrie de flux, le test classique de BeLPT sera fait. De cette façon nous pourrons commencer à évaluer la sensibilité de l'immuno-BeLPT versus le BeLPT.

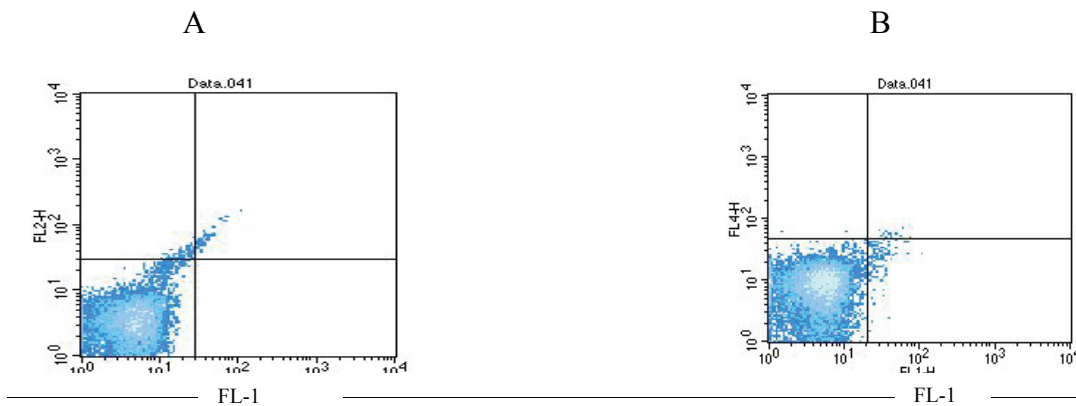
Ces conditions optimales semblent se confirmer avec les sujets sensibilisés. Voici les données préliminaires avec un premier travailleur sensibilisé.

**Figure 8 Prolifération des lymphocytes avec la PHA (A) et *Candida albicans* (B) avec un travailleur sensibilisé**



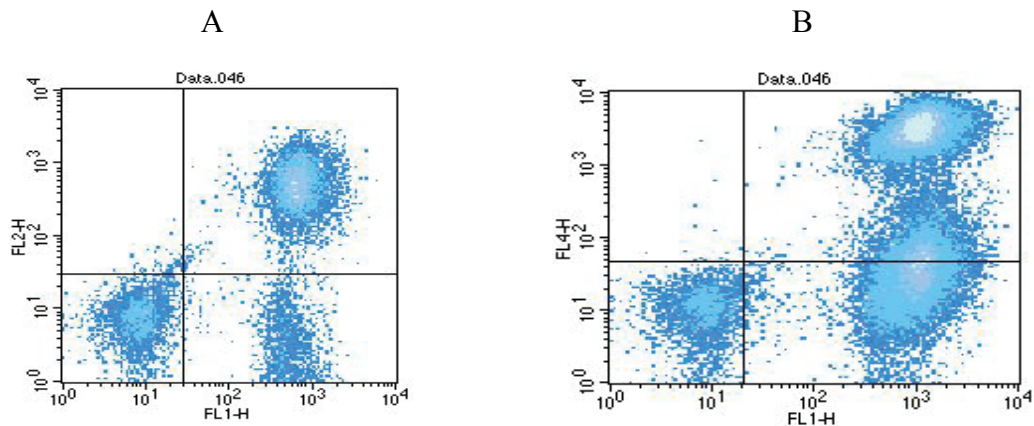
En étudiant les graphiques de dispersion de points entre des cellules stimulées avec la PHA (Figure 8A) ou *Candida albicans* (Figure 8B), nous avons observé une augmentation de la taille (FSC) des cellules de même qu'une augmentation de leur granularité (SSC), conséquence typique de cellules en prolifération.

**Figure 9 Autofluorescence FL4 vs FL1 (A) et FL2 vs FL1 (B) des lymphocytes cultivés pour 6 jours en présence du milieu de culture seul avec un travailleur sensibilisé**



Il est facile de constater que l'ajustement pour éliminer l'interférence de l'autofluorescence dans les détecteurs sélectionnés est adéquat, pour un sujet sensibilisé, étant donné que la population de lymphocytes dans les deux cas se retrouve dans le coin inférieur gauche, ce qui reflète l'absence de bruit de fond dans les quadrants dans lesquels nous allons analyser la synthèse d'ADN et les marqueurs de surface.

**Figure 10 Double marquage avec CFSE : CD3 (A) et CFSE : CD4 (B) des cellules mononucléées obtenues d'un travailleur sensibilisé et stimulées avec la PHA**



Dans ces graphiques nous pouvons observer que les conditions de coloration de la prolifération avec le CFSE et les marqueurs de surface CD3 sont aussi optimales pour un travailleur sensibilisé. Cependant les conditions de la coloration avec le CD4 doivent être légèrement modifiées étant donné la discrimination moins efficace entre les cellules CD4<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup>.

Les conditions optimales de détection de prolifération sans marquage, avec marquage au CFSE de même que le phénotypage avec le marqueur CD3 semblent être aussi optimales pour un sujet sensibilisé. Une légère correction dans la détection du CD4 doit cependant être apportée. Ces résultats préliminaires doivent être confirmés avec d'autres travailleurs sensibilisés.

### **3. Progrès réalisé sur l'objectif 2 : Bien caractériser les interactions Be et cibles cellulaires afin d'identifier une (des) composante(s) protéomique(s) associé(es) à la sensibilité au Be**

L'exposition chronique au béryllium se traduit par des transformations morphologiques et biochimiques au niveau de divers organes et structures cellulaires. Comme précisé dans la demande, ces modifications sont vraisemblablement, en tout ou en partie, de nature inflammatoire puisqu'elles résulteraient de l'interaction d'un complexe cellules présentatrices de l'antigène – Be - antigène avec un récepteur de lymphocytes T spécifiques[9,10,11]. Par conséquent, nous proposons d'identifier le(s) ligand(s) peptidique(s)/protéique(s) de haute affinité pour le béryllium dans les cellules.

Pour ce faire, il fallait entre autre : a-) bien caractériser les interactions entre le béryllium et les cellules immunitaires (macrophages et lymphocytes). b-) vérifier la capacité d'agents chélateurs à déplacer le béryllium. À partir de ces bases il serait alors possible de procéder à la détermination des sites d'accrochages du béryllium sur les cellules par des méthodes, bien maîtrisées par notre équipe, liées à l'emploi de biocapteurs et de la technologie de résonance plasmonique de surface (BIAcore),

#### ***3a- Interactions entre le béryllium et les cellules immunitaires***

Le béryllium (Be) est un métal reconnu pour induire une réponse immunitaire et des inflammations chez les gens qui sont exposés à ce métal. En effet, ce métal est souvent associé à des maladies pulmonaires en fonction des niveaux d'exposition. Une forte exposition peut causer de graves maladies pulmonaires. Une exposition chronique peut entraîner des désordres pulmonaires chroniques comme des sensibilisations au Be et si les gens exposés ne sont pas retirés du milieu d'exposition ce problème peut dégénérer en béryllose (MCB).

#### **Les macrophages**

Les macrophages sont les premières cellules arrivées sur les lieux de l'infection afin de séquestrer et d'éliminer les xénobiotiques. Elles sont impliquées dans les réactions inflammatoires. Nous avons choisi de travailler avec des macrophages afin de voir les modifications au niveau des fonctions de ces cellules. Nous avons donc choisi une lignée cellulaire, les H36.12J pour déterminer les effets du Be sur les macrophages. Nous avons testé plusieurs paramètres impliqués dans des études d'immunotoxicologie afin de voir les dommages causés au système immunitaire suite à une exposition des macrophages au Be. Les paramètres immunotoxiques les plus importants et étudiés ici sont: la phagocytose, la flambée oxydative, l'apoptose, la libération de NO, le phénotypage et le dosage de cytokines inflammatoires par ELISA.

À partir des tests effectués, nous avons observé une diminution de la phagocytose chez les macrophages. Nous avons également observé une augmentation du pourcentage des cellules en apoptose et une modification du cycle cellulaire chez les macrophages. La production de peroxyde d'hydrogène est plus élevée en présence de Be et la production de cytokines (TNF- $\alpha$ ) est également augmentée. Nous avons regardé les changements au niveau des récepteurs de surface chez les macrophages par ELISA et nous avons observé une augmentation du pourcentage de cellules exprimant le CD68, un récepteur qui pourrait être impliqué dans la prise en charge et la présentation de l'antigène et également dans la protection des membranes du lysosome contre les attaques des enzymes hydrolytiques. Ces tests démontrent que le Be affecte les fonctions des macrophages ce qui confirmerait ces effets sur la formation de réactions inflammatoires chroniques (Larrivée et al., 2007 soumis à Toxicology Letter).

### Les lymphocytes

Pour ce qui est des lymphocytes, une série d'expérience fut entreprise pour étudier l'effet de l'exposition *in vitro* au Be. Ces études permirent de développer le modèle de culture utilisée dans la section suivante pour les études de déplacement. La toxicité du Be fut comparée à celle d'autres métaux tels le mercure, le cadmium, le zinc, le vanadium. La capacité de défense cellulaire, par la production de thiols fut aussi évaluée avec ou sans induction par des métaux tels le zinc et le sélénium. Les sources de cellules furent les lymphocytes sanguins humains et les cellules spléniques de souris.

### **3b- Études de déplacement du béryllium**

Des études récentes montrent que la maladie chronique provoquée par le béryllium est reliée à la présence à la surface des cellules de certaines allèles du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC-II) de classe II. En effet, selon Weston et al. (2005)[12] la présence de l'allèle (HLA-DPB1), via la charge superficielle du complexe MHC-II, permet d'associer un risque élevé de lier le béryllium suggérant ainsi que les allèles d'HLA-DP avec les acides aminés les plus négativement chargées augmentent le risque de développer la MCB[13]. Ceci souligne que l'interaction de charge est la base de ce couplage entre le béryllium (chargé positivement) et le complexe MHC-II (chargé négativement). À partir de ces observations nous avons émis l'hypothèse que l'exploitation d'un traitement par des agents complexant capable de sélectivement masquer le béryllium et d'ainsi l'empêcher d'interagir avec le MHC-II représenterait une piste de traitement à exploiter. Dans le cadre du présent projet nous avons comme objectif de valider cette hypothèse.

Pour ce faire nous avons sélectionné trois agents complexant qui respectent les propriétés physico-chimiques du béryllium, l'acide nitrilotriacétique (NTA), l'acide nitrilotripropionique (NTP) [14]et le Tiron[15]. Nous avons mesuré la force d'interaction (constante d'association) et étudié la sélectivité de ces agents complexant pour le béryllium par titrage calorimétrique isothermique. Les résultats obtenus sont à la base de deux articles soumis pour publication (Stephan et al., 2007a,b)

Par la suite, nous avons étudié l'efficacité de ces agents complexant à prévenir ou à inhiber la toxicité du béryllium dans des modèles d'exposition *in vitro* mettant à contribution des lymphocytes de souris. Différents protocoles ont été utilisés afin d'étudier l'effet protecteur, thérapeutique et combiné des ces agents complexant sur la toxicité de béryllium. Un autre article est issu de ces travaux (Stephan et al., 2007c).

L'ensemble des résultats obtenus démontre la justesse de notre hypothèse de départ. Les divers agents chélateurs permettent de déplacer le béryllium et de protéger les cellules (traitement en prophylaxie) ou de renverser la toxicité du béryllium sur des cellules pré-exposées à ce métal. Pour compléter ces travaux nous voulons vérifier la capacité des agents chélateurs à déplacer le béryllium dans une matrice biologique.

## **4- Progrès réalisé sur l'objectif 3 : déterminer les niveaux de Be dans le sérum et le plasma des travailleurs exposés, hypersensibles et ayant développés la béryllose afin d'établir une courbe dose-réponse pour l'établissement de normes d'exposition**

L'analyse des teneurs de Be dans le sang complet ainsi que dans différentes composantes (sérum, plasma, cellules) devrait permettre d'identifier si on peut obtenir une meilleure relation entre la réponse des tests de dépistage d'hypersensibilité et les niveaux de Be observés dans le sang des travailleurs exposés. L'avantage et l'originalité de cette approche sont de permettre une mesure ponctuelle de la charge corporelle de Be à laquelle était soumise ces travailleurs au moment du prélèvement. La littérature suggère que le lien entre les mesures de Be dans l'air sous forme de particules de différentes grosseurs n'est pas bien établi avec l'apparition d'hypersensibilité au Be et à la béryllose. Une approche basée sur les concentrations de Be mesurées dans le sang ou ses composantes reflète mieux le résultat net de l'exposition et intègre l'effet modulateur causé par la proximité de la source, les mesures de protection contre l'inhalation et la durée de l'exposition. Il est ainsi possible d'avoir une plus grande exposition par un travailleur éloigné des sources principales et donc sans protection, que d'un travailleur directement exposé mais avec une protection accrue. Un indicateur sanguin de l'exposition au Be serait un atout majeur pour définir une courbe dose-réponse qui permette d'identifier les milieux et les conditions de travail propices au développement de l'hypersensibilité et de la béryllose. Le présent devis devait permettre la mise au point la méthode d'analyse chimique du Be à partir d'une matrice biologique le plasma.

Les analyses sanguines de Be seront aussi combinées avec des mesures des constantes d'association du béryllium avec différents ligands naturels et synthétiques dans la continuité des travaux de déplacement présentés dans la section précédente. Ces travaux permettront aussi de déterminer les sites d'attachement du Be dans le sang.

### **4a- Dosage du Be plasmatique**

Après des tentatives d'analyses de Be dans le sang par spectroscopie d'émission atomique avec plasma induit (ICP-AES) (limite de détection 1 µg/L), par spectrométrie de masse avec plasma induit (ICP-MS), et par GC-MS après dérivatisation avec du trifluoroacétylacétone (limite de détection 50 µg/L), nous avons opté pour une méthode d'analyse par absorption atomique au four graphite (GFAAS). Nous avons testé différents modificateurs de matrices et nous sommes rendus à l'étape d'optimiser les différents paramètres pour obtenir les meilleures performances. Nous obtenons déjà une limite de détection aux environs de 0.03 µg/L dans le sérum sanguin humain. L'optimisation qui reste à faire vise à trouver les températures, les concentrations et les ratios optimaux de palladium/magnésium comme modificateurs de matrice.

### **4b- Sites plasmatiques d'attachement du béryllium**

En effet, le potentiel du NTP et du Tiron à minimiser l'effet toxique du béryllium tel que dévoilé par les tests de transformations lymphoblastiques nous pousse à regarder leurs effets sur la répartition du béryllium dans le sang. Une fois arrivé au poumon, le béryllium va traverser les tissus pulmonaires pour se rendre dans le sang qui va le transporter vers d'autres organes du corps. La circulation sanguine constitue donc le mode de transport du béryllium. D'où l'importance d'étudier sa répartition dans le sang et vérifier la modification qu'apporte la présence des agents complexant.

La première étape a été de fortifier des échantillons de sang par des quantités connues de béryllium. Pour ce faire diverses doses de béryllium ont été ajoutées à des échantillons de sang (4 h avec agitation continue), puis le sérum a été séparé de la partie corpusculaire par centrifugation. Le sérum est par la suite soumis à une ultrafiltration (masse de séparation 10000 Da) afin de séparer les protéines à haute masse moléculaire des faibles. L'analyse du béryllium dans chacune de ces trois parties est réalisée par absorption atomique dans un four graphite avec usage de différents modificateurs de matrice afin de sélectionner le plus efficace. Les mêmes étapes de séparation seront effectuées avec des échantillons de sang traités par du béryllium et par des agents complexant. L'ajout des agents complexant peut se faire avant ou bien après l'ajout du béryllium. Cela permettra de clarifier si cette complexation du Be-agent complexant se fait par compétition avec les protéines sanguines. En effet, en vérifiant l'Index de Mobilisation du Plasma (IMP), nous pouvons déterminer l'efficacité de l'agent complexant à mobiliser le béryllium du complexe labile béryllium-protéine. L'IMP fournit une bonne mesure de la capacité thermodynamique de complexation d'un agent complexant avec un ion métallique dans le sérum.

La deuxième étape compte sur l'étude de la répartition du béryllium dans chacune de deux fractions sanguines (protéines à haute et à faible masse moléculaire) séparément par chromatographie liquide à échange anionique (colonne Mono Q Hr 5/5). Cette colonne est utilisable pour la séparation des deux fractions au pH physiologique de 7.4. Dans la fraction à faible masse moléculaire (FMM), nous isolerons les citrates et les oxalates pour évaluer leurs capacités d'associer le béryllium. Le choix de ces deux composés de la fraction à FMM est justifié par des études de spéciation d'aluminium due à sa ressemblance avec les propriétés physico-chimiques du béryllium. Des collectes de fraction de 2 mL vont s'effectuer durant l'analyse par HPLC. L'analyse pour le béryllium dans ces fractions va se faire par absorption atomique au four de graphite (GFAAS). Pour la fraction à haute masse moléculaire (HMM), nous isolerons la transferrine, l'albumine et la  $\delta$ -globuline et déterminerons leurs capacités d'associer le béryllium. Ces trois protéines sont bien connues pour leur potentiel de rétention des métaux dans le sang. Ici aussi, des épreuves de déplacement par les agents chélateurs seront effectuées.



## **5- Progrès sur l'objectif 4 : étudier les événements moléculaires impliqués dans le développement de l'hypersensibilité et dans l'induction de la béryllose afin de mettre au point un protocole de dépistage précoce de l'hypersensibilité et de la béryllose.**

Tel que mentionné plus haut, l'exposition chronique au béryllium se traduit par des transformations morphologiques et biochimiques au niveau de divers organes et structures cellulaires. Certaines de ces modifications aux niveaux des acides nucléiques et des protéines cellulaires pourraient servir de signature spécifique à l'action néfaste du béryllium. Il serait alors possible avec des approches de génomique et de protéomique de développer des tests diagnostiques plus précoces et plus précis. Dans le présent devis nous devons nous assurer de l'applicabilité de ces approches dans le cadre de populations de lymphocytes.

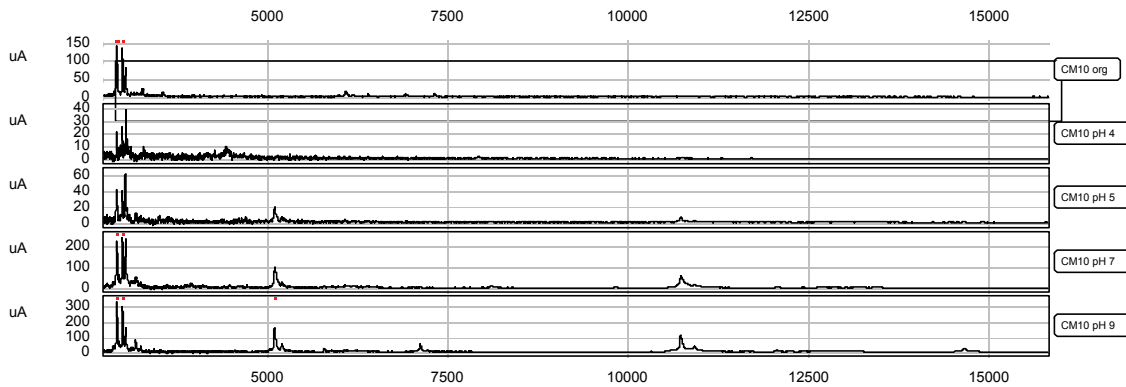
### **5a- Protéomique**

Il est acquis que les lymphocytes T sont des intermédiaires-clés de la réponse inflammatoire induite par le Be. Nous proposons dans notre programme de recherche de comparer l'expression de diverses protéines intracellulaires de lymphocytes T obtenus de volontaires sains et de travailleurs exposés au béryllium. Dans le cadre du présent devis, nous avons développé les méthodes de protéomique dans un cadre instrumental qui permet, via la robotisation déjà en place au CRBM de Rimouski, l'analyse de nombreux échantillons.

Pour la détermination de la signature en protéines nous avons utilisé la technologie ProteinChip® Arrays de CIPHERGEN® (Fremont, CA, USA). Avec l'acquisition du premier modèle au Canada d'un nouveau système pour la découverte de biomarqueurs (CIPHERGEN ProteinChip® Serie 4000, modèle Enterprise) et d'une unité de robotisation, nous pouvons assurer le suivi et la quantification des marqueurs biologiques dans de nombreux échantillons. À partir de lymphocytes, nous avons optimisé les conditions de préparation tel que la quantité de protéines, les paramètres de sonication, et le fractionnement des échantillons sur résine d'échange anionique Q-hyper D®F [16,17,18].

Notre stratégie a consisté à utiliser deux types de surfaces chimiques pour étudier le profil d'expression protéique soit une surface cationique (CM10) et une surface chargée d'un ion métallique (IMAC). La surface CM10 est chargée négativement et la surface IMAC est chargée avec un métal qui va capturer les protéines contenant des groupements histidine, tryptophane, cystéine et les acides aminés phosphorylés. En modulant les conditions de pH, nous avons également pu obtenir des profils protéiques variés. Nous planifions pour augmenter la sensibilité de la détection de coupler du béryllium à l'IMAC.

Figure 11 : Exemple de profils protéiques obtenus par CM10



À l'aide du module d'analyse, nous pouvons maintenant comparer les différents profils protéiques obtenus dans diverses conditions expérimentales et détecter les pics d'intérêts qui sont soit augmentés ou diminués. Il est donc possible de tester l'hypothèse de signatures différentes de protéines sur des lymphocytes humains de sujets témoin, sensibles au béryllium et ayant développés une béryllose.

### 5b Génomique

L'utilisation d'une approche d'analyse moléculaire devait nous permettre de déterminer le profil d'expression de différentes sous-classes d'acides nucléiques et de protéines dont l'expression peut être modulée par le béryllium. Ainsi en comparant des individus en santé avec d'autres présentant une hypersensibilité au Be ou ayant développé une béryllose, nous aurions pu déterminer si l'expression préférentielle de certaines molécules, ou encore leur inhibition, peut être liée au développement de cette pathologie.

Pour ce faire une source d'ARNm homogène est nécessaire en quantité suffisante pour initier le processus d'amplification (PCR).

À ce jour à partir d'un volume sanguin acceptable pour un donneur humain il ne fut pas possible de purifier des sous-populations de lymphocytes en assez grande quantité pour extraire suffisamment d'ARNm pour procéder à cette approche. De plus les coûts associés à cette approche (environ \$1000 seulement pour l'achat de puces) rendraient un test diagnostique basé sur la génomique prohibitif.

## 6- Conclusions

En résumé, les objectifs de la demande initiale ont tous été remplis, à l'exception des épreuves avec des échantillons de sang de travailleurs sensibilisés. Nous avons préféré mettre l'ensemble des efforts sur le processus de validation des différentes approches expérimentales. Dans plusieurs des volets la validation a été poussée beaucoup plus loin qu'initialement prévue, tel que par exemple l'emploi des agents chélateurs pour le déplacement du Be.

De ces travaux nous pouvons dégager qu'au niveau des épreuves de dépistage, l'immuno LPT s'avère techniquement réalisable et fort prometteur. Au niveau de la protéomique, les travaux effectués permettent de conclure qu'il est possible avec un échantillon de sang d'avoir suffisamment de matériel pour dégager des signatures de protéines le raffinement des méthodes et l'emploi de support à base de béryllium devraient nous permettre de se doter d'une approche très sensible, permettant éventuellement de caractériser la sensibilité des travailleurs.

Sur le plan analyse chimique, nous avons pu mettre au point une approche méthodologique permettant de détecter le béryllium dans des matrices biologiques de type plasma sanguin. Il sera donc possible de mettre sur pied un programme de suivi des travailleurs permettant de détecter l'exposition à la cible de ceux-ci. Avec ces données, il sera alors beaucoup plus facile de déterminer les niveaux d'exposition vraiment sécuritaires.

Les épreuves de déplacement du béryllium avec des agents chélateurs ont été un grand succès. Ils permettront de mieux comprendre la dispersion du béryllium dans les différents tissus et les interactions de celui-ci avec les différentes molécules de transport. Ces travaux permettent aussi de mettre en lumière que certains agents chélateurs ont le potentiel de renverser la toxicité du béryllium suite à des expositions. De nouvelles perspectives de traitement des travailleurs exposés s'ouvrent donc.

Le lien initialement prévu avec les laboratoires de diagnostic pour obtenir des échantillons s'est avéré une approche non fonctionnelle. Pour circonvenir ces difficultés dans une suite éventuelle du programme de recherche, nous avons décidé de mettre sur pied des facilités de diagnostique dans notre laboratoire. Avec des formulaires de consentement approprié il sera alors possible d'effectuer le suivi de travailleurs exposés avec le test classique BeLPT tout en validant avec les mêmes échantillons de sang le test Immuno LPT, le dosage de béryllium dans le plasma et les épreuves de protéomique. Cette approche multiparamétrique permettrait de valider les nouvelles méthodes en conditions réelles, de comparer la sensibilité des nouveaux tests avec le test classique BeLPT et par l'addition des épreuves d'analyse chimique, de bien corrélérer les effets biologiques aux niveaux cellulaire et moléculaire avec les expositions à la cible.

## 7- Articles scientifiques découlant du présent travail

Stephan, C.H., Lafleur, M., Brousseau, P., Fournier, M., Sauvé, S. 2007. Competitive Metal Binding by Displacement Isothermal Titration Calorimetry: A Study of Be<sup>2+</sup> Ca<sup>2+</sup> EDTA Complexation. Soumis à Biometals.

Stephan, C.H., Brousseau, P., Fournier, M., Sauvé, S. 2007. Nitrilotripropionic acid (NTP), Nitrilotriacetic acid (NTA) and Tiron as sequestering agents for Beryllium. An Isothermal Titration Calorimetry Study. Soumis à Analytical Biochemistry

Stephan, C.H., Brousseau, P., Fournier, M., Sauvé, S. 2007. Beryllium Lymphocyte Proliferation Test: a study of the therapeutic effects of NTA, NTP and Tiron. Soumis à Toxicology Letters.

Larrivée, A., Brousseau, P., Stephan, C.H., Sauvé, S. Fournier, M. 2007. Effects of Beryllium on natural immunity. Soumis à Toxicology Letters.

Fortier, M., Brousseau, P., Omara, FO., Kouassi, E., Bernier, J., Fournier, M., Sauvé, S., 2007. Effects of metals tested at relevant concentrations individually or in mixtures on viability and immune competence of immune cells in human blood. En préparation pour Environmental Toxicology and Chemistry

## 8- Références

1. Newman LS, Kreiss K, King TE, Seay S, Campbell PA: Pathologic and Immunological Alterations in Early Stages of Beryllium Disease - Re-Examination of Disease Definition and Natural-History. *American Review of Respiratory Disease* 139:1479-1486, 1989.
2. Sawyer RT, Maier LA, Kittle LA, Newman LS: Chronic Beryllium Disease: A Model Interaction Between Innate and Acquired Immunity. *International Immunopharmacology* 2:249-261, 2002.
3. Takaro TK, Pepper L: Screening for Chronic Beryllium Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 172:1230, 2005.
4. Newman LS, Mroz MM, Maier LA, Daniloff EM, Balkisson R. Efficacy of serial medical surveillance in a beryllium machining plant. *J Occup Environ Med.* 43: 231–237, 2001.
5. Farris, G.M., Newman, L.S., Frome, E.L., Shou, Y., Barker, E., Habbersett, R.C., Maier, L., Smith, H.N., Marrone, B.L. Detection of beryllium sensitivity using a flow cytometric lymphocyte proliferation test: the immuno-Be-LPT. *Toxicology* 143; 125-140, 2000.
6. Milovanova, T.N., Popma, S.H., Cherian, S., Moore, J.S., Rossman, M.D. Flow cytometric test for beryllium sensitivity. *Clinical Cytometry*, 60B; 23-30, 2004.
7. Milovanova, T. Comparative analysis between CFSE flow cytometric and tritiated thymidine incorporation tests for beryllium sensitivity. *Cytometry B Clinical Cytometry*, 72; 265-275, 2007.
8. Koepke, J., Lanaday, A. Precision and accuracy of absolute lymphocyte counts. *Clin Immunol Immunopathol*, 52; 19-27, 1989.
9. Fontenot AP, Newman LS, Kotzin BL: Chronic Beryllium Disease: T Cell Recognition of a Metal Presented by HLA-DP. *Clinical Immunology* 100:4-14, 2001.
10. Fontenot AP, Vollmer M, Newman LS, Kotzin BL: HLA-DP Restricted CD4(+) T Cells from the Lungs of Patients with Chronic Beryllium Disease. *Faseb Journal* 14:A1161, 2000.
11. Fontenot AP, Keizer TS, McCleskey M, Mack DG, Meza-Romero R, Huan J, Edwards DM, Chou YK, Vandenbark AA, Scott B, Burrows GG: Recombinant HLA-DP2 Binds Beryllium and Tolerizes Beryllium-Specific Pathogenic CD4+ T Cells. *Journal of Immunology* 177:3874-3883, 2006.

12. Weston A, Ensey JS, Frye BL: DNA-Sequence Determination of exon 2 of a Novel HLA-DPB1 allele, HLA-DPB1\*0403. *DNA Sequence* 16:235-236, 2005.
13. Snyder JA, Weston A, Tinkle S, Demchuck E: Electrostatic Potential on Human Leukocyte Antigen: Implications for Putative Mechanism of Chronic Beryllium Disease. *Environmental Health Perspectives* 111:1827-1834, 2003.
14. China E, Dominguez S, Mederos A, Brito F, Arrieta JM, Sanchez A, Germain G: Nitrilotripropionic Acid (Ntp) and Other Polyamino Carboxylic-Acids As Sequestering Agents for Beryllium(Ii) - X-Ray Crystal-Structure of Sodium (Nitrilotripropionato)Beryllate(Ii) Trihydrate, Na[Be(Ntp)]Center-Dot-3H(2)O. *Inorganic Chemistry*, 34:1579-1587, 1995.
15. Sharma P, Shukla S: Comparative Effectiveness of Tiron (4,5-Dihydroxy benzene 1,3-disulphonic acid disodium salt) and CaNa<sub>2</sub>EDTA with Time after Beryllium Poisoning. *Indian Journal of Experimental Biology*, 38:785-790, 2000.
16. Rollin D, Whistler T, Vernon SD Laboratory methods to improve SELDI peak detection and quantitation. *Proteome Sci.*, 2; 5-9 2007.
17. : Guerrier L, Lomas L, Boschetti EJ A new general approach to purify proteins from complex mixtures. *Chromatogr A.*, 1156;188-95, 2007.
18. Göbel T, Vorderwülbecke S, Hauck K, Fey H, Häussinger D, Erhardt A New multi protein patterns differentiate liver fibrosis stages and hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C serum samples. *World J Gastroenterol.*,12; 7604-7612, 2007.