

Université du Québec
INRS - Institut Armand-Frappier
Laval, Québec

**EFFICACITÉ DU DÉNOMBREMENT DES CELLULES SÉCRÉTRICES
D'INTERFÉRON- γ ET D'INTERLEUKINE 2 POUR LA DÉTECTION D'UNE
SENSIBILISATION CHEZ DES TRAVAILLEURS EXPOSÉS AU BÉRYLLIUM**

Par
Raïma Marlyse Opimba

Mémoire présenté pour
l'obtention du grade de *Magister Scientiae* (M.Sc.)
en sciences expérimentales de la santé

Jury d'évaluation

Examineur externe	Laurence Terrisse Rulleau Univalor, Montréal
Examineur interne	Dr Cathy Vaillancourt Ph.D INRS - Institut Armand-Frappier
Directeur de recherche	Dr Jacques Bernier Ph.D INRS - Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

L'objectif du projet était d'évaluer l'efficacité d'une méthode alternative de détection d'une sensibilisation au béryllium chez des travailleurs exposés. Le béryllium présente plusieurs utilisations en industrie. Son ajout aux alliages améliore leur dureté, conductivité et résistance à la corrosion. L'exposition répétée de travailleurs à des poussières contenant du béryllium peut mener au développement de la béryllose, une maladie respiratoire à progression lente caractérisée par la présence de granulomes au niveau des poumons. Elle résulte d'une détection du béryllium comme un antigène par le système immunitaire d'une personne. Celle-ci est alors considérée comme sensibilisée au béryllium et à risque de développer la maladie. Pour dépister une sensibilisation, la méthode de référence consiste à déceler la présence de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques au béryllium. Pour ce faire, un échantillon de sang est prélevé pour en isoler les cellules mononucléaires de la circulation périphérique (PBMCs). Ces cellules sont ensuite mises en culture en présence de sels de béryllium pour déterminer si cela stimule leur prolifération. Ce test est appelé le test de prolifération lymphocytaire au béryllium (BeLPT). L'exactitude et la sensibilité du BeLPT sont acceptables, mais une détection plus précoce d'une sensibilisation permettrait une meilleure prévention chez les travailleurs exposés. Une technique alternative consiste à mesurer la quantité de cellules sécrétrices de cytokines suite à une stimulation au béryllium. Cela s'effectue par la technique de l'ELISpot en ciblant les cellules T CD4⁺ produisant de l'interféron- γ (IFN- γ) et de l'interleukine-2 (IL-2). L'ELISpot permettrait de détecter la présence de lymphocytes T mémoire effecteurs spécifiques au béryllium. Ceux-ci produisent des cytokines, mais prolifèrent peu lorsqu'ils sont stimulés.

Pour le projet, la méthode de l'ELISpot fut comparée au BeLPT pour déterminer l'efficacité de l'ELISpot et établir si les deux tests pourraient se compléter pour améliorer l'efficacité de détection d'une sensibilisation au béryllium. Pour ce faire, des échantillons de sang prélevés de travailleurs d'une fonderie ont été analysés. Les PBMCs étaient isolées et mises en culture en présence de sulfate de béryllium (BeSO₄). Une plaque servait à mesurer la prolifération cellulaire à l'aide de la thymidine tritiée, et deux plaques ELISpot permettaient de dénombrer les cellules sécrétrices d'IFN- γ et IL-2 respectivement.

Pour le BeLPT, les résultats sont exprimés par l'indice de stimulation (SI), qui est le rapport entre les coups par minute mesurés chez les cellules stimulées divisés par le compte pour les cellules non stimulées. Deux contrôles positifs furent utilisés, la phytohémagglutinine (PHA) et *Candida albicans*. Au total, 12 travailleurs ont ainsi pu être analysés.

En comparant les résultats obtenus, on a constaté que la technique de l'ELISpot présente davantage de variabilité interindividus en comparaison au BeLPT. Cette variabilité s'observe également dans les valeurs mesurées pour les contrôles positifs. L'efficacité des contrôles positifs est comparable. Pour 8 des 12 travailleurs, le BeLPT et les ELISpot étaient tous les deux normaux. 2 travailleurs présentaient une valeur plus élevée que le contrôle pour la production soit d'IFN- γ ou d'IL-2 en présence de béryllium, tout en montrant un BeLPT normal. Le fait qu'il s'agissait seulement d'une valeur anormale indique une incertitude, que le BeLPT vient confirmer. Un travailleur a présenté une valeur de SI anormale, alors que les résultats pour les ELISpot étaient normaux. Pour un travailleur, nous avons mesuré deux valeurs anormales pour le dénombrement des cellules sécrétrices d'IFN- γ , alors que le BeLPT était normal, mais présentait des valeurs de SI relativement élevées. Ce résultat indique que le test ELISpot pourrait permettre d'améliorer la détection, car il indique la nécessité d'un suivi plus étroit de ce travailleur.

Le test ELISpot pour l'IL-2 devra être optimisé, mais nos résultats confirment tout de même la pertinence d'une étude comparant l'ELISpot et les résultats du BeLPT pour une cohorte de travailleurs plus grande. Cela pourrait permettre de déterminer quelles quantités de cellules productrices d'IFN- γ ou IL-2 correspond à l'identification d'une sensibilisation au béryllium, ou à un diagnostic de la béryllose. Puisque le dosage ELISpot et BeLPT mesurent différentes fonctions des cellules, il est également possible que ces tests puissent avoir des rôles complémentaires pour la surveillance de la maladie.



Marlyse Opimba, B. Sc.
Étudiante



Jacques Bernier, Ph.D.
Directeur de recherche

TABLE DES MATIÈRES

I. REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	1
1.1. INTRODUCTION	2
1.1.1. Maladies professionnelles	2
1.1.2. Maladies professionnelles reliées à l'exposition aux métaux	3
1.1.3. Maladies professionnelles respiratoires.....	6
1.2. Le béryllium.....	7
1.2.1. Secteurs d'activité utilisant le béryllium.....	8
1.2.2. Voies d'exposition.....	10
1.2.3. Effets résultant d'une exposition aiguë au béryllium	12
1.2.4. Effets résultant d'expositions chroniques au béryllium	13
1.3. Système immunitaire	15
1.3.1. Sensibilisation de type Hypersensibilité	16
1.3.2. Lymphocytes T	17
1.3.2.1. Activation des lymphocytes T CD4 ⁺	18
1.3.2.2. Lymphocytes T helper 1 (Th1)	19
1.3.2.3. Lymphocytes T helper 2 (Th2)	19
1.3.2.4. Lymphocytes T helper 17 (Th17)	20
1.3.2.5. Lymphocytes T régulatrices (Treg)	21
1.3.2.6. Lymphocytes T mémoires	21
1.4. Cytokines.....	23
1.4.1. Interleukine-2.....	24
1.4.1.1. Récepteur de l'interleukine-2.....	26
1.4.2. Interféron-γ.....	27
1.4.2.1. Récepteur de l'interféron-γ.....	28
1.5. Sensibilisation au béryllium.....	29
1.5.1. Captation du béryllium par les cellules présentatrices d'antigène	29
1.5.2. Présentation du béryllium aux lymphocytes T CD4 ⁺	30
1.5.3. Activation des lymphocytes T CD4 ⁺ sensibilisés	31
1.5.4. Formation de cellules mémoires	32
1.6. Développement de la béryllose	33
1.7. Prédisposition génétique	35
1.8. Méthodes pour diagnostiquer la béryllose.....	36
1.8.1. Détection de la sensibilisation au béryllium.....	36
1.8.1.1. Test de prolifération Lymphocytaire	37
II. OBJECTIFS DE LA RECHERCHE	41
2.1. Objectif et hypothèse.....	42
2.1.1. Problématique de santé et de sécurité au travail	42
2.1.2. Hypothèse.....	43
2.1.3. Objectif spécifique	43
III. MÉTHODOLOGIE	44
3.1. MATÉRIELS	45
3.1.1. Liste des produits.....	45
3.1.2. Source des échantillons de sang.....	45
3.2. MÉTHODES.....	46
3.2.1. Isolement des cellules mononuclées de la circulation périphérique	46

3.2.2.	Test de prolifération lymphocytaire	46
3.2.3.	Détermination des contrôles positifs et de la valeur critique du BelPT	47
3.2.4.	Contrôles positifs utilisés	48
3.2.5.	Protocole du BelPT	48
3.2.6.	Quantification de l'interféron- γ et de l'interleukine 2 par le test ELISpot.....	49
3.2.7.	Protocole.....	50
3.2.8.	Analyse statistique.....	52
IV.	RÉSULTATS	53
4.1.	Résultats	54
4.1.1.	Prolifération des PBMCs en présence de béryllium	54
4.1.2.	Travailleurs non sensibilisés au béryllium	58
4.1.3.	Travailleur ayant un résultat anormal incertain	62
4.1.4.	Quantification par ELISpot des cellules sécrétrices d'IFN- γ et d'IL-2 suite à la stimulation de PBMCs au sulfate de béryllium.	64
V.	DISCUSSION	77
5.1.	Discussion.....	78
5.1.1.	Test de prolifération lymphocytaire au béryllium	78
5.1.2.	ELISpot	80
5.1.3.	Comparaison des deux méthodes	82
5.1.4.	Autres méthodes	85
VI.	CONCLUSION.....	88
6.1.	Conclusion	89
VII.	RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE	90
7.1.	Référence	91

LISTE DES ABRÉVIATIONS

³ H-thymidine	Thymidine tritiée
AICD	Mort cellulaire induite par activation
BeLPT	Beryllium lymphocyte proliferation test
Blimp1	Facteur de transcription des lymphocytes B induisant la maturation de la protéine 1
BrdU	Bromodésoxyuridine
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CFSE	Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
CLIP	Class II-associated invariant chain peptide
CMHII	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
Cpm	Coups par minute
CSST	Commission de la santé et de la sécurité du travail
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DC	Cellule dendritique
ELISpot	Enzyme-Linked Immuno Spot
GATA3	GATA-binding protein 3
HLA	Human leukocyte antigen
IDO	Indoléamine 2,3-dioxygénase
IFN- γ	Interféron gamma
IFNGR1	Interféron gamma receptor 1
IFNGR2	Interféron gamma receptor 2
IL	Interleukine
IL-2R	Récepteur pour l'interleukine-2
iNOS	Inductible nitric oxide synthase
IRSST	Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail
iTreg	Cellule T régulatrice induite
GATA	Guanosine, Adenosine, Thymidine, Adenosine protein Binding

LBA	Lavage broncho-alvéolaire
LPT	Test de prolifération des lymphocytes
LT α	Lymphotoxine α
MCB	Maladie chronique du béryllium
NFAT	Facteur nucléaire des lymphocytes T activés
NK	Tueuses naturelle
NKT	T tueuse naturelle
NO	oxyde nitrique
OSHA	Organisation pour la santé et la sécurité professionnelle
PA	Polyarthrite rhumatoïde
PBMCs	Cellules mononuclées de la circulation périphérique
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PHA	Phytohémagglutinine
PI	Iodure de propidium
SEP	Sclérose en plaques
SFU	Unités formant des spots
SI	Index de stimulation
Stat	Signal transducer and activator of transcription
Tc	T cytotoxique
TCR	Récepteur des cellules T
T _{CM}	T mémoire centrale
T _{EM}	T mémoire effectrice
Th	T helper
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TP	Température pièce
Treg	T régulateur
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VLEP	Valeur limite d'exposition professionnelle

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Conversion des différents composés de béryllium dans un environnement neutre	11
Tableau 2 : Principales cytokines et leur rôle dans le système immunitaire	24
Tableau 3 : Exemple de plaque de culture cellulaire.....	49
Tableau 4 : Valeurs en cpm du BeLPT pour les contrôles pour chaque patient (n=12).....	55
Tableau 5 : Valeurs des indices de stimulation (SI) des contrôles positifs lors du BeLPT pour chaque patient (n=12).....	57
Tableau 6 : Moyenne des indices de stimulation (SI) des 12 travailleurs pour le test BeLPT aux différentes concentrations de béryllium.	58
Tableau 7 : Moyenne des cpm des 12 travailleurs pour le test BeLPT aux différentes concentrations de béryllium.....	59
Tableau 8 : Valeurs en SFU (Spot formant une unité) pour les contrôles négatifs et positifs du test ELISpot de chaque patient (n = 12) pour l'IFN- γ	64
Tableau 9 : Valeurs en SFU pour les contrôles négatifs et positifs du test ELISpot de chaque patient (n = 12) pour l'IL-2.....	66
Tableau 10 : Nombre de cellules productrices d'IFN- γ en moyenne en présence de BeSO ₄	68
Tableau 11 : Nombre de cellules productrices d'IL-2 en moyenne en présence de BeSO ₄ ..	69
Tableau 12 : Récapitulation comparative des résultats pour les deux méthodes.	76

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Fibrose pulmonaire résultant d'expositions répétées au béryllium, A) Anatomie du poumon, B) Tissu pulmonaire normal C) Tissu pulmonaire pathologique e la bérylliose.	15
Figure 2 : Différenciation des lymphocytes T et la régulation croisée entre les sous-ensembles de cellules T.	23
Figure 3 : Modèle de l'interaction de Blimp1 et de l'IL-2 dans la différenciation des cellules T.	26
Figure 4 : Activation et recrutement des macrophages par les lymphocytes lors de l'inflammation chronique.	32
Figure 5 : Schématisation de la formation de granulomes dans les poumons par les macrophages.	34
Figure 6: Exemple de résultat pour l'ELISpot.	51
Figure 7: Valeurs en cpm pour le BeLPT des contrôles négatifs (RPMI-1640) par rapport aux contrôles positifs.	56
Figure 8 : Travailleurs ayant une prolifération normale des lymphocytes en présence de béryllium pour le BeLPT.	61
Figure 9 : Travailleur 90 montrant une prolifération anormale incertaine des lymphocytes en présence de béryllium pour le BeLPT.	62
Figure 10 : Travailleur 84 montrant une prolifération suspicieuse des lymphocytes en présence de béryllium lors du BeLPT.	63
Figure 11 : Valeurs en SFU pour les contrôles négatifs et positifs du test ELISpot de chaque patient (n = 12) pour l'IFN- γ	65
Figure 12 : Valeurs en SFU pour les contrôles négatifs et positifs du test ELISpot de chaque patient (n = 12) pour l'IL-2.	67
Figure 13 : Travailleurs normaux pour le nombre de cellules productrices d'IFN- γ ou IL-2 mesuré par ELISpot en présence de différentes concentrations de sulfate de béryllium.	73
Figure 14 : Travailleurs 94 et 98, anormaux pour le nombre de cellules productrices d'IFN- γ ou IL-2 mesuré par ELISpot en présence de différentes concentrations de sulfate de béryllium.	74
Figure 15 : Travailleur 84, anormal pour le nombre de cellules productrices d'IFN- γ mesuré par ELISpot en présence de différentes concentrations de sulfate de béryllium.	75
Figure 16 : Travailleur 90, normal pour le nombre de cellules productrices d'IFN- γ et IL-2 mesuré par ELISpot en présence de différentes concentrations de sulfate de béryllium.	76

*À TSONO SIMONE, ma grand-mère,
Ma mère, ma grande amie qui n'a pas pu être là
Pour récolter le fruit de son dur labeur.
Je t'aime Maman (24 septembre 2011).*

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier avant tout mon directeur de recherche Jacques Bernier de m'avoir permis d'apprendre dans son laboratoire durant ma maîtrise.

Je remercie aussi Marlène Fortier assistante de laboratoire ainsi que l'associée de recherche Pauline Brousseau du laboratoire du professeur Fournier pour leur aide quant aux résultats sur le test de prolifération lymphocytaire.

Je remercie aussi mes collègues qui ont rendu la tâche plus facile et agréable, Bruno Johnson et Guillaume Côté-Maurais avec qui je partage ce mémoire.

Je tiens à remercier l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) pour le soutien financier.

J'aimerais remercier de tout mon cœur ma famille d'ici Hans Kah, Cassandra Gauthier, Henriette Ognaligui et celle qui est en France Ndala Lebani Imelda, Lebani Hermann, Gwabazo Rilo Anushka, Assitan Koné pour leur support. Leur amour et confiance m'ont permis d'avancer. Je vous aime.

Finalement je remercie Mes amours Vincent Lebel et Joshua Philippe Lebel les hommes de ma vie pour avoir été patients et de m'avoir accompagné dans cette aventure.

I. REVUE DE LA LITTERATURE

1.1. INTRODUCTION

1.1.1. Maladies professionnelles

Il existe plusieurs secteurs d'activités où des travailleurs sont exposés à répétition et de façon prolongée, par inhalation, à des substances agressives qui mènent à l'apparition de maladies dites professionnelles. Une maladie est considérée professionnelle lorsqu'elle est la conséquence directe des conditions dans lesquelles le travailleur exerce son activité professionnelle (Dalphin .J.C. et Andujarn .P., 2005). Ces maladies prennent souvent des mois ou même des années à se développer selon l'intensité et les circonstances du contact (Guidotti Tee.L et al., 1989; Levy B.S et Wegman D .H, 1995). Elles ressemblent souvent à des maladies qui peuvent survenir en d'autres circonstances. C'est le cas du cancer causé par l'inhalation de fibres d'amiante, qui prend au moins 20 ans à se développer et pour lequel il est difficile d'identifier une cause exacte chez le travailleur. La béryllose causée par une exposition aux poussières de béryllium en est un autre exemple, de même que l'asthme, où le diagnostic du travailleur suivant une sensibilisation à des produits chimiques au travail est souvent faussement attribué à une exposition au domicile.

Les maladies professionnelles ne sont donc pas toujours déclarées. Il peut aussi arriver que certaines soient déclarées à tort, en tant qu'accident de service ou maladie ordinaire (Simard.R, 1998; Provencher .S et De Guire.L, 2001). Plusieurs maladies professionnelles sont répertoriées mais nous nous attarderons sur les principales. Les maladies professionnelles les plus courantes sont : les troubles musculo squelettiques, les affections chroniques du rachis lombaire, les affections provoquées par le bruit intense qui détruisent progressivement et de façon irréversible les cellules ciliées de l'oreille interne et les affections liées aux poussières d'amiante (Lebel.G et Gingras .S, 2007). L'amiante, matière minérale fibreuse, a été très largement utilisé pendant plus de 130 ans du fait de ses nombreuses propriétés (résistance au feu, faible conductivité thermique, acoustique et électrique, faible coût). Suite à la reconnaissance de sa toxicité, il est maintenant moins utilisé.

L'intérêt pour les maladies professionnelles dans les grands centres de recherche est généralement stimulé par des problèmes économiques importants dans les industries locales. Du fait de l'importance de l'amiante au Québec, les études portant sur l'amiante et ses effets sur la santé ont dominé la recherche dans les institutions de cette province. En Ontario, les chercheurs s'intéressent particulièrement à l'industrie minière. En Colombie-Britannique, l'accent est mis sur les causes de l'asthme et des problèmes liés à la circulation de l'air dans les poumons résultant d'une réaction asthmatique inhabituelle en réponse aux poussières de cèdre rouge de l'Ouest, bois important sur le plan économique (Teschke et Barroetavena, 1992; Goldsmith, 1998).

1.1.2. Maladies professionnelles reliées à l'exposition aux métaux

Depuis longtemps, les métaux sont reconnus comme des agents pouvant causer des maladies humaines, y compris certaines maladies pulmonaires (Lauwerys RR., 1982; Bisetti, 1988). Le type de maladie pulmonaire causé par les composés métalliques dépend de la nature du métal en cause, de sa forme chimique, aussi appelé spéciation des métaux, ainsi que de ses propriétés physico-chimiques. Ces propriétés, en plus de la dose et des conditions d'expositions, vont influencer la toxicocinétique et les effets biologiques chez l'hôte.

Les gens sont rarement exposés à la forme métallique pure (degré d'oxydation zéro) des métaux ou métalloïdes. Ils sont plus généralement exposés aux oxydes ou aux autres composés métalliques binaires, tels que les sulfures, halogénures, hydrures et carbures, ou encore aux composés d'éléments multiples, principalement les sels. Les métaux, et plus particulièrement les métaux de transition, peuvent également former des complexes de coordination avec différents ligands, tels que l'ammoniaque et les molécules soufrées.

La forme du métal aura une influence sur la biodisponibilité et l'absorption des métaux. Cela détermine leur solubilité dans l'eau et les lipides, mais surtout leur solubilité réelle

dans les fluides biologiques, qui contiennent une variété de ligands organiques. Plus le composé métallique déposé dans les voies respiratoires est insoluble, plus il sera efficacement éliminé par les mouvements muco-ciliaires. À l'inverse, les sels solubles se dissocient facilement, ce qui facilite le transport des ions métalliques dans les cellules pulmonaires ou dans la circulation sanguine. La forte affinité entre les ions métalliques et les ligands organiques des tissus résulte en une liaison entre l'ion métallique et ces molécules. Cela permet d'envisager un certain nombre d'effets biologiques et d'effets toxiques par des métaux (Vouk V, 1986).

Certains métaux, tels que le fer (Fe), le cuivre (Cu), le manganèse (Mn), le cobalt (Co), le zinc (Zn) et le chrome (Cr) sont essentiels comme coenzymes à de nombreuses enzymes. Un dysfonctionnement dans certains processus enzymatiques peut donc survenir suite à un état de carence en ces métaux. Cela peut également se produire s'il y a présence d'un métal essentiel à des concentrations très élevées. Celui-ci va alors se substituer par mimétisme à d'autres ions essentiels causant un dysfonctionnement.

Le transport et l'accumulation des métaux sont souvent le résultat de leur capacité à interagir avec les ligands. La transferrine, la ferritine, l'albumine et la céruloplasmine sont les principaux transporteurs ou protéines de stockage du Fe et du Cu. Leur abondance constitue probablement une protection contre la toxicité de ces métaux lorsqu'ils sont sous leur forme libre. D'autres métaux, comme le Cd, peuvent se lier à la métallothionéine, une protéine de faible poids moléculaire riche en groupements sulfhydriles. Ce processus jouerait également un rôle dans la défense contre le Cd, mais il mène à l'accumulation et la rétention graduelle du Cd dans divers tissus, incluant les tissus pulmonaires (Hart, 1986).

Une autre conséquence toxicologique de la liaison des métaux aux protéines est la possibilité de déclencher une réponse immunitaire. Le Pt, le Cr, le Ni et le Co sont des sensibilisateurs qui agiraient par des mécanismes analogues à ceux des autres réactifs des molécules organiques de faible poids moléculaire en agissant comme des haptènes (Hart, 1986).

L'activité biologique et la toxicité de certains métaux sont aussi fortement influencées par leur capacité à modifier leur état d'oxydation par oxydation (perte d'électrons) ou par réduction (gain d'électrons). Les métaux de transition sont électroniquement stables dans plus d'un état d'oxydation. En raison de cette propriété, les métaux de transition jouent un rôle important dans la catalyse de réactions d'oxydation biologique. Parmi les métaux de transition, le Fe et le Cu ont été largement étudiés en raison de leur implication dans de nombreux processus pathologiques pulmonaires et non pulmonaires ainsi que pour leur capacité à accroître la production de radicaux libres (Halliwell et Gutteridge, 1984; Slater, 1984; Halliwell et Gutteridge, 1986).

Les réponses du système immunitaire caractérisées par une inflammation sont souvent déclenchées par un stress oxydatif. Par exemple, le béryllium peut engendrer un déséquilibre au niveau des thiols, ce qui entraîne un stress oxydatif qui modulerait la prolifération et l'expansion clonale de cellules T CD4⁺ spécifiques au béryllium dans le sang (Dobis et al., 2008). Un autre thème majeur qui émerge dans l'examen de l'évolution récente de la toxicité pulmonaire des métaux est que ceux-ci peuvent induire des réactions immunologiques spécifiques ou non à un antigène dans les poumons. Avec la reconnaissance de ces effets immunitaires et inflammatoires, il y a une prise de conscience croissante des risques potentiels pour les poumons d'une exposition à de faibles niveaux de certains métaux. Dans le cas par exemple du béryllium et du cobalt, il y a une reconnaissance émergente de facteurs de risques génétiques associés à la susceptibilité suite à l'exposition (Newman, 1996). Plusieurs métaux sont associés au développement de maladies pulmonaires. En plus de la fibrose pulmonaire, l'inhalation de particules métalliques peut induire un grand nombre de pathologies du poumon, y compris une affection respiratoire réactionnelle et le cancer (Fontenot et Amicosante, 2008).

L'exposition au béryllium se fait suite à l'extraction de la matière minérale ou lors du traitement dans les alliages de métaux, de produits céramiques et de sels métalliques. Elle s'est traduite dans certaines industries (par exemple, l'électronique, l'aéronautique et l'énergie nucléaire) par une épidémie continue de la maladie chronique du béryllium (MCB) ou béryllose. Cette maladie est une affection granulomateuse qui affecte

principalement les poumons, les vaisseaux lymphatiques et la peau (Vier et al., 2003; Muller-Quernheim et al., 2007; Seidler et al., 2012). Une étude a montré qu'environ 134 000 travailleurs étaient potentiellement exposés au béryllium à travers les États-Unis (Henneberger et al., 2004). Les travailleurs présentant un très grand potentiel d'exposition sont ceux œuvrant dans les mines de béryllium, les fabricants d'alliage de béryllium, les techniciens de missiles et de réacteurs nucléaires, ainsi que les personnes qui façonnent les équipements électriques et électroniques (NIEHS, January 2003).

1.1.3. Maladies professionnelles respiratoires

Les poumons représentent une interface majeure entre les humains et l'environnement. Nous inhalons des substances environnementales sous forme de particules, de fibres et de gaz chaque jour. Alors que beaucoup sont relativement inoffensives, d'autres ont le potentiel de provoquer des maladies pulmonaires aiguës ou chroniques (Yuh-Chin T. Huan. et al., 2012). Les maladies respiratoires professionnelles sont fréquentes et affectent les gens de tous les secteurs industriels. Il existe deux principaux types de maladies respiratoires : les maladies pulmonaires interstitielles ou pneumoconioses et les maladies des voies respiratoires.

Les pneumoconioses sont définies comme étant des maladies respiratoires subaiguës ou chroniques qui résultent de la réaction de l'appareil pulmonaire à l'agression par des particules inorganiques (minérales ou métalliques). Celles-ci sont souvent inhalées lors d'expositions professionnelles et vont causer des altérations structurelles (Laney et al., 2012). Les maladies pulmonaires interstitielles sont parfois caractérisées par la présence de fibrose. Elles incluent la maladie chronique du béryllium, l'asbestose, la byssinose, la pneumoconiose du travailleur de charbon, la silicose et les maladies pulmonaires de l'agriculteur (NIOSH, 2011).

Les maladies des voies respiratoires incluent l'asthme aggravé liée au travail, la maladie pulmonaire obstructive chronique et la bronchiolite oblitérante (Weston, 2011). L'asthme

professionnelle est une des maladies pulmonaires professionnelles les plus répandues et se caractérise par une difficulté à respirer (Masoli et al., 2004). La commission de la santé et de la sécurité du travail (CSST) a instauré un programme de détection et de compensation permettant de retirer de leur milieu de travail les personnes atteintes dès que le diagnostic est posé. Malgré cette approche proactive, 70 % des travailleurs affectés continuent de manifester des symptômes d'asthme professionnelle après l'arrêt d'exposition à l'agent causal (Lemière et al., 2011). L'asthme est reconnu depuis longtemps pour avoir à la fois une composante environnementale et une autre génétique, en plus d'être une maladie multigénique reconnue (Aron et al., 1996; Hizawa et al., 2006). Pour faire face à la nature multigénique de l'asthme, une tentative de modélisation statistique a été effectuée pour élucider le risque de développer l'asthme. Le modèle a révélé un large spectre de risques potentiels et pourrait aider à identifier plus clairement les populations à risque, mais il serait difficile d'intégrer la composante environnementale. Ce qui contrairement à la béryllose peut être accompli grâce à la compréhension de l'interaction d'un gène (HLA-DPβGlu69) avec l'environnement au niveau moléculaire

1.2. Le béryllium

Le béryllium est un élément naturel présent dans les roches de la surface terrestre. Il s'agit d'un métal gris-argenté d'un poids atomique de 9,01 g possédant un point de fusion de 1287 °C, un point d'ébullition de 2970 °C et une densité de 1,8477 g/cm³ à 20 °C ((WHO), 1990; Bruce et Odin, 2001). Il possède une structure cristalline hexagonale serrée et fait partie du groupe des alcalino-terreux dans la classification des éléments périodiques, donc possède un état d'oxydation de +2. Cependant en raison de sa forte réactivité, le béryllium n'existe pas à l'état pur dans la nature, mais uniquement sous forme de composés ((WHO). 2001). Ceux-ci peuvent être naturellement émis dans l'atmosphère via les poussières souflées par le vent et les particules volcaniques ((EPA), 1987). La source d'émission majeure dans l'environnement est surtout d'origine anthropique, soit principalement par la combustion du charbon et du mazout, ce qui libère dans l'atmosphère, sous forme d'aérosol, des particules et des cendres contenant du béryllium ((DOE). 1996). Ces particules sont alors sous forme d'oxyde de béryllium (Ogus et al.,

2004). D'autres procédés anthropiques, tels que le traitement du minerai, la fabrication métallique, la production et l'utilisation d'oxyde de béryllium et la combustion de déchets municipaux libèrent aussi du béryllium, mais représentent seulement une faible fraction (0,17%) des émissions de béryllium (OMS, 1990) (Cleverly DH, 1989). Certains composés du béryllium sont naturellement présents en faible quantité dans le sol, mais une concentration élevée de béryllium dans des sols localisés résulte principalement de l'élimination de cendres de charbon, de cendres de combustion municipale, des déchets industriels contenant du béryllium et des dépôts des aérosols atmosphériques (Stefaniak et al., 2008).

La population générale est exposée à des traces de béryllium par l'inhalation de l'air, par la consommation de nourriture et d'eau potable, mais les fumeurs peuvent être exposés à des niveaux plus élevés, car la fumée de cigarette en contient (Sanderson et al., 2001). Les gens travaillant dans les secteurs manufacturiers de fabrication et de récupération du béryllium sont quant à eux exposés à des niveaux beaucoup plus élevés que la population générale. Des normes d'exposition ont donc été établies pour ces travailleurs. En 2007, la province de Québec a réduit la limite d'exposition professionnelle (VLEP) de 2 à 0,15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en moyenne pondérée dans le temps pour une journée de travail de 8 heures, 5 jours par semaine (Québec, 2006). Le seuil de valeur moyenne pondérée récemment adoptée par l'American Conference of Governmental Industrial Hygienists est plutôt de 0,05 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ par rapport à la valeur précédente de 2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Clay et al., 2008).

1.2.1. Secteurs d'activité utilisant le béryllium

Le béryllium possède plusieurs propriétés chimiques uniques intéressantes pour l'industrie. Il est le plus léger de toutes les substances solides, chimiquement stables, possède un point de fusion très élevé, une excellente conductivité électrique et thermique et n'est pas magnétique. De plus, malgré sa légèreté, il est 40 % plus rigide et environ un tiers plus élastique que l'acier. Il est insoluble dans l'eau, mais peut être solubilisé dans les acides et les alcalins. À des températures ordinaires, le béryllium résiste à l'oxydation par

l'air, car un mince film d'oxyde de béryllium se forme à sa surface, ce qui le rend très résistant à la corrosion. Il est utilisé dans certains alliages, où il contribue à améliorer leur dureté, résistance, conductivité électrique et thermique et leur résistance à la corrosion ainsi qu'à l'usure ((ATSDR). 2002; Drolet-Vives et al., 2009). Ses propriétés font du béryllium un métal très utilisé dans les hautes technologies. Environ 20 tonnes par an de métal béryllium pur sont utilisées dans des applications très spécifiques, telles que les réacteurs nucléaires/fusion, dans le domaine aérospatial, les télécommunications et l'industrie automobile (Strupp, 2011). Les alliages contenant du béryllium représentent de loin le plus grand pourcentage, soit environ 75 %, des matières contenant du béryllium présentes sur le marché (Cummings et al., 2009). Les groupes de travailleurs les plus à risques d'être exposés à des niveaux élevés de béryllium sont les machinistes d'alliage de béryllium, les travailleurs de la construction et tous les travailleurs exposés à beaucoup de poussières (Newman, 2007).

Il existe peu de documentation sur les précautions particulières à prendre pour protéger les travailleurs d'une exposition au béryllium en usine, lors des prélèvements sur le terrain ou durant l'analyse des échantillons en laboratoire. L'organisation pour la santé et la sécurité professionnelle (OSHA) des États-Unis suggère la prudence quant à la possibilité d'émission de béryllium dans l'air et recommande de prendre des précautions pour éviter l'inhalation. Cela s'applique notamment pour la prévention des risques d'exposition au béryllium dans les laboratoires dentaires, où les alliages dentaires peuvent contenir de 0,5 à 2 % de béryllium (Ben-Ali et al., 2004). Pour diminuer l'exposition, la CSST du Québec propose certains procédés manuels, soit une bonne utilisation de la ventilation, des aspirateurs HEPA pour nettoyer les équipements et les surfaces, la prohibition d'utiliser l'air comprimé, la mesure dans l'air des niveaux de béryllium, l'imposition d'une limite sur le nombre de travailleurs ayant accès aux zones contenant du béryllium et l'utilisation d'une bonne protection respiratoire. Pour minimiser les contacts avec la peau et pour réduire les possibilités d'apporter les poussières à la maison ou dans des zones de travail non contaminées, la CSST suggère le port de vêtement de protection (sarrau, couvre-chaussures, gants et manches); le lavage du visage, des mains et des avant-bras avant de manger, de boire, de fumer ou d'appliquer des cosmétiques et l'entreposage

des vêtements de ville à l'écart des vêtements de travail contaminés par le béryllium. Elle recommande des équipements de protection respiratoire adéquats, l'utilisation d'un masque de chirurgie est prohibée en raison du mauvais ajustement et de son manque d'efficacité pour la filtration des particules fines (CSST).

1.2.2. Voies d'exposition

Le béryllium et ses composés sont principalement absorbés par voie pulmonaire chez les humains et les animaux (Zorn et al., 1977; Finch et al., 1990). L'efficacité d'absorption suite à l'inhalation dépend de la taille, de la solubilité des particules et de l'activité alvéolaire des macrophages (Finch et al., 1990). L'absorption du béryllium via le tractus gastro-intestinal ou en traversant la peau intacte est faible (Furchner et al., 1973). Par contre, certaines études démontrent qu'il y aurait pénétration des particules dans la couche cornée et les follicules pileux (Tan et al., 1996; Lademann et al., 1999; Deubner et al., 2001). Le béryllium et ses composés subissent une biotransformation une fois dans l'organisme, car les sels de béryllium solubles sont partiellement convertis en des formes moins solubles au niveau des poumons (Reeves, 1965).

L'élimination du béryllium, au niveau des poumons, s'effectuerait de deux façons en fonction de la solubilité de ses composés (voir tableau 1). Les composés solubles se dissolvent rapidement dans le liquide des voies respiratoires, tandis que les particules insolubles se déposent dans les voies respiratoires supérieures de l'arbre trachéo-bronchique et sont lentement éliminées par transport mucociliaire. Ces particules insolubles sont principalement éliminées par les macrophages alvéolaires et par les mécanismes de translocation et de solubilisation, avec un temps de demi-vie allant de 2,5 jours à un peu plus de 2 ans (Reeves et Vorwald, 1967; Rhoads et Sanders, 1985). Chez l'homme, la présence de béryllium insoluble dans les poumons a été détectée plusieurs années après que l'exposition professionnelle ait cessé. Quant au béryllium atteignant la circulation, les principales voies d'élimination sont via l'urine et les fèces. Selon Reeves et

al, l'excrétion urinaire du béryllium est irrégulière et ne serait pas utile à des fins de diagnostics (Reeves, 1965)

Tableau 1 : Conversion des différents composés de béryllium dans un environnement neutre

<p>Ammonium tetrafluoroberyllate (Ammonium beryllium fluoride)</p> $(NH_4)_2BeF_4 \rightarrow 2[NH_4]^+_{aq} + [BeF_4]^{2-}_{aq}$ <p>Excess H₂O pH 7</p>	Remains soluble in a neutral environment
<p>Beryllium oxide</p> $BeO + H_2O \rightarrow Be(OH)_2$ <p>Excess H₂O pH 7</p>	Forms insoluble beryllium hydroxide in a neutral environment
<p>Beryllium hydroxide</p> $Be(OH)_2 \rightarrow \text{no reaction}$ <p>Excess H₂O pH 7</p>	Beryllium hydroxide is insoluble in a neutral environment
<p>Beryllium fluoride</p> $BeF_2 + 2 H_2O \rightarrow [BeF_2(H_2O)_2]_{aq} \text{ and other complexes}$ <p>Excess H₂O pH 7</p>	Remains soluble in a neutral environment
<p>Beryllium nitrate trihydrate</p> $Be(NO_3)_2 \cdot 3H_2O + 2MOH^p \rightarrow Be(OH)_2 + 2[M]^+_{aq} + 2[NO_3]^-_{aq} + 3H_2O$ <p>Excess H₂O pH 7</p>	Forms insoluble beryllium hydroxide in a neutral environment
<p>Beryllium sulfate tetrahydrate</p> $BeSO_4 \cdot 4H_2O + 2MOH^p \rightarrow Be(OH)_2 + 2[M]^+_{aq} + [SO_4]^{2-}_{aq} + 4H_2O$ <p>Excess H₂O pH 7</p>	Forms insoluble beryllium hydroxide in a neutral environment
<p>Beryllium oxalate trihydrate</p> $BeC_2O_4 \cdot 3H_2O + 2MOH^p \rightarrow Be(OH)_2 + 2[M]^+_{aq} + [C_2O_4]^{2-}_{aq} + 3H_2O$ <p>Excess H₂O pH 7</p>	Forms insoluble beryllium hydroxide in a neutral environment
<p>Beryllium Basic Acetate^b</p> $Be_2O(C_2H_3O_2)_6 + 6MOH^p + H_2O \rightarrow 4Be(OH)_2 + 6[M]^+_{aq} + 6[C_2H_3O_2]^-_{aq}$ <p>Excess H₂O pH 7</p>	Forms insoluble beryllium hydroxide in a neutral environment

Source: EPA 1998

^aMOH is a base; M in MOH signifies a cation such as sodium (Na) or potassium (K).

^bBeryllium basic acetate is not a true basic salt; it is a covalent compound.

1.2.3. Effets résultant d'une exposition aiguë au béryllium

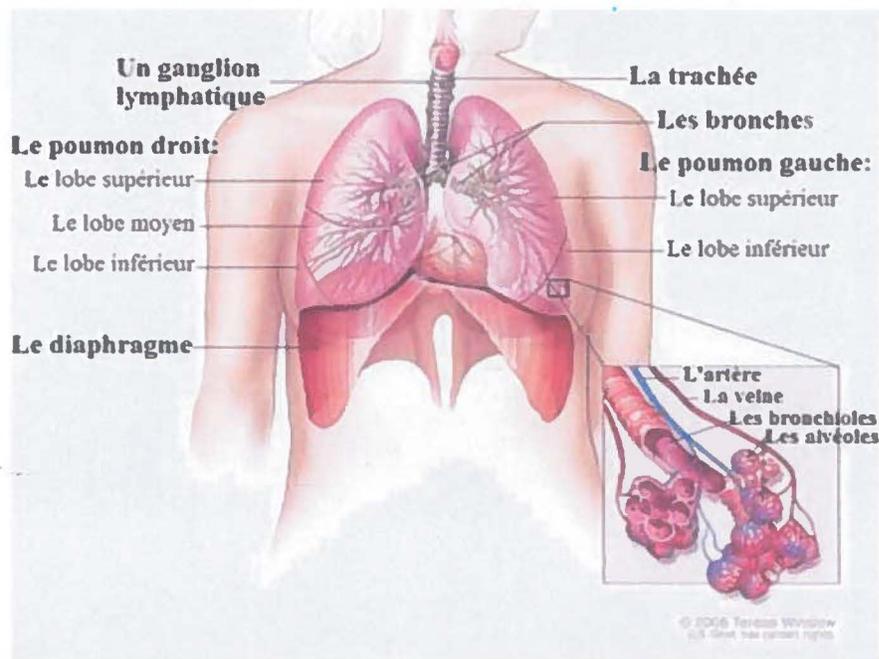
L'inhalation de vapeurs ou de poussières contenant des niveaux élevés de béryllium ($> 100 \mu\text{g}/\text{m}^3$) peut causer une toxicité aiguë (Sterner et Eisenbud, 1951). Cet effet fut observé chez certains travailleurs dans les années 1940 jusqu'à ce que des normes d'exposition furent établies (Cummings et al., 2009). Il traduit de l'action irritante directe du béryllium sur les muqueuses, notamment au niveau de l'arbre respiratoire, ce qui provoque une pneumonie chez les gens exposés, et peut également affecter la peau (Gadola et Gross, 2012). L'effet est souvent complètement réversible et est généralement considéré comme le phénomène d'une exposition à un composé chimique irritant (Cummings et al., 2009). Lors d'une réaction aiguë, une réponse inflammatoire précoce non-spécifique est également générée par le béryllium. Les particules phagocytées par les macrophages entraînent un dysfonctionnement au niveau de leur fonction phagocytaire, alors que certains sont tués et d'autres seulement endommagés. Les macrophages endommagés déversent des enzymes lysosomiales et d'autres intermédiaires chimiques qui vont stimuler le recrutement d'autres macrophages et autres cellules immunitaires. Certains médiateurs libérés par les macrophages peuvent alors augmenter la perméabilité pulmonaire et entraîner un œdème pulmonaire (Savary, 2003; Gadola et Gross, 2012).

1.2.4. Effets résultant d'expositions chroniques au béryllium

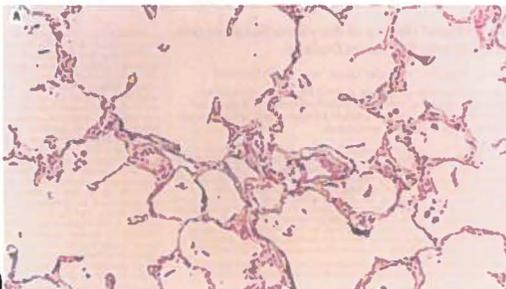
L'exposition chronique à des niveaux inférieurs au seuil permet de $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de béryllium peut engendrer une réponse immunitaire se traduisant généralement par une réaction d'hypersensibilité. Cela peut éventuellement mener à la maladie chronique du béryllium (MCB), ou béryllose. Il s'agit d'une maladie respiratoire à progression lente caractérisée par la formation de lésions inflammatoires connues sous le nom de granulomes, soit des cellules (macrophages et neutrophiles) groupées de manière compacte qui remplacent les tissus fonctionnant normalement dans les poumons. L'examen microscopique des populations cellulaires a révélé une inflammation caractérisée par une augmentation des cellules mononucléées interstitiels et un épaissement de la cloison alvéolaires (Mroz et al., 2009; Flynn et al., 2011). La MCB résulte donc d'une réponse immunologique chronique à une stimulation antigénique

persistante par le béryllium. Cette maladie mène à plusieurs troubles au niveau des poumons et de la peau, et peut également affecter le foie, la rate, les ganglions lymphatiques, les glandes salivaires, le cœur, le système nerveux et les muscles. Les observations cliniques montrent souvent une atteinte pulmonaire de type congestion, toux sèche et une détérioration des fonctions pulmonaires, mais aussi une fatigue générale, une perte de poids et d'appétit, de la fièvre et des suees nocturnes. Elle peut entraîner de graves dommages aux tissus et conduire au développement d'une fibrose pulmonaire irréversible ou à des troubles et obstructions des voies respiratoires, allant même jusqu'à causer des cancers dans des cas extrêmes (Bergeron et al., 1997; Agostini et al., 2001; Kolanz et al., 2001; Semenzato et Agostini, 2001).

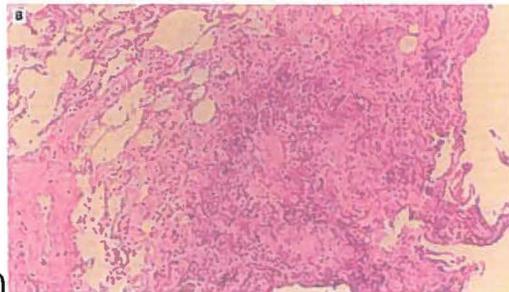
Il ressort que certaines personnes exposées au béryllium ou à ses composés deviennent sensibilisées, ce qui signifie que ces individus développeront une réponse immunitaire spécifique au béryllium, mais ne présente aucun signe de maladie pulmonaire. Selon la nature de l'exposition et la susceptibilité génétique de la personne exposée, la MCB se développe chez 1 à 18% des travailleurs exposés au béryllium (Kreiss et al., 1997; Kreiss et al., 2007). La progression du statut de sensibilisé vers celui de la MCB se produit à un taux de 6 à 8% par année (Newman et al., 2005). Cela suggère que la sensibilisation est généralement une condition nécessaire, mais insuffisante au développement de la maladie (Infante et Newman, 2004; Sawyer et al., 2004). L'importance de la sensibilisation dans la progression de la maladie n'est pas encore établie, mais l'hypothèse la plus communément acceptée voudrait qu'elle constitue un passage obligatoire vers la béryllose chronique. (Voir Figure 1)



A)



B)



C)

Newman, 1996

Figure 1 : Fibrose pulmonaire résultant d'expositions répétées au béryllium, A) Anatomie du poumon, B) Tissu pulmonaire normal C) Tissu pulmonaire pathologique e la bérylliose.

1.3. Système immunitaire

Le système immunitaire a pour rôle de prévenir et d'éradiquer les infections ainsi que d'empêcher la prolifération tumorale. La réponse immunitaire se déclenche parce que le système reconnaît des motifs moléculaires associés aux pathogènes, on parle d'antigènes du non-soi. L'organisme dispose de deux systèmes de défense : l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée correspond à une réponse d'action immédiate non spécifique à l'agent pathogène, alors que l'immunité adaptative, ou acquise, est spécifique à l'antigène du fait que les cellules de l'immunité adaptative portent un seul type de

récepteur capable de reconnaître un déterminant antigénique. La réponse adaptative est limitée dans le temps par l'éradication de l'agresseur et l'établissement d'une mémoire immunologique. Les organes et tissus lymphoïdes sont disséminés dans l'organisme. Les cellules immunitaires circulent à l'intérieur et entre ces organes via le sang et la lymphe. Elles communiquent entre elles par contact direct (récepteur-ligand) ou à distance par le biais de molécules sécrétées (récepteur-méiateur). Ces molécules sécrétées, solubles, sont appelées les cytokines. Les réactions coordonnées entre les cellules et cytokines constituent la réponse immunitaire.

1.3.1. Sensibilisation de type Hypersensibilité

Les réactions d'hypersensibilité correspondent à des réactions d'immunité spécifique dirigées contre des antigènes localisés sur des cellules ou dans des tissus. Elles sont à l'origine de lésions cellulaires ou de réactions inflammatoires. Ces réactions peuvent se développer dans le cadre de mécanismes de défense face à un microorganisme pathogène ou face à une substance chimique (Reeves et Krivanek, 1974). Robert Combs et Philip Gell ont proposé une classification des réactions d'hypersensibilités basées sur leurs mécanismes immunologiques effecteurs.

- La réaction d'hypersensibilité de type I regroupe les réactions impliquant les anticorps de type IgE.
- La réaction d'hypersensibilité de type II correspond aux destructions cellulaires et aux lésions tissulaires dues à l'action des anticorps et concerne plus particulièrement les destructions des cellules du sang.
- La réaction d'hypersensibilité de type III correspond aux lésions tissulaires induites par l'action des anticorps et du complément en particulier celles dues aux dépôts de complexe immuns dans les parois vasculaires ou bien leur formation au sein des tissus.

- La réaction d'hypersensibilité de type IV implique l'immunité à médiation cellulaire et des réponses de type Th1, un recrutement local de macrophages par les cytokines et chimiokines de lymphocytes T activés et enfin, si ce recrutement devient chronique, il y aurait formation de granulomes. Ce type de réaction est pertinent dans le cas de la béryllose (Reeves et Krivanek, 1974; Bergschmidt et al., 2012).

Une autre classification révisée selon Johansson propose deux types d'hypersensibilités. Une hypersensibilité allergique (mécanisme immunologique prouvé) et une hypersensibilité non allergique (Johansson et al., 2004).

1.3.2. Lymphocytes T

Les lymphocytes T jouent un rôle crucial au cours des réponses immunitaires adaptatives. Leur différenciation secondaire s'effectue au niveau du thymus, et ultérieurement ils colonisent les organes lymphoïdes où s'achèvera leur différenciation (Lacombe, 2007). La différenciation des lymphocytes T implique la formation de différentes sous-populations : les lymphocytes T auxiliaires, ou cellules T helper (Th), qui expriment la molécule membranaire CD4, les lymphocytes T effecteurs, qui donnent naissance aux lymphocytes cytotoxiques (T_C) exprimant le CD8 et les lymphocytes T régulateurs (Treg) qui vont exprimer le facteur de transcription FoxP3 dont le niveau et la stabilité d'expression corrèlent avec leur fonction suppressive (Lacombe, 2007).

Les lymphocytes T CD4⁺ jouent le rôle de régulateurs. Les diverses fonctions des cellules T CD4⁺ sont déterminées par la sécrétion de cytokines dans le but d'augmenter la phagocytose et de stimuler une réponse inflammatoire (Zhu et Paul, 2008). Ils recrutent et activent les lymphocytes T CD8⁺, vont aider les cellules B à produire des anticorps et à se soumettre au changement isotypique en plus de participer à la maturation de l'affinité des anticorps.

1.3.2.1. *Activation des lymphocytes T CD4⁺*

L'activation optimale des cellules T naïves nécessite deux événements de signalisation (Bretscher et Cohn, 1970; Bluestone, 1995). D'abord, les récepteurs des cellules T (TCRs) des CD4⁺ naïves doivent généralement se lier au peptide étranger attaché au complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII) situé sur les cellules présentatrices d'antigène (CPAs) pour initier l'activation. Les CPAs incluent les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques. L'interaction entre le CMHII et le TCR a lieu dans les domaines des cellules T des organes lymphoïdes secondaires (Davis, 1990). Le signal est déclenché par le CD3, qui est associé au TCR. Le second signal, appelé signal de costimulation, est fréquemment médié par la liaison entre la molécule CD28-CD2 exprimées par les cellules T avec leur ligand B7-1 ou B7-2 présent sur les CPAs (Harding et al., 1992).

Lorsque ces conditions sont remplies, les cellules T naïves vont alors produire des interleukines et des les cytokines nécessaires pour la prolifération et la génération des lymphoblastes ou cellules effectrices (Jenkins et al., 2001). Les cellules effectrices existent en lignées définies selon les facteurs de transcription qu'elles expriment et leur profil de production d'interleukines (Zhu et al., 2010). Les cellules T CD4⁺ naïves ont quatre, au minimum, destins distincts possibles qui sont déterminés par la nature des signaux qu'ils reçoivent lors de leur interaction initiale avec l'antigène. Ces quatre principales populations de cellules sont les Th1, Th2 et Th17, qui sont des cellules effectrices, et les cellules T régulatrices induites (iTreg). Une portion de ces différentes populations deviendra des cellules T mémoires (Mosmann et Coffman, 1989). Les cellules Th exercent leurs fonctions principalement par le biais des cytokines et des chimiokines qu'elles sécrètent, qui activent et/ou recrutent les cellules cibles ou effectrices. Donc la population de Th vers laquelle les cellules T CD4⁺ se différencie est déterminante dans le rôle qu'elles joueront.

1.3.2.2. *Lymphocytes T helper 1 (Th1)*

Les cellules Th1 pro-inflammatoires médient les réponses immunitaires contre les pathogènes intracellulaires (Mosmann et Coffman, 1989; Paul et Seder, 1994). Chez les humains, elles jouent un rôle important dans la résistance aux virus et aux infections mycobactériennes. Cependant, les réponses des cellules Th1 doivent être contrôlées étroitement pour prévenir les maladies. Par exemple, l'activation inappropriée des lymphocytes Th1 en réponse à un auto-antigène ou à des antigènes inoffensifs (dérivé de la nourriture, du matériel particulaire de l'air ou de commensaux de l'intestin) conduit à des maladies auto-immunes. Par exemple, la sclérose en plaques (SEP) est provoquée par des réactions auto-immunes caractérisées par la filtration des cellules lymphocytaires et mononucléaires du système nerveux central. Chez l'homme, la maladie a également été associée à des mutations au niveau des récepteurs à l'IFN- γ (Kantarci, 2008). La polyarthrite rhumatoïde (PA) est causée par une réaction auto-immune chronique qui conduit à la destruction des articulations. Elle est caractérisée par l'accumulation de lymphocytes T effecteurs y compris les lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ (Harris, 1990; Manadan et Block, 2008). Le diabète de type 1 est causé par la destruction chronique des cellules productrices d'insuline bêta des îlots pancréatiques par les lymphocytes T auto-agressifs. Sa pathogénie est liée à une augmentation de la cytotoxicité des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ et une voie immunitaire Th1 biaisée (Haskins et McDuffie, 1990; Moutschen et al., 1992).

Les principales cytokines produites par les cellules Th1 sont l'interféron gamma (IFN- γ), la lymphotoxine α (LT α) et l'interleukine 2 (IL-2). Le phénotype cellulaire Th1 dépend des signaux de l'IL-12, qui mènent à l'activation de Stat4 (Signal transducer and activator of transcription 4). Celui-ci induit l'expression du facteur de transcription signature des cellules Th1, T-bet, qui induit alors la production d'IFN- γ (Infante et Newman, 2004).

1.3.2.3. *Lymphocytes T helper 2 (Th2)*

Les cellules Th2 sont dites anti-inflammatoires Elles sont impliquées dans l'immunité

humorale et sont donc importantes dans la défense de l'hôte contre les parasites extracellulaires (Mosmann et Coffman, 1989; Paul et Seder, 1994). La différenciation des cellules effectrices Th2 requiert le récepteur d'IL-4 et de la stimulation du TCR, et se caractérise par la production d'IL-4, IL-5 et IL-13 (Ansel et al., 2006). L'engagement de la lignée Th2 est généralement initié par la signalisation via le récepteur de l'IL-4 via STAT6, qui régule l'expression de GATA-3 (Guanosine, Adénosine, Thymidine, Adénosine-3). À son tour, GATA-3 auto-induit sa propre expression dans une boucle de rétroaction positive. GATA-3 est un membre de la famille des protéines de liaison à l'ADN en doigt de zinc. Il est à la fois nécessaire et suffisant pour amorcer la différenciation des cellules CD4⁺ naïves en Th2 (Zhang et al., 1997; Zheng et Flavell, 1997). Il est donc défini comme étant le facteur de spécification vers la lignée Th2 (Infante et Newman, 2004).

Les lymphocytes Th2 joueraient un rôle dans l'induction et la persistance de l'asthme et d'autres maladies allergiques. L'asthme serait provoqué en partie par la sécrétion d'interleukines, par exemple IL-4, IL-5 et IL-13. Ces cytokines produites par les lymphocytes Th2 activées, stimulent l'activation des cellules B et la sécrétion d'IgE. Les cytokines des cellules Th2 et les IgE activent les cellules du système immunitaire inné, telles que les éosinophiles et les mastocytes. Cela provoque la libération de médiateurs vaso-actifs, pro-inflammatoires, la contraction du muscle lisse, l'hypersécrétion de mucus, l'œdème et le remodelage des voies aériennes. L'homéostasie et la survie des cellules T mémoire dans les ganglions lymphatiques et les poumons perpétuent la maladie (Bosnjak et al., 2011). Il a aussi été démontré que l'ARNm de la protéine de liaison GATA-3 était élevé dans les voies respiratoires des patients asthmatiques comparé aux contrôles (Nakamura et al., 1999).

1.3.2.4. *Lymphocytes T helper 17 (Th17)*

Les cellules Th17 médient les réponses immunitaires contre les bactéries extracellulaires et champignons. Elles participent à l'induction de maladies auto-immunes

dans des organes spécifiques (Weaver et al., 2006), et produisent de l'IL-17A, IL-17F, IL-21 et IL-22 (Harrington et al., 2005; Park et al., 2005).

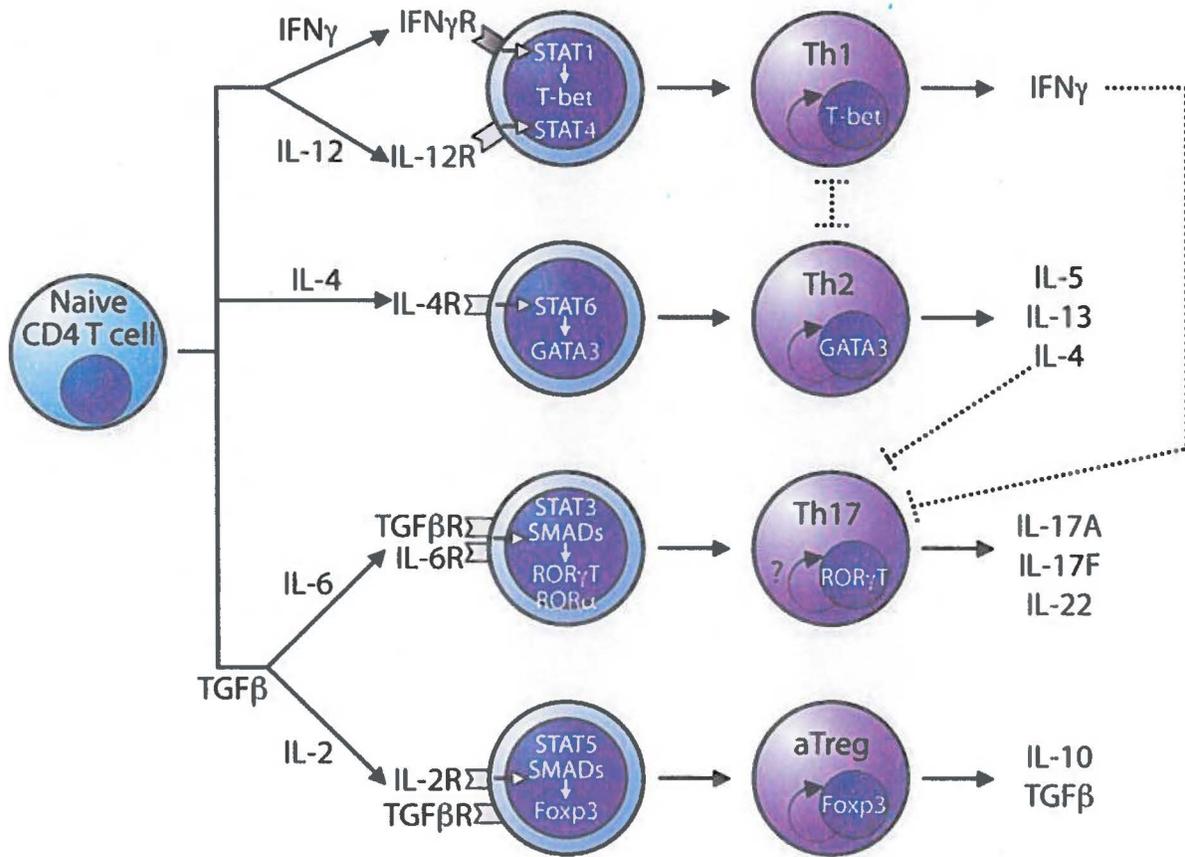
1.3.2.5. *Lymphocytes T régulatrices (Treg)*

Les cellules Treg jouent un rôle crucial dans le maintien de la tolérance au soi, ainsi que dans la régulation de la réponse immunitaire (Sakaguchi, 2004). Elles ont des fonctions immunosuppressives, et l'augmentation de leur nombre et l'amélioration de leur fonction peut être bénéfique pour le traitement des maladies auto-immunes et pour prévenir le rejet d'allogreffe. Pendant les premières étapes d'une infection, l'inflammation est contrôlée par l'expansion clonale et le recrutement local de cellules Treg naturelles, qui vont reconnaître des auto-antigènes et limiter la réponse immunitaire innée par l'expression de l'IL-10 et CTLA-4. CTLA-4 induit la synthèse de l'idole amine 2,3-dioxygénase (IDO) par les cellules dendritiques (CD) en inhibant l'activation des lymphocytes T effectrices, induisant ainsi leur mort. Les cellules Treg adaptatives sont alors générées. Elles synthétisent l'IL-10 et le TGF- β , des inhibiteurs de l'activité des lymphocytes Th1 et Th2. Le TGF- β et l'IL-10 sont des cytokines jouant un rôle important dans la régulation de l'inflammation. Le TGF- β est impliqué dans la tolérance immunitaire aux antigènes du soi, alors que l'IL-10 régule l'immunité innée et adaptative pour limiter l'ampleur de la réponse immunitaire à des antigènes microbiens. Les cellules Treg permettent donc de contrôler les maladies auto-immunes et de limiter les lésions tissulaires collatérales lors d'une infection (Chatila et al., 2008).

1.3.2.6. *Lymphocytes T mémoires*

Les cellules T CD4⁺ mémoires peuvent répondre à des concentrations plus faibles d'un antigène et sont moins dépendantes des signaux de costimulation en comparaison aux cellules T CD4⁺ naïves (London et al., 2000; Berard et Tough, 2002). Elles sont générées lors de la réponse primaire à partir de la descendance des cellules effectrices (Pepper et Jenkins, 2011). Une corrélation a été établie chez les cellules T CD4⁺ activées entre le

niveau d'expression de la chaîne α du récepteur pour l'IL-7 et le taux de survie (Kondrack et al., 2003; Li et al., 2003). Cela suggère une importance des signaux générés par l'IL-7 pour la génération des cellules T CD4⁺ mémoires. La force du signal déclenché par le complexe TCR/CD3 aurait aussi une influence importante, car les cellules qui reçoivent un signal relativement faible sont moins aptes à rivaliser avec les cellules T possédant une affinité plus grande pour l'antigène (Williams et al., 2008). Les lymphocytes T CD4⁺ mémoire se divisent en deux catégories, les cellules T mémoire effectrices (cellules T_{EM}) et les cellules T mémoire centrale (cellules T_{CM}). Les cellules T_{EM}, sont situées dans les sites non-lymphoïdes et produisent rapidement des lymphokines microbicides (Sallusto et al., 2004). Suite à leur stimulation subséquente, elles se divisent durant une période plus courte comparativement aux cellules T CD4⁺ effectrices (MacLeod et al., 2008). Cette prolifération réduite résulte de la différence au niveau du profil des cytokines produites quelques jours après leur activation, car les cellules T_{EM} produisent alors davantage d'IFN- γ et moins d'IL-2 que les lymphocytes T CD4⁺ nouvellement activés. Inversement, les cellules T_{CM} sécrètent surtout de l'IL-2 et prolifèrent abondamment suite à seconde activation via le TCR et le complexe d'histocompatibilité des cellules dendritiques (Pepper et Jenkins, 2011). Elles vont éventuellement produire d'autres types de cytokines, mais seulement après un certain temps. Elles expriment le CD62L et le récepteur à chimiokines CCR7, qui sont impliqués dans la migration à l'intérieur des ganglions lymphatiques et des muqueuses des organes lymphoïdes pour leur positionnement dans les aires des cellules T de ces organes (Cyster, 2005) (voir Figure 2).



(Chatila et al., 2008).

Figure 2 : Différenciation des lymphocytes T et la régulation croisée entre les sous-ensembles de cellules T.

1.4. Cytokines

Les cytokines sont un groupe de petits peptides ou glycoprotéines ayant un poids moléculaire entre 8 et 30 kDa (Yu et al., 2012). Ce sont des molécules solubles qui sont impliquées dans la communication intercellulaire et sont produites par une grande variété de cellules (Tracey et Cerami, 1993). Elles comprennent plusieurs sous-familles dont la famille des interférons, des interleukines, des facteurs de nécrose tumorale (TNF), des facteurs de croissance transformant (TGF- β), des facteurs de stimulation des colonies et des chimiokines. Les cytokines médient plusieurs processus biologiques fondamentaux, y compris la croissance, l'adiposité, la lactation, l'hématopoïèse, ainsi que l'inflammation et l'immunité (Tilg et Diehl, 2000; Miller AM, 2011) (Voir Tableau 2).

Tableau 2 : Principales cytokines et leur rôle dans le système immunitaire

Cytokine*	Secreted by**	Targets and effects
SOME CYTOKINES OF INNATE IMMUNITY		
Interleukin 1 (IL-1)	Monocytes, macrophages, endothelial cells, epithelial cells	Vasculature (inflammation); hypothalamus (fever); liver (induction of acute phase proteins)
Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)	Macrophages	Vasculature (inflammation); liver (induction of acute phase proteins); loss of muscle, body fat (cachexia); induction of death in many cell types; neutrophil activation
Interleukin 12 (IL-12)	Macrophages, dendritic cells	NK cells; influences adaptive immunity (promotes T _H 1 subset)
Interleukin 6 (IL-6)	Macrophages, endothelial cells	Liver (induces acute phase proteins); influences adaptive immunity (proliferation and antibody secretion of B cell lineage)
Interferon α (IFN- α) (This is a family of molecules)	Macrophages	Induces an antiviral state in most nucleated cells; increases MHC class I expression; activates NK cells
Interferon β (IFN- β)	Fibroblasts	Induces an antiviral state in most nucleated cells; increases MHC class I expression; activates NK cells
SOME CYTOKINES OF ADAPTIVE IMMUNITY		
Interleukin 2 (IL-2)	T cells	T-cell proliferation; can promote AICD. NK cell activation and proliferation; B-cell proliferation
Interleukin 4 (IL-4)	T _H 2 cells; mast cells	Promotes T _H 2 differentiation; isotype switch to IgE
Interleukin 5 (IL-5)	T _H 2 cells	Eosinophil activation and generation
Interleukin 25 (IL-25)	Unknown	Induces secretion of T _H 2 cytokine profile
Transforming growth factor β (TGF- β)	T cells, macrophages, other cell types	Inhibits T-cell proliferation and effector functions; inhibits B-cell proliferation; promotes isotype switch to IgE; inhibits macrophages
Interferon γ (IFN- γ)	T _H 1 cells; CD8 ⁺ cells; NK cells	Activates macrophages; increases expression MHC class I and class II molecules; increases antigen presentation

*Many cytokines play roles in more than one functional category.

**Only the major cell types providing cytokines for the indicated activity are listed; other cell types may also have the capacity to synthesize the given cytokine.

**Also note that activated cells generally secrete greater amounts of cytokine than unactivated cells.

Kindt, T. J., Osborne, B. A. & Goldsby, R. A. (2006) Kuby Immunology. 6th Edition, p. 281.

1.4.1. Interleukine-2

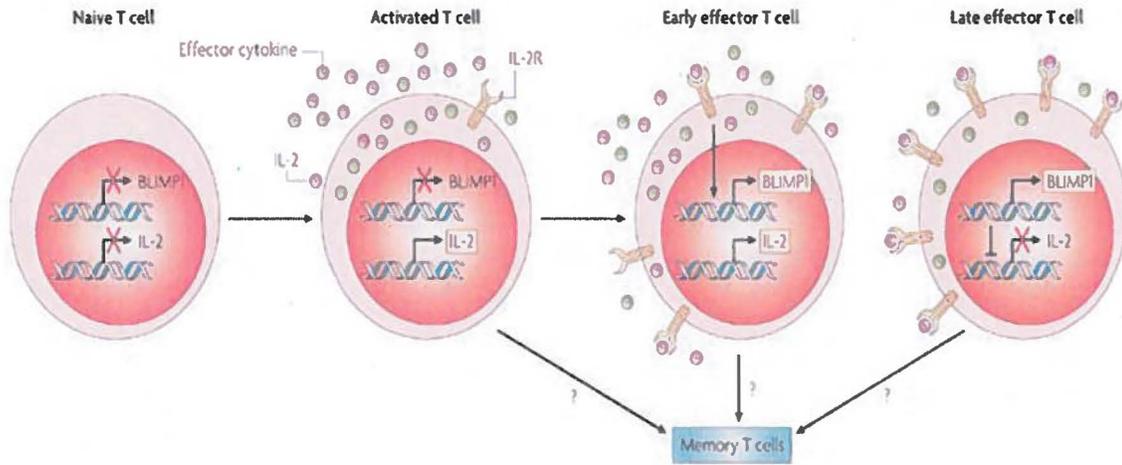
En raison de son activité de puissant facteur de croissance des lymphocytes T *in vitro*, l'IL-2 a été largement étudiée en partie parce que cette activité a offert un moyen potentiel de stimuler l'immunité directement. L'IL-2 est principalement produite par les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires (Th1) au niveau des organes lymphoïdes secondaires et, dans une moindre mesure, par les lymphocytes T CD8⁺, les cellules tueuses naturelles (NK) et les cellules T tueuses naturelles (NKT) (Setoguchi et al., 2005; Malek, 2008). Sous

certaines conditions, l'IL-2 peut également être synthétisée en petites quantités par les cellules dendritiques (DC) activées ainsi que par les mastocytes (Granucci et al., 2001; Hershko et al., 2011).

L'induction de la production d'IL-2 est sous la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle dépendante de l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et NFAT (Facteur nucléaire des lymphocytes T activés) (Jain et al., 1995). Le facteur de transcription des lymphocytes B induisant la maturation de la protéine 1 (Blimp1, ou PRDM1) régule aussi la production d'IL-2 en inactivant le gène *IL2* (Butnor et al., 2003)(voir Fig.3). Blimp1 est activé par l'IL-2 et à son tour réprime la production d'IL-2, ce qui induit un mécanisme de rétroaction négative. Les lymphocytes T effecteurs différenciés en cellules mémoire, en particulier les cellules T_{CM}, expriment des niveaux faibles de Blimp1 et conservent la capacité à produire de l'IL-2 (Comhair et al., 1999; Chaudhary et al., 2004). Toutefois, une exposition prolongée des cellules T mémoires à l'antigène conduit à la régulation positive de l'expression de Blimp1, ce qui réduit progressivement leur capacité à sécréter de l'IL-2 dès qu'elles sont définitivement différenciées ou épuisées (Comhair et al., 1999; Chaudhary et al., 2004; Day et al., 2007). Une telle stimulation persistante des cellules T via leur TCR par des antigènes en collaboration avec les signaux induits par l'IL-2 peut également induire l'expression du récepteur de mort FAS, ou CD95, et du ligand FAS, ou CD95L. Cela favorise l'apoptose de ces cellules par l'intermédiaire du processus de la mort cellulaire induite par activation (AICD ou Activation-induced cell death) (Frome et al., 2003; Fontenot et al., 2006).

L'IL-2 joue donc un rôle important dans l'homéostasie des lymphocytes T. Les signaux induits par cette cytokine peuvent influencer la différenciation des cellules T CD4⁺ effectrices en cellules Th1 ou Th2. La production d'IFN- γ induite par T-bet est renforcée par la coproduction d'IL-2 par les cellules T répondantes (Henneberger et al., 2001). La signalisation déclenchée par l'IL-2 chez les cellules Th2 induit l'expression précoce de la chaîne α du récepteur IL-4R et maintient le locus du gène *IL-4* dans une configuration accessible pendant les derniers stades de la différenciation cellulaire des Th2 (Kokturk et

al., 2009). L'IL-2 peut également agir sur d'autres types cellulaires. Elle induit notamment la prolifération des macrophages et des cellules NK et NKT (Hoyer et al., 2008).



Nature Reviews | Immunology

(Nutt et al., 2007)

Figure 3 : Modèle de l'interaction de Blimp1 et de l'IL-2 dans la différenciation des cellules T

1.4.1.1. Récepteur de l'interleukine-2

L'IL-2 est une protéine de 15 kDa constituée de quatre hélices α qui se lie à un récepteur de haute affinité (trimère) ou de faibles affinités (dimère) (Barna et al., 2002). Le récepteur de faible affinité est constitué de la chaîne β (IL-2R β), ou CD122, et la chaîne γ , ou CD132. Du fait de sa faible affinité pour l'IL-2 (constante de dissociation (Kd) $\approx 10^{-9}$ M), ce récepteur doit être exprimé à un niveau relativement élevé pour générer une réponse en présence d'IL-2 (Waldmann, 2006). Le récepteur de haute affinité possède en plus la chaîne alpha (IL-2R α), ou CD25, qui est surtout exprimés sur les cellules Treg et les lymphocytes T récemment activés par un antigène (Wang et al., 2005; Stauber et al., 2006). La chaîne β du récepteur est constitutivement exprimée par les lymphocytes T, cellules NK, NKT et les cellules mémoires T CD8⁺, alors que la chaîne γ est moins strictement régulée et est constitutivement exprimée par toutes les cellules lymphoïdes (Muller et al., 2010).

1.4.2. Interféron- γ

L'IFN- γ est sécrété par les cellules du système immunitaire inné (les cellules NK) et du système immunitaire adaptatif (les lymphocytes cytotoxiques CD8⁺ et les cellules T CD4⁺ de type Th1) (Pernis et al., 1995; Schoenborn et Wilson, 2007). Initialement, on pensait que seulement ces cellules produisaient l'IFN- γ , cependant il a été démontré que d'autres cellules, comme les lymphocytes B, les cellules NKT et les CPAs sécrètent elles aussi de l'IFN- γ (Bach et al., 1997; Tinkle et al., 1997; Frucht et al., 2001; Rossman et al., 2002; Nilsen et al., 2010). La production d'IFN- γ local par les CPAs joue un rôle important dans l'auto-activation de la cellule et la défense précoce de l'hôte contre une infection (Toledo et al., 2011; Van Dyke et al., 2011). Les lymphocytes T deviennent la principale source d'IFN- γ lors de la réponse immunitaire adaptative (Frucht et al., 2001; Sen, 2001). La production d'IFN- γ est contrôlée par des cytokines sécrétées par les CPA, notamment l'IL-12 et l'IL-18. Ces cytokines servent de pont entre la réponse immunitaire adaptative et innée pour combattre les infections de par leur rôle d'induction de la production d'IFN- γ (Ding et al., 2000; Fukao et al., 2000; Munder et al., 2001; Rana, 2008).

L'IFN- γ agit comme un médiateur intercellulaire capable de moduler la prolifération et la différenciation cellulaire, d'accroître la présentation de l'antigène aux CMH de classe I et II, d'activer la fonction cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ et des cellules NK, de réguler la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en Th1/Th2 et d'activer la production d'anticorps par les lymphocytes B (De Maeyer et De Maeyer-Guignard, 1998). Il peut aussi influencer la survie cellulaire en modulant l'apoptose, en ayant paradoxalement soit un effet pro ou anti-apoptotique (Marchand-Adam et al., 2008). L'effet anti-apoptotique de l'IFN- γ est observé chez les cellules T CD4⁺ dépourvues du récepteur pour l'IFN- γ . Celles-ci sont alors résistantes à l'AICD (Mort cellulaire induite par activation). L'IFN- γ augmenterait l'apoptose des cellules T CD4⁺ par la voie mitochondriale (Li et al., 2007). L'IFN- γ serait aussi requis pour la production des caspases (Chen et Moller, 2007). Chez les cellules dendritiques, l'IFN- γ médie l'apoptose en induisant l'expression de l'enzyme indole amine

2,3-dioxygénase (IDO), une enzyme qui dégrade le tryptophane chez les cellules dendritiques, et permet d'inhiber les réponses des cellules T *in vitro* et *in vivo* par l'épuisement du tryptophane, un acide aminé essentiel (Mellor et Munn, 2004). Une autre enzyme induite également par l'IFN- γ est l'iNOS (inductible NO synthase). L'induction de iNOS par l'IFN- γ régule négativement la production de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-1 β (Guedez et al., 2001).

Foulds et al ont montré que l'IFN- γ aurait un rôle central dans la régulation de toutes les étapes de différenciation des cellules Th1 et des cellules mémoires (Foulds et al., 2008). Dans cette étude, il a été observé que les cellules Th1 produisant de l'IFN- γ étaient éliminées suite à leur activation *in vivo*. Par contre, chez les souris dont le gène du récepteur IFNGR a été inactivé, ou chez les souris traitées avec des anticorps anti-IFN- γ , il a été observé que ces cellules Th1 survivaient après une stimulation antigénique. Cette étude propose que pendant la génération d'une première réponse des cellules Th1, l'IFN- γ agit comme régulateur positif sélectif en induisant la différenciation des cellules Th1. L'IFN- γ est plutôt considéré comme une cytokine pro-inflammatoire en raison de ses capacités antivirales, sa capacité à stimuler les macrophages, les réponses Th1 et l'activité des cellules T cytotoxiques.

1.4.2.1. Récepteur de l'interféron- γ

Le récepteur pour l'IFN- γ est un récepteur possédant deux sous-unités, IFNGR1 (Interferon gamma receptor 1), ou chaîne α , de 90 kDa responsable de la liaison à l'IFN- γ , et IFNGR2 (Interferon gamma receptor 2), ou chaîne β , de 27 kDa en partie impliquée dans la transmission du signal (Bach, Aguet et al. 1997; El-Beshbishy, Hassan et al. 2012). La fixation à l'IFN- γ induit une autophosphorylation de Jak2, donc son activation, ce qui permet la transphosphorylation de Jak1 par Jak2 (Hensley, Robinson et al. 2000; Pan, Hong et al. 2009). Le domaine intracellulaire de l'IFNGR1 contient des motifs de liaison de la tyrosine kinase Jak1 et du facteur de transcription Stat1 (Kaplan, Greenlund et al. 1996; Nemery 2003; Nirala, Bhadauria et al. 2008). La région intracellulaire de l'IFNGR2 contient

un motif non contigu contraignant pour le recrutement de la kinase Jak2 afin de participer à la transduction du signal (Kotenko, Izotova et al. 1995; Nemery, Bast et al. 2001). Les deux chaînes du IFNGR n'ont pas d'activité kinase/phosphatase intrinsèque et doivent donc s'associer à la machinerie de signalisation pour la transduction du signal. L'homodimère Stat1 dissocié pénètre dans le noyau et se lie à des éléments du promoteur pour amorcer la transcription ou la suppression des gènes régulés par l'IFN- γ (Kolanz, Madl et al. 2001; Turrens 2003; Flynn, Chan et al. 2011). La plupart des gènes induits sont des facteurs de transcription (par exemple, l'IRF-1 ou Interferon regulatory factor-1) qui vont être en mesure de réguler la vague de transcription subséquente.

1.5. Sensibilisation au béryllium

Le processus de sensibilisation au béryllium résulte du fait que celui-ci entraîne une réponse immunitaire à médiation cellulaire dans les poumons. Il y a alors formation d'une population de cellules T CD4⁺ sensibilisées au niveau des poumons et dans la circulation périphérique (Sawyer et Maier, 2011). Pour arriver à ce niveau, le béryllium est d'abord capté par les cellules présentatrices d'antigène, qui vont alors le présenter comme antigène via leur CMHII. Les cellules T, à l'aide de leur TCR, détecteront cet antigène et seront ainsi activées. Cela a pour effet d'entraîner une libération de cytokines de type Th1 et conduit à la formation de cellules T mémoires.

1.5.1. Captation du béryllium par les cellules présentatrices d'antigène

La formation de complexes peptide-CMHII se produit dans le réticulum endoplasmique des CPAs, où la poche de liaison du CMHII est occupée par le peptide de classe II associé à la chaîne invariable CLIP (Class II-associated invariant chain peptide), qui empêche une liaison peptidique non désirée. Lorsque le peptide CLIP est enlevé par voie enzymatique, cela permet aux peptides antigéniques d'entrer dans la poche de liaison. Le peptide lié au CMHII est alors transporté à la surface des CPAs où il peut être présenté aux autres cellules immunitaires (Amicosante et al., 2009). Deux études ont constaté que le béryllium pouvait

supplanter le peptide de haute affinité CLIP pour se lier aux molécules HLA-DP qui constituent le CMHII (Amicosante et al., 2001; Berretta et al., 2003). D'autres études ont montré que les interactions entre le béryllium et des groupes carboxylates dans la poche de liaison au niveau des HLA-DP peut entraîner la formation d'amas de béryllium associés au peptide lié (Scott et al., 2003). Pour appuyer cette idée, une étude menée par Keizer et al. a démontré qu'au pH physiologique, le béryllium formerait des amas en anneaux stables avec l'oxygène. La poche de liaison du CMHII contient six groupements carboxylate. Le béryllium pourrait donc former des complexes stables liés par l'intermédiaire d'un ou plusieurs de ces groupements (Snyder et al., 2003; Keizer TS et al., 2005).

Quant à l'habilité des CPAs à ingérer et présenter l'antigène béryllium suite à son internalisation, cet élément est encore peu compris. Des études ont montré que les macrophages possèdent la capacité de phagocyter le béryllium (Hanifin et al., 1970; Sawyer et al., 2004). Celui-ci induirait par contre, suite à son ingestion, des hauts taux d'apoptose chez les macrophages pulmonaires (Kittle et al., 2002; Sawyer et al., 2004; Sawyer et al., 2005). Une autre étude a observé, à partir d'une lignée de macrophages de souris, qu'il y avait endocytose et dégradation des particules d'oxyde de béryllium, puis relargage du béryllium dans le milieu de culture (Day et al., 2005). Ces résultats suggèrent que les macrophages pourraient retirer les particules contenant du béryllium des poumons, les dégrader pour rendre le béryllium biodisponible, et renvoyer le béryllium dans les poumons et ainsi perpétuer la réponse immunitaire (Sawyer et Maier, 2011).

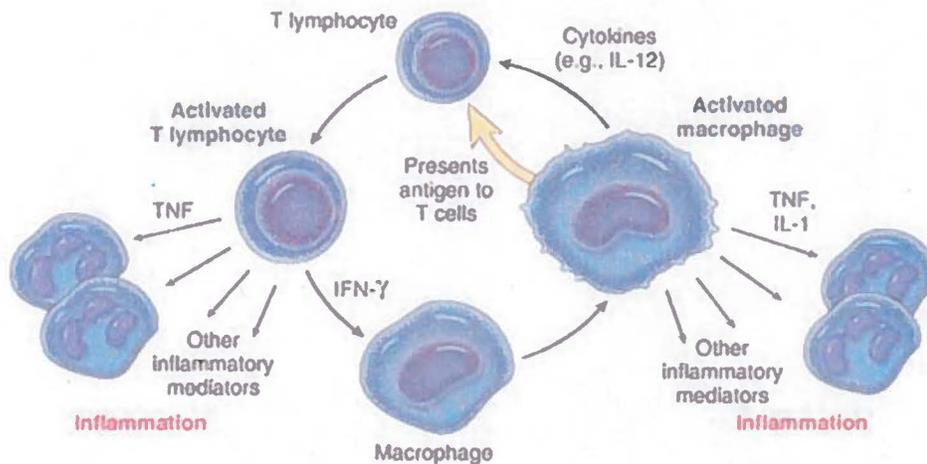
1.5.2. Présentation du béryllium aux lymphocytes T CD4⁺

Le béryllium, lorsqu'il est lié au CMHII des CPAs, devient disponible pour être détecté par les lymphocytes T CD4⁺ via leur TCRs (Fontenot et al., 2001). Il a été démontré que cette étape est nécessaire pour l'activation des cellules T en présence de béryllium. Saltini et al ont observé *in vitro* que la prolifération de cellules T CD4⁺ isolées de patients atteints de la béryllose était bloquée par des anticorps anti-CMHII, mais non par des anticorps anti-CMHI en présence de béryllium (Saltini et al., 1989). La réponse antigénique générée par le

béryllium est donc restreinte au CMHII. Saltini et al. ont aussi étudié les clones spécifiques au béryllium et constaté qu'ils avaient tous un réarrangement différent de leur TCR. Cela suggère que les cellules T CD4⁺ sensibilisées au béryllium possèdent des spécificités différentes pour l'antigène. D'autres études ont également cherché à déterminer s'il y avait une similarité au niveau du TCR des lymphocytes T CD4⁺ sensibilisés au béryllium (Fontenot et al., 1998; Fontenot et al., 1999; Lombardi et al., 2001). Elles ont observé la présence du motif TCRV β 3 pour une grande proportion des cellules T CD4⁺ isolées à partir de lavage bronchoalvéolaire (LBA) de patients atteints de la béryllose.

1.5.3. Activation des lymphocytes T CD4⁺ sensibilisés

L'activation des cellules T CD4⁺ par le béryllium engendre une libération de cytokines pro-inflammatoires. Fontenot et al ont démontré, à l'aide de cellules obtenues par LBA, que les lymphocytes T CD4⁺ spécifique au béryllium produisent de l'IFN- γ , du TNF- α et de l'IL-2 lorsqu'ils sont stimulés avec du béryllium en absence de CPAs (Fontenot et al., 2006). Les cytokines de type de Th1 sont donc prédominantes au niveau des poumons lorsque les cellules T CD4⁺ sensibilisées sont activées par le béryllium. La plupart de ces cellules ne nécessiteraient pas de co-stimulation du CD28 pour produire et sécréter leurs cytokines, car elles n'expriment plus le CD28, tant au niveau de la protéine que pour l'ARN messenger, mais continue de répondre en culture (Fontenot et al., 2003). La perte d'expression du CD28 par les lymphocytes T est généralement associée à une inflammation chronique résultant d'une exposition soutenue à des cytokines pro-inflammatoires (Bryl et al., 2001; Vallejo et al., 2004). Cela est notamment le cas dans un contexte d'exposition antigénique chronique (voir Figure 4).



Kumar V. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 2010, 8th ed.

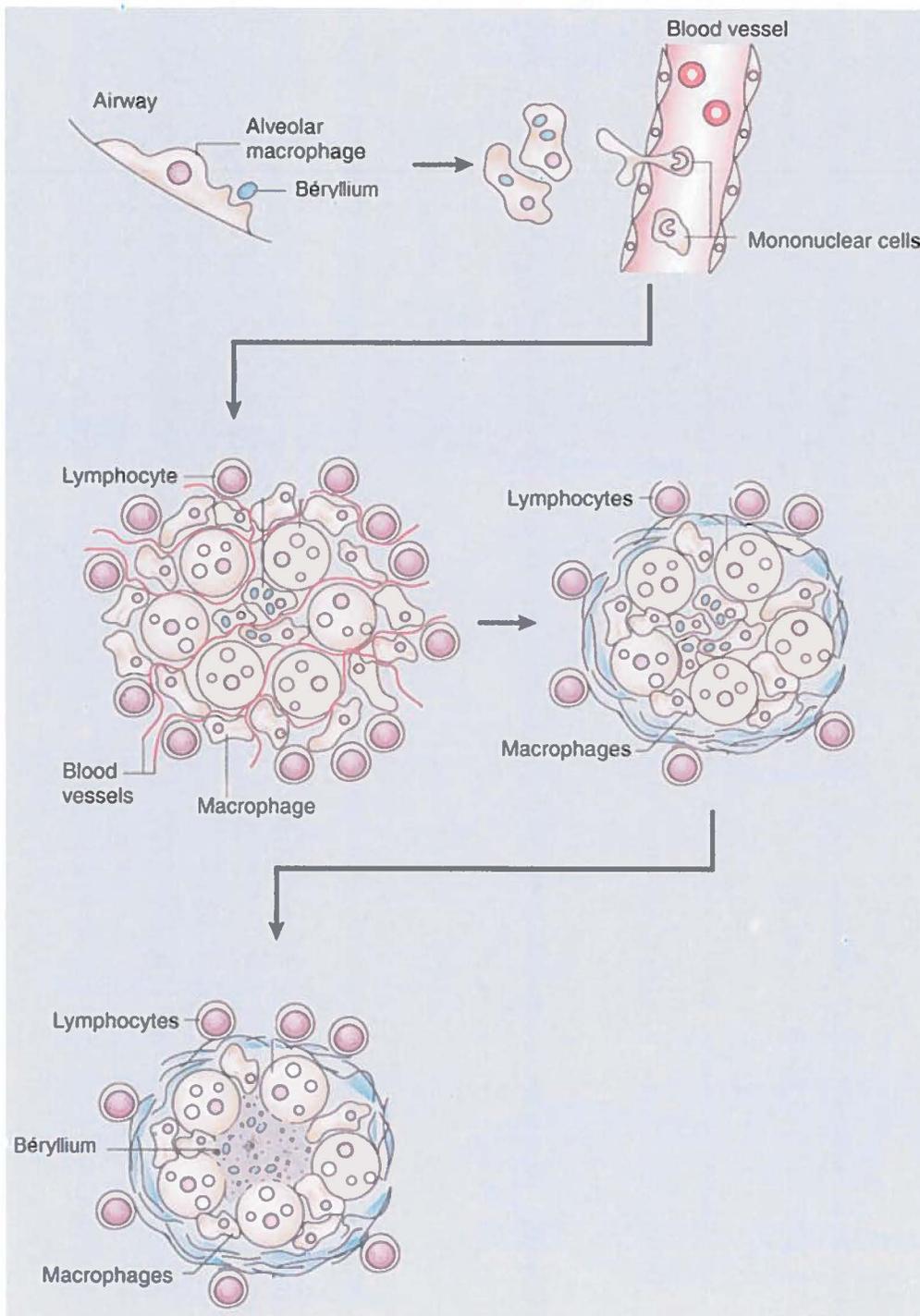
Figure 4 : Activation et recrutement des macrophages par les lymphocytes lors de l'inflammation chronique

1.5.4. Formation de cellules mémoires

Fontenot et al. ont observé que les lymphocytes T CD4⁺ spécifiques au béryllium récoltés par LBA étaient indépendants de la costimulation du CD28, mais que cela n'était pas le cas de ceux récoltés dans la circulation périphérique (Fontenot et al., 2003). Cela suggère une différence dans la maturation des cellules T CD4⁺ mémoire selon le compartiment. Les cellules T_{EM} et T_{CM} peuvent être expérimentalement différencié par l'analyse de l'expression du récepteur homing des ganglions lymphatiques CCR7. Celui-ci est exprimé par les cellules T_{CM}, mais non par les T_{EM} (Fontenot et al., 2005). Fontenot et al. ont effectué une étude avec 23 patients atteints de la béryllose et 9 patients sensibilisés au béryllium pour analyser le profil des cellules T CD4⁺ mémoire récoltées par LBA ou de la circulation périphérique (Fontenot et al., 2005). Ils ont montré que la majorité des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques au béryllium, tant dans le sang que les poumons, exprimaient un phénotype de cellule T_{EM}. La plus grande fréquence de cellules T_{CM} spécifiques au béryllium et exprimant de l'IL-2 était mesurée chez 3 patients sensibilisés au béryllium.

1.6. Développement de la béryllose

La population de lymphocytes T CD4⁺ sensibilisés de type Th1 sécrétant des cytokines en réponse au béryllium favorise la migration des macrophages (Gadola et Gross, 2012). La présence d'IFN- γ et de TNF- α attire les macrophages, et ceux-ci se concentreraient alors pour former un granulome au niveau des poumons (Schilder, 2010). La libération d'enzymes et la formation de granulomes endommageraient le fonctionnement des poumons et engendreraient les symptômes associés à la béryllose (Gadola et Gross, 2012). Pour qu'un individu sensibilisé développe la béryllose, il doit y avoir une forte accumulation de cellules T CD4⁺ sensibilisées au niveau des poumons. Ceux-ci vont alors sécréter suffisamment de cytokines de type Th1 pour déclencher l'inflammation granulomateuse (Fontenot et al., 2005). La progression d'une sensibilisation au béryllium vers la béryllose se produirait à un taux de 6-8% par an (Newman et al., 2005). Les résultats obtenus par Fontenot et al. présentés plus haut suggèrent que la progression de la maladie serait potentiellement associée à une différenciation des cellules T_{CM} spécifiques au béryllium en cellules T_{EM} (Fontenot et al., 2005). Des facteurs génétiques seraient aussi déterminants quant aux risques d'un individu à développer la maladie.



Russelet al.,2009

Figure 5 : Schématisation de la formation de granulomes dans les poumons par les macrophages.

1.7. Prédilection génétique

Des études ont identifié une forte association entre la MCB et une caractéristique génétique au niveau de l'allèle codant pour l'antigène des leucocytes humains HLA-DP du CMH II (Maier et al., 2003; McCanlies et al., 2003; Bill et al., 2005). Les travaux menés par Richeldi et al ont démontré qu'un allèle du gène HLA-DP, qui code pour un acide glutamique (Glu) en position 69 sur la chaîne β 1 de la HLA-DP, pouvait prédisposer au développement de la maladie (Richeldi et al., 1997). Jusqu'à 40% de la population serait porteuse de cet allèle mis en cause (Dastoori et al., 2012). Les gènes HLA (human leukocyte antigen), classiques codent pour les protéines du CMHII qui assurent la fonction de présentation de l'antigène et l'histocompatibilité. Ils sont localisés sur le bras court du chromosome 6. La région CMHII comprend 3 paires de gènes HLA de classe II dits « classiques », HLA-DP (gènes DPA et DPB), HLA-DQ (gènes DQA et DQB) et HLA-DR (gènes DRA et DRB1) (Luckey et al., 2011). Le polymorphisme du complexe HLA conduit à une variabilité interindividuelle à présenter un peptide donné, donc à induire la réponse de lymphocytes T spécifiques. Les différences génétiques entre les molécules du CMH des individus se traduisent, en physiologie, par des différences dans l'aptitude à répondre efficacement à une stimulation antigénique donnée, et, en pathologie, par des différences de susceptibilité aux maladies. Les variantes HLA-DP peuvent être soit des facteurs de protection ou de risque pour les maladies infectieuses (hépatite B), le dysfonctionnement immunitaire (béryllose) et l'auto-immunité (myasthénie grave) (Vukmanovic et al., 2003; Smith et al., 2006; van Oosterhout, 2009).

Richeldi et al ont utilisé la méthode de PCR (polymerase chain reaction) pour repérer ce gène et classer des travailleurs exposés au béryllium en HLA-DP β 1Glu-69 positif ou négatif selon si l'allèle est présent ou non (Richeldi et al., 1997). Lors de l'étude, les travailleurs étaient séparés soit en un premier groupe de machinistes exposés à une concentration de 0,9 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ou en un second groupe de non-machinistes exposés à 0,3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Les travaux prenaient en compte d'autres facteurs de confusion tels que l'âge, le sexe, l'origine ethnique, le tabagisme occasionnel ou régulier, ainsi que le degré d'éducation. À ces facteurs, aucune association significative n'a été démontrée avec les marqueurs génétiques.

Les résultats ont montré que 41 des 127 travailleurs (32 %) présentaient le marqueur génétique. Par contre, chez les travailleurs peu exposés, aucun cas de béryllose n'a été détecté chez les 55 personnes HLA-DPβ1Glu-69 négatif, mais un cas de béryllose a été observé sur 25 parmi ceux étant HLA-DPβ1Glu-69 positif. Parmi les travailleurs davantage exposés, 1 cas de béryllose fut détecté sur les 31 étant HLA-DPβ1Glu-69 négatif et 4 cas sur les 16 HLA-DPβ1Glu-69 positifs (Dastoori et al., 2012). Cela montre que la prédisposition génétique et l'exposition sont deux facteurs qui auraient des effets additifs. Deux études ont aussi démontré qu'il y avait une association entre les cas de MCB et le locus HLA-DPβ1 (Lombardi et al., 2001; Wang et al., 2001). Bien que plus de 95% des patients atteints de la MCB étaient HLA-DPβ1Glu-69 positif, la prévalence mesurée pour le développement de la maladie était tout de même faible. De plus, la majorité des gens exposés au béryllium qui étaient β1Glu-69 positif n'avaient pas développé la maladie. Ce qui indique que la présence ou l'absence du Glu69 ne serait pas le seul facteur de susceptibilité à la maladie (Wang et al., 1999; Wang et al., 2001; Grunewald et Eklund, 2007).

1.8. Méthodes pour diagnostiquer la béryllose

Le premier symptôme d'une personne atteinte de la béryllose est une diminution des capacités pulmonaires lors d'exercices physiques (McCleskey et al., 2009). Des radiographies pulmonaires vont alors être effectuées pour évaluer s'il y a présence d'anormalités, soit des masses dans les poumons. Pour déterminer ensuite avec certitude si une personne est atteinte, il faut utiliser des techniques plus invasives permettant de détecter la présence de granulomes. Pour ce faire, une bronchoscopie est habituellement effectuée, puis une biopsie transbronchique pour un examen histologique (McCleskey et al., 2009).

1.8.1. Détection de la sensibilisation au béryllium

Le diagnostic d'une sensibilisation au béryllium permet de prévenir le risque de développer la béryllose. Il repose sur l'hypothèse selon laquelle la béryllose chronique

serait une affection immunoallergique. Les patients atteints ont été exposés de multiples fois au béryllium pour que le processus allergique se développe et possèdent des lymphocytes T pulmonaires et sanguins qui prolifèrent *in vitro* en présence de sels de béryllium. Le test effectué se nomme le BeLPT (beryllium lymphocyte proliferation test) (Epstein et al., 1982). Il peut être effectué à partir d'échantillons cellulaires obtenus de la circulation périphérique ou par LBA.

Pour le LBA-BeLPT, le liquide bronchoalvéolaire est prélevé en instillant une petite quantité de sérum physiologique dans les portions distales des poumons et en aspirant de nouveau le liquide à l'aide d'un bronchoscope (Stange et al., 2001). Étant donné son caractère invasif, ce test n'est généralement utilisé que sur des patients ayant obtenu deux résultats anormaux lors du BeLPT sanguin, ou encore présentant des radiographies pulmonaires anormales par la présence de granulomes histopathologique (Mack et al., 2009; Rieber et al., 2012).

Le LBA a émergé comme une technique utile pour l'étude des troubles pulmonaires interstitiels. La détermination des constituants cellulaires permet de séparer les maladies où le processus inflammatoire est prédominé par les lymphocytes, par exemple la sarcoïdose, la pneumonie d'hypersensibilité ou la béryllose, de celles dans lesquelles prédominent les neutrophiles ou les macrophages, comme la fibrose pulmonaire idiopathique et l'histiocytose x. Les cellules prélevées au cours du lavage peuvent être étudiées pour leurs propriétés immunitaires et leur fonction à l'aide d'antigènes spécifiques, dans le cas de maladies comme la béryllose et la pneumopathie d'hypersensibilité, ou examinées pour la présence d'antigènes de surface uniques en utilisant des anticorps monoclonaux (Daniele et al., 1985).

1.8.1.1. Test de prolifération Lymphocytaire

Ce test a été développé en 1970 lorsqu'il a été démontré que des lymphocytes obtenus de patients qui avaient eu des tests cutanés positifs proliféraient *in vitro* lorsqu'ils

étaient en présence de sels de béryllium (Hanifin et al., 1970). Au début, ce test a été nommé *Lymphocyte Transformation Test* (LTT), car on croyait que la réaction représentait une transformation maligne. Mais vers la fin des années 1980, ce test a été amélioré et renommé BeLPT.

Le test de prolifération des lymphocytes (LPT) mesure la prolifération des lymphocytes de la circulation périphérique en réponse à un antigène ou un mitogène *in vitro*. Le LPT est utilisé pour détecter une sensibilisation individuelle à une grande variété d'antigènes et de toxines, y compris le nickel (Richeldi et al., 1997), le chrome (Rasanen et al., 1991), le lait de vache (DeRemee, 1994; Muller-Quernheim, 1998), le latex (Turjanmaa et al., 1989) et les cytomégalovirus (Wang et al., 2003). Aujourd'hui, le LPT représente le test clinique réalisé auprès des travailleurs pour dépister la sensibilisation au béryllium (Samuel et Maier, 2008).

Pour effectuer le test, les lymphocytes, obtenus de la circulation périphérique, sont cultivés *in vitro* et exposés à une solution de sulfate de béryllium pour évaluer si cela stimule leur prolifération. Les études ont démontré que seul les sels de béryllium et non les sels d'autres métaux, utilisés comme témoin à des concentrations variant entre 0,1 et 100 μM , stimulent la prolifération des lymphocytes lorsque le patient est sensibilisé au béryllium. Le sulfate d'aluminium constitue un témoin intéressant dans la mesure où ses propriétés chimiques sont très proches de celles du sulfate de béryllium, et qu'il n'a pas été associé à des granulomes inflammatoires chez l'humain (Newman, 1996). Le plus souvent, la prolifération est mesurée par incorporation de la thymidine tritiée (^3H -thymidine). Le dénombrement des coups par minute (cpm) à l'aide d'un appareil compteur béta permet de mesurer l'incorporation des radionucléides et constitue un indicateur de la prolifération des cellules. Les résultats sont généralement exprimés en un indice de stimulation (SI) calculé de la façon suivante :

$$SI = \frac{\text{Nombre de cpm mesuré pour les cellules stimulées au sulfate de béryllium}}{\text{Nombre de cpm mesuré pour les cellules non stimulées (contrôle)}}$$

Au moins deux indices de stimulation calculés pour deux conditions doivent dépasser la valeur critique, déterminée à partir de données de référence, pour que les lymphocytes soient considérés comme sensibilisés au béryllium. Cette valeur critique varie selon le lot de sérum utilisé, et est déterminée à l'aide d'échantillons de sang d'individus normaux à partir desquels un test de prolifération est effectué. Les individus normaux sont des personnes sans histoire connue d'exposition au béryllium (Kreiss et al., 1989; Frome et al., 1996). En tenant compte de la prolifération normale en présence de sulfate de béryllium, chaque laboratoire établit ensuite par analyse statistique un seuil critique au-delà duquel les résultats seront considérés comme anormaux (Ricard, 2004).

Thomas et al. ont effectué une étude dans une usine de transformation du béryllium dans laquelle les niveaux de béryllium dans l'air ambiant étaient bien en deçà de $2,0 \mu\text{g}/\text{m}^3$, soit la limite d'exposition admissible (Thomas et al., 2009). L'enquête médicale initiale, en utilisant le BeLPT, a révélé que 7% des travailleurs étaient sensibilisés au béryllium, et que 4% étaient atteints de la MCB. Ces résultats ont permis de mesurer un taux d'incidence de la sensibilisation de 3,8/1000 personnes par mois. Cependant, en dépit du fait que la plupart des expositions étaient en dessous de la valeur limite d'exposition, un programme d'exposition multidisciplinaire de contrôle a ensuite été mis en place dans cette installation. C'est ainsi que le programme, qui incluait l'utilisation d'une surveillance plus fréquente des travailleurs à l'aide du BeLPT, a permis de réduire le nombre de cas détectés de sensibilisation au béryllium. Cela démontre la pertinence d'effectuer un suivi des travailleurs par la technique du BeLPT dans le cadre d'un programme de prévention de la maladie.

En revanche, il faut préciser que bien que le BeLPT soit une méthode sensible et bien établie, elle ne donne pas d'informations sur la réponse des sous-populations lymphocytaires, nécessite l'utilisation de la radioactivité et a une forte variabilité inter et intralaboratoire (Deubner et al., 2001; Deubner et al., 2001; Maier, 2001). Plusieurs études

épidémiologiques sur l'utilisation du BeLPT ont aussi démontré que le test ne différenciait pas si une personne était sensibilisée ou déjà atteinte de la MCB (Kreiss et al., 1997; Mroz et al., 2009).

II. OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

2.1. Objectif et hypothèse

2.1.1. Problématique de santé et de sécurité au travail

On estime qu'il y aurait aux États-Unis près de 800 000 travailleurs exposés au béryllium. Au Québec, un recensement effectué conjointement par l'IRSSST (Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail) et la CSST a répertorié un total de 2800 entreprises, réparties dans 10 secteurs d'activité différents, où des travailleurs pouvaient potentiellement être exposés au béryllium sous ses formes les plus nocives. Depuis les dernières années, plusieurs travailleurs québécois ont été identifiés comme étant sensibilisés au béryllium. Cela représente un important risque de voir augmenter les cas de béryllose chronique, puisque le taux de conversion est de 6 à 8% par année. De là l'importance de faire du béryllium un volet de recherche prioritaire pour améliorer l'efficacité des tests de dépistage.

Bien que le BeLPT soit couramment utilisé pour déceler une sensibilisation chez les travailleurs, il offre peu de valeur prédictive quant aux risques de développer une béryllose. En effet, un travailleur peut avoir un BeLPT positif sans être nécessairement porteur de la béryllose. Sachant que la béryllose peut prendre jusqu'à 30 ans à se développer chez un travailleur sensibilisé, il est clair que la corrélation BeLPT et béryllose chronique n'est pas acceptable (Kelleher et al., 2001). Le BeLPT est effectué couramment au Québec depuis 2002, et certains résultats lors de suivi de travailleurs demeurent énigmatiques. Deux situations se sont produites pour lesquelles nous n'avons pas encore d'explication. La première où des travailleurs porteurs de béryllose mais dont les symptômes s'amélioraient, avaient des résultats positifs pour le BeLPT, c'est-à-dire toujours la présence d'une sensibilisation confirmée. Or, au moment du dernier test il s'est révélé négatif. Pour la deuxième situation, des travailleurs porteurs de la béryllose et avec des signes cliniques qui s'aggravaient ont toujours eu des BeLPT négatifs. Il devient donc primordial de développer un autre outil alternatif et/ou complémentaire au BeLPT afin de déceler la sensibilisation au béryllium et de déterminer plus adéquatement les risques de

développer une béryllose. Cela permettra de rassurer les travailleurs quant à la détection plus efficace de la sensibilisation et d'aider les gestionnaires du dossier béryllium à mieux cerner l'ampleur du problème.

2.1.2. Hypothèse

Les mécanismes immunologiques expliquant la conversion de l'état sensibilisé au développement de la béryllose restent peu connus. En effectuant un test de prolifération de lymphocytes T CD4⁺, obtenus à partir d'échantillons de sang prélevés chez des porteurs de la béryllose, en présence de béryllium, certains résultats ont donné une prolifération faible (Fontenot et al., 2005). En utilisant les mêmes échantillons et en étudiant la corrélation entre la capacité de ces cellules à proliférer et à synthétiser de l'IFN- γ ou de l'IL-2, il leur a été possible de discriminer entre deux types de cellules mémoire, soit les T CD4⁺ mémoire centraux (T_{CM}) et les T CD4⁺ mémoire effecteurs (T_{EM}). Les T_{CM} ayant retenu leur capacité à proliférer mais synthétisant peu de cytokines et les T_{EM} étant plus spécialisés à synthétiser des cytokines qu'à proliférer (Fontenot et al., 2005; Pott et al., 2005). Cette piste est intéressante à suivre et nous allons l'utiliser afin de vérifier si nous pouvons augmenter la précision du BeLPT en faisant en parallèle la quantification des cellules productrices d'IFN- γ et d'IL-2. Comme hypothèse la question est : Peut-on développer et valider une nouvelle approche expérimentale à partir du sang périphérique uniquement qui nous permettrait de :

- 1- Détecter plus efficacement une sensibilisation au béryllium.
- 2- Établir une distinction entre un patient sensibilisé et un atteint de la béryllose.

2.1.3. Objectif spécifique

Dans un premier temps, comparer le BeLPT et la détection de cellules productrices de cytokines par ELISpot (Enzyme-Linked ImmunoSpot). Dans un second temps, étudier l'influence sur la concordance d'un test complémentaire soit l'ELISpot afin de dénombrer les cellules sécrétrices d'IFN- γ et/ou d'IL-2.

III. MÉTHODOLOGIE

3.1. MATÉRIELS

3.1.1. Liste des produits

Produits	Compagnie
Human serum AB	Gemini Bioproducts, CA, USA.
Antibiotic- antimycotic	Sigma-Aldrich, ON, Canada
Thymidine	Perkin Elmer, MA, USA.
Beryllium sulfate tetrahydrate 99.99%	Sigma-Aldrich, ON, Canada
PHA	Sigma-Aldrich, ON, Canada
Candida albicans	Greer, NC, USA.
Lympholyte-H	Cedarlane, ON, Canada
Microscint TM.20	Perkin Elmer, MA, USA.
alcohol isopropyl	Ultident, QC, Canada
sodium hypochlorite 5%	solution commerciale, Loblaws, ON, Canada
96 plate round bottom	Sarstedt, Mtl, Canada
Human IL-2 ELISpot Kit	Abcam, MA, USA
Interféron gamma Human ELISpot Kit	Abcam, MA, USA

3.1.2. Source des échantillons de sang

Les échantillons de sang ont été obtenus de travailleurs de la fonderie de Nickel Extrata à Rouyn-Noranda (Québec). Les travailleurs étaient des volontaires avisés de l'utilisation de leur échantillon pour la recherche. L'approbation éthique a été obtenue ainsi que la signature de consentement de chaque travailleur. Dans un souci de confidentialité, tous les échantillons étaient codifiés de sorte que l'identité des travailleurs soit inconnue. Trois tubes de sang de 10 ml héparinés pour chaque travailleur ont été obtenus du centre de prélèvement et vérifiés pour s'assurer de la présence d'héparine, car certains tubes n'en contenaient pas à la réception. La durée du transport ne devait pas dépasser 24h. Les échantillons reçus ont été conservés à température pièce (20°C - 25°C).

3.2. MÉTHODES

3.2.1. Isolement des cellules mononuclées de la circulation périphérique

Pour chaque travailleur, trois tubes de sang de 10 ml prélevés ont été mélangés dans un tube de 50 ml, puis le sang a été dilué en complétant le volume à 50 ml avec du PBS. Par la suite, 25 ml de la solution sanguine diluée ont été déposés délicatement sur 15 ml de Lympholyte-H (Cedarlane, ON, Canada) (permet la séparation par gradient), soit deux tubes par travailleur. Après centrifugation à 600 g durant 15 minutes à température pièce sans le frein, le surnageant a été délicatement prélevé et jeté, puis les PBMCs (anneau à l'interphase) ont été récoltées et transférées dans un tube de 50 ml (l'anneau de PBMCs pour chaque travailleur est mélangé dans un seul tube de 50 ml). Les PBMCs ont ensuite été lavées en complétant le volume à 50 ml avec du PBS et centrifugées à 600 g, 10 minutes à température pièce. Le culot cellulaire a ensuite été resuspendu dans 30 ml de PBS un premier lavage s'est fait en centrifugeant à 350 g à température pièce et un second lavage a été fait en centrifugeant à 200 g à température pièce. Les cellules ont ensuite été resuspendues dans 5 ml de tampon RPMI-1640 (Invitrogen). Un volume de 100 µl de la suspension cellulaire a été prélevé dans un vial et 10 ml de diluant Isotone II (0,03% NaF) a été ajouté dans le vial pour déterminer la concentration cellulaire en utilisant le compteur Coulter.

3.2.2. Test de prolifération lymphocytaire

Les lymphocytes obtenus du sang périphérique des patients sont cultivés *in vitro* et exposés à différentes concentrations d'une solution de BeSO₄ pour stimuler leur prolifération. Des études ont démontré que seuls les sels de béryllium, dont les concentrations comprises entre 0,1 et 100 µM et non les sels d'autres métaux peuvent stimuler la prolifération lymphocytaire.

3.2.3. Détermination des contrôles positifs et de la valeur critique du BeLPT

Dans notre étude, nous avons utilisé des concentrations en BeSO_4 de 1, 10 et 100 μM . Ces concentrations proviennent du Comité d'accréditation des tests de sensibilisation au béryllium, dans le but de résoudre les problèmes techniques liés à l'essai. Ce comité est formé des laboratoires qui effectuent le BeLPT. Le groupe de Newman et al. a déterminé ces concentrations à partir d'une gamme de trois log de concentrations en sel de béryllium sachant que les concentrations comprises entre 0,1 et 100 μM stimulaient la prolifération (Kreiss et al., 1989; Mroz et al., 1991; Newman, 1996).

La prolifération cellulaire a été mesurée par l'incorporation de ^3H -thymidine dans les cellules. Les résultats sont exprimés en un indice de stimulation (SI), qui est le rapport entre les coups par minute mesurée chez les cellules stimulées divisées par le compte pour les cellules non stimulées. Pour évaluer le résultat du test, deux valeurs d'indice de stimulation doivent être supérieures à la valeur d'indice de stimulation critique. Cette valeur critique est déterminée en fonction du lot de sérum humain (certains types de cellules humaines nécessitent l'ajout de sérum humain plutôt que du sérum animal dans le milieu de culture cellulaire). Lorsqu'un nouveau lot est reçu, des tests de prolifération sont effectués à partir d'échantillons sanguins de sujets normaux n'ayant jamais été exposés au béryllium. Des indices de stimulation sont alors calculés pour chaque sujet. La valeur critique d'indice de stimulation est ensuite déterminée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Ln} (\text{SI}_{\text{critique}}) = (\text{Ln} (\text{SI}_{\text{maximum}}) - \text{M}) / \text{SD}$$

où :

SI_{maximum} est la valeur d'indice de stimulation la plus élevée ayant été mesurée

M est la valeur médiane de tous les indices de stimulation obtenus

et **SD** est l'écart type de toutes les valeurs d'indices de stimulation

Ce test a permis d'établir une valeur critique d'indice de stimulation de 2,6 pour le lot de sérum utilisé lors des tests BeLPT effectués à partir des échantillons sanguins des travailleurs (Wambach, 2001).

3.2.4. Contrôles positifs utilisés

La PHA (Phytohémagglutinine) est un mitogène qui stimule la synthèse des phospholipides, de l'ARN et de l'ADN. C'est un activateur polyclonal des lymphocytes T. Ce mitogène est utilisé afin de tester la capacité des cellules T à proliférer en culture (Frome et al., 1996; Frome et al., 2003).

Candida albicans (*C. albicans*) est un antigène de rappel commun à la population (Wambach, 2001). La plupart des personnes en bonne santé possèdent des niveaux élevés d'anticorps des protéines de la paroi cellulaire externe de *C. albicans*. La prolifération des lymphocytes en réponse à des extraits ou des mélanges de composantes de *C. albicans* est utilisé pour établir la réponse immunitaire des cellules T (Ausiello et al., 1986).

3.2.5. Protocole du BeLPT

Les PBMCs isolées au préalable ont été ajustée à $2,5 \times 10^6$ cellules/ml. Les cellules ont été mises en plaque en présence de PHA ou *C. albicans* qui représentent les témoins positifs des jours 4 (PHA) et 6 (*C. albicans*) respectivement. Pour chaque temps d'incubation, les cellules ont été mises en présence de sulfate de béryllium à 1 μ M, 10 μ M et 100 μ M. Des puits ont été préparés avec le milieu de culture seul pour servir de témoins négatifs. Les cellules ont été ainsi incubées dans une atmosphère humide à 37°C avec 5% de CO₂ (voir Tableau 3).

Une plaque a été incubée pour 4 jours et la seconde pour 6 jours. Dix-huit heures avant la fin de chacune des périodes d'incubation, 1 μ Ci de ³H-thymidine a été ajouté dans chaque

puits. L'incubation a été poursuivie et à la fin les plaques ont été congelées à -20°C. Les cellules ont ensuite été récoltées sur un filtre et lysées pour ne conserver que l'ADN sur filtre. L'incorporation de ³H-thymidine, suite à la division cellulaire, a été analysée par scintillation. Les résultats obtenus en coups par minute (CPM) et ont été exprimés en indice de stimulation (National Jewish Medical and Research Center, Denver).

Tableau 3 : Exemple de plaque de culture cellulaire

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Be 100	Be 100	Be 100	Be 10	Be 10	Be 10	Be 1	Be 1	Be 1	RFMI	RFMI	RFMI
B	Cand/PHA	Cand/PHA	Cand/PHA	x	Be 100	Be 100	Be 100	Be 10	Be 10	Be 10	Be 1	Be 1
C	Be 1	RFMI	RFMI	RFMI	Cand/PHA	Cand/PHA	Cand/PHA	x	Be 100	Be 100	Be 100	Be 10
D	Be 10	Be 10	Be 1	Be 1	Be 1	Be 10	Be 10	Be 10	Cand/PHA	Cand/PHA	Cand/PHA	x
E	Be 100	Be 100	Be 100	Be 10	Be 10	Be 10	Be 1	Be 1	Be 1	RFMI	RFMI	RFMI
F	Cand/PHA	Cand/PHA	Cand/PHA	x	Be 100	Be 100	Be 100	Be 10	Be 10	Be 10	Be 1	Be 1
G	Be 1	RFMI	RFMI	RFMI	Cand/PHA	Cand/PHA	Cand/PHA	x	Be 100	Be 100	Be 100	Be 10
H	Be 10	Be 10	Be 1	Be 1	Be 1	RFMI	RFMI	RFMI	Cand/PHA	Cand/PHA	Cand/PHA	x
I												

	BeSO ₄ 1 µmol
	BeSO ₄ 10 µmol
	BeSO ₄ 100 µmol
	Solution de RPMI 1640 Pour le contrôle négatif
	candida albicans ou PHA pour le contrôle positif

3.2.6. Quantification de l'interféron-γ et de l'interleukine 2 par le test ELISpot

Bien que le test ELISpot fut initialement développé pour détecter les cellules sécrétant des anticorps (Czerkinsky, Nilsson et al. 1983), il est aussi largement utilisé pour évaluer la réponse antigénique ou mitogénique des lymphocytes T CD4⁺ (Taguchi, McGhee et al. 1990; Miyahira, Murata et al. 1995). Des ELISpot furent donc effectués pour dénombrer les cellules productrices d'IFN-γ et d'IL-2 dans le but de mesurer l'effet du béryllium sur la production de cytokines par les lymphocytes T CD4⁺ de chaque travailleur.

3.2.7. Protocole

Pour réaliser le test ELISpot, des kits IFN- γ Human ELISpot (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) et IL-2 Human ELISpot (Abcam Inc.) ont été utilisés tel que décrit par la compagnie. Brièvement, un anticorps monoclonal spécifique de la cytokine à l'étude, soit anti-interféron gamma humain ou anti-interleukine-2 humaine, est distribué dans les puits d'une plaque de 96 puits dont le fond est constitué de PVDF (polyvinylidene difluoride). Après un blocage des sites non-spécifiques, les cellules ont été stimulées au béryllium comme décrit dans la méthode de BeLPT, ainsi que leurs témoins positifs respectifs (PHA, *C. albicans*) et le témoin négatif (RPMI-1640 seulement). 500,000 cellules ont été déposées dans chaque puits et les plaques incubées à 37°C avec 5% de CO₂ pour 48 heures. Durant l'incubation, les cytokines sécrétées se fixent aux anticorps de leur environnement immédiat présents au fond des plaques. Après plusieurs lavages pour éliminer les cellules et toutes substances non liées, des anticorps polyclonaux conjugués à la biotine et spécifiques à la cytokine étudiée sont ajoutés à chacun des puits pour une incubation de 2 heures. Par la suite, le complexe strepavidine/phosphatase alcaline a été ajouté pour une incubation d'une heure. Suite à un autre lavage pour éliminer les éléments non fixés, le substrat et un chromogène ont été ajoutés. Un précipité coloré s'est alors formé au site de fixation des cytokines (spot) (voir Figure 6). Chacun des spots a été compté à l'aide d'un système automatisé d'analyse d'image (CTL Immunospot analyses 5.0 series) et la moyenne des triplicatas calculée.

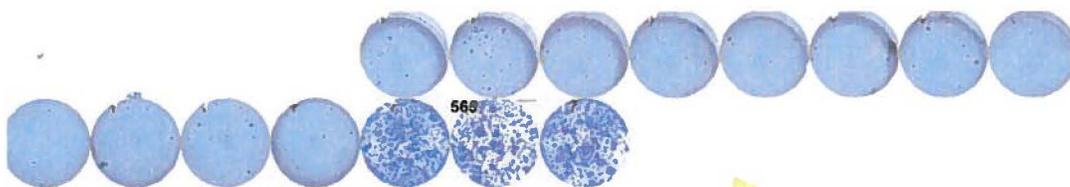
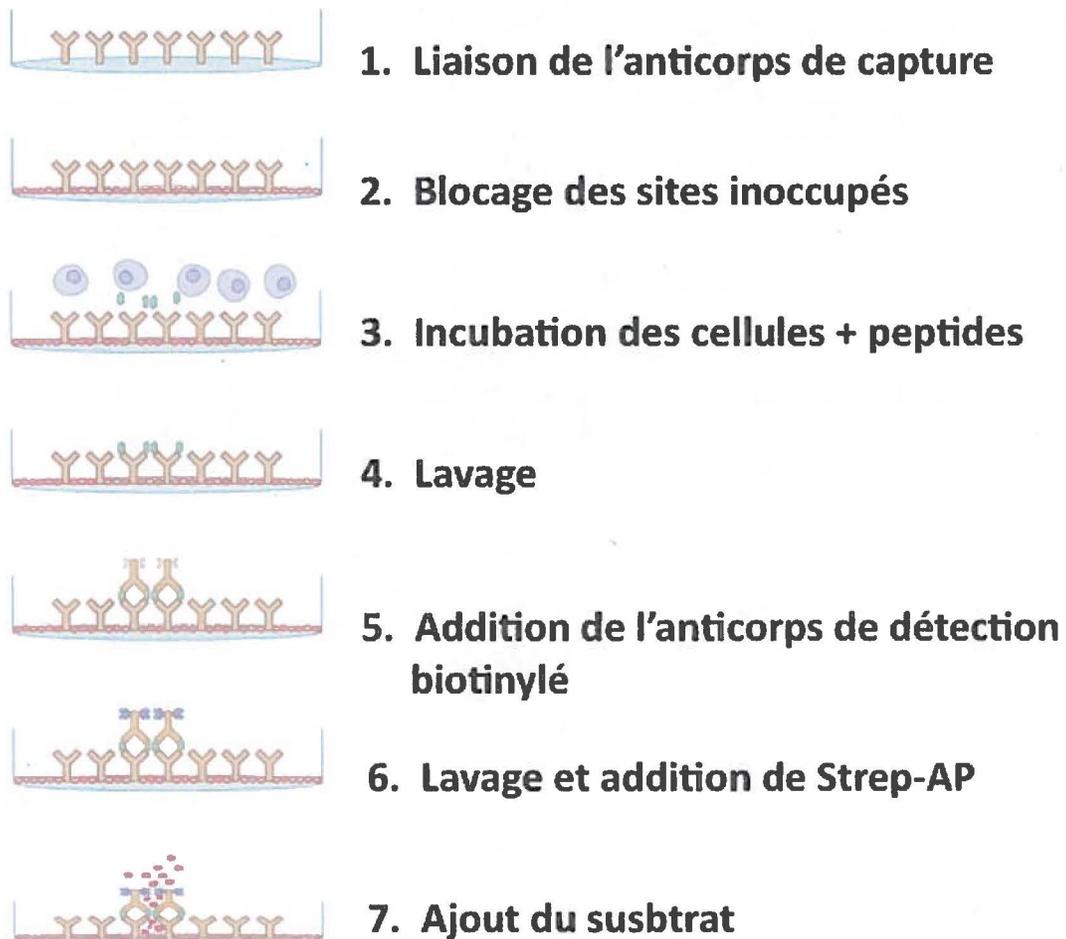


Figure 6: Exemple de résultat pour l'ELISpot

Dans cet exemple représentatif, la plaque fut traitée tel qu'illustré et décrit en détails dans la section « Quantification de l'interféron- γ et de l'interleukine-2 par le test ELISpot ».

3.2.8. Analyse statistique

Les résultats sont présentés par la moyenne \pm l'écart type de la moyenne (SEM). Le test t student fut utilisé pour déterminer si la différence entre deux conditions était significative à l'aide du programme statistique InStat (GraphPad Software, San Diego, CA). Les différences étaient considérées significatives lorsque la valeur de P était inférieure à 0,05.

IV. RÉSULTATS

4.1. Résultats

4.1.1. Prolifération des PBMCs en présence de béryllium

Le BeLPT mesure la réponse à médiation cellulaire des cellules T spécifiques au béryllium. Pour ce faire, la réponse proliférative fut mesurée chez des PBMCs isolés à partir du sang des travailleurs volontaires. Les PBMCs ont été mises en présence de sels de béryllium à différentes concentrations (sulfate de béryllium à 1 μM , 10 μM et 100 μM). Pour s'assurer de l'efficacité de la méthode lors de chaque essai, deux contrôles positifs furent utilisés, soit la stimulation au PHA pour 4 jours et la réponse proliférative en réponse à *C. albicans* après 6 jours d'exposition. La PHA est un mitogène polyclonal stimulant majoritairement les cellules T, alors que *C. albicans* est un antigène spécifique auquel la vaste majorité des êtres humains ont été exposés au cours de leur vie. La mesure des cpms pour les contrôles négatifs et positifs du test BeLPT a montré que les résultats sont davantage reproductibles entre les patients au jour 4 par rapport au jour 6 (voir Tableau 4).

Tableau 4 : Valeurs en cpm du BeLPT pour les contrôles pour chaque patient (n=12).

Patient	cpm Ctr jour 4	cpm PHA	cpm Ctr jour 6	cpm Candida
76	520	127821	1491	94326
78	430	166736	3361	53981
80	441	170873	1302	47766
81	337	151400	563	58384
82	738	107947	2792	69501
84	773	155394	1402	62129
90	420	90636	450	43756
92	741	97067	1588	98390
94	658	156813	970	33810
98	576	126765	7435	11022
99	876	139373	12980	16725
103	670	104174	3327	53168
Moyenne	598	132916	3138	53580
Écart-Type	169	28010	3638	26473
SEM	49	8086	1050	7642

Le tableau 4 représente les valeurs de cpm pour le contrôle négatif (RPMI-1640) et le contrôle positif (PHA) au jour 4, ainsi que le contrôle négatif (RPMI-1640) et le contrôle positif (*C. albicans*) au jour 6 pour chaque travailleur.

La variabilité des résultats entre les patients, tant pour le contrôle négatif au jour 4 que pour le PHA, a été beaucoup plus faible que ce qui fut mesuré pour le contrôle négatif du jour 6 et pour *C. albicans*. Le PHA a aussi stimulé davantage la prolifération cellulaire que *C. albicans*, car la valeur moyenne des cpm calculée est environ 2,5 fois plus élevée que celle de *C. albicans* (voir Figure 7).

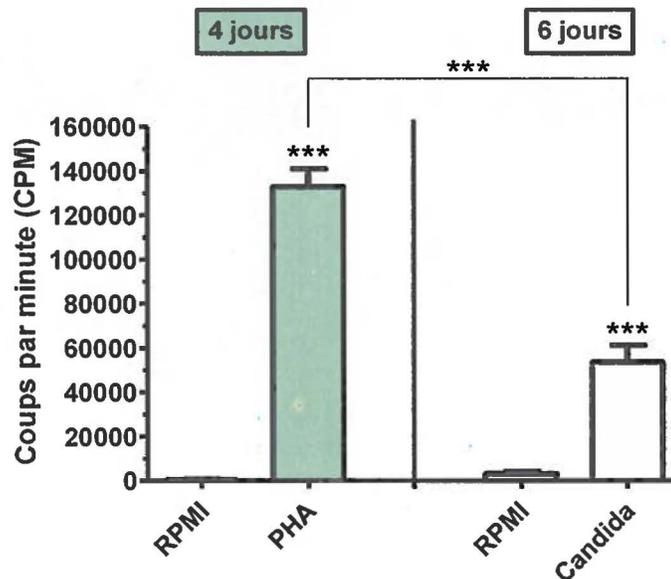


Figure 7: Valeurs en cpm pour le BeLPT des contrôles négatifs (RPMI-1640) par rapport aux contrôles positifs.

Graphique représentant les valeurs de cpm du contrôle négatif (RPMI-1640) par rapport du contrôle positif (PHA) au jour 4, ainsi que le contrôle négatif (RPMI-1640) et le contrôle positif (*C. albicans*) au jour 6. (***) indique une différence significative ($p < 0.0001$) par rapport au contrôle sans traitement (Student t test).

Des index de stimulation ont été calculés pour classer les résultats selon quatre catégories : anormal, incertain, normal et ininterprétable. Un SI de 2,6 ou plus a été défini comme une réponse positive au béryllium. Par normes établies, les valeurs d'index de stimulation mesurées pour les contrôles positifs devait être supérieure à 50 pour le PHA ($SI > 50$) et à 3,0 dans le cas de *C. albicans* ($SI > 3,0$) pour que la réponse proliférative soit considérée normale. (National Jewish Medical and Research Center (NJC) à Denver) Les résultats obtenus ont démontré qu'à l'exception de la réponse pour le contrôle *C. albicans* pour les patients 98 et 99, tous les tests BeLPT effectués ont montré des valeurs pour les

contrôles positifs supérieures au minimum établi (voir Tableau 5). Comme pour les mesures en cpm, la variation entre les individus mesurée fut beaucoup plus grande dans le cas du contrôle positif *C. albicans* par rapport au PHA.

Tableau 5 : Valeurs des indices de stimulation (SI) des contrôles positifs lors du BeLPT pour chaque patient (n=12).

Patient	SI PHA	SI Candida
76	245,7	63,3
78	387,8	16,1
80	387,5	36,7
81	449,1	103,7
82	146,3	24,9
84	201,1	44,3
90	215,9	97,3
92	131,0	62,0
94	238,4	34,9
98	219,9	1,5
99	159,2	1,3
103	155,6	16,0
Moyenne	244,8	41,8
Écart-Type	106,1	34,0
SEM	30,6	9,8

Le tableau 5 représente les valeurs d'indices de stimulation (SI) pour le contrôle positif (PHA) au jour 4, ainsi que pour contrôle positif (*C. albicans*) au jour 6 de chaque travailleur.

4.1.2. Travailleurs non sensibilisés au béryllium

La variabilité observée entre les travailleurs a été beaucoup plus grande pour les mesures effectuées après 6 jours d'incubation par rapport à 4 jours en SI ; autant pour les résultats en présence de béryllium, que pour les résultats des contrôles négatifs (voir Tableau 6).

Tableau 6 : Moyenne des indices de stimulation (SI) des 12 travailleurs pour le test BeLPT aux différentes concentrations de béryllium.

	4 jours			6 jours		
	Be 1	Be 10	Be 100	Be 1	Be 10	Be 100
Moyenne (N=12)	1,1	1,4	1,1	1,1	0,9	0,4
Écart-Type	0,1	0,3	0,4	0,4	0,7	0,4
SEM	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1

Tableau 6 indiquant les moyennes des SI mesurées pour chaque travailleur lorsque les PBMCs étaient mises en présence de différentes concentrations de BeSO₄ (Be 1 (1 µM), Be 10 (10 µM) et Be 100 (100 µM)). Les incubations étaient d'une durée de 4 jours ou 6 jours.

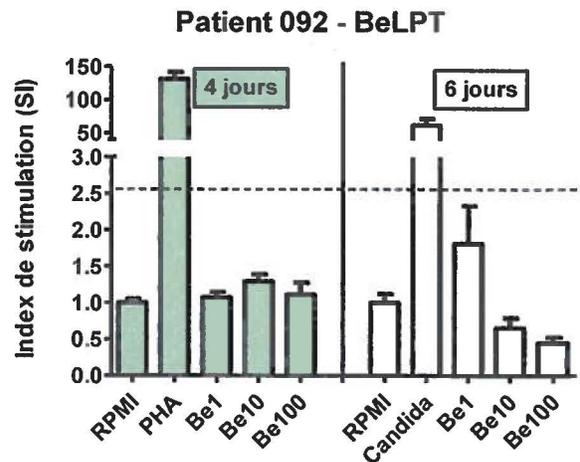
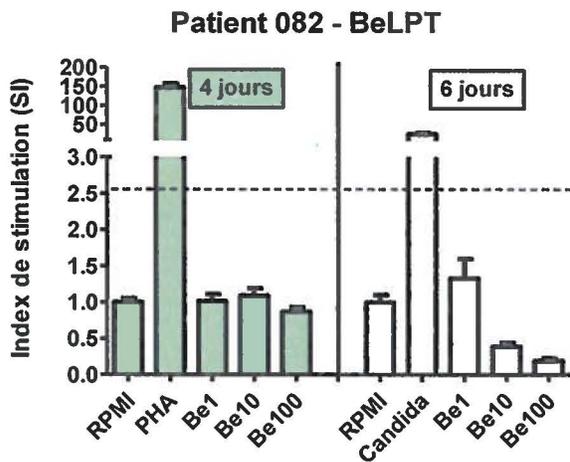
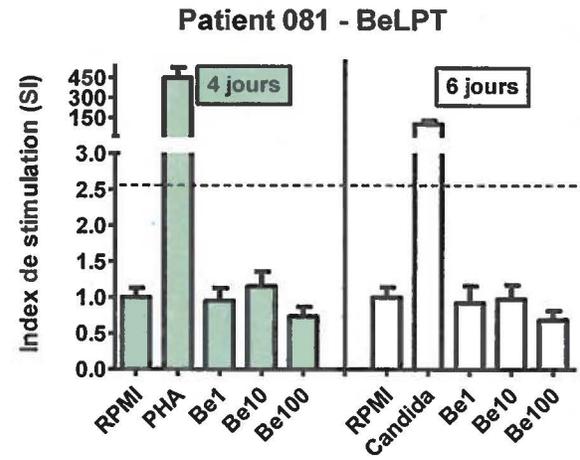
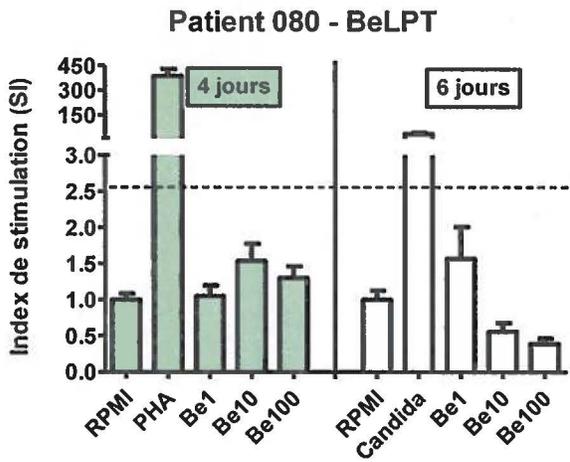
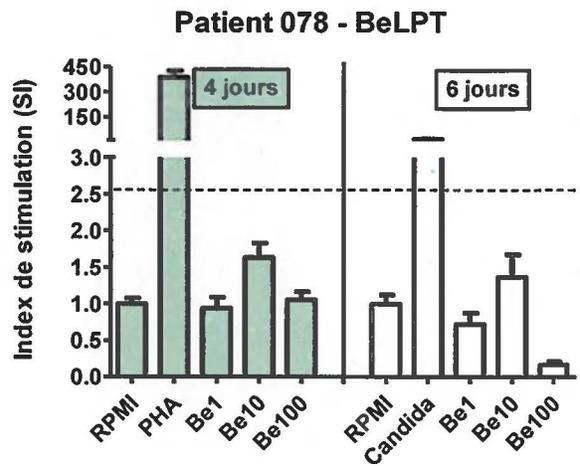
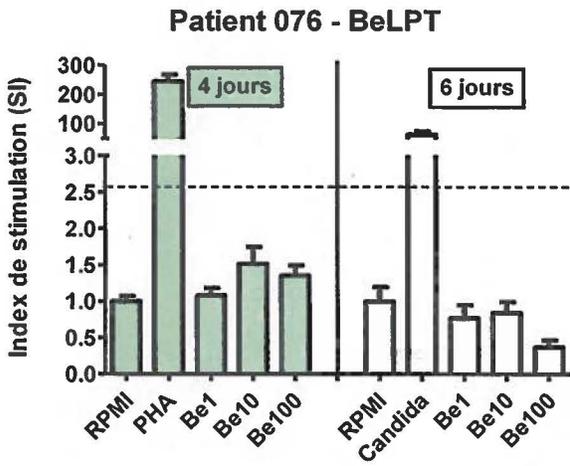
La variation des résultats en cpm pour le BeLPT au jour 6 en présence de béryllium a été moins importante que la celle mesurée pour le contrôle négatif. Par contre, elle est plus importante à 6 jours qu'à 4 jours (voir Tableau 7).

Tableau 7 : Moyenne des cpm des 12 travailleurs pour le test BeLPT aux différentes concentrations de béryllium.

	4 jours				6 jours			
	Ctr	Be 1	Be 10	Be 100	Ctr	Be 1	Be 10	Be 100
Moyenne	598	638	844	689	3138	2962	1672	571
Écart-Type	169	200	335	338	3638	2588	1141	201
SEM	49	58	97	98	1050	747	329	58

Tableau 7 indiquant les moyennes des cpm mesurées pour chaque travailleur lorsque les PBMCs étaient mises en présence de différentes concentrations de BeSO₄ (Be 1 (1 µM), Be 10 (10 µM) et Be 100 (100 µM)). Les incubations étaient d'une durée de 4 jours ou 6 jours.

Au jour 4, la variation a augmenté lorsque la concentration de sulfate de béryllium était plus élevée. Les résultats présentés à la figure 8 montrent en détail le BeLPT pour 10 des 12 travailleurs ayant un test lymphocytaire normal. Pour ces patients, les valeurs des index de stimulation en présence des différentes concentrations de sulfate de béryllium (1, 10 et 100 µM) ont toutes été inférieures à la valeur critique de 2,6 requise pour avoir une réponse anormale. Aucun des résultats ayant été obtenus approche de la valeur critique, car les index de stimulation mesurés pour ces travailleurs ne dépassent pas 1,9.



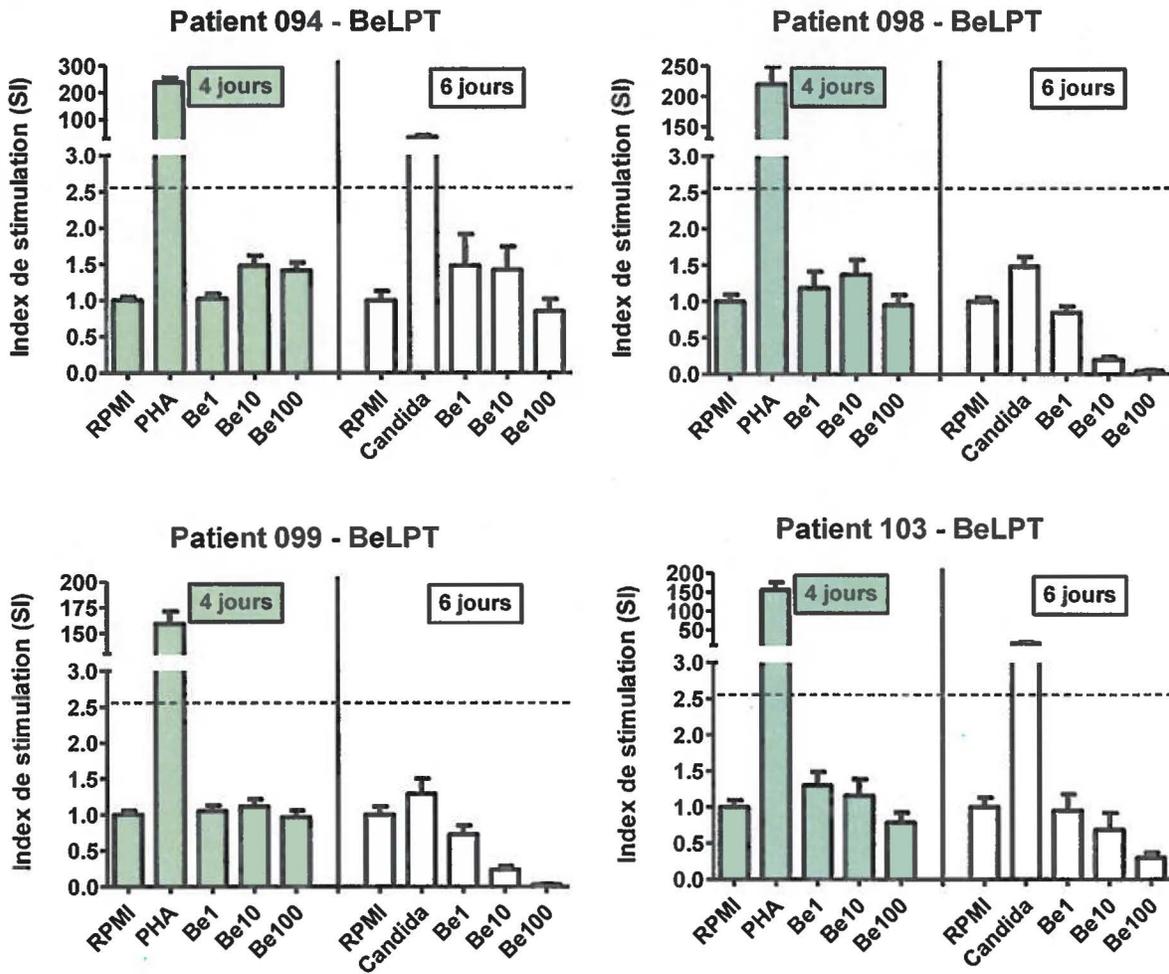


Figure 8 : Travailleurs ayant une prolifération normale des lymphocytes en présence de béryllium pour le BeLPT.

Les PBMCs ont été isolées du sang des travailleurs, puis incubées en présence de différentes concentrations de béryllium, soit Be 1 (1 μM), Be 10 (10 μM) et Be 100 (100 μM). 18h avant la fin de l'incubation, de la ^3H -thymidine a été ajoutée. À la fin de l'incubation, le nombre de cpm était mesuré pour chaque condition. Le SI représente le rapport des cpm moyen mesurés pour chaque condition sur les cpm moyen mesurés pour le contrôle négatif (RPMI).

4.1.3. Travailleur ayant un résultat anormal incertain

Le résultat du test de prolifération lymphocytaire du patient 90 a été interprété comme anormal incertain en réponse au béryllium (voir Figure 9). Au jour 4, en présence des concentrations de sulfate de béryllium de 1, 10 et 100 μM , les index de stimulation ont été de 1,0, 1,3 et 1,0 respectivement, donc en deçà du seuil critique pour une réponse anormale. Par contre au jour 6, pour les mêmes concentrations en sulfate de béryllium, les index de stimulation ont été de 0,7 à 1 μM , 2,8 à 10 μM et 1,5 à 100 μM . Donc à la concentration de 10 μM , l'index de stimulation a dépassé le seuil de 2,6. Ce travailleur n'a pas été défini comme sensibilisé ou anormal, mais a montré une réponse anormale incertaine, car une seule valeur a dépassé le seuil critique. Pour qu'un test soit considéré comme anormal, un index de stimulation supérieur à 2,6 doit être mesuré pour au moins deux conditions en présence de sulfate de béryllium.

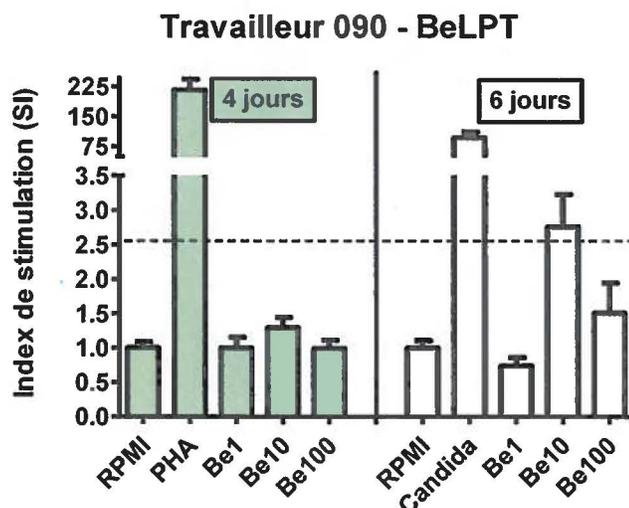


Figure 9 : Travailleur 90 montrant une prolifération anormale incertaine des lymphocytes en présence de béryllium pour le BeLPT.

Les PBMCs ont été isolées du sang du travailleur, puis incubées en présence de différentes concentrations de béryllium, soit Be 1 (1 μM), Be 10 (10 μM) et Be 100 (100 μM). 18h avant la fin de l'incubation, de la ^3H -thymidine a été ajoutée. À la fin de l'incubation, le nombre de nombre cpm était mesuré pour chaque condition. Le SI représente le rapport des cpm moyen mesurés pour chaque condition sur les cpm moyen mesurés pour le contrôle négatif (RPMI).

Les SI qui ont mesurés pour le travailleur 84 ont tous été inférieurs à 2,6 (voir Figure 10). Donc le patient serait considéré comme normal. Par contre, contrairement aux autres patients normaux, certaines valeurs d'indices de stimulation ont été relativement élevées. Aux concentrations de sulfate de béryllium de 10 et 100 μM , des index de stimulation de 2,3 et 2,0 furent respectivement mesurés après 4 jours d'incubation. Pour les incubations de six jours, les valeurs ont été normales avec 1,5 à 1 μM , 1,0 à 10 μM et 0,3 à 100 μM . Tout de même, deux valeurs d'index de stimulation au jour 4 se sont avérées élevées par rapport aux autres patients normaux, et se sont rapprochées de la valeur critique de 2,6. Les résultats qui furent obtenus pour ce travailleur ont donc été qualifiés de suspicieux.

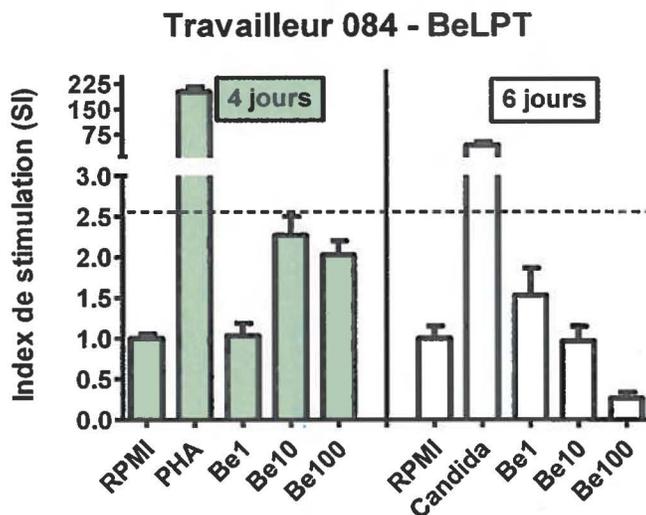


Figure 10 : Travailleur 84 montrant une prolifération suspicieuse des lymphocytes en présence de béryllium lors du BeLPT.

Les PBMCs ont été isolées du sang du travailleur, puis incubées en présence de différentes concentrations de béryllium, soit Be 1 (1 μM), Be 10 (10 μM) et Be 100 (100 μM). 18h avant la fin de l'incubation, de la ^3H -thymidine a été ajoutée. À la fin de l'incubation, le nombre de cpm était mesuré pour chaque condition. Le SI représente le rapport des cpm moyen mesurés pour chaque condition sur les cpm moyen mesurés pour le contrôle négatif (RPMI).

4.1.4. Quantification par ELISpot des cellules sécrétrices d'IFN- γ et d'IL-2 suite à la stimulation de PBMCs au sulfate de béryllium.

Comme pour le BeLPT, le PHA et *C. albicans* furent utilisés comme contrôles positifs. Lorsque la réponse de tous les travailleurs à ces contrôles a été comparée, on a mesuré une très grande variabilité dans le nombre SFU. Pour la quantification des cellules productrices d'IFN- γ , le nombre de SFU a varié entre 2 à 1047 en réponse au PHA et entre 2 et 194 pour le *C. albicans* (voir Tableau 8). La réponse pour les contrôles négatifs des jours 4 et 6 variait aussi beaucoup, mais les contrôles positifs ont tout de même été significativement plus élevés (voir Figure 11).

Tableau 8 : Valeurs en SFU (Spot formant une unité) pour les contrôles négatifs et positifs du test ELISpot de chaque patient (n = 12) pour l'IFN- γ .

Patient	SFU Ctr jour 4	SFU PHA	SFU Ctr jour 6	SFU Candida
76	9,0	426,0	27,3	120,0
78	11,3	270,0	18,3	162,7
80	9,5	236,5	20,3	193,7
81	1,0	296,0	4,0	96,3
82	4,3	132,0	18,7	116,0
84	10,0	374,0	11,3	113,3
90	3,0	1113,3	1,3	8,7
92	13,3	1047,3	3,0	15,7
94	17,3	163,3	2,0	14,3
98	1,0	2,0	0,7	2,0
99	0,0	4,0	4,3	6,0
103	1,3	36,0	16,3	63,7
Moyenne	6,8	341,7	10,6	76,0
Écart-Type	5,7	371,5	9,2	66,9
SEM	1,7	107,3	2,7	19,3

Tableau 8 représentant les valeurs de SFU (spot formant une unité) pour le contrôle négatif (RPMI-1640) et le contrôle positif (PHA) au jour 4, ainsi que le contrôle négatif (RPMI-1640) et le contrôle positif (*C. albicans*) au jour 6 pour la quantification des cellules productrices d'IFN- γ .

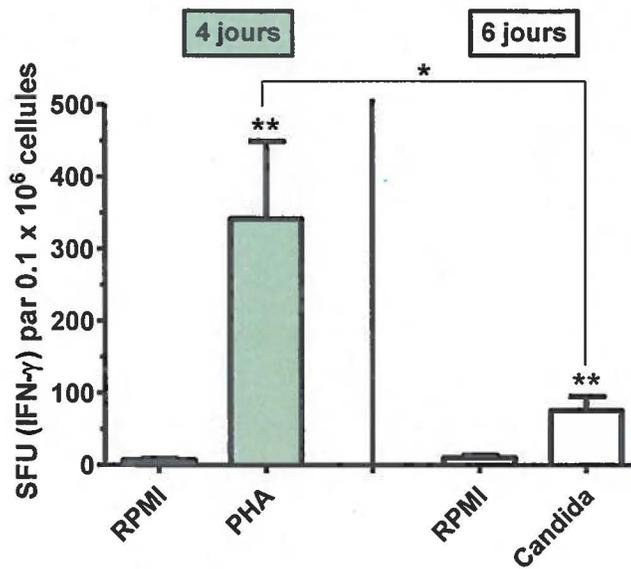


Figure 11 : Valeurs en SFU pour les contrôles négatifs et positifs du test ELISpot de chaque patient (n = 12) pour l'IFN- γ .

Graphique représentant les valeurs de SFU en fonction du contrôle négatif (RPMI-1640) et du contrôle positif (PHA) au jour 4, ainsi que le contrôle négatif (RPMI-1640) et le contrôle positif (*C. albicans*) au jour 6 pour la quantification des cellules productrices d'IFN- γ .

La réponse au PHA a aussi été significativement plus grande que celle pour *C. albicans*. Dans le cas de l'IL-2, le nombre de SFU mesuré fut relativement faible par rapport à la quantification des cellules productrices d'IFN- γ . Comme pour l'IFN- γ , la variation mesurée entre les travailleurs pour le nombre de cellules productrices d'IL-2 fut élevée, avec des valeurs variant entre 5 et 300 SFU en réponse au PHA, et 2 à 14 SFU pour *C. albicans* (voir Tableau 9). Les contrôles positifs se sont tout de même avérés significativement plus élevés, et le PHA a engendré une réponse plus grande que *C. albicans* (voir Figure 12).

Tableau 9 : Valeurs en SFU pour les contrôles négatifs et positifs du test ELISpot de chaque patient (n = 12) pour l'IL-2.

Patient	SFU Ctr jour 4	SFU PHA	SFU Ctr jour 6	SFU Candida
76	0,7	300,0	0,0	13,7
78	0,7	156,0	0,0	3,0
80	3,5	140,7	0,0	2,2
81	0,7	284,0	3,3	9,3
82	4,3	202,0	0,0	5,7
84	0,7	95,3	0,3	3,0
90	2,0	18,7	0,7	2,7
92	2,0	13,3	1,0	2,0
94	1,0	45,3	0,0	2,3
98	0,0	5,3	1,3	2,7
99	2,3	7,3	0,7	3,3
103	11,3	12,3	1,3	8,3
Moyenne	2,4	106,7	0,7	4,8
Écart-Type	3,1	109,1	1,0	3,7
SEM	0,9	31,5	0,3	1,1

Tableau 9 représentant les valeurs de SFU pour le contrôle négatif (RPMI-1640) et le contrôle positif (PHA) au jour 4, ainsi que pour le contrôle négatif (RPMI-1640) et le contrôle positif (*C. albicans*) au jour 6 pour la quantification des cellules productrices d'IL-2.

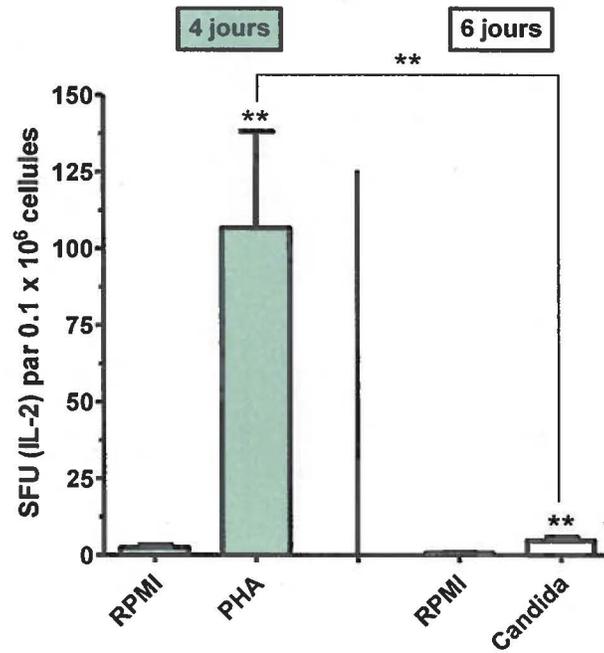


Figure 12 : Valeurs en SFU pour les contrôles négatifs et positifs du test ELISpot de chaque patient (n = 12) pour l'IL-2.

Graphique représentant les valeurs de SFU pour le contrôle négatif (RPMI-1640) et le contrôle positif (PHA) au jour 4, ainsi que pour le contrôle négatif (RPMI-1640) et le contrôle positif (*C. albicans*) au jour 6 pour la quantification des cellules productrices d'IL-2.

Pour les mesures qui furent effectuées en présence de sels de sulfate de béryllium, les valeurs ont été relativement similaires au contrôle négatif. Pour la quantification des cellules productrices d'IFN- γ , la variation mesurée a été élevée pour toutes les conditions, et l'est davantage après 6 jours d'incubation (voir Tableau 10). La valeur médiane pour le contrôle négatif a été plus élevée que pour les conditions en présence de sulfate de béryllium, ce qui montre que la plupart des patients ont présenté des résultats normaux. Pour l'IL-2, la quantification s'est avérée limitée, surtout après 6 jours d'incubation (voir Tableau 11). La condition en présence de 100 μM de sulfate de béryllium a notamment montré une médiane de 0 SFU pour les 12 patients.

Tableau 10 : Nombre de cellules productrices d'IFN- γ en moyenne en présence de BeSO₄.

	4 jours (SFU/0,1 x 10 ⁶ cellules)				6 jours (SFU/0,1 x 10 ⁶ cellules)			
	Ctr	Be 1	Be 10	Be 100	Ctr	Be 1	Be 10	Be 100
Valeur minimum	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,3	0,0	0,0
Valeur maximum	17,3	18,7	15,0	18,7	27,3	14,7	24,0	31,0
Valeur médiane	6,7	3,7	3,3	2,9	7,8	8,0	7,8	8,5

Tableau 10 illustrant les valeurs en unités formant des spots (SFU) moyennes par 0,1 x 10⁶ cellules pour la production d'IFN- γ par les PBMCs isolées de chaque patient (n = 12). Les cellules ont été incubées durant 4 ou 6 jours en présence de BeSO₄ (Be 1 (1 μM), Be 10 (10 μM) et Be 100 (100 μM)).

Tableau 11 : Nombre de cellules productrices d'IL-2 en moyenne en présence de BeSO₄.

	4 jours (SFU/0,1 x 10 ⁶ cellules)				6 jours (SFU/0,1 x 10 ⁶ cellules)			
	Ctr	Be 1	Be 10	Be 100	Ctr	Be 1	Be 10	Be 100
Valeur minimum	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Valeur maximum	11,3	15,3	9,7	7,0	3,3	6,3	3,0	0,7
Valeur médiane	1,5	1,5	1,7	0,7	0,5	1,2	1,1	0,0

Tableau 11 illustrant les valeurs en unités formant des spots (SFU) moyennes par 0,1 x 10⁶ cellules pour la production d'IL-2 par les PBMCs isolées de chaque patient (n = 12). Les cellules ont été incubées durant 4 ou 6 jours en présence de BeSO₄ (Be 1 (1 µM), Be 10 (10 µM) et Be 100 (100 µM)).

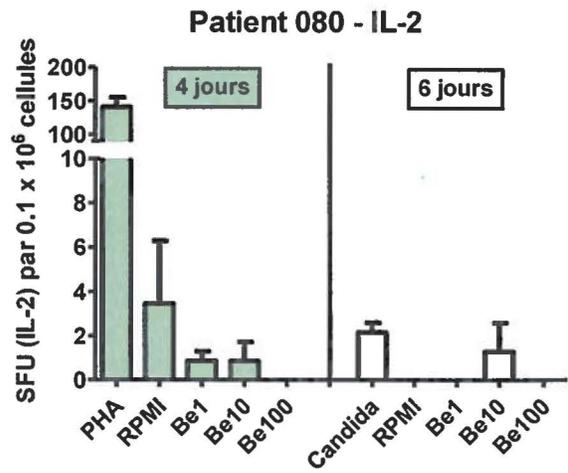
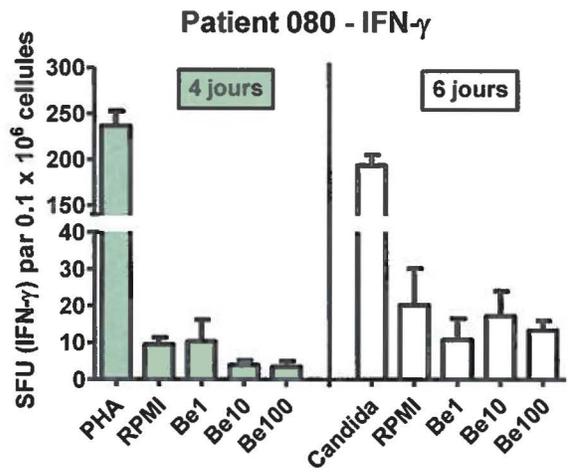
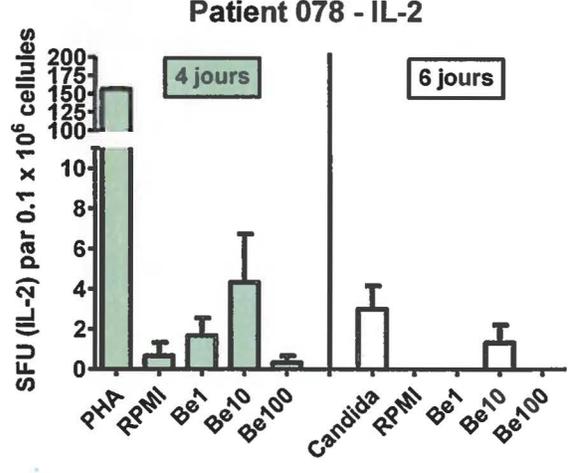
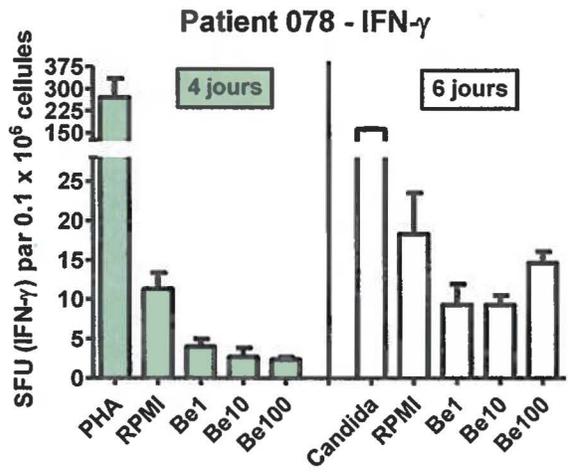
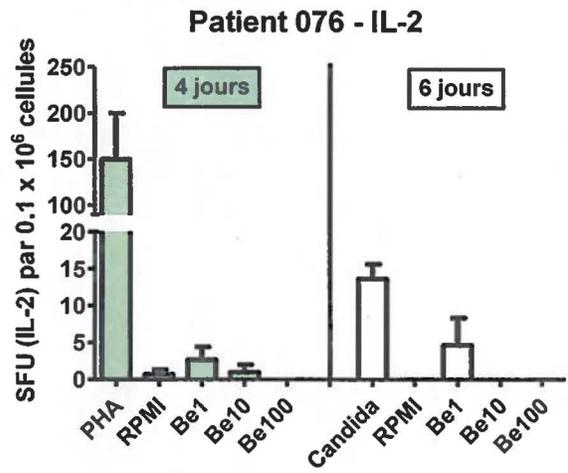
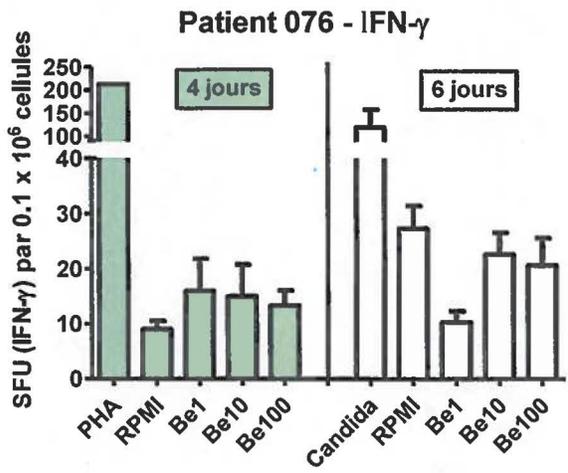
Pour la majorité des travailleurs, soit 8 sur 12, aucune différence significative ne fut mesurée en présence des différentes concentrations de sulfate de béryllium par rapport au milieu contrôle (voir Figure 13). Pour évaluer si une différence significative a été mesurée, un test t student fut effectué entre chaque valeur obtenue en présence de sulfate de béryllium et celle obtenue pour le contrôle (RPMI-1640).

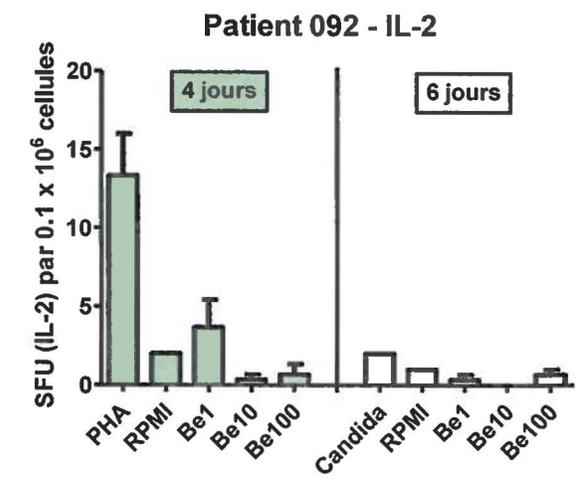
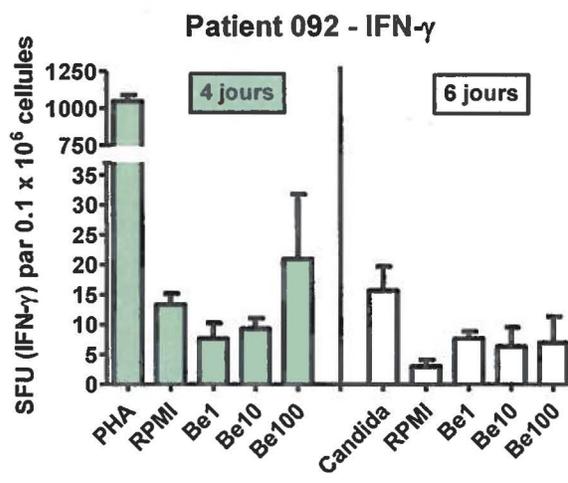
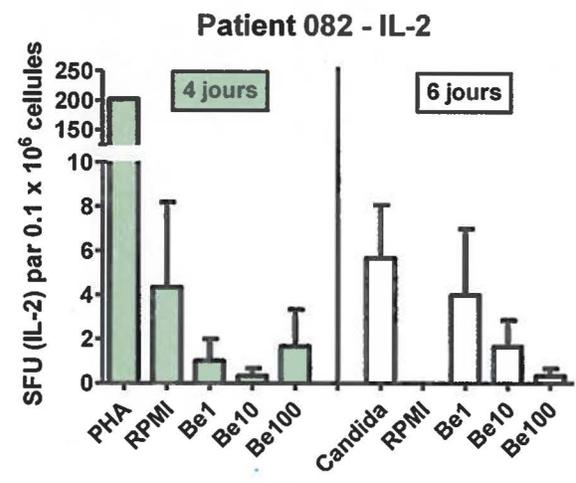
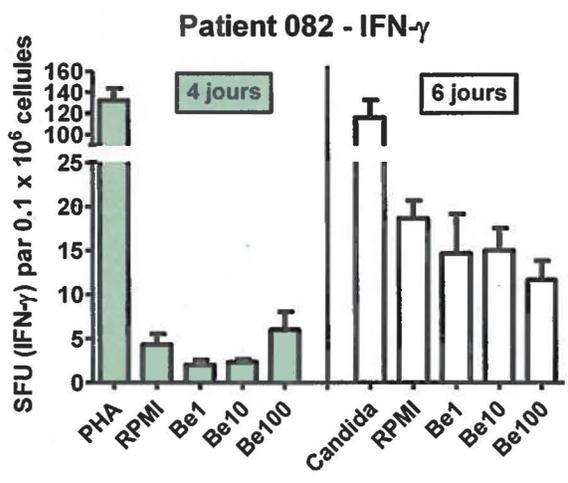
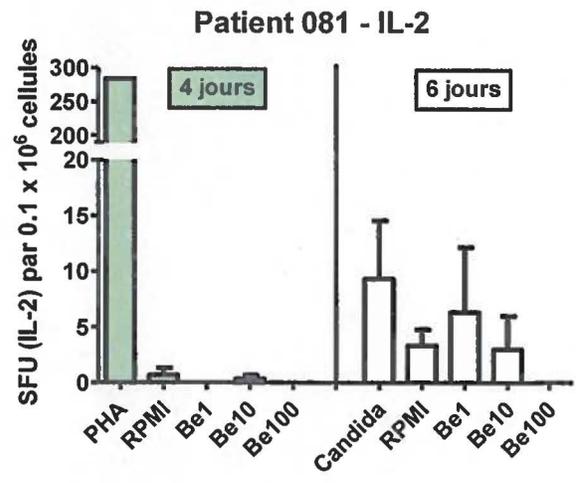
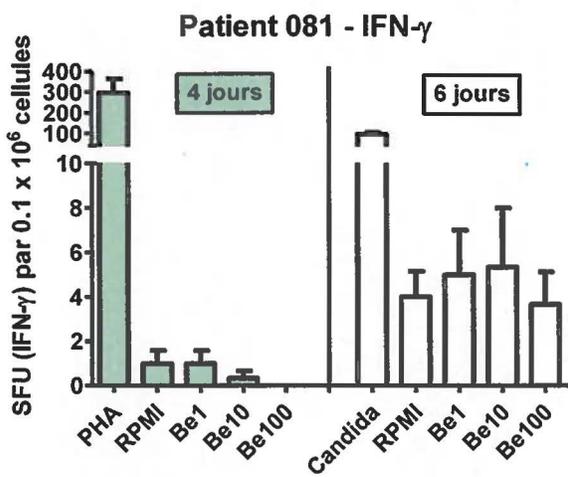
Pour deux des travailleurs, 94 et 98, des résultats significativement élevés furent mesurés pour une condition en présence de sulfate de béryllium (voir Figure 14). Le sujet 94 a montré une différence significative de production d'IFN-γ au jour 6 en présence de 1 µM de sulfate de béryllium. La quantité de SFU est de 8,3 ± 2,9 en présence de 1 µM de sulfate de béryllium, alors que la valeur dans le RPMI contrôle est de 2,0 ± 1,7. Pour le travailleur 98, une production significativement élevée d'IL-2 fut mesurée en présence de 1 µM de sulfate de béryllium après 4 jours d'incubation. Au jour 4, pour le contrôle négatif, aucun spot ne fut observé pour les trois répliques, alors qu'en présence de 1 µM de sulfate de béryllium, la quantité de SFU était de 9,3 ± 2,3.

Les résultats pour le nombre de cellules productrices d'IFN-γ dans le cas du travailleur 84 indiquent plus clairement une sensibilisation, car deux valeurs en présence de sulfate de béryllium sont supérieures au contrôle (voir Figure 15). Au jour 6, en présence de 10 µM et 100 µM de sulfate de béryllium, le nombre de spots a été de 24 ± 6 et 31 ± 8

respectivement, alors que pour le contrôle, 11 ± 4 spots ont été dénombrés. Pour le jour 4, il n'y a pas eu de production significative d'interféron- γ en présence des différentes concentrations de béryllium, mais le nombre de spots détecté est faible à l'exception du contrôle positif en présence de PHA. Aucune différence significative n'a été mesurée dans le cas du dénombrement des cellules productrices d'IL-2 en présence de sulfate de béryllium.

Pour le sujet 90, dont le BeLPT avait montré un résultat anormal incertain, aucune différence significative ne fut mesurée par la technique de l'ELISpot (voir Figure 16). Pour la quantification des cellules productrices d'IFN- γ , une certaine augmentation par rapport au contrôle est observée au jour 4 en présence de 1 et 10 μM de sulfate de béryllium, mais cette différence n'est pas statistiquement significative. Au jour 6, aucune tendance n'est observée, de même que pour la quantification des cellules productrices d'IL-2.





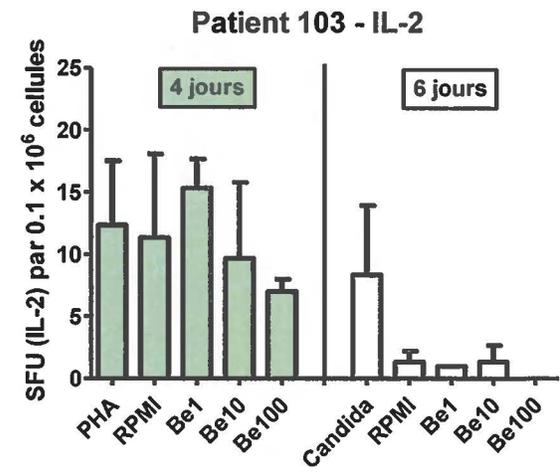
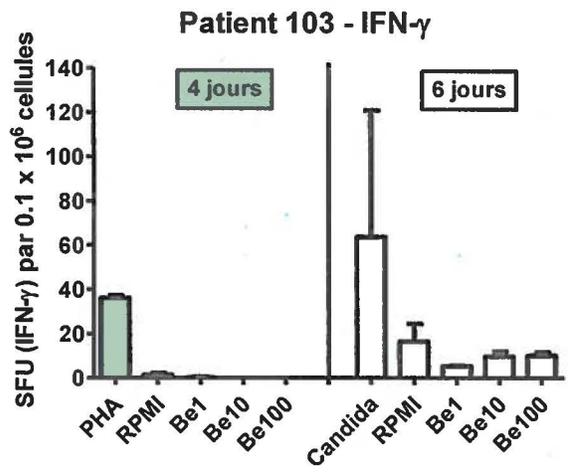
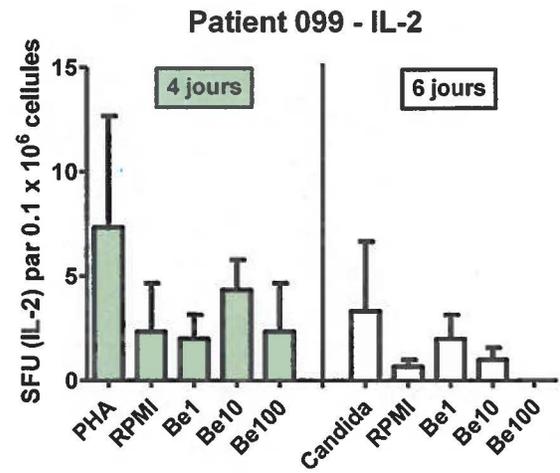
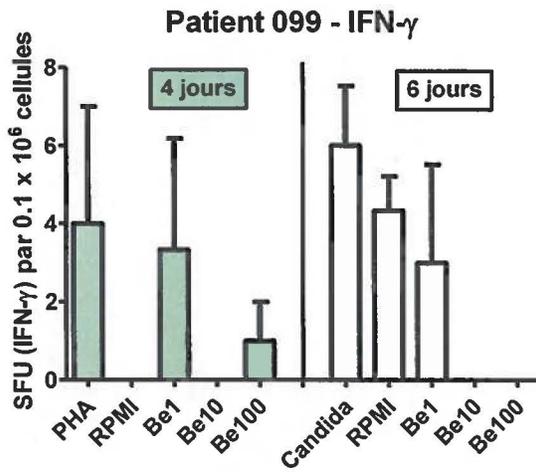


Figure 13 : Travailleurs normaux pour le nombre de cellules productrices d'IFN- γ ou IL-2 mesuré par ELISpot en présence de différentes concentrations de sulfate de béryllium.

Les PBMCs ont été isolées du sang des travailleurs, puis incubées ($0,1 \times 10^6$ cellules par puits) en présence de différente concentration de béryllium, soit Be 1 ($1 \mu\text{M}$), Be 10 ($10 \mu\text{M}$) et Be 100 ($100 \mu\text{M}$). L'évaluation du nombre de cellules productrices d'IFN- γ ou IL-2 fut effectuée à l'aide de la technique de l'ELISpot (voir matériels et méthodes). Le nombre de SFU a été déterminé avec le CTL immunospot analysé.

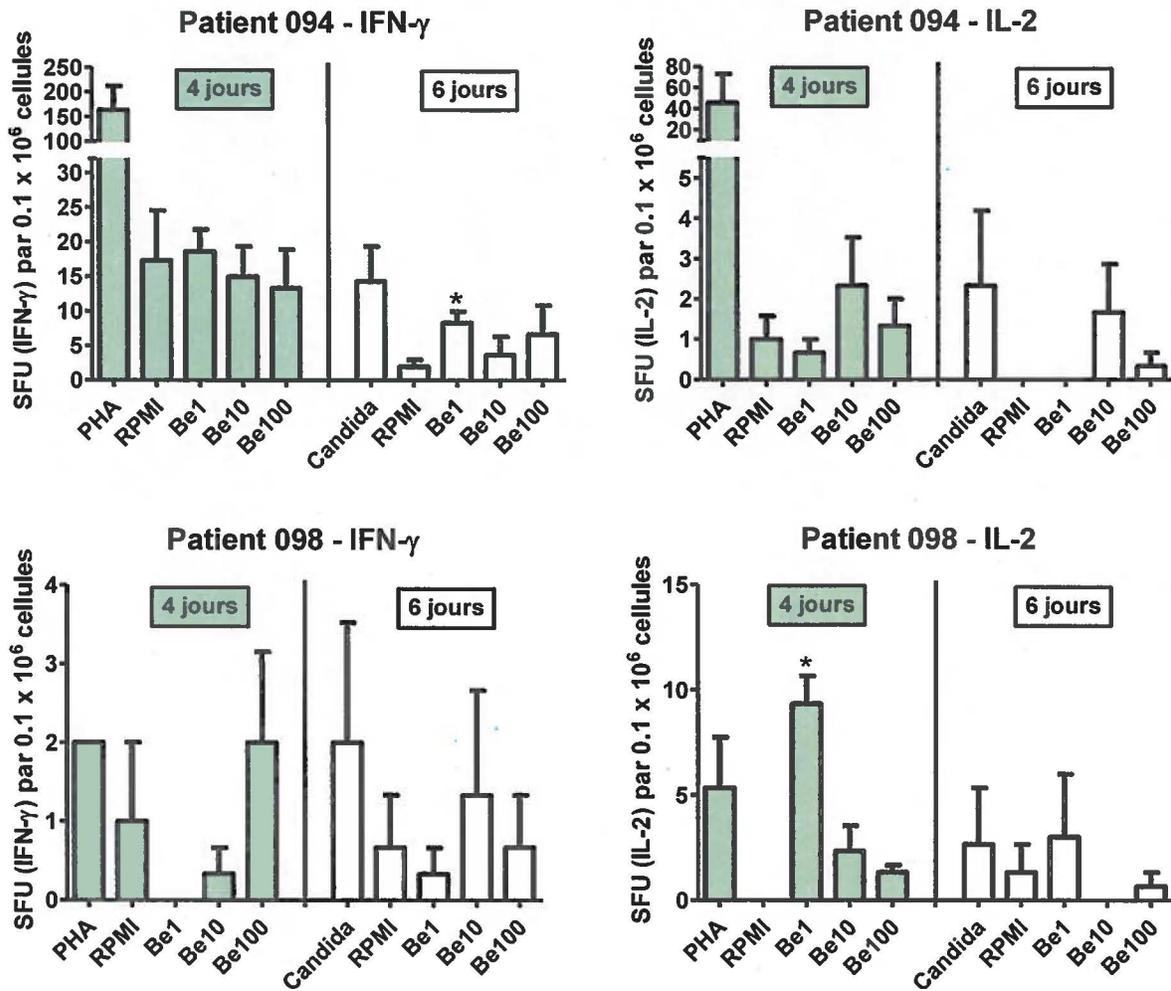


Figure 14 : Travailleurs 94 et 98, anormaux pour le nombre de cellules productrices d'IFN-γ ou IL-2 mesuré par ELISpot en présence de différentes concentrations de sulfate de béryllium.

Les PBMCs ont été isolées du sang des travailleurs, puis incubées ($0,1 \times 10^6$ cellules par puits) en présence de différente concentration de béryllium, soit Be 1 ($1 \mu\text{M}$), Be 10 ($10 \mu\text{M}$) et Be 100 ($100 \mu\text{M}$). L'évaluation du nombre de cellules productrices d'IFN-γ ou IL-2 fut effectuée à l'aide de la technique de l'ELISpot (voir matériels et méthodes). Le nombre de SFU a été déterminé avec le CTL immunospot analysé. (*) indique une différence significative ($p < 0.05$) par rapport au contrôle sans traitement (Student t test).

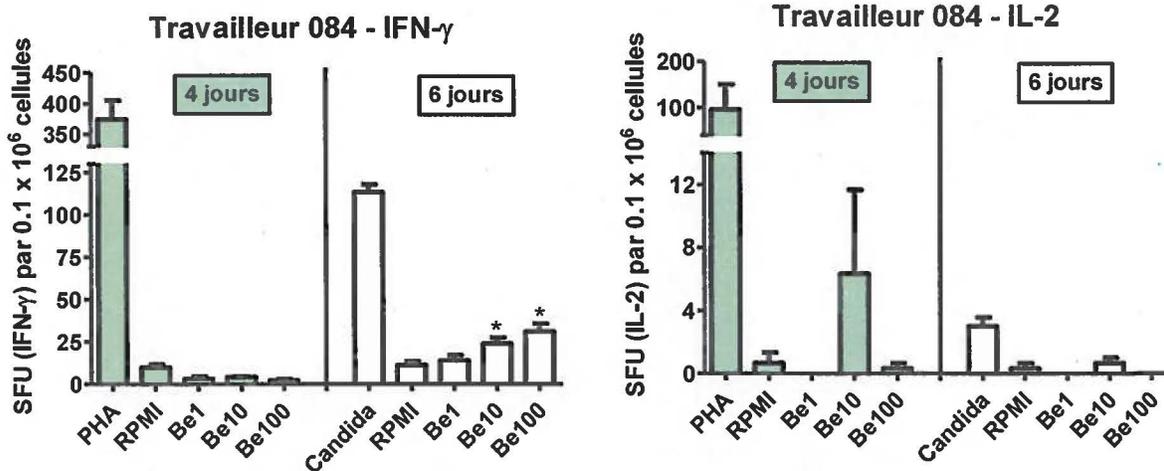


Figure 15 : Travailleur 84, anormal pour le nombre de cellules productrices d'IFN-γ mesuré par ELISpot en présence de différentes concentrations de sulfate de béryllium.

Les PBMCs ont été isolées du sang du travailleur, puis incubées ($0,1 \times 10^6$ cellules par puits) en présence de différente concentration de béryllium, soit Be 1 ($1 \mu\text{M}$), Be 10 ($10 \mu\text{M}$) et Be 100 ($100 \mu\text{M}$). L'évaluation du nombre de cellules productrices d'IFN-γ ou IL-2 fut effectuée à l'aide de la technique de l'ELISpot (voir matériels et méthodes). Le nombre de SFU a été déterminé avec le CTL immunospot analysé. (*) indique une différence significative ($p < 0.05$) par rapport au contrôle sans traitement (Student t test).

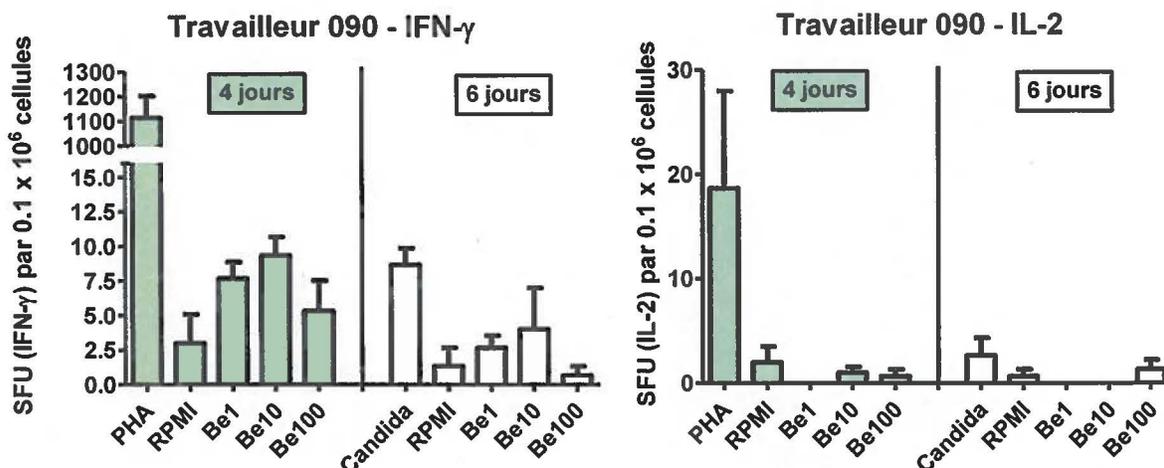


Figure 16 : Travailleur 90, normal pour le nombre de cellules productrices d'IFN-γ et IL-2 mesuré par ELISpot en présence de différentes concentrations de sulfate de béryllium.

Les PBMCs ont été isolées du sang du travailleur, puis incubées ($0,1 \times 10^6$ cellules par puits) en présence de différente concentration de béryllium, soit Be 1 ($1 \mu\text{M}$), Be 10 ($10 \mu\text{M}$) et Be 100 ($100 \mu\text{M}$). L'évaluation du nombre de cellules productrices d'IFN-γ ou IL-2 fut effectuée à l'aide de la technique de l'ELISpot (voir matériels et méthodes). Le nombre de SFU a été déterminé avec le CTL immunospot analysé.

Tableau 12 : Récapitulatif comparative des résultats pour les deux méthodes.

Méthode BeLPT	Méthode ELISpot
1 patient anormal incertain	IL-2 et IFN-γ normaux
1 patient normal, mais avec des valeurs de SI élevées	Deux valeurs anormales pour l'IFN-γ. IL-2 normal.
10 autres patients normaux	1 patient avec une valeur anormale pour l'IFN-γ, et 1 autre avec une valeur anormale pour l'IL-2.

V. DISCUSSION

5.1. Discussion

5.1.1. Test de prolifération lymphocytaire au béryllium

L'apparition d'une sensibilisation au béryllium découle d'une réponse immunitaire envers celui-ci. Elle est généralement associée à une réponse proliférative des cellules T CD4⁺ du sang en présence de sels de béryllium. L'attachement du béryllium à un peptide associé aux chaînes alpha et bêta des molécules HLA-DP du CMHII serait reconnu par le récepteur de l'antigène des lymphocytes T (TCR) spécifique au béryllium. L'activation des lymphocytes T entraînerait la sensibilisation et à long terme la maladie chronique du béryllium (Fontenot et al., 2000).

Le présent projet avait pour but de comparer et d'évaluer la concordance et la complémentarité de deux méthodes pour mesurer une sensibilisation au béryllium. Les deux méthodes utilisées étaient la méthode dite conventionnelle ou standard, soit le test de prolifération lymphocytaire au béryllium, ou BeLPT, et la méthode de l'Enzyme-Linked Immunospot ou ELISpot. L'analyse des échantillons a été réalisée en ne tenant pas compte du genre et de la condition du travailleur.

Parmi les échantillons sanguins reçus des travailleurs volontaires, 12 ont pu être analysés à des fins scientifiques. D'autres échantillons reçus avaient un nombre trop faible de PBMCs pour permettre de compléter l'analyse. Ce problème a également été rencontré par Pott et al., dont l'étude portait sur la quantification des antigènes spécifiques aux cellules T CD4⁺. L'une des difficultés constatée était la faible fréquence des cellules T CD4⁺ en circulation dans le sang (Pott et al., 2005).

Deux contrôles positifs furent utilisés, soit PHA et *C. albicans*. Dans le cas de tous les travailleurs, le PHA a induit une prolifération beaucoup plus importante que *C. albicans*. Ce résultat était attendu, car le PHA étant un mitogène, il induit une réponse proliférative et la

synthèse de protéines des lymphocytes T, et ce même si ces cellules T sont incapables de répondre adéquatement aux stimuli antigéniques. Pour ce qui est de *C. albicans*, comme il s'agit d'un antigène de rappel, il induit une prolifération uniquement auprès des cellules T ayant la capacité de le reconnaître comme un antigène via leur TCR. Le spectre d'action de *C. albicans* est donc moins large que celui du PHA. La réponse des PBMCs des différents patients à ces deux agents pour les contrôles positifs variait considérablement, ce qui est le résultat de la variabilité interindividus dans la réponse cellulaire.

Parmi les 12 échantillons analysés, un seul, le patient 90, a montré un résultat anormal incertain avec la technique du BeLPT. Pour confirmer un résultat anormal, deux valeurs plus grandes que 2,6 doivent être mesurées. Dans ce cas-ci, il n'y en avait qu'une seule. Un autre patient, bien que diagnostiqué comme normal, présentait quand même deux valeurs proches de 2,6, soit 2,3 et 2,0. Cela suggère qu'il pourrait s'agir d'un résultat faux négatif. Stange et al. expliquent que les résultats normaux ne serait pas un échec de l'essai, mais une manifestation de l'incapacité des individus faiblement sensibilisés à montrer un résultat toujours anormal. Leur étude a démontré que sur 519 patients, 138 étaient des faux négatifs par le test du BeLPT, soit 26,6 % des tests effectués pour ces participants (Stange et al., 2004). Des tests supplémentaires ont confirmé que ces participants étaient atteints de la béryllose. D'autres études ont montré que certaines personnes qui présentaient un résultat limite-anormal par le BeLPT, pouvait montrer un résultat normal lorsqu'elles étaient testées à nouveau dans le même laboratoire, alors que ces personnes étaient atteintes de la béryllose (Williams et Williams, 1983; Stange et al., 2004; Milovanova, 2007; Middleton et al., 2008; Nilsen et al., 2010; Middleton et al., 2011). Ce qui vient confirmer la discordance des résultats souvent observés avec le BeLPT.

5.1.2. ELISpot

Dans le second volet, nous avons testé, à partir du même stock de PBMCs que pour le BeLPT, l'efficacité de la technique de l'ELISpot. Nous avons ainsi mesuré le nombre de cellules produisant deux types de cytokines, soit l'IL-2 et l'IFN- γ . Des 12 participants, nous avons mesuré chez trois d'entre-eux un nombre plus élevé de cellules productrices de cytokines en présence de sulfate de béryllium par rapport au contrôle. Parmi ces trois individus, nous avons constaté qu'il y avait production d'IFN- γ chez deux d'entre-eux, et d'IL-2 pour le troisième. Celui-ci montre une certaine production d'IFN- γ , mais elle n'est pas significative ($p > 0.05$) selon le test t student. Martin et al. ont effectué une étude sur 33 patients atteints de la béryllose, et mesuré une production d'IFN- γ chez 20 individus, alors que seulement 12 manifestaient une production d'IL-2 (Martin et al., 2011). Fontenot et al. ont démontré que deux populations de cellules T CD4⁺ spécifiques au béryllium existent dans le sang et le liquide bronchoalvéolaire des patients atteints de la béryllose, les cellules T_{EM} et les cellules T_{CM} (Fontenot et al., 2002). Ils ont aussi observé que peu de cellules T CD4⁺ spécifiques au béryllium pouvaient sécréter seulement l'IL-2. Ce qui indique que parmi les cellules T CD4⁺ sensibilisées au béryllium, une faible proportion représente des cellules T_{CM}.

Ces observations sont très similaires à celles rapportées dans des études sur les infections virales persistantes, tel que l'infection au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) progressive. Lors d'une infection au VIH, les cellules T CD4⁺ spécifiques aux virus produisaient principalement de l'IFN- γ et peu ou pas d'IL-2 (Younes et al., 2003; Harari et al., 2004; Palmer et al., 2004). Cependant, dans leur étude, lorsque la charge virale d'antigène était réduite par l'administration de la thérapie antirétrovirale hautement active, ils percevaient une reprise partielle des cellules T_{CM} productrices d'IL-2 (Harari et al., 2004; Palmer et al., 2004). Il a également été démontré dans un autre modèle murin déficient en perforine, que lors de l'infection chronique par le virus de la chorioméningite lymphocytaire, les cellules T perdent d'abord la capacité à produire de l'IL-2, du TNF- α et enfin l'IFN- γ (Harari et al., 2004; Palmer et al., 2004). Ce qui pourrait expliquer le fait de ne

pas observer de l'IL-2 dans les échantillons où il y a sécrétion d'IFN- γ , notamment pour le patient 84.

Les cellules T_{CM} ne produisent pas de cytokines prototypes de la lignée des cellules effectrices immédiatement après stimulation par le TCR, à l'exception de l'IL-2. Ces cellules prolifèrent largement et acquièrent la capacité de produire des cytokines effectrices plus tard (Pepper et Jenkins, 2011). Elles expriment la molécule d'adhésion CD62L (L-sélectine) et le récepteur CCR7 de chimiokines, qui sont impliqués dans la migration à travers les ganglions lymphatiques et les organes lymphoïdes des muqueuses (Cyster, 2005). Il a été postulé que les cellules T_{CM} circulaient dans ces endroits et probablement y subissaient une réponse secondaire (Sallusto et al., 2004). Cette prédiction a été confirmée par des études avec des souris montrant que des cellules T CD4⁺ mémoires productrices d'IL-2 étaient présentes principalement dans les ganglions lymphatiques, alors que les cellules productrices d'IFN- γ sont situées dans les organes non lymphoïdes (Reinhardt et al., 2001).

Pour deux des trois patients positifs, soit le patient 94 et le patient 98 (voir Figure 14), une seule valeur significativement supérieure au contrôle est mesurée en présence de béryllium, et ce à la plus faible concentration de 1 μ M de BeSO₄. Ce résultat peut paraître contradictoire, car d'autres études ont montré que la concentration optimale pour évaluer s'il y a une réponse antigénique au béryllium est de 100 μ M (Pott et al., 2005; Martin et al., 2011). Par contre, pour le protocole d'ELISpot de ces études, les PBMCs sont incubées une nuit seulement, par rapport à 4 et 6 jours pour le protocole de notre étude. Cette plus longue durée d'incubation peut faire en sorte que certains spot se chevauchent à cause de leur nombre élevé et de leur diamètre plus grand, car les cellules ont davantage de temps pour sécréter des cytokines. Ce faisant, le compte effectué de façon automatisé à l'aide du CTL Immunospot Analyser pourrait être faussé. Cette plus longue durée d'incubation pourrait aussi expliquer les grandes disproportions observées entre les patients, notamment dans le cas de la production d'IFN- γ en réponse au PHA et à *C. albicans*. Cette variation pourrait donc non seulement être attribuable à la variabilité interindividus, mais

également à des comptes erronés dû à un trop grand nombre de spot. Il serait se faisant justifié de mener des tests d'optimisation du protocole pour l'ELISpot de façon établir la durée d'incubation optimale pour obtenir une variabilité acceptable entre les patients, tout en gardant une bonne sensibilité de détection. Par exemple, dans le cas du patient 84, positif pour la production d'IFN- γ , l'effet est uniquement observable après 6 jours d'incubation. Par contre, lorsqu'on prend en compte tous les patients, la variation est généralement plus élevée après 6 jours par rapport à 4 jours. Il faudrait donc conserver un long temps d'incubation pour les patients dont les PBMCs répondent plus lentement, et un temps plus court pour améliorer la précision du test.

5.1.3. Comparaison des deux méthodes

Lorsque l'on compare la variance entre les résultats pour les différents patients, on constate que la variation est plus grande pour les résultats des ELISpot par rapport au BeLPT. Les résultats pour le BeLPT se sont avérés plus constants et précis lorsque la durée d'incubation était de 4 jours, en comparaison à 6 jours. Tous les contrôles positifs se sont avérés significativement plus élevés. En comparant les taux de réponses anormales pour les ELISpot IFN- γ /IL-2 et les résultats BeLPT, nous remarquons qu'avec la méthode d'ELISpot, nous avons trois résultats anormaux, tandis qu'il n'y en a qu'un seul avec le test BeLPT. De plus, aucun des sujets désignés comme anormaux dans le cas de l'ELISpot ou anormal incertain dans le cas du BeLPT n'est commun aux deux méthodes. Par contre, l'un des travailleur ayant montré une quantité plus grande de cellules productrices d'IFN- γ (patient 84) serait un candidat à être tester une seconde fois, car deux valeurs d'index de stimulation mesurées sont près de la valeur critique de 2,6 (2,3 et 2,0). Ce patient, contrairement aux deux autres ayant eu un test ELISpot anormal, avait deux valeurs de SFU plus élevées que le contrôle, avec un effet augmentant avec la concentration de sulfate de béryllium (voir Figure 16). Inversement, les deux autres patients avaient une seule valeur positive, et celle-ci était mesurée à la plus faible concentration de sulfate de béryllium (voir Figure 14). Cela montre une bonne correspondance entre les deux tests, car le travailleur ayant un test ELISpot clairement positif présente un BeLPT anormal, mais avec un index de

stimulation assez proche de la valeur critique. La complémentarité s'observe également, car les trois tests positifs incertains (2 ELISpot et 1 BeLPT) sont confirmés comme des faux positifs d'après les résultats pour l'autre test complémentaire.

Martin et al., ont réalisé une étude auprès d'une cohorte de 260 travailleurs exposés au béryllium. Ils établirent chez 8 sujets, parmi les 26 ayant obtenu une réponse anormale à l'ELISpot et normale pour le BeLPT, un diagnostic d'une béryllose. Toujours dans le cadre de leur étude, les sujets qui avaient eu une réponse anormale à l'ELISpot et normale au BeLPT possédaient le marqueur majeur génétique de la béryllose HLA-DP β 1Glu69 (Martin et al., 2011). Une étude de Stange et al. a été conduite auprès de 12 194 individus sur une période de 9 ans (1992-2001), et a démontré que le taux de faux négatif variait entre 25-38% et cela même entre différents laboratoires (Stange et al., 2004). Bien que le nombre de travailleurs de la cohorte pour notre étude soit faible, plusieurs études dans la littérature démontrent l'efficacité et l'intérêt grandissant pour la méthode de l'ELISpot.

Le BeLPT est la méthode standard pour documenter la présence d'une réponse immunitaire spécifique au béryllium dans le sang (Rossman et al., 1988; Mroz et al., 1991). Grâce à la sensibilité de cette méthode, elle est utilisée pour surveiller et diagnostiquer la sensibilisation au béryllium en milieu de travail. Elle est notamment une composante requise au programme de prévention des maladies chroniques du béryllium du US Department of Energy (Chronic beryllium disease prevention program. Office of environment et Safety and Health, 1999). Cette méthode est par contre critiquée à cause de la variabilité des résultats du test. Le BeLPT ne permet pas de distinguer entre un individu sensibilisé ou atteint de la béryllose. Pour ce faire, il est requis d'effectuer une bronchoscopie, un lavage bronchoalvéolaire et une biopsie du poumon afin de confirmer la progression vers la béryllose (Maier, 2001; Frome et al., 2003; Stange et al., 2004; Newman et al., 2005).

Dans les poumons, certaines cellules T CD4⁺ spécifiques au béryllium prolifèrent difficilement après l'exposition à l'antigène, mais elles maintiennent quand même la capacité de sécréter des cytokines de type Th1 (Fontenot et al., 2002). Ceci pourrait expliquer pourquoi nous avons obtenu une augmentation significative du nombre de cellules productrices d'IFN- γ pour le patient 84, alors que le BeLPT était normal. La littérature soutient aussi que malgré la présence d'une quantité significative de cellules T CD4⁺ spécifiques au béryllium dans le sang, la capacité de ces cellules à se diviser est intimement liée à l'état de maturation des cellules T mémoires (Fontenot et al., 2005). On observe chez certains individus souffrant de la béryllose une réduction lymphoproliférative induite par le béryllium. Celle-ci ne serait pas due à l'absence de cellules T CD4⁺ spécifiques au béryllium dans la circulation, mais serait plutôt causée par la fraction élevée de T_{EM}, incapables de proliférer vigoureusement. Cependant, il reste possible que la fréquence des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques au béryllium dans le sang fluctue au cours de la maladie, avec une fréquence plus élevée dans la circulation des cellules spécifiques à l'antigène lorsque l'inflammation pulmonaire est élevée. Au moment des prélèvements d'échantillons ce n'était peut-être pas le cas. De plus, les personnes ayant participé à l'étude sont des travailleurs actuellement en contact avec le béryllium, donc qui y sont potentiellement exposés en continu. Dans de telles circonstances, s'il y a présence de cellules T_{EM} CD4⁺ spécifiques au béryllium, celles-ci peuvent présenter le phénotype d'une cellule épuisée ou même en sénescence, ce qui limite leur habilité à proliférer en réponse à l'antigène (Palmer et al., 2007; Palmer et al., 2008). Dans le cas d'anciens travailleurs, l'exposition n'est plus soutenue, donc leur pool potentiel de cellules T_{EM} CD4⁺ spécifique au béryllium aura repris sa pleine capacité à proliférer dû à l'absence d'une exposition antigénique. Le BeLPT pour ces anciens travailleurs présente une meilleure efficacité pour la détection d'une sensibilisation (Martin et al., 2011).

5.1.4. Autres méthodes

Bien que le BeLPT soit une méthode sensible et bien établie, elle ne donne pas d'informations sur la réponse des sous-populations lymphocytaires, nécessite l'utilisation de la radioactivité et a une forte variabilité inter et intralaboratoire (Deubner et al., 2001; Deubner et al., 2001; Maier, 2001). L'utilisation du composé fluorescent CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) pour mesurer la prolifération serait une méthode cliniquement pertinente d'analyse qui permettrait de résoudre l'aspect de la radioactivité. Cette méthode a été développée pour mesurer la prolifération des lymphocytes T (Dye et al., 1999; Kallenberg et Tadema, 2008). Le CFSE se lie aux protéines intracellulaires et de surface suite à une réaction des chaînes latérales de lysine et autres groupes amines disponibles. Lorsque les cellules se divisent, la fluorescence du CFSE est répartie également entre les cellules filles, qui sont donc deux fois moins fluorescentes que la cellule parent. La réduction de moitié de l'intensité de la fluorescence cellulaire marque donc chaque génération successive dans une population de cellules en prolifération et est facilement mesurable par cytométrie en flux. Le nombre de divisions pouvant être suivies est par contre limité par le niveau de fluorescence de base des cellules non marquées et l'uniformité de la taille de la population de cellules marquées (Hodgkin et al., 1996; Lyons et al., 2001; Kallenberg et Tadema, 2008).

Une étude a été réalisée auprès de 72 individus travaillant dans une industrie de traitement du béryllium dans le but de comparer la détection d'une sensibilisation au béryllium ou de la MCB par la méthode de BeLPT en utilisant soit la ^3H -thymidine ou le CFSE (Milovanova, 2007). Les résultats ont montré une bonne concordance entre les deux méthodes suggérées, mais le test CFSE aurait une meilleure spécificité et une sensibilité plus grande que la [^3H] thymidine. L'étude conclue que les deux méthodes peuvent être utilisées pour évaluer la prolifération des lymphocytes T CD4^+ spécifique au béryllium et peuvent améliorer sensiblement la qualité du diagnostic précoce de l'hypersensibilité au béryllium (Milovanova, 2007).

Farris et *al.* ont mis au point une nouvelle méthode appelée immuno-BeLPT (Farris et al., 2000). Ils l'ont nommée ainsi parce qu'elle combine un immunophénotypage à la mesure de la prolifération des lymphocytes par stimulation avec le béryllium dans un même test. Le principe est le suivant, des anticorps monoclonaux et des empreintes d'ADN fluorescents sont utilisés pour évaluer la synthèse d'ADN ainsi que l'ADN contenu dans certaines sous-populations lymphocytaires. Les lymphocytes sont alors identifiés comme des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ à l'aide d'anticorps anti-CD4 ou CD8. Deux versions de l'immuno-BeLPT ont été développées. Dans la première, la prolifération cellulaire est détectée après plusieurs jours de culture en présence d'anatoxine tétanique ou de sulfate de béryllium en mesurant l'incorporation de la bromodésoxyuridine (BrdU). Celle-ci fonctionne de façon analogue à l'incorporation de la thymidine, sauf que des marqueurs fluorescents sont utilisés à la place de radio-marqueurs. Dans le second Immuno-BeLPT, la prolifération cellulaire est confirmée par l'analyse du contenu en ADN et la modélisation du cycle cellulaire après plusieurs jours de culture avec l'anatoxine tétanique ou le sulfate de béryllium suivi d'une coloration au 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) ou à l'iodure de propidium (PI). La coloration au DAPI permet de dénombrer la totalité des cellules, car ce fluorochrome se lie spécifiquement à l'ADN et émet une fluorescence bleue. Le PI est un fluorochrome rouge qui s'intercale dans l'ADN des cellules fixées ou mortes, car la membrane cellulaire doit être altérée pour permettre au PI d'entrée dans le cytoplasme. L'avantage du Immuno-BeLPT, est qu'il permet de comparer la réponse proliférative des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, tout en effectuant une seule lecture par cytométrie en flux (Farris et al., 2000). Des études supplémentaires pourraient éventuellement permettre de déterminer, à partir des informations obtenues par l'Immuno-BeLPT, le stade de développement vers la béryllose auquel un individu se situe.

Une autre technique qui pourrait permettre de prévenir plus efficacement le développement de la béryllose est l'analyse pour déterminer la prédisposition génétique. Cela pourrait être effectué par PCR en utilisant des séquences d'amorces spécifiques pour le HLA-DPβ1. On sait maintenant que les personnes portant le gène HLA-DPβ1Glu69 sont plus à risques de développer une sensibilisation au béryllium lorsqu'elles y sont exposées

(Van Dyke et al., 2011). Par contre, les études effectuées jusqu'à maintenant ne permettent pas de confirmer si cette prédisposition génétique a une influence sur le développement de la béryllose lorsque la personne est sensibilisée.

VI. CONCLUSION

6.1. Conclusion

La présence de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques au béryllium est actuellement déterminée en utilisant le BeLPT (Newman et Maier, 2003). Cependant, ce test nécessite que les cellules spécifiques au béryllium maintiennent leur capacité à proliférer en culture après stimulation antigénique. De plus, le test ne permet pas une quantification précise des fréquences réelles des cellules répondantes. Le dosage des cellules productrices de cytokines avec l'ELISpot présente l'avantage d'être quantitatif, et ne nécessite par l'utilisation de la radioactivité (Guerkov et al., 2003; Kreher et al., 2003). Comme cela a été démontré, l'ELISpot peut identifier préférentiellement un sous-ensemble de lymphocytes T effecteurs mémoires (T_{EM}), tandis que le BeLPT identifie le sous-ensemble de cellules sensibles au béryllium mémoires central (T_{CM}).

Nos résultats suggèrent la nécessité d'une étude comparant l'ELISpot et les résultats du test BeLPT pour une cohorte de patients plus grande. Cela pourrait permettre de déterminer quelles quantités de cellules productrices d'IFN- γ ou IL-2 correspondent à l'identification d'une sensibilisation au béryllium, ou à un diagnostic de la béryllose. Puisque le dosage des cellules productrices d'IFN- γ et d'IL-2 au moyen de l'ELISpot et le test BeLPT mesure différentes fonctions des cellules, il est également possible que ces tests puissent avoir des rôles complémentaires dans la surveillance de la maladie. Les différences observées dans le nombre de cellules sécrétant des cytokines entre les patients sensibilisés et les travailleurs ayant la béryllose fournissent une base pour de futures études dans le but de vérifier si l'analyse par ELISpot permettrait de prédire une progression de la sensibilisation au béryllium vers la béryllose.

VII. RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE

7.1. Référence

- (ATSDR), A. f. T. S. a. D. R. (2002). "Toxicological profile for beryllium." Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- (DOE), D. o. E. (1996). "A comprehensive assessment of toxic emissions from coal-fired power plants-topical report." Department of Energy.
- (EPA), E. P. A. (1987). "Health assessment document for beryllium." Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment, U.S. Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, NC for Office of Health and Environmental Assessment, Office of Research and Development.
- (WHO), W. H. O. (1990). "Environmental health criteria for beryllium."
- (WHO), W. H. O. (2001). "Beryllium and Beryllium Compounds." Concise International Chemical Assessment Document 32: 6-7, 21-31.
- Agostini, C., Albera, C., Bariffi, F., De Palma, M., Harari, S., Lusuardi, M., Pesci, A., *et al.* (2001). "First report of the Italian register for diffuse infiltrative lung disorders (RIPID)." Monaldi Arch Chest Dis 56(4): 364-368.
- Amicosante, M., Berretta, F., Dweik, R. et Saltini, C. (2009). "Role of high-affinity HLA-DP specific CLIP-derived peptides in beryllium binding to the HLA-DP_{Glu69} berylliosis-associated molecules and presentation to beryllium-sensitized T cells." Immunology 128(1 Suppl): e462-470.
- Amicosante, M., Sanarico, N., Berretta, F., Arroyo, J., Lombardi, G., Lechler, R., Colizzi, V., *et al.* (2001). "Beryllium binding to HLA-DP molecule carrying the marker of susceptibility to berylliosis glutamate beta 69." Hum Immunol 62(7): 686-693.
- Ansel, K. M., Djuretic, I., Tanasa, B. et Rao, A. (2006). "Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility." Annu Rev Immunol 24: 607-656.
- Aron, Y., Desmazes-Dufeu, N., Matran, R., Polla, B. S., Dusser, D., Lockhart, A. et Swierczewski, E. (1996). "Evidence of a strong, positive association between atopy and the HLA class II alleles DR4 and DR7." Clin Exp Allergy 26(7): 821-828.
- Ausiello, C. M., Spagnoli, G. C., Boccanera, M., Casalnuovo, I., Malavasi, F., Casciani, C. U. et Cassone, A. (1986). "Proliferation of human peripheral blood mononuclear cells induced by *Candida albicans* and its cell wall fractions." J Med Microbiol 22(3): 195-202.
- Bach, E. A., Aguet, M. et Schreiber, R. D. (1997). "The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling." Annu Rev Immunol 15: 563-591.
- Barna, B. P., Dweik, R. A., Farver, C. F., Culver, D., Yen-Lieberman, B. et Thomassen, M. J. (2002). "Nitric oxide attenuates beryllium-induced IFN γ responses in chronic beryllium disease: evidence for mechanisms independent of IL-18." Clin Immunol 103(2): 169-175.
- Ben-Ali, M., Barbouche, M. R., Bousnina, S., Chabbou, A. et Dellagi, K. (2004). "Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients." Clin Diagn Lab Immunol 11(3): 625-626.
- Berard, M. et Tough, D. F. (2002). "Qualitative differences between naive and memory T cells." Immunology 106(2): 127-138.
- Bergeron, A., Bonay, M., Kambouchner, M., Lecossier, D., Riquet, M., Soler, P., Hance, A., *et al.* (1997). "Cytokine patterns in tuberculous and sarcoid granulomas: correlations

- with histopathologic features of the granulomatous response." J Immunol **159**(6): 3034-3043.
- Bergschmidt, P., Bader, R. et Mittelmeier, W. (2012). "Metal hypersensitivity in total knee arthroplasty: revision surgery using a ceramic femoral component - a case report." Knee **19**(2): 144-147.
- Berretta, F., Butler, R. H., Diaz, G., Sanarico, N., Arroyo, J., Fraziano, M., Aichinger, G., *et al.* (2003). "Detailed analysis of the effects of Glu/Lys beta69 human leukocyte antigen-DP polymorphism on peptide-binding specificity." Tissue Antigens **62**(6): 459-471.
- Bill, J. R., Mack, D. G., Falta, M. T., Maier, L. A., Sullivan, A. K., Joslin, F. G., Martin, A. K., *et al.* (2005). "Beryllium presentation to CD4+ T cells is dependent on a single amino acid residue of the MHC class II beta-chain." J Immunol **175**(10): 7029-7037.
- Bisetti, A. A. (1988). "Bernardino Ramazzini and occupational lung medicine." Ann N Y Acad Sci **534**: 1029-1037.
- Bluestone, J. A. (1995). "New perspectives of CD28-B7-mediated T cell costimulation." Immunity **2**(6): 555-559.
- Bosnjak, B., Stelzmueller, B., Erb, K. J. et Epstein, M. M. (2011). "Treatment of allergic asthma: modulation of Th2 cells and their responses." Respir Res **12**: 114.
- Bretscher, P. et Cohn, M. (1970). "A theory of self-nonsel discrimination." Science **169**(3950): 1042-1049.
- Bruce, R. et Odin, M. (2001). "Beryllium and beryllium compounds." Concise International Chemical Assessment Document 32 Geneva, Organisation mondiale de la santé: 75.
- Bryl, E., Vallejo, A. N., Weyand, C. M. et Goronzy, J. J. (2001). "Down-regulation of CD28 expression by TNF-alpha." J Immunol **167**(6): 3231-3238.
- Butnor, K. J., Sporn, T. A., Ingram, P., Gunasegaram, S., Pinto, J. F. et Roggli, V. L. (2003). "Beryllium detection in human lung tissue using electron probe X-ray microanalysis." Mod Pathol **16**(11): 1171-1177.
- Chatila, T. A., Li, N., Garcia-Lloret, M., Kim, H. J. et Nel, A. E. (2008). "T-cell effector pathways in allergic diseases: transcriptional mechanisms and therapeutic targets." J Allergy Clin Immunol **121**(4): 812-823; quiz 824-815.
- Chaudhary, A., Sauer, N. N. et Gupta, G. (2004). "Beryllium-specific immune response in primary cells from healthy individuals." Toxicology **201**(1-3): 9-19.
- Chen, E. S. et Moller, D. R. (2007). "Expression profiling in granulomatous lung disease." Proc Am Thorac Soc **4**(1): 101-107.
- Chronic beryllium disease prevention program. Office of environment et Safety and Health, D. o. E. F. r. (1999). Fed Regist **64**(68854): 914.
- Clay, H., Volkman, H. E. et Ramakrishnan, L. (2008). "Tumor necrosis factor signaling mediates resistance to mycobacteria by inhibiting bacterial growth and macrophage death." Immunity **29**(2): 283-294.
- Cleverly DH, M. R., Riddle BL (1989). "Regulatory analysis of pollutant emissions, including polychlorinated dibenzo-p-dioxins (CDDs) and dibenzofurans (CDFs), from the stacks of municipal waste combustors." chemosphere **18**: 1143-1153.
- Comhair, S. A., Lewis, M. J., Bhatena, P. R., Hammel, J. P. et Erzurum, S. C. (1999). "Increased glutathione and glutathione peroxidase in lungs of individuals with chronic beryllium disease." Am J Respir Crit Care Med **159**(6): 1824-1829.

- CSST "Nettoyage et décontamination des lieux de travail où il y a la présence de Beryllium." Synthèse des bonnes pratiques.
- Cummings, K. J., Stefaniak, A. B., Virji, M. A. et Kreiss, K. (2009). "A reconsideration of acute Beryllium disease." Environ Health Perspect **117**(8): 1250-1256.
- Cyster, J. G. (2005). "Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs." Annu Rev Immunol **23**: 127-159.
- Dalphin J.C. et Andujarn .P. (2005). "Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) d'origine professionnelle." Rev Mal Respir **22**.
- Daniele, R. P., Elias, J. A., Epstein, P. E. et Rossman, M. D. (1985). "Bronchoalveolar lavage: role in the pathogenesis, diagnosis, and management of interstitial lung disease." Ann Intern Med **102**(1): 93-108.
- Dastoori, M., Fedele, S., Leao, J. C. et Porter, S. R. (2012). "Sarcoidosis - a clinically orientated review." J Oral Pathol Med.
- Davis, M. M. (1990). "T cell receptor gene diversity and selection." Annu Rev Biochem **59**: 475-496.
- Day, G. A., Dufresne, A., Stefaniak, A. B., Schuler, C. R., Stanton, M. L., Miller, W. E., Kent, M. S., et al. (2007). "Exposure pathway assessment at a copper-beryllium alloy facility." Ann Occup Hyg **51**(1): 67-80.
- Day, G. A., Hoover, M. D., Stefaniak, A. B., Dickerson, R. M., Peterson, E. J., Esmen, N. A. et Scripsick, R. C. (2005). "Bioavailability of beryllium oxide particles: an in vitro study in the murine J774A.1 macrophage cell line model." Exp Lung Res **31**(3): 341-360.
- De Maeyer, E. et De Maeyer-Guignard, J. (1998). "Type I interferons." Int Rev Immunol **17**(1-4): 53-73.
- DeRemee, R. A. (1994). "Sarcoidosis and Wegener's granulomatosis: a comparative analysis." Sarcoidosis **11**(1): 7-18.
- Deubner, D., Kelsh, M., Shum, M., Maier, L., Kent, M. et Lau, E. (2001). "Beryllium sensitization, chronic beryllium disease, and exposures at a beryllium mining and extraction facility." Appl Occup Environ Hyg **16**(5): 579-592.
- Deubner, D. C., Goodman, M. et Iannuzzi, J. (2001). "Variability, predictive value, and uses of the beryllium blood lymphocyte proliferation test (BLPT): preliminary analysis of the ongoing workforce survey." Appl Occup Environ Hyg **16**(5): 521-526.
- Deubner, D. C., Lowney, Y. W., Paustenbach, D. J. et Warmerdam, J. (2001). "Contribution of incidental exposure pathways to total beryllium exposures." Appl Occup Environ Hyg **16**(5): 568-578.
- Ding, M., Shi, X., Castranova, V. et Vallyathan, V. (2000). "Predisposing factors in occupational lung cancer: inorganic minerals and chromium." J Environ Pathol Toxicol Oncol **19**(1-2): 129-138.
- Dobis, D. R., Sawyer, R. T., Gillespie, M. M., Huang, J., Newman, L. S., Maier, L. A. et Day, B. J. (2008). "Modulation of lymphocyte proliferation by antioxidants in chronic beryllium disease." Am J Respir Crit Care Med **177**(9): 1002-1011.
- Drolet-Vives, K., Zayed, J. et Sauve, S. (2009). "Assessment of hair and bone accumulation of beryllium by mice exposed to contaminated dusts." J Appl Toxicol **29**(7): 638-642.
- Dye, C., Scheele, S., Dolin, P., Pathania, V. et Raviglione, M. C. (1999). "Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project." JAMA **282**(7): 677-686.

- Epstein, P. E., Dauber, J. H., Rossman, M. D. et Daniele, R. P. (1982). "Bronchoalveolar lavage in a patient with chronic berylliosis: evidence for hypersensitivity pneumonitis." Ann Intern Med **97**(2): 213-216.
- Farris, G. M., Newman, L. S., Frome, E. L., Shou, Y., Barker, E., Habbersett, R. C., Maier, L., *et al.* (2000). "Detection of beryllium sensitivity using a flow cytometric lymphocyte proliferation test: the Immuno-Be-LPT." Toxicology **143**(2): 125-140.
- Finch, G. L., Mewhinney, J. A., Hoover, M. D., Eidson, A. F., Haley, P. J. et Bice, D. E. (1990). "Clearance, translocation, and excretion of beryllium following acute inhalation of beryllium oxide by beagle dogs." Fundam Appl Toxicol **15**(2): 231-241.
- Flynn, J. L., Chan, J. et Lin, P. L. (2011). "Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis." Mucosal Immunol **4**(3): 271-278.
- Fontenot, A. P. et Amicosante, M. (2008). "Metal-induced diffuse lung disease." Semin Respir Crit Care Med **29**(6): 662-669.
- Fontenot, A. P., canavera, S. J., Gharavi, L., Newman, L. S. et Kotzin, B. L. (2000). "Beryllium presentation to CD4+ cells underlies disease susceptibility HLA-DP alleles in chronic beryllium disease." Proc Natl Acad Sci U S A **97**:12717-22.
- Fontenot, A. P., Canavera, S. J., Gharavi, L., Newman, L. S. et Kotzin, B. L. (2002). "Target organ localization of memory CD4(+) T cells in patients with chronic beryllium disease." J Clin Invest **110**(10): 1473-1482.
- Fontenot, A. P., Edwards, D. M., Chou, Y. K., Mack, D. G., LaTocha, D., Vandembark, A. A. et Burrows, G. G. (2006). "Self-presentation of beryllium by BAL CD4+ T cells: T cell-T cell interactions and their potential role in chronic beryllium disease." Eur J Immunol **36**(4): 930-939.
- Fontenot, A. P., Falta, M. T., Freed, B. M., Newman, L. S. et Kotzin, B. L. (1999). "Identification of pathogenic T cells in patients with beryllium-induced lung disease." J Immunol **163**(2): 1019-1026.
- Fontenot, A. P., Gharavi, L., Bennett, S. R., Canavera, S. J., Newman, L. S. et Kotzin, B. L. (2003). "CD28 costimulation independence of target organ versus circulating memory antigen-specific CD4+ T cells." J Clin Invest **112**(5): 776-784.
- Fontenot, A. P., Kotzin, B. L., Comment, C. E. et Newman, L. S. (1998). "Expansions of T-cell subsets expressing particular T-cell receptor variable regions in chronic beryllium disease." Am J Respir Cell Mol Biol **18**(4): 581-589.
- Fontenot, A. P., Newman, L. S. et Kotzin, B. L. (2001). "Chronic beryllium disease: T cell recognition of a metal presented by HLA-DP." Clin Immunol **100**(1): 4-14.
- Fontenot, A. P., Palmer, B. E., Sullivan, A. K., Joslin, F. G., Wilson, C. C., Maier, L. A., Newman, L. S., *et al.* (2005). "Frequency of beryllium-specific, central memory CD4+ T cells in blood determines proliferative response." J Clin Invest **115**(10): 2886-2893.
- Foulds, K. E., Rotte, M. J., Paley, M. A., Singh, B., Douek, D. C., Hill, B. J., O'Shea, J. J., *et al.* (2008). "IFN-gamma mediates the death of Th1 cells in a paracrine manner." J Immunol **180**(2): 842-849.
- Frome, E. L., Newman, L. S., Cragle, D. L., Colyer, S. P. et Wambach, P. F. (2003). "Identification of an abnormal beryllium lymphocyte proliferation test." Toxicology **183**(1-3): 39-56.
- Frome, E. L., Smith, M. H., Littlefield, L. G., Neubert, R. L. et Colyer, S. P. (1996). "Statistical methods for the blood beryllium lymphocyte proliferation test." Environ Health Perspect **104** Suppl 5: 957-968.

- Frucht, D. M., Fukao, T., Bogdan, C., Schindler, H., O'Shea, J. J. et Koyasu, S. (2001). "IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge." Trends Immunol **22**(10): 556-560.
- Fukao, T., Matsuda, S. et Koyasu, S. (2000). "Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells." J Immunol **164**(1): 64-71.
- Furchner, J. E., Richmond, C. R. et London, J. E. (1973). "Comparative metabolism of radionuclides in mammals. 8. Retention of beryllium in the mouse, rat, monkey and dog." Health Phys **24**(3): 293-300.
- Gadola, S. D. et Gross, W. L. (2012). "Vasculitis in 2011: the renaissance of granulomatous inflammation in AAV." Nat Rev Rheumatol **8**(2): 74-76.
- Goldsmith, D. F. (1998). "Uses of workers' compensation data in epidemiology research." Occup Med **13**(2): 389-415.
- Granucci, F., Vizzardelli, C., Pavelka, N., Feau, S., Persico, M., Virzi, E., Rescigno, M., et al. (2001). "Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis." Nat Immunol **2**(9): 882-888.
- Grunewald, J. et Eklund, A. (2007). "Role of CD4+ T cells in sarcoidosis." Proc Am Thorac Soc **4**(5): 461-464.
- Guedez, Y. B., Whittington, K. B., Clayton, J. L., Joosten, L. A., van de Loo, F. A., van den Berg, W. B. et Rosloniec, E. F. (2001). "Genetic ablation of interferon-gamma up-regulates interleukin-1beta expression and enables the elicitation of collagen-induced arthritis in a nonsusceptible mouse strain." Arthritis Rheum **44**(10): 2413-2424.
- Guerkov, R. E., Targoni, O. S., Kreher, C. R., Boehm, B. O., Herrera, M. T., Tary-Lehmann, M., Lehmann, P. V., et al. (2003). "Detection of low-frequency antigen-specific IL-10-producing CD4(+) T cells via ELISPOT in PBMC: cognate vs. nonspecific production of the cytokine." J Immunol Methods **279**(1-2): 111-121.
- Guidotti Tee.L, Cowell John.W.F et G, J. G. (1989). "Services: A practical Approach." Occup Health Services.
- Halliwell, B. et Gutteridge, J. M. (1984). "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease." Biochem J **219**(1): 1-14.
- Halliwell, B. et Gutteridge, J. M. (1986). "Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts." Arch Biochem Biophys **246**(2): 501-514.
- Hanifin, J. M., Epstein, W. L. et Cline, M. J. (1970). "In vitro studies on granulomatous hypersensitivity to beryllium." Invest Dermatol **55**(4): 284-288.
- Harari, A., Petitpierre, S., Vallelian, F. et Pantaleo, G. (2004). "Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy." Blood **103**(3): 966-972.
- Harding, F. A., McArthur, J. G., Gross, J. A., Raulet, D. H. et Allison, J. P. (1992). "CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones." Nature **356**(6370): 607-609.
- Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M. et Weaver, C. T. (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." Nat Immunol **6**(11): 1123-1132.

- Harris, E. D., Jr. (1990). "Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy." N Engl J Med **322**(18): 1277-1289.
- Hart, B. A. (1986). "Cellular and biochemical response of the rat lung to repeated inhalation of cadmium." Toxicol Appl Pharmacol **82**(2): 281-291.
- Haskins, K. et McDuffie, M. (1990). "Acceleration of diabetes in young NOD mice with a CD4+ islet-specific T cell clone." Science **249**(4975): 1433-1436.
- Henneberger, P. K., Cumro, D., Deubner, D. D., Kent, M. S., McCawley, M. et 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): 167-176.
- Henneberger, P. K., Goe, S. K., Miller, W. E., Doney, B. et Groce, D. W. (2004). "Industries in the United States with airborne beryllium exposure and estimates of the number of current workers potentially exposed." J Occup Environ Hyg **1**(10): 648-659.
- Hershko, A. Y., Suzuki, R., Charles, N., Alvarez-Errico, D., Sargent, J. L., Laurence, A. et Rivera, J. (2011). "Mast cell interleukin-2 production contributes to suppression of chronic allergic dermatitis." Immunity **35**(4): 562-571.
- Hizawa, N., Maeda, Y., Konno, S., Fukui, Y., Takahashi, D. et Nishimura, M. (2006). "Genetic polymorphisms at FCER1B and PAI-1 and asthma susceptibility." Clin Exp Allergy **36**(7): 872-876.
- Hodgkin, P. D., Lee, J. H. et Lyons, A. B. (1996). "B cell differentiation and isotype switching is related to division cycle number." J Exp Med **184**(1): 277-281.
- Hoyer, K. K., Dooms, H., Barron, L. et Abbas, A. K. (2008). "Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease." Immunol Rev **226**: 19-28.
- Infante, P. F. et Newman, L. S. (2004). "Beryllium exposure and chronic beryllium disease." Lancet **363**(9407): 415-416.
- Jain, J., Loh, C. et Rao, A. (1995). "Transcriptional regulation of the IL-2 gene." Curr Opin Immunol **7**(3): 333-342.
- Jenkins, M. K., Khoruts, A., Ingulli, E., Mueller, D. L., McSorley, S. J., Reinhardt, R. L., Itano, A., et al. (2001). "In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells." Annu Rev Immunol **19**: 23-45.
- Johansson, S. G., Bieber, T., Dahl, R., Friedmann, P. S., Lanier, B. Q., Lockey, R. F., Motala, C., et al. (2004). "Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003." J Allergy Clin Immunol **113**(5): 832-836.
- Kallenberg, C. G. et Tadema, H. (2008). "Vasculitis and infections: contribution to the issue of autoimmunity reviews devoted to "autoimmunity and infection"." Autoimmun Rev **8**(1): 29-32.
- Kantarci, O. H. (2008). "Genetics and natural history of multiple sclerosis." Semin Neurol **28**(1): 7-16.
- Keizer TS, Sauer NN et TM, M. (2005). "Beryllium binding at neutral pH: the importance of the Be-O-Be motif." J Inorg Biochem.
- Kelleher, P. C., Martyny, J. W., Mroz, M. M., Maier, L. A., Ruttenber, A. J., Young, D. A. et Newman, L. S. (2001). "Beryllium particulate exposure and disease relations in a beryllium machining plant." J Occup Environ Med **43**(3): 238-249.
- Kittle, L. A., Sawyer, R. T., Fadok, V. A., Maier, L. A. et Newman, L. S. (2002). "Beryllium induces apoptosis in human lung macrophages." Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis **19**(2): 101-113.

- Kokturk, N., Sabag, M., Stark, M., Grief, J. et Fireman, E. (2009). "High extracellular induced sputum haem oxygenase-1 in sarcoidosis and chronic beryllium disease." Eur J Clin Invest **39**(7): 584-590.
- Kolanz, M. E., Madl, A. K., Kelsh, M. A., Kent, M. S., Kalmes, R. M. et Paustenbach, D. J. (2001). "A comparison and critique of historical and current exposure assessment methods for beryllium: implications for evaluating risk of chronic beryllium disease." Appl Occup Environ Hyg **16**(5): 593-614.
- Kondrack, R. M., Harbertson, J., Tan, J. T., McBreen, M. E., Surh, C. D. et Bradley, L. M. (2003). "Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells." J Exp Med **198**(12): 1797-1806.
- Kreher, C. R., Dittrich, M. T., Guerkov, R., Boehm, B. O. et Tary-Lehmann, M. (2003). "CD4+ and CD8+ cells in cryopreserved human PBMC maintain full functionality in cytokine ELISPOT assays." J Immunol Methods **278**(1-2): 79-93.
- Kreiss, K., Day, G. A. et Schuler, C. R. (2007). "Beryllium: a modern industrial hazard." Annu Rev Public Health **28**: 259-277.
- Kreiss, K., Mroz, M. M., Zhen, B., Wiedemann, H. et Barna, B. (1997). "Risks of beryllium disease related to work processes at a metal, alloy, and oxide production plant." Occup Environ Med **54**(8): 605-612.
- Kreiss, K., Newman, L. S., Mroz, M. M. et Campbell, P. A. (1989). "Screening blood test identifies subclinical beryllium disease." J Occup Med **31**(7): 603-608.
- Lacombe, M. (2007). "Lacombe: précis d'anatomie et de physiologie humaines, Volume 1." **29e** 186.
- Lademann, J., Weigmann, H., Rickmeyer, C., Barthelmes, H., Schaefer, H., Mueller, G. et Sterry, W. (1999). "Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice." Skin Pharmacol Appl Skin Physiol **12**(5): 247-256.
- Laney, A. S., Petsonk, E. L., Hale, J. M., Wolfe, A. L. et Attfield, M. D. (2012). "Potential determinants of coal workers' pneumoconiosis, advanced pneumoconiosis, and progressive massive fibrosis among underground coal miners in the United States, 2005-2009." Am J Public Health **102** Suppl 2: S279-283.
- Lauwerys RR. (1982). "Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles." Masson, Paris 2nd Edn: 462.
- Lebel.G et Gingras .S (2007). "Épidémiologie descriptive des principaux problèmes de santé reliés à l'exposition à l'amiante au Québec 1981-2004." Institut nationale de la santé publique du Québec.
- Lemière, c., Tremblay, C., Bohadana, A. et Chaboillez, S. (2011). "Prognosis of the workers with non-eosinophilic occupational asthma." American Journal of Respiratory Critical Care Medicine **183**(A1172).
- Levy B.S et Wegman D .H (1995). "Recognizing and Preventing work-related Disease." Occup Health **3ed**.
- Li, J., Huston, G. et Swain, S. L. (2003). "IL-7 promotes the transition of CD4 effectors to persistent memory cells." J Exp Med **198**(12): 1807-1815.
- Li, X., McKinstry, K. K., Swain, S. L. et Dalton, D. K. (2007). "IFN-gamma acts directly on activated CD4+ T cells during mycobacterial infection to promote apoptosis by inducing components of the intracellular apoptosis machinery and by inducing extracellular proapoptotic signals." J Immunol **179**(2): 939-949.

- Lombardi, G., Germain, C., Uren, J., Fiorillo, M. T., du Bois, R. M., Jones-Williams, W., Saltini, C., *et al.* (2001). "HLA-DP allele-specific T cell responses to beryllium account for DP-associated susceptibility to chronic beryllium disease." *J Immunol* **166**(5): 3549-3555.
- London, C. A., Lodge, M. P. et Abbas, A. K. (2000). "Functional responses and costimulator dependence of memory CD4+ T cells." *J Immunol* **164**(1): 265-272.
- Luckey, D., Bastakoty, D. et Mangalam, A. K. (2011). "Role of HLA class II genes in susceptibility and resistance to multiple sclerosis: studies using HLA transgenic mice." *J Autoimmun* **37**(2): 122-128.
- Lyons, A. B., Hasbold, J. et Hodgkin, P. D. (2001). "Flow cytometric analysis of cell division history using dilution of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, a stably integrated fluorescent probe." *Methods Cell Biol* **63**: 375-398.
- Mack, D. G., Lanham, A. M., Palmer, B. E., Maier, L. A. et Fontenot, A. P. (2009). "CD27 expression on CD4+ T cells differentiates effector from regulatory T cell subsets in the lung." *J Immunol* **182**(11): 7317-7324.
- MacLeod, M. K., McKee, A., Crawford, F., White, J., Kappler, J. et Marrack, P. (2008). "CD4 memory T cells divide poorly in response to antigen because of their cytokine profile." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(38): 14521-14526.
- Maier, L. A. (2001). "Beryllium health effects in the era of the beryllium lymphocyte proliferation test." *Appl Occup Environ Hyg* **16**(5): 514-520.
- Maier, L. A., McGrath, D. S., Sato, H., Lympany, P., Welsh, K., Du Bois, R., Silveira, L., *et al.* (2003). "Influence of MHC class II in susceptibility to beryllium sensitization and chronic beryllium disease." *J Immunol* **171**(12): 6910-6918.
- Malek, T. R. (2008). "The biology of interleukin-2." *Annu Rev Immunol* **26**: 453-479.
- Manadan, A. M. et Block, J. A. (2008). "Rheumatoid arthritis: beyond tumor necrosis factor-alpha antagonists, B cell depletion, and T cell blockade." *Am J Ther* **15**(1): 53-58.
- Marchand-Adam, S., El Khatib, A., Guillon, F., Brauner, M. W., Lamberto, C., Lepage, V., Naccache, J. M., *et al.* (2008). "Short- and long-term response to corticosteroid therapy in chronic beryllium disease." *Eur Respir J* **32**(3): 687-693.
- Martin, A. K., Mack, D. G., Falta, M. T., Mroz, M. M., Newman, L. S., Maier, L. A. et Fontenot, A. P. (2011). "Beryllium-specific CD4+ T cells in blood as a biomarker of disease progression." *J Allergy Clin Immunol* **128**(5): 1100-1106 e1101-1105.
- Masoli, M., Fabian, D., Holt, S. et Beasley, R. (2004). "The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report." *Allergy* **59**(5): 469-478.
- McCanlies, E. C., Kreiss, K., Andrew, M. et Weston, A. (2003). "HLA-DPB1 and chronic beryllium disease: a HuGE review." *Am J Epidemiol* **157**(5): 388-398.
- McCleskey, T. M., Buchner, V., Field, R. W. et Scott, B. L. (2009). "Recent advances in understanding the biomolecular basis of chronic beryllium disease: a review." *Rev Environ Health* **24**(2): 75-115.
- Mellor, A. L. et Munn, D. H. (2004). "IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism." *Nat Rev Immunol* **4**(10): 762-774.
- Middleton, D. C., Fink, J., Kowalski, P. J., Lewin, M. D. et Sinks, T. (2008). "Optimizing BeLPT criteria for beryllium sensitization." *Am J Ind Med* **51**(3): 166-172.
- Middleton, D. C., Mayer, A. S., Lewin, M. D., Mroz, M. M. et Maier, L. A. (2011). "Interpreting borderline BeLPT results." *Am J Ind Med* **54**(3): 205-209.

- Miller AM, M. I. (2011). "Cytokines as therapeutic targets to reduce cardiovascular risk in chronic inflammation." Curr Pharm Des **17**(1): 1-8.
- Milovanova, T. N. (2007). "Comparative analysis between CFSE flow cytometric and tritiated thymidine incorporation tests for beryllium sensitivity." Cytometry B Clin Cytom **72**(4): 265-275.
- Mosmann, T. R. et Coffman, R. L. (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." Annu Rev Immunol **7**: 145-173.
- Moutschen, M. P., Scheen, A. J. et Lefebvre, P. J. (1992). "Impaired immune responses in diabetes mellitus: analysis of the factors and mechanisms involved. Relevance to the increased susceptibility of diabetic patients to specific infections." Diabete Metab **18**(3): 187-201.
- Mroz, M. M., Kreiss, K., Lezotte, D. C., Campbell, P. A. et Newman, L. S. (1991). "Reexamination of the blood lymphocyte transformation test in the diagnosis of chronic beryllium disease." J Allergy Clin Immunol **88**: 54-60.
- Mroz, M. M., Kreiss, K., Lezotte, D. C., Campbell, P. A. et Newman, L. S. (1991). "Reexamination of the blood lymphocyte transformation test in the diagnosis of chronic beryllium disease." J Allergy Clin Immunol **88**(1): 54-60.
- Mroz, M. M., Maier, L. A., Strand, M., Silveira, L. et Newman, L. S. (2009). "Beryllium lymphocyte proliferation test surveillance identifies clinically significant beryllium disease." Am J Ind Med **52**(10): 762-773.
- Muller-Quernheim, J. (1998). "Sarcoidosis: immunopathogenetic concepts and their clinical application." Eur Respir J **12**(3): 716-738.
- Muller-Quernheim, J., Gaede, K. I., Prasse, A. et Zissel, G. (2007). "[Chronic berylliosis]." Pneumologie **61**(2): 109-116.
- Muller, C., Audusseau, S., Salehi, F., Truchon, G., Chevalier, G., Mazer, B., Kennedy, G., *et al.* (2010). "Beryllium contamination and exposure monitoring in an inhalation laboratory setting." Toxicol Ind Health **26**(1): 39-45.
- Munder, M., Mallo, M., Eichmann, K. et Modolell, M. (2001). "Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18 - a bridge built on solid ground." Immunol Lett **75**(2): 159-160.
- Nakamura, Y., Ghaffar, O., Olivenstein, R., Taha, R. A., Soussi-Gounni, A., Zhang, D. H., Ray, A., *et al.* (1999). "Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma." J Allergy Clin Immunol **103**(2 Pt 1): 215-222.
- Newman, L. (1996). "Metals." Occupational and Environmental Respiratory Disease 1st Ed (Harber P, Schenker MB, Balmes J, eds). St Louis, M): Mosby: 469-513.
- Newman, L. S. (1996). "Significance of the blood beryllium lymphocyte proliferation test." Environ Health Perspect **104 Suppl 5**: 953-956.
- Newman, L. S. (2007). "Immunotoxicology of beryllium lung disease." Environ Health Prev Med **12**(4): 161-164.
- Newman, L. S. et Maier, L. (2003). "Beryllium disease." 3rd ed. Hamilton : BC Decker Inc Intertitial lung disease: 435-451.
- Newman, L. S., Mroz, M. M., Balkissoon, R. et Maier, L. A. (2005). "Beryllium sensitization progresses to chronic beryllium disease: a longitudinal study of disease risk." Am J Respir Crit Care Med **171**(1): 54-60.

- NIEHS (January 2003). "(National Institute of Environmental Health Science)." The National Toxicology. Program-Update.
- Nilsen, A. M., Vik, R., Behrens, C., Drablos, P. A. et Espevik, T. (2010). "Beryllium sensitivity among workers at a Norwegian aluminum smelter." Am J Ind Med 53(7): 724-732.
- NIOSH (2011). "Occupational Exposure to Respirable Coal Mine dust." National Institute for Occupational safety and Health.
- Nutt, S. L., Fairfax, K. A. et Kallies, A. (2007). "BLIMP1 guides the fate of effector B and T cells." Nat Rev Immunol 7(12): 923-927.
- Ogus, A. C., Yoldas, B., Ozdemir, T., Uguz, A., Olcen, S., Keser, I., Coskun, M., *et al.* (2004). "The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease." Eur Respir J 23(2): 219-223.
- OMS (1990). "BERYLLIUM: Health And Safety Guide,." Collection Health and Safety Guide.
- Palmer, B. E., Boritz, E. et Wilson, C. C. (2004). "Effects of sustained HIV-1 plasma viremia on HIV-1 Gag-specific CD4+ T cell maturation and function." J Immunol 172(5): 3337-3347.
- Palmer, B. E., Mack, D. G., Martin, A. K., Gillespie, M., Mroz, M. M., Maier, L. A. et Fontenot, A. P. (2008). "Up-regulation of programmed death-1 expression on beryllium-specific CD4+ T cells in chronic beryllium disease." J Immunol 180(4): 2704-2712.
- Palmer, B. E., Mack, D. G., Martin, A. K., Maier, L. A. et Fontenot, A. P. (2007). "CD57 expression correlates with alveolitis severity in subjects with beryllium-induced disease." J Allergy Clin Immunol 120(1): 184-191.
- Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y. H., Wang, Y., *et al.* (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." Nat Immunol 6(11): 1133-1141.
- Paul, W. E. et Seder, R. A. (1994). "Lymphocyte responses and cytokines." Cell 76(2): 241-251.
- Pepper, M. et Jenkins, M. K. (2011). "Origins of CD4(+) effector and central memory T cells." Nat Immunol 12(6): 467-471.
- Pernis, A., Gupta, S., Gollob, K. J., Garfein, E., Coffman, R. L., Schindler, C. et Rothman, P. (1995). "Lack of interferon gamma receptor beta chain and the prevention of interferon gamma signaling in TH1 cells." Science 269(5221): 245-247.
- Pott, G. B., Palmer, B. E., Sullivan, A. K., Silveira, L., Maier, L. A., Newman, L. S., Kotzin, B. L., *et al.* (2005). "Frequency of beryllium-specific, TH1-type cytokine-expressing CD4+ T cells in patients with beryllium-induced disease." J Allergy Clin Immunol 115(5): 1036-1042.
- Pott, G. B., Palmer, B. E., Sullivan, A. K., Silveira, L., Maier, L. A., Newman, L. S., Kotzin, B. L., *et al.* (2005). "Frequency of beryllium-specific, TH1-type cytokine-expressing CD4+ T cells in patients with beryllium-induced disease." J Allergy Clin Immunol 115(5): 1036-1042.
- Provencher .S et De Guire.L (2001). "Étude des nouveaux cas de maladies professionnelles pulmonaires reliées à l'exposition à l'amiante au Québec de 1988-1997." Direction de la santé publique, régie régionale de la santé et des services sociaux de Montréal-Centre.
- Québec, G. d. (2006). "Règlement modifiant le Règlement sur la santé et la sécurité du travail." Gazette Officielle Québec 138: 5793-5799.

- Rana, S. V. (2008). "Metals and apoptosis: recent developments." J Trace Elem Med Biol **22**(4): 262-284.
- Rasanen, L., Sainio, H., Lehto, M. et Reunala, T. (1991). "Lymphocyte proliferation test as a diagnostic aid in chromium contact sensitivity." Contact Dermatitis **25**(1): 25-29.
- Reeves, A. L. (1965). "The absorption of beryllium from the gastrointestinal tract." Arch Environ Health **11**(2): 209-214.
- Reeves, A. L. et Krivanek, N. D. (1974). "The influence of cutaneous hypersensitivity to beryllium on the development of experimental pulmonary berylliosis." Trans N Y Acad Sci **36**(1): 78-93.
- Reeves, A. L. et Vorwald, A. J. (1967). "Beryllium carcinogenesis. II. Pulmonary deposition and clearance of inhaled beryllium sulfate in the rat." Cancer Res **27**(3): 446-451.
- Reinhardt, R. L., Khoruts, A., Merica, R., Zell, T. et Jenkins, M. K. (2001). "Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body." Nature **410**(6824): 101-105.
- Rhoads, K. et Sanders, C. L. (1985). "Lung clearance, translocation, and acute toxicity of arsenic, beryllium, cadmium, cobalt, lead, selenium, vanadium, and ytterbium oxides following deposition in rat lung." Environ Res **36**(2): 359-378.
- Ricard, P. M. e. S. (2004). "Le test sanguin de prolifération lymphocytaire au béryllium (BeLPT) : de la théorie à la pratique." Rapport de l'INSPQ: 71.
- Richeldi, L., Kreiss, K., Mroz, M. M., Zhen, B., Tartoni, P. et Saltini, C. (1997). "Interaction of genetic and exposure factors in the prevalence of berylliosis." Am J Ind Med **32**(4): 337-340.
- Rieber, N., Hector, A., Kuijpers, T., Roos, D. et Hartl, D. (2012). "Current concepts of hyperinflammation in chronic granulomatous disease." Clin Dev Immunol **2012**: 252460.
- Rossman, M. D., Kern, J. A., Elias, J. A., Cullen, M. R., Epstein, P. E. et Preuss, O. P. (1988). "Proliferative response of bronchoalveolar lymphocytes to beryllium." Ann Intern Med **108**(687): 93.
- Rossman, M. D., Stubbs, J., Lee, C. W., Argyris, E., Magira, E. et Monos, D. (2002). "Human leukocyte antigen Class II amino acid epitopes: susceptibility and progression markers for beryllium hypersensitivity." Am J Respir Crit Care Med **165**(6): 788-794.
- Sakaguchi, S. (2004). "Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses." Annu Rev Immunol **22**: 531-562.
- Sallusto, F., Geginat, J. et Lanzavecchia, A. (2004). "Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance." Annu Rev Immunol **22**: 745-763.
- Saltini, C., Winestock, K., Kirby, M., Pinkston, P. et Crystal, R. G. (1989). "Maintenance of alveolitis in patients with chronic beryllium disease by beryllium-specific helper T cells." N Engl J Med **320**(17): 1103-1109.
- Samuel, G. et Maier, L. A. (2008). "Immunology of chronic beryllium disease." Curr Opin Allergy Clin Immunol **8**(2): 126-134.
- Sanderson, W. T., Ward, E. M., Steenland, K. et Petersen, M. R. (2001). "Lung cancer case-control study of beryllium workers." Am J Ind Med **39**(2): 133-144.
- Savary, B. (2003). "Le béryllium." Travail et Sécurité.

- Sawyer, R. T., Day, B. J., Fadok, V. A., Chiarappa-Zucca, M., Maier, L. A., Fontenot, A. P., Silveira, L., *et al.* (2004). "Beryllium-ferritin: lymphocyte proliferation and macrophage apoptosis in chronic beryllium disease." Am J Respir Cell Mol Biol **31**(4): 470-477.
- Sawyer, R. T., Dobis, D. R., Goldstein, M., Velsor, L., Maier, L. A., Fontenot, A. P., Silveira, L., *et al.* (2005). "Beryllium-stimulated reactive oxygen species and macrophage apoptosis." Free Radic Biol Med **38**(7): 928-937.
- Sawyer, R. T. et Maier, L. A. (2011). "Chronic beryllium disease: an updated model interaction between innate and acquired immunity." Biomaterials **24**(1): 1-17.
- Sawyer, R. T., Parsons, C. E., Fontenot, A. P., Maier, L. A., Gillespie, M. M., Gottschall, E. B., Silveira, L., *et al.* (2004). "Beryllium-induced tumor necrosis factor-alpha production by CD4+ T cells is mediated by HLA-DP." Am J Respir Cell Mol Biol **31**(1): 122-130.
- Schilder, A. M. (2010). "Wegener's Granulomatosis vasculitis and granuloma." Autoimmun Rev **9**(7): 483-487.
- Schoenborn, J. R. et Wilson, C. B. (2007). "Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses." Adv Immunol **96**: 41-101.
- Scott, B. L., Wang, Z., Marrone, B. L. et Sauer, N. N. (2003). "Potential binding modes of beryllium with the class II major histocompatibility complex HLA-DP: a combined theoretical and structural database study." J Inorg Biochem **94**(1-2): 5-13.
- Seidler, A., Euler, U., Muller-Quernheim, J., Gaede, K. I., Latza, U., Groneberg, D. et Letzel, S. (2012). "Systematic review: Progression of beryllium sensitization to chronic beryllium disease." Occup Med (Lond) **62**(7): 506-513.
- Semenzato, G. et Agostini, C. (2001). "Interstitial lung diseases: what next?" Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis **18**(3): 239-241.
- Sen, G. C. (2001). "Viruses and interferons." Annu Rev Microbiol **55**: 255-281.
- Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T. et Sakaguchi, S. (2005). "Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization." J Exp Med **201**(5): 723-735.
- Simard, R. (1998). "Bilan de situation concernant l'exposition à l'amiante dans l'industrie de la transformation à Montréal-Centre." Montréal: Régie régionale de la santé et des services sociaux de Montréal-Centre. Direction de la santé publique.
- Slater, T. F. (1984). "Free-radical mechanisms in tissue injury." Biochem J **222**(1): 1-15.
- Smith, W. P., Vu, Q., Li, S. S., Hansen, J. A., Zhao, L. P. et Geraghty, D. E. (2006). "Toward understanding MHC disease associations: partial resequencing of 46 distinct HLA haplotypes." Genomics **87**(5): 561-571.
- Snyder, J. A., Weston, A., Tinkle, S. S. et Demchuk, E. (2003). "Electrostatic potential on human leukocyte antigen: implications for putative mechanism of chronic beryllium disease." Environ Health Perspect **111**(15): 1827-1834.
- Stange, A. W., Furman, F. J. et Hilmas, D. E. (2004). "The beryllium lymphocyte proliferation test: Relevant issues in beryllium health surveillance." Am J Ind Med **46**(5): 453-462.
- Stange, A. W., Hilmas, D. E., Furman, F. J. et Gatliffe, T. R. (2001). "Beryllium sensitization and chronic beryllium disease at a former nuclear weapons facility." Appl Occup Environ Hyg **16**(3): 405-417.

- Stauber, D. J., Debler, E. W., Horton, P. A., Smith, K. A. et Wilson, I. A. (2006). "Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(8): 2788-2793.
- Stefaniak, A. B., Chipera, S. J., Day, G. A., Sabey, P., Dickerson, R. M., Sbarra, D. C., Duling, M. G., *et al.* (2008). "Physicochemical characteristics of aerosol particles generated during the milling of beryllium silicate ores: implications for risk assessment." J Toxicol Environ Health A **71**(22): 1468-1481.
- Sterner, J. H. et Eisenbud, M. (1951). "Epidemiology of beryllium intoxication." AMA Arch Ind Hyg Occup Med **4**(2): 123-151.
- Strupp, C. (2011). "Beryllium metal II. a review of the available toxicity data." Ann Occup Hyg **55**(1): 43-56.
- Tan, M. H., Commens, C. A., Burnett, L. et Snitch, P. J. (1996). "A pilot study on the percutaneous absorption of microfine titanium dioxide from sunscreens." Australas J Dermatol **37**(4): 185-187.
- Teschke, K. et Barroetavena, M. C. (1992). "Occupational cancer in Canada: what do we know?" CMAJ **147**(10): 1501-1507.
- Thomas, C. A., Bailey, R. L., Kent, M. S., Deubner, D. C., Kreiss, K. et Schuler, C. R. (2009). "Efficacy of a program to prevent beryllium sensitization among new employees at a copper-beryllium alloy processing facility." Public Health Rep **124** **Suppl 1**: 112-124.
- Tilg, H. et Diehl, A. M. (2000). "Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis." N Engl J Med **343**(20): 1467-1476.
- Tinkle, S. S., Kittle, L. A., Schumacher, B. A. et Newman, L. S. (1997). "Beryllium induces IL-2 and IFN-gamma in berylliosis." J Immunol **158**(1): 518-526.
- Toledo, F., Silvestre, J. F., Cuesta, L., Latorre, N. et Monteagudo, A. (2011). "Contact allergy to beryllium chloride: report of 12 cases." Contact Dermatitis **64**(2): 104-109.
- Tracey, K. J. et Cerami, A. (1993). "Tumor necrosis factor, other cytokines and disease." Annu Rev Cell Biol **9**: 317-343.
- Turjanmaa, K., Rasanen, L., Lehto, M., Mäkinen-Kiljunen, S. et Reunala, T. (1989). "Basophil histamine release and lymphocyte proliferation tests in latex contact urticaria. In vitro tests in latex contact urticaria." Allergy **44**(3): 181-186.
- Vallejo, A. N., Weyand, C. M. et Goronzy, J. J. (2004). "T-cell senescence: a culprit of immune abnormalities in chronic inflammation and persistent infection." Trends Mol Med **10**(3): 119-124.
- Van Dyke, M. V., Martyny, J. W., Mroz, M. M., Silveira, L. J., Strand, M., Fingerlin, T. E., Sato, H., *et al.* (2011). "Risk of chronic beryllium disease by HLA-DPB1 E69 genotype and beryllium exposure in nuclear workers." Am J Respir Crit Care Med **183**(12): 1680-1688.
- van Oosterhout, C. (2009). "Trans-species polymorphism, HLA-disease associations and the evolution of the MHC." Commun Integr Biol **2**(5): 408-410.
- Vier, H., Protze, M., Brunner, R. et Gillissen, A. (2003). "[Asthma, alveolitis, aspergillosis, berylliosis. What to do when there is allergic reaction of the lung?]." MMW Fortschr Med **145**(10): 34-38.
- Vouk V (1986). "General chemistry of metals. ." Chap 2 . In: Handbook on the toxicologie of metals **Vol I. General aspects**: 15-17.

- Vukmanovic, S., Neubert, T. A. et Santori, F. R. (2003). "Could TCR antagonism explain associations between MHC genes and disease?" *Trends Mol Med* **9**(4): 139-146.
- Waldmann, T. A. (2006). "The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design." *Nat Rev Immunol* **6**(8): 595-601.
- Wambach, P. (2001). "Beryllium Lymphocyte Proliferation Testing (BeLPT), at Document Number DOE-SPEC-1142-2001." *National Technical Information service, Springfield, VA 22161* (<http://tis.eh.doe.gov/techstds/standard/spec1142/SPEC11422001.pdf>).
- Wang, J. P., Rought, S. E., Corbeil, J. et Guiney, D. G. (2003). "Gene expression profiling detects patterns of human macrophage responses following Mycobacterium tuberculosis infection." *FEMS Immunol Med Microbiol* **39**(2): 163-172.
- Wang, X., Rickert, M. et Garcia, K. C. (2005). "Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its alpha, beta, and gamma receptors." *Science* **310**(5751): 1159-1163.
- Wang, Z., Farris, G. M., Newman, L. S., Shou, Y., Maier, L. A., Smith, H. N. et Marrone, B. L. (2001). "Beryllium sensitivity is linked to HLA-DP genotype." *Toxicology* **165**(1): 27-38.
- Wang, Z., White, P. S., Petrovic, M., Tatum, O. L., Newman, L. S., Maier, L. A. et Marrone, B. L. (1999). "Differential susceptibilities to chronic beryllium disease contributed by different Glu69 HLA-DPB1 and -DPA1 alleles." *J Immunol* **163**(3): 1647-1653.
- Weaver, C. T., Harrington, L. E., Mangan, P. R., Gavrieli, M. et Murphy, K. M. (2006). "Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties." *Immunity* **24**(6): 677-688.
- Weston, A. (2011). "Work-related lung diseases." *IARC Sci Publ*(163): 387-405.
- Williams, M. A., Ravkov, E. V. et Bevan, M. J. (2008). "Rapid culling of the CD4+ T cell repertoire in the transition from effector to memory." *Immunity* **28**(4): 533-545.
- Williams, W. J. et Williams, W. R. (1983). "Value of beryllium lymphocyte transformation tests in chronic beryllium disease and in potentially exposed workers." *Thorax* **38**(1): 41-44.
- Younes, S. A., Yassine-Diab, B., Dumont, A. R., Boulassel, M. R., Grossman, Z., Routy, J. P. et Sekaly, R. P. (2003). "HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4+ T cells endowed with proliferative capacity." *J Exp Med* **198**(12): 1909-1922.
- Yu, S. L., Kuan, W. P., Wong, C. K., Li, E. K. et Tam, L. S. (2012). "Immunopathological roles of cytokines, chemokines, signaling molecules, and pattern-recognition receptors in systemic lupus erythematosus." *Clin Dev Immunol* **2012**: 715190.
- Yuh-Chin T .Huan., Andrew, J. G. et Lisa A. Maier. (2012). "A Clinical Guide to Occupational and Environmental Lung Diseases." *Respratory Medecine Springer Sciences+Business Media New york*.
- Zhang, D. H., Cohn, L., Ray, P., Bottomly, K. et Ray, A. (1997). "Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene." *J Biol Chem* **272**(34): 21597-21603.
- Zheng, W. et Flavell, R. A. (1997). "The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells." *Cell* **89**(4): 587-596.
- Zhu, J. et Paul, W. E. (2008). "CD4 T cells: fates, functions, and faults." *Blood* **112**(5): 1557-1569.

- Zhu, J., Yamane, H. et Paul, W. E. (2010). "Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)." Annu Rev Immunol **28**: 445-489.
- Zorn, H., Stiefel, T. et Diem, H. (1977). "[The importance of beryllium and its compounds for the industrial physician-2. communication]." Zentralbl Arbeitsmed Arbeitsschutz Prophyl **27**(4): 83-88.