

Substances chimiques et agents biologiques

Études et recherches

RAPPORT R-637



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

*Caroline Muller
Bruce Mazer
Fariba Salehi
Séverine Audusseau
Ginette Truchon
Jean Lambert*

*Gilles L'Espérance
Gaston Chevalier
Suzanne Philippe
Yves Cloutier
Pierre Larivière
Joseph Zayed*



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

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 nationale du Québec
2010
ISBN : 978-2-89631-423-2 (version imprimée)
ISBN : 978-2-89631-422-5 (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
www.irsst.qc.ca
© Institut de recherche Robert-Sauvé
en santé et en sécurité du travail,
février 2010



Substances chimiques et agents biologiques

Études et recherches

■ Rapport R-637

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

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.



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

*Caroline Muller¹
Bruce Mazer²
Fariba Saleh²
Séverine Audusseau²
Ginette Truchon³
Jean Lambert¹
Gilles L'Espérance⁴
Gaston Chevalier⁵
Suzanne Philippe¹
Yves Cloutier³
Pierre Larivière³
et Joseph Zayed¹*

¹Université de Montréal

²Meakins-Christie Laboratories, Université McGill

³IRSST

⁴École Polytechnique de Montréal

⁵Université du Québec à Montréal

CONFORMÉMENT AUX POLITIQUES DE L'IRSST
Les résultats des travaux de recherche publiés dans ce document
ont fait l'objet d'une évaluation par des pairs.

Sommaire

Au cours des dernières années, plusieurs auteurs ont remis en cause le niveau de protection accordé aux travailleurs par la valeur seuil reconnue pour le béryllium (Be) et ses sels (VEMP Québec, TLV (TWA) ACGIH). La prévalence des effets associés au Be suggère que les risques sont en fonction de sa spéciation. Par ailleurs, il semble que les particules fines constituent la fraction d'intérêt pour l'occurrence de tels effets. L'objectif de cette recherche est d'évaluer la toxicité du Be en fonction de la forme chimique et de la taille particulaire.

Pour chacune des formes chimiques visées par la présente étude (Be, BeO, BeAl), la toxicité a été évaluée à la suite d'une exposition subchronique par inhalation *oro nasale* à des particules fines et totales. À cette fin, un modèle animal (souris) a été utilisé. Au total, 245 souris ont été utilisées. Elles ont été subdivisées en sept groupes de 35 individus. Un groupe a servi de contrôle, alors que chacun des six autres a été exposé soit à des particules fines soit à des particules totales, pour chacune des trois formes chimiques de Be. La durée d'exposition pour chacun des groupes s'est étendue sur 3 semaines comprenant 15 jours d'exposition (5j/sem, 6h/j). Au moment du sacrifice, plusieurs tissus (poumon, rate, foie et reins) ainsi que des échantillons de sang ont été prélevés puis immédiatement congelés jusqu'à leur analyse pour la détermination de leur teneur en Be. De plus, certains poumons et rates ont été analysés pour l'évaluation de la sensibilité immunologique et de l'inflammation pulmonaire.

De nombreuses corrélations ont été établies entre les concentrations tissulaires en Be et les effets normalement observés chez le travailleur à la suite d'une exposition. Les coupes histologiques montrent que les souris exposées au Be présentent des niveaux d'inflammation pulmonaire similaires à ceux observés chez des patients atteints de béryllose chronique (BC). Les résultats témoignent également d'une association entre la taille des particules, les concentrations pulmonaires, l'inflammation pulmonaire, la production de certaines cytokines et l'expression de certains lymphocytes.

Les effets dépendent aussi de la forme chimique de Be. Ainsi, ce sont le Be métallique et le BeO qui seraient les formes les plus toxiques. Manifestement, le diamètre aérodynamique et le caractère soluble ou insoluble ont joué un rôle significatif sur la déposition et la rétention pulmonaire.

Les résultats de cette recherche contribueront d'une part à la compréhension du rôle de la taille des particules et de la forme chimique dans la toxicité du Be. Combinés à d'autres résultats, ils contribueront aussi à guider les actions de prévention relativement à l'exposition au Be, incluant éventuellement la révision de la valeur limite de l'exposition et possiblement l'établissement de valeurs limites en fonction de la forme chimique et de la taille des particules.

Table des matières

Liste des tableaux	v
Liste des figures	vii
Sommaire	i
1. PROBLÉMATIQUE.....	1
2. ÉTAT DES CONNAISSANCES SCIENTIFIQUES	3
2.1. Caractéristiques du béryllium	3
2.1.1. <i>Origine</i>	3
2.1.2. <i>Propriétés physico-chimiques</i>	3
2.1.3. <i>Utilisation</i>	3
2.2. Sources d'exposition	4
2.3. Normes et valeurs de référence	6
2.4. Toxicocinétique	7
2.4.1. <i>Absorption</i>	7
2.4.2. <i>Déposition pulmonaire des poussières chez l'humain</i>	8
2.4.3. <i>Déposition pulmonaire des poussières chez la souris</i>	9
2.4.4. <i>Distribution</i>	9
2.4.5. <i>Métabolisme</i>	9
2.4.6. <i>Excrétion</i>	9
2.4.7. <i>Demi-vie</i>	10
2.5. Pathologies attribuables au Be	10
2.5.1. <i>Sensibilisation</i>	10
2.5.2. <i>Béryllose chronique</i>	10
2.5.3. <i>Béryllose aiguë</i>	10
2.5.4. <i>Cancer</i>	11
2.6. Facteurs de risque.....	11
2.7. La toxicité à partir des modèles animaux	11
3. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE	13
4. MÉTHODE DE RECHERCHE.....	15
4.1. <i>Exposition oro-nasale</i>	15
4.2. <i>Sacrifice</i>	16
4.3. <i>Détermination du béryllium dans les matrices biologiques</i>	17
4.4. <i>Évaluation des effets</i>	17
4.5. <i>Analyse statistique</i>	18

5. RÉSULTATS.....	21
5.1. Concentrations et caractéristiques du béryllium	21
5.2. Concentrations tissulaires et sanguines	22
5.3. Cytométrie en flux	27
5.4. Cytokines	28
5.5. Coupes histologiques et score inflammatoire.....	29
5.6. Tests de prolifération lymphocytaires.....	31
6. DISCUSSION.....	32
Conclusion.....	37
Références	39
ANNEXE I	45

Liste des tableaux

Tableau 1 - Comparaison des réponses entre la BC chez l'humain et chez deux lignées de souris C3H/HeJ et A/J	12
Tableau 2 - Concentrations moyennes de Be et MMAD	21
Tableau 3 - Pourcentage de déposition pulmonaire en fonction du MMAD.....	22
Tableau 4 - Score histologique de l'inflammation pulmonaire chez les souris (n=8/groupe) sacrifiées 1 semaine après la fin de l'exposition...	30
Tableau 5 - Score histologique de l'inflammation pulmonaire chez les souris (n=5/groupe) sacrifiées 3 semaines après la fin de l'exposition.	30
Tableau 6 - Corrélations entre les concentrations tissulaires, les concentrations des cytokines et l'expression cellulaire de la rate pour les souris exposés aux Be-F, au BeO-F et au BeAl-F	35

Liste des figures

Figure 1 -	Prédiction du dépôt total et régional des particules dans les voies respiratoires de l'humain en fonction de la taille des particules.	8
Figure 2 -	Déposition pulmonaire chez la souris.....	9
Figure 3 -	Concentrations pulmonaires moyennes (\pm SD) de béryllium chez des souris exposées au Be-T et au BeAl-T comparativement au groupe contrôle (n=15/groupe).....	22
Figure 4 -	Concentrations moyennes (\pm SD) de béryllium dans le sang (n=30) et les tissus (rate n=15, foie n=30, reins n=30) chez des souris exposées au Be-T et au BeAl-T comparativement au groupe contrôle.....	23
Figure 5 -	Concentrations pulmonaires moyennes (\pm SD) de béryllium chez des souris exposées au Be-F (n=15), au BeO-F (n=30) et au BeAl-F (n=15) comparativement au groupe contrôle	23
Figure 6 -	Concentrations moyennes (\pm SD) de béryllium dans le sang (n=30 pour Be-F et BeAl-F, n=60 pour BeO-F) et les tissus (rate n=15 pour Be-F et BeAl-F, n=30 pour BeO-F, foie et reins n=30 pour Be-F et BeAl-F, n=60 pour BeO-F) chez des souris exposées au Be-F, au BeO-F et au BeAl-F comparativement au groupe contrôle.....	24
Figure 7 -	Concentrations pulmonaires moyennes (\pm SD) de béryllium chez des souris exposées au Be-F et au Be-T comparativement au groupe contrôle (n=15/groupe).....	25
Figure 8 -	Concentrations moyennes (\pm SD) de béryllium dans le sang (n=30) et les tissus (rate n=15, foie n=30, reins n=30) chez des souris exposées au Be-F et au Be-T comparativement au groupe contrôle.....	25
Figure 9 -	Concentrations pulmonaires moyennes (\pm SD) de béryllium chez des souris exposées au BeAl-F et au BeAl-T comparativement au groupe contrôle (n=15/groupe).....	26
Figure 10 -	exposées au BeAl-F et au BeAl-T comparativement au groupe contrôle.....	26
Figure 11 -	Profils comparatifs des lymphocytes de la rate (n= 7/groupe) des souris exposées au Be-F, au Be-T, au BeAl-F et BeAl-T Pourcentage cellulaire (\pm SD).....	27
Figure 12 -	Profils comparatifs des lymphocytes de la rate des souris exposées au Be-F (n=7), au BeO-F (n=14) et au BeAl-F (n=7) Pourcentage cellulaire (\pm SD).....	27

Figure 13 - Concentrations moyennes (\pm SD) de cytokines chez les souris (n=7/groupe) exposées au Be-F, au Be-T, au BeAl-F et BeAl-T	28
Figure 14 - Concentrations moyennes (\pm SD) de cytokines chez les souris exposées au Be-F (n=7), au BeO-F (n=14) et au BeAl-F (n=7)	28
Figure 15 - Coupes histologiques du poumon de souris (n=8/groupe) exposées au Be.....	29
Figure 16 - Coupes histologiques du poumon de souris (n=16/ groupe) exposées au BeO.....	29
Figure 17 - Coupes histologiques du poumon de souris (n=8/groupe) exposées au BeAl.....	29
Figure 18 - BeLPT effectué à partir des cellules de la rate des souris du groupe contrôle et des souris exposées au BeO-F (n=16), au BeAl-T (n=8) et au BeAl-F (n=8) Index de stimulation (\pm SD).....	31
Figure 19 - BeLPT effectué à partir des cellules de la rate des souris du groupe (n=8) Index de stimulation (\pm SD)	31
Figure 20 - Les concentrations pulmonaires et les scores inflammatoires en fonction du diamètre aérodynamique massique médian	33

1. Problématique

Au cours des dernières années plusieurs auteurs ont remis en cause le niveau de protection accordé aux travailleurs par la valeur seuil reconnue pour le Be et ses sels (VEMP¹ du Québec, équivalente de TLV (*Threshold Limit Value*) de l'ACGIH). Récemment, certains travailleurs, tant au Québec qu'ailleurs dans le monde, ont été sensibilisés ou ont développé une béryllose, interpellant ainsi la communauté scientifique pour mieux comprendre la problématique sous-jacente à l'exposition au Be et à ses sels.

En 1998, un premier cas de BC a été diagnostiqué au Québec chez un employé d'une usine utilisant du Be. La commission de la santé et de la sécurité du travail (CSST) a accepté, en février 1999, une demande d'indemnisation présentée par un travailleur d'une fonderie chez qui la béryllose a été diagnostiquée en 1998. Par la suite, un certain nombre de demandes d'indemnisation ont été soumises à la CSST. À la fin de l'année 2000, une première analyse de documents scientifiques a permis d'établir que la situation était problématique au Québec. Dans les fonderies, environ 40% des travailleurs étaient exposés à des concentrations supérieures à 0,2 µg/m³. Au Québec environ 100 000 travailleurs étaient exposés (CSST, 2004; Brousseau, 2006). Dans certains établissements où la norme était respectée, des cas de BC ont été découverts (Noranda, 2001).

Au début 2001, la CSST a mis sur pied l'*Opération Béryllium* avec ses partenaires (Réseau de la santé, Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et sécurité du travail (IRSST) et associations sectorielles paritaires visées), afin de faire le point sur l'utilisation de ce métal et le niveau d'exposition des travailleurs.

¹ La valeur d'exposition moyenne pondérée pour une période de 8 h/ j, en fonction d'une semaine de 40 h.

2. État des connaissances scientifiques

2.1. Caractéristiques du béryllium

2.1.1. Origine

Le béryllium fut découvert en France en 1798 par Louis Nicolas Vauquelin. L'appellation «béryllium» pour le métal date de 1949, utilisé alors en remplacement du «glucinium»; l'appellation initiale en raison de son goût sucré. Il se distribue de façon ubiquiste dans la croûte terrestre à des concentrations variant généralement de 2,8 à 5,0 mg/Kg (Kolanz, 2001). Le Be n'existe pas à l'état pur dans la nature. Il est incorporé à 45 éléments naturels dont 5 ont une importance en matière d'exploitation industrielle. Ce sont le béryl, la bertrandite, le phénacite, le chrysobéryl et la gadolinite. Les deux principaux minerais béryllifères sont la bertrandite, composée de moins de 1% de Be, et le béryl dont la proportion en Be s'élève jusqu'à 4%. Les réserves mondiales sont évaluées à environ 80 000 tonnes dont 65 % seraient aux États-Unis (INRS, 2003). Des mines de Be sont également situées au Brésil, en Afrique du sud, en Chine, à Madagascar et au Zimbabwe (Williams, 1994).

2.1.2. Propriétés physico-chimiques

Le Be est un métal gris brillant, très dur, très léger et est doté d'une grande élasticité. Il est caractérisé par un nombre atomique de 4 et est le deuxième métal le plus léger des métaux avec un poids moléculaire de 9,01218 daltons. Il possède la même densité que le magnésium, il est trois fois plus léger que l'aluminium et six fois plus rigide que l'acier. Il résiste à la pression, à la chaleur, aux vibrations et à la corrosion. À titre d'exemple, le cuivre est six fois plus résistant en présence de 2% de Be (Plante *et al.*, 2002). Le Be a un point de fusion très élevé, soit 1287 °C, et il conserve sa forme malgré de très grandes variations de température (Bruce et Odin, 2001). Transparent aux rayons X et aux micro-ondes, le Be est à la fois un réflecteur et un émetteur de neutrons par bombardement alpha (Billen, 1983; WHO, 1990; Babadzhanova et Busakov, 1997). C'est un amphotère dont la structure cristalline est hexagonale et il constitue un excellent produit fluorescent (Bruce et Odin, 2001). C'est donc un métal dont les propriétés physiques et mécaniques sont très recherchées notamment dans les secteurs aéronautique, énergétique, électrique et électronique. En général le Be et ses composés sont très faiblement solubles dans l'eau avec un coefficient de solubilité de 0,2 pour certains (INSPQ, 2004). Cependant, lorsqu'il est sous forme de sel, il est davantage soluble dans l'eau.

2.1.3. Utilisation

Il existe plusieurs composés de Be tels que l'oxyde de béryllium (BeO), le sulfate de béryllium (Be(SO₄)), le fluorure de béryllium (BeF₂), le phosphate de béryllium (BeHPO₄), l'hydroxyde de Be (Be(OH)) (Schepers, 1964), et des alliages tels que

béryllium-cuivre (Be-Cu), béryllium-aluminium (Be-Al) ou béryllium-nickel (Be-Ni) (ATSDR, 2002).

Le Be métallique, les alliages et l'oxyde de Be sont les produits les plus importants pour le commerce obtenus de la transformation de l'hydroxyde de Be qui résulte de l'extraction acide du minerai (Bruce et Odin, 2001). Le Be métallique est utilisé principalement comme modérateur et réflecteur de neutrons dans les réacteurs nucléaires et dans les fenêtres pour tubes de rayons X et dans l'industrie de l'armement nucléaire (INSPQ, 2004). Les alliages, principalement de cuivre et dans une moindre mesure d'aluminium, de magnésium, de nickel, de zinc et de zirconium, trouvent de nombreuses applications dans les industries aérospatiale, électronique et mécanique ainsi que dans la fabrication d'articles de sport tels que les bâtons de golf (INSPQ, 2004). Les alliages d'aluminium-béryllium proprement dits contiennent entre 20 et 62 % de Be. Leur utilisation demeure réservée à des applications spécialisées, telles que les matériaux de structure d'avion et les pièces d'avionique, les étriers de freins de voiture de Formule-1 et des pièces d'équipement de précision. D'autres alliages d'aluminium contiennent du Be mais à des teneurs beaucoup plus faibles (moins de 0,07 %). Ils sont utilisés entre autres dans le secteur de l'aéronautique comme matériau de structure, mais ont aussi de nombreuses autres utilisations, là où une résistance accrue est requise.

Les oxydes de Be sont utilisés comme modérateur dans les réacteurs nucléaires et servent à la fabrication de céramiques dans les domaines de l'électronique, de l'automobile, en microélectronique, dans les lasers, dans les tubes à micro-ondes (INSPQ, 2004). Les sels solubles de fluorure et de sulfate de Be constituent principalement des intermédiaires dans les procédés de production (Bruce et Odin, 2002)

2.2. Sources d'exposition

L'exposition au Be peut être de nature environnementale ou professionnelle (Willis et Florig, 2002). Dans l'air, les concentrations gravitent autour de 0,0002 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en milieu urbain (ACGIH, 1998). Des cas de BC d'origine environnementale restent exceptionnels (Eisenbud *et al.* 1949). Par contre, la possibilité d'apparition de problèmes de santé liés au Be, en dehors d'une exposition professionnelle a interpellé les scientifiques et les décideurs à conjuguer des efforts afin de réglementer cette forme d'exposition. C'est ainsi que la norme d'exposition environnementale a été établie par les États-Unis à 0,01 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (ATSDR, 1993; US EPA, 1998). Il est à noter qu'il n'existe pas de norme environnementale établie au Québec (INSPQ, 2004).

On retrouve des concentrations moyennes ambiantes de Be dans le sol variant de 2,8 à 5 mg/kg (Reeves *et al.* 1986) alors que les concentrations retrouvées dans l'eau varient de 0,001 à 0,01 $\mu\text{g}/\text{L}$ (EPA, 1980). Les sols cultivables contiennent de 1 à 7 mg/Kg, avec une moyenne de 0,6 mg/Kg. Il existe de rares endroits où les

concentrations moyennes peuvent atteindre 60 mg/Kg avec des maximums de l'ordre de 300 mg/Kg. Le Be se retrouve dans les aliments à des concentrations variant de 0,2 à 2200 µg/kg avec pour chef de file une variété de haricot et les fèves soya. L'ingestion journalière de Be par la population générale est évaluée à environ 0,423 µg dont 0,12 µg par la nourriture et à 0,3 µg par l'eau selon des calculs effectués en 1987. Il fut établi que la concentration de Be dans l'eau ne devrait pas dépasser 4 µg/l (US EPA, 1998).

La fumée de cigarette serait une autre source potentielle d'exposition. Ainsi, les concentrations de Be ont été estimées à 0,47, 0,68, et 0,74 µg/cigarette dans le tabac de trois marques différentes de cigarettes. En estimant que 10 % de ces concentrations passent dans la fumée, un fumeur consommant 20 cigarettes par jour serait ainsi exposé à des concentrations de Be d'environ 1,5 µg/jour, équivalant de trois à quatre fois l'exposition occasionnée par l'air ambiant, l'eau, la nourriture et l'ingestion de poussières (Bruce et Odin, 2001).

Les personnes qui ont certains alliages dentaires (nickel-béryllium) ont une source supplémentaire d'exposition au Be. Le niveau d'exposition de ces personnes n'est pas connu, mais le dosage de ces alliages indique qu'ils peuvent contenir de 0,5 à 2 % de Be (US OSHA 2002).

Compte tenu de ses propriétés particulièrement intéressantes, le Be est de plus en plus utilisé dans l'industrie de la haute technologie. De ce fait, il n'est pas rare de voir des pays confrontés de façon croissante aux problèmes découlant de l'exposition des travailleurs à ce métal et ses composés.

En milieu de travail, l'inhalation est la principale voie d'exposition des travailleurs; le Be étant très peu absorbé par la peau. Le Be en milieu de travail se trouve essentiellement sous forme particulaire dans les poudres, les poussières ou encore les fumées. Les travailleurs présentant un très grand potentiel d'exposition sont ceux oeuvrant dans des mines de Be, les fabricants d'alliage de Be, les techniciens de missiles et de réacteurs nucléaires ainsi que les ouvriers rattachés à l'équipement électrique et électronique (NIEHS, 2003).

Les États-Unis furent le premier pays à mettre en place des limites d'exposition en milieu de travail. Avant 1950 et l'implantation de systèmes de contrôle d'émissions, il n'était pas rare de voir les travailleurs exposés à des concentrations élevées de Be pouvant atteindre 1 mg/m³ dans l'air (Eisendud et Lisson, 1983). Les concentrations ont par la suite diminué alors que les travailleurs des usines d'extraction du métal pouvaient être encore exposés à plus de 50 µg/m³ durant les années 60, à plus de 30 µg/m³ durant les années 70 et finalement à moins de 2 µg/m³ à la fin des années 70 (Kriebel et al., 1988). Récemment, une étude a montré qu'environ 134 000 travailleurs des secteurs privé et public étaient potentiellement exposés au Be à travers les États-Unis (Henneberger *et al.* 2004).

La nature de la tâche et les moyens de protection des travailleurs sont également des facteurs pouvant influencer l'exposition. Ainsi les postes de travail et les techniques utilisées pour accomplir différentes tâches seraient importants dans la l'étiologie de la maladie. C'est ainsi que les machinistes présentent un risque d'exposition plus élevé que les autres travailleurs dans les usines utilisant le Be car les procédés de concassage, de sciage et de polissage, génèrent des poussières et des aérosols de petite taille. Certains travaux ont également démontré que dans les fonderies, les concentrations de Be peuvent être élevées, avec des valeurs moyennes d'environ 0,87 µg/m³ (Johnson *et al.* 2001).

En fait, plusieurs facteurs peuvent influencer sur le niveau d'exposition. Les principaux sont reliés au diamètre des particules, à leur nombre, à leur morphologie, à leur forme chimique, à la durée et à la voie d'exposition (Henneberger *et al.* 2001; Kent *et al.* 2001; Kreiss *et al.* 1996; Paustenbach *et al.* 2001).

Hormis les travailleurs affectés à l'extraction et à la production du Be dont l'exposition serait par ailleurs beaucoup mieux contrôlée maintenant, les travailleurs les plus exposés, aujourd'hui, seraient ceux qui font l'usinage des pièces de Be ou d'alliages contenant du Be. Dans certaines fonderies du Québec, plusieurs travailleurs ont été exposés pendant plusieurs années, sans protection, à des niveaux largement supérieurs à la norme.

Par ailleurs, de nombreuses études ont montré que la sensibilisation et la BC peuvent se produire dans des industries où les niveaux d'exposition sont nettement inférieurs à 2 µg/m³ pendant 8 heures (Cullen *et al.* 1987; Kreiss *et al.* 1996; Kreiss *et al.* 1997). Ainsi, il est évident que différents facteurs influent tant sur l'exposition que sur le risque qui en découle.

2.3. Normes et valeurs de référence

La valeur limite de 2 µg/m³ pour l'exposition professionnelle au Be a été retenue par la commission de l'énergie atomique américaine en 1949. Ce n'est qu'en 1959 que cette même valeur a été adoptée par l'*American Conference of Governmental Industrial Hygienists* sous forme de TLV[®] (*Threshold Limit Value*[®]) et par l'Occupational Safety and Health Administration des Etats-Unis (OSHA) en 1972 (Kolanz, 2001).

Au Québec, le Règlement sur la santé et la sécurité du travail édicte les normes d'exposition en milieu de travail pour plusieurs substances. La valeur d'exposition moyenne pondérée (VEMP) pour le Be a été établie à 0,15 µg/m³ en janvier 2007. Avant cette date la valeur limite d'exposition était de 2 µg/m³.

À la fin des années 1980, l'arrivée du test sanguin de prolifération lymphocytaire au Be (BeLPT) ainsi que des moyens de diagnostic plus sophistiqués ont permis d'identifier des cas de sensibilisation et de maladie de façon beaucoup plus précoce.

Des taux d'incidence similaires à ceux qui prévalaient avant l'adoption de la norme, soit environ 2 % des travailleurs exposés, ont été enregistrés (Newman, 1996). Une étude publiée en 2001 notait que l'on avait trouvé des cas de BC qui n'avaient pas été théoriquement exposés à des concentrations de plus de $0,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Stange et al., 2001). Les résultats d'une étude s'échelonnant sur 4 ans ont démontré que les travailleurs soumis à des niveaux de Be supérieurs à $0,01 \mu\text{g}/\text{m}^3$ avaient des valeurs de BeLPT beaucoup plus élevées que les travailleurs exposés à des niveaux inférieurs (Yoshida et al., 1997).

Il est possible d'atteindre et de dépasser la TLV si des particules de matériau contenant du Be sont émises dans l'air, même si la teneur en Be du matériau ou que le taux d'émission des particules est faible. La pertinence de la TLV a donc été remise en question. Certains chercheurs avaient déjà suggéré de la réduire à $0,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Wambach et al., 2000). L'ACGIH (2009) a d'ailleurs adopté un nouveau seuil de $0,05 \mu\text{g}/\text{m}^3$ pour les particules inhalables ($< 100 \mu\text{m}$ de diamètre) alors que le gouvernement du Québec a adopté en 2007 une valeur limite de $0,15 \mu\text{g}/\text{m}^3$ comme valeur d'exposition moyenne pondérée (2007).

2.4. Toxicocinétique

2.4.1. Absorption

L'absorption dans l'organisme se fait principalement par la voie respiratoire suite à l'inhalation de fumée ou de poussières. La déposition dans les poumons dépend de la grosseur des particules (particulièrement le diamètre aérodynamique), de leur forme et de leur solubilité. Pour les composés insolubles, la clairance pulmonaire se fait très lentement et ce qui n'a pas été éliminé rapidement par l'activité mucociliaire ou la phagocytose, est retenu plusieurs mois dans les poumons et graduellement libéré dans le sang. Pour les composés solubles, la clairance pulmonaire se fait rapidement par dissolution dans les fluides pulmonaires et une proportion variable passe dans le sang.

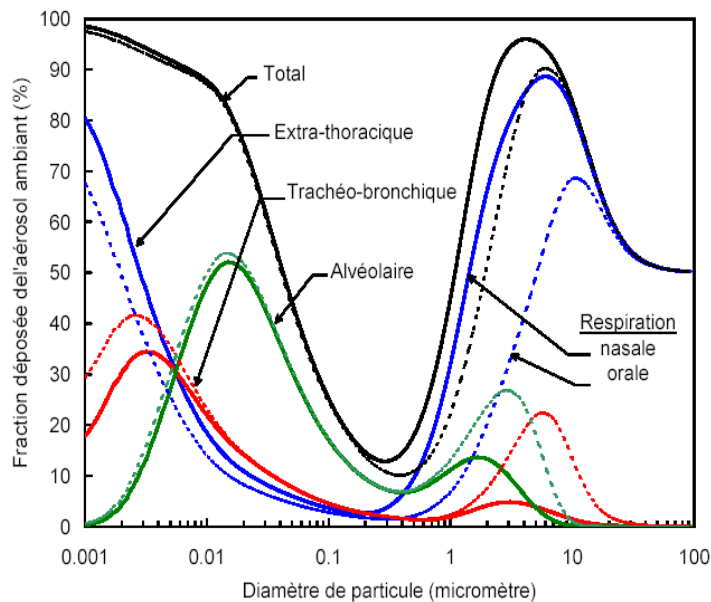
Le Be n'est que très peu absorbé par la peau intacte car il se lie à des constituants de l'épiderme, soit des protéines et acides nucléiques, pour former des complexes peu diffusibles. Cependant on pense que le contact cutané peut jouer un rôle dans la sensibilisation surtout suite à l'exposition à de fines particules. Tinkle et al. (2003) ont montré que de fines particules fluorescentes de dextran ($0,5 \mu\text{m}$ - $1 \mu\text{m}$) en combinaison avec un mouvement de la peau peuvent pénétrer la couche cornée, le derme et l'épiderme de la peau et initier une réponse immunitaire.

Le Be est très faiblement absorbé par la voie digestive, soit moins de 1%. La quantité absorbée dépend de la dose et de la solubilité des composés et est limitée par la formation de phosphate colloïdal insoluble au niveau de l'intestin.

2.4.2. Déposition pulmonaire des poussières chez l'humain

Les poumons constituent la principale voie d'entrée des poussières dans l'organisme humain. Le dépôt des poussières le long de l'arbre pulmonaire varie considérablement en fonction de la granulométrie des poussières et de leur comportement dans l'air. Normalement, pour les poussières plus grossières, la proportion des poussières inhalées se déposant dans les alvéoles augmente avec la diminution du diamètre de la particule pour atteindre des valeurs maximales de l'ordre de 20 % et de 15% pour des particules de 3 μm et de 2 μm respectivement. Ce pourcentage diminue graduellement par la suite. Par contre ce ne sont pas les particules les plus petites qui vont se déposer nécessairement au niveau des alvéoles (IRSST, 2006).

La Figure 1 illustre le taux de déposition dans les différentes régions pulmonaires en fonction de la grosseur des particules. Cette figure illustre clairement qu'aucune particule de 1 nm de diamètre aérodynamique, soit 0,001 μm , n'atteint les alvéoles alors que 80 % se déposent au niveau du nez et du pharynx, les autres 20 % se situant dans la région de la trachée et des bronches. À cette dimension, la rétention des nanoparticules inhalées est de près de 100 % (IRSST, 2006).

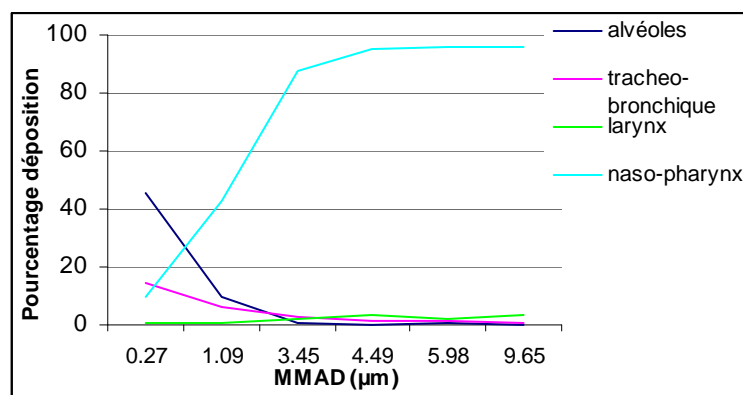


Source : IRSST, 2006

Figure 1 - Prédiction du dépôt total et régional des particules dans les voies respiratoires de l'humain en fonction de la taille des particules.

2.4.3. Déposition pulmonaire des poussières chez la souris

Raabe et al., (1988) ont publié une étude portant sur la déposition pulmonaire d'aérosol monodispersé de particules d'aluminosilicate chez des souris (CF1) de 25 - 35 g, âgées de 10 - 15 semaines. L'étude a démontré une augmentation du taux de déposition dans la région du naso-pharynx pour les particules de 3 μm et plus avec parallèlement une diminution du taux de déposition alvéolaire pour ces mêmes particules. Pour les particules de 10 μm et plus, la déposition alvéolaire est presque nulle alors que la déposition au niveau du naso-pharynx et du larynx est importante (voir figure 2).



Selon les données de Raabe et al., 1988.

Figure 2 - Déposition pulmonaire chez la souris

2.4.4. Distribution

Le Be absorbé est transporté dans l'organisme sur des protéines plasmatiques sous forme de phosphate colloïdal. À court terme, le Be s'accumule dans le foie, surtout dans le cas d'une exposition importante. À long terme, on le retrouve principalement dans les ganglions lymphatiques et les os. Le Be a aussi été identifié dans le sang du cordon ombilical et le sang maternel.

2.4.5. Métabolisme

Le Be n'est pas métabolisé. Au niveau des poumons, les sels solubles de Be sont partiellement transformés en sels insolubles. L'action immunologique semble passer par la formation d'un complexe béryllium-protéine, en raison du faible poids moléculaire du Be.

2.4.6. Excrétion

L'excrétion se fait principalement par voie urinaire pour les composés absorbés dans l'organisme. Pour les composés non absorbés, l'excrétion se fait principalement par les fèces ou par clairance mucociliaire et dépend de la solubilité

des composés. Le Be a aussi été identifié dans le lait et le colostrum. La mobilisation et l'excrétion peuvent continuer pendant plusieurs années et persister très longtemps après l'arrêt de l'exposition.

2.4.7. Demi-vie

Il n'existe pas de données précises chez l'humain. D'après des données animales, la clairance dans le tissu pulmonaire se fait d'une manière biphasique, tant pour les composés insolubles, peu solubles que solubles. Dans un premier temps, 30 à 50 % du Be est éliminé avec une demi-vie de quelques jours. Une seconde phase, qui varie selon le degré de solubilité du Be, suggère que la demi-vie pour les composés solubles est de l'ordre de quelques semaines ou moins tandis qu'elle varie de quelques mois ou années pour les composés peu ou pas solubles. La demi-vie dans le corps entier peut être de plusieurs années.

2.5. Pathologies attribuables au Be

2.5.1. Sensibilisation

Cette phase, caractérisée par la prolifération des lymphocytes sanguins qui réagissent à une exposition au Be (BeLPT), est plus ou moins longue et asymptomatique (Rosenberg, 1993). Ce test peut être effectué sur le liquide prélevé par lavage bronchique (BAL-BeLPT). Certains développeront la maladie même si l'exposition est arrêtée, d'autres pas. La sensibilisation témoigne, notamment, d'une susceptibilité accrue de l'individu à développer la maladie. Dans certains cas, des symptômes et des signes caractéristiques de la béryllose sont présents alors que les tests de sensibilisation demeurent négatifs.

2.5.2. Béryllose chronique

La béryllose chronique (BC) se caractérise par la création de granulomes, couplée à la formation de fibrose interstitielle, les deux résultants d'une réaction immunitaire spécifique au Be. Chez les patients atteints de BC, le Be agirait comme un antigène de classe II et stimulerait la prolifération locale et l'accumulation dans les poumons de cellules CD4+ spécifiques au Be. La découverte de cellules sensibles au Be au niveau du poumon fut un apport non négligeable à la démonstration que la BC est une maladie pulmonaire immunitaire (Rosenberg, 1993).

2.5.3. Béryllose aiguë

La béryllose aiguë traduit l'effet irritant direct du Be sur les muqueuses - dont celles de l'arbre respiratoire - comme sur la peau et s'observe lors d'expositions à des concentrations relativement élevées, même brèves. Au niveau respiratoire, il s'agit d'une pneumonite chimique qui, de nos jours, n'est plus observée en dehors des situations accidentelles (Rosenberg, 1993). La béryllose aiguë est souvent

complètement réversible; elle résulterait d'un processus toxique plutôt qu'immunitaire. Elle se diagnostique au moyen de la radiographie pulmonaire, et par l'évaluation des échanges gazeux pulmonaires, chez des travailleurs exposés à des concentrations élevées de Be. Aucun cas de béryllose aiguë n'aurait été décrit chez des travailleurs dont l'exposition n'a pas été supérieure à 15 µg/m³.

2.5.4. Cancer

Au Québec, le règlement sur la santé et la sécurité du travail classe le Be comme un cancérigène démontré chez l'humain (classe C1). Selon l'*Environmental Protection Agency* des États-Unis (US EPA, 1998) le Be est classé dans la classe B1; cancérigène probable. Le centre international de recherche sur le cancer (CIRC, 1993) l'a plutôt classé comme cancérigène chez l'humain (Groupe 1). Les études animales réalisées chez plusieurs espèces et par différentes voies d'administration ont démontré les propriétés cancérigènes de cette substance (INSPQ, 2004).

2.6. Facteurs de risque

Plusieurs facteurs peuvent influencer la probabilité que les travailleurs développent une pathologie attribuable au Be. Parmi ces facteurs il y a la prédisposition génétique, les types de travail reliés à des procédés industriels différents, les formes chimiques de Be associées à des toxicités différentes, la grosseur des particules et les voies d'exposition (Kolanz, 2001).

2.7. La toxicité à partir des modèles animaux

Plusieurs études animales ont contribué à documenter la toxicité du Be. Celles-ci ont débuté dès 1940 (Vorward, 1950) et ont rapidement démontré les toxicités tant aiguë que chronique du Be (Hyslop *et al.*, 1943). Mais ce sont plutôt les études relativement récentes qui ont montré plusieurs réponses semblables entre les modèles animaux et l'humain.

Ainsi, Barna *et al.* (1981) ont exposé des cochons de guinée à l'oxyde de Be (BeO) par instillation intratrachéale et ont constaté que certaines lignées développaient des granulomes. Hayley *et al.* (1989) ont réalisé des études de toxicité aiguë en exposant des chiens à du BeO et ont observé sporadiquement des réponses positives au BeLPT. Par ailleurs, plusieurs chercheurs ont tenté de développer un modèle avec des rongeurs pour reproduire la BC rencontrée chez l'humain. Ainsi, Votto *et al.* (1987) ont décrit des lésions pulmonaires granulomateuses induites par du sulfate de béryllium (BeSO₄) chez les rats exposés par instillation intratrachéale.

L'Agence américaine de protection de l'environnement a dressé un bilan des études réalisées sur différents modèles animaux et a conclu qu'aucun d'entre eux ne reproduisait exactement la totalité des effets observés chez l'humain (EPA, 1998). Néanmoins, les études les plus récentes réalisées sur des souris suggèrent que cette espèce peut présenter un modèle approprié. Tout d'abord, Huang *et al.* (1992)

ont décrit une granulomatose avec atteinte pulmonaire chez une lignée de souris (A/J) et une légère réponse au BeLPT a été observée. D'autres lignées de souris comme la C3H et la HeJ ont été subséquemment investiguées par Finch *et al.* (1998 et 1996) et par Nikula *et al.* (1997) qui ont observé la présence d'agrégats lymphocytaires et une pneumonie avec granulomatose.

Ces études montrent donc que plusieurs réponses pulmonaires observées chez des souris exposées à des composés de Be sont semblables à celles observées chez l'humain à plusieurs égards (Tableau 1). Il s'agit notamment de la présence de micro-granulomes et d'infiltrats mononucléaires, de la prolifération générale de lymphocytes et d'une accumulation et d'un accroissement spécifiques de lymphocytes T en réaction au Be (Finch *et al.*, 1996). Ce parallèle observé avec la réponse chez l'humain permet aux auteurs de considérer le développement d'un modèle chez la souris, comme étant prometteur et significatif. Ce modèle devait permettre selon eux, non seulement d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires des réponses impliquées dans la BC, mais aussi l'examen de l'influence de la forme physicochimique du Be et du mode d'exposition (Finch *et al.* 1996).

Tableau 1 - Comparaison des réponses entre la BC chez l'humain et chez deux lignées de souris C3H/HeJ et A/J

Réponses	Humains	Souris
Microgranulomes	+	+
Prolifération lymphocytaire	+	+
Accroissement des cellules T	+	+

Adapté de Finch *et al.* 1996

3. Objectifs et hypothèses de recherche

Les objectifs de la recherche sont d'évaluer et de comparer la toxicité du Be en fonction des principales formes chimiques retrouvées dans les industries (Be, BeO et BeAl) et de la taille particulaire. Ces objectifs reposent sur plusieurs hypothèses à savoir : 1) Les différentes formes chimiques de Be et les morphologies variables de ses particules ne représentent pas le même risque potentiel ; 2) le respect des valeurs seuils n'est pas protectrice pour toutes les formes chimiques de Be ni pour toutes les particules de Be indépendamment de leur distribution granulométrique.

4. Méthode de recherche

L'évaluation de la toxicité a été faite à l'aide d'un modèle animal; des souris mâles (C3H/HeJ) âgés de neuf semaines (*The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME*). Tous les protocoles d'expérimentation animale ont été conformes aux règles du CIPA (Comité institutionnel de protection des animaux) de l'université du Québec à Montréal.

Pour chacune des formes chimiques, la toxicité subaiguë a été évaluée à la suite d'une exposition par inhalation (oro-nasale) à des particules fines « F » et totales « T ». À noter que les classes F et T ont été utilisées pour comparer entre eux les deux MMAD (diamètre aérodynamique massique médian ou *mass median aerodynamic diameter*) d'une même forme chimique.

La durée d'exposition pour chacun des groupes a été de 3 semaines comprenant 14 jours d'exposition effective (5j/sem, 6h/j). En dehors de l'exposition, les souris étaient placées dans des cages individuelles et pouvaient manger et boire *ad-libitum*. Ces cages étaient gardées dans des enceintes de sécurité *Canadian Cabinet*, en dépressurisation, et munies de filtre d'entrée d'air de type HEPA.

Au total, 245 souris ont été utilisées. Les souris ont été subdivisées en sept groupes de 35 individus. Un groupe a servi de contrôle, alors que chacun des six autres a été exposé soit à des particules fines (F) soit à des particules totales (T), pour chacune des trois formes chimiques de Be. La taille de l'échantillon a tenu compte d'une déperdition possible de 5 souris/groupe et a reposé principalement sur la nécessité de *pooler* le sang de 3 souris à la fois pour l'évaluation des effets (voir la section à ce propos plus loin dans la méthode).

Le niveau auquel ont été exposées les souris a été dérivé de la seule étude toxicologique sub-chronique ayant été axée sur les effets immunologiques et lymphocytaires. En effet, l'étude de Stiefel *et al.* (1980) a permis d'observer chez le rat une augmentation de l'activité des cellules T à la suite d'une exposition à 500 µg/m³ pendant 10 semaines, 6 hres par jour. Pour dériver un niveau d'exposition pour la souris, il a fallu prendre en compte la différence entre le rat et la souris quant au taux de déposition pulmonaire en fonction de la taille des particules, quant au taux d'inhalation et quant au poids corporel. Ce faisant, le niveau d'exposition cible dérivé auquel les souris ont été exposées est de 250 µg/m³.

4.1. Exposition oro-nasale

Les souris ont été exposées à des particules de Be, BeO et BeAl obtenues auprès du fournisseur Brush Wellman Inc. (Product Stewardship Department) Mayfield Heights, Ohio 44124. Ces particules n'avaient subi aucun traitement avant leur utilisation.

L'exposition a été réalisée à l'aide d'une chambre d'inhalation de 22.8 L pour nez seulement (Modèle 04-1100; Intox Products, Albuquerque, N. Mex) et d'un système d'exposition muni de 48 hublots pour accueillir 48 rats ou souris, tel qu'originellement décrit par Raabe et al (1973).

Les particules de Be ont été générées grâce à un générateur de particules (appareil à lit fluidisé, modèle 3400 TSI Inc., St.-Paul, MN), mélangées à de l'air filtré (HEPA) et distribuées dans la chambre d'inhalation à un débit total de 22 L air/min, soit un taux de 60 changements d'air à l'heure durant l'exposition. Pour l'obtention de particules fines, un réservoir ASME d'acier inoxydable (Model 73, Mc Master-Carr, NJ) a été ajouté au générateur pour jouer le rôle de cyclone.

Les concentrations de Be dans la chambre d'inhalation ont été vérifiées en continue à l'aide d'un moniteur d'aérosol de marque Dust Track (Modèle 8520, TSI Inc.). Cet appareil est un photomètre laser portatif qui mesure en temps réel les particules de poussières entre 0,001 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ et 100 mg/m^3 . Une double vérification a été réalisée par des prélèvements d'air bihebdomadaires. L'échantillonnage a été réalisé à l'aide d'une pompe Gilian (Gilian Corp., West Caldwell, NJ) et d'un dispositif collecteur de particules (cassettes-filtres). Pour la fraction fine, un cyclone Dorr Oliver en nylon 10 mm a été utilisé alors qu'une cassette fermée avec orifice d'entrée de 4 mm a été utilisée pour le Be total. Des filtres d'ester de cellulose mélangé (ECM) (Oméga, M-083700AF) d'un diamètre de 37 mm et d'une porosité de 0,8 μm ont été utilisés. Les pompes ont été calibrées avant et après chaque échantillonnage avec un Gilibrator (Gilian Corp.). Un débit constant de 1,7 L/min a été utilisé pour les particules respirables et un autre de 1,5 L/min pour les particules totales.

La granulométrie des aérosols de la chambre d'inhalation a été déterminée par l'évaluation du diamètre aérodynamique massique médian (MMAD). Elle a été aussi réalisée 1 fois/semaine d'exposition grâce à un impacteur en cascades de sept étages (Marple Personal Cascade impactor, série 290). De plus, pour les particules fines, un échantillonnage a également été réalisé 1 fois/semaine à l'aide du MOUDI (impacteur Uniform Deposit Impactor, modèle 100, MSP Corp., Minneapolis, Minn.) un impacteur à basse pression. Cet impacteur permet la mesure de la distribution en masse en fonction du MMAD entre environ 0,05 μm et 10 μm .

4.2. Sacrifice

Le sacrifice des souris a eu lieu 1 semaine après la fin de l'exposition. De plus, 5 souris par groupe ont été sacrifiées 3 semaines après la fin de l'exposition. Plusieurs tissus (poumon gauche, rate, foie et reins) ont été prélevés puis immédiatement congelés jusqu'à leur analyse pour la détermination de leur teneur en Be. De plus, des échantillons de sang (1 à 2 mL) ont été recueillis au niveau de l'artère fémorale avec une seringue héparinée.

4.3. Détermination du béryllium dans les matrices biologiques

Les analyses de Be dans les différents tissus ont été effectuées par ICP-MS selon deux méthodes développées et implantées dans les laboratoires de l'IRSST et inspirées de Krachler et al. (1996). Pour la détermination du Be métal et de BeAl, les matrices biologiques sont digérées en présence de 6 ml d'un mélange d'acide nitrique et perchlorique (3 : 1). Pour ce faire, les échantillons sont chauffés sur une plaque jusqu'à évaporation complète du mélange d'acide, puis reconstitués dans un volume final de 10 mL d'acide nitrique 1%. Pour le BeO, 500 µL d'acide sulfurique sont ajoutés aux 6 mL du mélange d'acide nitrique et perchlorique (3 : 1) afin d'assurer une solubilisation complète des particules de BeO. Les échantillons sont chauffés sur une plaque jusqu'à évaporation complète du mélange d'acide (sauf l'acide sulfurique qui ne s'évapore pas), puis reconstitués dans un volume final de 14 mL d'acide nitrique 1% (acide sulfurique 1%).

4.4. Évaluation des effets

Après son sacrifice, chaque souris a été évaluée du point de vue de la sensibilité immunologique et de l'inflammation pulmonaire. La sensibilité immunologique a été déterminée par l'utilisation du test de la prolifération lymphocytaire induite par le Be, le BeLPT, *Beryllium lymphocyte proliferation test*; test standard utilisé pour diagnostiquer la BC chez l'humain. Cette analyse a été effectuée sur les cellules de la rate ainsi que sur le lymphocyte infiltré par un lavage bronchoalvéolaire (LAB) des spécimens.

Pour le lavage bronchoalvéolaire, un volume de 5 mL d'eau saline a permis de préparer entre 5 et 8 parties aliquotes d'environ 0,8 – 1 mL chacune. Le lavage a été effectué sur le poumon droit à l'aide de 5 parties aliquotes d'eau saline, injectées successivement par voie intratrachéale et ensuite retirées. Ceci a permis de retirer environ 4 mL. Le liquide obtenu a été centrifugé et le culot cellulaire séparé du surnageant qui a été congelé à -80°C pour analyses futures. Ensuite, le culot cellulaire a été remis en suspension avec un médium complet (RPMI 1640 avec 20% de sérum fœtal de bovin, pénicilline / streptomycine, 1-glutamine et HEPES).

Les cellules ont été mises en culture à une concentration de $2,5 \times 10^4$ /mL dans les plaques 96 puits. Le LBA ou les cellules de la rate ont été cultivés avec un médium à trois doses de BeSO₄ (1 mM, 10 mM et 100 mM), tout en conservant les protocoles standards pour le diagnostic clinique de la BC. Un contrôle positif de Concanavalin A (CON A) a également été inclus. Toutes les opérations ont été effectuées en triplicata. Les cellules ont été cultivées dans un incubateur humidifié à 37°C, 5% de CO₂ pour une durée de 6 jours. Au 5^{ième} jour, 1µCi/mL de thymidine tritiée (3[H]thy) a été ajouté et les cellules ont été incubées pendant 18 heures. La prolifération cellulaire a été mesurée par l'ajout de thymidine tritiée utilisant une récolte automatisée et un compteur beta-scintillation effectuant une lecture par minute (CPM) de 3[H] thy.

Un indice de stimulation a été calculé par la mesure du CPM (comptage par minute) ou SI (Index de stimulation, égal au ratio des CPM des cellules stimulées par rapport à celles non stimulées) et les échantillons contrôles, se référant au protocole pf du Department of Energy, US Government (disponible sur le site internet : <http://tis-nt.eh.doe.gov/be/>). Un index stimulateur de ≥ 3 est considéré positif pour la sensibilisation au BeSO₄.

Les lymphocytes obtenus à partir des cellules de la rate ont été cultivés *in vitro* et également exposés à une solution de sulfate de Be pour stimuler leur prolifération. Les études ont démontré que seuls les sels de Be dont les concentrations peuvent varier entre 0,1 et 100 μM , et non les sels des autres métaux stimulent la prolifération des lymphocytes. L'utilisation de la thymidine tritiée a donc permis d'augmenter les performances du test. Le comptage par un appareil de scintillation mesure l'incorporation des précurseurs de l'ADN marqués d'un radionucléide et constitue un indicateur de la prolifération des cellules. Le BeLPT permet donc la détection de la sensibilisation et a également été préconisé comme outil de dépistage de la BC car il permet d'identifier des personnes à risque avant même qu'elles ne développent des symptômes.

Suite au lavage bronchoalvéolaire, le poumon droit a été dilaté avec un fluide OCT (*Optimal Cutting Temperature*) et le poumon divisé en sections. Une partie a été mise dans du papier paraffine et l'autre partie congelée à -80°C . La partie qui a été placée dans le papier paraffine a été coupée en sections qui ont été colorées avec de l'hématoxyline et de l'éosine ou colorées au mélange giemsa pour les éosinophiles. Ces coupes histologiques ont ensuite été examinées et classées en termes de présence de granulomes, d'inflammation de cellules infiltrées, de dépôts de collagène et de fibrose pulmonaire. La partie congelée qui a été conservée a aussi été découpée et ses coupes ont été marquées par immunocytochimie pour la présence de CD4+ lymphocytes-T, CD8 + lymphocytes-T, CD19 et l'interféron gamma (INF- γ).

4.5. Analyse statistique

Les résultats de nature quantitative sont présentés dans les tableaux et les figures à l'aide de moyennes et d'écart types (SD). Dans les figures, les barres verticales représentent un écart type. Les résultats de nature qualitative sont tout simplement présentés à l'aide de pourcentages.

Pour les paramètres de nature quantitative, la comparaison des groupes a été réalisée à l'aide d'analyses de variances à un facteur. À la suite d'une analyse de variance significative, des contrastes comparant deux groupes ont été estimés et testés à l'aide de la procédure de Tukey afin de contrôler la probabilité globale de commettre une erreur de première espèce. Les pré-suppositions de base, telles la normalité des valeurs résiduelles et l'homoscédasticité de la variance ont été

vérifiées à l'aide des tests de Shapiro-Wilk et de Levene et aucun résultat n'a été significatif.

Le seuil de signification a été fixé à 0,05 pour tous les tests. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du progiciel SPSS de SPSS Inc., 233 South Wacker Drive, Chicago, IL, USA.

5. Résultats

5.1. Concentrations et caractéristiques du béryllium

Les concentrations obtenues dans la chambre d'inhalation (Tableau 2) sont près de la concentration cible de 250 µg/m³. Les valeurs de température et d'humidité relative obtenues sont respectivement entre 22-25°C et 25-40 %.

Les MMAD obtenus pour les différentes formes chimiques varient entre 0,4 µm et 6,5 µm (Tableau 2). Par ailleurs, contrairement aux attentes et considérant que les MMAD obtenus pour le BeO-F et BeO-T sont identiques et compris exclusivement dans la fraction fine, les données obtenues pour cette forme chimique seront désormais regroupées dans la présentation de l'ensemble des résultats. Par ailleurs, à des fins de validation, les poussières de BeO-F ont été analysées par microscopie électronique. Les résultats sont présentés en annexe 1. Ceux-ci convergent avec l'analyse des données obtenues par les impacteurs et qui permet notamment de considérer comme plausible l'hypothèse d'une population bi-modale de particules dont les grosses particules sont distribuées suivant une fonction lognormale polydisperse.

Tableau 2 - Concentrations moyennes de Be et MMAD

Formes chimiques	Densité	MMAD (µm ± SD) (n=5)	Concentration (µg/m ³ ± SD) (n=5)
Be-T	1,85	4,1 ± 0,71	285 ± 32
Be-F	1,85	1,5 ± 0,12	254 ± 31
BeO-T	3,01	0,4 ± 0,14	267 ± 27
BeO-F	3,01	0,4 ± 0,03	248 ± 10
BeAl-T	2,30	6,5 ± 1,96	275 ± 08
BeAl-F	2,30	4,4 ± 1,64	253 ± 49

De tels diamètres particuliers entraînent des taux de déposition pulmonaire chez la souris et chez l'humain qui sont passablement différents (Tableau 3). On remarquera que contrairement à la grande variabilité chez la souris, les taux de déposition chez l'humain varient relativement faiblement, soit de 5% à 15%.

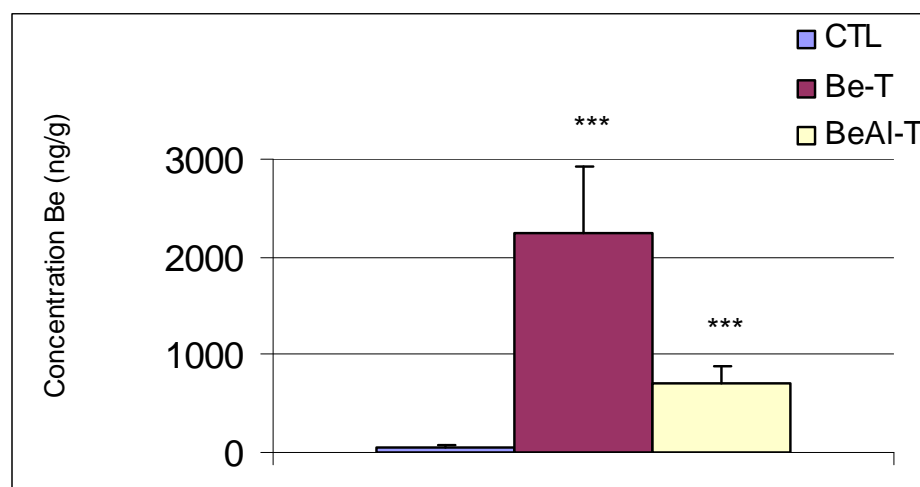
5.2. Concentrations tissulaires et sanguines

Toutes les concentrations tissulaires présentent des différences significatives entre le groupe contrôle et les groupes exposés. Pour ne pas surcharger les figures, ces différences n'ont pas été illustrées. Les figures 3, 4, 5 et 6 présentent les concentrations tissulaires de Be pour les groupes exposés et le groupe contrôle.

Tableau 3 - Pourcentage de déposition pulmonaire en fonction du MMAD

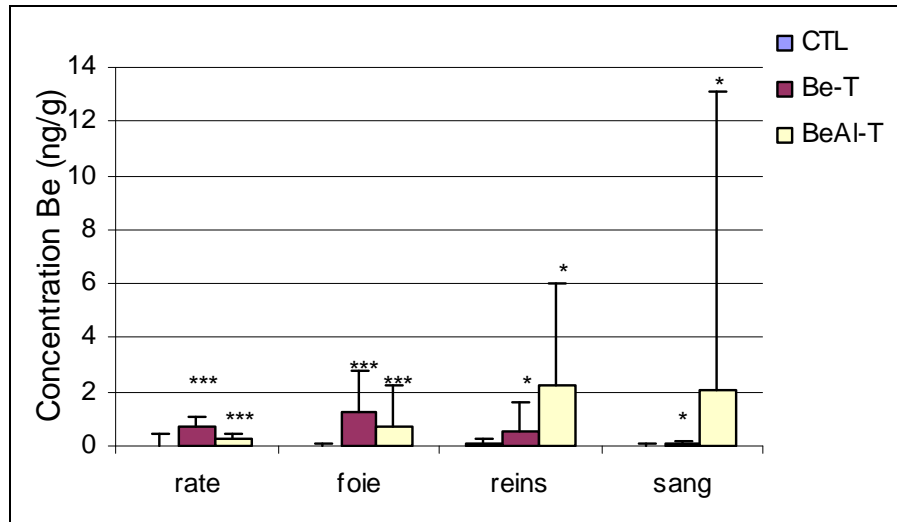
Forme chimique	MMAD (µm)	Taux de déposition pulmonaire chez la souris (%)*	Taux de déposition pulmonaire chez l'humain (%)*
Be-T	4,1	0,5	10
Be-F	1,5	11	15
BeO-F	0,4	40	8
BeAl-T	6,5	0,25	5
BeAl-F	4,4	0,4	9

Taux établis à partir des données de Raabe *et al.*, 1988 et IRSST, 2006.



*** Différence significative ($p < 0,001$)

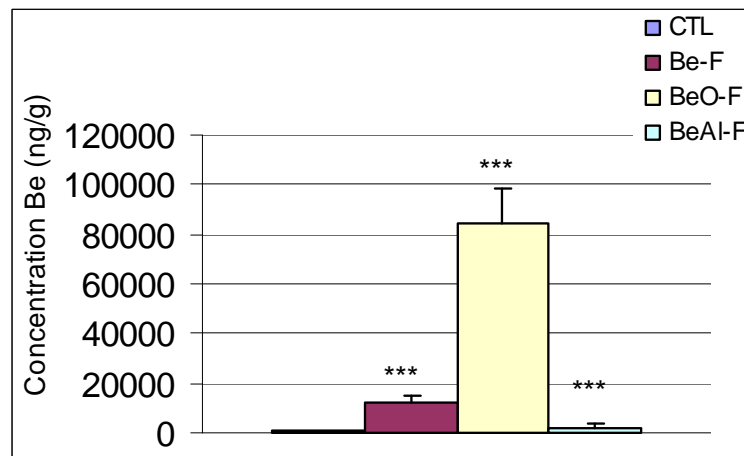
Figure 3 - Concentrations pulmonaires moyennes (\pm SD) de béryllium chez des souris exposées au Be-T et au BeAl-T comparativement au groupe contrôle (n=15/groupe)



*** Différence significative ($p < 0,001$)

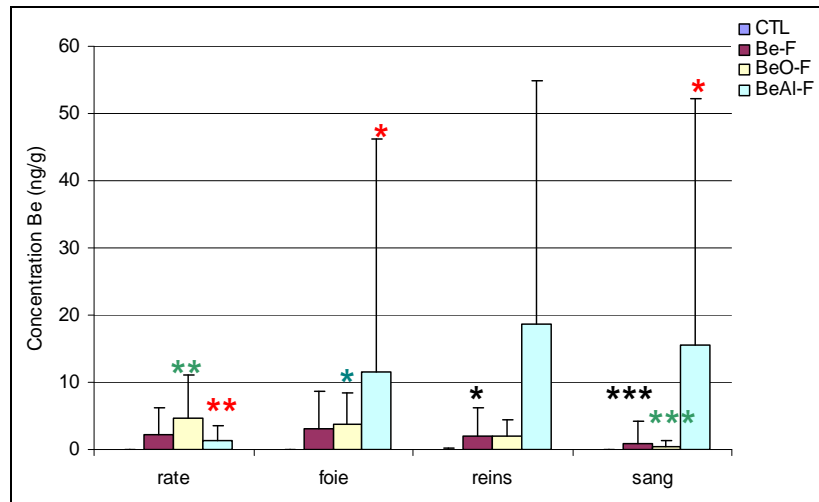
* Différence significative ($p < 0,05$)

Figure 4 - Concentrations moyennes (\pm SD) de béryllium dans le sang ($n=30$) et les tissus (rate $n=15$, foie $n=30$, reins $n=30$) chez des souris exposées au Be-T et au BeAl-T comparativement au groupe contrôle



*** Différence significative ($p < 0,001$) entre tous les groupes

Figure 5 - Concentrations pulmonaires moyennes (\pm SD) de béryllium chez des souris exposées au Be-F ($n=15$), au BeO-F ($n=30$) et au BeAl-F ($n=15$) comparativement au groupe contrôle

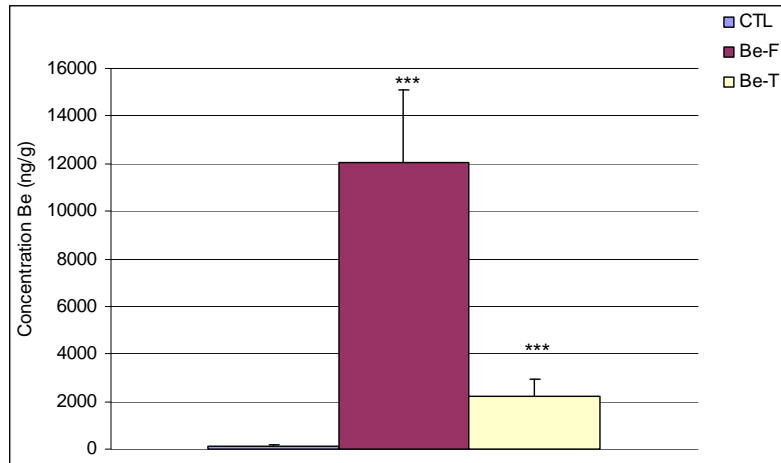


- * Différence significative ($p < 0,05$) avec Be-F
- ** Différence significative ($p < 0,01$) avec Be-F
- * Différence significative ($p < 0,05$) avec BeAl-F
- ** Différence significative ($p < 0,01$) avec BeAl-F
- *** Différence significative ($p < 0,001$) avec BeAl-F
- * Différence significative ($p < 0,05$) avec BeO-F
- *** Différence significative ($p < 0,001$) avec Be-F

Figure 6 - Concentrations moyennes (\pm SD) de béryllium dans le sang ($n=30$ pour Be-F et BeAl-F, $n=60$ pour BeO-F) et les tissus (rate $n=15$ pour Be-F et BeAl-F, $n=30$ pour BeO-F, foie et reins $n=30$ pour Be-F et BeAl-F, $n=60$ pour BeO-F) chez des souris exposées au Be-F, au BeO-F et au BeAl-F comparativement au groupe contrôle

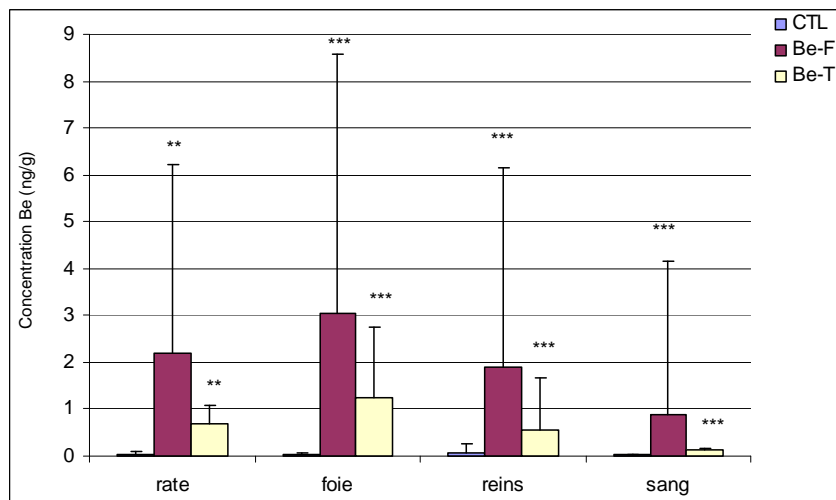
Un des résultats les plus intéressants obtenus ici concerne les concentrations pulmonaires des différentes formes chimiques de Be pour leur fraction fine. En effet, le taux de déposition pulmonaire théorique beaucoup plus élevé pour le groupe exposé au BeO est en quelque sorte confirmé par une concentration pulmonaire beaucoup plus élevée comparativement aux deux autres groupes.

Les figures 7, 8, 9 et 10 présentent les concentrations tissulaires entre les différentes tailles particulières, soit totale et fine pour les groupes de souris exposées au Be et au BeAl. Ces résultats témoignent du rôle prépondérant de la taille dans leur absorption et leur accumulation dans différents tissus. Nous les retrouvons essentiellement dans les poumons, à des niveaux au moins dix fois plus élevés qu'ailleurs.



*** Différence significative ($p < 0,001$)

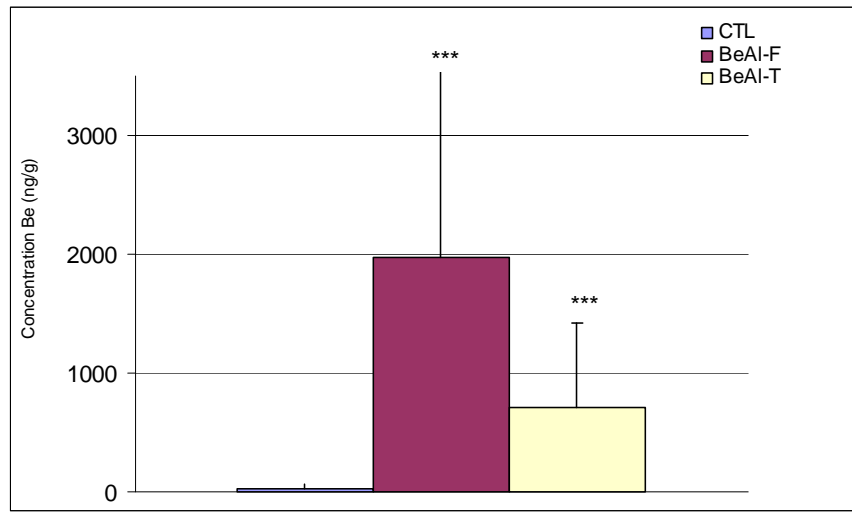
Figure 7 - Concentrations pulmonaires moyennes (\pm SD) de béryllium chez des souris exposées au Be-F et au Be-T comparativement au groupe contrôle (n=15/groupe)



*** Différence significative ($p < 0,001$)

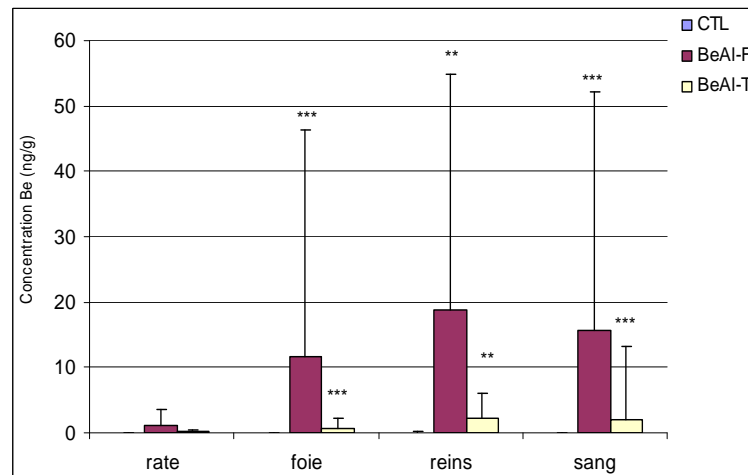
** Différence significative ($p < 0,01$)

Figure 8 - Concentrations moyennes (\pm SD) de béryllium dans le sang (n=30) et les tissus (rate n=15, foie n=30, reins n=30) chez des souris exposées au Be-F et au Be-T comparativement au groupe contrôle



*** Différence significative ($p < 0,001$)

Figure 9 - Concentrations pulmonaires moyennes (\pm SD) de béryllium chez des souris exposées au BeAl-F et au BeAl-T comparativement au groupe contrôle (n=15/groupe)



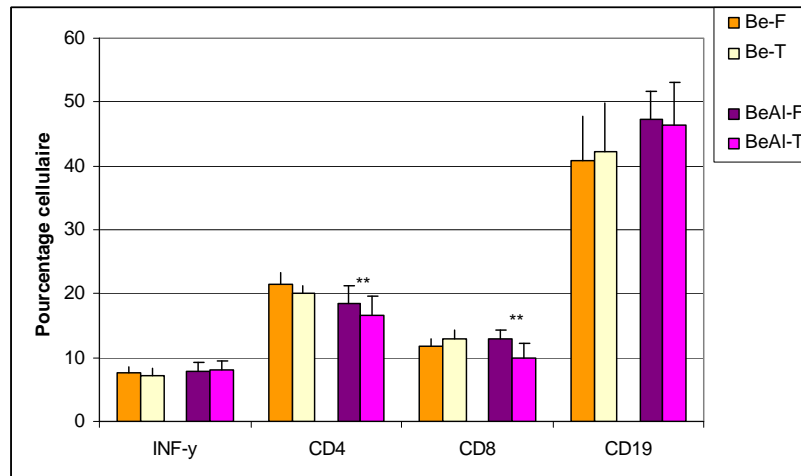
*** Différence significative ($p < 0,001$)

** Différence significative ($p < 0,01$)

Figure 10 - Concentrations moyennes (\pm SD) de béryllium dans le sang (n=30) et les tissus (rate n=15, foie n=30, reins n=30) chez des souris exposées au BeAl-F et au BeAl-T comparativement au groupe contrôle

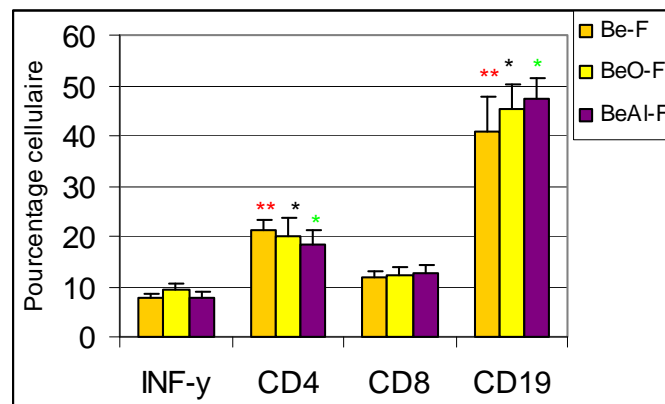
5.3. Cytométrie en flux

Les profils phénotypiques des lymphocytes de la rate entre différents groupes de souris sont représentés aux figures 11 et 12 par l'expression des CD4+, CD8+, IFN- γ , et CD19.



** Différence significative ($p < 0,01$) entre le BeAl-F et BeAl-T

Figure 11 - Profils comparatifs des lymphocytes de la rate (n= 7/groupe) des souris exposées au Be-F, au Be-T, au BeAl-F et BeAl-T
Pourcentage cellulaire (\pm SD)



** Différence significative ($p < 0,01$) avec BeAl-F

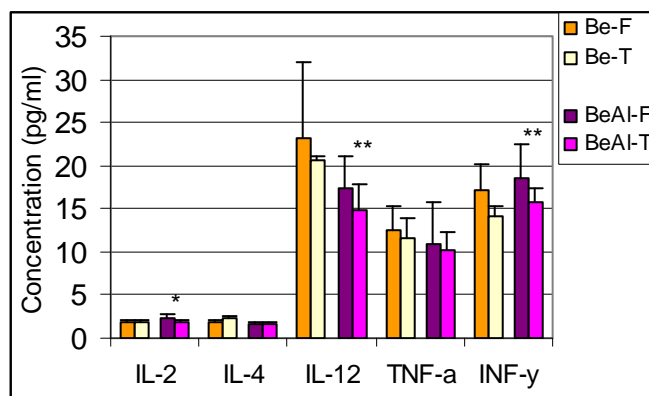
* Différence significative ($p < 0,05$) avec Be-F

* Différence significative ($p < 0,05$) avec BeO-F

Figure 12 - Profils comparatifs des lymphocytes de la rate des souris exposées au Be-F (n=7), au BeO-F (n=14) et au BeAl-F (n=7)
Pourcentage cellulaire (\pm SD)

5.4. Cytokines

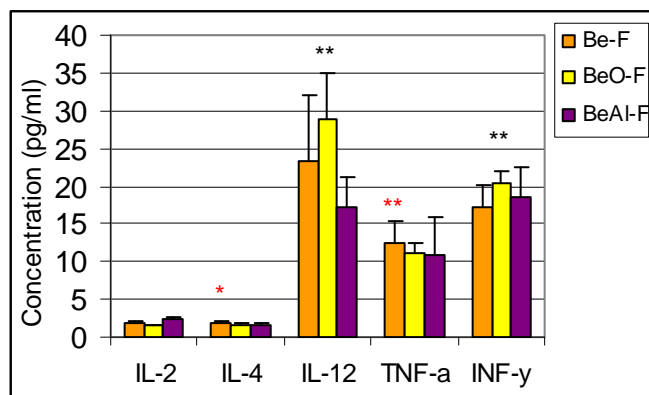
La mesure des cytokines (IL-2, IL-4, IL-12, TNF- α et IFN- γ) a été réalisée par le test ELISA sur les cellules du lavage broncho alvéolaire (LBA) des souris. La figure 13 présente les concentrations de cytokines dosées chez le groupe contrôle comparativement aux groupes exposés au Be et au BeAl. La figure 14 présente les différences entre les résultats relatifs au groupe contrôle et ceux obtenus chez les souris exposées aux particules fines de Be, de BeO et de BeAl.



** Différence significative ($p < 0,01$) entre le BeAl-F et BeAl-T

* Différence significative ($p < 0,05$) entre le BeAl-F et BeAl-T

Figure 13 - Concentrations moyennes (\pm SD) de cytokines chez les souris ($n=7$ /groupe) exposées au Be-F, au Be-T, au BeAl-F et BeAl-T



** Différence significative ($p < 0,01$) avec Be-F et BeAl-F

** Différence significative ($p < 0,01$) avec BeO-F et BeAl-F

* Différence significative ($p < 0,05$) avec BeO-F et BeAl-F

Figure 14 - Concentrations moyennes (\pm SD) de cytokines chez les souris exposées au Be-F ($n=7$), au BeO-F ($n=14$) et au BeAl-F ($n=7$)

5.5. Coupes histologiques et score inflammatoire

Les figures 15, 16 et 17 représentent les coupes histologiques effectuées sur les poumons des souris exposées aux différentes formes chimiques de Be (particules fines et totales) et sacrifiées 1 ou 3 semaines après la fin de l'exposition.

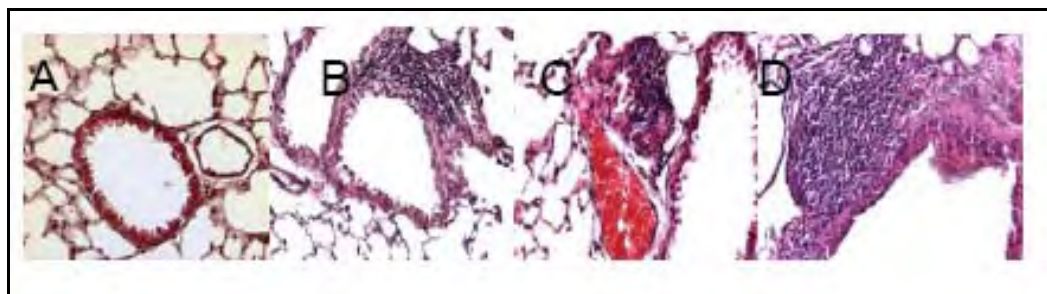


Figure 15 - Coupes histologiques du poumon de souris (n=8/groupe) exposées au Be

A: groupe contrôle, B: souris exposées au Be-F et sacrifiées 1 semaine après la fin de l'exposition, C: souris exposées au Be-T et sacrifiées 1 semaine après la fin de l'exposition, D: souris exposées au Be-F et sacrifiées 3 semaines après la fin de l'exposition.

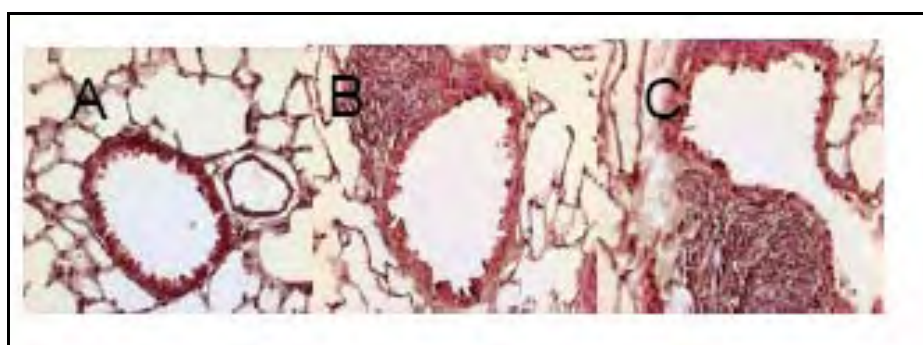


Figure 16 - Coupes histologiques du poumon de souris (n=16/ groupe) exposées au BeO

A: groupe contrôle, B: souris exposées au BeO-F et sacrifiées 1 semaine après la fin de l'exposition, C: souris exposées au BeO-F et sacrifiées 3 semaines après la fin de l'exposition.

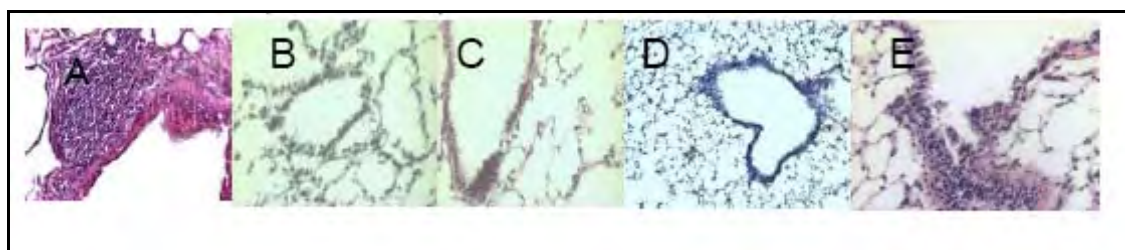


Figure 17 - Coupes histologiques du poumon de souris (n=8/groupe) exposées au BeAl

A: groupe contrôle, B: souris exposées au BeAl-T et sacrifiées 1 semaine après la fin de l'exposition, C: souris exposées au BeAl-F et sacrifiées 1 semaines après la fin de l'exposition, D: souris exposées au BeAl-T et sacrifiées 3 semaines après la fin de l'exposition, E: souris exposées au BeAl-F et sacrifiées 3 semaines après la fin de l'exposition.

Les tableaux 4 et 5 présentent les scores histologiques attribués par 2 observateurs à l'aveugle, pour les souris sacrifiées 1 semaine et 3 semaines après la fin de l'exposition.

Tableau 4 - Score histologique de l'inflammation pulmonaire chez les souris (n=8/groupe) sacrifiées 1 semaine après la fin de l'exposition

1: pas d'inflammation, 2: inflammation légère, 3: inflammation modérée, 4: inflammation sévère

	1	2	3	4
CTL	95,5%	4,5%	0	0
Be-F	0	54,5%	45,5%	0
Be-T	22,7%	68,2%	9,1%	0
BeO-F	22,7%	63,6%	13,6%	0
BeAl-F	44,4%	55,6%	0	0
BeAl-T	61,1%	38,9%	0	0

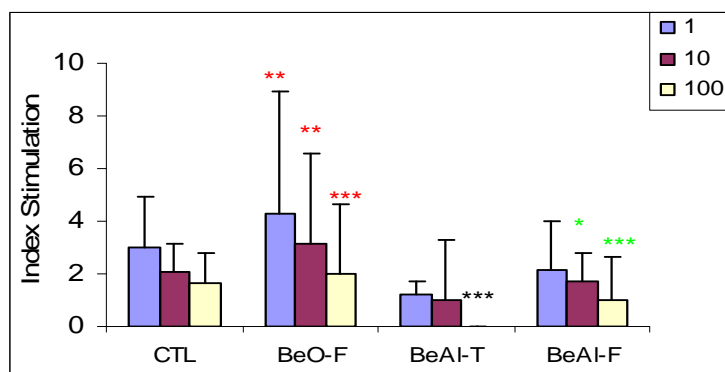
Tableau 5 - Score histologique de l'inflammation pulmonaire chez les souris (n=5/groupe) sacrifiées 3 semaines après la fin de l'exposition

1: pas d'inflammation, 2: inflammation légère, 3: inflammation modérée, 4: inflammation sévère

	1	2	3	4
CTL	91,7%	8,3%	0	0
Be-F	0	29,4%	70,6%	0
BeO-F	0	75%	25%	0
BeAl-F	0	77,80%	22,20%	0
BeAl-T	0	100%	0	0

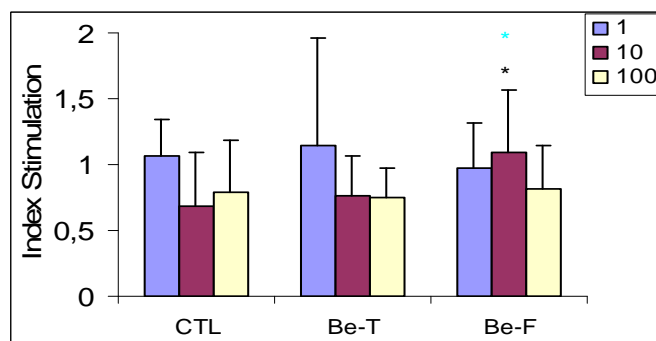
5.6. Tests de prolifération lymphocytaires

Les lymphocytes obtenus des cellules de la rate ont été cultivés *in vitro* et également mis en présence d'une solution de sulfate de Be pour stimuler leur prolifération. Les résultats présentés à la figure 18 montrent que l'index de stimulation est généralement plus élevé à une concentration de 100 µM; l'index est plus élevé chez les souris exposées au BeO-F comparativement au BeAl. Les résultats présentés à la figure 19 témoignent que l'index obtenu chez les souris dont les cellules ont été traitées à 10 µM est plus élevé chez le groupe Be-F comparativement au groupe contrôle et au Be-T.



- *** Différence significative ($p < 0,001$) entre le CTL et BeAl-T (100 µM BeSO₄)
- *** Différence significative ($p < 0,001$) entre BeO-F et BeAl-F (100 µM BeSO₄)
- ** Différence significative ($p < 0,01$) entre BeO-F et BeAl-F (1 et 10 µM BeSO₄)
- *** Différence significative ($p < 0,001$) entre le BeAl-F et BeAl-T (100 µM BeSO₄)
- * Différence significative ($p < 0,05$) entre BeAl-F et BeAl-T (10 µM BeSO₄)

Figure 18 - BeLPT effectué à partir des cellules de la rate des souris du groupe contrôle et des souris exposées au BeO-F (n=16), au BeAl-T (n=8) et au BeAl-F (n=8)
Index de stimulation (± SD)



- * Différence significative ($p < 0,05$) entre CTL et Be-F (10 µM BeSO₄)
- * Différence significative ($p < 0,05$) entre Be-T et Be-F (10 µM BeSO₄)

Figure 19 - BeLPT effectué à partir des cellules de la rate des souris du groupe contrôle (n=8) et des souris exposées au Be-T (n=8) et au Be-F (n=8)
Index de stimulation (± SD)

6. Discussion

Plusieurs facteurs de risques sont impliqués dans la toxicité du Be, tant pour la réaction de sensibilisation que pour le développement de la BC (Kolanz, 2001). La dose à laquelle les travailleurs sont exposés, la durée de cette exposition, la susceptibilité génétique ainsi que la forme chimique et la taille des particules du Be sont les facteurs de risque les plus fréquemment évoqués pour expliquer les atteintes pulmonaires (Henneberger *et al.*, 2001; Kent *et al.*, 2001; Maier *et al.*, 2003).

La forme chimique et la taille des particules joueraient un rôle important au niveau de la déposition pulmonaire (Stefaniak *et al.*, 2005; Rouleau *et al.*, 2005). La rétention du Be dans le poumon, dû entre autres à son caractère soluble ou non, peut exercer un rôle important dans le développement et la persistance d'inflammation granulomateuse (Salehi *et al.*, 2009). En fait, les effets spécifiques se traduisent, entre autres, par la formation de granulomes inflammatoires pulmonaires, par la prolifération de lymphocytes T et la production de cytokines de types Th1 (Amicosante *et al.*, 2006; Fontenot *et al.*, 2002).

L'importance de la forme chimique et de la taille des particules du Be sur sa toxicité a été évaluée par la présente recherche. Celle-ci est d'ailleurs la première étude subchronique en toxicologie d'inhalation (oro nasale) réalisée sur un modèle animal (souris). Cette voie d'exposition aura certainement permis de réduire au minimum l'absorption de Be par les voies cutanée et gastro-intestinale.

Les résultats obtenus témoignent que la diminution du diamètre des particules entraîne une augmentation de l'accumulation dans les différents tissus et semblent conséquemment plus toxiques que les particules totales. Les concentrations tissulaires de Be (poumons, rate, foie, reins et sang) sont significativement supérieures chez les souris exposées aux particules fines. Les particules les plus grosses se déposent principalement au niveau de la trachée et des bronches. Elles sont ensuite éliminées par le mécanisme mucociliaire où les muqueuses de la trachée et des bronches sont recouvertes de cellules ciliées, forment un ascenseur et repoussent le mucus contenant les particules vers le système digestif (IRSST, 2006).

En fonction des MMAD obtenus, 11% et 0,4% des particules de Be-F et de BeAl-F respectivement devraient théoriquement se déposer au niveau pulmonaire comparativement à seulement 0,5% et 0,25% pour le Be-T et le BeAl-T. Quant aux particules de BeO (0,41 μ m), c'est environ 40% des particules qui devraient se déposer au niveau pulmonaire. En fait, comme l'illustre la figure 20, les concentrations pulmonaires obtenues sont nettement en relation avec les MMADs. Ces derniers présentent également une faible relation avec les scores inflammatoires chez les souris sacrifiées 1 semaine après la fin de l'exposition. En

effet, l'inflammation pulmonaire semble être plus faible quand le MMAD est plus grand.

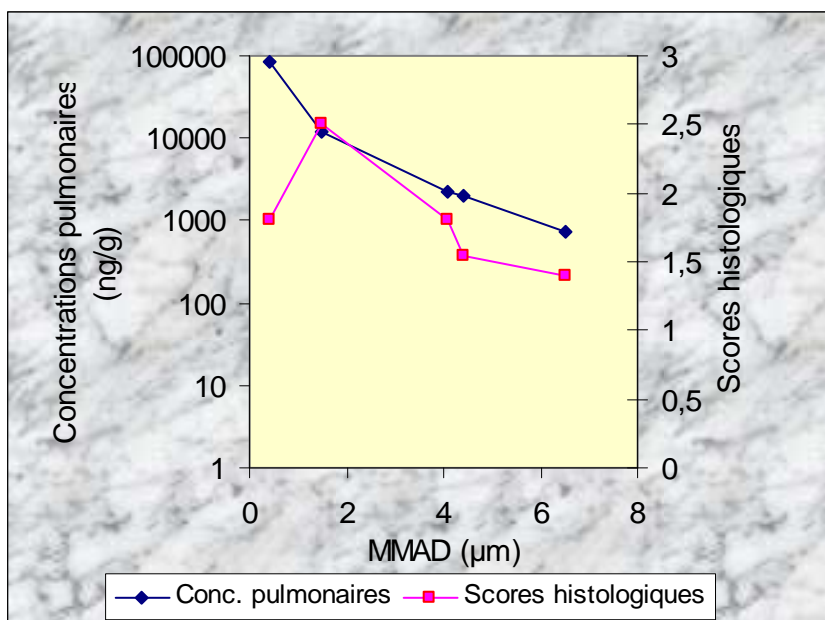


Figure 20 - Les concentrations pulmonaires et les scores inflammatoires en fonction du diamètre aérodynamique massique médian

Par ailleurs, les souris sacrifiées 3 semaines après la fin de l'exposition présentent une inflammation pulmonaire plus sévère que celles sacrifiées 1 semaine après la fin de l'exposition. En effet, le score 3 de l'inflammation pulmonaire a été obtenu chez 45,5 % et 0 % (tableau 4) des souris exposées respectivement au Be-F et au BeAl-F et sacrifiées 1 semaine après la fin de l'exposition. Pour les souris sacrifiées 3 semaines après la fin de l'exposition, le score 3 obtenu chez les souris exposées aux mêmes formes chimiques et physiques de Be est de 70,6% et de 22,20% respectivement (tableau 5). Cet aspect revêt une grande importance puisqu'il témoigne que l'effet (ou du délai dans la mesure de la réponse) du Be se poursuit même après la cessation de l'exposition.

La production des cytokines IL-2, IL-12 et IFN- γ est elle aussi significativement supérieure chez les souris exposées au BeAl-F comparativement au BeAl-T en dépit d'une faible différence dans la taille granulométrique de leurs particules (figure 13). On observe une différence similaire entre ces deux groupes de souris pour leur profil phénotypique des lymphocytes de la rate, alors que les pourcentages de CD4+ et de CD8+ sont significativement supérieurs chez les souris exposées au BeAl-F.

L'importance de la forme chimique ressort également dans cette étude tant pour les particules fines que totales. Les concentrations tissulaires du poumon des souris exposées au Be-F, au Be-T et au BeO-F sont significativement supérieures comparativement à celles exposées au BeAl-T.

Parallèlement, la concentration sanguine est significativement supérieure chez les souris exposées au BeAl-T ou au BeAl-F comparativement à celles exposées au Be-F et au BeO-F. Ceci est peut-être dû au caractère peu soluble du BeAl comparativement au caractère non soluble du Be ou du BeO. Ainsi, les particules de BeAl auraient tendance à migrer plus facilement dans le sang et par conséquent à moins s'accumuler au niveau des poumons.

En fait, la clairance pulmonaire pour les composés non solubles se fait très lentement et ce qui n'a pas été éliminé rapidement par l'activité mucociliaire ou la phagocytose des particules, peut être retenu plusieurs mois dans les poumons et graduellement libéré dans le sang. Pour les composés solubles, la clairance se fait plus rapidement par dissolution dans les fluides pulmonaires et une proportion variable passe dans le sang (IRSST, 2006).

De plus, le MMAD moyen de 4,1 μm obtenu pour le Be-T peut expliquer en partie sa concentration pulmonaire supérieure comparativement au BeAl-T. En effet, le taux de déposition pulmonaire estimé est de l'ordre de 0,5% pour le Be-T alors qu'il est 0,25 % pour le BeAl-T. Par conséquent, les souris exposées au Be-T obtiennent un score inflammatoire supérieur et ce tant pour les souris sacrifiées 1 semaine ou 3 semaines après la fin de l'exposition.

Ceci est en accord avec les résultats de Finch et ses collègues qui ont indiqué que l'infiltration interstitielle pulmonaire est une réaction dose dépendante et que la sévérité des lésions pulmonaires augmentent avec le temps et la charge pulmonaire (Finch *et al.*, 1998).

Quant aux cytokines, les souris exposées au Be-F expriment significativement plus de CD4+, de TNF- α et de IL-4 et moins de CD19 que les souris exposées au BeO-F et BeAl-F (Figures 13 et 14). Les concentrations d'IL-12 et INF- γ sont supérieures chez les souris exposées au BeO-F alors que les concentrations d'IL-4 et de TNF- α sont supérieures chez les souris exposées au Be-F et au BeAl-F.

Le taux de déposition pulmonaire des particules de BeO (près de 40%) peut expliquer les effets qui y sont associés alors que le caractère non-soluble et la rétention pulmonaire de 11% du Be peuvent expliquer sa toxicité. Au niveau alvéolaire, les macrophages vont prendre en charge des particules insolubles par un mécanisme de phagocytose dont l'efficacité est fortement dépendante de la forme chimique et de la taille de la particule. Plusieurs études semblent d'ailleurs démontrer que les particules ultrafines non agglomérées déposées dans les alvéoles ne sont pas phagocytées de façon efficace par les macrophages, ceux-ci étant par contre très efficaces dans le domaine de 1 à 3 μm (IRSST, 2006).

En fait, plus une particule qui atteint les alvéoles est hydrosoluble, plus elle se dissout dans les muqueuses qui tapissent les alvéoles. Lorsqu'il y a dissolution dans

le mucus, il y a une plus grande possibilité de phagocytose ou de contact avec les cellules de type I et II pour favoriser la transcytose (translocation épithéliale). Les molécules insolubles dans le mucus auront un temps de résidence alvéolaire potentiellement très long contrairement aux particules solubles dans l'eau qui peuvent être phagocytées (selon la taille) ou traverser l'épithélium alvéolaire par transcytose (Oberdörster *et al.*, 2007).

En examinant les résultats plus spécifiques obtenus chez les souris exposées au Be-F, au BeO-F et au BeAl-F, nous obtenons un certain nombre de corrélations (Tableau 6).

Tableau 6 - Corrélations entre les concentrations tissulaires, les concentrations des cytokines et l'expression cellulaire de la rate pour les souris exposés aux Be-F, au BeO-F et au BeAl-F

Concentration des tissus	Concentration des cytokines	r	p
Poumon	IL-12	0,615	0,002 (n=23)
	IFN- γ	0,573	0,008 (n=20)
Sang	IL-2	0,543	0,000 (n=47)
Rate	IL-12	0,602	0,000 (n=31)
Concentration des tissus	Expression cellulaire	r	p
Poumon	INF- γ	0,518	0,003 (n=31)
	CD4+	0,424	0,016 (n=32)
Sang	CD8+	0,482	0,000 (n=96)
Rate	INF- γ	0,452	0,006 (n=36)
Concentration des cytokines	Expression cellulaire	r	p
IL-12	INF- γ	0,467	0,000 (n=62)
	CD4+	0,448	0,000 (n=64)

En considérant les corrélations obtenues entre les concentrations tissulaires et les cytokines, l'IL-12 est corrélé avec les concentrations en Be du poumon, de la rate et du foie. Par ailleurs, si on se réfère à la figure 13 on voit que la concentration d'IL-12 augmente chez les souris exposées et ces résultats sont significativement différents de ceux obtenus chez les souris exposées au BeAl-F comparativement au BeAl-T. D'après la figure 14, la concentration d'IL-12 est significativement supérieure chez

les souris exposées au BeO-F comparativement à celles exposées au Be-F et au BeAl-F. Cette concentration pulmonaire d'IL-12 est en lien avec la concentration de CD4 pulmonaire, qui d'après la figure 12 est significativement supérieure chez les souris exposées au Be-F comparativement à celles exposées au BeO-F et BeAl-F.

Enfin, il serait intéressant de diriger cette discussion vers l'appréciation du risque chez les travailleurs. Dans un premier temps, le niveau d'exposition utilisé dans la présente étude $250 \mu\text{g}/\text{m}^3$ peut être extrapolé à l'humain en utilisant l'équation suivante :

Facteur d'extrapolation: $(VE / S_{\text{A}}\text{PU})_{\text{animal}} / (VE / S_{\text{A}}\text{PU})_{\text{humain}}$

VE : Taux de ventilation

$S_{\text{A}}\text{PU}$: Aire de surface pulmonaire

Ainsi, le niveau d'exposition pour l'humain correspondrait à :

Concentration utilisée X facteur d'extrapolation, soit

$$250 \mu\text{g}/\text{m}^3 \times (0,052 \text{ m}^3/\text{j} / 0,295 \text{ m}^2) / (20 \text{ m}^3/\text{j} / 54 \text{ m}^2) = 121 \mu\text{g}/\text{m}^3$$

Par ailleurs, puisque la concentration d'exposition a entraîné une inflammation pulmonaire qualifiée de légère à modérée, elle ne peut être considérée comme étant la concentration minimale entraînant un effet nocif observé (soit le *Lowest Observed Adverse Effect Level* ou *LOAEL*). Pour l'établir, il serait prudent de diviser le niveau d'exposition dérivé pour l'humain par un facteur de 10. Ainsi, le *LOAEL* s'établirait à $12,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

En utilisant ensuite une approche standard, cette dernière valeur devrait être ensuite divisée par trois autres facteurs d'incertitude : Un facteur de 10 pour l'extrapolation d'une toxicité subchronique à chronique ; un autre facteur de 10 pour l'extrapolation d'un *LOAEL* à la concentration sans effet nocif observé (soit le *No Observed Adverse Effect Level* ou *NOAEL*) ; un troisième facteur de 1,25 pour l'extrapolation de la durée d'exposition utilisée dans la présente étude (6 h) à une durée de 8 h généralement considérée pour le travailleur. Dans cette perspective, la valeur limite que l'on pourrait dériver de la présente étude serait de $0,10 \mu\text{g}/\text{m}^3$; soit une valeur légèrement inférieure à la limite québécoise de $0,15 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

Conclusion

Cette recherche a permis de vérifier dans quelle mesure les effets pulmonaires étaient reliés à la forme chimique de Be et à la taille de ses particules et plusieurs résultats convergent avec ceux obtenus par Finch *et al.* (1990 et 1996) et Haley *et al.* (1994). Manifestement, le modèle souris de souche C3H/HeJ utilisé dans la présente étude s'est révélé très bon puisqu'il reproduisait fidèlement plusieurs effets observés chez l'humain.

De nombreuses corrélations ont été établies entre les concentrations tissulaires en Be et les effets normalement observés chez le travailleur à la suite d'une exposition. En effet, les coupes histologiques montrent que les souris exposées au Be présentent des niveaux d'inflammation pulmonaire similaires à ceux observés chez des patients atteints de BC. Les lésions pulmonaires chez les humains sont par contre reconnues pour être plus importantes que celles observées chez les animaux (Nikula *et al.*, 1997 ; Finch *et al.*, 1998).

Les résultats témoignent également d'une association entre la taille des particules, les concentrations pulmonaires, l'inflammation pulmonaire, la production de certaines cytokines et l'expression de certains lymphocytes. Les effets dépendent aussi de la forme chimique de Be. Ainsi, c'est le Be métallique et le BeO s'avèrent les plus toxiques. Manifestement, le diamètre aérodynamique et le caractère soluble ont joué un rôle significatif sur la déposition et la rétention pulmonaire.

Ces rôles de la taille et de la forme chimique dans la toxicité du Be soulèvent une question fondamentale. Ne devrait-on pas établir des valeurs limites d'exposition spécifiques en tenant compte de ces paramètres ? Si, par pragmatisme, l'utilisation de multiples valeurs limites serait difficilement applicable sur le plan opérationnel, il serait minimalement souhaitable que les mesures de protection des travailleurs ou de réduction de leur exposition tiennent compte de telles propriétés.

Références

- ACGIH. 2009. Beryllium and Compounds. In: Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices, 7th Edition, pp. 1-14. American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati, OH.
- Amicosante, M., Fontenot, A.P. 2006. T cell recognition in chronic beryllium disease. *Clinical Immunology*. 121:134-143.
- Barna, B.P., Chiang, T., Pillarisetti, S.G., Deodhar, S.D. 1981. Immunologic studies of experimental beryllium lung disease in the guinea pig. *Clin Immunol Immunopathol*, 20:402-11.
- Bruce, R.M., Odin, M. 2001. Beryllium and beryllium compounds. Concise international chemical assessment document (CICAD), no. 32. Geneva, Organisation mondiale de la santé : 75.
- Chevalier, G., Boudreau, J., Vincent, R., Nadeau, D., Lapare, S., Fournier, M., Krystyniak, K., Trottier, B. (1993) Acute pulmonary toxicity of aerosolized oil-based aminocarb insecticide; early responses of the pulmonary surfactant. *Inhalation Toxicol*. 5 : 55-75.
- Cullen, M.R., Kominsky, J.R. Rossman, M.D. Cherniack, M.G. Ranklin, J.A., Balmes, J. R. Daniele, R.P., Palmer, L., Naegel, G.P. 1987. Chronic beryllium disease in a previous metal refinery. Clinical epidemiologic and immunologic evidence for continuing risk from exposure to low level beryllium fume. *Am Rev Respir Dis*. 135(1): 201-8.
- Day, G.A., Hoover, M.D., Stefaniak, A.B., Dickerson, R.M., Peterson, E.J., Esmen, N.A., Scripsick, R.C. 2005. Bioavailability of beryllium oxide particles: an in vitro study in the murine J774A.1 macrophage cell line model.
- Derelanko, M.J. Risk assessment. In *CRC Handbook of Toxicology*, CRC press, Inc., Edited by MJ Derelanko and MA Hollinger, 1995, pp. 591- 676.
- Eisenbud, M., Lissou, J. 1983. Epidemiological aspects of beryllium-induced nonmalignant lung disease: a 30-year update. *J Occup Med*. 25(3):196-202.
- Eisenbud, M., Wanta, R.C., Dustan, C., Steadman, L.T., Harris, W.B., Wolf, B.S. 1949. Non-occupational berylliosis. *J Ind Hyg Toxicol*. 31: 281-94.
- EPA. Toxicological review of beryllium and compounds. U.S. Environmental Protection Agency, Washington DC. 1998.

Finch, G.L., Hoover, M.D., Hahn, F.F., Nikula, K.J., Belinsky, S.A., Haley, P.J., Griffith, W.C. Animal models of beryllium-induced lung disease. *Environ Health Perspect* 104 Suppl 5:973-979, 1996.

Finch, G.L., Nikula, K.J., Hoover, M.D. 1998. Dose-response relationships between inhaled beryllium metal and lung toxicity in C3H mice. *Toxicol Sci* 42(1):36-48.

Fontenote, A.P., Canavera, S.J., Gharavi, L., Newman, L.S. 2002. Target organ localization of memory CD4+ T cells in patients with chronic beryllium disease. *J Clin Invest* 110:1473-1481.

Gouvernement du Québec. Règlement sur la santé et la sécurité du travail. Décret 885-2001, règlement modifié le 4 janvier 2007.

Haley, P.J., Finch, G.L., Mewhinney J.A., Harmsen, A.G., Hahn F.F., Hoover, M.D., Bice, D.E. 1989. A canine model of beryllium-induced granulomatous lung disease. *Lab Invest*, 61:219-227.

Haley, P.J., Finch, G.L., Hoover, M.D., Cuddihy, R.G. 1990. The acute toxicity of inhaled beryllium metal in rats. *Fundam Appl Toxicol* 15(4): 767-78.

Hennerberger, P.K. Cumro, D. Deubner, D.D. Kent, M.S. McCawley, M., Kreiss, K. 2001. Beryllium sensitization and disease among long-term and short-term workers in a beryllium ceramics plant. *Int Arch Occup Environ Health*. 74(3): 167-76.

Huang, H., Meyer, K.C., Kubai, L., Auerbach, R. 1992. An immune model of beryllium-induced pulmonary granulomata in mice: Histopathology, immune reactivity, and flow-cytometric analysis of broncho-alveolar lavage-derived cells. *Lab Invest*, 67:138-46.

Hyslop, F., Palmes, E.D., Alford, W.C., Monaco, A.R., Fairhall, L.T. 1943. The Toxicology of beryllium. U.S. Public Health Service, Washington, DC, National Institute of Health - Bulletin No. 181.

INRS. 1992. Béryllium et composés minéraux. Fiche toxicologique no. 92. Paris, Institut national de recherche et de sécurité, 6p.

INSPQ. 2004. Direction des risques biologiques, environnementaux et occupationnels, Poulin, M. et Ricard, S. Le test sanguin de prolifération lymphocytaire au béryllium (BeLPT) : de la théorie à la pratique. Québec : L'Institut. 71 p. (NSPQ: 2004-018).

IRSST. Les nanoparticules : connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en SST. Ostiguy et al., février 2006 Page 29.

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

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

Kreiss, K., Mroz, M.M., Zhen, B., Wiedemann, H., Barna, B. 1997. Risks of beryllium disease related to work processes at a metal, alloy, and oxide production plant. *Occup Environ Med* 54: 605-612.

Kreiss, K. Mroz, M.M. Newman, L.S. Martiny, J., Zhen, B. 1996. Machining risk of beryllium disease and sensitization with median exposure below 2 micrograms/m³. *Am J Ind Med* 30(1): 16-25.

Kriebel, D. Spreince, N.L. Eisen, E.A. Greaves, I.A. Feldman, H.A., Greene, R.E. 1988. Beryllium exposure and pulmonary function: a cross sectional study of beryllium workers. *Br J Ind Med* 45(3): 167-73.

Maier, L.A., McGrath, D.S., Sato, H., Lympny, P., Welsh, K., Du Bois, R., Silveira, L., Fontenot, A.P., Sawyer, R.T., Wilcox, E., Newman, L.S., 2003. Influence of MHC class II in susceptibility to beryllium sensitization and chronic beryllium disease. *J Immunol* 171, 6910-6918.

Manca, D., Ricard, A. C.Vincent, Trottier, B, Van Tra, H.,Chevalier, G. 1991. Lipid Peroxidation in rats Subacutely Exposed to a Low Concentration of Aerosolized Cadmium Chloride. *Inhalation Toxicol* 3: 419-433.

Newman, L.S., Lloyd, J., Daniloff, E. 1996. The natural history of beryllium sensitization and chronic beryllium disease. *Environ Health Perspect* 104 (Suppl 5):937-43.

Nikula, K.J., Swafford, D.S., Hoover, M.D., Tohulka, M.D., Finch, G.L. 1997. Chronic Granulomatous pneumonia and lymphocyte responses induced by inhaled beryllium metal in A/J and C3H/HeJ mice. *Toxicol Pathol*, 25:2-12.

Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster J. 2007. Concepts of nanoparticle dose metric and response metric. *Environ Health Perspect*. 115(6):A290.

OSHA, Occupational Safety and Health Administration. 2005. Toxic and Hazardous Substances. 29CFR 1000, Table Z-1, Washington D.C.

Raabe, O.G., Al-Bayati, M.A., Teague, S.V., Rasolt, A. 1988. Regional deposition of inhaled monodisperse coarse and fine aerosol particles in small laboratory animals. *Ann Occup Hyg*, Vol. 32,pp.53-63. Supplement 1.

Rouleau, M., Dion, C., Plamondon, P., L'Espérance, G., Zayed, J. 2005. Physical and Chemical Characterization of Beryllium Particles from Several Workplaces in Quebec, Canada-Part A: Time-of-flight Secondary-ion Mass Spectroscopy. *J Toxicol Env Health* 68:1907–1916.

Salehi, F., Zayed, J., Audusseau, S., Muller, C., Truchon, G., Plamondon, P., L'Espérance G., Chevalier, G., Mazer, B. 2008. Immunological responses in C3H/HeJ mice following inhalation exposure to different sizes of Beryllium metal particles. *J App Toxicol* 2009; 61-68.

Semenzato, G., Adami, F., Maschio, N., Agostini, C. 2000. Immune mechanisms in interstitial lung diseases. *Allergy* 55:1103-20.

Stefaniak, A.B., Gulmette, R.A., Day, G.A., Hoover, M.D., Breysse, P.N., Scripsick, R.C. 2005. Characterization of phagolysosomal stimulant fluid for study of beryllium aerosol particle dissolution. *Toxicol In Vitro* 19(1): 123-134.

Stefaniak, A.B., Hoover, M.D., Dickerson, R.M., Day, G.A., Breysse, P.N., Scripsick, R.C. 2007. Differences in estimates of size distribution of beryllium powder materials using phase contrast microscopy, scanning electron microscopy, and liquid suspension counter techniques. *Part Fiber Toxicol.* 4:3.

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

Strange, A.W. Hilmas, D.E. Furnam, F.J., Gatcliffe, T.R. 2001. Beryllium sensitization and chronic beryllium disease at a former nuclear weapons facility. *Appl Occup Environ Hyg* 16(3): 405-17.

Tinkle, S. S., Antonini, J. M., Rich, B. A., Roberts, J. R., Salmen, R., DePree, K., Adkins, E. A. 2003. Skin as a route of exposure and sensitisation in chronic beryllium disease. *Environ. Heath Perspect.* 111:1202–1208.

Tinkle, S.S., Kittle, L.A., Schumacher, B.A., Newman, L.S. 1997. Beryllium induces IL-2 and IFN- γ in berylliosis. *J Immunol* 158: 518-26.

US EPA. 1998. Integrated risk information system, substance file:Beryllium and compounds (CASRN 7440-41-7). Washington DC, United States Environmental Protection Agency.

Vorwald A.J. *Pneumoconiosis* (Sixth Saranac Symposium). New-York: Paul B. Hoeber Publishing, 1950.

Votto, J.J., Barton, R.W., Gionfriddo, M.A., Cole, S.R., McCormick, J.R., Thrall, R.S. A model of pulmonary granulomata induced by beryllium sulfate in the rat. *Sarcoidosis*, 4:71-76, 1987.

Wambach, P.F., Tuggle, R.M. 2000. Development of an eight-hour occupational exposure limit for beryllium. *Appl Occup Environ Hyg*, 15:581-587.

William, W.J. 1994. Beryllium disease. *Occupational Lung Disorders*. P. W. Raymond. London, Butterworth Heinemann. 3^{ème} édition: 571.

Willis, H.H., Floring, H.K. 2002. Potential exposures and risks from beryllium-containing products. *Risk Anal.* 22(5): 1019-33.

Yoshida, T., Shima, S., Nigaoka, K., Taniwaki, H., Wada, A., Kurita, H., Morita, K. 1997. A study on the beryllium lymphocyte transformation test and the beryllium levels in working environment. *Ind Health.* 35(3): 374-9.

ANNEXE I

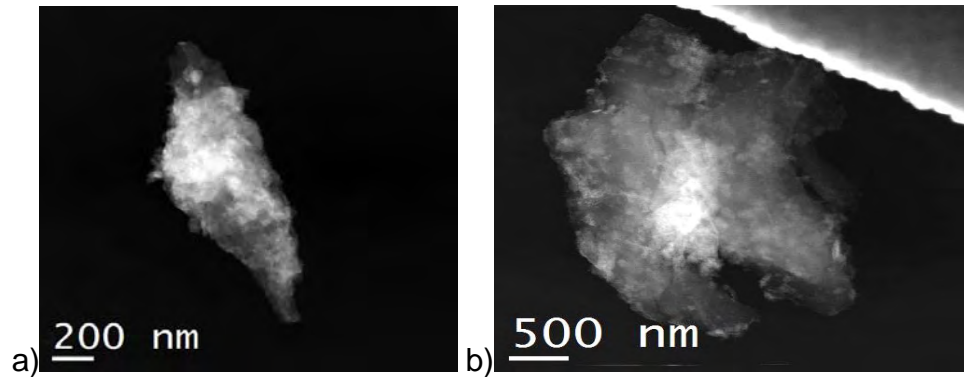


Figure a - Micrographies MET (microscopie électronique en transmission) en mode contraste Z montrant des particule de Be a) Be-F et b) Be-T.

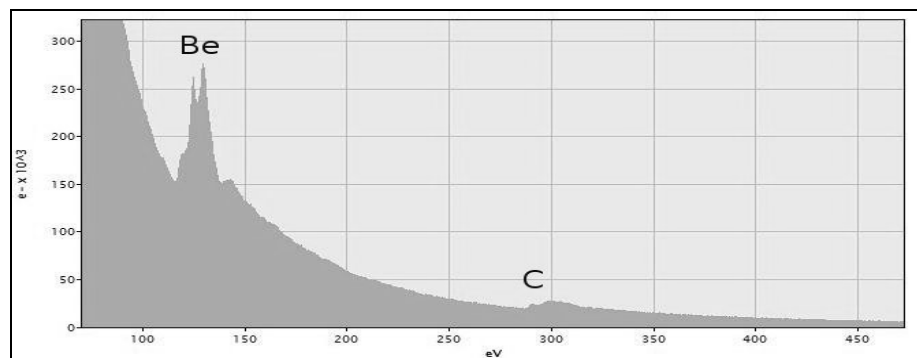


Figure b - Spectre PEELS (spectrométrie de la perte d'énergie des électrons transmis) acquis sur une particule de poudre montrant la détection du Be. La discontinuité du carbone provient du film soutenant les particules de poudre.

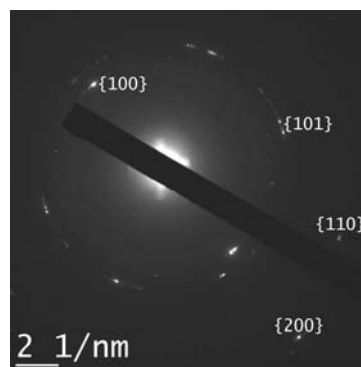


Figure c - Cliché de diffraction des électrons acquis sur une particule de poudre contenant du Be.

La présence d'anneaux indique que la particule est formée de plusieurs cristaux. Les distances interplanaires mesurées correspondent à ceux du Be pur et les familles de plans sont identifiées sur la figure.

Nous avons donné un second souffle
au diagnostic de l'asthme professionnel.

« Les chambres de provocation favorisent l'établissement d'un diagnostic objectif de l'asthme professionnel chez les travailleurs susceptibles d'être sensibilisés à... »

Pour les résultats des travaux de l'IRSST dans le domaine du diagnostic et de la prévention de l'asthme professionnel et pour les conclusions de 700 autres études prioritaires en santé et sécurité du travail, consultez notre site:

www.irsst.qc.ca

