

Université de Montréal

**Développement d'un nébuliseur thermique pour le couplage
d'un chromatographe liquide et d'un plasma inductif pour
la séparation et la détermination des métaux liés aux différentes
isoformes de la métallothionéine.**

par

Jean-François Archambault

Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

Thèse présentée à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade du
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en chimie

Janvier 2000

© Jean-François Archambault, 2000



QD
3
U54
2000
v. 025

University of Toronto

The following is a list of the books in the collection of the University of Toronto Library, which are available for loan to the public. The books are listed in the order in which they were added to the collection.

1. The History of the University of Toronto
2. The University of Toronto: A History
3. The University of Toronto: A History

The following is a list of the books in the collection of the University of Toronto Library, which are available for loan to the public. The books are listed in the order in which they were added to the collection.



1. The History of the University of Toronto
2. The University of Toronto: A History
3. The University of Toronto: A History

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

**Développement d'un nébuliseur thermique pour le couplage
d'un chromatographe liquide et d'un plasma inductif pour
la séparation et la détermination des métaux liés aux différentes
isoformes de la métallothionéine.**

présenté par

Jean-François Archambault

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

.....			
.....	André L. Beauchamp	président-rapporteur	
.....	Joseph Hubert	directeur de recherche	le
	Karen Waldron	membre du jury	
.....	Hugues Ménard	examineur externe	
	Robert William Cochrane	représentant du doyen	
.....			

Thèse acceptée le:

19 juin 2000

SOMMAIRE

La biodisponibilité et la concentration élevée de certains métaux (ex : cadmium ou mercure) dans l'environnement peuvent engendrer des effets toxiques chez les organismes biologiques en bloquant les sites actifs de certaines protéines et de certaines enzymes. Cependant, ces organismes possèdent des protéines, les métallothionéines (MT), permettant une défense naturelle envers ces métaux et la présence de ces espèces permettent d'augmenter le niveau de tolérance des organismes aux métaux. Le rôle de «détoxiquant» des métallothionéines vient du fait qu'elles peuvent former des liaisons avec les métaux lourds toxiques et qu'elles servent également à assurer la distribution des métaux essentiels tels que le cuivre et le zinc dans l'organisme. Pour l'analyse de ces MT, nous avons développé un système permettant la séparation de leurs isoformes et la détection sélective des métaux qui y sont liés par spectroscopie d'émission atomique à plasma inductif (ICP-AES = Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry) et par spectrométrie de masse à plasma inductif (ICP-MS = Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry). Ces méthodes offrent l'avantage de permettre une détection simultanée de métaux.

La séparation des différentes isoformes de la métallothionéine et la quantification des métaux lourds (cadmium, zinc, cuivre) liés à ces protéines pourraient donner des informations supplémentaires quant à leur efficacité en tant que biomarqueur de pollution et nous informer sur l'existence d'une spécificité des isoformes envers certains métaux.

La chromatographie liquide de partage en phase apolaire polymérique (HPLC) est efficace pour effectuer la séparation des isoformes puisqu'elle n'affecte pas les liens métal:thiolate. Toutefois, le solvant organique nécessaire pour la séparation des différentes isoformes de la MT, peut nuire au plasma en le refroidissant ce qui entraîne une perte dans l'efficacité d'ionisation et/ou d'excitation des analytes et donc diminuera la sensibilité analytique. Pour tenter de minimiser cet inconvénient, nous avons développé un système de nébulisation thermique (TSP) qui permet d'obtenir de meilleurs aérosols et procède à une première désolvatation de ceux-ci pour obtenir un aérosol primaire quasi-sec. De plus, de nouvelles chambres de nébulisation ont été développées pour le TSP afin de permettre de réduire le volume mort résultant du couplage HPLC-

ICP. Le système, que nous avons développé comporte une première chambre de désolvatation en «U» suivie d'une chambre de nébulisation cyclone. Le volume mort de ce système est de 35 mL. Une comparaison a été faite avec un système de nébulisation pneumatique conventionnel (Meinhard) et une chambre de nébulisation classique (Scott) dont le volume mort est de 106 mL. Le système de nébulisation thermique améliore le signal analytique à la fois en ICP-MS (x 1,6) et en ICP-AES (x 4) comparé au système de nébulisation pneumatique, ce qui démontre une augmentation de la qualité de l'aérosol et de son efficacité de transport.

Des études détaillées des interférences spectrales en spectrométrie d'émission et en spectrométrie de masse ont été faites. Ces études ont montré qu'en ICP-AES la présence de solvant organique provoque des interférences spectrales qui proviennent principalement du système des bandes γ de NO et qui interfèrent lors de la quantification de certains métaux (Zn I, Cd II, Co II). En ICP-MS, des interférences spectrales de masse ont été observées et affectent la quantification de certains éléments dont la masse est inférieure à 69 uma (unité de masse atomique). Un certain nombre d'hypothèses ont été formulées pour expliquer ces observations. De plus, les résultats par ICP-MS avec un nébuliseur pneumatique ont montré que toutes les interférences isobariques proviennent du solvant organique, mais une explication complète de toutes les interférences n'a pu être proposée. En ICP-MS, on a constaté que la présence du solvant organique provoque une diminution du signal analytique de deux décades.

En ICP-AES, l'utilisation de cobalt comme étalon spectroscopique s'est avérée intéressante et a permis de corriger l'effet des fluctuations du plasma d'une mesure à l'autre. Par contre en ICP-MS, la présence de solvant organique rend le choix du cobalt comme étalon interne moins intéressant car le rapport m/z du cobalt se situe dans une région où les interférences isobariques sont importantes.

La MT de foie de lapin, disponible commercialement, a été utilisée pour optimiser la séparation des isoformes avec une colonne apolaire polymérique PRP-3. Cette séparation a été faite en utilisant à la fois le ICP-AES et le ICP-MS comme détecteur. La meilleure sensibilité a été obtenue en ICP-MS et la séparation optimale des différentes isoformes de la MT de foie de lapin a été effectuée avec un gradient d'élution allant de 0 à 10 % de propanol à raison de 0,48%/min de propanol. Les trois isoformes de Cd-MT

présentes dans le foie de lapin ont été séparées en utilisant des procédures de filtrage numérique et de déconvolution de pics. Une analyse semi-quantitative a été faite et nous avons trouvé pour cette MT que la MT-1 contenait 1,4 μM de Cd, la MT-2 contenait 2,9 μM de Cd et une troisième MT contenait 6,2 μM de Cd.

Des mesures semi-quantitatives pour les métaux liés aux différentes isoformes de la MT de moule ont également été faites par ICP-AES et ICP-MS avec le système de nébulisation thermique. Cependant, la détection des isoformes de la MT de moule a été difficile, voire impossible, puisque les concentrations initiales de MT se sont avérées insuffisantes. Toutefois, en enlevant la colonne chromatographique et en renonçant à la séparation des isoformes, des mesures semi-quantitatives du cadmium et du zinc ont été faites et les résultats obtenus ont été comparés aux résultats de Couillard obtenus par absorption atomique à atomiseur électrothermique. Les résultats obtenus montrent que les concentrations en Zn et en Cd dans les MT de moule sont de l'ordre de 1 μM , soient des concentrations comparables à celles obtenues par Couillard.

En conclusion, le nébuliseur TSP que nous avons développé a permis des gains intéressants du point de vue analytique et son utilisation, notamment avec des solvants organiques, améliore la qualité des aérosols en effectuant une désolvation partielle des gouttelettes. Cependant, des améliorations devront encore être apportées à ce nébuliseur pour augmenter la sensibilité obtenue par ICP-MS et permettre des analyses environnementales plus complexes.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	I
TABLE DES MATIÈRES	IV
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES TABLEAUX	XIII
REMERCIEMENT	XV
CHAPITRE I: INTRODUCTION	1
I.1. OBJECTIF DU PROJET	1
I.2. PROBLÉMATIQUE ENVIRONNEMENTALE.....	2
<i>I.2.1. Les Métaux dans les systèmes biologiques</i>	2
I.2.1.1. Disponibilité.....	2
I.2.1.2. Toxicité des Métaux lourds.....	3
I.2.1.2.1. Le zinc	4
I.2.1.2.2. Le cuivre	7
I.2.1.2.3. Le cadmium	9
<i>I.2.2. Les métallothionéines</i>	13
I.2.2.1. La Définition des métallothionéines.....	13
I.2.2.2. La Nomenclature.....	14
I.2.2.3. Caractéristiques des métallothionéines.....	14
I.2.2.4. Les Rôles Biologiques des Métallothionéines.....	16
I.2.2.5. Les Facteurs d'induction de la MT.....	17
<i>I.2.3. La MT : Biomarqueur de Pollution Environnementale ?</i>	18
I.3. SÉPARATION DES MT.....	20
<i>I.3.1. Pourquoi effectuer une séparation chromatographique?</i>	21
<i>I.3.2. La Chromatographie Liquide</i>	22
I.3.2.1. Perméation de Gel.....	22
I.3.2.2. Échange d'Ions.....	22
I.3.2.3. Chromatographie de partage	23
I.4. ANALYSE DES MÉTAUX.....	24
<i>I.4.1. Plasma Induit par haute-fréquence (ICP)</i>	24
<i>I.4.2. Détecteurs pour la spectrométrie à plasma ICP</i>	27
I.4.2.1. Spectromètre d'émission atomique	27

I.4.2.1.1. Les spectromètres séquentiels.....	27
I.4.2.1.2. Les spectromètres simultanés.....	28
I.4.2.2. Spectromètre de masse.....	30
I.4.2.2.1. Avantages et inconvénients.....	33
I.4.2.2.2. Interférences en ICP-MS.....	33
I.5. COUPLAGE HPLC/ICP.....	36
I.5.1. Les Nébuliseurs.....	36
I.5.1.1. Nébuliseurs pneumatiques.....	37
I.5.1.2. Nébuliseur à injection totale.....	40
I.5.1.3. Injection de microparticules séchées monodispersées.....	41
I.5.1.4. Nébuliseur thermique.....	42
I.5.2. Chambre de nébulisation.....	46
CHAPITRE II: PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	48
II.1. PRÉPARATION DES SOLUTIONS.....	48
II.1.1. Solution tampon Tris-HCl.....	48
II.1.2. Solutions de MT.....	49
II.1.3. Les éluants chromatographiques.....	50
II.1.4. Solutions pour l'optimisation des instruments.....	50
II.2. SYSTÈME CHROMATOGRAPHIQUE.....	51
II.3. SPECTROMÈTRE À PLASMA.....	53
II.3.1. Spectromètre d'émission atomique.....	55
II.3.2. Spectromètre de masse.....	56
II.4. SYSTÈME DE NÉBULISATION THERMIQUE.....	58
CHAPITRE III: RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	63
III.1. CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE.....	63
III.1.1. Optimisation de la détection par spectrométrie d'absorption moléculaire dans l'ultraviolet.....	63
III.1.2. Choix des éluants.....	65
III.1.3. Étude du gradient d'élution pour la séparation des isoformes.....	67
III.2. DÉVELOPPEMENT DU NÉBULISEUR THERMIQUE.....	71
III.3. COUPLAGE HPLC/ICP.....	73
III.3.1. Optimisation du débit du gaz porteur de l'aérosol.....	74
III.3.2. Optimisation de la température du nébuliseur thermique.....	76
III.3.3. Optimisation du débit de la phase mobile.....	81
III.3.4. Comparaison des systèmes de nébulisation.....	81
III.4. ÉTUDE DE LA SÉPARATION DES MT PAR ICP-AES.....	85
III.4.1. Caractérisation des longueurs d'onde d'analyse.....	86

<i>III.4.2. Efficacité de séparation des MT</i>	97
<i>III.4.3. Séparation des métallothionéines environnementales</i>	105
III.4.3.1. Choix d'un étalon interne spectroscopique.....	106
III.4.3.2. Séparation des isoformes de la MT commerciale et environnementale	107
III.5. LES MT ET LE ICP-MS	120
<i>III.5.1. Balayage des masses pour différente composition d'éluant</i>	121
<i>III.5.2. Influence du n-propanol sur le signal analytique</i>	128
<i>III.5.3. Influence de l'utilisation d'un nébuliseur thermique sur le signal</i>	136
<i>III.5.4. Efficacité de séparation</i>	140
<i>III.5.5. Comparaison de la séparation entre TSP et Meinhard</i>	145
<i>III.5.6. Séparation des MT environnementales</i>	153
CHAPITRE IV: CONCLUSION	158
BIBLIOGRAPHIE	163

LISTE DES FIGURES

Figure 1:Représentation généralisée de l'assimilation des métaux chez un organisme.....	5
Figure 2:Représentation générale du cheminement possible des métaux assimilés.....	6
Figure 3:Diagramme simplifié du cycle de répartition du zinc dans l'environnement.....	8
Figure 4:Diagramme géochimique généralisé du cycle du cadmium.....	11
Figure 5:Schématisation des facteurs influençant la mobilité du cadmium dans l'environnement.	12
Figure 6:Migration du cadmium intracorporel et rôle des substances liantes du cadmium dans le sang ainsi que la synthèse et la dégradation des métallothionéines.....	12
Figure 7:Schéma décrivant les corrélations existant entre le temps, les points d'impact des polluants et les intérêts écologiques.....	19
Figure 8:Schéma d'un plasma induit par haute-fréquence.....	26
Figure 9:Diagramme d'un parcours optique de configuration Czerny-Turner.....	28
Figure 10:Schéma d'un spectromètre échelle qui permet de séparer les ordres et les longueurs d'ondes.	29
Figure 11:Schéma illustrant les composantes principales d'un plasma induit par haute fréquence couplé à un spectromètre de masse.	31
Figure 12:Représentation schématique d'un quadripôle.	32
Figure 13:Schématisation de différentes configurations de nébuliseurs pneumatiques.....	38
Figure 14:Schéma d'un nébuliseur à injection totale et de son panache.....	40

Figure 15: Profil de température en fonction de la longueur du vaporiseur et illustration schématique du mécanisme de nébulisation pour l'eau d'un nébuliseur thermique	43
Figure 16: Schéma du montage chromatographique en phase apolaire pour la séparation des isoformes de la MT avec détection par spectrométrie d'absorption dans l'UV.	52
Figure 17: Schéma du montage expérimental pour la séparation des isoformes de la MT par chromatographie apolaire couplée au plasma ICP	54
Figure 18: Description d'une matrice de pixels d'un détecteur à injection de charge.	57
Figure 19: Schéma du nébuliseur thermique.	60
Figure 20: Schéma des différentes chambres de nébulisation refroidies	61
Figure 21: Détermination de la longueur d'onde d'absorption des métallothionéines.....	64
Figure 22: Influence de la composition de l'éluant sur la séparation des isoformes de la métallothionéine	66
Figure 23: Influence du débit liquide sur l'efficacité de séparation des isoformes de la MT	68
Figure 24: Influence de la composition en propanol sur la séparation des isoformes de la MT	70
Figure 25: Influence du débit du gaz porteur sur le signal net de la raie du cadmium (Cd II 214,438 nm) pour différentes conditions de débit du liquide	75
Figure 26: Influence du débit du gaz porteur sur la largeur du pic à 10% et 50% de la hauteur du signal du cadmium (Cd II 214,438 nm) pour différentes conditions de débit du liquide	77

Figure 27:Détermination de la température du TSP en vue de l'optimisation du signal et des différents critères	78
Figure 28:Influence de la température du TSP sur le rapport de la hauteur nette sur le bruit du signal de fond pour la raie du cadmium (Cd II 214,438 nm).....	80
Figure 29:Comparaison des systèmes de nébulisation pour une injection de 100 µL de MT (3,3 µM) dans un ICP-AES (IRIS-AP).....	83
Figure 30:Effet du solvant sur le signal de fond pour le cadmium (Cd II 214,438nm) avec un nébuliseur pneumatique en aspiration continue.....	87
Figure 31:Comparaison du signal de fond entre le propanol et l'acétonitrile pour la raie du cadmium (Cd II 214,438 nm)	90
Figure 32:Effet du solvant sur le signal de fond pour le cobalt (Co II 228,616 nm) avec un nébuliseur pneumatique concentrique en aspiration continue	91
Figure 33:Effet du solvant sur le signal de fond du zinc (Zn I 213,856 nm) avec un nébuliseur pneumatique concentrique en aspiration continue.....	92
Figure 34:Effet du solvant sur le signal de fond du cuivre (Cu I 324,754 nm) avec un nébuliseur pneumatique concentrique en aspiration continue.....	93
Figure 35:Signal du cadmium en présence de n-propanol sur les pixels de la raie du Cd II à 214,438 nm du CID	96
Figure 36:Déconvolution gaussienne pour la détermination de la résolution des isoformes de la métallothionéine pour différents solvants organiques mais pour un même gradient de polarité.....	98
Figure 37:Influence du solvant sur le signal de la raie du cadmium (TSP).....	100
Figure 38:Influence du solvant sur la séparation des isoformes de la MT pour différentes baisses de polarité, $\lambda_{Cd II} = 214,438 \text{ nm}$	102

Figure 39:Injection (100 μ L) de MT de foie de lapin (3,3 μ M de MT; soit 10,5 μ M de Cd et 1,5 μ M Zn) avec un gradient d'élution modifié, en présence de 10,2 μ M Co sur une colonne PRP-3.....	108
Figure 40:Vérification de la contamination du Zn (Zn I 213,856 nm) sur la colonne PRP-3.....	111
Figure 41:Injection (100 μ L) de MT de foie de lapin (3,3 μ M MT; 5,9% Cd : 0,5% Zn) avec du cobalt (10,2 μ M) comme étalon interne	112
Figure 42:Déconvolution sur le signal du cadmium et lissage des signaux de zinc et de Co pour déterminer les caractéristiques de la séparation des isoformes de la MT de foie de lapin par HPLC/ICP-AES.....	114
Figure 43:Comparaison des signaux en mode isocratique entre la métallothionéine de foie de lapin et son blanc	116
Figure 44:Détermination des métaux liés à la MT de moule.....	119
Figure 45: Spectre de masse de différentes compositions de solvant pour la détermination des interférences spectroscopiques avec un nébuliseur thermique.....	123
Figure 46:Spectre de masse par ICP-MS avec le système à nébulisation thermique et les chambres de nébulisation « U » et cyclone pour différentes compositions de solvants.....	126
Figure 47:Spectre de masse par ICP-MS avec le système de nébulisation pneumatique pour différentes compositions de solvants.....	127
Figure 48:Influence du solvant sur le signal en aspiration continue avec un nébuliseur Meinhard et une chambre Scott refroidie à -5 °C pour une solution de 10 μ g/L en métal.....	129

Figure 49:Influence des solvants sur le signal pour différents éléments avec le nébuliseur pneumatique en aspiration continue	131
Figure 50:Détermination de l'effet mémoire de différentes compositions de solvants sur le signal d'une solution 2% HNO ₃ contenant 10 µg/L en métal	132
Figure 51:Influence du solvant sur le signal des éléments en mode d'injection discontinue d'échantillon	133
Figure 52:Influence des solvants sur la reproductibilité de la surface suite à l'injection de 100 µL d'une solution de 10 µg/L en métal avec un nébuliseur pneumatique et une chambre Scott	135
Figure 53:Comparaison des chromatogrammes pour une injection de 100 µL d'une solution de 10,5 µM de Cd libre et de 0,85 µM de Co libre pour différents nébuliseurs.....	137
Figure 54:Comparaison des chromatogrammes pour une injection de 100 µL d'une solution de 10,5 µM de Cd-MT et de 0,85 µM de Co libre pour différents nébuliseurs.....	139
Figure 55:Étude du gradient par le signal du ¹¹⁴ Cd sur la séparation des isoformes de la MT. Les déconvolutions suivent une équation gaussienne.....	142
Figure 56:Chromatogramme pour la séparation des isoformes de la MT de foie de lapin (20 µg/mL) pour un gradient de 0,48%/min propanol.	144
Figure 57:Signaux ICP-MS à différentes masses suite à l'injection d'une solution Tris-HCl. Un nébuliseur pneumatique et une chambre Scott refroidie.....	146
Figure 58:Signaux ICP-MS à différentes masses suite à l'injection de 100µL d'une solution de 3,3 µM en MT de foie de lapin. Un nébuliseur pneumatique et une chambre Scott refroidie	148

Figure 59: Comparaison des signaux du cadmium et du cuivre entre le nébuliseur thermique (TSP) et le nébuliseur pneumatique (Meinhard) pour la séparation des isoformes de la MT de foie de lapin (3,3 μ M).....	149
Figure 60: Effet du solvant sur le signal du ^{114}Cd pour différents systèmes de nébulisation en l'absence de colonne chromatographique	151
Figure 61: Effet du solvant sur le signal du ^{63}Cu pour différents systèmes de nébulisation en l'absence de colonne chromatographique	152
Figure 62: Chromatogramme des isoformes de MT provenant de la moule et du foie de lapin pour une injection de 100 μ L.....	155
Figure 63: Signal de cadmium par nébulisation thermique pour des MT de foie de lapin et de MT de branchies de moule en l'absence de colonne chromatographique (liquide porteur: Tris-HCl).	156
Figure 64: Signal de cuivre et zinc par nébulisation thermique pour des MT de foie de lapin et de MT de branchies de moule en l'absence de colonne chromatographique (liquide porteur: Tris-HCl).	157

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Liste des principaux facteurs intrinsèques et extrinsèques régissant la synthèse des MT chez les organismes aquatiques.....	17
Tableau II: Liste des propriétés physico-chimiques de certains solvants.....	50
Tableau III: Caractéristiques de la colonne PRP-3 pour la séparation des isoformes de la MT.....	51
Tableau IV: Conditions d'opération du système d'émission atomique.....	55
Tableau V: Caractéristiques physique des éléments aux longueurs d'onde d'analyse en émission atomique ou ionique.....	57
Tableau VI: Conditions d'opération du ICP-MS.....	58
Tableau VII: Détermination du diamètre moyen de Sauter (d_s) pour une nébulisation pneumatique selon la composition et la température du solvant pour des conditions de nébulisation prédéterminées.....	62
Tableau VIII: Liste des gradients d'élution pour l'optimisation du débit lors de la séparation des isoformes de la MT.....	69
Tableau IX: Résultats de la séparation des isoformes de la MT avec la colonne PRP-3 et détection par ICP-AES pour différents solvants organiques.....	104
Tableau X: Conditions optimales pour la séparation des isoformes des MT de foie de lapin et pour la détection des métaux liés.....	104
Tableau XI: Caractéristiques de séparation des isoformes de MT de foie de lapin par ICP-AES.....	113

Tableau XII: Caractéristiques des pics chromatographiques pour des conditions d'éluion choisies lors de la séparation des isoformes de la MT de foie de lapin par ICP-MS.....143

REMERCIEMENT

J'aimerais tout d'abord remercier Dr Joseph Hubert pour m'avoir donné l'opportunité de continuer mes recherches dans son laboratoire ainsi que son encouragement tout au long de l'écriture de cette thèse.

Je tiens également à remercier tous mes collègues de laboratoire pour les discussions intéressantes. Un merci tout particulier à Chi Khan Tran pour son soutien moral, sa bonne humeur et ses judicieux conseils. Je remercie également Robert Sing pour les discussions et son savoir-faire informatique.

Je m'en voudrais de passer sous silence les exploits « surhumains » de Julien DelTesta, Martin Lambert et Christophe Ciesla sans qui ce projet n'aurait, littéralement, jamais vu le jour.

Il faut également que je souligne la remarquable compréhension de François Dumouchel et Patrice Turcotte du département d'Écotoxicologie du Centre Saint-Laurent à Montréal pour la disponibilité qu'ils m'ont donnée sur le ICP-AES. Cette aide est des plus appréciées.

De l'Institut de Recherche en Santé et Sécurité au Travail (IRSST) de Montréal, je tiens également à remercier Nicole Goyer et Yves Cloutier pour m'avoir permis d'accéder à l'impacteur à cascade pour l'étude sur les aérosols.

Enfin, je me fais un devoir de remercier haut et fort mes amis et ma famille pour leur soutien moral, mais plus particulièrement à ma soeur, Marie-Hélène, qui s'est « tappé » la lecture de cette thèse, un domaine fort éloigné du génie civil et du calcul des poutres de soutien. Et à cette famille que j'aime tant mais qui me pose sans cesse la même question depuis le début de ma recherche : « Puis, quand finis-tu ? », je tiens à leur répondre : « Bientôt. »

Chapitre I: INTRODUCTION

La biodisponibilité et la concentration élevée de certains métaux (ex : cadmium ou mercure) dans l'environnement peuvent engendrer des effets toxiques chez les organismes en bloquant les sites actifs de certaines protéines et de certaines enzymes. Cependant, les organismes possèdent une défense naturelle, les métallothionéines (MT), envers ces métaux qui permet d'augmenter leur niveau de tolérance par la séquestration de ces métaux. Les métallothionéines possèdent ce rôle de détoxiquant puisqu'elles forment des liaisons avec les métaux lourds toxiques, mais elles servent également à assurer la distribution des métaux essentiels tels que le cuivre et le zinc dans l'organisme. De plus, elles peuvent servir comme biomarqueur. Benson (Benson *et al.*, 1992) a défini le terme biomarqueur comme suit: « Les biomarqueurs sont des réponses biochimiques, physiologiques ou pathologiques mesurées chez les organismes individuels pour lesquelles une information est donnée suite à une exposition aux contaminants environnementaux et/ou aux effets sous-létaux provenant de telles expositions. ».

I.1. OBJECTIF DU PROJET

Comme la métallothionéine se présente sous différentes isoformes, leur séparation pourrait donner des informations supplémentaires quant à leur rôle de biomarqueur. La séparation des isoformes sera effectuée par chromatographie liquide en phase inversée (RP-HPLC) puisqu'elle est l'une des plus efficaces.

Le système de détection doit permettre la quantification des éléments d'intérêts, les métaux lourds. La détection en simultané ou en quasi-simultané est nécessaire pour suivre la répartition de ces métaux en fonction des différentes isoformes en temps réel puisqu'elle permettra d'évaluer pour chacune de ces isoformes les rapports métal:MT. De plus, il est essentiel que le mode de détection soit sensible car les quantités environnementales en MT peuvent être très faibles. Pour ces études, un spectromètre d'émission atomique (ICP-AES) et un spectromètre de masse à plasma inductif (ICP-MS) sont envisagés.

Un système de nébulisation thermique (TSP), un nébuliseur non conventionnel, servant de couplage entre le système chromatographique et le plasma ICP sera développé

et étudié puisque la séparation des différentes isoformes utilise un éluant contenant un solvant organique et qu'il peut entraîner une instabilité du plasma. En effet, la présence de solvant organique dans le plasma modifie l'habileté du plasma ICP à ioniser et/ou exciter les analytes. Il devient donc nécessaire de procéder à la désolvatation avant que le solvant entre dans le plasma.

Par la suite, il sera possible de comparer la séparation des isoformes de la MT et la détection des métaux entre le ICP-AES et le ICP-MS. Une quantification des métaux liés aux MT de moule est envisagée puisque ces organismes reflètent la qualité de l'environnement.

I.2. PROBLÉMATIQUE ENVIRONNEMENTALE

Les contaminations métalliques environnementales proviennent fréquemment des rejets industriels. Les conséquences sur l'environnement peuvent alors être directes si ces rejets contiennent des composés métalliques (Cd, Hg, Zn, Cu). Par contre, elles sont considérées indirectes si ces rejets ne font que modifier le pH des eaux. Un changement de pH peut amener la libération des métaux lourds présents dans les sédiments et les sols. L'eau étant le milieu le plus propice à la propagation des métaux dans l'environnement, ceux-ci sont facilement accessibles aux différents organismes aquatiques. Ces organismes accumulent les métaux par inhalation ou par ingestion. Cette contamination se propage ensuite aux différents maillons de la chaîne alimentaire et une amplification du processus d'accumulation pourra être observée au sommet de la pyramide alimentaire.

I.2.1. LES MÉTAUX DANS LES SYSTÈMES BIOLOGIQUES

Certains métaux sont des éléments essentiels (ex. : zinc, cuivre) pour le développement d'un organisme puisqu'ils servent de catalyseurs pour certaines réactions biochimiques, alors que d'autres métaux, appelés « non-essentiels » (ex. : cadmium, mercure) peuvent inhiber ces réactions. Les métaux lourds tels que le cuivre, le zinc et le cadmium seront discutés dans cette section.

I.2.1.1. DISPONIBILITÉ

Des études (Ochiai, 1988) ont montré qu'il existait une corrélation entre l'abondance d'un élément dans l'environnement et la quantité retrouvée dans les tissus

biologiques. En effet, plus un élément est abondant dans son environnement, plus il a la possibilité de devenir essentiel, mais la forme sous laquelle l'élément se présente déterminera son assimilation. Notons que l'abondance d'un élément dans l'environnement ne lui confère pas nécessairement un caractère essentiel. En effet, certains éléments tels que le cobalt et le sélénium, bien que peu abondants dans l'environnement, s'avèrent essentiels lorsqu'ils sont présents au niveau de trace dans l'organisme. Par ailleurs, il existe d'autres métaux présents à faible abondance dont la forme assimilable est toxique. Le cadmium et le mercure font partie de cette catégorie. Bien qu'une grande quantité d'éléments puisse être déchargée dans l'environnement de façon naturelle, il reste que les déversements de source anthropogénique sont importants. Nriagu (Nriagu, 1990) a estimé le rapport entre les décharges naturelle et anthropogénique et il a montré que les problèmes ne sont pas uniquement dus au cadmium, au plomb et au mercure mais aussi au sélénium, à l'étain, à l'arsenic, au chrome, au nickel, au molybdène et au cuivre. Les grandes quantités de zinc et de fer, des métaux essentiels, générées par des sources anthropogéniques, sont mieux tolérées par les organismes puisque les mécanismes de contrôle de ces métaux sont mieux développés.

1.2.1.2. TOXICITÉ DES MÉTAUX LOURDS

Les effets toxiques des métaux lourds varient grandement sur une base physiologique, mais le mécanisme de toxicité au niveau moléculaire semble bien cerné. Ochiai (Ochiai, 1995) relève les mécanismes qui causent les effets toxiques dus aux métaux lourds.

En effet, les résidus spécifiques d'acides aminés, tels que la sérine (-OH), la cystéine (-SH) et l'histidine (-N) qui constituent les groupements fonctionnels essentiels des biomolécules, peuvent se trouver bloqués par les métaux lourds. Ce blocage peut s'expliquer par une plus grande affinité de l'ion métallique envers le groupement fonctionnel et entraîne le déplacement de l'ion métallique d'origine. Cette substitution entraîne la perte de l'activité de la biomolécule puisque la présence d'un ion métallique non désiré peut modifier sa conformation. La perte de la conformation active est principalement observée chez les enzymes, les protéines et quelquefois chez les polynucléotides (Ochiai, 1995).

Les biomembranes peuvent également être influencées par la présence des métaux lourds car en se liant à une tête d'un phospholipide chargé négativement et à des résidus de protéines membranaires, ils perturbent leur intégrité. Cook (Cook *et al.*, 1975) a montré que les métaux lourds pouvaient modifier le rôle de certains agents biologiques actifs. Ils ont observé, entre autres, que Cd^{2+} et Pb^{2+} augmentaient les risques potentiels des endotoxines produites par les bactéries. En effet, ces métaux agiraient en bloquant les enzymes responsables de l'élimination des endotoxines. Engel (Engel *et al.*, 1987) illustre bien les cheminements possibles que peuvent prendre les métaux lourds dans les organismes vertébrés ou invertébrés. Ce schéma est représenté à la Figure 1 et 2.

On peut donc remarquer que la toxicité des métaux lourds repose principalement sur leur affinité à former des liaisons avec les biomolécules. Les métaux lourds comprennent entre autres les éléments du groupe IB et IIB et possèdent un point en commun: la similitude de la couche électronique. Cette similitude amènera des comportements similaires envers les protéines et les enzymes et c'est ce qui explique que Cu^+ , Ag^+ , Au^+ , Hg^{2+} et Cd^{2+} peuvent remplacer Zn^{2+} , un métal essentiel. Vallee (Vallee *et al.*, 1972) et Friberg (Friberg *et al.*, 1986) ont fait une bonne revue de la littérature sur les effets toxiques de ces métaux.

I.2.1.2.1. Le zinc

Le zinc est un élément essentiel à la vie puisqu'il est fortement associé aux fonctions de certaines enzymes. Le fait d'être un élément essentiel engendre une meilleure tolérance lors d'ingestion importante due à des causes naturelles. En effet, on ne dénombre aucun cas d'intoxication au zinc suite à une libération naturelle. Cependant, les sources anthropogéniques peuvent provoquer une intoxication si cette libération est trop importante et excède les limites tolérées par les organismes.

Chez l'homme, le zinc se distribue principalement entre les muscles (~62%) et les os (~29%). Toutefois, le foie, la voie gastro-intestinale et la peau sont les autres tissus où la concentration en zinc est la plus importante avec des pourcentages respectifs de 2%, 1% et 1% (NRC, Subcommittee on Zinc, 1979). Il n'existe que très peu de cas où une intoxication au zinc a provoqué la mort. Cependant, l'excès de zinc peut amener

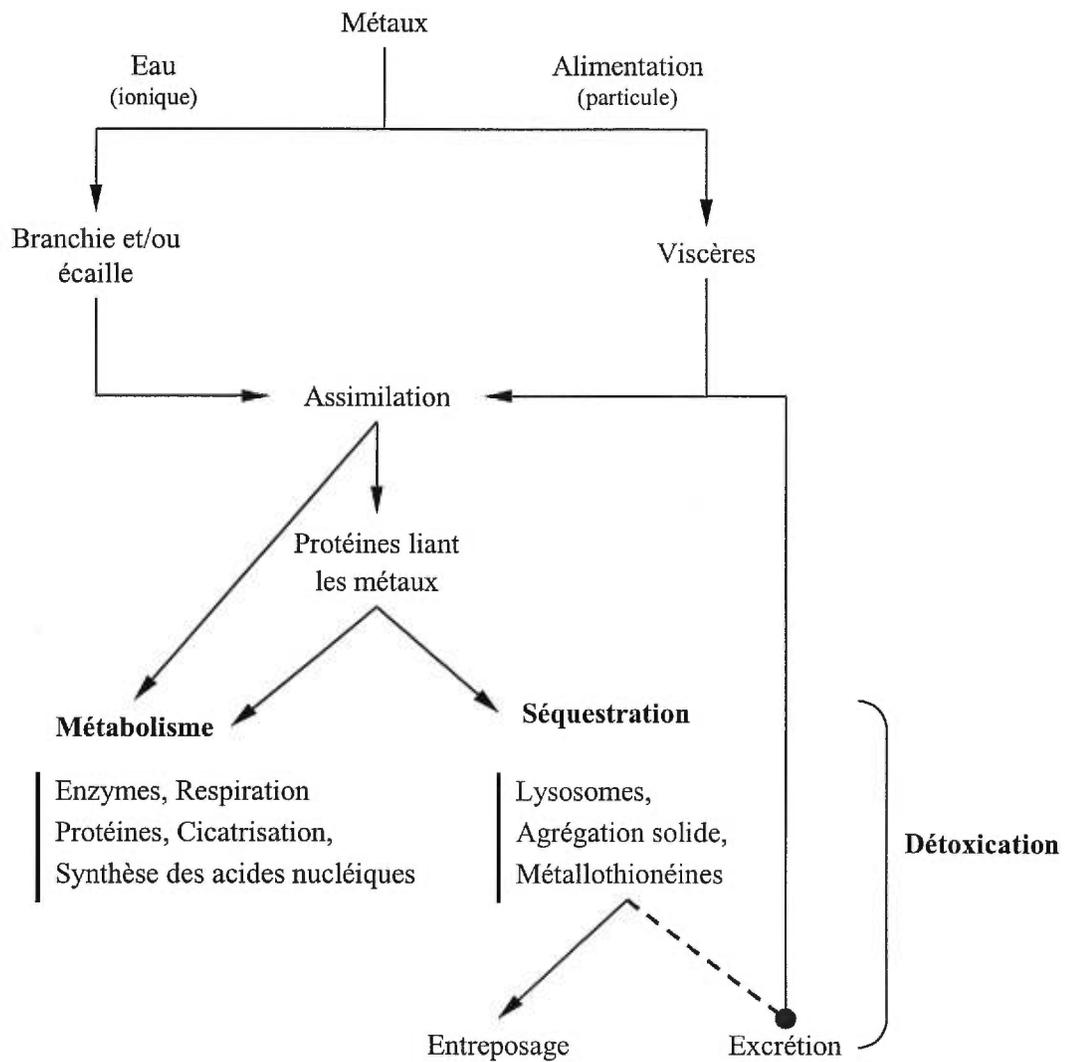


Figure 1: Représentation généralisée de l'assimilation des métaux chez un organisme. (Engel *et al.*, 1987).

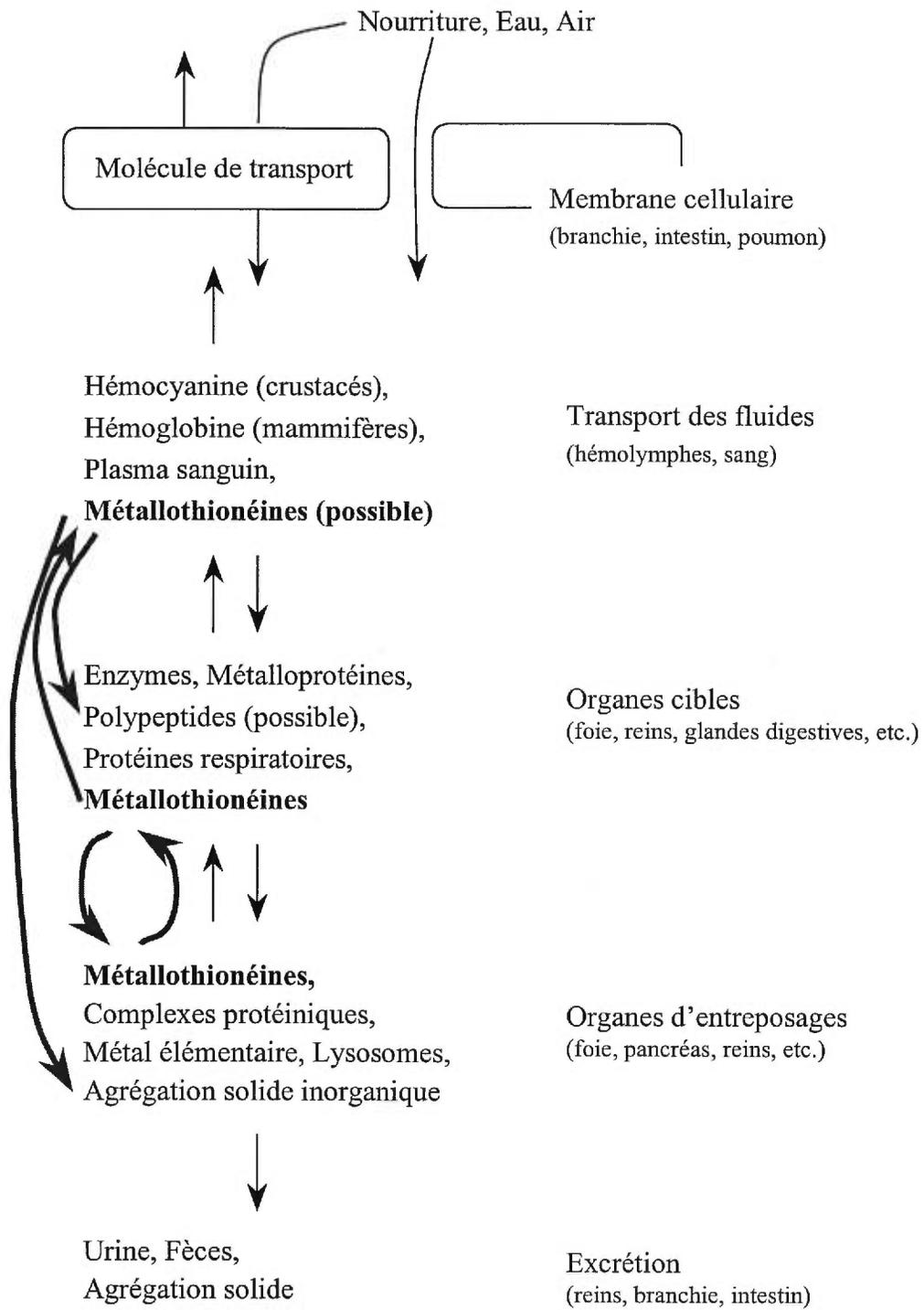


Figure 2: Représentation générale du cheminement possible des métaux assimilés (Engel *et al.*, 1987).

plusieurs symptômes qui varient selon le processus d'intoxication. A titre d'exemple, l'inhalation de zinc peut provoquer une hyperventilation, de la fièvre et des frissons, une transpiration abondante, des douleurs à la poitrine et aux jambes, des nausées et des vomissements, de l'anorexie ainsi qu'une faiblesse générale (NRC, Subcommittee on Zinc, 1979).

Le Canada est l'un des principaux pays où l'extraction et le raffinage du zinc ont lieu et où son emploi est multiple. En effet, dans 43% des cas, la galvanisation des métaux utilise le zinc comme métal de recouvrement. Nous le retrouvons également dans la production de bronze et de laiton (~21%) et des alliages non-corrosifs. Il est aussi utilisé dans les industries chimiques et en agriculture (Chilvers *et al.*, 1987; Spear, 1981). Toutes ces utilisations augmentent les risques d'émission anthropogénique de zinc dans l'environnement. Elles sont donc additionnelles aux émissions naturelles. Peu importe la source d'émission, le zinc se mobilisera selon le schéma illustré à la Figure 3.

Plusieurs composés de zinc, comme l'oxyde et le carbonate, peuvent être toxiques. Les composés de zinc ($Zn[H_2O]_6^{2+}$, $ZnCO_3$) les plus toxiques se retrouvent dans la biota aquatique et peuvent provoquer des intoxications chez les espèces aquatiques (Spear, 1981). Les études ont porté principalement sur les poissons d'eau douce et leur intoxication pourrait atteindre l'homme.

I.2.1.2.2. Le cuivre

Tout comme le zinc, le cuivre est un élément essentiel puisqu'il se retrouve dans plusieurs enzymes telles que les ferroxidases, les cytochromes oxydases, les superoxydes dismutases et les amines oxydases. Cet élément se retrouve dans presque tous les organes, mais le foie est celui où on le retrouve en plus grande concentration. Les cas d'intoxication par le cuivre sont rares et seule une ingestion importante de sels de cuivre (15 à 75 mg) peut provoquer cette intoxication qui cause généralement des dérangements gastro-intestinaux.

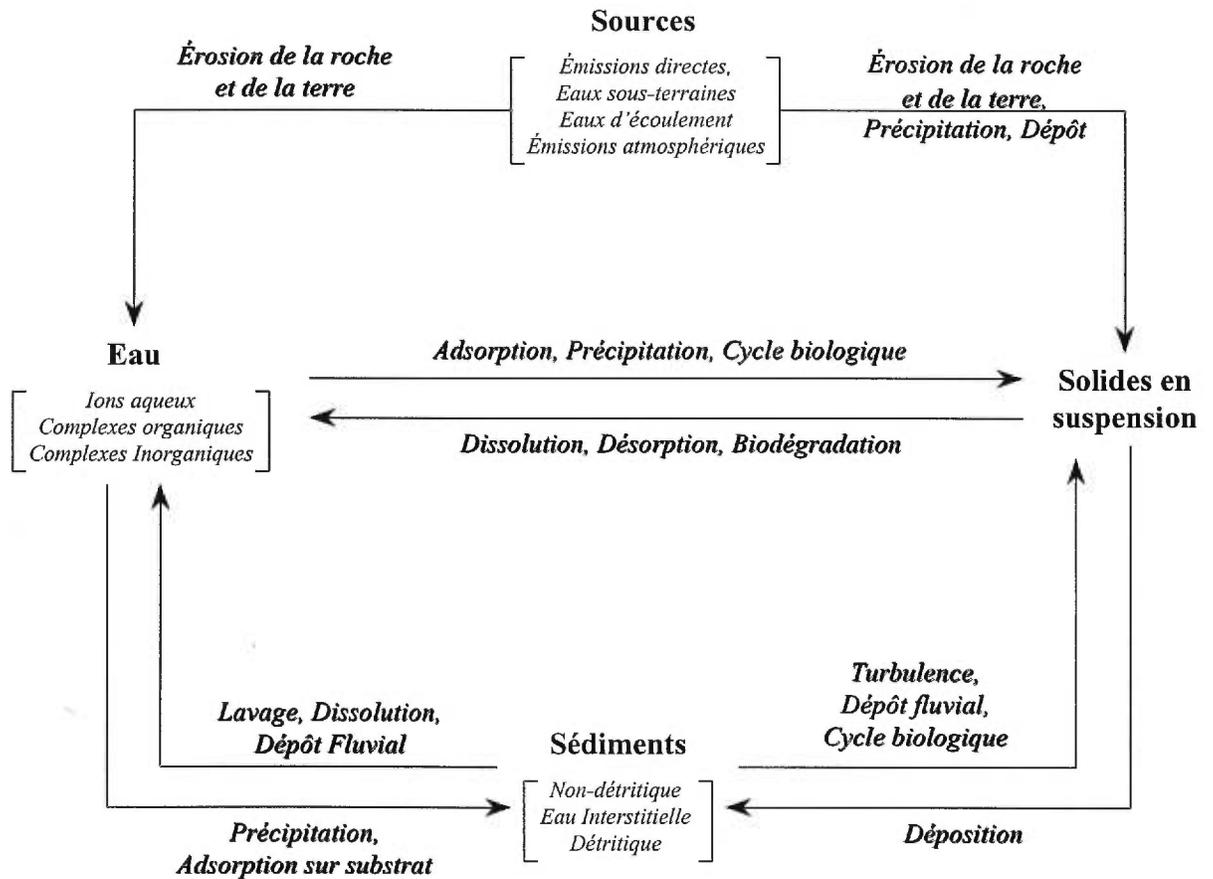


Figure 3: Diagramme simplifié du cycle de répartition du zinc dans l'environnement (Spear, 1981).

L'inhalation de vapeur de cuivre peut conduire à l'irritation des voies respiratoires mais aucun relevé n'existe quant à l'intoxication par des inhalations chroniques (Aaseth *et al.*, 1986). L'élimination de l'excès de cuivre se fait en grande partie par le foie via la bile. Chez l'homme, le mauvais fonctionnement de cet organe engendre une augmentation progressive de la concentration en cuivre dans plusieurs organes dont le foie, le cerveau, la cornée et peut causer la maladie de Wilson (Seymour, 1987).

Les sources de cuivre proviennent principalement des minerais suivant : la cuprite (Cu_2O), la chalcocite (Cu_2S), la chalcopyrite (CuFeS_2), la malachite et l'azurite. Ces minerais deviennent disponibles aux organismes principalement par la voie aquatique suite au lessivage des sols. Les sources anthropogéniques urbaines libèrent des quantités équivalentes de cuivre comparées aux sources naturelles, cependant, un milieu industriel en libère beaucoup plus. Toutefois peu de données fiables sont disponibles pour établir la toxicologie environnementale du cuivre (Spear *et al.*, 1980). Le schéma représentant le cheminement et la répartition du cuivre peut s'apparenter à celui du zinc.

I.2.1.2.3. Le cadmium

Le cadmium est un élément relativement rare : il représente en moyenne 0,5 g/tonne de la croûte terrestre (Lee, 1972). L'extraction du cadmium provient principalement de l'exploitation des mines de zinc et de plomb puisqu'il en est un sous-produit. Le cadmium est employé dans les pigments de peinture (sulfure de cadmium, pigment jaune insoluble), comme stabilisant lors de la fabrication des plastiques. On l'utilise aussi dans l'électroplacage des automobiles, dans les piles rechargeables nickel-cadmium, dans les alliages et dans les semi-conducteurs (Purdom *et al.*, 1980).

Le cheminement du cadmium et de ses sels dans l'environnement est illustré à la Figure 4. Les facteurs influençant le cycle du cadmium dans l'environnement ne sont pas clairement établis, mais il semble que la principale source de pollution soit de nature géochimique. En effet, les sulfures de cadmium contenus dans le sol sont instables et peuvent être facilement attaqués par les micro-organismes. Le cadmium ainsi libéré devient disponible aux plantes. Ces plantes concentrent aisément le cadmium et peuvent le disperser en se décomposant, contribuant ainsi à la pollution. La Figure 5 illustre plusieurs facteurs qui affectent la migration ou le mouvement du cadmium.

D'un point de vue biochimique, le comportement du cadmium se compare à celui du zinc puisqu'ils sont tous deux issus de la même famille. Ceci peut engendrer une certaine compétitivité entre le zinc et le cadmium pour les sites actifs des protéines et des enzymes. La toxicité du cadmium vient de son affinité plus importante pour les groupements sulfhydrylés (-SH) que celle du zinc.

Chez l'homme, le cadmium se retrouve initialement dans le foie et est graduellement transporté vers les reins où il est accumulé et éventuellement excrété. En fait, l'accumulation du cadmium est favorisée à ces endroits puisqu'il s'agit d'organes qui favorisent la synthèse de métallothionéines, une protéine à haute teneur en groupements sulfhydrylés. Chez l'homme, une intoxication au cadmium entraîne l'hypertension, la décalcification, l'artériosclérose, l'emphysème et les maladies rénales. Chez les organismes marins, on a observé pour les mollusques une accumulation de cadmium dans les reins et les glandes digestives alors que pour les crustacés et les poissons à ailerons (« *Finfish* »), le cadmium s'accumule dans le foie et les viscères. Ces organismes marins peuvent concentrer le cadmium d'un facteur allant de 100 à 10 000 fois celui rencontré dans les eaux. (McComish *et al.*, 1988).

Dans tous les cas, les auteurs notent que les MT ou les protéines similaires sont impliquées dans la détoxification du cadmium. La Figure 6 illustre le cycle du cadmium pour sa détoxification via la métallothionéine. En effet, Friberg (Friberg *et al.*, 1986) mentionne que le cadmium lié à la métallothionéine dans le plasma est filtré au travers du glomérule rénal et il sera ensuite absorbé dans le tubule. Une fois que le complexe protéine-cadmium entre dans la cellule tubulaire, la protéine est brisée et le cadmium, non lié à la métallothionéine, entre dans le fluide intracellulaire. Ces ions cadmium stimulent la production de métallothionéine intracellulaire qui se liera au cadmium. Un équilibre s'établit entre ces deux espèces. La quantité de cadmium non-lié dépend de la vitesse d'entrée du complexe Cd-MT dans la cellule et de la vitesse de production des nouvelles MT. Nordberg (Nordberg *et al.*, 1985) pense que le cadmium non-lié à la MT dans la cellule est plus toxique dans le processus biochimique intracellulaire et qu'il est responsable des dommages causés aux cellules rénales.

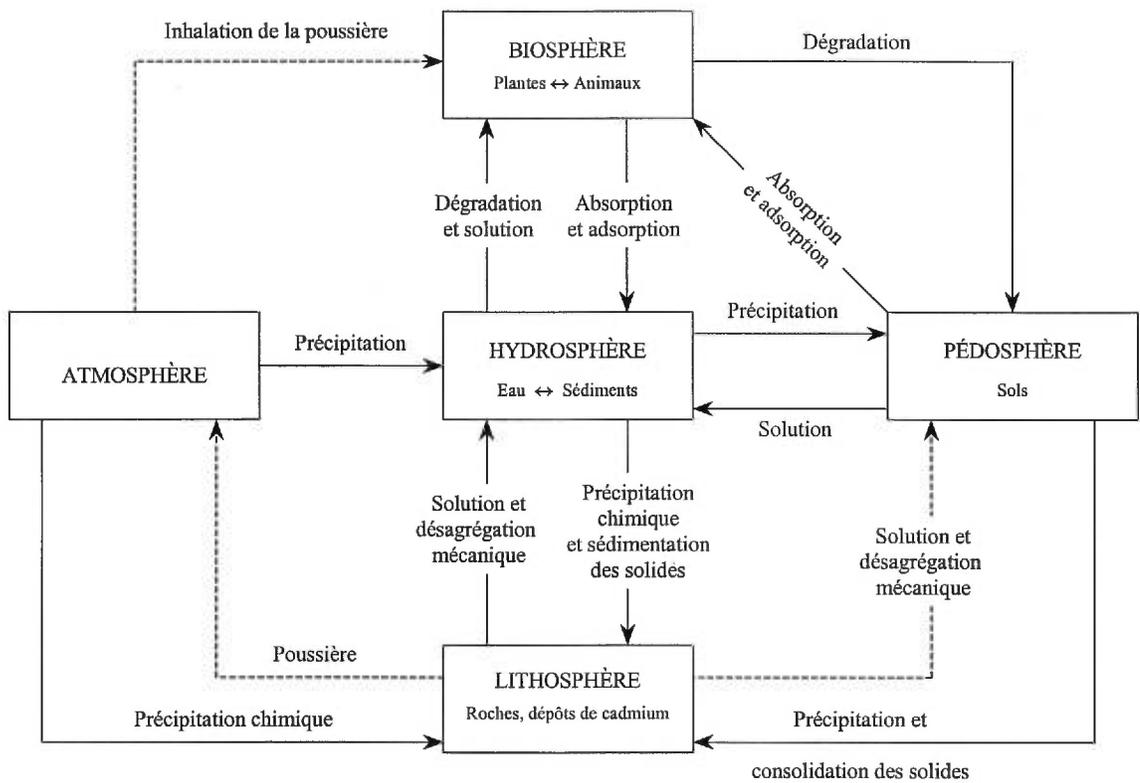


Figure 4: Diagramme géochimique généralisé du cycle du cadmium. (NRCC, 1979)

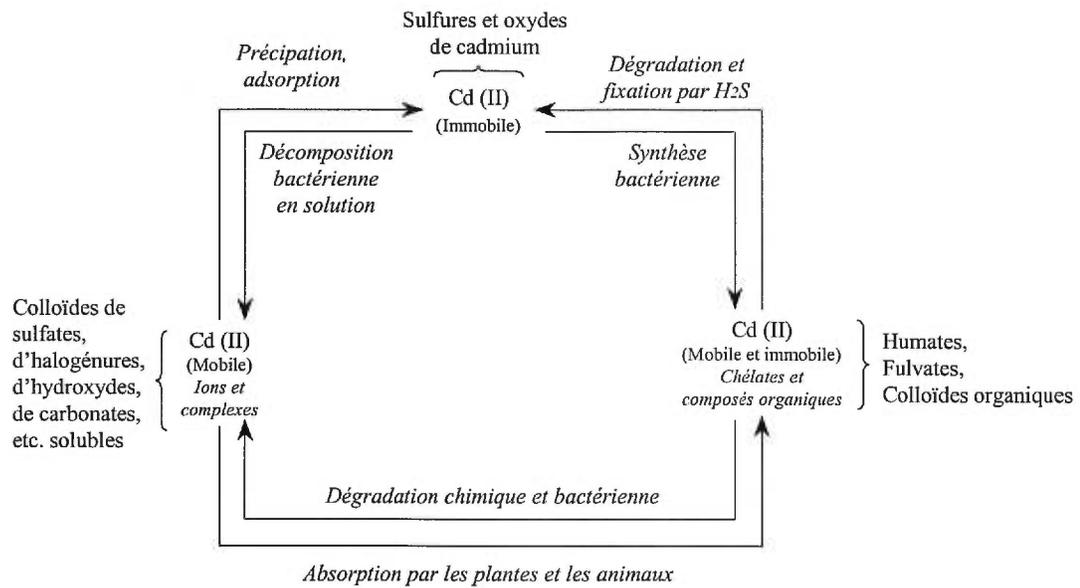


Figure 5: Schématisation des facteurs influençant la mobilité du cadmium dans l'environnement.

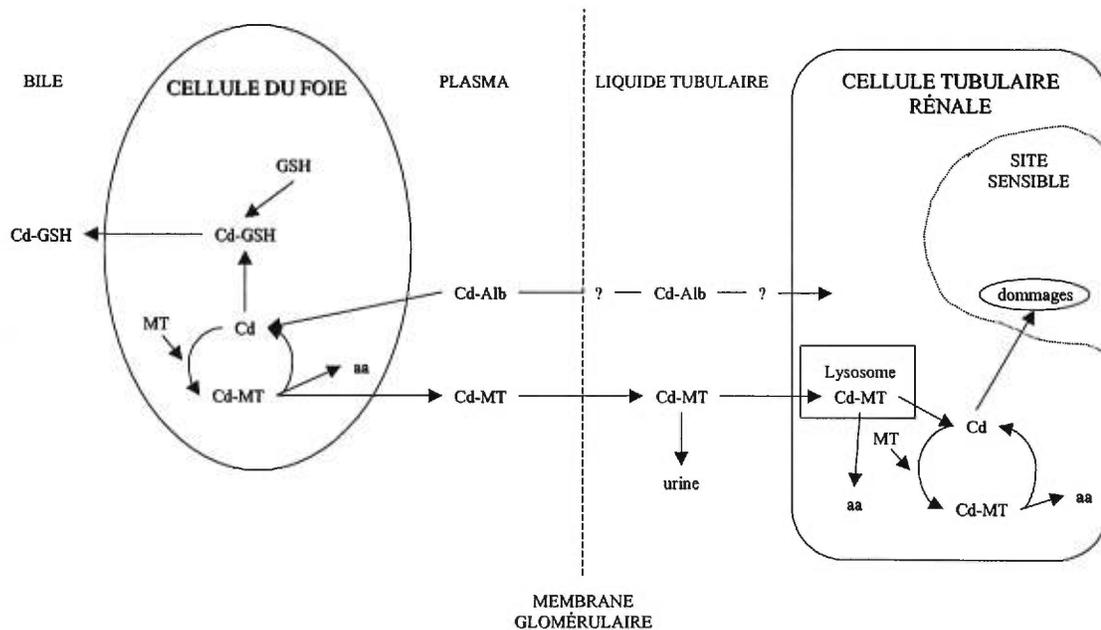


Figure 6 : Migration du cadmium intracorporel et rôle des substances liantes du cadmium dans le sang ainsi que la synthèse et la dégradation des métallothionéines. GSH: glutathione; MT: métallothionéine; aa: acides aminés; Alb: Albumine (Nordberg, 1984).

I.2.2. LES MÉTALLOTHIONÉINES

Les organismes, lorsque mis en présence des métaux lourds, peuvent leur résister dans la mesure où leur quantité ne dépasse pas un seuil critique qui peut varier d'une espèce à l'autre ou d'un individu à l'autre. L'une des meilleures défenses que les organismes possèdent pour augmenter le seuil de toxicité face aux métaux lourds est la métallothionéine (MT), une protéine qui possède un taux élevé de groupements soufrés. Tous les métaux que nous avons décrits précédemment (Zn, Cu, Cd) possèdent une bonne affinité pour le soufre et peuvent donc être liés à la MT.

I.2.2.1. LA DÉFINITION DES MÉTALLOTHIONÉINES

Historiquement, le terme « métallothionéine » a été introduit pour désigner des protéines provenant du cortex rénal équin (relatif au cheval). Bien entendu, les compositions, séquences et structures des MT diffèrent selon le degré d'évolution de l'organisme. Un premier classement des MT est fait selon leurs caractéristiques structurales. Kojima a défini ces différentes classes en fonction des polypeptides présents dans la protéine alors que Kägi les a définies en terme de l'évolution de l'organisme (Kojima, 1991; Kägi, 1991).

- Classe I: Cette classe regroupe tous les polypeptides dont l'emplacement des cystéines est étroitement relié aux MT rénales équines. En terme d'évolution, cette classe inclut les polypeptides dont la structure primaire est étroitement reliée à celle des mammifères.
- Classe II: Cette classe regroupe tous les polypeptides dont l'emplacement des cystéines n'a qu'une parenté éloignée avec les MT rénales équines. Par conséquent, tous les polypeptides n'ayant qu'une relation d'évolution très éloignée avec celle des mammifères sont inclus dans cette classe; soit par exemple ceux de certaines levures et de certains champignons.
- Classe III: Cette classe regroupe les polypeptides qui forment des liaisons thiolate-métal et qui ne possèdent aucune régularité dans leur structure. En terme d'évolution, elle ne comprendra que les protéines composées d'unités γ -glutamylcystéinyl telles que celles des plantes, des levures et des algues.

I.2.2.2. LA NOMENCLATURE

L'identification d'une MT ne se limite pas qu'à la classe puisque certaines espèces synthétisent plus d'un isoforme de la molécule. En effet, en se basant sur la Commission de la Nomenclature Biochimique (CBN : Commission on Biochemical Nomenclature), il a été établi que les termes « isométallothionéines » et « isoformes » (en parlant des métallothionéines) devaient être utilisés pour représenter toutes les formes de MT produites naturellement par une espèce. Pour nommer un isoforme, un chiffre arabe suit le terme « métallothionéine ». Par convention, ce chiffre est déterminé par l'ordre d'élution des isoformes en chromatographie d'échange d'anions. Chez les mammifères, la différence entre la MT-1 et la MT-2 est la présence d'un acide aminé résiduel à caractère acide en position 10 ou 11 dans la MT-2 alors que cet acide est neutre dans la MT-1. (Kojima, 1991; Kägi *et al.*, 1987). Si une métallothionéine ne contient pas de métaux, nous parlons d'apométallothionéine ou d'apothionéine.

La section suivante énumère les caractéristiques communes des différentes classes qui définissent la MT d'un point de vue physico-chimique.

I.2.2.3. CARACTÉRISTIQUES DES MÉTALLOTHIONÉINES

Pour qu'une protéine puisse être considérée « métallothionéine », il faut qu'elle puisse répondre à certains critères généraux dont la plupart ont été définis par rapport aux métallothionéines de la classe I. Les critères généraux des métallothionéines sont :

- les protéines ont une faible masse moléculaire qui se situe entre 6 000 et 15 000 Daltons;
- les protéines sont formées d'environ 30% de cystéine. Qu'il s'agisse de métaux essentiels (Cu, Zn) ou non-essentiels (Cd, Hg, Ag), les liens métal-protéine se font par la fonction thiolate. La force de cette liaison suit l'échelle décroissante suivante: Hg > Ag > Cu > Cd > Zn ;
- les protéines sont thermiquement stables (environ 80°C), ce qui peut s'avérer un facteur intéressant pour leur purification. En effet, en chauffant, nous provoquons la dénaturation des protéines indésirables tout en gardant les MT intactes;

- les protéines sont sensibles aux réactions rédox et ont une grande facilité à former des ponts disulfures. Ceci peut entraîner des erreurs quant à la quantification du contenu molaire en métaux si certaines précautions ne sont pas prises lors du traitement des échantillons.

À part ces critères généraux qui se retrouvent dans toutes les classes, les métallothionéines de différentes classes possèdent certaines caractéristiques qui leur sont propres. Toutefois, il est important de spécifier que les recherches ont principalement porté sur les mammifères et certaines espèces de mollusques et que les MT de ces espèces sont les mieux décrites. Les caractéristiques spécifiques des MT de la classe I, qui comprend celles des mammifères, sont :

- une faible masse moléculaire comprise entre 6 et 10 kDa;
- une teneur de 60-61 acides aminés dont aucun n'est aromatique;
- une absence d'histidine;
- une composition caractéristique de la séquence d'acides aminés dans la MT qui est cystéine-X-cystéine où « X » représente un acide aminé quelconque;
- des points isoélectriques compris dans le domaine de 3,9 à 4,6 (Kägi *et al.*, 1987). (Bethune *et al.*, 1979);
- un rapport stœchiométrique « métal:protéine » qui dépend de la valence du métal : « 7:1 » pour les métaux divalents et « 12:1 » pour les métaux monovalents;
- une formation, chez la métallothionéine de classe I, de deux globules appelés domaine α et domaine β . Le domaine α comprend les acides aminés 31 à 61 dont la terminaison est un groupement carboxyle. Ce domaine regroupe 11 cystéines et permet de lier 4 métaux divalents. Pour ce qui est du domaine β , on retrouve en terminal une amine libre provenant de la l'acétylméthionine. On dénombre 9 cystéines qui peuvent lier jusqu'à 3 métaux divalents;
- une fixation du zinc, métal essentiel chez les mammifères, sur les MT pour des conditions normales d'évolution;

- les principaux organes qui synthétisent cette protéine: le rein, le foie, l'intestin, le pancréas.

I.2.2.4. LES RÔLES BIOLOGIQUES DES MÉTALLOTHIONÉINES

Les rôles que jouent les MT sont multiples et la recherche continue sans arrêt à étudier et clarifier les rôles biologiques *in vivo* et *in vitro*. Pour l'instant, le rôle le plus connu est la détoxification. Cette détoxification conduit à l'augmentation de la tolérance envers les métaux lourds en excès et/ou toxiques. Le procédé, par lequel les MT agissent, est la séquestration par la complexation des métaux libres situés dans le cytoplasme de la cellule. Cette séquestration permet d'éviter que les métaux non-désirés occupent des sites cellulaires sensibles et génèrent des effets toxiques. Néanmoins, le mécanisme de la séquestration n'est pas très bien connu et est encore à l'étude. Vallee et collaborateurs (Vallee *et al.*, 1972; Jiang *et al.*, 1998; Maret *et al.*, 1998; Jacob *et al.*, 1998) a écrit une série d'articles qui propose un mécanisme de transfert du Zn entre la MT et des protéines.

Plusieurs chercheurs ont fait des revues de la littérature qui évoquent la corrélation entre l'augmentation de la tolérance des métaux et l'induction des MT (Webb, 1979; Roesijadi, 1981; Klaverkamp *et al.*, 1984). Afin de renforcer cette corrélation, d'autres auteurs ont démontré que l'amplification du gène de métallothionéine augmentait la tolérance des métaux (Hildebrand *et al.*, 1979; Beach *et al.*, 1981; Gick *et al.*, 1982). En 1985, Hamer (Hamer *et al.* 1985) a démontré que le retrait du gène de la MT dans les levures provoque l'élimination de la tolérance suivant une exposition normale au cuivre. Tous semblent reconnaître que la détoxification est la fonction primaire des MT (Templeton *et al.*, 1991).

Il existe cependant certains chercheurs qui prétendent que cette fonction de détoxification est probablement fortuite et qu'elle ne se reflète que par les similarités chimiques entre le Cd et le Zn (Bremner *et al.*, 1990; Kägi *et al.*, 1988).

Il devient donc nécessaire de connaître les autres rôles que peut jouer la MT du point de vue biologique afin de porter un meilleur jugement sur son rôle de marqueur de pollution métallique. Plusieurs articles décrivent ces autres rôles (Cousins, 1985 ; Engel *et al.*, 1984 ; Udom *et al.*, 1980; Churchill *et al.*, 1989; Brouwer *et al.*, 1991; Zeng *et al.*, 1991; Zeng *et al.* 1991a).

On remarque donc que la majorité des rôles attribués aux MT est reliée aux métaux. Cependant, des facteurs autres que les métaux peuvent également induire la synthèse des MT. Ces facteurs font en sorte que la fonction des MT ne se limite pas uniquement à celle de la détoxification des métaux lourds.

1.2.2.5. LES FACTEURS D'INDUCTION DE LA MT

Après une revue de la littérature, Kägi élabore une liste succincte des différents facteurs (incluant certaines hormones, antibiotiques et vitamines) pouvant induire la synthèse des MT (Kägi, 1991).

D'un point de vue purement environnemental, nous n'allons énoncer que les facteurs généraux qui régissent la synthèse de la MT. Nous devons considérer à la fois les facteurs provenant de « l'individu », nommés facteurs intrinsèques, et les facteurs provenant de son environnement, les facteurs extrinsèques (Engel *et al.*, 1987). Le Tableau I relève ces principaux facteurs intrinsèques et extrinsèques régissant la synthèse des MT. Les facteurs intrinsèques, placés dans un contexte d'évolution normale, sont inter-reliés et s'expliquent par le développement et l'évolution de l'individu, qui, à plus petite échelle, est l'évolution et le développement de la cellule. Lorsque cet organisme est placé dans un environnement, celui-ci exerce un stress sur l'individu. La synthèse des MT peut alors être provoquée aussi bien par le niveau de concentration des métaux toxiques disponibles (facteur étant lui-même régi par le pH) que par certains stress imposés tels que les infections, les inflammations, la famine, les stress physiques et bien d'autres.

Tableau I: Liste des principaux facteurs intrinsèques et extrinsèques régissant la synthèse des MT chez les organismes aquatiques. (Engel *et al.*, 1987)

Facteurs Intrinsèques	Facteurs Extrinsèques
Exigence de métal cellulaire	Concentration du métal
Concentration de métal cellulaire	Le pH
Cycle reproductif	Température
Développement et évolution	Salinité
Génétique	Cycle saisonnier (la mue)
	Stress imposé

Puisque tous ces facteurs peuvent engendrer la synthèse des MT, on peut se demander si la métallothionéine peut être utilisée comme marqueur de pollution envers les métaux lourds ?

I.2.3. LA MT : BIOMARQUEUR DE POLLUTION ENVIRONNEMENTALE ?

Plusieurs auteurs ont démontré que la MT répond à certains stress environnementaux dont la disponibilité et la toxicité des métaux. De plus, Engel (Engel *et al.*, 1996) et Schlenk (Schlenk, 1996) ont discuté de l'emploi de la MT comme biomarqueur et les précautions à prendre lors de l'interprétation des résultats obtenus. Benson (Benson *et al.*, 1992) et Huggett (Huggett *et al.*, 1992) s'accordent sur la définition globale d'un biomarqueur. Cependant, des précautions doivent être émises lors de l'utilisation de ces biomarqueurs pour une estimation des risques écologiques. En effet, Engel (Engel *et al.*, 1996) s'interroge sur l'évaluation d'un « indicateur » quant à son rôle de biomarqueur de risques écologiques :

- Est-ce que les mesures ou tests possèdent une sensibilité **et** une spécificité adéquates pour détecter les stressseurs d'intérêts (qu'ils soient chimiques ou physiques) ?
- Est-ce qu'une réponse positive permet d'établir une relation directe cause-à-effet ?
- Quelle est la reproductibilité des sources contrôlables, *i.e.* les techniques et manipulations, versus les sources incontrôlables, *i.e.* la variabilité du comportement des individus envers un stress donné ?
- Est-ce que les mesures du biomarqueur faites sur les individus peuvent refléter les effets subis par la population ou la communauté ?

En effet, les organismes peuvent répondre différemment lorsqu'ils sont soumis à des surdoses ponctuelles établies en laboratoire, ou à une exposition chronique sous-léthale (Engel *et al.*, 1996).

Engel et Vaughan ont illustré la relation qui existe entre le temps et le niveau d'impact des polluants sur les organismes (Figure 7). Il est alors probable que différents biomarqueurs soient requis pour déterminer les niveaux d'impact de contamination.

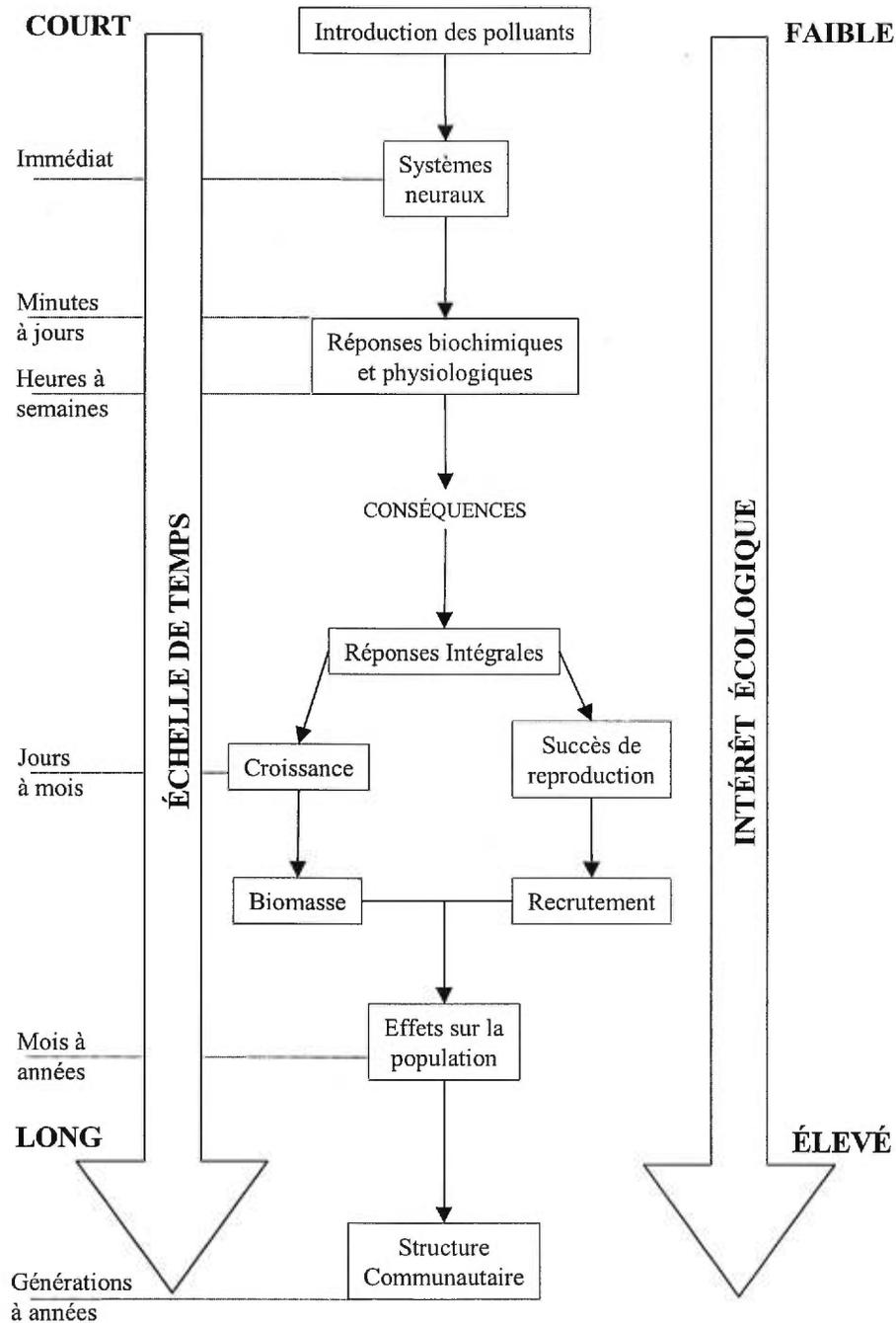


Figure 7: Schéma décrivant les corrélations existant entre le temps, les points d'impact des polluants et les intérêts écologiques. (tiré de Engel *et al.*, 1996).

Dans sa discussion sur l'emploi de la MT comme biomarqueur, Schlenk (Schlenk, 1996) insiste sur le fait que cette protéine est impliquée dans plusieurs fonctions endogènes au niveau de l'homéostasie des métaux essentiels et par surcroît, peut être également induite par des stress exogènes tels que les inflammations et les infections. Par conséquent, une augmentation de la quantité de MT ne signifie pas que l'organisme est exposé à une concentration importante des métaux lourds provenant de son environnement. Une attention particulière doit donc être prise lors de l'interprétation des résultats puisqu'il faudra juger si l'organisme s'adapte à son environnement ou s'il subit un stress exogène.

Enfin pour qu'un biomarqueur ait une signification, il faut que l'organisme puisse être représentatif et approprié de l'environnement étudié. Dallinger (Dallinger, 1994) définit le biomoniteur comme une espèce accumulant les éléments de trace dans ses tissus servant à contrôler la biodisponibilité des contaminants inclus dans l'écosystème. Il est donc préférable que l'espèce choisie possède une bonne distribution locale et régionale. De plus, l'indication de pollution sera d'autant plus exacte si l'organisme biomoniteur choisi se retrouve à la base de la chaîne alimentaire. Cependant, l'emploi d'organismes peu évolués limite la compréhension de la spécificité des isoformes envers les métaux lourds puisqu'ils diffèrent trop d'une espèce à l'autre, mais il existe certains mollusques dont la MT est classée «MT classe I» selon la répartition de Fowler (Fowler *et al.*, 1987).

I.3. SÉPARATION DES MT

Les MT ont été envisagées pour être utilisées comme marqueurs de contamination du cadmium. Des méthodes directes et indirectes ont été envisagées pour la quantification des MT dans les organes et les tissus biologiques. Les méthodes directes utilisent les déterminants antigéniques et comportent principalement les analyses immunologiques telles que le RIA¹ et l'ELISA². Ces techniques, très sensibles, ne permettent pas la spéciation des métaux et peuvent provoquer des réactions inter- et intraprotéinaires. Les méthodes indirectes quantifient les éléments des protéines ou les

¹ Immunoessai pratiqué sur des substances radio-étiquetées telles que des hormones ou des enzymes

² Immunoessai sensible utilisant des enzymes liées à des anticorps ou antigènes comme marqueur pour détecter une protéine spécifique. Méthode utilisée principalement pour dépister une exposition à un agent infectieux particulier en identifiant les anticorps présents dans un échantillon sanguin.

résultats de réactions chimiques. Ainsi, certaines méthodes indirectes quantifient l'intensité de la coloration des protéines ou des groupements thioliques alors que d'autres comptent la radioactivité émise par certains métaux (Hg, Cd et Ag) liés à la protéine. Toutefois, aucune de ces techniques ne permet d'identifier les isoformes de ces protéines. C'est pourquoi la chromatographie a été envisagée parce qu'elle permettait de préserver les liaisons et la structure de ces protéines.

I.3.1. POURQUOI EFFECTUER UNE SÉPARATION CHROMATOGRAPHIQUE?

Mais pourquoi procéder à la séparation des isoformes de la MT si la détermination du contenu métallique de ces protéines est envisagée ? Il est vrai qu'une simple quantification des métaux ne nécessite pas la séparation des isoformes de la MT. Cependant, des questions supplémentaires et complémentaires se posent :

- Pourquoi un organe peut-il synthétiser plusieurs isoformes de MT ?
- Est-ce que ces isoformes possèdent une certaine spécificité envers les métaux ?
- Est-ce que toutes les isoformes peuvent être utilisées comme biomarqueur de pollution ?
- Est-ce que la même isoforme peut être générée par plusieurs organes et a-t-elle le même rôle de détoxification ?

Pour répondre à toutes ces questions, la séparation des isoformes est requise. Des études sur les MT ont montré qu'un organe pouvait synthétiser plusieurs isoformes. En effet, des auteurs ont trouvé dans le foie humain six isoformes ou sous-isoformes de MT (Hunziker *et al.*, 1985).

Les prochaines sections porteront sur les différentes techniques de séparations utilisées sur les MT et relevées par la littérature. Nous verrons également les avantages et inconvénients de chacune d'entre elles.

I.3.2. LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

I.3.2.1. PERMÉATION DE GEL

La première chromatographie pratiquée sur les métallothionéines est la chromatographie par perméation de gel ou chromatographie d'exclusion (SE pour « Size Exclusion ») puisqu'elle sépare les molécules selon leur taille. Le réseau de pores, formé par les particules dont les dimensions sont variables, agit comme un labyrinthe qui permet la discrimination des molécules selon leur taille. Ainsi, une molécule de poids moléculaire élevé est moins retenue qu'une petite molécule.

Puisque nous envisageons l'analyse des métaux liés à la protéine, la liaison métal-MT doit être conservée. La préservation de ce lien nécessite que la solution d'élution ait un pH situé entre 7,0 et 8,6 et ceci peut poser problème puisque la plupart des colonnes sont faites d'un gel de silice qui peut être utilisé dans un domaine de pH allant de 2,5 à 7,5. Cependant, des colonnes d'exclusions en polymères sont accessibles et elles permettent de travailler dans un domaine de pH plus élevés (1 à 14).

Ce mode de séparation comporte certaines limites quant à l'efficacité de séparer les diverses isoformes des métallothionéines ayant des masses moléculaires similaires, mais est très utile pour la purification des MT car elle permet de les séparer des protéines cytosoliques.

I.3.2.2. ÉCHANGE D'IONS

Certains auteurs moins intéressés à la présence des métaux ont utilisé la chromatographie d'échange d'ions puisqu'elle permet de substituer le métal par un proton pour que la protéine devienne une apothionéine. Suzuki (Suzuki *et al.*, 1983) a utilisé une colonne échangeuse d'anions pour la séparation des isoformes et a pu démontrer que les MT-1 et MT-2 sont chargées différemment.

Ces séparations ne permettent pas de procéder à l'identification des métaux liés à la protéine et d'en connaître la distribution, puisque cette séparation s'effectue à des pH inférieur à 5 ou supérieur à 8,6 et dans ces conditions la liaison métal-thiolate n'est plus conservée.

I.3.2.3. CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE

Comme nous l'avons vu d'un point de vue toxicologique, la détermination et la répartition des métaux dans cette protéine peuvent donner des informations intéressantes, mais la liaison métal-thiolate doit être conservée. Ceci peut être envisagé en faisant de la chromatographie de partage. En effet, cette chromatographie repose sur les différences de solubilité des solutés entre le solvant constituant la phase mobile et la phase stationnaire. La solubilité du soluté envers les différentes phases est influencée à la fois par la nature des molécules (leur polarité) et par la longueur des chaînes de la phase stationnaire.

Puisque les isoformes de MT diffèrent entre elles par la composition en certains acides aminés, la séparation sera basée sur la polarité de ces protéines. Pour que cette séparation soit efficace, une phase stationnaire apolaire est envisagée pour augmenter l'affinité des isoformes avec cette phase.

Suzuki (Suzuki *et al.*, 1983) a étudié différentes longueurs de chaîne comme phase stationnaire afin de vérifier laquelle de ces longueurs de chaîne influence le plus l'efficacité de la séparation. Les colonnes étudiées comportent des greffons dont la longueur de la chaîne est d'un, de trois ou de huit carbones. Ce facteur devient important lorsque le support est de la silice et que certains groupements silanols (-Si-OH) restent accessibles. Leur accessibilité influence l'efficacité de la séparation puisque le nombre de sites actifs (SiOH) confère une polarité plus ou moins grande à la phase stationnaire. La présence de silanols peut induire une polarisation de la protéine sans déloger le métal qui lui est lié et ceci peut permettre d'améliorer la séparation des isoformes de la métallothionéine. Cependant, il est également possible que la présence de ces groupements silanols puisse modifier le rapport métal:protéine par la perte de métaux. Les métaux les plus sujets à être libérés seraient les métaux liés faiblement à la fonction thiolate tels que le zinc. Puisque l'un des objectifs de notre projet implique une quantification des métaux lourds liés à la MT, dont le zinc, cette situation est à éviter.

Il existe des phases stationnaires à support inerte de polymère qui permettent de préserver les liaisons métal : thiolate. La séparation des isoformes de la MT repose alors sur l'hydrophobicité et la nature de la surface de la phase stationnaire. Un soluté peu polaire ou apolaire tend à minimiser son contact avec le solvant polaire soit en migrant

vers une phase stationnaire non-polaire, soit par adsorption sur une surface non-polaire du support solide. Dans le cas qui nous concerne, comme les protéines sont peu polaires, nous avons choisi une colonne PRP-3 dont la phase stationnaire est composée d'une chaîne latérale à trois carbones. La séparation sera due principalement aux effets de solvants.

I.4. ANALYSE DES MÉTAUX

L'analyse des métaux dans les tissus biologiques, surtout les métaux toxiques, préoccupe les scientifiques depuis plusieurs années. Au début des années 60, les techniques qui ont été développées ne permettaient que l'analyse totale des métaux d'intérêt. L'extraction de ces métaux des tissus biologiques se faisait généralement par des digestions totales et les principales techniques analytiques de détermination des métaux étaient l'absorption et l'émission à la flamme. Ces techniques sont relativement simples, mais de nombreux problèmes dus aux effets de matrices nous empêchent d'atteindre des limites de détections acceptables. De plus, la plupart de ces instruments ne peuvent fonctionner qu'en mode d'analyse monoélémentaire. Une technique qui permet l'élimination de certains effets de matrice et qui donne la possibilité d'une analyse multi-élémentaire tout en permettant une bonne limite de détection est donc souhaitable. L'introduction du plasma induit par haute fréquence (ICP), au début des années 70, comme source d'atomisation et d'excitation pour l'émission atomique a redonné un élan considérable à l'analyse élémentaire. Dans les sections qui suivent, nous verrons le principe de fonctionnement du plasma ainsi que les avantages qu'apporte cette source.

I.4.1. PLASMA INDUIT PAR HAUTE-FRÉQUENCE (ICP)

Le plasma induit par haute-fréquence (ICP = Inductively coupled plasma) est intéressant puisqu'il atteint des températures plus élevées que la flamme. Ainsi, le plasma ICP permet d'atténuer des effets de matrice. Ce plasma est produit par l'induction magnétique produite par un courant alternatif à haute fréquence (27 ou 40 MHz) passant dans une bobine d'induction. Le passage d'un gaz comme l'argon, dans le champ magnétique en présence d'électrons, induit des courants de Foucault. Ces courants contribuent à augmenter la température et propager l'ionisation du gaz. Par collisions entre les espèces chargées (Ar^+ et e^-) et les atomes neutres (Ar), l'ionisation se propage et

permet au plasma de s'entretenir (Greenfield *et al.*, 1992). La Figure 8 représente un plasma inductif. La torche, située à l'intérieur de la bobine d'induction, est composée de trois tubes concentriques en quartz dans lesquels circulent trois courants de gaz : le gaz plasmagène (≈ 15 L/min), le gaz auxiliaire (≈ 1 L/min) et le gaz nébuliseur et porteur (≈ 1 L/min). Le gaz plasmagène sert à entretenir le plasma tout en l'isolant thermiquement des parois de quartz de la torche. Ce gaz circule entre le tube externe et le tube interne de la torche. Le gaz auxiliaire permet d'ajuster la position du plasma dans la bobine d'induction. Ce dernier circule dans le tube interne de la torche. Enfin, le gaz nébuliseur et porteur, qui circule dans le tube injecteur, entraîne l'aérosol dans le centre du plasma.

La Figure 8b illustre les régions du plasma où s'effectuent les différentes réactions. Tous les processus d'atomisation, d'excitation et/ou d'ionisation dans le plasma ont lieu dans le canal central. Cette zone se trouve entourée par de l'argon, gaz inerte qui permet de garder une certaine inertie chimique du milieu. La température macroscopique d'un plasma d'argon varie entre 6 000 et 10 000 K. Cette température permet une excitation efficace de la plupart des éléments. D'un point de vue énergétique, l'argon possède également une énergie d'ionisation suffisante (15 eV) pour permettre à la majorité des éléments d'atteindre un degré d'ionisation supérieur à 90%. Par conséquent, le couplage d'un spectromètre de masse avec le plasma ICP pour l'analyse élémentaire est accessible. Le degré d'ionisation d'un élément peut être déterminé d'après l'équation de Saha (Moore, 1989) :

$$\alpha = \frac{[M^+]}{[M^+] + [M^0]} = \frac{1}{n_e} \cdot \left(\frac{2\pi m_e kT}{h^2} \right)^{\frac{3}{2}} \cdot \frac{Q^+}{Q^0} \cdot e^{-\left(\frac{PI}{kT}\right)} \quad [1]$$

où $[M^+]$ et $[M^0]$ sont respectivement les concentrations des ions et des atomes de l'analyte; n_e , la densité électronique; m_e , la masse d'un électron; k , la constante de Boltzmann; T , la température; h , la constante de Planck; Q^+ et Q^0 , les fonctions de partition de l'ion et de l'atome neutre, et PI , le potentiel d'ionisation de l'élément.

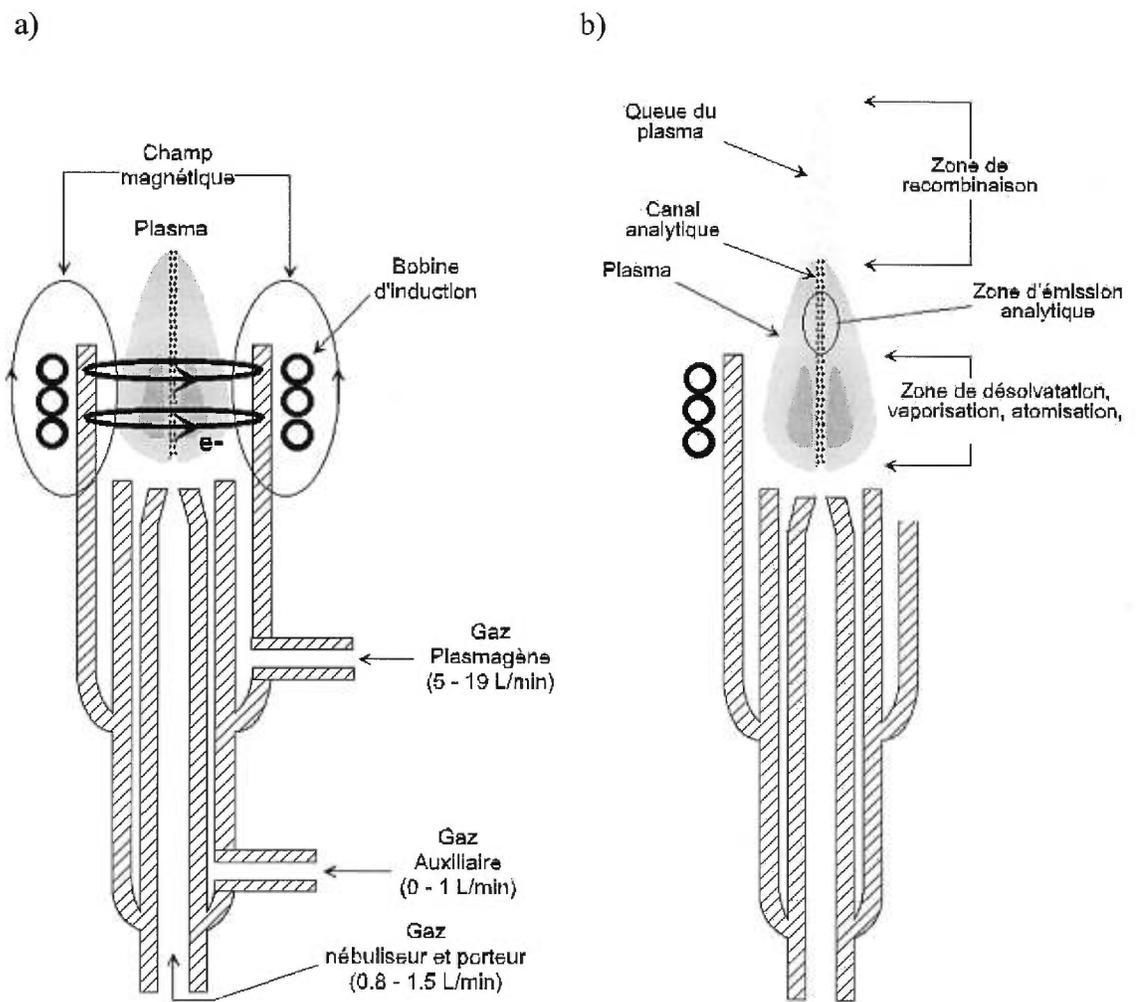


Figure 8: Schéma d'un plasma induit par haute-fréquence; a) formation du plasma et b) description du plasma.

I.4.2. DÉTECTEURS POUR LA SPECTROMÉTRIE À PLASMA ICP

I.4.2.1. SPECTROMÈTRE D'ÉMISSION ATOMIQUE

La détection par spectrométrie d'émission atomique nécessite l'excitation de l'analyte à l'état atomique ou ionique. À la suite de l'excitation, les atomes (ou ions) retournent vers un état électronique de plus faible énergie en émettant des photons à des longueurs d'onde qui sont propres à chaque élément. Les photons émis entrent dans un système dispersif qui sépare les différentes longueurs d'ondes. Par ailleurs, certains éléments peuvent émettre aux mêmes longueurs d'ondes ou à des longueurs d'onde très proches. Dans ce cas, lorsque le système dispersif ne possède pas la résolution nécessaire pour séparer ces longueurs d'ondes, nous sommes en présence d'interférences spectrales. Différents systèmes dispersifs existent pour procéder à la séparation des longueurs d'onde et la dispersion se fait généralement par des réseaux de diffraction. Le montage du système dispersif définit le type de spectromètre. Il existe deux types de spectromètres : le monochromateur (spectromètre séquentiel), et le polychromateur (spectromètre simultané). Chacun de ces deux types de spectromètres possède des avantages et des inconvénients. Nous les verrons en détails dans les prochains paragraphes.

I.4.2.1.1. Les spectromètres séquentiels

Les spectromètres séquentiels sont généralement montés suivant la configuration de Czerny-Turner (Figure 9). À chaque instant, une seule longueur d'onde arrive au détecteur, un photomultiplicateur (PMT). Le balayage des longueurs d'ondes est effectué par rotation du réseau. Cette configuration offre certains avantages dont la possibilité de déterminer la présence des différents éléments de notre échantillon en balayant l'ensemble de la région spectrale allant de l'UV au visible (200 à 700 nm). Par conséquent, le choix des longueurs d'onde et des éléments à analyser n'est pas limité à des choix prédéterminés. De plus, ce type de spectromètre nous offre la possibilité de faire la correction du signal de fond. Les inconvénients de ce type de spectromètre sont la lenteur du système pour une analyse multi-élémentaire et ce système n'est pas très performant pour la détection d'un signal transitoire en fonction du temps, comme c'est le cas en chromatographie. Pour de tels signaux, seul un polychromateur s'avère adéquat.

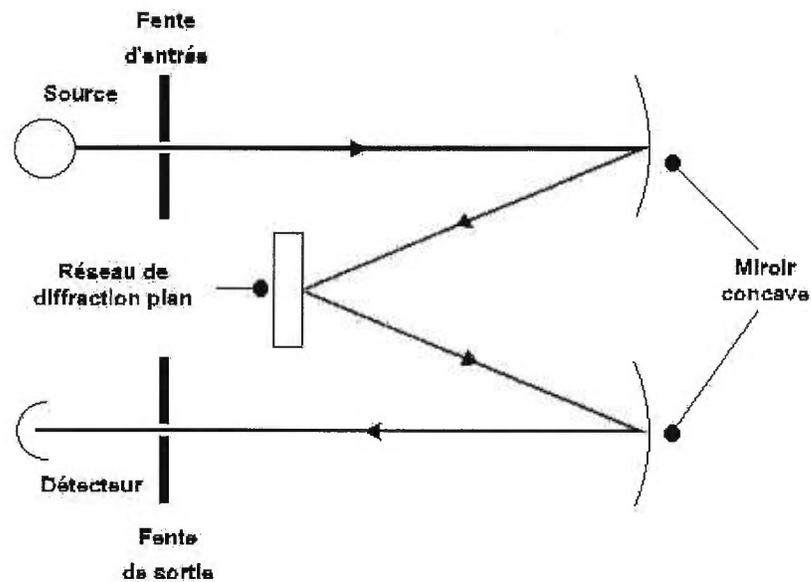


Figure 9: Diagramme d'un parcours optique de configuration Czerny-Turner

I.4.2.1.2. Les spectromètres simultanés

Ces spectromètres permettent d'observer différentes longueurs d'ondes en simultané. Ils sont donc mieux adaptés pour étudier les signaux transitoires. Plusieurs configurations existent, les plus classiques sont des polychromateurs qui utilisent un réseau de diffraction concave fixe. Cette configuration n'offre cependant pas la possibilité du choix des éléments et des longueurs d'ondes avant l'analyse et ces choix doivent être déterminés au moment de l'achat de l'instrument. De plus, comme aucun déplacement du réseau ne peut être envisagé, il n'est pas possible d'effectuer facilement la correction du signal de fond.

La seconde configuration, plus récente, est celle du spectromètre à échelle (Figure 10) qui est composé d'un réseau à échelle et d'un prisme. Contrairement au réseau de diffraction classique, le réseau à échelle possède une faible densité de traits (≈ 100 traits/mm). La détection se fait à des ordres de diffraction élevés, typiquement entre 50 et 150. Par conséquent, le problème de recouvrement des ordres devient important. L'utilisation d'un prisme comme séparateur des ordres, de façon à ce que sa

dispersion soit perpendiculaire à la dispersion du réseau, permet d'obtenir un spectre à deux dimensions dans le plan focal du spectromètre. La résolution de cette configuration peut atteindre 0,1 nm/mm. Cependant, dû à l'espace physique restreint, seulement 20

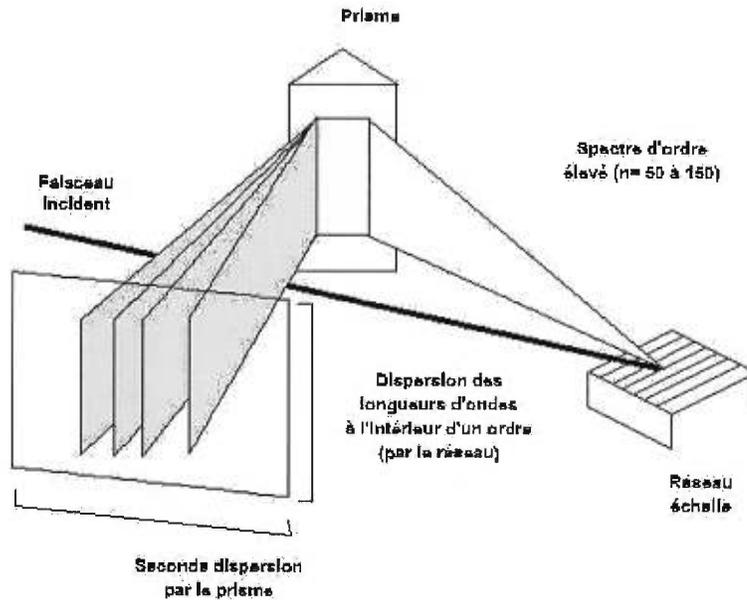


Figure 10: Schéma d'un spectromètre échelle qui permet de séparer les ordres et les longueurs d'ondes.

détecteurs PMT peuvent y être placés. Un détecteur à transfert de charge s'adapte mieux à ce type de spectromètre. En effet, un détecteur par injection de charge, (CID : Charge Injection Device) dont la surface est environ 2,0 x 2,0 cm, peut couvrir un domaine spectral UV-Vis allant de 165 à 800 nm. Il est composé d'une matrice de 512 x 512 pixels où chacun des pixels est un détecteur indépendant. Il devient donc possible de lire tous les pixels ou les pixels désirés seulement. Chaque pixel du CID est composé d'une porte de collection qui amasse les charges lors de l'acquisition, et d'une porte sensorielle où s'effectue la lecture des charges. Cette conception permet que les charges une fois la lecture réalisée, soient effacées ou retournées à la porte sensorielle. Par conséquent, l'augmentation de la dynamique est due à la lecture non-destructive des charges contenues dans les pixels. La gamme dynamique des CID se rapproche de celle des PMTs. Ces avantages font que le détecteur CID offre une liberté dans le choix des

longueurs d'onde d'analyse. Cependant, le bruit élevé de lecture d'un tel système de détection s'avère être la limitation principale puisqu'il peut diminuer les limites de détection de nos éléments.

1.4.2.2. SPECTROMÈTRE DE MASSE

Puisque la source d'ionisation ICP permet à la majorité des éléments d'obtenir un degré d'ionisation supérieur à 90%, le spectromètre de masse peut être utilisé comme détecteur. Le couplage entre un ICP et un spectromètre de masse est illustré à la Figure 11.

Les ions sont prélevés de la région analytique à l'aide d'un cône échantillonneur dont le diamètre de l'orifice est de 1,0 à 1,2 mm. Un cône écrémeur, dont l'orifice est de 0,5 mm de diamètre, est placé à l'arrière du cône échantillonneur. Ces deux cônes forment une chambre d'expansion qui sert de région intermédiaire entre le système à pression atmosphérique, le plasma ICP, et le système à basse pression (5×10^{-3} bar), le filtre de masse. La faible pression de cette chambre d'expansion provoque une chute rapide de la température. Les ions extraits passent par le cône écrémeur et entrent dans une seconde chambre à plus faible pression ($1,3 \times 10^{-6}$ bar). Cette chambre comprend un ensemble de lentilles qui focalisent les ions selon une trajectoire annulaire pour qu'ils puissent entrer dans le filtre de masse quadripolaire. Ce système de lentilles comprend un bloqueur de photons pour éviter que ceux-ci contribuent à l'augmentation du signal de fond (Date *et al.*, 1989).

Le quadripôle est composé de quatre électrodes reliées électriquement deux par deux. Le voltage appliqué sur ces électrodes, dont chaque paire a un signe opposé, est une combinaison d'un courant continu et d'une tension à haute-fréquence. Les ions qui entrent dans ce filtre sont soumis à une différence de potentiel qui influence leur trajectoire (Figure 12). La fréquence de changement du potentiel des tiges amène les ions à osciller sur les deux axes. À chaque amplitude de courant (ou voltage), les ions d'un seul rapport masse/charge (m/z) traversent le champ quadripolaire sans en heurter les parois. La vitesse de balayage du potentiel est assez rapide pour obtenir des spectres de masse en quasi simultanés.

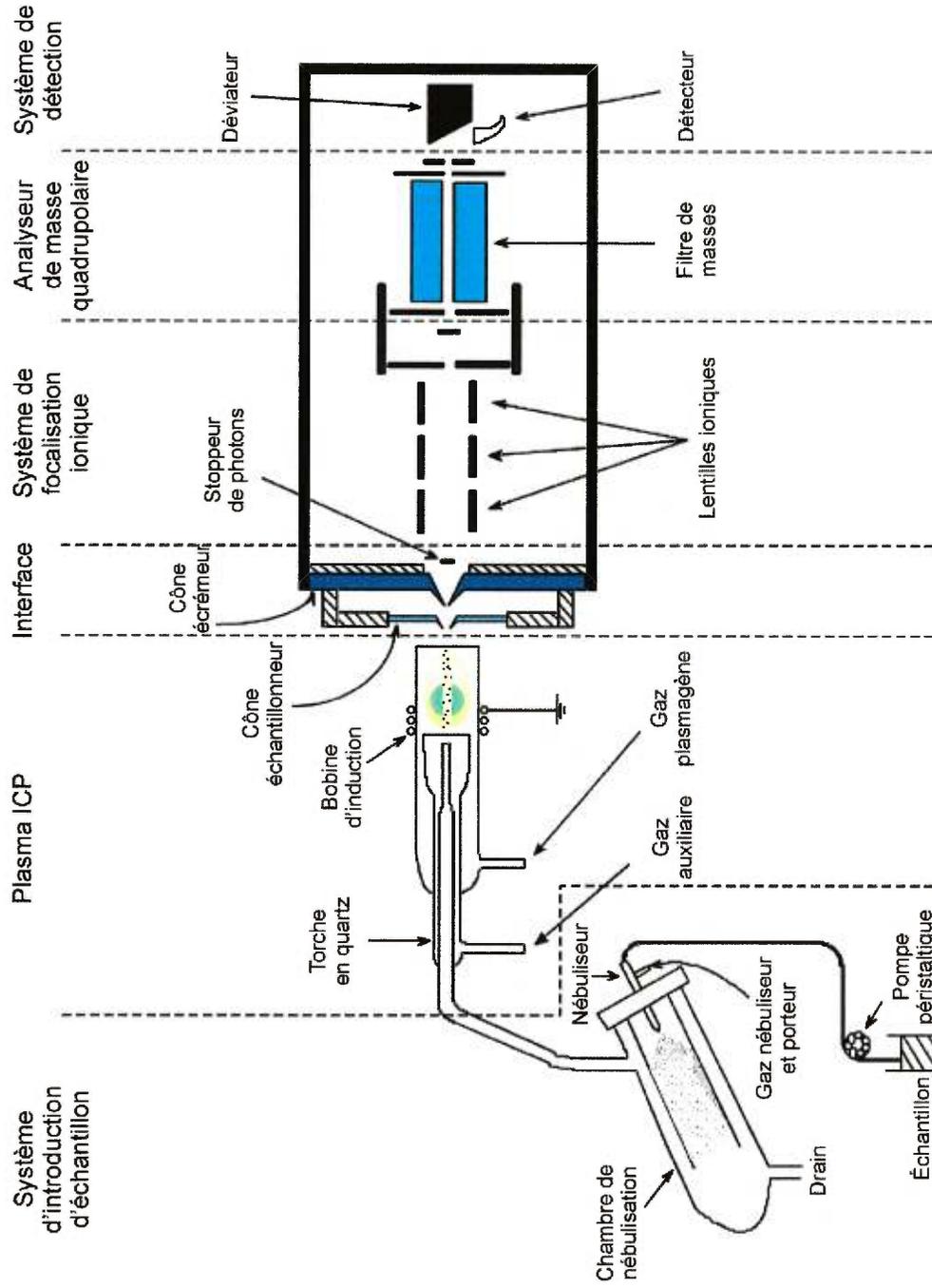


Figure 11: Schéma illustrant les composantes principales d'un plasma induit par haute fréquence couplé à un spectromètre de masse.

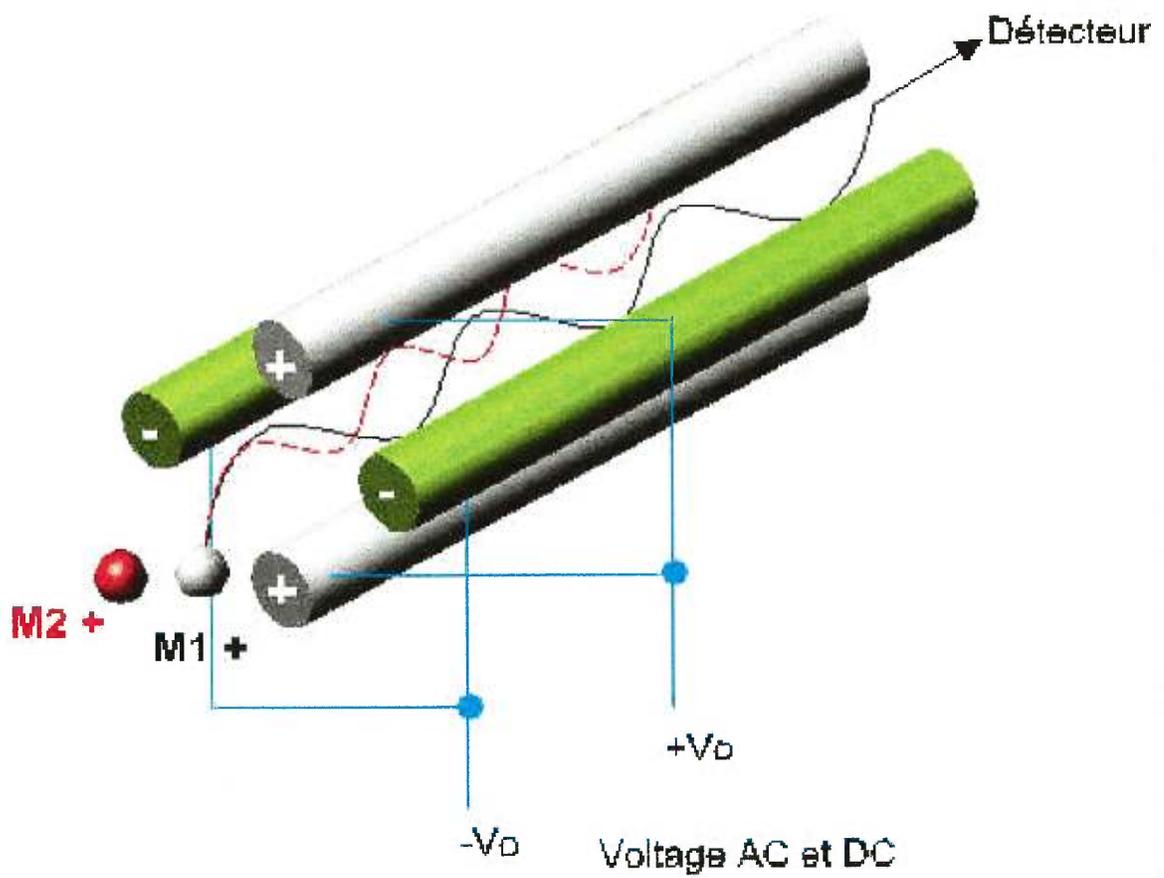


Figure 12: Représentation schématique d'un quadripôle.

I.4.2.2.1. Avantages et inconvénients

Le principal avantage de cette technique est sa sensibilité élevée et la possibilité d'offrir une détection quasi simultanée. En effet, cette «simultanéité» est obtenue par un balayage rapide des masses. Le temps d'intégration sur chaque masse peut être déterminé par l'utilisateur et permet ainsi d'accroître le nombre de balayages effectués. Ceci aura pour effet d'améliorer le rapport du signal sur le bruit du signal de fond (S/B) et ainsi augmenter la sensibilité.

Le principal inconvénient est le coût d'entretien et la stabilité qu'offre cette technique. En effet, les produits organiques influencent directement l'efficacité d'ionisation des métaux ou des éléments analysés. Par conséquent, pour qu'un élément soit détecté, il faut que ce dernier soit ionisé. Cette technique de détection nécessite donc qu'une partie de l'énergie soit consacrée à l'ionisation de notre analyte. Si la matrice est complexe, des interférences peuvent être présentes.

I.4.2.2.2. Interférences en ICP-MS

Il existe différentes interférences en spectroscopie de masse à plasma inductif. Parmi celles-ci, on compte principalement les interférences physiques et les interférences spectroscopiques. En général, les interférences de type chimique sont peu fréquentes puisque le plasma est une source très énergétique permettant une ionisation efficace des éléments, et parce que son milieu est chimiquement inerte.

I.4.2.2.2.1. Interférences spectroscopiques

Le spectre de masse est généralement simple. Cependant, une matrice complexe peut rendre l'interprétation des spectres de masse erronée et causer une mauvaise quantification.

Les interférences spectroscopiques rencontrées en spectrométrie de masse sont généralement des interférences isobariques. Ces interférences proviennent de la présence d'un isotope naturel stable d'un autre élément ayant la même masse nominale que l'élément d'intérêt (ex. : $^{114}\text{Cd}^+$ et $^{114}\text{Sn}^+$, $^{64}\text{Zn}^+$ et $^{64}\text{Ni}^+$). Le choix de l'isotope de l'analyse est alors important. En plus de prendre en considération l'abondance de

l'isotope, on doit porter une attention particulière sur les interférences isobariques possibles. Toutefois, comme la plupart des éléments possèdent au moins un isotope libre d'interférence, les interférences isobariques peuvent être corrigées en tenant compte des abondances isotopiques naturelles des éléments qui subissent l'interférence. Ce type d'interférence n'est pas un problème majeur en spectrométrie de masse.

En plus des interférences isobariques, il existe des interférences dues à la charge de l'ion. En effet, certains éléments possèdent un potentiel de seconde ionisation assez faible (ex. : Ce, 10,85 eV; Ba, 10,00 eV). Puisque que le filtre quadripolaire sépare les masses selon le rapport m/z , ces ions doublement chargés peuvent apparaître au même rapport que les éléments simplement chargés (ex. : $^{136}\text{Ce}^{2+}$ et $^{136}\text{Ba}^{2+}$ répondent au $^{68}\text{Zn}^+$). Ce type d'interférence se corrige plus difficilement mais est plus rare (Horlick *et al.*, 1992).

Les interférences spectroscopiques peuvent être également causées par les ions polyatomiques. Malgré la température élevée du plasma, certaines espèces moléculaires sont assez stables pour résister à la dissociation. Toutes les espèces présentes dans la matrice peuvent contribuer à la formation de différentes espèces polyatomiques. Les principales espèces polyatomiques sont les ions monoxydes, MO^+ et les ions hydroxydes, MOH^+ . Ces ions moléculaires ne peuvent être éliminés puisqu'ils proviennent d'une réaction de recombinaison entre l'analyte « M », l'oxygène et l'hydroxyde provenant du solvant dans le cas de l'eau. De plus, la présence d'eau, d'air et d'argon (gaz plasmagène) entraîne la formation des espèces suivantes : O^+ , OH^+ , H_2O^+ , N_2^+ , ArH^+ , ArO^+ , Ar^{2+} , ArN^+ et Ar_2^+ . La présence de solvant organique peut former des ions polyatomiques supplémentaires du type ArCO^+ et des fragments ou amas à base de carbone, variant selon la matrice et l'échantillon analysé. Puisque la majorité des éléments est poly-isotopique, le spectre de masse peut devenir rapidement plus complexe. L'interprétation devient alors très difficile (Horlick *et al.*, 1992). La chromatographie liquide utilise généralement des éluants dont les proportions en solvants organiques sont importantes. Si la chromatographie est en mode gradient, ces interférences polyatomiques deviennent encore plus difficiles à contrôler. Il devient donc nécessaire de les diminuer ou de les éliminer avant qu'elles entrent dans le plasma. Un choix judicieux de l'interface peut atténuer ces effets (section I.5.1).

I.4.2.2.2. Interférences physiques

Une interférence physique peut provenir de tous les facteurs qui influencent le transfert de l'échantillon du plasma au spectromètre de masse. Le cône échantillonneur illustré à la Figure 11 est la principale source d'interférences physiques. Une matrice fortement chargée en produits organiques ou en sels dissous peut amener un dépôt qui bloque graduellement l'orifice du cône échantillonneur. Ce blocage amène une diminution importante du signal. Différentes méthodes existent pour corriger ou minimiser ces interférences physiques : i) l'utilisation d'un étalon interne et, ii) la diminution de la quantité d'aérosol introduite dans le cône. Si un étalon interne est envisagé, certains critères doivent être considérés; citons l'absence de celui-ci dans notre échantillon, l'inertie chimique et spectrale envers notre analyte, et, une sensibilité et une masse similaire à notre élément d'intérêt. Pour diminuer la quantité d'échantillon qui se rend au cône échantillonneur, on peut : i) diluer l'échantillon, ii) diminuer le débit du gaz porteur ou nébuliseur et iii) introduire une plus faible quantité d'échantillon.

D'autres interférences physiques sont causées par la variation de la viscosité, de la densité et de la tension superficielle du liquide porteur. Ces propriétés jouent un rôle déterminant lors de la formation de l'aérosol (section I.5.1).

Le couplage d'un chromatographe liquide (HPLC = High performance liquid chromatography) à un ICP-MS peut amener des interférences physiques. La présence de solvant organique peut entraîner une suppression du signal analytique. Souvent les gouttelettes de solvant organique possèdent une volatilité très élevée et lorsque ces gouttelettes entrent dans le plasma, elles subissent une désolvation rapide qui peut induire un refroidissement local dans le plasma autour de la gouttelette. Ce refroidissement diminue l'énergie disponible permettant la volatilité, l'atomisation et enfin l'ionisation des espèces contenant l'analyte. De plus si cette quantité de solvant organique varie avec le temps, son élimination devient nécessaire sinon les spectres varieront tout au long de l'analyse. L'interface entre le HPLC et le ICP-MS devrait permettre l'élimination ou la minimisation de cet effet.

I.5. COUPLAGE HPLC/ICP

Comme nous l'avons mentionné antérieurement, la toxicité des métaux ne dépend pas uniquement du métal mais aussi de la forme sous laquelle il se présente et les études toxicologiques devront disposer d'une méthode d'analyse qui est capable de différencier les différentes formes chimiques. Par conséquent, il est important de préserver la forme et le degré d'oxydation des métaux durant tout le traitement de l'échantillon avant la quantification de l'espèce recherchée. Une des approches pour réaliser ce type d'analyses est le couplage entre des systèmes de séparation tels que la chromatographie liquide, et des systèmes d'analyse élémentaire tels que ICP-AES ou ICP-MS.

Le système d'introduction de liquide dans le plasma ICP consiste en un nébuliseur et une chambre de nébulisation. Chaque nébuliseur et/ou chambre de nébulisation a des caractéristiques différentes. Il est important, lors du couplage entre le HPLC et le plasma ICP, de choisir un système d'introduction d'échantillon dans le plasma dont les conditions d'opération sont compatibles avec celles de la chromatographie. De plus, dans la mesure du possible, ce couplage doit préserver la qualité de la séparation des pics chromatographiques. La perte de la résolution limite les informations toxicologiques qui peuvent en être déduites. Par ailleurs, si l'efficacité de transport de l'analyte à la sortie de la colonne chromatographique au plasma est maximisée, la limite de détection sera améliorée.

I.5.1. LES NÉBULISEURS

La nébulisation permet de transformer une solution en un fin aérosol qui peut être transporté vers le plasma. Un aérosol est caractérisé par la grosseur moyenne des gouttelettes ainsi que la distribution en taille de celles-ci. Un aérosol idéal aura des gouttelettes d'un diamètre approprié à la source d'excitation utilisée, une distribution serrée des tailles et un transport où la totalité des gouttelettes formées peut atteindre le plasma. Afin de permettre une bonne désolvation, le diamètre des gouttelettes doit être inférieur à 10 μm et varier préférentiellement entre 1 et 2 μm . En effet, la précision analytique d'un système ICP est fortement dépendante du contrôle exercé sur la dimension des gouttelettes. Tout changement significatif, autant dans la dimension des

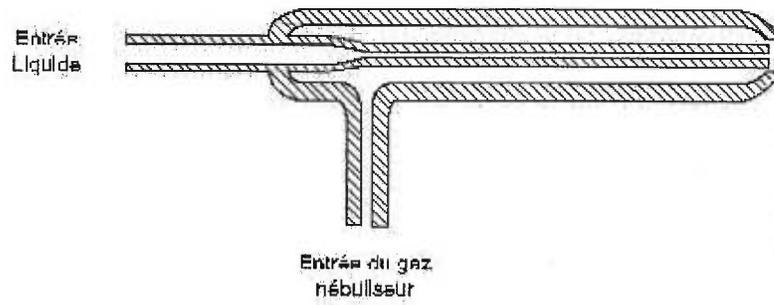
gouttelettes que dans la quantité des gouttelettes qui atteignent le plasma, influencera la précision et l'exactitude du système ICP.

Nous allons voir dans les sections suivantes les nébuliseurs les plus utilisés ainsi que ceux qui ont été envisagés pour le couplage HPLC/ICP. Chacun d'entre eux possède des avantages et des inconvénients qui limitent leur efficacité en tant qu'interface. Les principaux facteurs sont l'efficacité de transport et la grosseur des particules. De plus, certains nébuliseurs nécessitent des accessoires supplémentaires qui peuvent influencer la qualité de la séparation.

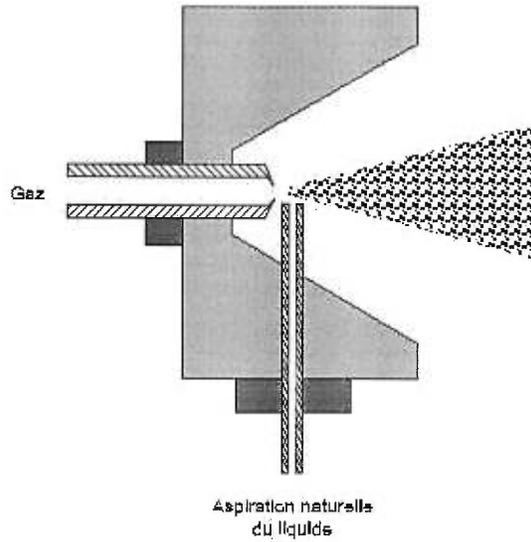
1.5.1.1. NÉBULISEURS PNEUMATIQUES

Les nébuliseurs pneumatiques sont les plus communs et les plus faciles d'utilisation. Ces nébuliseurs comptent trois classes : les nébuliseurs pneumatiques concentriques de type Meinhard, les pneumatiques à flots croisés et les nébuliseurs à haute teneur en solide de type Babington. La Figure 13 illustre ces trois classes de nébuliseurs pneumatiques. Pour les nébuliseurs pneumatiques, le liquide est aspiré par le capillaire suite à la formation d'une pression différentielle produite par un courant de gaz à très grande vitesse passant à proximité du capillaire. Dans le cas des nébuliseurs pneumatiques concentriques, le jet de gaz circule dans une ouverture qui entoure de façon concentrique le tube capillaire, tandis que pour les nébuliseurs pneumatiques à flots croisés, le capillaire est à un angle droit avec la sortie du jet gazeux. Le débit d'aspiration liquide varie entre 1 et 7 mL/min. Ces débits s'avèrent intéressants puisqu'ils sont compatibles avec les débits utilisés en HPLC. Lorsque le liquide entre en contact avec le jet gazeux, le liquide se fragmente formant ainsi un aérosol primaire dont le diamètre moyen des gouttelettes est d'environ 20 μm . La large distribution (diamètre variant entre 1 et 50 μm) est le principal inconvénient rencontré pour ces nébuliseurs. En effet, seules les plus fines gouttelettes se rendent au plasma, ce qui représente entre 2% et 3% du volume nébulisé. Pour un nébuliseur pneumatique concentrique, le diamètre des gouttelettes de l'aérosol primaire est fonction des propriétés physiques de la solution échantillon et peut s'estimer à l'aide d'une équation empirique:

A)



B)



C)

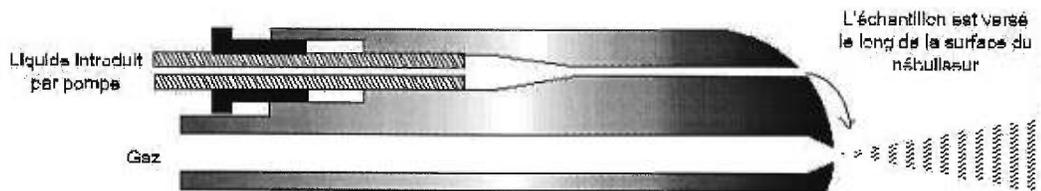


Figure 13: Schématisation de différentes configurations de nébuliseurs pneumatiques; A) concentrique (Meinhard), B) à flot croisé, C) nébuliseur à haute teneur en solides.

$$d_s = \frac{A \left(\frac{\gamma}{\rho} \right)^{0.5}}{\nu} + B \left[\frac{\eta}{(\gamma\rho)^{0.5}} \right]^{0.45} \cdot \left[\frac{Q_l}{Q_g} \right]^{1.5} \quad [2]$$

où d_s est le diamètre moyen des gouttelettes (diamètre de Sauter); ν , la différence de vitesse entre le gaz et le liquide; γ , la tension de surface du liquide; ρ , la densité du liquide; η , la viscosité du liquide; Q_l et Q_g , les débits du liquide et du gaz respectivement; A et B , les constantes qui dépendent des unités choisies.

Toutefois, le nébuliseur pneumatique concentrique ne tolère qu'une très faible teneur en sels dissous dans la solution. Cette concentration doit être inférieure à 2% (p/v) pour ne pas boucher le capillaire. Pour les nébuliseurs pneumatiques à flots croisés, la tolérance envers les sels dissous est légèrement supérieure, soit environ 6% (p/v).

Il existe des nébuliseurs à haute teneur en solides, dans ces systèmes le liquide s'écoule le long d'une rainure en « V » située à la surface du nébuliseur et dans laquelle une sortie de gaz permet de générer l'aérosol. Dans ce type de nébuliseur, le débit de liquide est assuré par une pompe. Le débit typique utilisé est de 1,0 mL/min. Comme le diamètre du capillaire conduisant le liquide est plus grand que celui des nébuliseurs pneumatiques concentriques et nébuliseurs pneumatiques à flots croisés, ce nébuliseur tolère les liquides à haute teneur en sels dissous. Cependant, l'aérosol formé est constitué de particules liquides dont les dimensions sont très variables et excèdent le diamètre moyen de 20 μm de sorte que les étapes de désolvatation, de volatilisation, d'atomisation et d'ionisation ne sont plus aussi efficaces. Des pertes de sensibilité, de précision et d'exactitude, de même que des effets interférents seront observés.

Les trois types de nébuliseurs pneumatiques mentionnés ci-dessus nécessitent l'utilisation d'une chambre de nébulisation pour discriminer les gouttelettes suivant leur diamètre. Les caractéristiques des chambres, ainsi que leur design, sont discutés plus loin (section I.5.2).

I.5.1.2. NÉBULISEUR À INJECTION TOTALE

Le nébuliseur à injection totale (DIN = Direct Insertion Nebuliser) est une technique d'introduction qui permet à la totalité de l'échantillon de pénétrer dans le plasma (Figure 14a). Son fonctionnement est similaire à celui d'un nébuliseur pneumatique concentrique. Un capillaire de 50 μm de diamètre traverse un tube nébuliseur. Un gaz à haute vitesse pénètre dans le tube nébuliseur qui, avec la présence du capillaire, se comprime puis subit une détente supersonique (Figure 14b). Cette détente fragmente les gouttelettes qui sortent du capillaire. Le panache de l'aérosol est plus étroit que celui formé par les nébuliseurs pneumatiques conventionnels. L'aérosol entre directement dans le plasma où il subit la désolvatation, la vaporisation, l'atomisation, l'ionisation et/ou l'excitation.

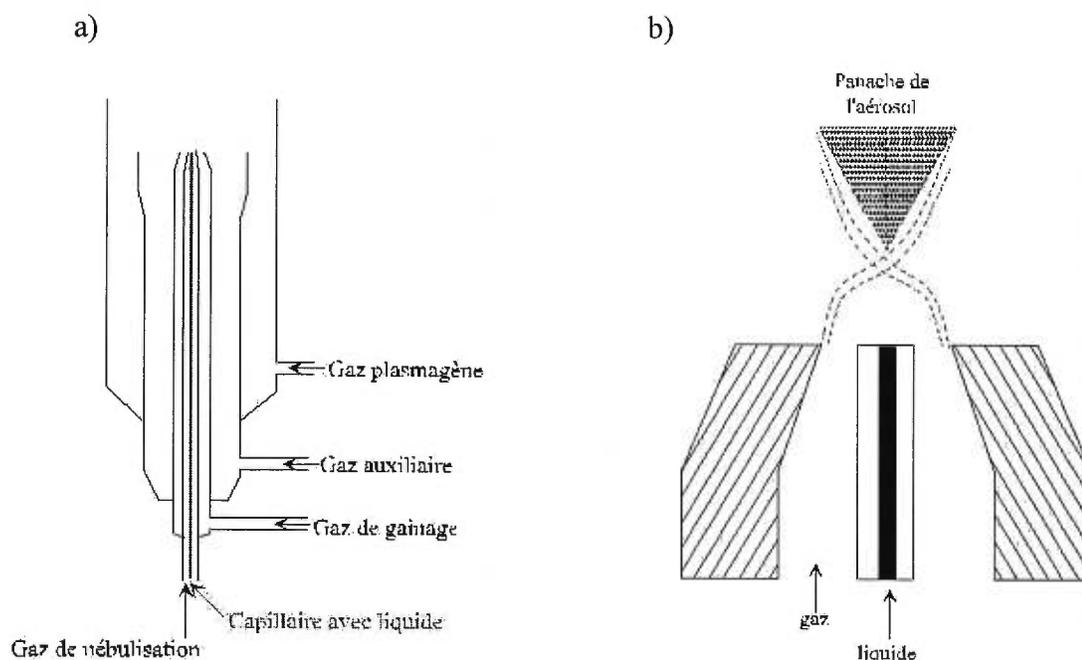


Figure 14: Schéma d'un nébuliseur à injection totale (a) et de son panache (b).

Le principal avantage de cette technique d'introduction est l'absence de chambre de nébulisation qui peut affecter la qualité de la séparation lors d'une chromatographie ou qui peut causer des effets mémoires. Cette technique permet également d'obtenir une

limite de détection accrue puisque la totalité de l'échantillon se rend au plasma. Pour une pression de gaz d'environ 2,2 bar, le débit liquide est d'environ 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. La population des gouttelettes de diamètre de 1-2 μm est plus importante (équation de Sauter p.39). Par conséquent, la désolvation est plus facile et nécessite moins d'énergie. L'énergie disponible permet alors à une plus grande quantité d'analyte d'atteindre l'étape déterminante pour la détection. Cependant, le débit envisagé par la chromatographie de partage est souvent supérieur aux débits de liquide utilisés avec ce type de nébuliseur; les gouttelettes alors formées ont un diamètre plus grand. Elles demandent donc plus d'énergie pour procéder à la désolvation. De plus, lorsque des solvants organiques sont utilisés et que leur présence est trop importante, le plasma devient instable. Cette instabilité peut s'observer par une fluctuation du signal.

1.5.1.3. INJECTION DE MICROPARTICULES SÉCHÉES MONODISPERSÉES

Le principe de l'injection de microparticules séchées monodispersées (MDMI = Monodispersed Dried Microparticulate Injection) repose sur la formation de gouttelettes à fréquence régulière générées par un cristal piézo-électrique. Les principaux auteurs de cette nouvelle technologie sont French (French *et al.*, 1994) et Olesik (Hobbs *et al.*, 1993; Olesik *et al.*, 1995; Dziewatkoski *et al.*, 1996; Olesik *et al.*, 1996). Comme son nom l'indique, ce système de génération de gouttelettes est utilisé en combinaison avec un système de désolvation. En effet, on introduit un gaz laminaire chauffé aux environs de 500°C pour désolvater les gouttelettes afin que l'énergie disponible du plasma ne serve qu'à la volatilisation, l'atomisation, l'excitation ou l'ionisation. Par conséquent, la sensibilité est améliorée. De plus, le MDMI génère des gouttelettes de même diamètre (50 μm) à une fréquence régulière, ce qui diminue les fluctuations temporelles et, par conséquent, améliore la reproductibilité. L'autre point intéressant de cette méthode d'introduction d'échantillon est l'efficacité de transport. En effet, cette technique permet presque à la totalité de l'échantillon d'atteindre le plasma, ce qui améliore la sensibilité de la technique.

Bien que ces avantages soient très intéressants, les inconvénients de ce mode d'introduction sont importants. En effet, ce système est limité par l'emploi d'un débit maximal de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ soit un facteur 10 fois inférieur au débit minimal utilisé en HPLC.

Le coût d'achat pour le système de base est élevé (environ 5 000\$). De plus, cette technique, qui demande beaucoup d'entretien, est difficile à maintenir en fonction. En effet, son alignement est fastidieux mais à la fois capital. Cet alignement influence le transport des gouttelettes. Puisque le montage typique entre un plasma inductif et un spectromètre de masse suit une visée axiale, la trajectoire des gouttelettes est influencée par la gravité. Celle-ci engendre une variation de la trajectoire qui permet aux gouttelettes d'entrer en collision avec les parois de la torche.

I.5.1.4. NÉBULISEUR THERMIQUE

Le principe du nébuliseur thermique (TSP = thermospray) repose sur la génération d'un jet de vapeur et de fines gouttelettes à la sortie d'un tube nébuliseur chauffé. Cette nébulisation est le résultat d'une fragmentation du liquide suite à l'expansion de la vapeur formée par l'évaporation d'une partie du liquide dans le tube chauffant. La Figure 15 (Vestal *et al.*, 1985) illustre le profil de température sur la longueur du tube vaporisateur ainsi que le mécanisme de vaporisation. Deux points sont importants dans la formation d'un jet thermique : i) la vitesse d'évaporation du liquide dans le capillaire et ii) l'énergie nécessaire à l'évaporation qui est reliée à la température fournie au capillaire.

La vitesse d'évaporation d'un liquide dans un tube capillaire est donnée selon l'équation suivante :

$$F_l = \frac{P_v \pi d_c^2}{4 \rho_l \sqrt{\frac{\gamma R T}{M}}} \cdot \frac{\gamma}{\sqrt{2\pi\gamma + z}} \quad [3]$$

où F_l représente le débit liquide ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$), P_v , la pression de vapeur saturée en liquide (bar), d_c , le diamètre interne du capillaire (m^2), ρ_l , la densité du liquide (kg m^{-3}), R , constante des gaz parfaits, T , la température en degré K, M , la masse molaire du liquide (kg mol^{-1}), γ , le rapport de la chaleur spécifique pour la vapeur (C_p/C_v) et z , le facteur de compressibilité qui permet de corriger les déviations du comportement des gaz parfaits (Niessen *et al.*, 1992).

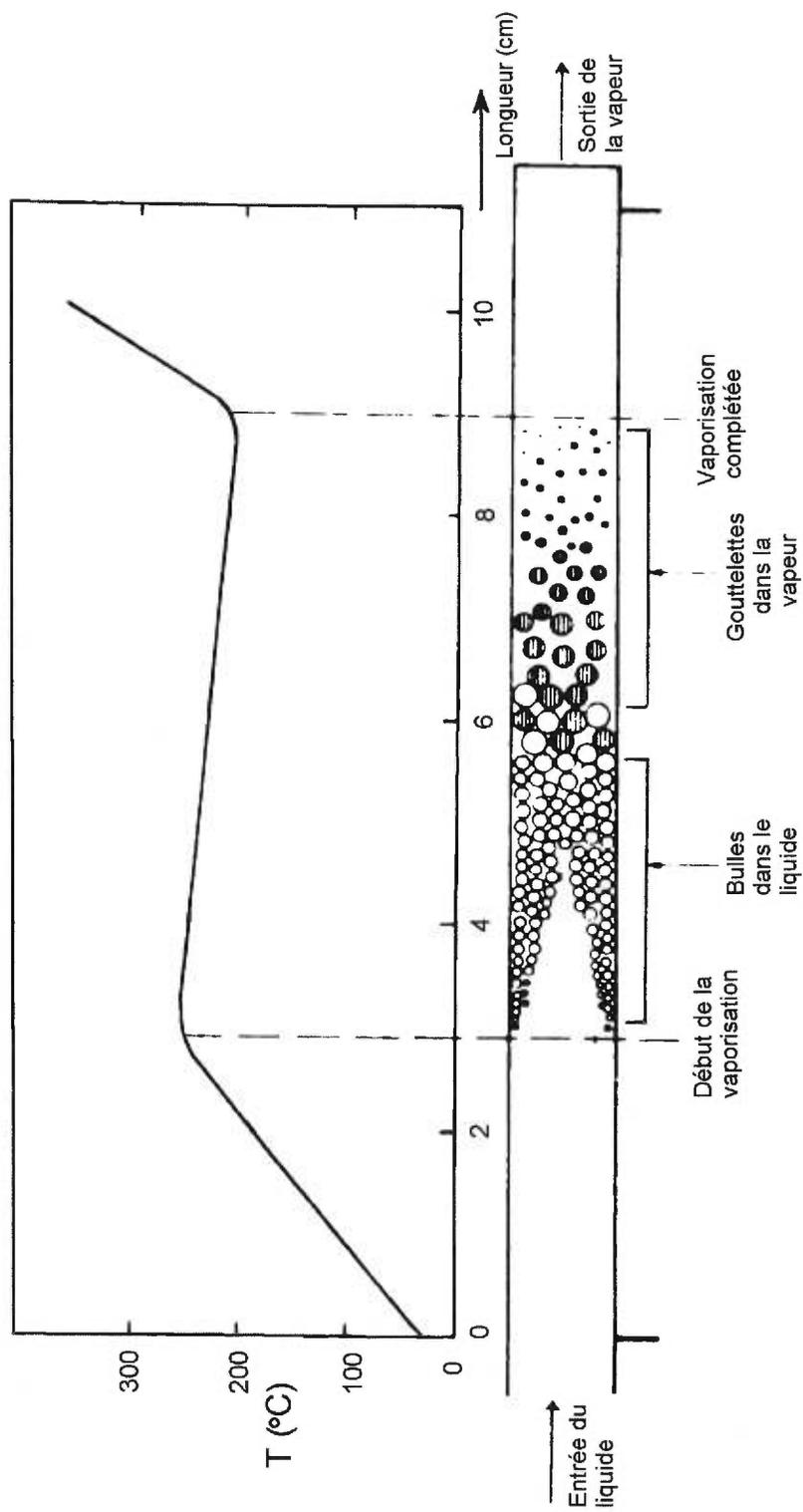


Figure 15: Profil de température en fonction de la longueur du vaporiseur et illustration schématique du mécanisme de nébulisation pour l'eau d'un nébuliseur thermique. (Adapté de Vestal *et al.*, 1985).

Le second point est la puissance énergétique nécessaire pour que la vaporisation s'effectue. L'étape de vaporisation peut être décomposée en trois segments : i) amener le liquide à la température d'ébullition, ii) procéder à la vaporisation et iii) amener la vapeur à la température désignée. Ces trois étapes demandent une puissance énergétique totale qui peut s'exprimer comme suit :

$$W_t = W_l + W_v + W_g = Q (c_l (T_b - T_0) + \Delta H_v + c_g (T_2 - T_b)) = F_l \rho_l \Delta H_t \quad [4]$$

où W représente l'énergie des différentes étapes (J/s) (l = liquide, v = vapeur, g = gaz), Q , la quantité de liquide à chauffer par unité de temps (kg/s) (déterminée par la relation $Q = F_l \rho_l$), c , la capacité calorifique spécifique (J/kg K), T , la température (K) (0 = initiale, 2 = finale, b = intermédiaire), ΔH_v , l'enthalpie de vaporisation du liquide et ΔH_t , l'enthalpie totale. Cependant, cette équation stipule que tout le liquide entre en phase gazeuse et atteint la température finale (T_2). Par ailleurs, il est possible que seule une fraction (f) du liquide reste sous forme de gouttelettes à très haute température (T_2) et qu'elle reste liquide, alors que le reste subit une vaporisation complète. Si tel est le cas, l'équation 4 s'écrit :

$$W_t = (1-f) Q \Delta H_t + f Q c_l (T_2 - T_0) \quad [5]$$

où le premier terme représente la vaporisation complète d'une portion du liquide, et le second terme représente la portion du liquide qui a formé des gouttelettes à haute température.

Comme l'illustre la Figure 15, le capillaire comporte trois régions pour lesquelles différentes étapes de la vaporisation sont atteintes. Ces régions varient selon les paramètres utilisés tels que : la longueur et la composition du tube capillaire, la puissance de chauffe, le débit liquide et la composition du solvant. En variant un ou plusieurs paramètres, il est possible d'atteindre les conditions telles que les fines gouttelettes ne soient formées qu'à la sortie du capillaire et qu'après la détente, elles s'évaporent. Dans ces conditions, les meilleures performances sont obtenues.

Le TSP s'avère très intéressant dans le contexte actuel puisqu'il permet de procéder à la vaporisation du solvant. Cette première vaporisation permet au plasma de « concentrer son énergie » sur les étapes subséquentes pour augmenter l'efficacité de l'ionisation ou de l'excitation. De plus, en utilisant un système de réfrigération, il est possible de condenser une partie du solvant avant l'introduction de l'échantillon dans le plasma. Cette condensation permet d'une part de diminuer les interférences spectroscopiques causées par les ions polyatomiques qui proviennent du solvant, et d'autre part de diminuer la quantité de dépôts de carbone sur le cône échantillonneur lorsqu'un solvant organique est utilisé comme éluant. De plus, si l'emploi d'un gradient d'éluant pour la séparation des isoformes de la métallothionéine est nécessaire, cela peut entraîner une variation dans les conditions du plasma. L'élimination du solvant permet de garder une certaine constance dans le plasma et ainsi améliorer la précision des mesures.

Contrairement aux nébuliseurs pneumatiques, le TSP ne nécessite pas de gaz nébuliseur mais seulement un gaz porteur. Ce gaz porteur transporte les gouttelettes au plasma et permet d'avoir un temps de résidence contrôlé dans le plasma, ce qui, éventuellement, fait augmenter l'efficacité d'ionisation des analytes. Les métaux étant liés à la protéine, un temps de résidence plus long permet à un plus grand nombre d'atomes d'accéder à l'ionisation qui est une étape importante pour la spectrométrie de masse. La possibilité de chauffer le gaz porteur améliore également l'étape de la désolvatation et selon Koropchak (Koropchak *et al.*, 1988; Koropchak *et al.*, 1994) l'efficacité de transport de ce type de nébuliseur est de l'ordre de 50%.

Les points négatifs de ce nébuliseur sont : i) l'emploi obligatoire d'une chambre de nébulisation et de refroidissement qui a pour effet d'élargir les pics chromatographiques et ii) les risques de blocage à l'embout ou à l'intérieur du tube nébuliseur. Ce dernier point est à surveiller surtout si le contenu en sels des solutions est élevé.

Néanmoins, ce nébuliseur est celui qui peut se prêter le mieux aux analyses désirées. La Figure 19 illustre le TSP utilisé. Ce dernier est plus amplement décrit à la section II.4.

I.5.2. CHAMBRE DE NÉBULISATION

Le premier rôle d'une chambre de nébulisation est d'effectuer une discrimination des gouttelettes selon leur dimension et de réduire le diamètre de ces gouttelettes. *L'aérosol primaire, i.e.* l'aérosol produit par le nébuliseur, possède une large distribution de la taille des gouttelettes. Si des gouttelettes de diamètre élevé (ou de volume élevé) se rendent au plasma, l'énergie fournie par le plasma sert principalement à la désolvation de ces gouttelettes. Cette désolvation provoque un refroidissement local dans le plasma qui diminue l'énergie disponible pour procéder à la vaporisation, à l'ionisation et/ou à l'excitation des analytes. De plus, des gouttelettes de diamètre important amènent une instabilité du plasma, ce qui réduit son efficacité comme source d'analyse quantitative. En ne sélectionnant que les gouttelettes de faible diamètre et volume, la sensibilité, les limites de détection et la précision sont améliorées.

La chambre de nébulisation doit induire des changements brusques dans la trajectoire des gouttelettes ou comporter des obstacles pour discriminer et pour réduire la taille des gouttelettes. En effet, les gouttelettes de forte dimension possèdent un momentum qui ne peut répondre à ces changements brusques de trajectoire. Ces obstacles, généralement présents à la sortie du nébuliseur, permettent une fragmentation supplémentaire de l'aérosol primaire en un *aérosol secondaire* qui possède une distribution des diamètres entre 1 et 20 μm avec un diamètre moyen entre 9 et 10 μm . Généralement, les chambres efficaces sont celles qui permettent un changement de trajectoire brusque ou qui ont une bille d'impact qui se trouvent près du nébuliseur et dans la trajectoire du jet de nébulisation.

Par la suite, l'aérosol subit une dernière étape qui permet une dernière discrimination dans la taille des gouttelettes et dans leur distribution. Cette étape se passe dans la chambre de nébulisation et dans l'injecteur de la torche et produit *l'aérosol tertiaire*. Cette étape comprend quatre processus de perte de gouttelettes et de diminution de diamètre de ces gouttelettes: i) la perte par turbulence, ii) la perte par gravité, iii) la perte par force centrifuge et iv) la perte par évaporation. Ces différentes étapes sont bien expliquées par Browner (Browner, 1987).

Dans notre travail, le choix des chambres de nébulisation doit être basé sur l'efficacité de celles-ci à produire de fines gouttelettes et à diminuer le volume mort du système.

Notre étude a considéré trois chambres de nébulisation différentes (Figure 20 à la section II.4). Ces trois chambres sont : la chambre Scott, la chambre cyclone et la chambre en « U ». Toutes ces chambres favorisent un processus de discrimination. La chambre en « U » et la chambre cyclone tentent de limiter le volume mort entre le HPLC et le ICP.

Chapitre II: PARTIE EXPÉRIMENTALE

Ce chapitre traitera de la préparation des différentes solutions nécessaires à l'étude et à la séparation des isoformes de la MT ainsi que des conditions de fonctionnement pour les différents instruments à plasma inductif à haute fréquence. L'acquisition et le traitement des données effectués avec le détecteur à injection de charge (CID), utilisé avec le spectromètre d'émission atomique à plasma inductif, seront également décrits et expliqués.

II.1. PRÉPARATION DES SOLUTIONS

Toute la verrerie est décontaminée en la laissant tremper dans une solution de 20 à 40% d'acide nitrique. La durée de la décontamination peut aller de 24 à 48 heures. La verrerie est ensuite rincée à l'eau purifiée.

L'eau purifiée, utilisée pour la préparation des solutions aqueuses, est de l'eau distillée traitée par un système de purification Milli-Q RG (Millipore Canada Ltd, Mississauga, Ontario). Ce système comporte quatre cartouches dont la première est composée de charbon activé qui adsorbe les produits organiques dissous dans l'eau. L'eau passe ensuite à travers deux cartouches mixtes échangeuses d'ions qui fixent les ions inorganiques. Finalement, une dernière cartouche de type Organex-Q™ réduit les traces de produits organiques et les amène à une concentration inférieure à 10 µg/L. L'eau est ensuite filtrée sur un filtre de 0,22 µm.

II.1.1. SOLUTION TAMPON TRIS-HCL

Pour extraire les MT des organes biologiques, on utilise généralement une solution de *tri*-[hydroxyméthyl]aminométhane (Trizma ou Tris, Sigma Chemical Co., S^t-Louis, USA). Afin de préserver les liens métal - thiolate, une solution tampon de ce produit à pH 7,2 est préparée à partir de son sel chloré. Des masses de 7,02 g de Tris-HCl (Sigma Chemical Co., S^t-Louis, USA) et 0,67 g de Tris sont dissoutes dans 1L d'eau purifiée. Le pH est ensuite vérifié et, si besoin est, ajusté avec une solution HCl 0,05 M (grade A.C.S, Fisher Scientique, Ontario, Canada) ou Tris 0,01 M. Cette solution

qui se nomme Tris-HCl dans la partie Résultats et Discussion, a une concentration de 50 mM de Tris-HCl et un pH de 7,2.

II.1.2. SOLUTIONS DE MT

Les solutions de MT de foie de lapin (Sigma Chemical Co., S^t-Louis, USA) qui sont utilisées comme étalon, sont préparées en dissolvant la totalité des MT (5 mg) avec 5,0 mL de la solution tampon Tris-HCl 50 mM. Une attention particulière a été portée au contenu métallique de ces MT. En effet, différents lots possèdent un contenu en cadmium et en zinc variable, mais il se situe autour de 5,9% (p/p) et de 0,5% (p/p) respectivement. Ce volume (5,0 mL) a été réparti également dans dix fioles. Une lyophilisation (Speed-Vac SC-110 de Savant, Fisher, Ontario, Canada) à $2,7 \times 10^{-5}$ bar pendant 18h a été effectuée afin de retirer l'eau et, ainsi, éviter la dégénérescence des MT par l'hydrolyse. Les fioles de lyophilisation sont conservées à une température de -15 °C jusqu'à leur utilisation. Des portions de 0,5 mg sont ensuite dissoutes dans un ballon de 25,0 mL avec la solution tampon Tris-HCl 50 mM. Si des étalons internes sont utilisés, 125 µL d'une solution de 10 mg/L de l'étalon interne dans Tris-HCl 50 mM y sont ajoutés. Cette solution est fabriquée à partir d'une solution standard ICP de 1000 mg en métal/L dans HNO₃ 2% (v/v) (Spex Plasma Standard, ATS Scientific Inc, Oakville, Ontario). Une quantité importante d'acide nitrique est évitée pour cette solution puisque l'acide peut affecter les liaisons métal:thiolate de la protéine lors d'un entreposage prolongé. Afin de diminuer la dégradation de la MT, ces solutions sont entreposées à 4 °C.

Les MT de branchies de moule d'origine environnementale ont été préparées par Yves Couillard à l'INRS-Eau. La procédure utilisée pour cette préparation est détaillée par Wang (Wang *et al.*, 1999). Lorsque les organismes marins sont récupérés, les branchies sont retirées, congelées et conservées à -80 °C. Les tissus sont ensuite homogénéisés sous atmosphère d'azote, et broyés à la main avec un pilon de verre. L'homogénéisation est faite avec deux volumes d'une solution de pH 7 composée de 10 mM Tris, 100 mM NaCl et de 0,03% NaN₃. Le cytosol (surnageant) est récupéré après une ultracentrifugation (160 000 tours/min) à 2 °C pendant une heure. Il est ensuite filtré sur une membrane d'acétate de cellulose dont les pores sont de 0,2 µm de diamètre.

Le filtrat est ensuite injecté sur une colonne à perméation de gel TSK gel G2000 SW (30 x 0,75 cm). Une solution de NaCl 100 mM, 10 mM Tris et 0,03% d'azote de sodium sert d'éluant. Les protéines de masse moléculaire comprise entre 18 et 1,5kDa, représentant les MT, sont récupérées dans des fioles sous atmosphère d'azote. Les fractions sont conservées dans un congélateur à -80 °C jusqu'à leur analyse. Aucune modification ou lyophilisation n'est pratiquée sur ces échantillons avant leur injection dans le système chromatographique en phase apolaire.

II.1.3. LES ÉLUANTS CHROMATOGRAPHIQUES

Les éluants chromatographiques sont préparés à partir du tampon Tris-HCl 50 mM et du n-propanol (grade HPLC, 99,5+ %, Sigma Chemical Co.) ou de l'acétonitrile (Accusolv, 99,7 %, Anachemia, Mississauga, Canada) dans les proportions désirées. Tous les éluants sont ensuite dégazés dans un bain à ultrason (Branson 5200, 50/60 Hz, 4,1 ampères) pour au moins 30 minutes.

Puisque certaines propriétés physiques influenceront la qualité de la nébulisation, ces principales propriétés sont énumérées au Tableau II.

Tableau II: Liste des propriétés physico-chimiques de certains solvants.^a

Solvant	Polarité (P')	Viscosité (cP)	Densité à 20°C (g/mL)	Tension de surface ^b (dyne/cm)	Température d'ébullition (°C)	Azéotrope (% p/p)	Température d'ébullition de l'azéotrope ^c (°C)
Eau ^d	10,2	1,0	1,00	72,75	100	--	--
n-Propanol	4,0	2,3	0,80	23,70	97,2	71,7	87
Acétonitrile	5,8	0,38	0,78	19,10	81,6	83,7	76,5

^a Valeurs tirées de Snyder *et al.*, 1997

^b Valeurs à 20°C par rapport à l'air (« High purity solvent guide », Burdick & Jackson Laboratories Inc, 1980)

^c Valeurs à la pression atmosphérique (Handbook of chemistry and physics, 62^e éd., 1982)

^d Les valeurs représentent celles de l'eau pure.

II.1.4. SOLUTIONS POUR L'OPTIMISATION DES INSTRUMENTS

Différentes solutions en métaux ont été utilisées pour l'optimisation des paramètres de mesure des spectromètres à plasma ICP. La préparation de chaque

solution est différente selon qu'il s'agisse de la nébulisation pneumatique ou de la nébulisation thermique.

Pour la nébulisation pneumatique, l'optimisation est effectuée avec une solution contenant 10 µg/L de Cu, Cd, Zn et Co. Cette solution a été préparée à partir d'une solution standard de 1000 mg/L dans l'eau (2% HNO₃) et complétée avec de l'eau purifiée acidifiée (2% HNO₃). Pour la nébulisation thermique, le volume a été complété avec une solution Tris-HCl 50 mM ou la solution Tris-HCl/n-propanol. Cette solution est utilisée afin d'éviter d'endommager les pompes HPLC model-510 (Waters, Millford, MA, USA) et le capillaire en acier inoxydable du TSP.

II.2. SYSTÈME CHROMATOGRAPHIQUE

Un schéma du montage pour le système chromatographique est illustré à la Figure 16. Afin d'éviter toute contamination métallique, des tubes en poly[(éther)éther cétone] (PEEK) de 508 µm de diamètre remplacent les tubes en acier inoxydable. La pression maximale pour l'utilisation de ces tubes inertes est de 138 bars. Seules les pièces des pompes HPLC et la valve de la boucle d'injection sont en acier inoxydable. Les caractéristiques de la colonne PRP-3 (Phénoménex, Torrance, CA, USA) pour la chromatographie de partage sont énumérées au Tableau III. La programmation du gradient d'éluion est effectuée par un contrôleur automatique model 680 (Waters, Millford, MA, USA).

Tableau III: Caractéristiques de la colonne PRP-3 pour la séparation des isoformes de la MT.

Remplissage	10 µm, Sphérique, 300 Å Poly(styrène-divinylbenzène)
Domaine de stabilité (pH)	1 à 13
Température limite (°C)	5 à 60
Matériau de la colonne	Acier inoxydable 316 recouverte de PEEK
Dimension physique de la colonne	4,6 x 150 mm

La détection des protéines se fait dans l'ultra-violet (UV) à 220 nm avec un spectrophotomètre Lambda-Max model 481 de Waters afin d'établir les paramètres

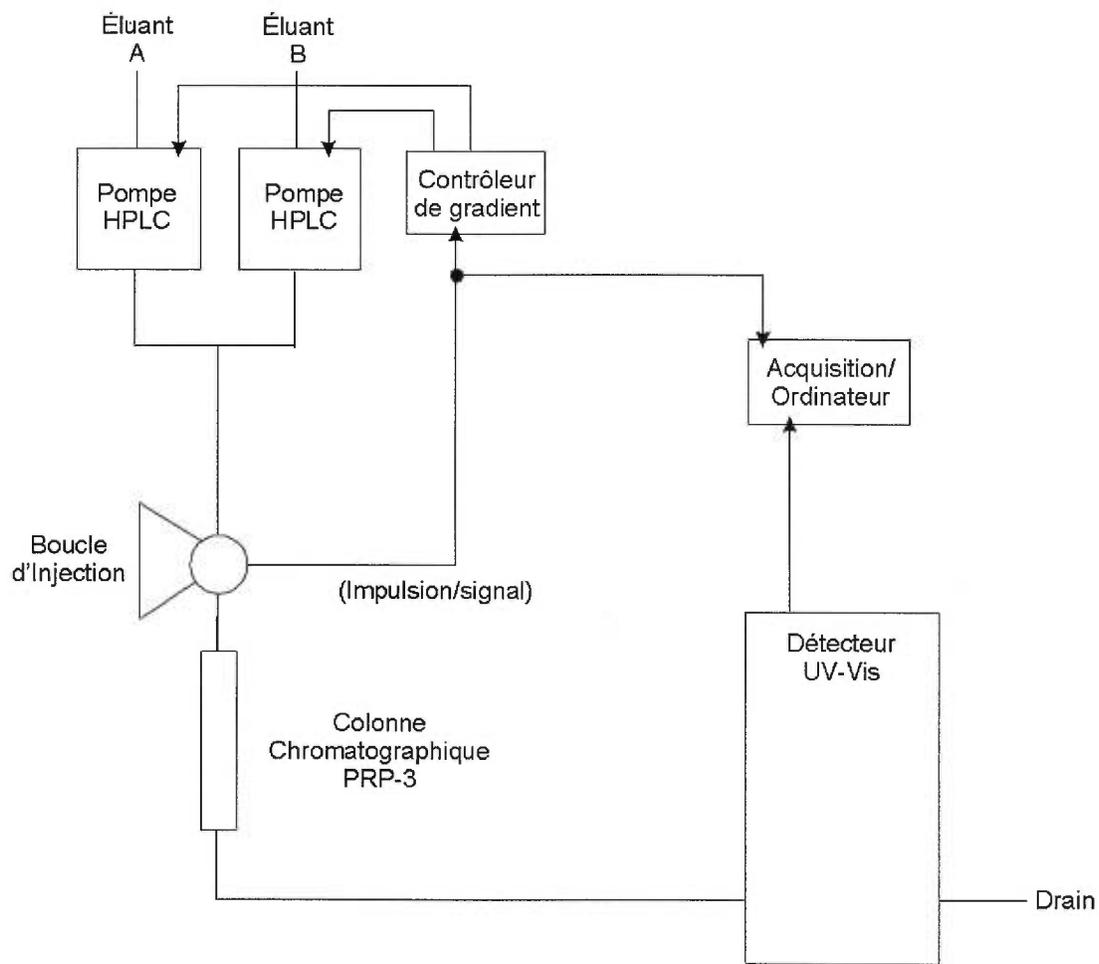


Figure 16: Schéma du montage chromatographique en phase apolaire pour la séparation des isoformes de la MT avec détection par spectrométrie d'absorption dans l'UV.

initiaux de la séparation. La cellule optique de ce détecteur possède un volume de 51,78 μL . La longueur du chemin optique est de 2,18 mm et le volume illuminé est de 3,96 μL . La fréquence d'acquisition du chromatogramme est de 1 Hz et est effectuée avec le logiciel Chro2803 (langage C++) conçu au laboratoire de l'Université de Montréal par Robert Sing.

II.3. SPECTROMÈTRE À PLASMA

Le schéma du montage complet est illustré à la Figure 17. Dans les deux montages (émission et masse), le plasma est échantillonné selon une position axiale.

Pour le spectromètre d'émission atomique, la visée axiale offre l'avantage d'observer la totalité du canal analytique. Toutefois, les signaux provenant de la queue du plasma doivent être éliminés. Il existe deux possibilités pour éliminer ces signaux: i) l'emploi d'un gaz de cisaillement et ii) l'injection d'un débit élevé d'argon à contre courant. Dans le premier cas, le gaz de cisaillement, qui est généralement de l'air, pousse la queue du plasma vers un évacuateur. Le principal inconvénient est que l'air limite la longueur d'onde d'analyse à un domaine supérieur à 190 nm. Dans le second cas, un débit d'argon à contre courant scinde la queue du plasma permettant ainsi d'échantillonner la zone analytique dans le plasma (Figure 8b). Pour cette configuration, une torche de quartz plus longue et de diamètre plus grand est utilisée, pour, d'une part recevoir ce débit élevé d'argon et, d'une autre part limiter les interactions avec l'air ambiant. Pour ces deux configurations, la torche est immobile puisque le foyer du système optique est centré en un point dans le canal analytique.

L'utilisation d'un spectromètre de masse comme détecteur ne permet que l'échantillonnage axial des ions puisque celui-ci s'effectue à l'aide d'un cône échantillonneur situé dans l'axe du plasma. Le plasma est avancé sur ce cône jusqu'à ce que celui-ci atteigne la région analytique. La queue du plasma, où s'effectue les réactions de recombinaisons, est donc physiquement écartée mais quelques réactions de recombinaisons sont encore possibles.

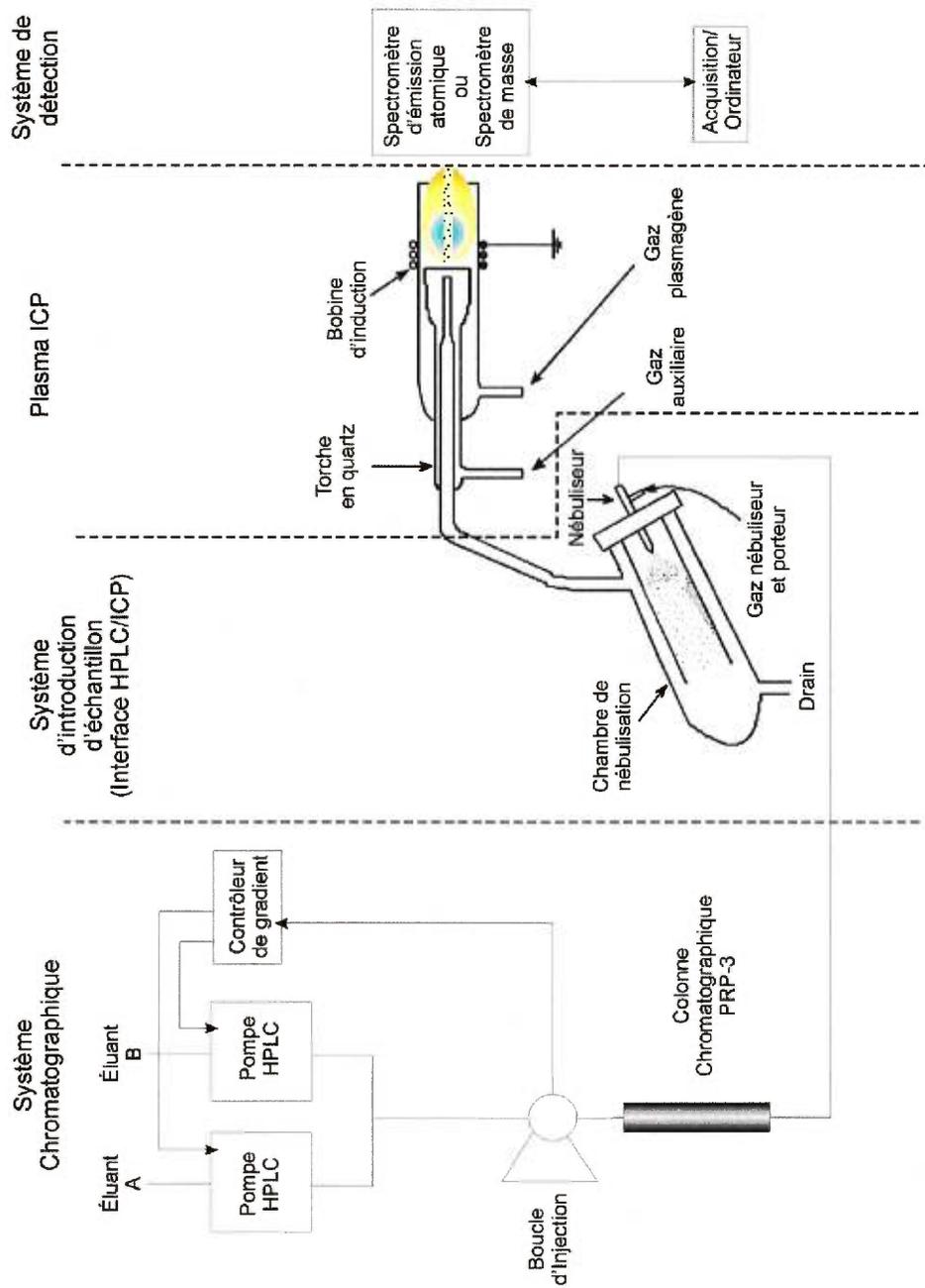


Figure 17: Schéma du montage expérimental pour la séparation des isoformes de la MT par chromatographie apolaire couplée au plasma ICP. L'interface représentée est un système conventionnel qui comprend un nébuliseur pneumatique concentrique et une chambre Scott à double passage.

II.3.1. SPECTROMÈTRE D'ÉMISSION ATOMIQUE

Dans un premier temps, un spectromètre séquentiel d'émission atomique à plasma induit par radio-fréquence (modèle ICP 6500XR, Perkin-Elmer, Norwalk CT, USA; contribution de Pratt & Whitney), avec vision latérale, a été utilisé pour optimiser la configuration du nébuliseur thermique et des chambres de nébulisation. Toutefois, les conditions de l'instrument n'ont pu permettre des études plus exhaustives quant à la séparation et la détermination simultanée des métaux liés à la MT. Nous avons ensuite tenté d'utiliser un appareil simultanée Maxim, mais cet appareil avait de sérieux défauts d'optique et de logiciels et a été abandonné par la suite après plusieurs mois de tentatives de correction des problèmes que nous avons décelés.

Les résultats d'émission atomique à plasma ICP sont obtenus à l'aide de l'IRIS-AP de Thermo Jarrell Ash Inc. (Franklin, MA, USA) appartenant au Centre Saint-Laurent. Le contrôle de l'instrument se fait avec le logiciel Thermo SPEC/CID version 3,10. Les conditions d'opération sont énumérées au Tableau IV.

Tableau IV: Conditions d'opération du système d'émission atomique.

Paramètres	Conditions
Puissance :	
Incidente	1350 W
Réfléchie	Non-déterminée ¹
Débit des gaz :	
Plasmagène	Non-déterminé ¹
Auxiliaire	0,5 L/min
Pression du gaz nébuliseur	2,1 bar (0,8 L/min)

¹ Contrôlé par le logiciel Thermo SPEC/CID

La détection est effectuée par un détecteur à injection de charge (CID = Charge injection device) dont la gamme dynamique se rapproche de celle des PMT. Billhorn (Billhorn *et al.*, 1987) explique le fonctionnement d'un CID. Pour l'instrument utilisé, la dimension du CID est d'environ 2,0 x 2,0 cm; ce qui représente, en terme de pixels, une surface de 512 x 512 (Figure 18). Chacun de ces pixels agit comme un détecteur de

28 x 28 μm . Une matrice de 3 x 15 pixels est généralement utilisée pour l'acquisition simultanée du signal de fond et de la raie spectrale. Les pixels utilisés pour enregistrer le signal de fond sont situés de part et d'autre des pixels de la raie analytique. Le temps d'acquisition est de 1 s et elle correspond également au temps d'intégration. Ce temps d'intégration est le même pour le signal analytique et le signal de fond. Cependant, puisque le nombre de pixels utilisé pour le signal de fond est inférieur à celui du signal analytique, une correction est apportée. Le signal net de la raie est obtenu par la soustraction de la moyenne du signal de fond corrigé à celui de la raie spectrale d'analyse :

$$S_N = S_\lambda - 3 \times [(S_{fg} + S_{fd})/2] \quad [6]$$

où S_N représente le signal net, S_λ , le signal à la longueur d'onde d'observation, S_{fg} et S_{fd} , le signal de fond à gauche et à droite, respectivement, de la raie d'observation.

Les caractéristiques physiques des éléments pour l'émission atomique ou ionique représentées aux longueurs d'ondes d'analyse utilisées au cours des études sont données au Tableau V.

II.3.2. SPECTROMÈTRE DE MASSE

Les résultats de spectrométrie de masse à plasma ICP sont obtenus sur un VG PlasmaQuad II (Thermo Jarrel Ash Inc.) dont les conditions d'opération sont décrites au Tableau VI. Si aucun signal transitoire n'est enregistré, les acquisitions sont effectuées avec le logiciel PlasmaQuad II STE version 4.1.2. Par contre, le logiciel TRAnalysis Software version 4.1.2 est utilisé avec le système chromatographique et le temps d'acquisition est de 2 s, mais puisqu'il s'agit d'un détecteur quasi simultané, le temps d'intégration réel pour chaque isotope sera déterminé par le nombre d'isotope à analyser. Pour les études qui ont été faites, ce temps d'intégration est de 0,2 s.

L'interface entre le plasma et le spectre de masse se compose d'un cône échantillonneur et d'un cône écrémeur qui sont tous deux faits de nickel. La torche, de type Fassel, est reliée au système de nébulisation via un tube de verre de 5 mm de diamètre interne. Pour le système de nébulisation thermique, cette jonction se compose d'une rallonge en Tygon™ afin d'obtenir une flexibilité pour permettre d'unir le système de nébulisation qui se trouve à l'extérieur du ICP-MS à la torche.

Tableau V: Caractéristiques physique des éléments aux longueurs d'onde d'analyse en émission atomique ou ionique.

Élément- Type de raie	Longueur d'onde (nm)	Intensité de la raie ^a	Énergie d'ionisation (eV) ^b	Énergie d'excitation (eV)	Énergie totale (eV)
Zn I	213,856	800	N/A	5,80	5,80
Zn II	206,200	500	9,39	6,01	15,40
Cu I	324,754	10000	N/A	3,82	3,82
Cu II	224,700	1000	7,73	5,52	13,25
Cd II	214,438	1000	8,99	5,78	14,77
Cd II	226,502	1000	8,99	5,47	14,46
Co II	228,616	1000	7,86	5,42	13,28

^a Intensités relevées des tables de NIST. (J.Reader et C.H. Corliss, 1992)

^b Potentiel de première ionisation relevé selon les tables de NIST.

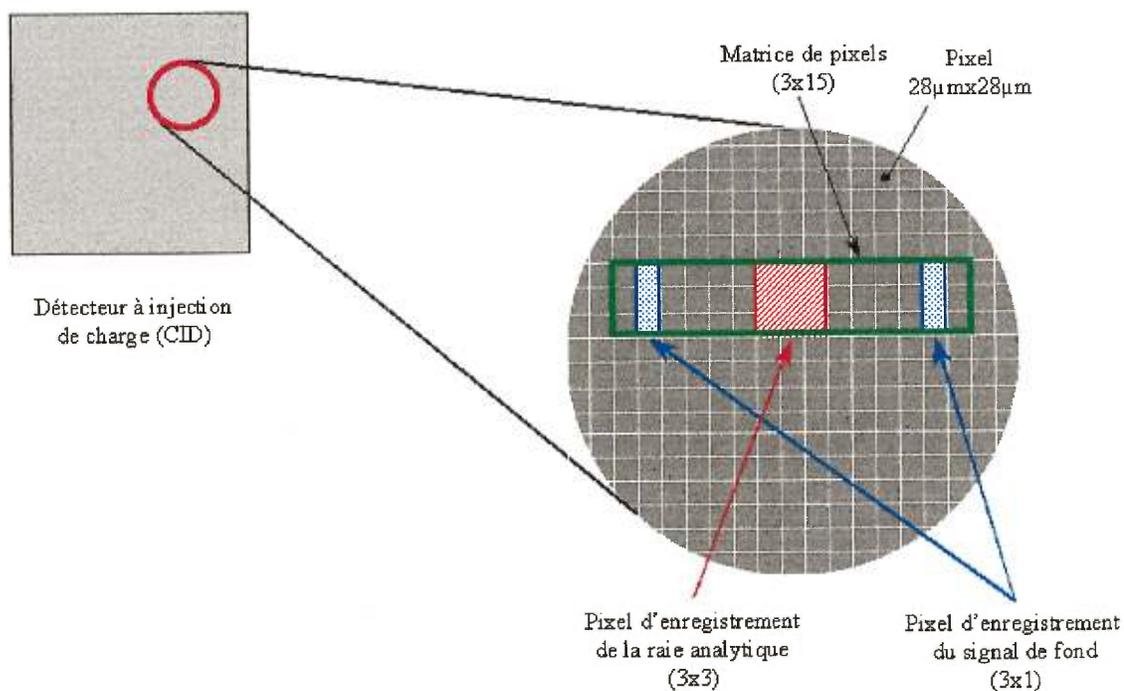


Figure 18: Description d'une matrice de pixels d'un détecteur à injection de charge.

Tableau VI: Conditions d'opération du ICP-MS.

Paramètres	Conditions
Puissance :	
Incidente	1350 W
Réfléchie	< 3 W avec TSP < 1 W avec Meinhard
Débit des gaz :	
Plasmagène	15 L/min
Auxiliaire	0,5 L/min
Nébuliseur	0,875 L/min avec TSP 0,998 L/min avec Meinhard

II.4. SYSTÈME DE NÉBULISATION THERMIQUE

La Figure 19 représente le système de nébulisation thermique que nous avons développé. Ce système est modifié par rapport au modèle d' Elgersma (Elgersma J.W. *et al.*, 1991). Le bloc chauffant est constitué d'un filament nickel-chrome (80:20) (Omega, Stamford, CT, USA) dont la résistance est de 53 Ω et qui entoure, dans plusieurs couches de céramique à haute température (Omega), un tube guide d'acier inoxydable (11 cm, 11,11 mm d.i.) et un tube de céramique. Le tube guide reçoit le tube du système chromatographique en acier inoxydable (11,11 mm d.e., 0,127 mm d.i.) alors que le tube de céramique permet au thermocouple de se rendre à l'extrémité du bloc chauffant où la lecture de la température est effectuée. Des blocs en acier inoxydable sont soudés au tube guide. Le bloc chauffant est inséré dans un tube d'acier isolé dont l'avant est sculpté pour accepter un joint sphérique de 29 mm de diamètre. Le bloc chauffant est fixé par deux écrous à l'arrière. Une bague de Téflon sert de joint d'étanchéité entre le bloc chauffant et le tube afin d'éviter les fuites du gaz porteur. Le gaz porteur est chauffé puis sort du nébuliseur par une fente annulaire de 0,1 mm de largeur.

Un thermocouple fer/cuivre-nickel (type « J », Omega) enregistre la température et un contrôleur différentiel de température (F&M Scientific 220, Hewlett-Packard) ajuste le potentiel pour maintenir une température constante. Un multimètre DA-8604a (Projean Instrument, Montréal, QC, Canada) est également branché au thermocouple pour permettre la mesure de la température. Puisque la lecture s'effectue à l'extérieur du tube guide, il peut y avoir décalage entre la température lue et la température réelle du nébulisat.

Un réducteur sphérique de verre (28 mm/5 mm) permet de brancher le TSP à la chambre de désolvation (chambre en « U »). Toutes les chambres et raccords sont faits en verre et ils se raccordent entre eux par des joints sphériques de 5 mm. La chambre de désolvation est de 17 x 3 cm. La chambre cyclone possède un angle de 40° et est longue de 3,5 cm. La distance entre les deux parois internes est de 3 mm. Les chambres de nébulisation et de désolvation sont illustrées à la Figure 20. Le volume mort de ces systèmes est de 35 mL pour le système mixte TSP-Cyclone-U et de 106 mL pour le système conventionnel Meinhard-Scott. Cependant, le couplage de la chambre Scott et d'un nébuliseur pneumatique concentrique sert de point de comparaison puisqu'il s'agit du montage le plus utilisé. La circulation d'eau refroidie se fait avec un bain thermostaté modèle RM20 (MGW Lauda, RMT, Brinkman).

Au cours des études, la qualité de la nébulisation sera discutée. C'est pourquoi des exemples de calcul du diamètre moyen de Sauter (équation 2, p.39) sont représentés au tableau. Les calculs énumérés proviennent de valeurs empiriques disponibles pour les différents solvants étudiés. Le Tableau VII illustre le diamètre moyen des gouttelettes selon la composition du solvant et l'effet de la température sur le diamètre. Cependant, cette équation se rapporte à une nébulisation de type pneumatique concentrique.

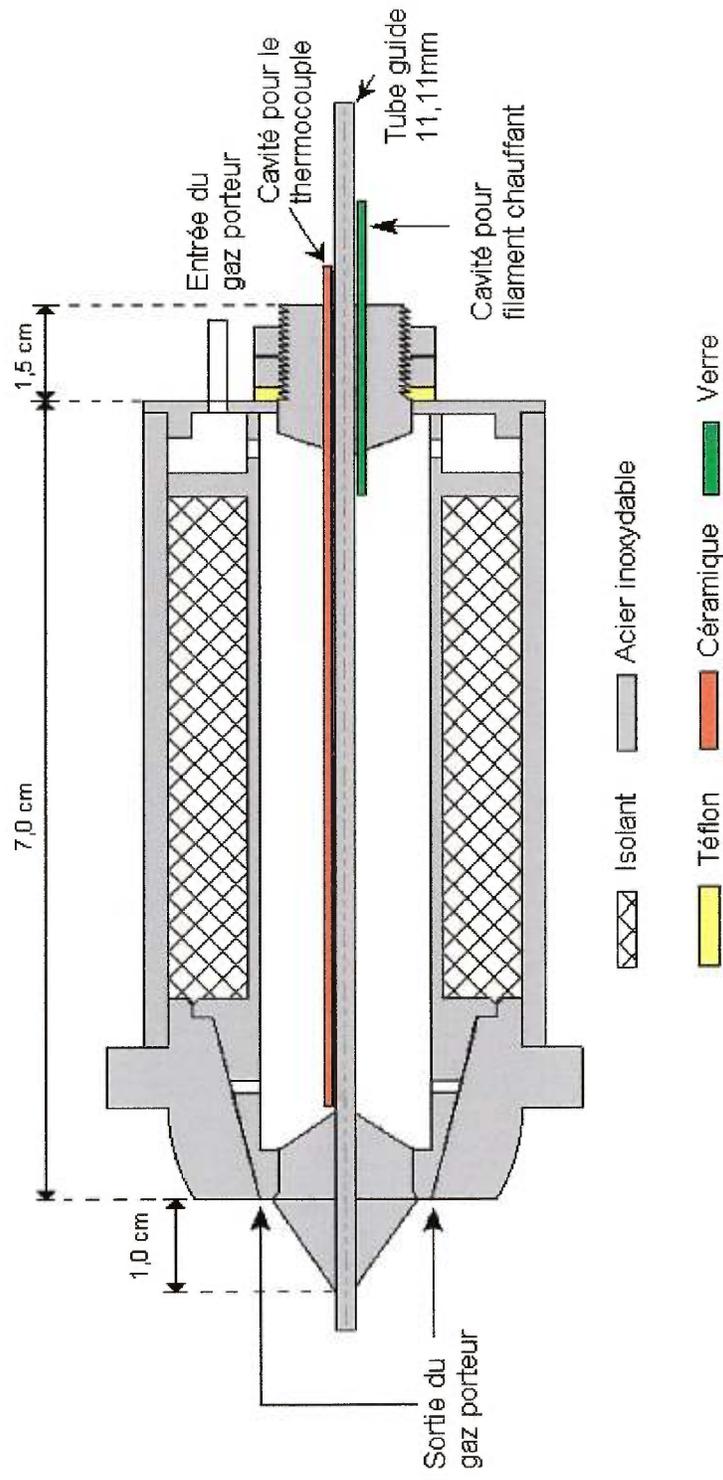
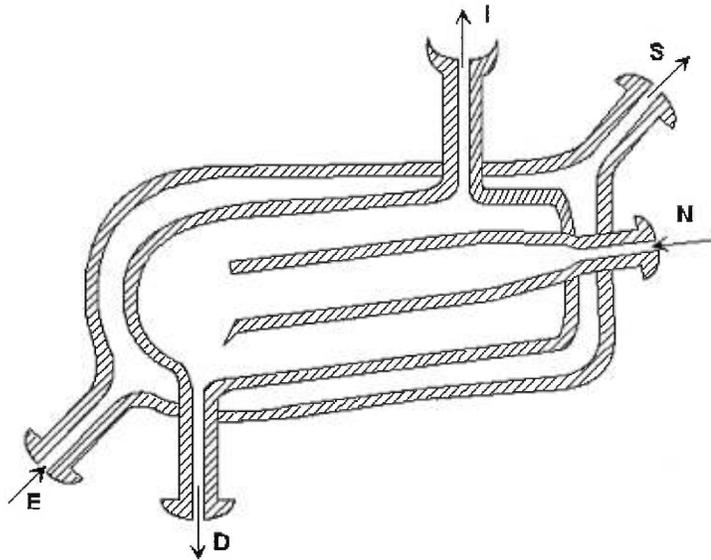
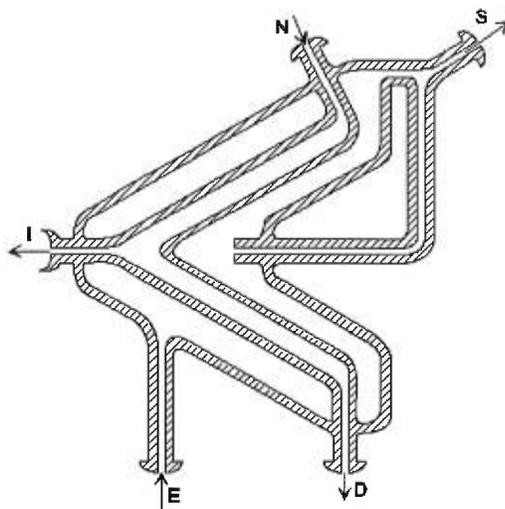


Figure 19: Schéma du nébuliseur thermique.

a)



b)



c)

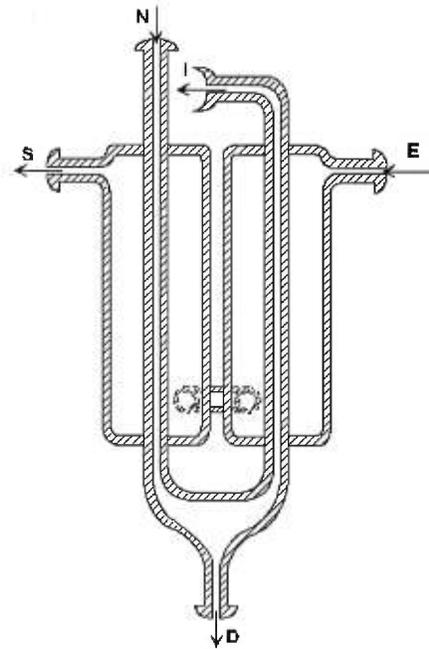


Figure 20: Schéma des différentes chambres de nébulisation refroidies; a) chambre Scott (70mL), b) chambre cyclone (6 mL), c) chambre en "U" (18mL). N = Nébuliseur, I = ICP, D = Drain, E = Entrée d'eau, S = Sortie d'eau.

Tableau VII: Détermination du diamètre moyen de Sauter (d_s) pour une nébulisation pneumatique selon la composition et la température du solvant pour des conditions de nébulisation prédéterminées.^{a,b}

Caractéristiques des gouttelettes ^c	Eau (20 °C)	Eau (70 °C)	Propanol (20 °C)	Propanol (70 °C)	10% propanol (20 °C)	Acétonitrile (20 °C)
d_s (μm)	39	29	63	41	49	31
Vol. Moyen (μm^3)	30 652	13 097	130 256	35 460	60 067	16 159

^a Dimension d'un nébuliseur pneumatique concentrique Meinhard modèle TR-30-A3 : diamètre interne du capillaire=0,034 cm, Aire annulaire du nébuliseur=0,00034 cm²

^b Conditions de nébulisation prédéterminées : Constante A=585, Constante B=18878798, Débit liquide (Q_l)=1 mL/min, Débit gazeux (Q_g)=1000 mL/min, Différence des vitesses (v)=490 m/s

^c Les caractéristiques physiques majeures des différents solvant sont mentionnées au Tableau II, les valeurs particulières peuvent être retrouvées dans (*CRC Press, Handbook of Chemistry and Physics*).

Chapitre III: RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats et la discussion seront classés en cinq sections. La première consiste en une étude de la séparation des isoformes de la métallothionéine (MT) par chromatographie de partage avec détection par absorption moléculaire. Elle sera suivie du développement du nébuliseur thermique (TSP). La troisième section concernera l'optimisation des conditions du couplage du TSP au chromatographe. Les deux dernières sections seront consacrées à l'étude de la séparation des isoformes de la MT par chromatographie liquide avec détection par ICP-AES et par ICP-MS.

III.1. CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE

III.1.1. OPTIMISATION DE LA DÉTECTION PAR SPECTROMÉTRIE D'ABSORPTION MOLÉCULAIRE DANS L'ULTRAVIOLET

Pour optimiser la séparation des isoformes de la MT, on doit être en mesure de les détecter. Selon les résultats obtenus (Mazzucotelli *et al.*, 1995; Kabzinski *et al.*, 1995), la longueur d'onde optimale pour la détection des MT (λ_{obs}) est 220 nm car cette longueur d'onde représente une transition électronique au niveau des liens peptidiques ($R_1\text{-CO-NH-R}_2$). L'emploi de solvant organique dans l'éluant est nécessaire pour désorber les MT de la phase stationnaire lors de leur séparation, il est donc important de vérifier que la longueur d'onde d'absorption est adéquate. Le propanol possède certaines caractéristiques physico-chimiques semblables à celles de l'eau (Tableau II), ce qui peut être un atout important lors de la formation de l'aérosol par le nébuliseur thermique. Par conséquent, il constitue un bon choix initial. L'éluant initial utilisé se compose de 20% de propanol et 80% de [*tri*-(hydroxyméthyl) amine]méthane (ou Tris-HCl). Différentes longueurs d'onde d'observation ont été étudiées car la présence de métaux liés à la protéine peut amener un déplacement du maximum d'absorption. La Figure 21 illustre les chromatogrammes de MT obtenus en mode isocratique aux différentes longueurs d'onde. Puisque le propanol absorbe fortement à 210 nm et à des plus faibles longueurs d'onde, il est préférable d'utiliser une longueur d'onde supérieure pour la détection.

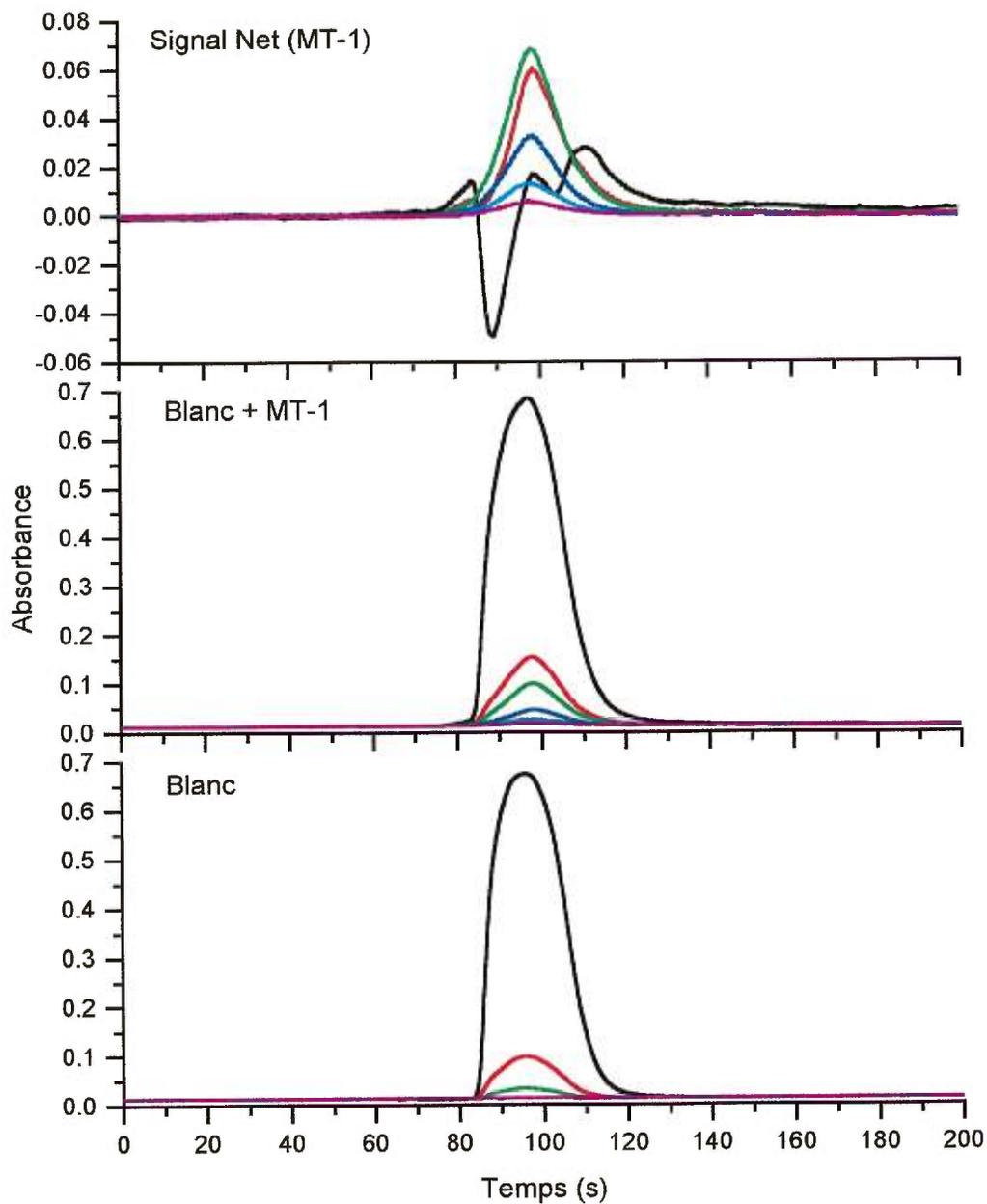


Figure 21 : Détermination de la longueur d'onde d'absorption des métallothionéines. (injection de 100 μ L de 10,5 μ M MT de foie de lapin; Éluant : 20% propanol + 80% Tris-HCl; Débit 1,0 mL/min). (—) $\lambda_{\text{obs}} = 194$ nm, (—) $\lambda_{\text{obs}} = 215$ nm, (—) $\lambda_{\text{obs}} = 220$ nm, (—) $\lambda_{\text{obs}} = 254$ nm, (—) $\lambda_{\text{obs}} = 270$ nm, (—) $\lambda_{\text{obs}} = 280$ nm.

III.1.2. CHOIX DES ÉLUANTS

Tel que mentionné à la section I.3.2.1, l'emploi de la chromatographie d'exclusion est nécessaire pour séparer les métallothionéines des protéines contenues dans le cytosol. Une solution de Tris-HCl, dont le rôle est de faire éclater la membrane de la cellule, est généralement utilisée lors de l'extraction des protéines cytosoliques dont la MT. Il est donc préférable d'utiliser la même solution comme solvant pour la préparation de l'échantillon et comme éluant pour la chromatographie d'exclusion ou de partage.

Cependant, selon Suzuki (Suzuki *et al.*, 1983), la présence d'une quantité de propanol (20%) permet une meilleure séparation des MT. La conformation linéaire de la chaîne carbonée du propanol peut permettre une meilleure désorption de la protéine de la phase stationnaire. Cet effet, ajouté à la polarité de la molécule, permettrait une meilleure séparation. En partant avec la composition de l'éluant proposée par Suzuki (80% Tris-HCl:20% propanol), nous avons vérifié l'effet de la composition de l'éluant sur la séparation des isoformes de la MT avec notre colonne. La Figure 22 montre les chromatogrammes obtenus en mode d'élution isocratique sur la colonne PRP-3 pour différentes compositions de l'éluant. L'absorbance due à la MT a été déterminée en soustrayant le blanc du signal obtenu pour le mélange « blanc+MT ». Notons qu'en injectant le blanc, un pic est observé puisque la composition du blanc (Tris-HCl 10 mM pH 8,6) est différente de celle de l'éluant. Un pH de 8,6 a été utilisé pour l'échantillon puisqu'il permet de préserver le lien métal-thiolate un peu plus longtemps. Un pH supérieur à cette valeur est à éviter puisque la protéine sera sujette à une oxydation par la formation de ponts disulfures ce qui amène la perte des métaux. Avec un mélange composé de 20% propanol :80% Tris-HCl, aucune séparation des isoformes de la MT n'a été obtenue sur notre colonne. Nous avons alors diminué le pourcentage de n-propanol ce qui a rendu possible la séparation des isoformes. Trois signaux ont été perçus pour un mélange à 5% propanol:95% Tris-HCl (ligne verte à la Figure 22). Cependant, cette séparation a engendré l'élargissement et l'affaïssement des signaux. De plus, on peut remarquer que l'absorbance n'est pas retournée à la ligne de base, ce qui signifie qu'il

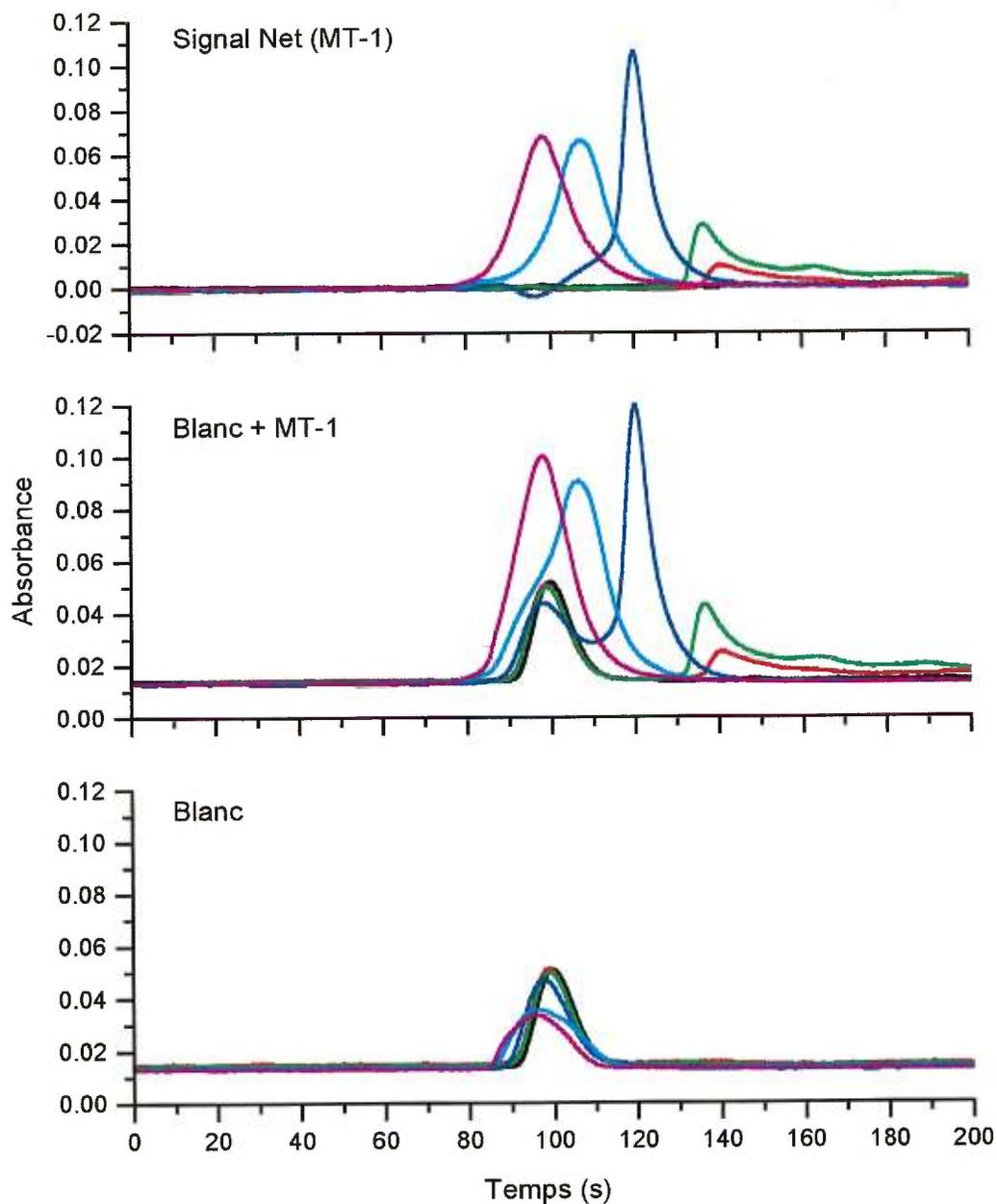


Figure 22: Influence de la composition de l'éluant sur la séparation des isoformes de la métallothionéine. (Débit liquide = 1,0 mL/min; Eluant de Tris-HCl + propanol; $\lambda_{\text{obs}} = 220 \text{ nm}$; Injection 100 μL de 10,5 μM MT-1 de foie de lapin; Colonne PRP-3). Mode isocratique: (—) 3% propanol, (—) 4% propanol, (—) 5% propanol, (—) 10% propanol, (—) 15% propanol, (—) 20% propanol.

reste des protéines qui n'ont pas été éluées à 200 s. Pour une concentration de 10,5 μM de MT, comme montré à la Figure 22, l'emploi de 3% de propanol amène la perte de signal à cause de la diffusion longitudinale. Les MT semblent rester dans la phase stationnaire bien au-delà de 200 s et l'analyse nécessite donc un temps d'acquisition plus long. Afin de réduire cet élargissement, l'emploi d'un gradient d'éluant devient nécessaire.

Cette étude démontre également que les isoformes de la MT de foie de lapin d'origine commerciale ne sont pas pures. En effet, la séparation effectuée à la Figure 22 illustre bien le problème puisqu'elle est faite sur l'isoforme disponible commercialement MT-1 qui est supposée être « pure ». Les pics observés correspondent aux autres isoformes (MT-2 et autres produits non définis). Ces « impuretés » ont également été observées par d'autres chercheurs (R.M. Barnes, communication personnelle). Cette observation amène une difficulté importante quant à l'établissement d'une courbe d'étalonnage externe. La difficulté d'accéder à une source d'isoformes de MT purifiées complique la détermination du rapport entre les métaux liés et l'isoforme.

III.1.3. ÉTUDE DU GRADIENT D'ÉLUTION POUR LA SÉPARATION DES ISOFORMES

Cette section étudie les effets de la composition de l'éluant et de la vitesse du gradient (% propanol/min) de même que le débit de l'éluant sur la séparation des isoformes de la métallothionéine. Le gradient utilise un mélange de deux éluants dont le premier (éluant A) est composé d'une solution de Tris-HCl et dont le deuxième est composé soit de 80% propanol:20% Tris-HCl, soit de 20% propanol:80% Tris-HCl. Dans un premier temps, l'efficacité de la séparation a été vérifiée en fonction du débit liquide. La Figure 23 montre qu'un débit de 1 mL/min amène une perte d'informations (représentée par les flèches) qui avaient été obtenues pour un débit inférieur (0,5 mL/min). On remarque que le débit du propanol influence l'efficacité de la séparation. Le Tableau VIII donne les informations sur les différents gradients utilisés à la Figure 23. Sur ce graphique, on constate que pour un même débit, les MT possèdent une affinité hydrophile plus importante. Cependant, aucune séparation en fonction du débit n'a été effectuée pour un éluant de 20% propanol:80% Tris-HCl.

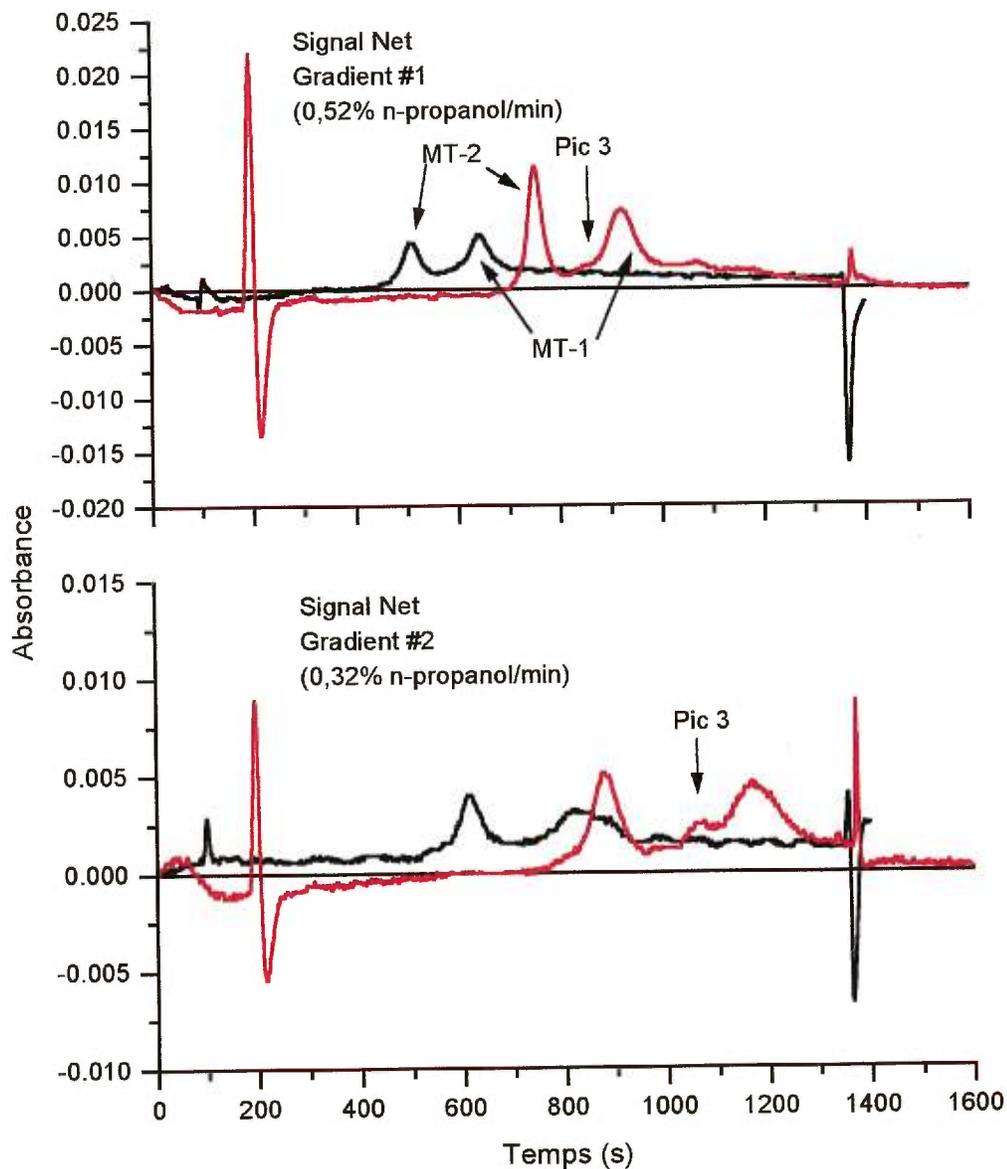


Figure 23: Influence du débit liquide sur l'efficacité de séparation des isoformes de la MT ($10,5 \mu\text{M}$). Éluants employés : Tris-HCl et 80% propanol:20% Tris-HCl. Les gradients sont donnés au Tableau VIII. Débit liquide : (—) 0,5 mL/min, (—) 1,0 mL/min.

Tableau VIII: Liste des gradients d'élution pour l'optimisation du débit lors de la séparation des isoformes de la MT.^a

Temps (s)	Gradient #1		Gradient #2	
	(%) Tris-HCl ^b	(%) 80% propanol : 20% Tris-HCl	(%) Tris-HCl ^b	(%) 80% propanol : 20% Tris-HCl
0	98	2	98	2
1200	85	15	90	10
1260	0	100	0	100
1320	98	2	98	2
1380	98	2	98	2
1440	98	2	98	2

^a Débit liquide est de 0,5 mL/min ou 1,0 mL/min

^b Tris-HCl 50 mM, pH 7,2

Selon les chromatogrammes de la Figure 23, le débit optimal qui permet la séparation des isoformes de la MT est de 0,5 mL/min. En effet, il nous permet d'obtenir le plus grand nombre de pics. En plus de deux pics principaux qui représentent les deux composantes majeures du mélange de MT (MT-1 et MT-2 respectivement), nous observons un autre pic de faible intensité (flèche). Celui-ci peut représenter une isoforme moins commune dans l'organe de synthèse dont provient la protéine ou des composés provenant de la décomposition de la MT durant l'entreposage. Cette décomposition proviendrait de la formation de ponts disulfures provoquant la perte de métaux et un changement dans la conformation de la protéine; la rétention est alors modifiée.

Nous avons donc utilisé un débit de 0,5 mL/min pour déterminer la qualité de la séparation entre les isoformes et nous avons inversé la composition de l'éluant (80% Tris-HCl:20% propanol). La Figure 24 compare la séparation des isoformes de la MT pour des gradients similaires mais dont la composition de l'éluant « organique » est différente. Ces chromatogrammes montrent que la séparation de ces isoformes est similaire mais que les temps de rétentions augmentent avec l'emploi d'une composition d'éluant à 20% propanol:80% Tris-HCl (éluant B). Cette plus grande rétention

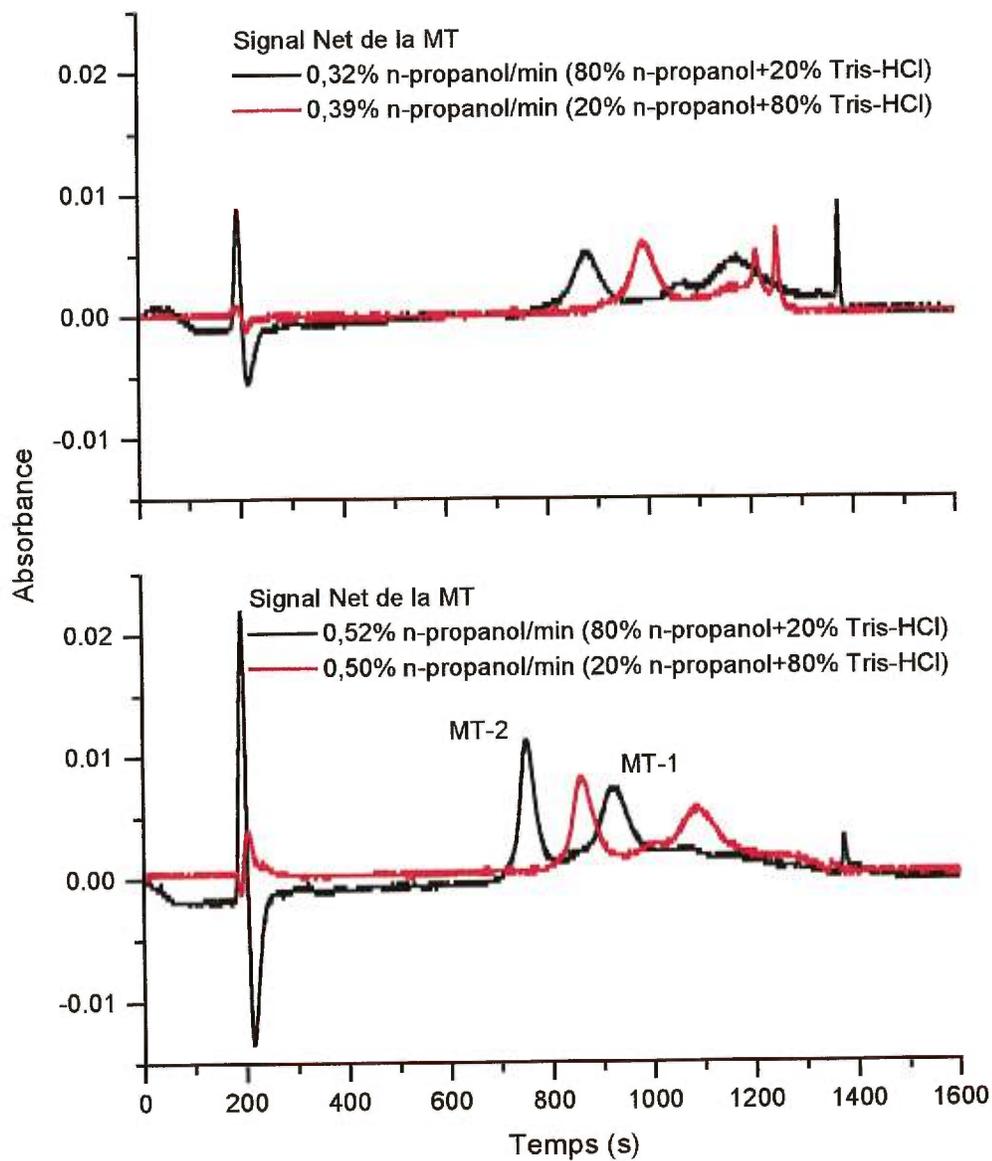


Figure 24: Influence de la composition en propanol sur la séparation des isoformes de la MT. La concentration en MT est de $10,5 \mu\text{M}$ et le débit est de $0,5 \text{ mL/min}$.

s'explique par une force éluotropique initiale différente entre les deux systèmes. En effet, la force éluotropique initiale pour l'éluant B est de 10,14 alors que pour l'éluant C, cette force est de 10,10. Cette faible différence permet de constater que le caractère hydrophobe des isoformes de la MT ainsi que leur polarité sont différents, et que la MT-1 possède un caractère polaire plus élevé que l'isoforme MT-2. Si nous comparons nos résultats à ceux de Suzuki, notre séparation semble moins efficace. Cependant, notre phase stationnaire est dépourvue de groupements silanol qui peuvent conférer à la colonne un caractère polaire et, par conséquent, permettre à la séparation de jouer sur deux facteurs importants : l'hydrophobicité et la polarité. Par contre, la présence de silanols libres dans la phase stationnaire ne confère pas à la colonne un caractère complètement inerte et peut contribuer à la séparation des MT. Bien que la séparation ne soit pas parfaite, il s'agit d'une première optimisation afin de connaître les paramètres initiaux à utiliser lors du couplage HPLC/ICP. L'éluant B (20% propanol:80% Tris-HCl) est retenu pour la suite du travail puisqu'il permet un contrôle plus aisé de la force éluotropique et qu'il emploie une quantité restreinte de solvant organique limitant ainsi une instabilité éventuelle du plasma ICP.

III.2. DÉVELOPPEMENT DU NÉBULISEUR THERMIQUE

Comme il a déjà été mentionné à la section I.5, la quantité d'échantillon se rendant au plasma ainsi que la taille des gouttelettes de l'aérosol déterminent la sensibilité et la stabilité du signal analytique.

Avant de procéder au couplage HPLC/ICP, nous devons caractériser l'ensemble du système d'introduction d'échantillon, soit le nébuliseur thermique et les chambres de nébulisation. Cette caractérisation impliquerait la détermination de la taille des gouttelettes formant l'aérosol et leur distribution ainsi que l'efficacité de transport de l'aérosol du nébuliseur au plasma ICP.

Des essais ont été effectués pour déterminer la distribution de la taille des gouttelettes de l'aérosol tertiaire. Toutefois, l'impacteur à cascade piézo-électrique (QCM PC-2, California Measurements Inc., CA, USA; appartenant à l'IRSST, MTL) étant constitué d'un cylindre d'acier inoxydable a agi comme corps réfrigérant et a

provoqué la condensation de gouttelettes sur les oscillateurs piézo-électriques. Par conséquent, aucune donnée significative n'a pu être déterminée.

L'efficacité de transport des aérosols peut être déterminée indirectement par la mesure du liquide récupéré au rejet. Toutefois, cette technique ne donne aucune information quant à la distribution de la dimension des gouttelettes. De plus, elle ne permet qu'une approximation de la mesure de l'efficacité de transport car elle repose sur l'hypothèse que tout ce qui n'est pas récupéré se rend à la source d'excitation et d'ionisation. Or, ceci n'est pas entièrement vrai puisque des gouttelettes peuvent rester sur les parois de la chambre de nébulisation ou de tout autre tube de transport et provoquer des erreurs importantes sur la détermination.

Pour le couplage du nébuliseur thermique (TSP: 275 °C) et des chambres en « U » et à cyclone refroidies (-8 °C), l'efficacité de transport a été calculée à environ 6 %. L'efficacité de transport théorique que peut permettre la nébulisation thermique (50 %) est loin d'être atteinte. Cette perte d'efficacité peut être due à la dimension des gouttelettes formées à la sortie de notre capillaire. En effet, seules les gouttelettes les plus petites suivent la trajectoire du gaz porteur et se rendent au plasma. Dans le cas d'un nébuliseur thermique, l'emploi d'un capillaire qui possède un coefficient de transfert de chaleur adéquat est nécessaire pour obtenir des gouttelettes et, par conséquent, un capillaire d'acier inoxydable est suggéré. Nous avons utilisé le plus petit capillaire en acier inoxydable disponible, dont le diamètre interne est de 127 µm, et nous pouvons admettre que des gouttelettes de quelques dizaines de micromètre de diamètre sont formées. L'efficacité de transport peut également être modifiée par l'allure du panache de l'aérosol et le diamètre de la chambre de nébulisation. En effet, un TSP à 275 °C dont le capillaire est de 127 µm et utilisé avec un débit de 1 mL/min, forme un panache dont l'angle d'ouverture est de 20°, ce qui correspond à un cône de 7 mm de diamètre à 2,0 cm de l'embouchure du capillaire. Ce diamètre est comparable au diamètre interne des tubes qui forment les chambres de nébulisation à faible volume mort. Par conséquent, lorsque l'aérosol primaire entre en collision avec les parois, une première condensation se fait formant ainsi un col liquide qui diminue l'iris où le gaz porteur s'écoule. Seule une section centrale de cet aérosol parcourt la chambre. Nous pouvons donc nous attendre à ce que l'efficacité de transport soit plus faible que 50% et, tel que mesuré précédemment,

de l'ordre de 6 % dans notre cas. Ce pourcentage n'est pas anormalement bas et est très commun en spectrométrie à plasma.

Dû à des contraintes physiques de notre appareil pour le couplage entre le nébuliseur thermique et la chambre de nébulisation, le choix s'est porté sur le nébuliseur thermique inspiré de Elgersma (Elgersma *et al.*, 1991). La présence d'un joint sphérique sur le nébuliseur permet de diminuer le stress que provoque la chaleur excessive sur le connecteur de verre. L'effet de dilatation et de contraction est la principale source de fissure et de bris de la chambre. L'emploi d'un joint sphérique limite ces stress et offre une certaine latitude d'ajustement et de résistance. Par contre, le centrage du système de nébulisation devient plus délicat et difficile.

Au cours de ces études, plusieurs prototypes de nébuliseurs thermiques et de chambres de nébulisation ont été développés. Un spectromètre séquentiel d'émission atomique à plasma induit par haute fréquence (ICP 6500XR) a été utilisé pour caractériser le nébulisat et l'efficacité de la nébulisation de chacun de ces prototypes. Cet instrument est toutefois inapproprié pour l'étude simultanée de plusieurs longueurs d'onde. Seuls les résultats obtenus pour le meilleur dispositif sont rapportés.

III.3. COUPLAGE HPLC/ICP

Une étude préliminaire chromatographique pour la séparation des isoformes de la métallothionéine a été effectuée à la section III.1. Cependant, l'emploi du nébuliseur thermique peut modifier les conditions optimales de l'efficacité et de la qualité de la séparation des isoformes de la MT. Comme il a été mentionné à la section I.5.1.4, l'emploi d'un nébuliseur thermique nécessite l'optimisation de trois paramètres qui peuvent altérer la séparation des isoformes de la MT: i) la température du nébuliseur, ii) le débit de gaz porteur et iii) le débit liquide. Des études préliminaires ont été réalisées sur la température de refroidissement de la chambre de nébulisation et pour des températures entre -5 et -8 °C il ne semble plus y avoir de changements significatifs sur les signaux. Par conséquent, pour toutes les optimisations et les analyses subséquentes, des températures de -5 à -8 °C ont été utilisées.

La raie d'émission ionique du cadmium (Cd II 214,438 nm) a été utilisée pour établir les paramètres optimum pour le nébuliseur thermique couplé aux chambres de nébulisation à cyclone et en « U ». La colonne PRP-3 a été utilisée afin de considérer le

facteur d'élargissement qu'elle engendre sur les pics chromatographiques. L'optimisation a été effectuée avec le mélange organique de la séparation initiale (20% propanol:80% Tris-HCl) puisqu'elle empêche la rétention des MT sur la colonne. Les paramètres suivants ont été optimisés : i) la sensibilité, déterminée à partir de la mesure de la hauteur nette et/ou l'aire nette des signaux, ii) la limite de détection, par la mesure du rapport « signal (S)/bruit du signal de fond (S_{br}) », iii) la qualité de la séparation, déterminée par la largeur des pics chromatographiques à mi-hauteur et iv) l'efficacité de rinçage du système de nébulisation, mesurée par la largeur à 10% de la hauteur nette. Ce dernier paramètre permet de vérifier tout effet de mémoire qui proviendrait des chambres de nébulisation.

III.3.1. OPTIMISATION DU DÉBIT DU GAZ PORTEUR DE L'AÉROSOL

Le débit du gaz porteur de l'aérosol a été varié de 0,75 à 1,25 L/min à différentes températures de nébulisation (200, 225, 238, 250 et 275 °C) et à différents débits de liquide porteur et l'influence de la variation de ces paramètres sur le signal de l'analyte a été étudiée. Puisque la mesure se fait par injection de 100 μ L d'échantillon, l'intensité du signal transitoire obtenu peut s'exprimer selon l'aire ou la hauteur du pic chromatographique.

Le débit du gaz porteur joue un rôle important sur le signal puisqu'il détermine le temps de résidence de la gouttelette dans le plasma dans lequel la désolvatation, la volatilisation, l'atomisation, l'ionisation et/ou l'excitation s'effectuent. Puisque chacune de ces étapes représente un équilibre, un temps de résidence plus important permet aux atomes de notre analyte contenus dans la gouttelette d'atteindre l'étape d'excitation. Par conséquent, la diminution du temps de résidence de l'analyte explique la perte de signal en fonction du débit du gaz porteur pour tous les débits de liquide et toutes les températures du TSP à la Figure 25. Cette décroissance s'explique par une diminution de l'efficacité combinée de l'atomisation, de l'excitation et d'ionisation de l'analyte. Pour des débits de gaz porteur supérieurs à 1,0 L/min, le temps de résidence est trop faible et le signal est pratiquement nul. Pour un débit du gaz porteur de 0,75 L/min et pour le

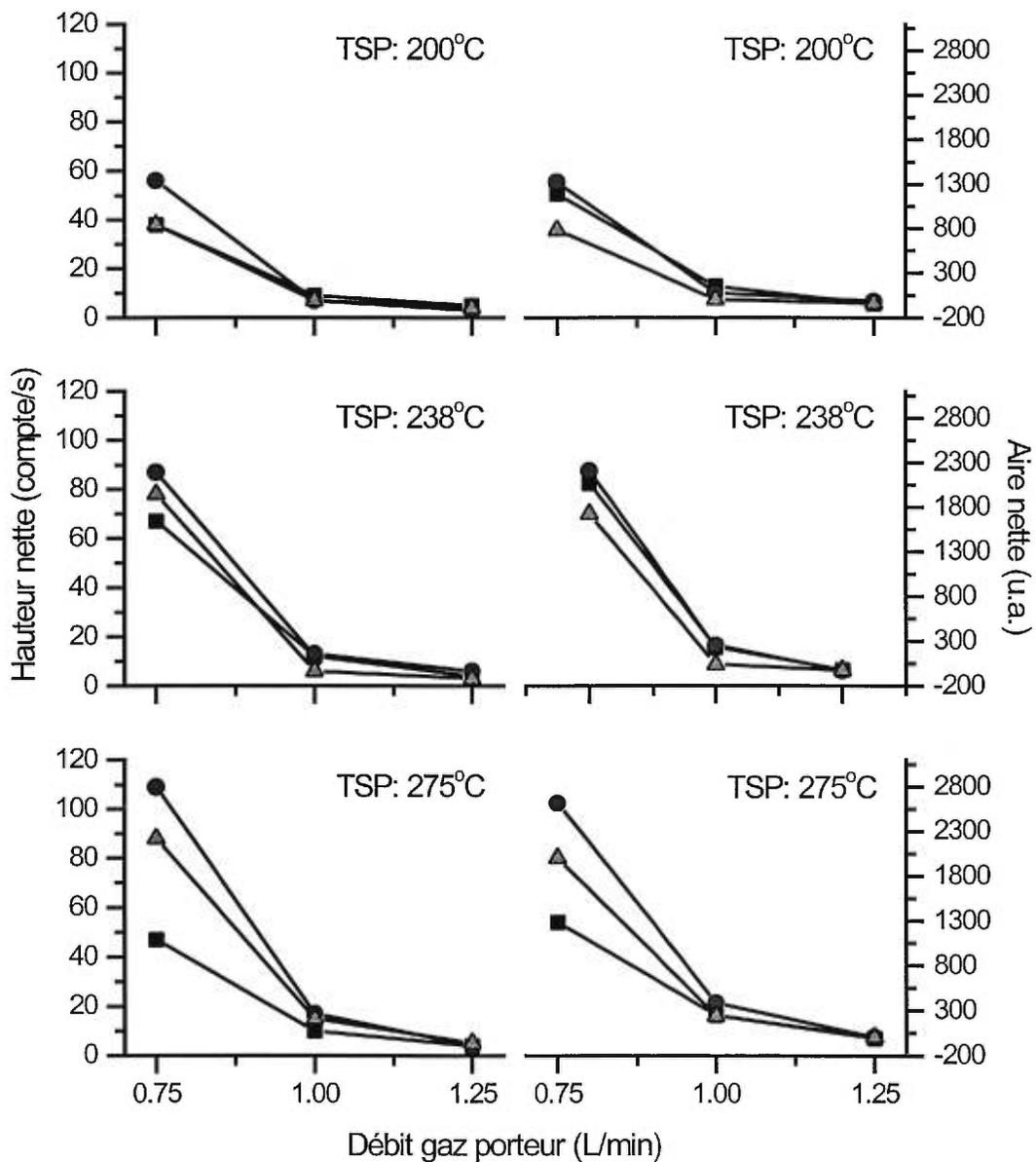


Figure 25: Influence du débit du gaz porteur sur le signal net de la raie du cadmium (Cd II 214,438 nm) pour différentes conditions de débit du liquide: (—■—) 0,8 mL/min, (—●—) 1,0 mL/min, (—▲—) 1,2 mL/min.

domaine de températures du nébuliseur étudié, un maximum est observé pour un débit liquide de 1,0 mL/min et le signal (hauteur ou aire) augmente avec l'augmentation de la température. On remarque également que selon le débit liquide utilisé, l'intensité maximale du signal ne se situe pas à la même température (0,8 mL/min, 238 °C; 1,0 mL/min, 275 °C). En effet, ce comportement s'explique par l'importance de bien choisir la température du nébuliseur, qui représente la quantité de chaleur fournie au liquide, et le débit liquide pour que la nébulisation s'effectue à l'embouchure du capillaire. Comme la longueur du tube chauffé est constante (6,0 cm), plusieurs maxima du signal seront obtenus en fonction des débits liquides utilisés.

De la Figure 27, on remarque que les largeurs des pics ($H/2$) sont indépendantes de la température. En effet, la largeur d'un pic est liée au facteur de rinçage de la chambre et de l'efficacité de la séparation des isoformes donc du débit du gaz porteur et du débit liquide respectivement. Un élargissement trop important amène une asymétrie du pic et peut donc empêcher la détection des isoformes subséquentes de plus faible intensité.

Le débit du gaz porteur influence également la vitesse de rinçage des chambres de nébulisation et l'intensité du signal. En effet, un faible débit du gaz nébuliseur entraîne une augmentation du temps de rinçage de la chambre qui se traduit par une augmentation de la largeur à 10% de la hauteur maximale du pic chromatographique (Figure 26).

Puisque le débit du gaz porteur influence deux réponses de comportement opposé, un compromis est nécessaire entre un temps de résidence assez long de l'échantillon dans le plasma, mais pas trop long dans la chambre de nébulisation.

III.3.2. OPTIMISATION DE LA TEMPÉRATURE DU NÉBULISEUR THERMIQUE

La seconde étape de l'optimisation se concentre sur l'optimisation de la température du TSP. La limite supérieure de température est déterminée par la fusion de la bague d'étanchéité en téflon du nébuliseur thermique. Le téflon ramollit aux environs de 325-350 °C, par conséquent, la température limite a été établie à 275 °C.

Une optimisation plus approfondie a été effectuée (Figure 27). Sur cette figure on constate que pour des débits liquides de 0,9 et 1,0 mL/min, la température optimale se situe aux environs de 250 et 260 °C pour l'obtention d'un signal optimum (aire ou

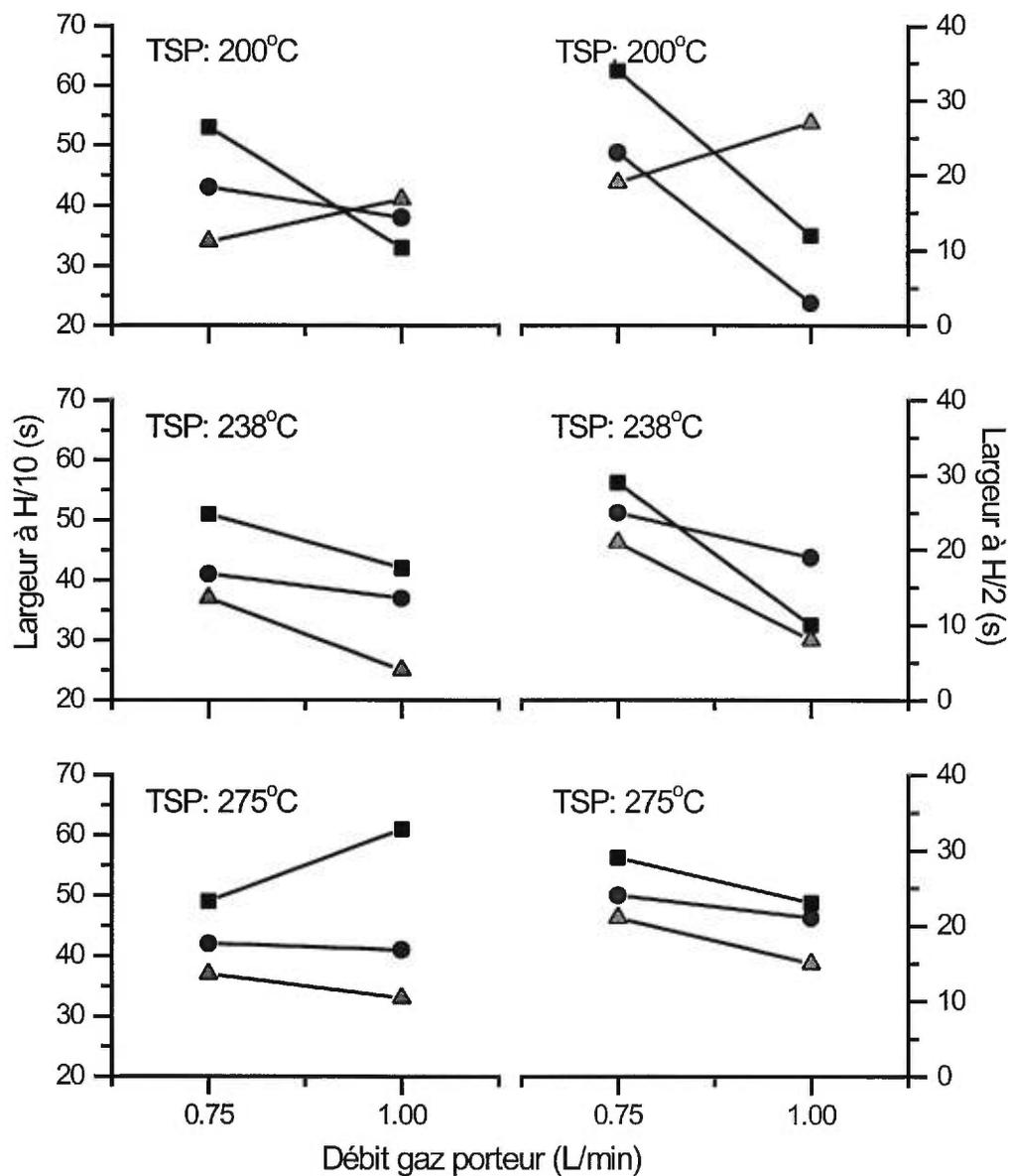


Figure 26: Influence du débit du gaz porteur sur la largeur du pic à 10% et 50% de la hauteur du signal du cadmium (Cd II 214,438 nm) pour différentes conditions de débit du liquide: (—■—) 0,8 mL/min, (—●—) 1,0 mL/min, (—▲—) 1,2 mL/min.

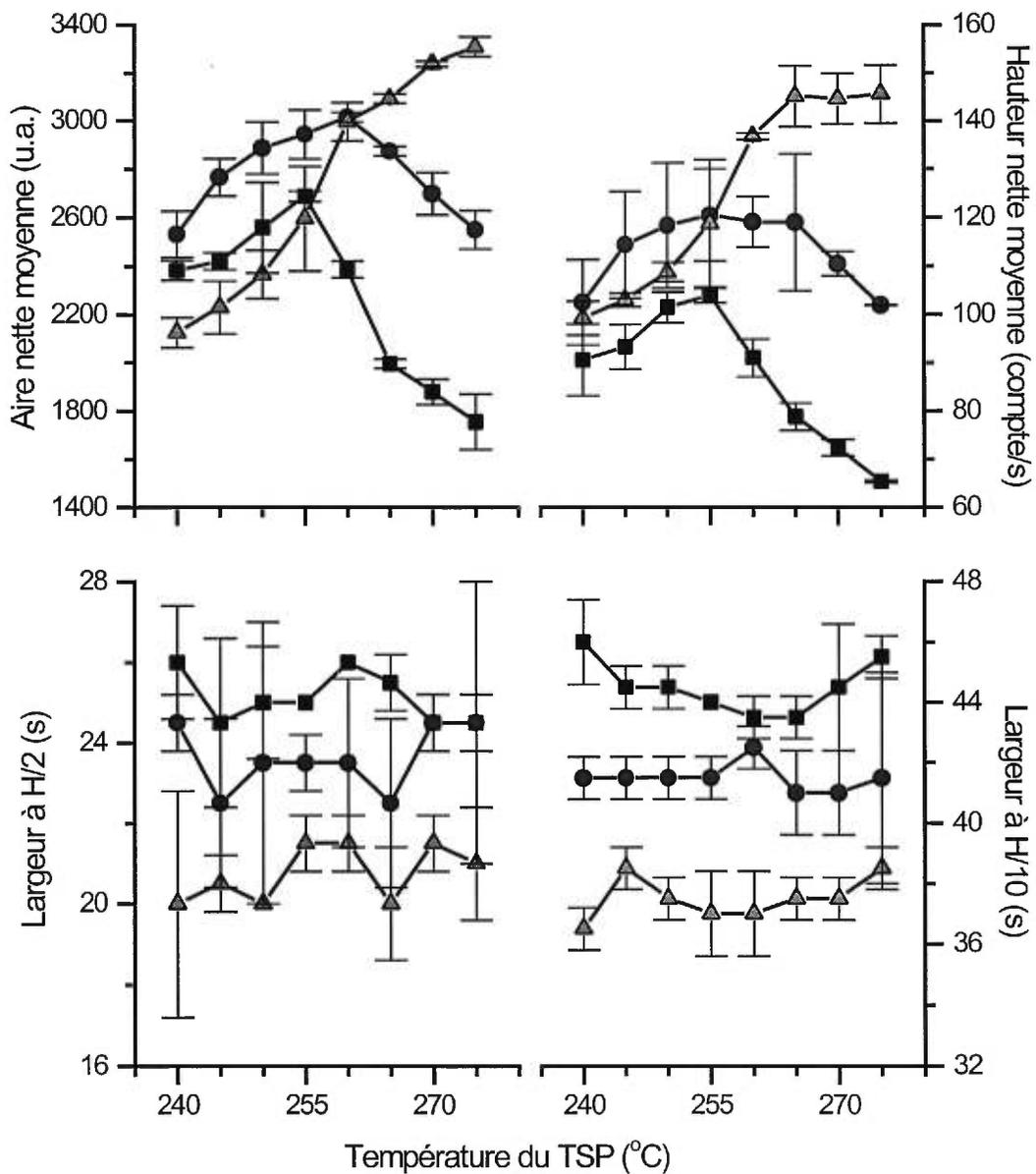


Figure 27: Détermination de la température de TSP en vue de l'optimisation du signal et des différents critères. Le débit du gaz porteur est fixé à 0,75 L/min. Débit du liquide: (—■—) 0,9 mL/min, (—●—) 1,0 mL/min, (—▲—) 1,1 mL/min.

hauteur). Entre ces deux températures le rapport S/S_{bf} est également optimum (Figure 28).

Une nébulisation plus régulière du liquide à plus haute température du TSP est responsable de cette amélioration du rapport S/S_{bf} . On remarque également que pour des températures supérieures à la température optimale, une baisse du signal est observée. On peut expliquer cette diminution par une nébulisation qui se fait à l'intérieur du tube nébuliseur pouvant provoquer ainsi une formation irrégulière de gouttelettes et peut-être la pyrolyse de notre analyte et donc une baisse de quantité d'échantillon qui se rend au plasma. Pour un débit de liquide supérieur à 1,1 mL/min, le signal semble augmenter avec la température et on n'observe pas cette diminution puisque nous sommes limités à 275 °C pour les raisons mentionnées précédemment.

La température de nébulisation influence la taille des gouttelettes de l'aérosol et par conséquent a un effet sur la vitesse de désolvatation de celles-ci. De plus, la formation de gouttelettes plus fines permet d'augmenter le nombre de gouttelettes qui se rend au plasma améliorant ainsi la sensibilité mais augmentant la charge du plasma.

De la Figure 27, on remarque qu'il existe une température où le maximum de signal (aire) diffère selon le débit du liquide porteur. Les autres réponses telles que la largeur à la mi-hauteur, la largeur à 10% de la hauteur nette et le rapport « signal sur le signal de fond (S/S_{bf}) » (Figure 27), doivent être considérées dans le choix des conditions optimales. Comme il a été dit au début de cette section, chacune de ces réponses représente un paramètre important à considérer dans le couplage. La composition du solvant peut également entraîner des fluctuations de la température de nébulisation car chaque mélange possédera des propriétés physiques différentes. Ceci est d'autant plus important que la séparation des isoformes de la MT utilise un gradient d'élution et ce gradient va engendrer une modification dans la composition du solvant et par conséquent va influencer la qualité de la nébulisation par une diminution ou une augmentation de la température du TSP. Nous cherchons donc à travailler dans une région où le signal analytique ne varie pas ou varie peu avec une variation de la température.

Cette optimisation nous pousse à considérer une température du nébuliseur de

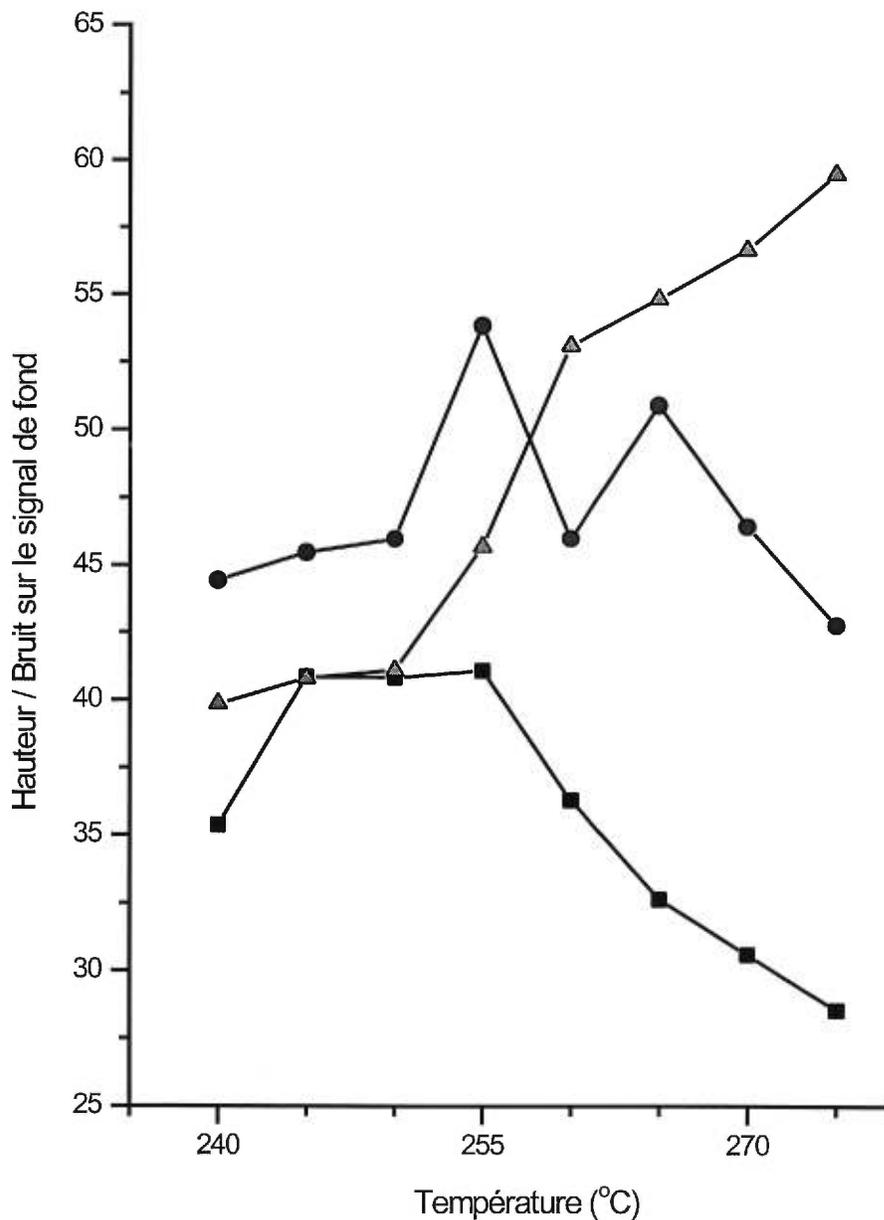


Figure 28: Influence de la température du TSP sur le rapport de la hauteur nette sur le bruit du signal de fond pour la raie du cadmium (Cd II 214,438 nm). Débit du liquide (—■—) 0,9 mL/min, (—●—) 1,0 mL/min, (—▲—) 1,1 mL/min. Le cadmium est lié à la MT. Le bruit sur le signal de fond (S_{bf}) est déterminé comme étant l'écart-type des 20 premières secondes d'acquisition en l'absence d'analyte.

275 °C avec un débit liquide de 1,1 mL/min puisque le rapport signal sur bruit du signal de fond est le plus élevé et qu'une faible variation de température ne semble pas affecter de façon importante la variation du signal et de ce rapport ($\pm 10\%$).

III.3.3. OPTIMISATION DU DÉBIT DE LA PHASE MOBILE

Le débit de la phase mobile joue un rôle sur la qualité de la séparation des isoformes de la MT et sur l'efficacité de la nébulisation. Dans le premier cas, il est responsable de l'élargissement des pics chromatographiques et par conséquent de la hauteur du signal. Dans le second cas, un aérosol formé à la sortie du capillaire est recherché puisqu'il limite les problèmes de dépôts à l'intérieur du tube de nébulisation. Un faible débit du liquide et une température élevée peuvent amener la pyrolyse des produits organiques à l'intérieur du tube. Ces dépôts entraînent une diminution du diamètre intérieur limitant par la suite le débit d'écoulement du liquide. À la suite de plusieurs cycles, un bouchon est finalement formé éliminant tout signal.

Comme il a été mentionné antérieurement, le mécanisme de nébulisation dans un TSP doit permettre la nébulisation à la sortie du capillaire. Pour contrôler ce facteur, il faut soigneusement ajuster le débit du liquide et la température du nébuliseur. La Figure 27 illustre bien cet effet sur la variation de l'intensité du signal en fonction de la température. Si ces conditions sont préservées, un débit liquide plus élevé amène une augmentation du signal puisqu'il augmente la quantité d'analyte se rendant au plasma par unité de temps.

Puisque les quantités d'analytes (métaux liés à la MT) prévues sont faibles, il est nécessaire de respecter les conditions qui fournissent une sensibilité maximale. Par conséquent, les conditions optimales d'utilisation du nébuliseur thermique couplé aux chambres cyclone et «U» sont un débit liquide de 1,1 mL/min, une température de 275 °C et un débit de gaz porteur de 0,75 L/min.

III.3.4. COMPARAISON DES SYSTÈMES DE NÉBULISATION

Une comparaison a été faite entre le système de nébulisation pneumatique conventionnel d'un ICP-AES et le système TSP que nous avons développé. Les conditions d'opérations utilisées sont les conditions optimales obtenues pour les deux

systèmes. Le système de nébulisation conventionnel est composé d'un nébuliseur pneumatique concentrique (Meinhard) et d'une chambre cyclone non-refroidie de 60 mL. Le second système est composé du nébuliseur thermique et de deux chambres de nébulisation juxtaposées, la première est une chambre de désolvation en forme de « U » refroidie et la seconde est une chambre cyclone refroidie. Le volume total de ce dernier système est de 35 mL. Un volume de 100 μ L d'une solution de MT 3,3 μ M (dans une solution de Tris-HCl) est injectée dans les deux systèmes et le même débit de liquide porteur est utilisé dans les deux cas.

La Figure 29 représente les signaux transitoires obtenus pour le cadmium et on constate que l'utilisation du système thermique augmente le signal d'un facteur 4. Cette augmentation du signal peut donc être attribuée à quatre facteurs : i) la qualité de l'aérosol, ii) l'efficacité de transport vers le plasma, iii) l'apport énergétique que le TSP fournit aux produits et iv) le temps de résidence de l'analyte dans le système d'introduction d'échantillon et dans le plasma.

Le premier facteur qui pourrait expliquer la différence observée entre les signaux analytiques obtenus avec les deux systèmes de nébulisation, est la qualité de l'aérosol produit. Cette qualité dépend de la taille des gouttelettes et de leur distribution en taille. Nous savons que les propriétés physiques (densité, viscosité et tension superficielle) varient avec la composition du solvant et avec la température. Nous savons également que la formation d'un aérosol primaire à l'aide d'un nébuliseur dépend de ces mêmes propriétés physiques. Pour un nébuliseur pneumatique, nous pouvons estimer le diamètre moyen des gouttelettes (diamètre de Sauter) à l'aide de l'équation [2] (p.39). Nous savons que la tension superficielle d'un liquide décroît généralement avec la température, donc nous pouvons admettre qu'une élévation de température va favoriser la formation de gouttelettes de plus petits diamètres. Comme nous ne disposons pas des valeurs des variations des tensions superficielles en fonction de la température pour notre système, nous ne pouvons calculer l'effet de ce paramètre sur la taille des gouttelettes. Par contre nous disposons de quelques valeurs de viscosités pour l'eau et pour le propanol à quelques températures et nous pouvons donc calculer la variation relative de la taille des gouttelettes selon l'équation [2]. Lorsque l'eau est le solvant, cette équation nous montre que le diamètre moyen à 70 °C est 0,7 fois le diamètre à 20 °C. Pour le propanol la

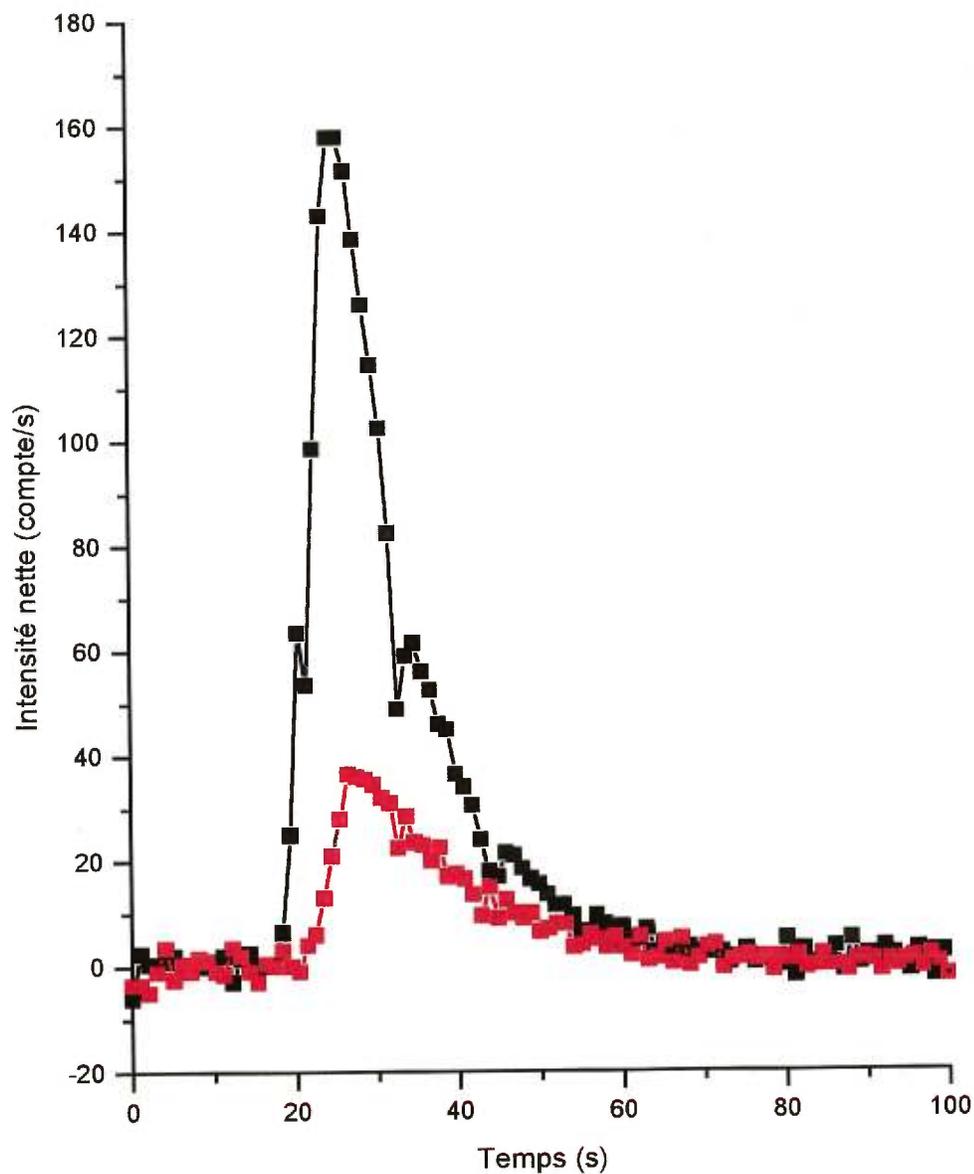


Figure 29: Comparaison des systèmes de nébulisation pour une injection de 100 μ L de MT (3,3 μ M) dans un ICP-AES (IRIS-AP). La quantité absolue de cadmium injectée est de 1,1 nmol. Cd II 214,438 nm. (—■—) TSP avec chambre cyclone refroidie et chambre «U» refroidie, (—■—) Pneumatique concentrique avec chambre cyclone non-refroidie.

diminution est du même ordre (0,6 au lieu de 0,7). Nous pouvons donc admettre que la variation de diamètre pour le TSP va dans le même sens et est probablement au moins égale à celle prédite pour le nébuliseur pneumatique. La masse (ou le volume) moyenne des gouttelettes diminuera donc d'environ 4 fois lorsqu'on augmente la température de 20 à 70 °C et la désolvation de ces gouttelettes sera plus facile. Comme le TSP fonctionne à des températures plus élevées (275 °C), nous pouvons admettre que cet effet sera encore plus favorable pour la production de petites gouttelettes. L'amélioration de la taille des gouttelettes va donc contribuer à l'augmentation de la sensibilité analytique.

En ce qui concerne la distribution des tailles de gouttelettes de l'aérosol primaire, nous savons que la présence d'un solvant organique contribue généralement à resserrer la distribution des tailles autour d'une valeur moyenne et ceci est favorable au transport vers le plasma et à la stabilité du signal analytique émis dans le plasma.

Comme nous venons de le voir, l'aérosol produit avec le TSP est composé de gouttelettes plus petites et l'efficacité de transport vers le plasma sera meilleure, car un plus grand nombre de particules traverseront la chambre de nébulisation (aérosols secondaire et tertiaire) pour se rendre au plasma. Ce facteur contribuera donc à augmenter le signal analytique obtenu avec le TSP par rapport à celui d'un nébuliseur pneumatique. Un autre facteur à considérer dans le cas du système TSP est la désolvation de l'aérosol qui est améliorée par l'utilisation d'une chambre de nébulisation refroidie. L'aérosol sec ou partiellement sec introduit dans le plasma laissera plus d'énergie du plasma pour l'atomisation et l'excitation des analytes. Cet effet contribuera également à améliorer la qualité de l'aérosol qui se rendra au plasma et contribuera à augmenter le signal analytique.

L'augmentation de l'efficacité de transport n'a cependant pas que des effets positifs. En effet une efficacité supérieure de transport amène une quantité plus importante d'échantillon au plasma, ce qui pourrait entraîner des conditions de surcharge du plasma en échantillon. Dans ce cas le signal analytique va décroître.

Un autre aspect à considérer est l'énergie fournie par le TSP. En effet, si cette énergie excède celle nécessaire à la nébulisation et à la désolvation, cette énergie supplémentaire sera distribuée aux différentes liaisons des protéines contenues dans l'échantillon et pourra contribuer à faciliter la rupture des liens métal - thiolate. Une fois

de plus l'atomisation et l'excitation des analytes seront facilitées et une augmentation du signal sera alors enregistrée.

Enfin, le dernier facteur à considérer est le temps de résidence de l'échantillon dans le système de nébulisation et dans le plasma. Comme nous l'avons vu pour un nébuliseur pneumatique, la formation des gouttelettes et leur transport dépendent de la vitesse du gaz nébuliseur (et porteur), alors que pour un nébuliseur thermique la formation de l'aérosol est indépendante du gaz porteur. Dans le premier, les contraintes liées à la nébulisation font que l'on ne peut pas optimiser adéquatement le débit du gaz porteur et donc le temps de résidence de l'analyte dans le plasma, alors que pour le TSP, il est possible d'optimiser le temps de résidence dans le plasma. Ce paramètre permettra d'optimiser la désolvatation dans le plasma et toutes les étapes subséquentes d'atomisation et d'excitation. Une augmentation du temps de résidence se traduira par une augmentation du signal analytique.

En conclusion, lors du passage du nébuliseur pneumatique au TSP, les divers effets contribuent généralement tous à augmenter le signal analytique, le seul effet négatif étant la surcharge du plasma due à un système de transport trop efficace. Toutefois, l'expérience que nous avons faite ne permet pas de quantifier et de déterminer la contribution de tous ces facteurs à l'augmentation du signal.

Quant à la largeur du signal, on n'observe pas de différence significative malgré la différence de volume mort qui existe entre les deux systèmes. L'absence d'élargissement supplémentaire dans le système à nébuliseur pneumatique, où le volume de la chambre est plus grand, peut être expliquée par l'utilisation d'un débit de gaz « porteur » plus grand (1,0 L/min) qui entraîne un temps de résidence plus court dans le système de nébulisation et dans le plasma.

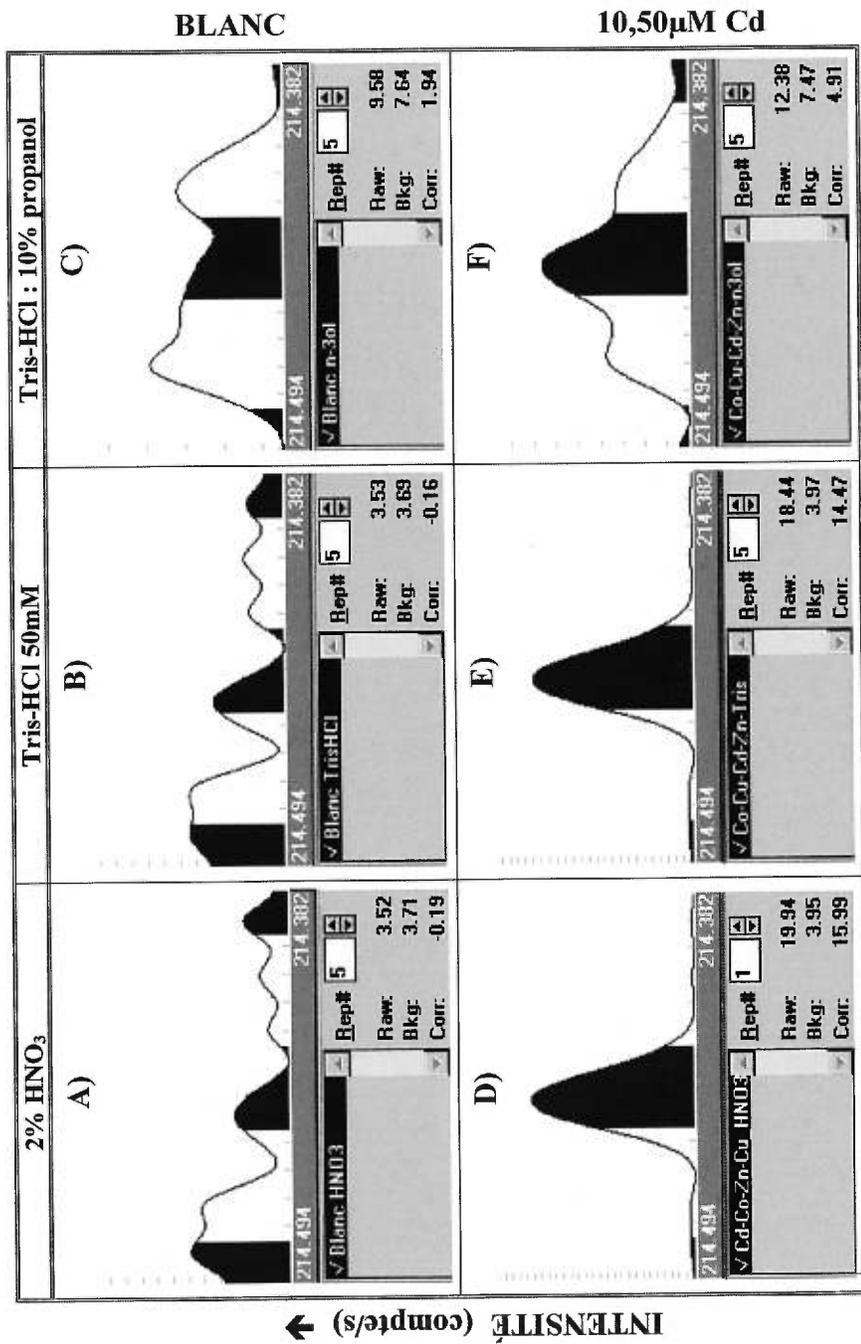
III.4. ÉTUDE DE LA SÉPARATION DES MT PAR ICP-AES

Tout d'abord, nous allons décrire le mode de mesure utilisé en spectrométrie d'émission atomique à plasma ICP (ICP-AES). Durant l'ensemble de nos travaux plusieurs systèmes de détection ont été utilisés. Dans un premier temps, pour la mise au point du nébuliseur thermique (TSP), nous avons utilisé un système de détection séquentiel. Cet appareil, le seul disponible au laboratoire, nous a permis d'effectuer quelques optimisations du TSP et de son couplage avec un chromatographe liquide. La

principale limitation de ce système est, comme nous l'avons décrit dans la revue de la littérature, que seule la longueur d'onde d'analyse peut être mesurée et qu'aucune information simultanée n'est disponible sur le signal de fond. Par la suite, nous avons obtenu un prototype d'un système simultané à réseau échelle à matrice de photomultiplicateurs (Maxim), mais malgré de nombreux efforts durant plusieurs mois ce système n'a jamais été fonctionnel (problèmes de logiciels pour l'analyse de signaux transitoires, faible sensibilité dans l'UV due à la dégradation des matériaux composites constituant le spectromètre et aux dépôts de produits de dégradation de ces matériaux sur les composantes optiques réduisant ainsi l'efficacité du système dans l'UV). Nous avons enfin eu un accès limité à un système simultané (IRIS) à réseau échelle à matrice de CID du Centre St-Laurent. Les mesures que nous rapportons ont été obtenues sur cet appareil.

III.4.1. CARACTÉRISATION DES LONGUEURS D'ONDE D'ANALYSE

Le système IRIS permet la lecture simultanée de plusieurs longueurs d'onde ainsi que la mesure du signal de fond. Cette possibilité est importante puisqu'elle permet de meilleures mesures des signaux nets des raies d'émission. La Figure 30 montre plusieurs spectres au voisinage de la raie du Cd II à 214,438 nm, ces spectres ont été obtenus pour différents solvants avec un nébuliseur pneumatique concentrique et une chambre de nébulisation cyclone non-refroidie. Sur la Figure 30A, la zone centrale "sombre" du spectre correspond à un ensemble de six pixels qui permettent la mesure du signal à la longueur d'onde du cadmium (Section II.3.1.). Les zones "sombres" à gauche et à droite correspondent à deux ensembles de trois pixels qui permettent la mesure du signal de fond de part et d'autre de la raie analytique du cadmium. L'intensité brute intégrée à la longueur d'onde du cadmium (Raw: 3,52) est rapportée, de même que la somme des intensités intégrées des deux zones de mesure du signal de fond (Bkg: 3,71). Enfin, l'intensité nette est donnée sur le spectre (Corr: -0,19). Dans ce cas, ceci indique que, pour cet échantillon qui est un blanc, l'intensité nette est essentiellement nulle. La Figure 30D représente le même spectre obtenu pour une solution étalon contenant 10,5 μM de Cd. Sur ce spectre on constate que l'intensité nette est de 15,99, alors que l'intensité brute est de 19,94. L'utilisation des intensités nettes permet ainsi d'améliorer l'exactitude de la mesure. En effet, sans correction du fond spectral, nous aurions fait une erreur de près de +25% sur la mesure des concentrations.



← LONGUEUR D'ONDE (nm)

Figure 30: Effet du solvant sur le signal de fond pour le cadmium (Cd II 214,438nm) avec un nébuleur pneumatique en aspiration continue: Blanc A) 2% HNO₃, B) Tris-HCl, C) Tris-HCl:10% propanol; Étalon de Cd 10,5 μM D) 2% HNO₃, E) Tris-HCl, F) Tris-HCl:10% propanol.

Pour avoir un aperçu de la variabilité du signal de fond et du signal analytique en fonction de la composition du solvant, nous avons enregistré au voisinage de la raie du cadmium les spectres de blancs et de solutions étalons dans trois solvants : i) Eau – 2% HNO₃ (A, D), ii) Eau – Tris-HCl (B, E) et iii) Eau – Tris-HCl :10% Propanol (C, F). Si nous comparons les spectres des blancs, nous constatons que les spectres des blancs dans l'eau – 2% HNO₃ (A) et dans l'eau – Tris-HCl (B) sont identiques et correspondent principalement à du bruit sur le signal de fond. Par contre le spectre du blanc dans l'eau – Tris-HCl :10% Propanol (C) est différent et présente une structure avec des maxima vers 214,42 et 214,47 nm. Cette structure étant également présente sur le spectre de la solution étalon dans le même solvant (F) nous avons donc une bonne certitude que nous sommes en présence d'une interférence spectrale due à des espèces présentes dans le plasma et provenant du solvant organique. La présence de cette structure dans le signal de fond rend également la correction difficile. Nous pouvons constater que la correction apportée par la mesure des signaux aux deux positions de correction du signal de fond est trop faible par rapport à la perturbation qu'apportera la présence de ce fond structuré au voisinage immédiat de la raie analytique du Cd. On note sur le spectre (C) que la correction apportée pour le fond spectral laisse un signal résiduel de 1,94, ce qui n'était pas le cas dans le cas des spectres (A) et (B). Cette correction imparfaite va nous donner une surestimation du signal dû au cadmium, mais cette surestimation aurait été pire sans correction de fond spectral.

Pour tenter de confirmer l'origine de la structure observée en présence d'un solvant organique, nous avons enregistré les spectres de divers blancs "organiques" au voisinage de la longueur d'onde d'analyse du Cd. La Figure 31 représente le spectre du signal de fond dans : i) Eau – Tris-HCl (A), ii) Eau – Tris-HCl :10% propanol (B), iii) Eau – Tris-HCl :60% propanol (C) et iv) Eau – Tris-HCl :60% acétonitrile (D). L'augmentation du pourcentage de n-propanol dans la solution ne fait qu'augmenter les intensités des signaux d'environ un facteur deux à 214,42 et 214,47 nm. Le remplacement du propanol par l'acétonitrile donne pour le spectre du solvant une structure plus complexe, mais semble également posséder des maxima au voisinage de 214,42 et 214,47 nm. Le remplacement du n-propanol par de l'acétonitrile amène une augmentation plus considérable du signal de fond (facteur quatre). L'intensité du fond

spectral à la longueur d'onde du Cd augmente également avec l'augmentation de la fraction organique du solvant et également est plus forte avec l'acétonitrile qu'avec le propanol. La même expérience a été répétée aux voisinages des autres longueurs d'onde analytiques.

Nous avons enregistré au voisinage de la raie du cobalt à 228,616 nm (Figure 32) les spectres de blancs et de solutions étalons dans deux solvants : i) Eau – Tris-HCl (A, C) et ii) Eau – Tris-HCl :10% Propanol (B, D). Si nous comparons les spectres des blancs, nous constatons que les spectres des blancs dans l'eau – Tris-HCl (A) et dans l'eau – Tris-HCl :10% Propanol (B) sont légèrement différents et diffèrent par une intensité du fond spectral plus grande en présence du solvant organique. Le spectre est cependant moins structuré que dans le cas de la longueur d'onde du Cd. Le même déplacement de fond spectral est observé pour le spectre de la solution étalon dans le même solvant (D). Nous avons donc une bonne certitude que nous sommes en présence d'une interférence spectrale de type déplacement de fond spectral provenant d'espèces présentes dans le solvant.

Nous avons ensuite enregistré au voisinage de la raie du zinc (Figure 33) à 213,856 nm les spectres de blancs et de solutions étalons dans deux solvants : i) Eau – Tris-HCl (A, C) et ii) Eau – Tris-HCl :10% Propanol (B, D). Si nous comparons les spectres des blancs, nous constatons que les spectres des blancs dans l'eau – Tris-HCl (A) et dans l'eau – Tris-HCl :10% Propanol (B) sont légèrement différents. L'intensité du fond spectral est plus grande en présence du solvant organique, mais le spectre est cependant moins structuré que dans le cas de la longueur d'onde du Cd, mais plus structuré que dans le cas de Co. Le même déplacement de fond spectral est observé pour le spectre de la solution étalon dans le même solvant (D). Nous avons donc une bonne certitude que nous sommes en présence d'une interférence spectrale provenant d'espèces présentes dans le solvant. Nous constatons également que l'intensité de la raie du zinc est beaucoup plus faible, voire inexistante, dans la solution organique.

Nous avons enfin enregistré au voisinage de la raie du cuivre (Figure 34) à 324,754 nm les spectres de blancs et de solutions étalons dans deux solvants : i) Eau – Tris-HCl (A, C) et ii) Eau – Tris-HCl :10% propanol (B, D). Si nous comparons les

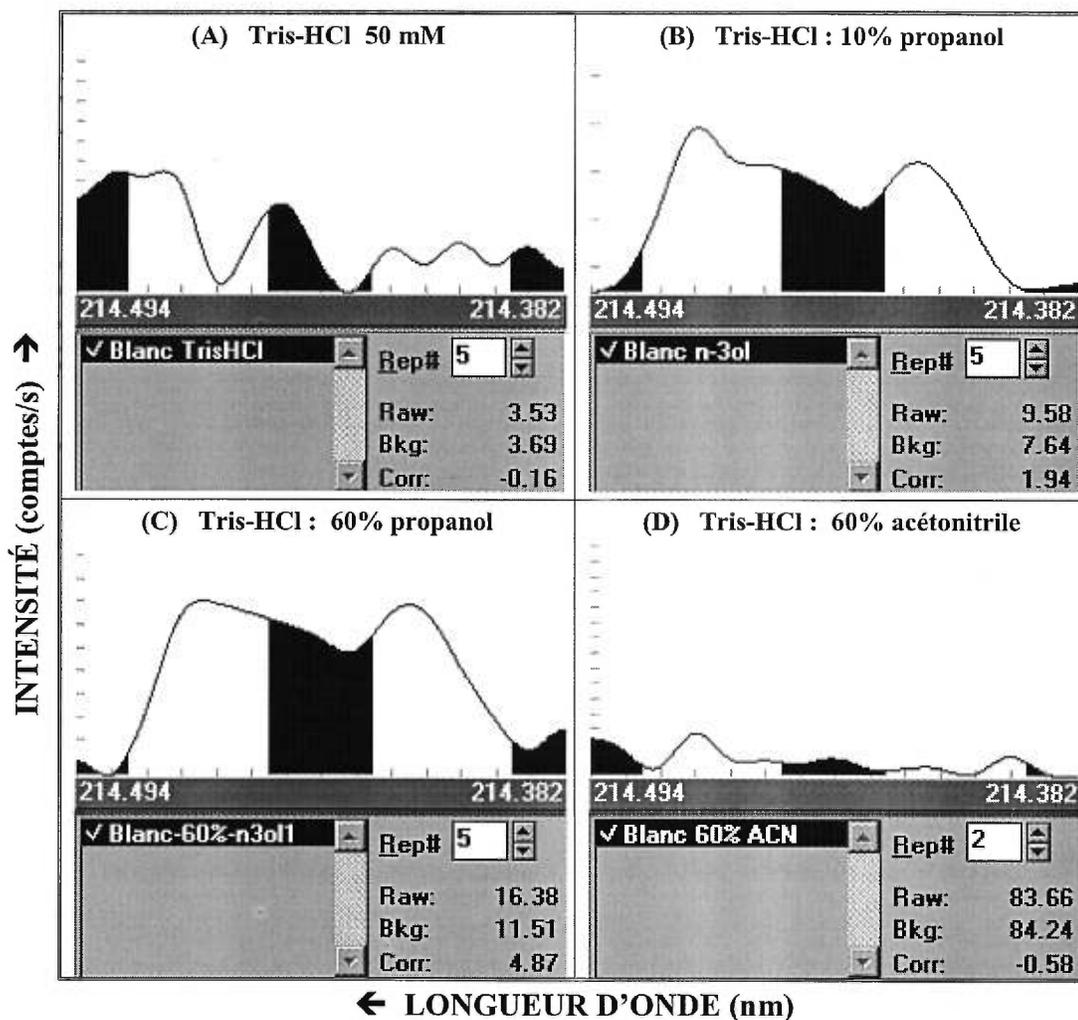


Figure 31: Comparaison du signal de fond entre le propanol et l'acétonitrile pour la raie du cadmium (Cd II 214,438 nm); Blanc A) Tris-HCl, B) Tris-HCl: 10% propanol, C) Tris-HCl:60% propanol et D) Tris-HCl: 60% acétonitrile.

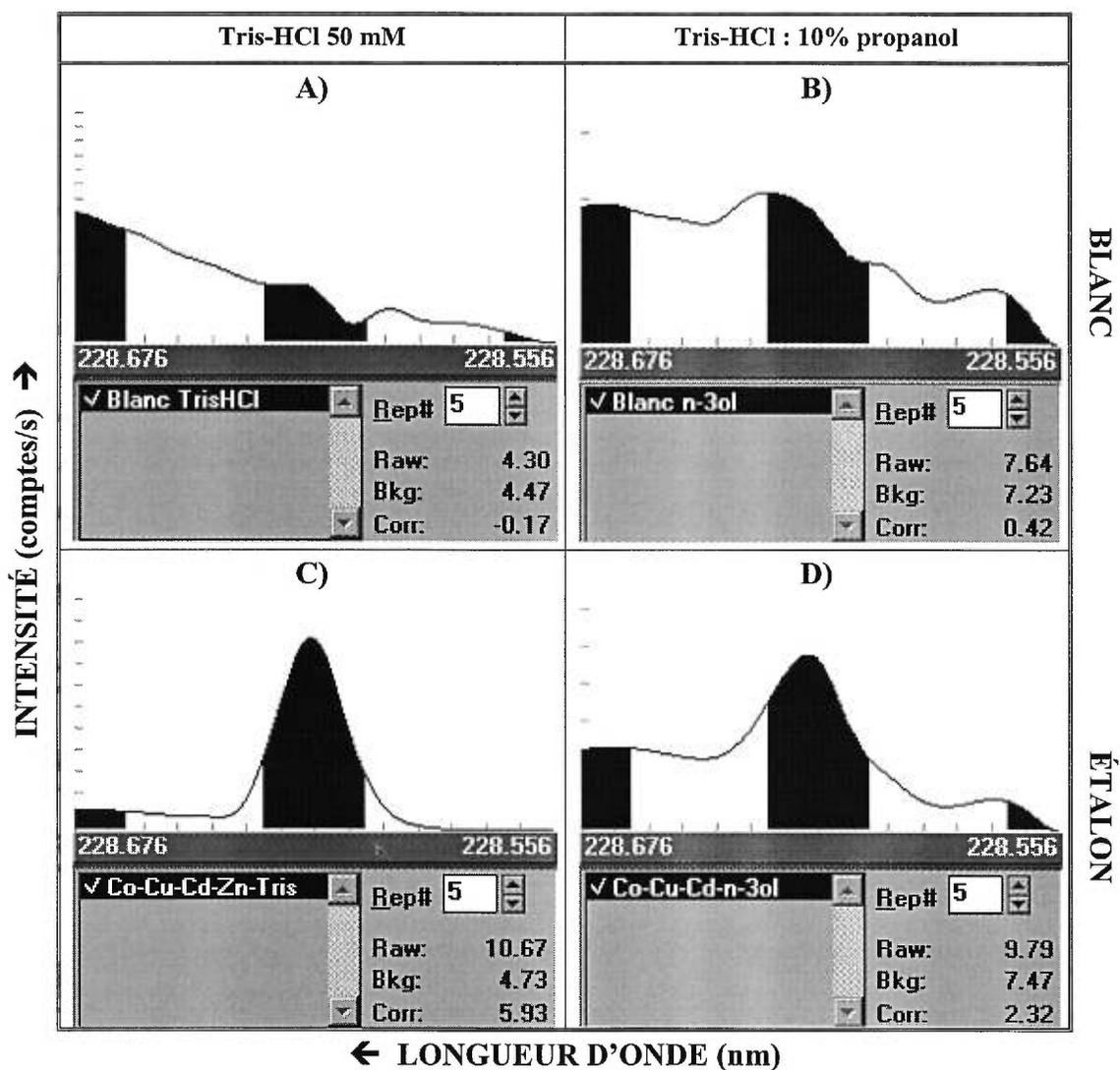


Figure 32: Effet du solvant sur le signal de fond pour le cobalt (Co II 228,616 nm) avec un nébuliseur pneumatique concentrique en aspiration continue: Blanc A) Tris-HCl, B) Tris-HCl:10% propanol; Étalon de Co 10,2 μ M C) Tris-HCl, D) Tris-HCl:10% propanol.

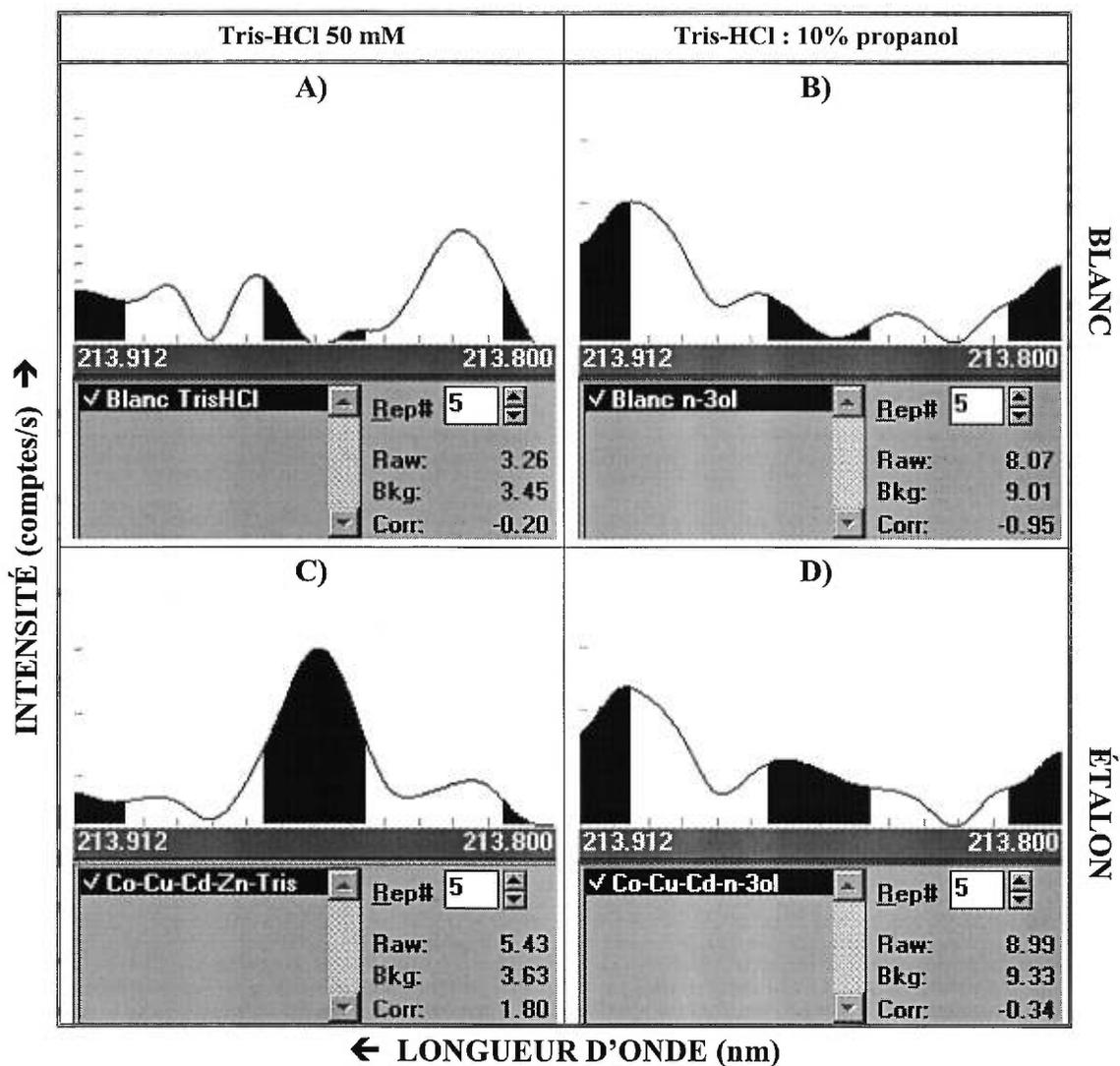


Figure 33: Effet du solvant sur le signal de fond du zinc (Zn I 213,856 nm) avec un nébuliseur pneumatique concentrique en aspiration continue: Blanc A) Tris-HCl, B) Tris-HCl:10% propanol; Étalon de Zn 1,5 μ M C) Tris-HCl, D) Tris-HCl:10% propanol.

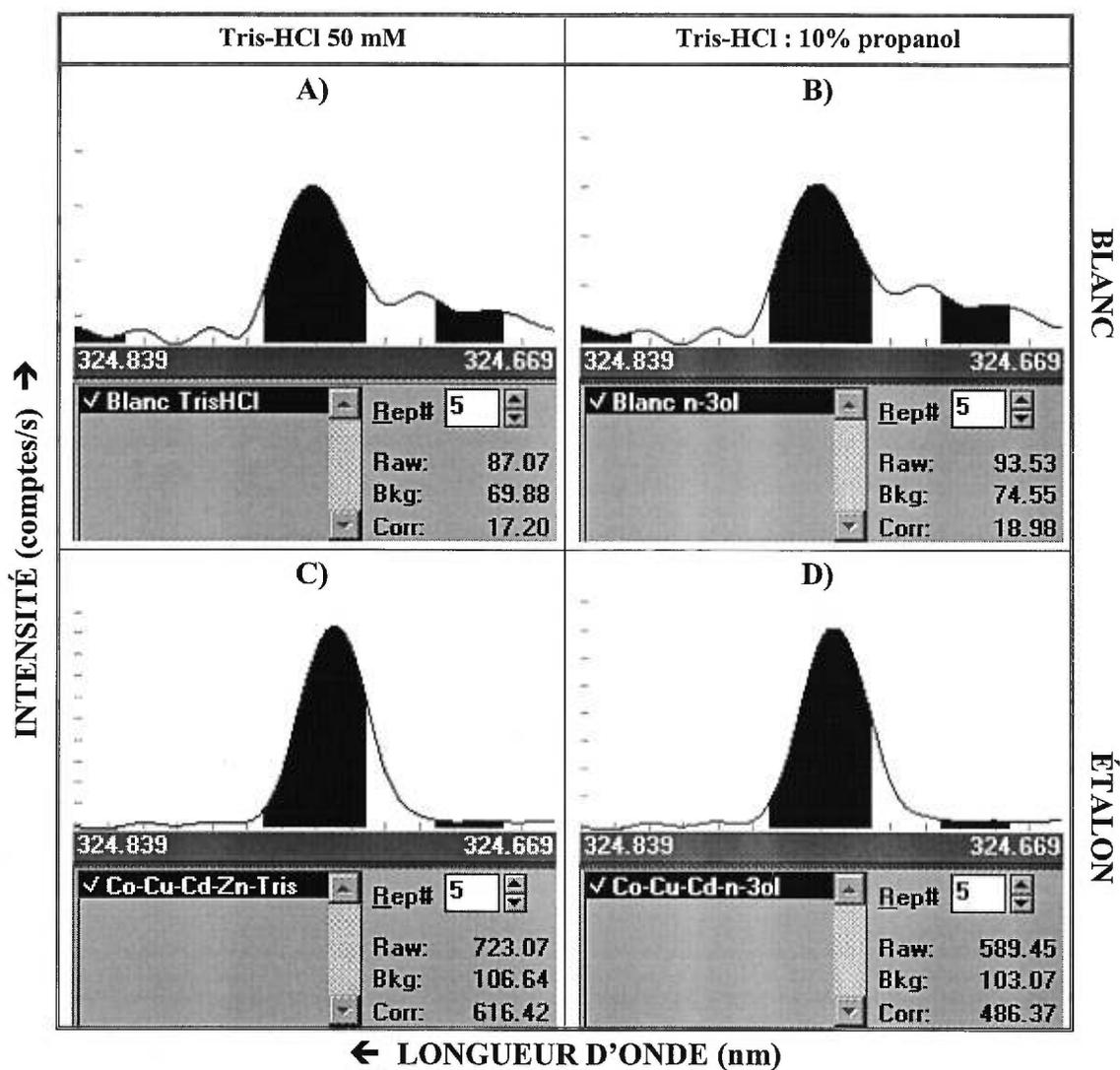


Figure 34: Effet du solvant sur le signal de fond du cuivre (Cu I 324,754 nm) avec un nébuliseur pneumatique concentrique en aspiration continue: Blanc A) Tris-HCl, B) Tris-HCl:10% propanol; Étalon de Cu 15,7 μ M C) Tris-HCl, D) Tris-HCl:10% propanol.

spectres des blancs, nous constatons que les spectres des blancs dans l'eau – Tris-HCl (A) et dans l'eau – Tris-HCl :10% propanol (B) sont très semblables, une légère augmentation du fond spectral est cependant observée en solution organique. Le pic central représente probablement une légère contamination des blancs par le cuivre.

Toutes ces expériences nous ont permis d'établir que le fond spectral était plus ou moins structuré lorsque le blanc ou l'échantillon contenait des solvants organiques. La présence de structure dans le signal de fond est généralement due à la présence de bandes moléculaires. Comme le système IRIS ne permet pas l'acquisition de tout le spectre de manière continue, nous ne pouvons pas déterminer avec certitude quelles sont les bandes moléculaires responsables de ces augmentations. Winge (Winge *et al.*, 1982) a observé que l'introduction d'un solvant organique dans un plasma ICP entraînait la formation de bandes moléculaires appartenant aux systèmes C₂, CN, NO, N₂, OH et NH. En effet, la présence de solvant organique provoque un refroidissement local provenant notamment de la présence d'un plus grand nombre de molécules de solvant dans le plasma et d'une altération des propriétés conductrices du plasma due à la présence de carbone et réduisant ainsi l'énergie nécessaire à l'atomisation. Dans le domaine spectral de 213,8 à 214,5 nm, dans lequel nous travaillons, les principaux systèmes présents sont les systèmes : i) NO dont les têtes de bande provenant du système γ ($A^2\Sigma^+ - X^2\Pi$) sont à 215,49 et 214,91 nm ainsi qu'à 214,35 nm pour le système β ($B^2\Pi - X^2\Pi$), ii) C₂ dont la tête de bande provenant du système Freymark ($e^1\Sigma_g^+ - b^1\Pi_u$) est à 214,29 nm et iii) CO dont la tête de bande est à 213,70 et 215,02 nm provenant du quatrième système positif ($A^1\Pi - X^1\Sigma$).

La correction du signal de fond est toujours plus complexe en présence de bandes moléculaires et ne sera pas aussi efficace que pour les corrections de déplacement continu de fond spectral, mais elle est cependant nécessaire car elle réduira toujours les erreurs systématiques sur la mesure des analytes.

Le deuxième effet de l'introduction d'un solvant organique sur les signaux analytiques des éléments est une perte de sensibilité. En effet, on constate sur les divers spectres des Figures 30 à 34 que : i) l'intensité nette de la raie de Cd II est réduite de 14 à 4 (71%), ii) pour la raie de Co II l'intensité diminue de 6 à 2 (66%), iii) pour la raie du Zn I celle-ci diminue de 2 à 0 (100%) et enfin iv) pour la raie de Cu I la diminution est de

616 à 487 (21%). Cette perte de sensibilité est proportionnelle à l'énergie d'excitation pour les raies atomiques (Cu I 3,82 eV et Zn I 5,80 eV) et proportionnelle à la somme de l'énergie d'excitation et de l'énergie d'ionisation pour les raies ioniques (Cd II 14,77 eV et Co II 13,28 eV), et elle indique une moins bonne excitation et ionisation en présence de solvant organique. Les causes possibles pour ces effets sont un refroidissement du plasma dû à la présence d'un solvant organique, une efficacité de transport plus grande pour le solvant organique produisant une surcharge du plasma et/ou un aérosol de moins bonne qualité.

A titre d'illustration de l'importance de la correction du fond spectral sur la qualité des chromatogrammes obtenus lors de la séparation des MT, la Figure 35 représente une séparation de MT obtenue sur une colonne PRP-3 avec un gradient d'élution allant de 0 à 60% de propanol. Le système de détection ICP-AES comprend un nébuliseur thermique. Sur cette figure on a représenté le signal brut mesuré sur le canal analytique du Cd II à 214,438 nm, les signaux de fond avant et après (214,382 et 214,494 nm) cette raie analytique et le profil du gradient d'élution allant de 0 à 60% en propanol. Il faut souligner qu'à cause du volume mort du système chromatographique incluant le détecteur ICP-AES il existe un décalage de 180 s entre l'échelle de temps du profil du gradient et celle des signaux en ICP-AES. Sur cette figure on constate qu'avant la sortie des MT (de 0 à 400 s), les signaux analytique brut et de fond donnent une intensité non-nulle qui représente essentiellement le déplacement du fond spectral en présence de la solution Tris-HCl. Par la suite la sortie des MT produit un signal croissant sur les trois canaux. Ces augmentations sont dues à la sortie des MT contenant le cadmium (sur le canal analytique) et à un déplacement de fond plus important (sur les canaux analytique et de fond) provenant de la quantité croissante de solvant organique présent dans le plasma. Après le passage des MT (après 700 s) les signaux décroissent et ces décroissances correspondent à une diminution des signaux de fond. Le signal net dû au cadmium est également représenté sur cette figure et on constate que la correction pour les déplacements de signal de fond donne une ligne de base assez faible et un signal net bien

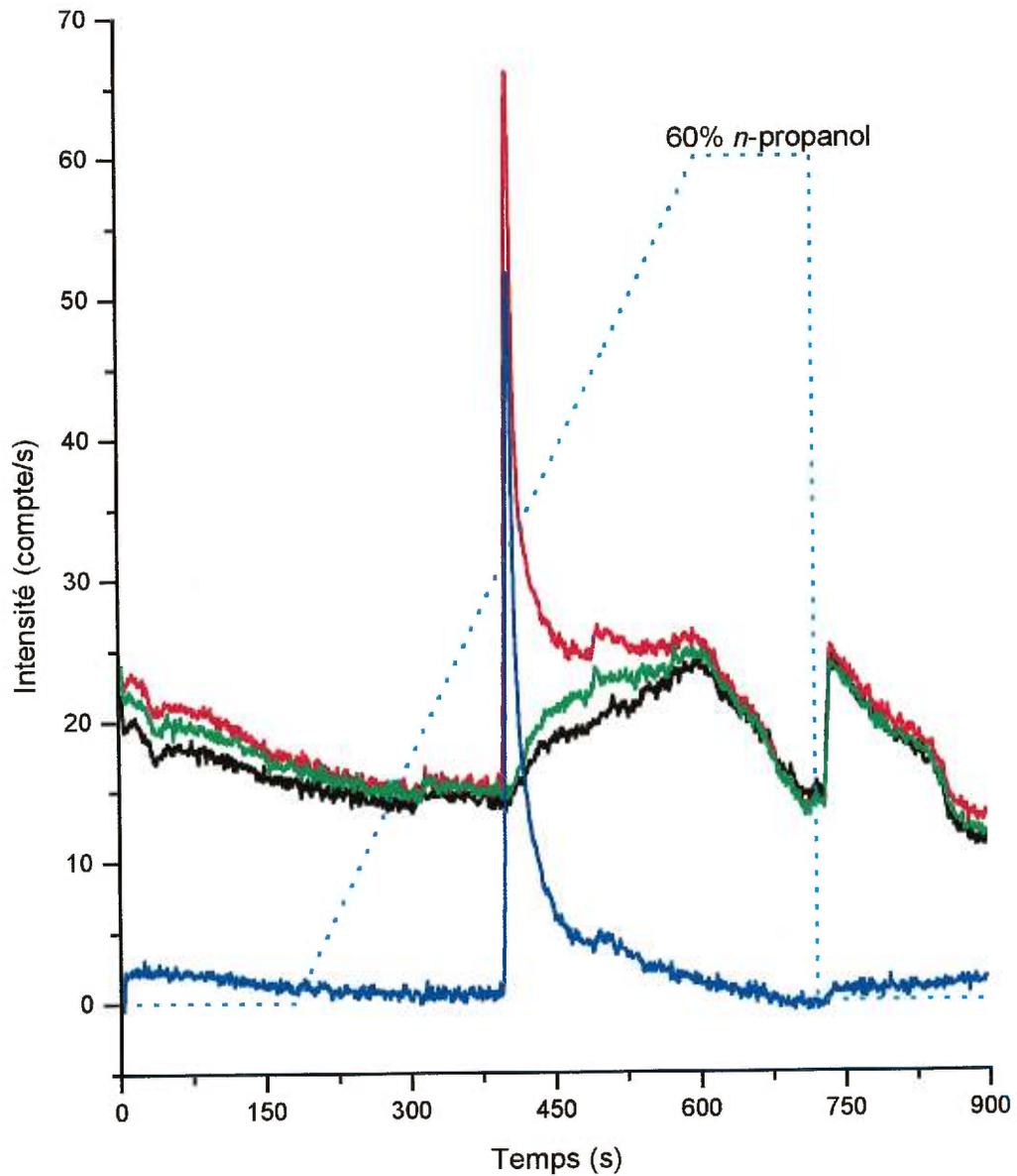


Figure 35: Signal du cadmium en présence de n-propanol sur les pixels de la raie du Cd II à 214,438 nm du CID. La vitesse du gradient est de 8,6%/min. (— et —) Signal de fond situé de part et d'autre des pixels analytiques, (—) Signal analytique, (—) Signal net et (---) gradient d'éluion.

distinct de la ligne de base. La Figure 35 illustre également que la correction n'est "pas parfaite", mais suffisante pour améliorer de manière significative l'exactitude des mesures.

Pour terminer l'optimisation du système de détection, nous avons étudié l'influence du mode de traitement du signal analytique sur la séparation chromatographique des isoformes de MT. Nous avons représenté à la Figure 36 un chromatogramme "brut" (Figure 36A) obtenu à partir du signal net du cadmium et un chromatogramme "traité" (Figure 36B) pour diminuer le bruit sur le signal. Le bruit a été réduit en appliquant un lissage de type Savitsky-Golay avec filtre mobile à 5 points. L'application de ce filtre diminue de manière très significative le bruit et améliore la qualité du chromatogramme obtenu.

Par la suite pour identifier les divers pics chromatographiques présents dans le pic "composite" obtenu pour les MT nous avons procédé à des déconvolutions des pics. Un exemple de déconvolution gaussienne est représentée à la Figure 36 (A et B). L'absence de lissage ne permet pas de distinguer les pics chromatographiques de (A). La déconvolution montre que deux pics sont superposés pour le propanol (A) ce qui ne correspond pas à ce qui avait été observé avec la détection dans l'UV (section III.1.3), par contre le chromatogramme obtenu par déconvolution à la figure (B) est plus proche de ceux que nous avons obtenus avec la détection par absorption UV. La Figure 36 (C) représente la séparation avec comme solvant de l'acétonitrile et illustre la moins bonne qualité de cette séparation. On constate à la lumière de cet exemple qu'il est important de procéder à un filtrage numérique des signaux avant de procéder à la déconvolution et ceci sera fait par la suite pour toutes les mesures.

III.4.2. EFFICACITÉ DE SÉPARATION DES MT

L'optimisation du système TSP pour la détection par ICP-AES nous amène à l'utilisation d'un débit liquide différent de celui utilisé lors de la séparation des isoformes de la MT avec la détection UV. Comme le volume mort devient également plus grand lors du couplage HPLC-ICP, nous devons donc réoptimiser la séparation des isoformes de la MT avec ce système de détection. Différents paramètres seront étudiés dont : i) la nature du solvant organique, ii) la composition des éluants et iii) le gradient d'élution.

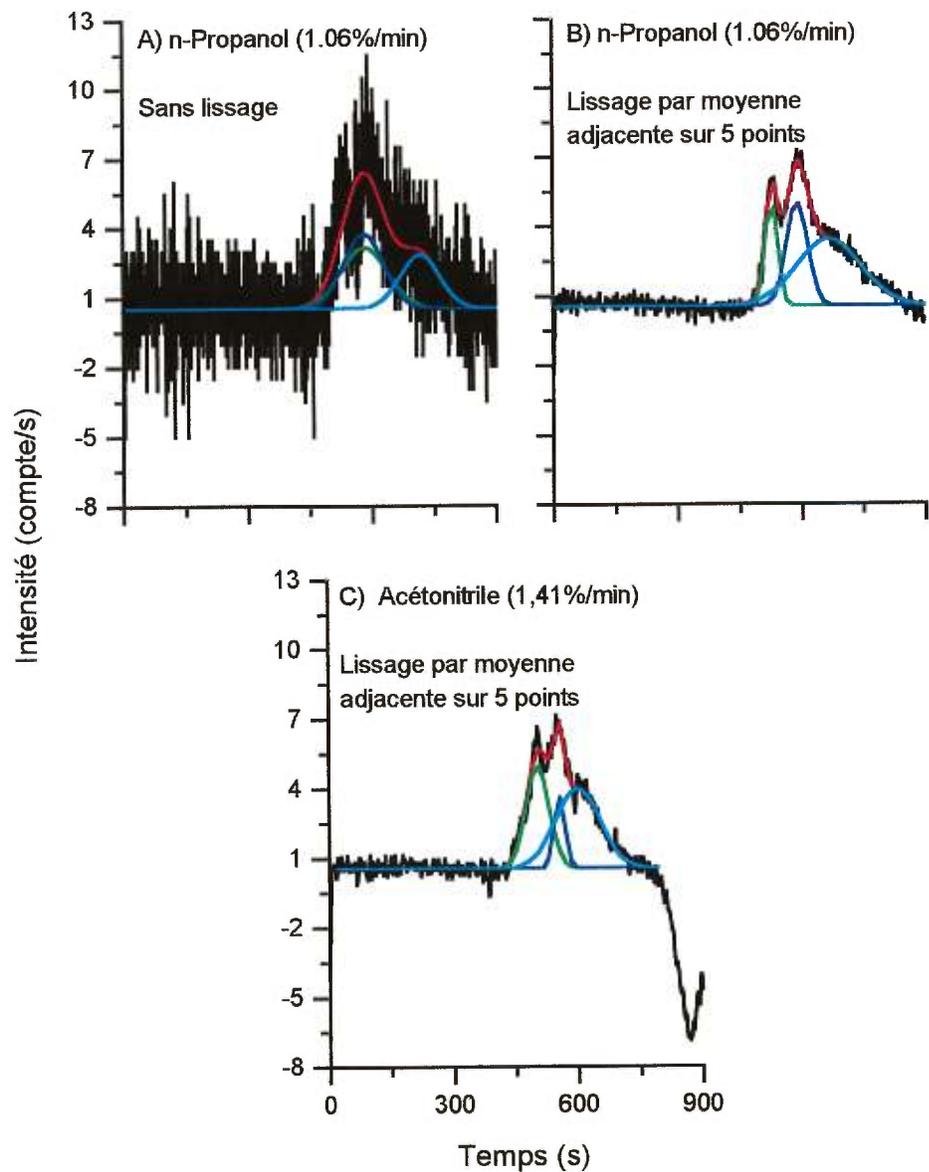


Figure 36: Déconvolution gaussienne pour la détermination de la résolution des isoformes de la métallothionéine pour différents solvants organiques mais pour un même gradient de polarité. Signal du cadmium (Cd II 214,438 nm).

La Figure 37 représente la séparation obtenue avec un échantillon de 100 μL contenant 3,3 μM de MT de foie de lapin (MT étalon) sur la colonne PRP-3 pour des vitesses identiques de gradient mais pour des mélanges de solvants différents. Les conditions d'opération du TSP utilisés, quel que soit le solvant utilisé, sont les conditions optimales obtenues avec une solution de Tris-HCl : 20% propanol.

On constate que la sensibilité obtenue pour le cadmium en présence d'acétonitrile est plus faible que celle obtenue en présence de propanol. Cette perte de sensibilité s'explique probablement par des différences entre la qualité des aérosols et/ou leur efficacité de transport vers le plasma. Dans ce cas comme les temps de résidence sont les mêmes pour les deux solvants, ce facteur n'intervient pas.

Si nous comparons l'acétonitrile au propanol, nous constatons que l'acétonitrile possède des viscosité et tension superficielle plus faibles que le propanol alors que les densités sont à peu près identiques. Les mélanges à base de ces deux solvants organiques auront donc des propriétés physiques qui varient dans le même sens que pour les solvants purs. Dans ces conditions l'aérosol primaire qui serait produit avec un système de nébulisation pneumatique aurait donc un diamètre de gouttelettes plus petit pour les mélanges à base d'acétonitrile ($0,5 d_{\text{propanol}}$) et probablement une distribution de taille des gouttelettes plus serrée. Cet aérosol primaire sera transformé en aérosol secondaire de meilleure qualité dans la chambre de nébulisation mais sera relativement peu désolvaté pour former l'aérosol tertiaire. Si la quantité d'aérosol peu désolvaté est mieux transporté vers le plasma, cela entraînera une "surcharge du plasma en solvant", et ceci se traduirait, comme nous l'avons vu (section III.4.1), par une baisse du signal analytique.

Dans le cas du nébuliseur thermique, l'explication proposée pour le nébuliseur pneumatique pourrait aussi être valable si l'aérosol primaire était de qualité supérieure pour les solutions à base d'acétonitrile. Cependant, dans ce cas, il est plus probable que l'aérosol primaire formé à partir de solutions à base d'acétonitrile soit de moins bonne qualité. En effet, les propriétés physique données au Tableau II (p.50) montrent que la température d'ébullition du mélange eau - acétonitrile est inférieure à celle du mélange eau - propanol. Comme la température de fonctionnement du TSP avait été optimisée pour les mélanges à base de propanol, cette température était probablement trop élevée

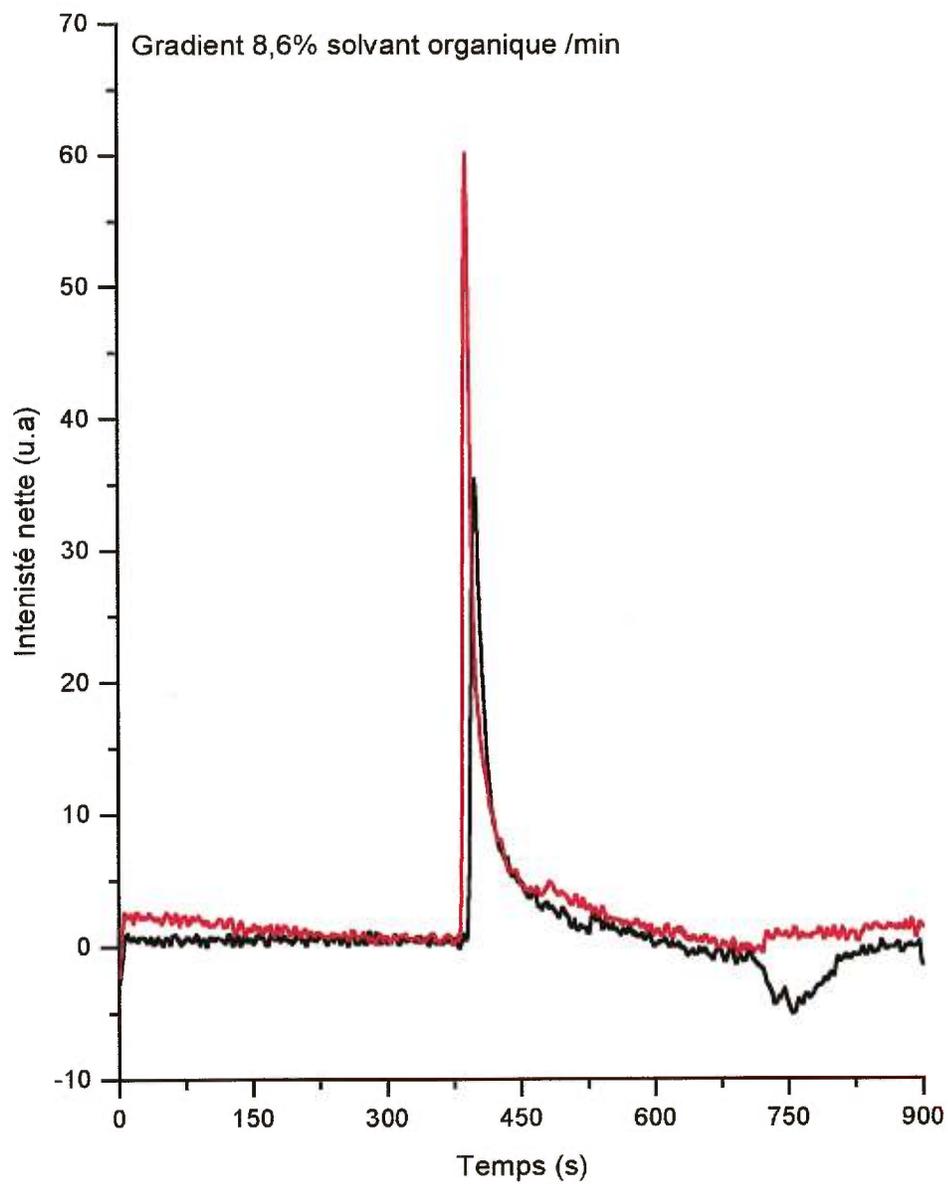


Figure 37: Influence du solvant sur le signal de la raie du cadmium (Cd II 214,438 nm). Injection de 100 μ L de MT de foie de lapin 3,3 μ M, (—) acétonitrile, (—) n-propanol. Nébuliseur TSP.

pour le solvant à base d'acétonitrile. La conséquence est que le solvant va entrer en ébullition à l'intérieur du capillaire et former ainsi des poches de gaz dans le tube nébuliseur. Ces poches de gaz vont augmenter la pression à l'intérieur de ce tube et les gouttelettes de solvant seront alors expulsées à très grande vitesse générant ainsi un aérosol dont les gouttelettes auront une taille plus importante et dont la distribution sera moins optimale.

La Figure 38 représente la variation de la qualité de la séparation des isoformes pour deux différentes compositions de mélanges d'éluants : i) mélange de Tris-HCl - acétonitrile et ii) mélange de Tris-HCl - propanol à différentes vitesses de gradient. La vitesse des gradients a été ajustée de sorte que pour chaque figure la variation de la polarité par unité de temps soit similaire pour les deux mélanges d'éluants.

La variation de la polarité du gradient est décroissante pour les deux mélanges lorsqu'on passe de la figure (A) à la figure (D). Les gradients utilisés sur les figures (A) et (B) donnent des séparations à peu près identiques en terme de résolution pour les deux mélanges. Par contre, on remarque que la séparation avec l'acétonitrile est légèrement meilleure comparée à celle obtenue avec le propanol comme on le voit aux figures (C et D). Cette meilleure séparation peut s'expliquer par une polarité intermédiaire de l'acétonitrile (Tableau II) ce qui peut être un facteur intéressant pour la séparation des isoformes de la MT, puisque leur polarité est due à la présence d'acides aminés ayant des degrés de polarité différents.

Nous pouvons donc considérer qu'un gradient avec une variation de polarité autour de $-0,066/\text{min}$ représentera le meilleur choix pour la séparation des isoformes de la MT (D). Cette variation de polarité est obtenue avec des gradients de $1,06\%$ de propanol/min ou $1,41\%$ d'acétonitrile/min). Pour le choix final, nous devons cependant prendre en considération le fait que pour une même variation de polarité, la proportion en solvant organique est moindre si le propanol est utilisé comme solvant organique. Ce facteur devient important puisqu'il permet, comme nous l'avons vu précédemment, de diminuer la quantité de solvant organique qui se rend au plasma, et ainsi de conserver une énergie suffisante pour permettre l'ionisation et/ou l'excitation de notre analyte. Par

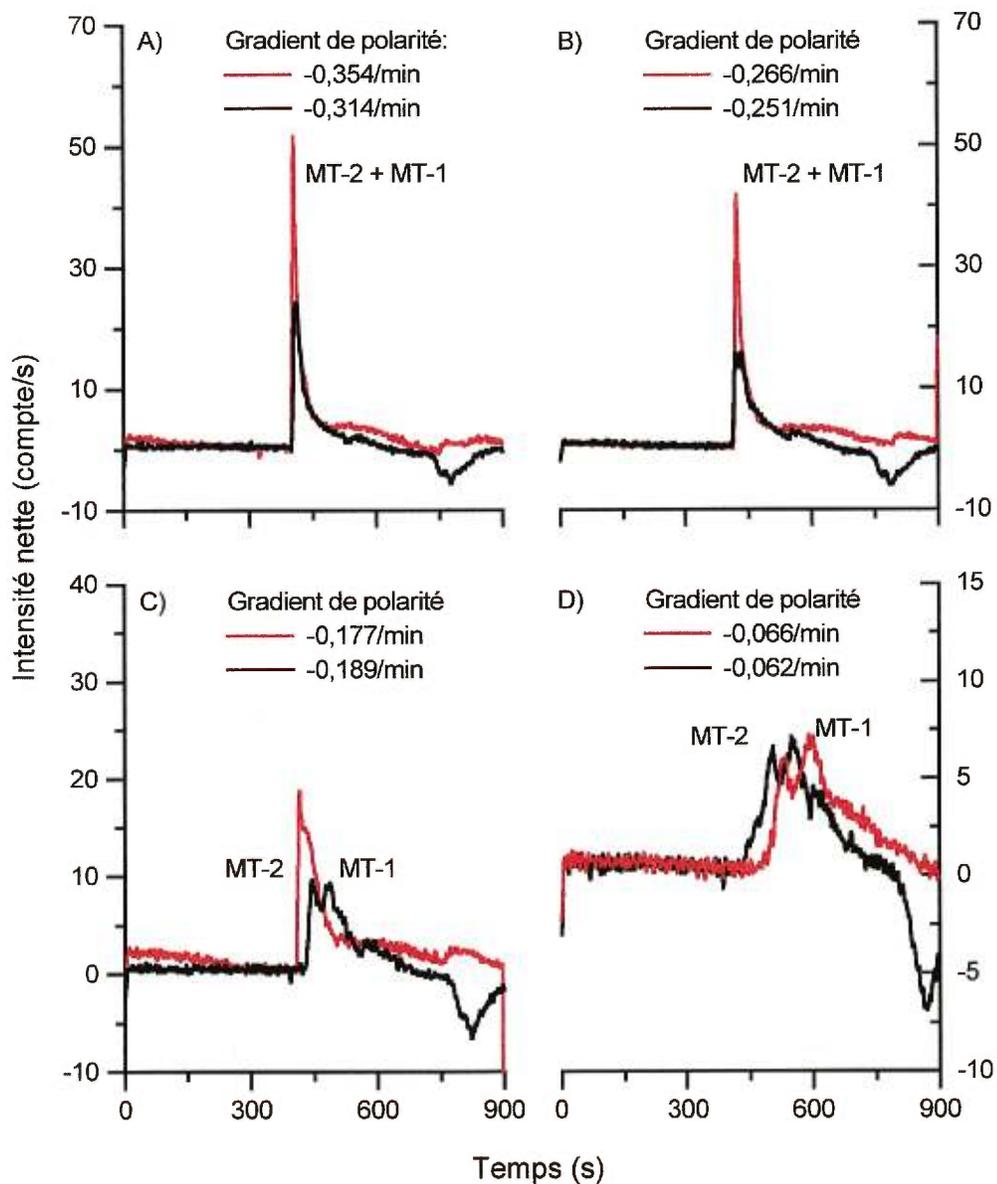


Figure 38: Influence du solvant sur la séparation des isoformes de la métallothionéine pour différentes baisses de polarité, $\lambda_{CdII} = 214,438$ nm. Injection de 100 μ L de MT de foie de lapin 3,3 μ M, (—) acétonitrile, (—) n-propanol.

conséquent, toutes autres choses étant égales, nous retiendrons les mélanges à base de propanol. De plus, en choisissant ce gradient à base de propanol, nous n'augmentons la séparation que d'une centaine de secondes, ce qui est acceptable.

Pour étudier de manière plus fine la qualité de la séparation et l'influence du choix du solvant, nous avons représenté à la Figure 36 les chromatogrammes obtenus lors de la séparation des isoformes de MT avec un gradient à base de propanol et un gradient à base d'acétonitrile. La séparation effectuée avec une détection dans l'UV nous avait montré que pour nos conditions chromatographiques le mélange des isoformes comprenait un minimum de trois produits. Une déconvolution de type gaussienne (c.à.d. avec des pics chromatographiques gaussiens) a donc été effectuée sur les chromatogrammes obtenus dans des conditions optimales de séparation (1,06% propanol/min et 1,41% acétonitrile/min). Les résultats obtenus montrent que la séparation de ces isoformes avec le propanol est légèrement plus efficace que celle effectuée avec l'acétonitrile. Les résultats obtenus pour les deux séparations sont donnés au Tableau IX.

Une dernière contrainte provient du système de pompage de notre chromatographe liquide. En effet, pour minimiser les pulsations produites par ce système, il faut éviter une faible cadence de pompage. Pour préserver la polarité du gradient choisi et conserver un débit total de pompage de 1,1 mL/min, une solution de Tris-HCl - 10% propanol est utilisée. Cette solution permet d'obtenir un gradient de polarité de -0,089/min (1,43% propanol / min). Cette diminution du pourcentage de propanol dans l'éluant permet de séparer les isoformes avec une efficacité similaire pour un gradient de polarité inférieur (-0,066/min comparé à -0.089/min). De plus, l'utilisation d'un gradient de polarité inverse supérieur permet de raccourcir le temps d'analyse.

Le Tableau X énumère les conditions optimales utilisées pour la séparation des isoformes de la MT et le couplage LC- ICP avec un système de nébulisation thermique. La concentration minimale de MT injectée dans le système est de 3,3 μM (20 mg de MT/L) ce qui est équivalent à 10,5 μM de cadmium (1,2 mg de Cd/L) et de 1,5 μM de zinc (0,1 mg de Zn/L) pour une injection de 100 μL d'échantillon.

Tableau IX: Résultats de la séparation des isoformes de la MT avec la colonne PRP-3 et détection par ICP-AES pour différents solvants organiques*.

Propanol						
Gradient (polarité)	Pic	Aire (u.a.)	Temps de rétention (s)	Larg. H/2 (s)	Hauteur (compte/s)	Résolution (MT-1,MT-2)
1,06%/min	MT-2 (—)	169	528	30	4,5	1,5
(-0,062/min)	MT-1 (—)	290	590	52	4,5	
	# 3 (—)	560	667	156	2,9	
Acétonitrile						
1,41%/min	MT-2 (—)	309	503	56	4,4	1,3
(-0.066/min)	MT-1 (—)	99	556	26	3,1	
	# 3 (—)	459	600	107	3,4	

* Détection sur la raie Cd II 214,438nm

Tableau X: Conditions optimales pour la séparation des isoformes des MT de foie de lapin et pour la détection des métaux liés.

Séparation			Détection	
Temps (s)	%A ^a	%B ^b	Puissance incidente (W)	1350
0	100	0	Gaz porteur (L/min)	0,75
180	100	0	Débit liquide (mL/min)	1,1
600	0	100 ^c	TSP (°C)	275
720	0	100		
720	100	0		
900	100	0		

^a Solution de Tris-HCl

^b Solution 10% n-propanol - Tris-HCl

^c Gradient linéaire

III.4.3. SÉPARATION DES MÉTALLOTHIONÉINES ENVIRONNEMENTALES

L'une des applications de ce couplage est de quantifier les métaux liés à la métallothionéine provenant des échantillons réels vivant dans la nature. Comme échantillon, nous avons choisi les moules à cause de leur disponibilité et du fait que ces espèces aquatiques pourraient donner des indications quant au niveau de la pollution en métaux lourds dans notre environnement (Projet du groupe du professeur Pinel-Alloul, Sciences biologiques, Université de Montréal).

Pour effectuer la séparation et la quantification des MT plusieurs possibilités se présentent. Pour assurer la reproductibilité des injections et des séparations chromatographiques l'utilisation d'un étalon interne chromatographique peut s'avérer intéressante. En ce qui concerne la quantification des métaux dans les diverses fractions séparées par chromatographie, diverses stratégies sont possibles : i) Étalonnage externe avec des sels inorganiques des métaux d'intérêt, ii) Utilisation d'un étalon interne spectroscopique et iii) Utilisation d'étalons externes plus complexes (petites molécules organo-métallique, protéines connues, etc..).

Pour l'analyse par spectroscopie atomique, un étalonnage externe avec des sels inorganiques pour la quantification des métaux liés à la MT ne nous paraît pas le meilleur choix car nous pouvons anticiper un certain nombre de problèmes. En effet, nous avons vu que la matrice provenant des tissus biologiques est très différente de celle des solutions étalons aqueuses et par conséquent nous pouvons anticiper des différences marquées dans la nébulisation et le transport de l'aérosol vers le plasma. L'utilisation d'un étalon interne à base de sels inorganiques pose le même type de problèmes que pour l'étalonnage externe à cause de la présence de la matrice organique dans nos échantillons biologiques, mais cette approche a été trouvée satisfaisante dans certaines applications (Szpunar *et al.*, 1998) et par conséquent cette approche mérite d'être explorée. L'utilisation d'un étalon externe dont la composition de la matrice est plus proche de celle de nos échantillons nous est apparue comme étant aussi un bon choix.

Nous avons donc opté pour l'utilisation d'étalons composés des MT disponibles commercialement provenant du foie de lapin dont la concentration des métaux lourds est connue afin de permettre la quantification des métaux liés aux MT de moules.

Ce choix doit être cependant fait en prenant quelques précautions. En effet en utilisant les MT de lapin comme étalons, nous supposons que la protéine provenant d'un organisme marin se comporte de la même façon que la MT de mammifère dans la séparation chromatographique et dans le plasma ICP. Cette hypothèse est acceptable si ces MT sont de la même classe, mais dans notre cas les deux MT ont des compositions (structures primaires) en acides aminés différentes, ce qui pourrait amener à des différences dans la rétention entre les MT étalons et les MT des moules.

Pour la chromatographie, nous pourrions choisir un étalon interne qui aurait des temps de rétention similaires à ceux des MT, cependant ceci complique encore le système chromatographique et nous n'avons pas exploré cette piste.

III.4.3.1. CHOIX D'UN ÉTALON INTERNE SPECTROSCOPIQUE

L'intensité du signal par émission atomique peut subir des variations dues aux fluctuations du système d'introduction de l'échantillon et/ou du plasma. L'emploi d'un étalon interne permettrait de corriger ces fluctuations, cependant le choix de l'étalon interne doit être fait avec vigilance. Dans un premier temps, l'étalon ne doit pas être contenu dans l'échantillon. Dans notre cas, il doit être inerte envers la protéine, que ce soit pour les sites actifs, car il pourrait entrer en compétition avec les analytes, soit pour d'autres sites de la protéine, puisqu'il pourrait engendrer une modification dans la conformation de celle-ci. Du point de vue de la détection par émission atomique à plasma ICP, les critères suivants doivent être pris en considération : i) la longueur d'onde d'émission de l'étalon interne et ii) l'énergie d'excitation et/ou d'ionisation de la raie.

Dans certains cas, tous ces critères ne pourront être suivis et certains compromis devront être faits. Pour les conditions actuelles de la détection, le cobalt est envisagé comme étalon interne pour la détection du cadmium et si possible pour la détection du zinc et du cuivre.

Le Tableau V (p.57) nous permet de constater que la longueur d'onde de détection du cobalt est à proximité de celles des analytes envisagés. De plus, l'énergie que requiert cette transition est comparable à celle de la raies ioniques Cd II que nous utilisons. Par contre, elle diffère de celles des raies atomiques du cuivre et du zinc que nous avons utilisé. De plus, les intensités relatives publiée par Reader (Reader *et al.*, 1992) nous indiquent que ce choix d'étalon interne semble être valable pour le cadmium.

III.4.3.2. SÉPARATION DES ISOFORMES DE LA MT COMMERCIALE ET ENVIRONNEMENTALE

Le sel de cobalt utilisé comme étalon interne en ICP-AES est présent sous forme d'ion libre, et ne sera donc pas retenu par le système chromatographique. Le pic chromatographique dû au cobalt ne sera donc pas un bon choix d'étalon interne chromatographique. Par contre, le temps de rétention du cobalt correspondra au volume mort du système HPLC-ICP et il servira également de point de repère pour identifier le début du gradient d'élution en chromatographie.

Une solution de MT de foie de lapin (3,3 μM) dopé avec le sel de cobalt a donc été injectée en présence de la colonne chromatographique PRP-3, mais avec une programmation modifiée du gradient de solvant. Durant les trois premières minutes (180 s) l'éluant est la solution aqueuse de Tris-HCl. Par la suite, à partir du moment où le cobalt est sorti de la colonne (180 s), on change la composition de l'éluant pour un mélange Tris-HCl-10% propanol.

Les résultats obtenus apparaissent à la Figure 39. Le chromatogramme obtenu est beaucoup plus complexe que celui attendu. Le chromatogramme obtenu pour le signal du cadmium comprend deux pics. Le pic à 340 s correspond au signal du cadmium lié à la MT. Par contre, le signal de Cd à 280 s ne provient pas de la MT puisqu'au moment où ce pic est détecté, l'éluant est encore entièrement la solution de Tris-HCl (en tenant compte du temps mort de système). Normalement la liaison Cd-S de la MT est très stable dans ces conditions et aucun cadmium ne devrait être libéré. Nous pouvons aussi conclure qu'il ne s'agit pas d'ions cadmium libres présents dans la solution injectée puisque leur temps de rétention devrait correspondre à celui du cobalt qui est également présent sous forme d'ions libres en solution et qui sortent avec le temps mort. Il est donc possible que ce premier pic du Cd provienne de la dégradation de la protéine dont les fragments contiendraient du cadmium. Toutefois, la proportion de cette "protéine dégénérée" serait faible car le signal du cadmium du pic 280 s représente 20% de celui de la MT. Cette "protéine dégénérée" posséderait une certaine affinité avec la phase stationnaire mais cette affinité ne devrait pas être importante. Cette expérience a été répétée trois fois et nous avons fait les mêmes observations que celles illustrées à la Figure 39.

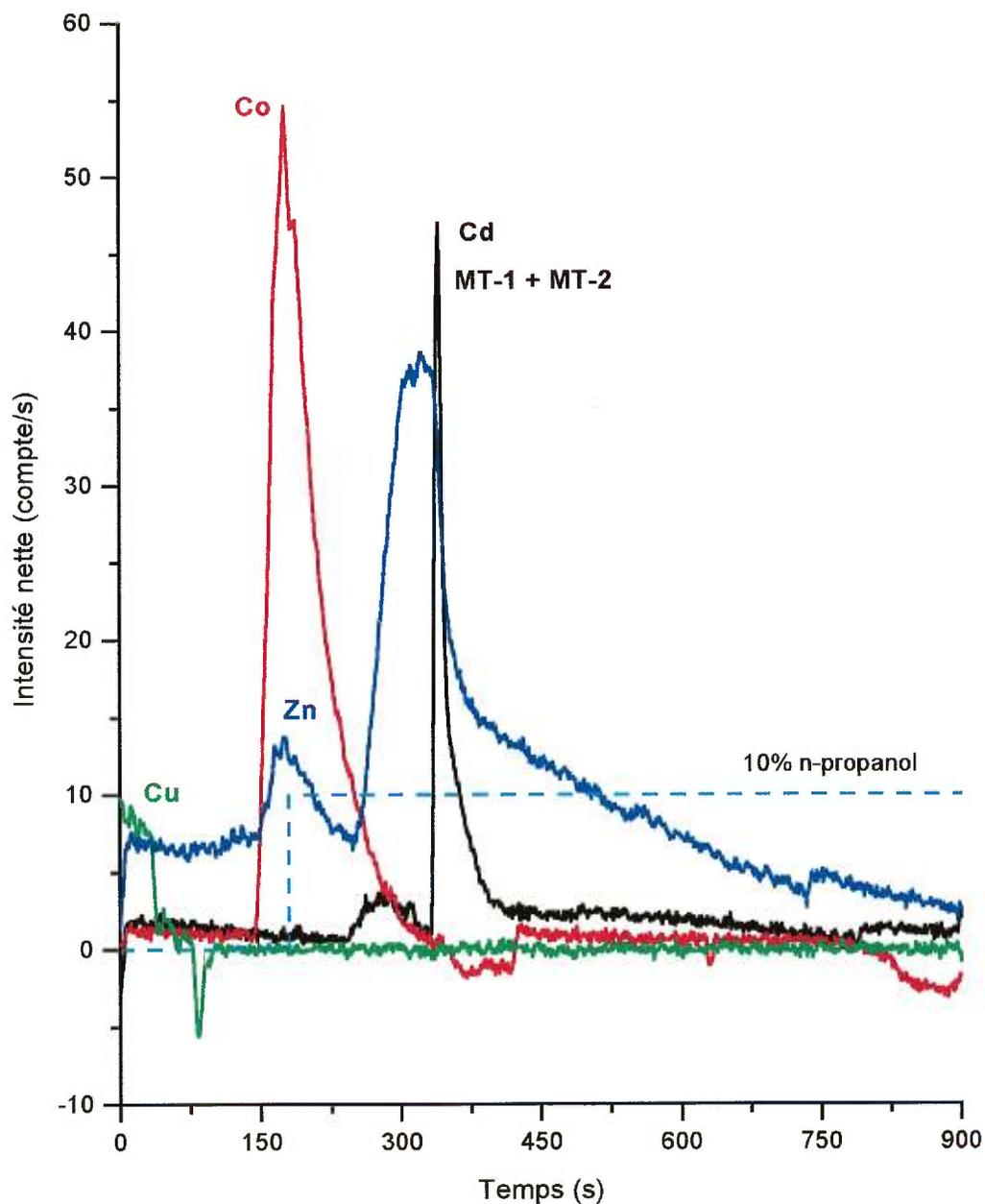


Figure 39: Injection (100 μL) de MT de foie de lapin (3,3 μM de MT; soit 10,5 μM de Cd et 1,5 μM Zn) avec un gradient d'élution modifié, en présence de 10,2 μM Co sur une colonne PRP-3 : (—) Cd II 214,438 nm, (—) Co II 228,616 nm, (—) Cu I 324,754 nm, (—) Zn I 213,856 nm et (---) programmation du n-propanol.

Une autre particularité du signal du cadmium est la faible largeur du pic de la Cd-MT comparativement à celui du Co. Le cobalt semble donner des effets mémoire assez important dans les chambres de nébulisation, alors que la Cd-MT n'en donnerait pas.

Pour le signal du zinc, il faut expliquer le pic à 180 s et la coïncidence de son temps de rétention avec celui du cobalt. Nous devons d'abord étudier la possibilité d'une interférence spectrale avec le cobalt. Pour que l'interférence soit présente, il faut que le cobalt émette à des longueurs d'ondes voisines de celles du zinc et que ces longueurs d'ondes soient observées dans le même ordre de diffraction sur le système ICP-AES que nous avons utilisé. La seule raie de cobalt (Co I) présente dans cette région spectrale est à 213,897 nm. Cette longueur d'onde est trop éloignée de la raie du zinc à 213,856 nm pour interférer. En effet, puisque la bande passante du ICP-AES utilisé est de 3 pm dans cette région et comme les deux raies sont séparées par plus de 13 fois la bande passante, aucune interférence n'est possible. Cette hypothèse doit donc être rejetée.

Une autre hypothèse pour expliquer le pic de zinc à 180 s consiste à supposer que la conformation de la protéine dans une solution de Tris-HCl est modifiée de sorte qu'elle libère une partie du zinc, un métal faiblement lié, qu'elle contient. Ce zinc devrait apparaître en même temps que le cobalt à 180 s, ce qui semble être le cas et le pic serait ainsi expliqué.

Si la présence d'un premier pic de zinc à 180 s pourrait provenir de la libération du zinc de la MT, le second pic plus intense à 300 s ne peut pas provenir de cette libération. En effet, ce pic a à peu près le même temps de rétention que le premier pic du cadmium. Comme nous savons que le contenu de Zn (0,5% p/p) lié à la protéine est 10 fois inférieur à celui du Cd (5,9% p/p), l'intensité du deuxième pic de zinc (300 s) est trop forte pour provenir de la protéine dégréé. Par conséquent, nous devons envisager l'hypothèse d'une contamination de zinc provenant de la colonne et que cette quantité importante de zinc est libérée par un solvant contenant 10% propanol. Enfin, on remarque également que la ligne de base pour le signal net du zinc est non nulle avant 180 s. Ceci peut s'expliquer comme précédemment par une contamination provenant de la colonne ou de l'éluant. Ce signal de la ligne de base diminue après 600 s et cette diminution, une

fois de plus est expliquée par l'effet de la présence du propanol sur le signal en émission atomique.

Afin de vérifier l'hypothèse de la contamination en Zn, trois injections de 100 μ L de la même solution de MT étalon ont été effectuées sur la colonne PRP-3, mais en mode isocratique avec un mélange Tris-HCl:10% n-propanol. Les deux premières injections donnent un pic pour le zinc à 325 s dont la traînée persiste jusqu'à la fin. La surface totale du signal dû au zinc est alors de 4300 et il s'agit de valeur similaire à celle obtenue sur la Figure 39. Seule la troisième injection illustre un chromatogramme dépourvu de contamination où le pic présent ne correspond plus qu'à la réponse du Zn provenant de la MT (Figure 40). Notons qu'au cours de cette expérience, les rapports des surfaces totales entre le pics observés sur les canaux de Cd et de Co sont préservés.

Nous avons alors poursuivi avec la séparation des isoformes de la MT de foie de lapin sur cette colonne "décontaminée" en zinc en utilisant comme détecteur le système ICP-AES. Les conditions chromatographiques utilisées sont celles décrites au Tableau X (p.104).

La Figure 41 illustre une séparation des isoformes de la MT de foie de lapin en présence de cobalt comme étalon interne spectroscopique (10,2 μ M). Sur le canal du cobalt, on constate que le signal de la ligne de base avant et après le pic dû au cobalt est nul et on note la présence d'un seul pic fortement asymétrique (temps de rétention 180 s) dont le début correspond au volume mort du système chromatographique. Sur le canal du cadmium on constate également que le signal de la ligne de base est essentiellement nul, sauf dans la région allant de 480 et 750 s où un certain nombre de signaux correspondant aux temps de rétention que nous avons observés pour les isoformes de MT apparaissent. Sur le canal du zinc, on constate tout d'abord que le signal de la ligne de base est différent de zéro et relativement constant jusqu'à 150 s. Un pic ou un ensemble de pics non résolus très étalés apparaissent ensuite jusque vers 550s, puis la ligne de base retourne vers zéro. Enfin sur la canal du cuivre, un signal irrégulier apparaît entre 0 et 80s puis aucun autre signal du cuivre n'est visible.

Pour mieux caractériser le chromatogramme, nous avons procédé à une analyse des pics sur les deux canaux du cadmium. Le résultat de cette analyse des pics

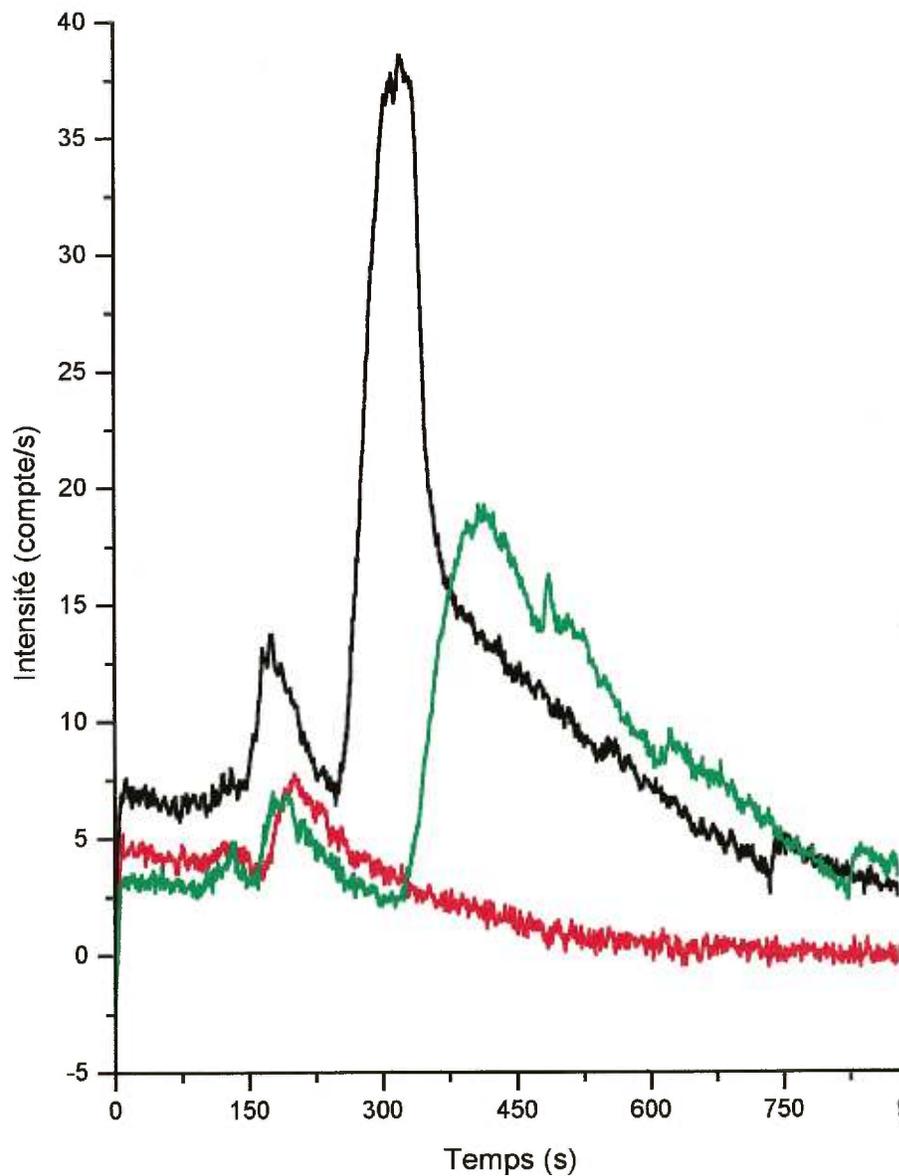


Figure 40: Vérification de la contamination du Zn (Zn I 213,856 nm) sur la colonne PRP-3 : (—) 3^e essai avec le gradient d'élution de la Figure 39, (—) 1^{er} essai mode isocratique avec Tris-HCl:10% propanol et (—) 3^e essai mode isocratique avec Tris-HCl:10% propanol.

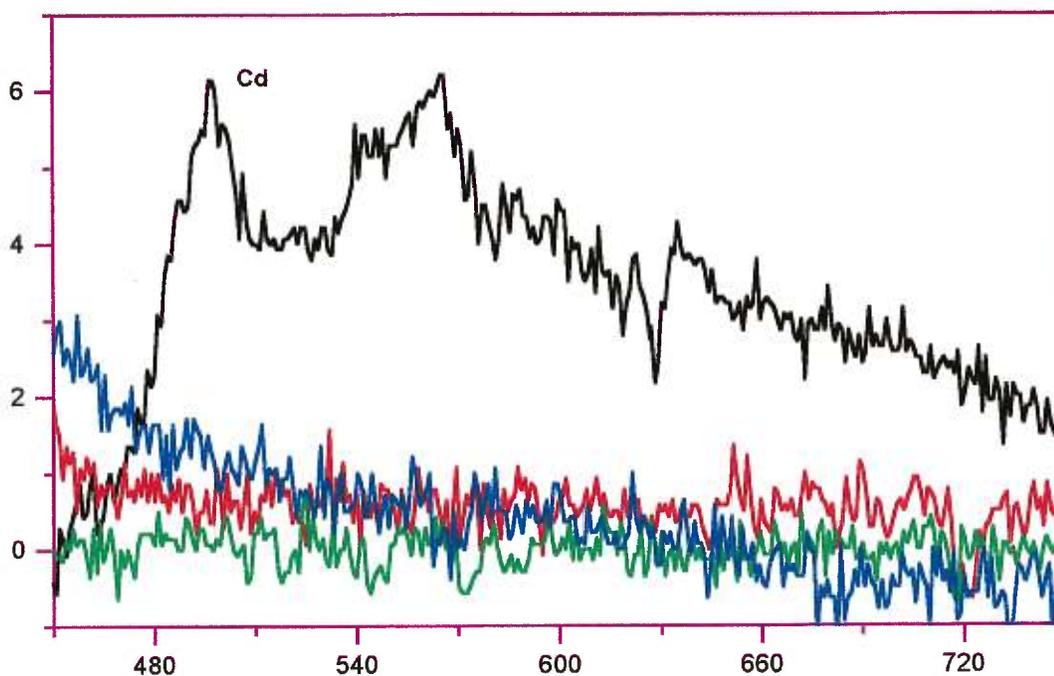
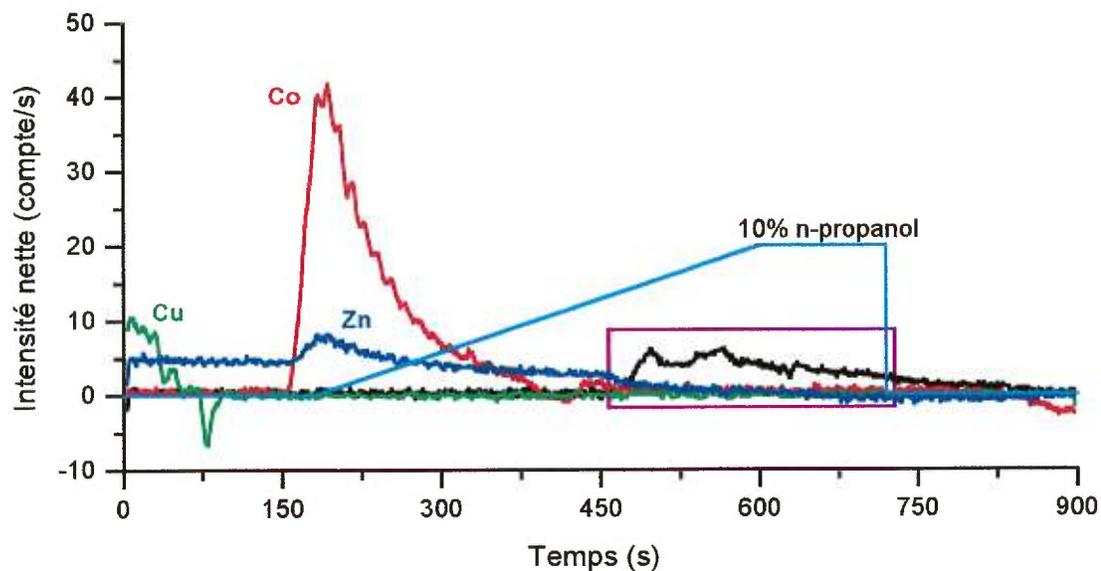


Figure 41: Injection (100 μ L) de MT de foie de lapin (3,3 μ M MT; 5,9% Cd : 0,5% Zn) avec du cobalt (10,2 μ M) comme étalon interne: (—) Cd II 214,438 nm, (—) Co II 228,616 nm, (—) Cu I 324,754 nm, (—) Zn I 213,856 nm et (—) programmation du gradient d'éluion.

chromatographiques est présenté à la Figure 42. Par déconvolution des pics entre 450 et 800s, nous obtenons trois pics dont deux (temps de rétention: 500 et 560 s) correspondant aux temps de rétention des isoformes de MT-2 et MT-1. Un troisième pic non identifié est également observé comme cela avait été le cas à la section III.4.1. L'aire totale du cadmium à la Figure 41 (1689) correspond à celle déterminée avec le gradient modifié à la Figure 39 (1430) une fois corrigé avec le cobalt comme étalon interne spectroscopique. Par conséquent, l'hypothèse de la dégradation de la protéine est plausible et permet d'expliquer la présence d'un premier pic à 280 s (Figure 39).

A la Figure 42, nous avons également procédé à l'étude du profil des pics observé sur les canaux de Zn et de Co. Dans ces cas, on ne peut mettre en évidence de pics gaussiens bien définis. Cependant pour améliorer le calcul de la surface, un lissage avec une courbe sigmoïdale doublement asymétrique a été effectué. Les caractéristiques de séparation des isoformes de la MT sont décrites au Tableau XI.

Tableau XI: Caractéristiques de séparation des isoformes de MT de foie de lapin par ICP-AES.

Élément	Pic	T _r (s)	Aire	Hauteur	Rs ^a	L ^b	LD ^c (µM)
Co	1	186,5 ± 0,1	3600 ± 70	41 ± 1		70 ± 9	
Zn	1	193 ± 4	283 ± 4	3,8 ± 0,1			
Cd 214,438nm	1 (MT-2)	490 ± 5	110 ± 3	4,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	22,1 ± 0,5	0,01
	2 (MT-1)	547 ± 5	360 ± 30	4,2 ± 0,3	0,7 ± 0,1	69 ± 2	0,1
	3	652 ± 4	580 ± 30	2,8 ± 0,1		170 ± 10	0,3
Cd 226,700 nm	1 (MT-2)	490 ± 4	120 ± 30	3,9 ± 0,4	1,2 ± 0,3	24 ± 3	
	2 (MT-1)	545 ± 7	240 ± 50	3,4 ± 0,2	0,5 ± 0,1	60 ± 10	
	3	610 ± 20	93 ± 40	1,2 ± 0,2		60 ± 10	

^a Résolution déterminée après déconvolution gaussienne et calculée selon : $2(T_{r2}-T_{r1})/(L_2+L_1)$

^b Largeur à la base du pic obtenu après déconvolution.

^c Limite de détection pour une seconde d'intégration.

Les séparations observées pour les isoformes sur les canaux du cadmium sont équivalentes et la séparation est suffisante pour une analyse quantitative acceptable.

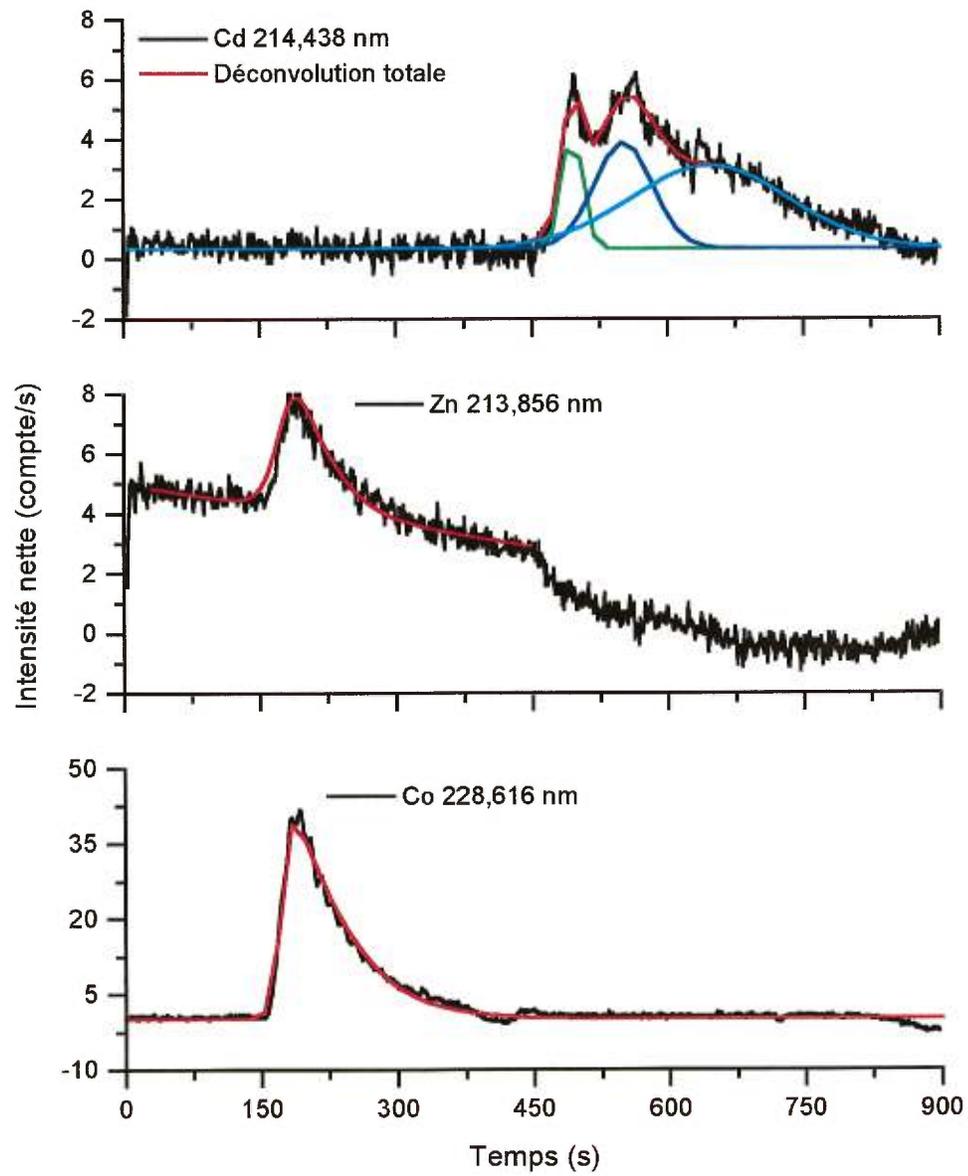


Figure 42: Déconvolution sur le signal du cadmium et lissage des signaux de zinc et de Co pour déterminer les caractéristiques de la séparation des isoformes de la MT de foie de lapin par HPLC/ICP-AES.

Nous avons déjà décrit qualitativement le chromatogramme obtenu sur le canal du cobalt. Le Tableau XI nous donne les caractéristiques quantitative du pic observé. La forte traînée du pic n'est pas facile à interpréter, mais pourrait résulter d'effets combinés de la diffusion longitudinale dans le système chromatographique et d'un effet mémoire de la chambre de nébulisation.

Le chromatogramme observé sur le canal du zinc est plus complexe. Comme nous l'avons déjà décrit, le début du chromatogramme (0 à 180 s) est caractérisé par la présence d'un signal continu. On remarque ensuite la présence d'un pic de zinc au temps de rétention du cobalt (185 s) et ce pic est observé aux deux longueurs d'onde (213,856 et 206,200 nm) du zinc. Enfin, aucun signal n'est apparent pour le zinc pendant l'élution des MT.

En ce qui concerne la première partie du chromatogramme du zinc (de 0 à 180 s), le signal de fond est continu et positif. Ce signal est observé alors qu'une solution aqueuse de Tris-HCl traverse le système chromatographique. Par contre, dès que les premières traces de propanol arrivent au plasma (>280 s) l'intensité nette chute rapidement pour atteindre la valeur zéro. Cette diminution rapide du signal de zinc est due à la très forte perte de sensibilité observée pour le zinc en présence de solvant organique et l'augmentation du signal de fond qui rend la détermination du zinc impossible (section III.4.1). Le signal de fond positif tout au long de cette première moitié du chromatogramme pourrait provenir d'une légère contamination en zinc provenant de la colonne ou de l'éluant Tris-HCl

En ce qui concerne le cuivre, aucun signal n'est détecté, ce qui pourrait s'expliquer par l'absence de cuivre à une concentration détectable par ICP-AES ou par fixation du cuivre dans le système d'analyse.

Pour essayer de mieux cerner les problèmes de contamination, un volume de 100 μ L de MT de foie de lapin (3,3 μ M), suivi d'un même volume d'un blanc (Tris-HCl + Co 10,2 μ M) ont été injectés en mode isocratique (Tris-HCl:10% propanol) dans le système sans la colonne chromatographique (Figure 43).

On remarque que le blanc ne présente aucune contamination en zinc provenant de la solution de cobalt ou de l'éluant. Par conséquent, l'hypothèse de la contamination

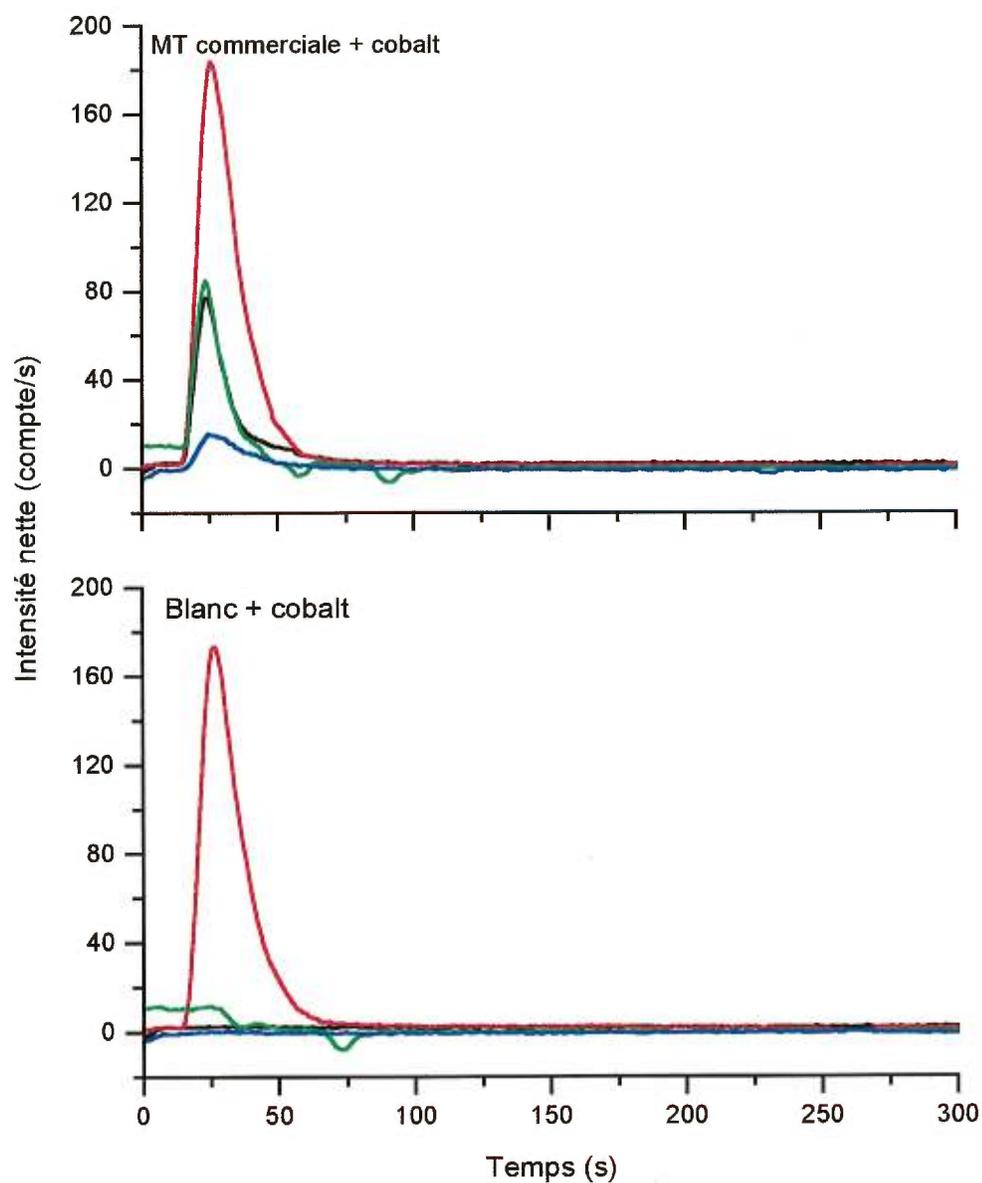


Figure 43: Comparaison des signaux en mode isocratique entre la métallothionéine de foie de lapin et son blanc (injection de 100 μ L de 3,3 μ M MT ou Blanc; liquide porteur = Tris-HCl:10% n-propanol). (—) Cd-MT 10,5 μ M (Cd II 214,438nm), (—) Co 10,2 μ M (Co I 228,616nm), (—) Cu-MT (Cu I 324,754nm), (—) Zn-MT 1,5 μ M (Zn I 213,856nm).

extérieure à la colonne doit être rejetée et l'hypothèse de la contamination résiduelle par la colonne semble se confirmer.

L'injection de la solution de MT de foie de lapin dans le plasma en l'absence de colonne chromatographique montre bien qu'elle renferme du cadmium, du zinc et du cuivre.

Si nous comparons les signaux attribués aux divers éléments des échantillons analysés en présence ou en l'absence de colonne chromatographique, nous constatons que pour les signaux du cadmium à 380s (avec colonne) et à 25s (sans colonne) ont la même largeur de pics (50 s) et par conséquent, l'élargissement principal du pic n'est dû qu'à l'interface entre le chromatographe et le plasma ICP et non à la colonne dans ce cas. La réponse du cadmium selon la surface en présence de la colonne (1430) concorde à moins de 10% près avec celle du cadmium en l'absence de colonne (1464), une fois qu'elles sont corrigées avec le cobalt comme étalon interne.

Nous remarquons également que pour des concentrations molaires comparables, le signal du Co (3397) est supérieur à celui du cadmium (1464) à la Figure 43 dans une proportion similaire que celle retrouvée à la Figure 41 (2,13), ce qui représente une différence de l'ordre de 8%.

Pour le zinc, nous constatons que les signaux de la Figure 43 (359) ne sont pas équivalents à ceux de la Figure 39 (427). En effet, après avoir corrigé avec le cobalt comme étalon interne, cette différence s'élève à 25%. Cependant, on peut expliquer ces différentes observations par la présence d'une contamination en zinc difficile à contrôler.

Enfin, en ce qui concerne le cuivre, son signal est bien visible à la Figure 43 alors qu'il était entièrement absent dans toutes les expériences de chromatographie sauf en début de chromatogramme. Dans toutes les études faites le signal du cuivre varie de manière anormale au début de la séparation et nous n'avons pas d'explication pour cette observation. En ce qui concerne l'absence de signal sur le reste du chromatogramme, elle aurait pu s'expliquer par la perte de cuivre par une fixation irréversible sur la colonne chromatographique. Toutefois, comme nous le verrons plus loin en ICP-MS cela ne semble pas être le cas (section III.5.5).

Enfin, puisque cette dernière expérience ne permet pas de vérifier la présence de la MT dégénérée, on peut supposer que l'hypothèse de la dégénérescence de la MT est encore plausible, mais demanderait une certaine validation.

Afin de nous assurer que nous sommes en mesure de détecter semi-quantitativement les métaux dans la MT provenant des moules, l'analyse a été faite par injection directe sans colonne pour les conditions illustrées à la Figure 44.A et également par séparation chromatographique avec un gradient simplifié Figure 44.B. Pour ces MT, selon une étude faite par Yves Couillard (communication personnelle) par spectrométrie d'absorption atomique à atomiseur électrothermique, le contenu total de cadmium se situe autour de 132 ng/mL (1,2 μ M). Cette concentration est environ 10 fois inférieure à celle utilisée à la Figure 43 et dans ces conditions, nous devrions pouvoir détecter le cadmium. Mentionnons qu'aucune solution de cobalt n'a été ajoutée à la solution de MT de moule pour éviter une dilution supplémentaire de l'échantillon.

La Figure 44.A représente les signaux obtenus en injectant un échantillon de 100 μ L d'une solution de MT de moules et une solution d'un blanc de Tris-HCl dans le plasma ICP en l'absence de la colonne chromatographique. On remarque, par ordre d'importance décroissante, la présence de signaux dus au cuivre, au zinc et au cadmium. Les concentrations approximatives totales sont de 1 μ M pour le cadmium et le zinc. Bien que ces concentrations soient imprécises, elles sont du même ordre de grandeur que celle déterminée par Couillard. Pour le cadmium et le zinc sans la présence de la colonne, les limites de détection sont respectivement de 0,8 μ M et de 0,4 μ M. Lorsque la séparation des isoformes de la MT est effectuée, les limites de détections pour le cadmium sont de 0,01 μ M pour la MT-2, 0,1 μ M pour la MT-1 et 0,3 μ M pour le pic #3, pour un temps d'intégration de 1 s.

Bien que le signal du cuivre soit intense, sa quantification n'a pu être faite puisque, pour les MT de foie de lapin, aucune information n'est donnée sur le contenu en cuivre. Par contre, nous pouvons signaler que la présence de cuivre a également été observée par le laboratoire d'Yves Couillard à INRS-Eau et qu'elle serait de 0,2 μ M pour la MT des moules.

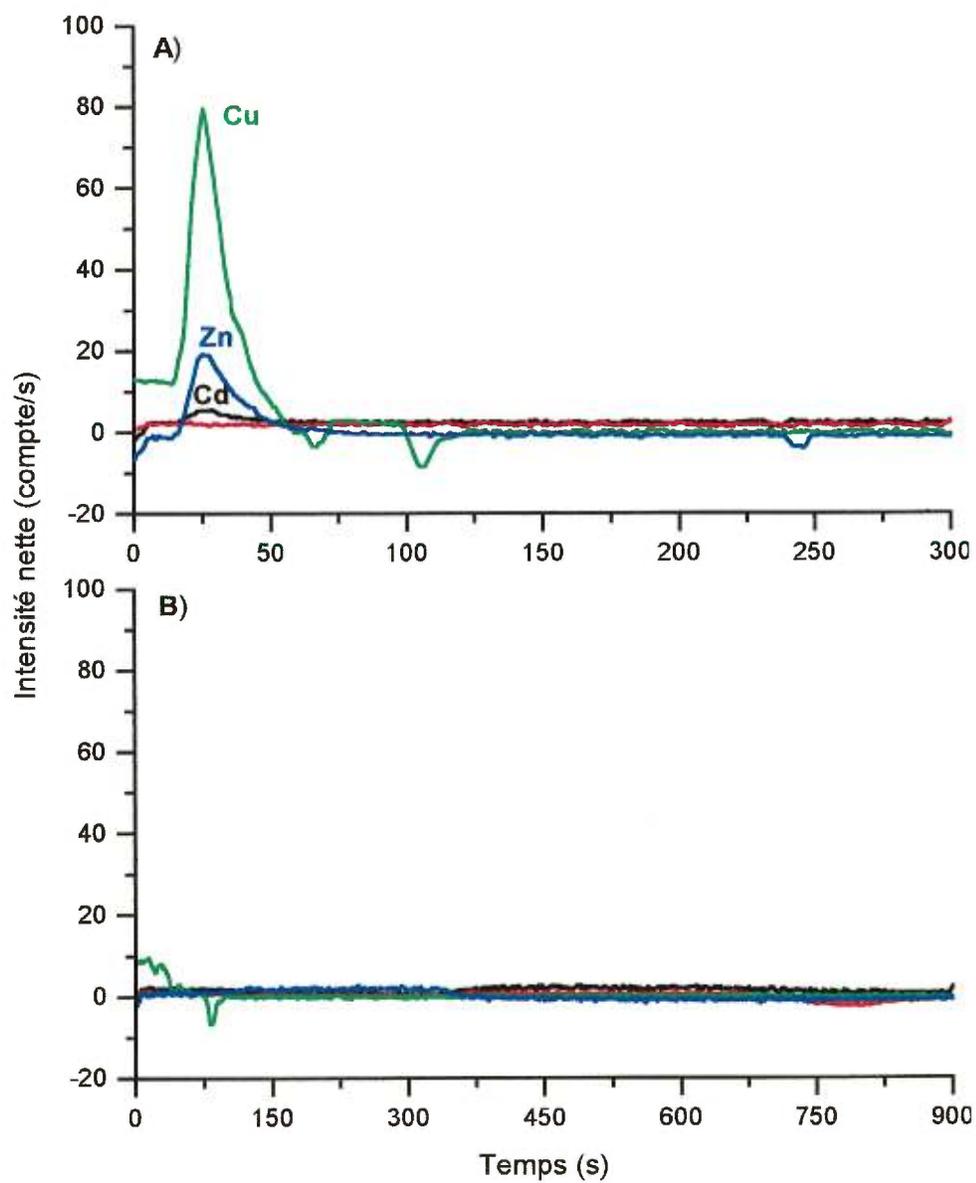


Figure 44: Détermination des métaux liés à la MT de moule (Lac Bousquet, [Co] = 0) : **A)** En mode isocratique (Tris-HCl: 10% n-propanol) sans la colonne et **B)** Éluion en présence de la colonne PRP-3 et avec le gradient modifié.

Pour le cadmium, bien que le signal et la concentration (1 μM) soient faibles, ils montrent quand même la possibilité de contamination par le cadmium dans l'habitat de ces moules.

Pour le zinc, un métal essentiel, une concentration de 1 μM dans les moules a été trouvée et est du même ordre de grandeur que celle de notre étalon (foie de lapin), bien que notre étalon ait été soumis à des doses importantes de Cd. Nous ne pouvons pas en dire plus sur le niveau d'intoxication des moules puisque la masse de moule nécessaire à la préparation des échantillons nous est inconnue.

La Figure 44B représente les signaux obtenus en injectant le même échantillon dans le plasma ICP en présence de la colonne chromatographique. Cette fois aucun signal n'est enregistré pour le cadmium, le zinc et le cuivre. Les concentrations présentes dans les MT de moules après passage dans le système chromatographique étant trop basses pour être détectées. Rappelons également que ces MT proviennent d'un organisme marin tandis que la MT de la Figure 43 provient d'un mammifère. Toutefois, Couillard (Wang *et al.*, 1999) a déterminé que les MT qui proviennent de ces organismes appartiennent à la classe I puisqu'elles possèdent un rapport « métal:MT » de 12:1. Ce rapport a été déterminé par une expérience de saturation à l'argent.

En ce qui concerne le cuivre, qui donnait un signal assez fort à la Figure 44A, le signal de celui-ci a entièrement disparu confirmant une fois de plus l'hypothèse de la perte de cuivre par passage sur la colonne chromatographique.

Enfin, la perte de signal du zinc peut s'expliquer par un effet combiné de dilution et de signal de fond en présence de n-propanol tel que nous l'avons observé antérieurement (section III.4.1, p.86).

III.5. LES MT ET LE ICP-MS

Comme il a été énoncé à la section I.4.2.2, la détection par spectrométrie de masse nécessite que l'élément à détecter soit ionisé. Par conséquent, l'énergie du plasma devra être suffisante pour conduire à une bonne ionisation des éléments à analyser. De plus, comme la détection est basée sur la mesure des rapports masse/charge (m/z) des ions monoatomiques des éléments, les spectres de masse de ceux-ci devront être libres de toutes interférences spectrales ou être affectés par des interférences spectrales contrôlables. Si l'étude des interférences spectrales provenant d'échantillons dans des

solutions aqueuses commence à être bien documentée en ICP-MS, par contre très peu d'informations sont disponibles au sujet des interférences spectrales pour des échantillons en solution organique ou en solution aqueuse contenant des solvants organiques.

Nous avons déjà vu que la présence de solvants organiques affectait la nébulisation et aussi conduisait à des interférences spectrales en émission atomique. Nous allons d'abord étudier l'effet de la présence du solvant et du système de nébulisation sur le spectre de masse de l'échantillon. Pour effectuer cette étude nous avons choisi comme conditions expérimentales initiales en ICP-MS celles que nous avons obtenues lors de l'optimisation en ICP-AES. Par contre, puisqu'il existe certaines différences entre ces deux montages, ces paramètres pourraient ne pas être optimaux en ICP-MS. En effet, à titre d'exemple, comme le diamètre de la torche de l'appareil IRIS utilisée en ICP-AES est supérieur à celui de la torche du PlasmaQuad II utilisée en ICP-MS, nous aurons une différence de densité de la puissance entre les deux plasmas pour une même puissance totale appliquée au plasma et donc nous pouvons anticiper des différences de propriétés analytiques.

III.5.1. BALAYAGE DES MASSES POUR DIFFÉRENTE COMPOSITION D'ÉLUANT

La présence de solvant organique dans le plasma peut affecter le signal de fond du spectre de masse et également affecter la qualité des signaux analytiques (intensité et stabilité). De plus l'emploi d'un gradient d'éluant pour la séparation chromatographique implique une variation de la composition du solvant en fonction du temps et pourrait donc modifier continuellement l'équilibre des différentes espèces présentes dans le plasma à un instant donné.

Pour étudier les effets de la composition du solvant sur le signal de fond, un balayage des masses a été effectué dans diverses conditions. La résolution du quadripôle du MS est de l'ordre d'une unité de masse atomique (uma) et ne permet pas de caractériser entièrement les molécules polyatomiques présentes dans le spectromètre de masse. Toutefois, cette résolution est suffisante pour déterminer les masses pour lesquelles une interférence est observée. La Figure 45 montre des spectres de masse obtenus par aspiration continue de solvants de différentes compositions avec le nébuliseur thermique (TSP). Le balayage des masses a été effectué entre les masses allant de 57 à 200 uma, mais seule la région située à des masses inférieures à 140 uma est

représentée puisqu'aucun signal de fond n'était détecté aux plus hautes masses. Les régions inférieures à la masse 57 n'ont pas été balayées puisqu'elles présentent d'importantes interférences spectrales provenant de la matrice du solvant qui donne des signaux de fond très intenses qui provoquent la saturation du détecteur.

Sur la Figure 45, nous avons identifié la masse correspondant aux principaux signaux observés. Si nous regardons le spectre de masse obtenu lors de l'aspiration de la solution aqueuse (Tris-HCl) nous constatons que les principaux signaux se retrouvent aux masses 58 (#1), 60 (#2), 77 (#9), 79 (#10) et 81 (#11). Ces signaux proviennent du nickel des cônes du ICP-MS (#1 et #2) et des ions moléculaires de l'argon tels Ar_2^+ et Ar_2H^+ (#10 et 11). Ces signaux sont partiellement supprimés lors de la détection. En effet pour protéger le détecteur d'une sursaturation dommageable le balayage de masse est interrompu au voisinage de la masse 80 correspondant à l'ion Ar_2^+ . Le pic #9 à 77 uma semble augmenter avec l'introduction croissante de solvant organique et ne peut être expliqué avec les informations dont nous disposons.

Nous remarquons que l'augmentation du pourcentage de propanol dans le solvant modifie le spectre de masse surtout dans la région inférieure à 80 uma de sorte qu'à certaines masses on observe une augmentation du signal alors que pour d'autres masses on enregistre une baisse d'intensité.

Les différents composés qui font partie du plasma ou qui y ont été introduits sont par ordre d'importance relative, l'argon, l'eau, le propanol et le Tris-HCl. Burton (Burton *et al.*, 1992) et May (May *et al.*, 1998) ont établi une base de données qui permet de déterminer les interférences les plus communes rencontrées avec un ICP-MS. Cette base a été établie à partir de la mesure des spectres obtenus avec des solutions aqueuses acides (HNO_3 , HCl , H_2SO_4) en ICP-MS. Par conséquent, elles ne peuvent pas être utilisées directement pour expliquer toutes les interférences présentes dans les spectres de masse de la Figure 45.

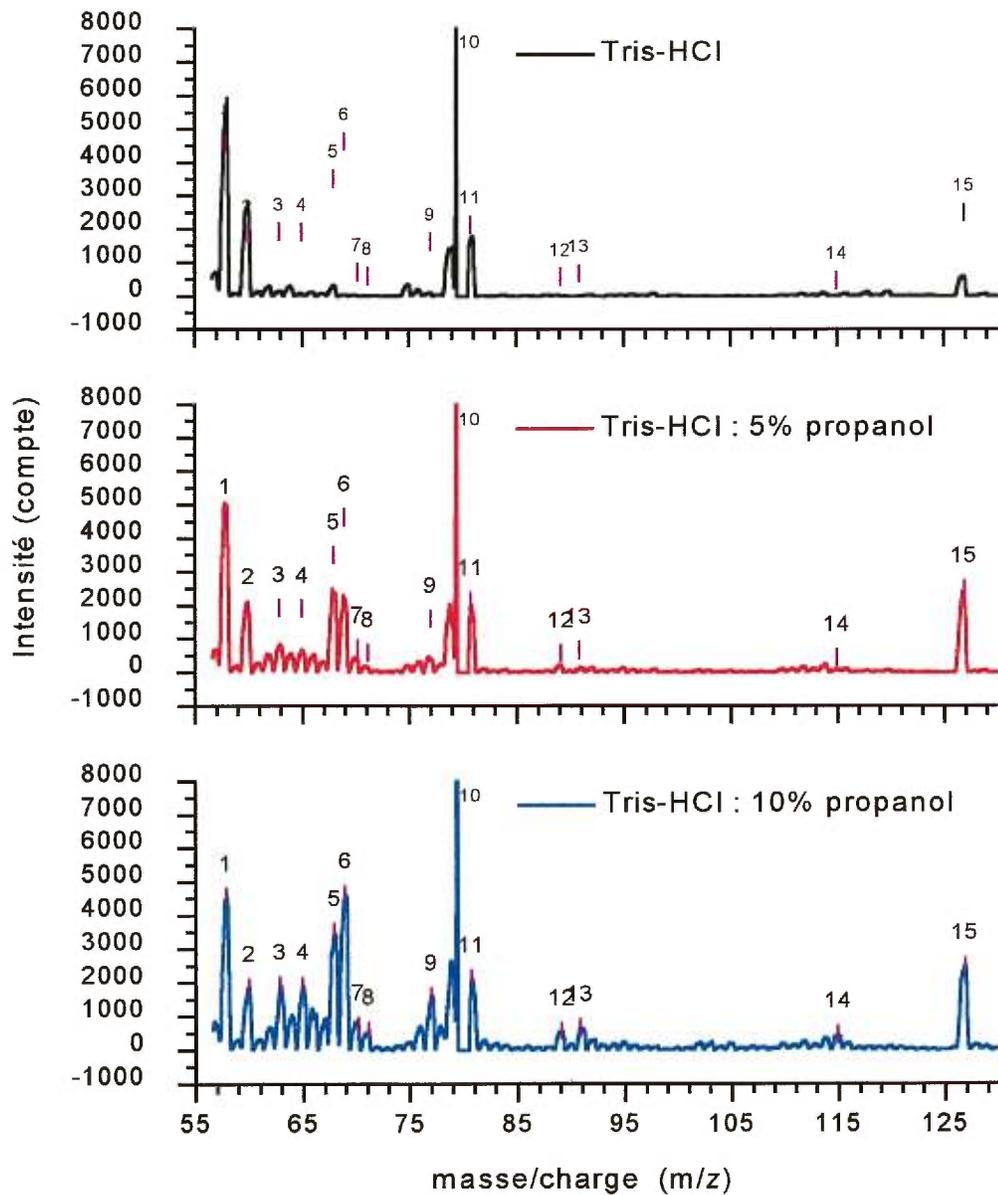


Figure 45: Spectre de masse de différentes compositions de solvant pour la détermination des interférences spectroscopiques avec un nébuliseur thermique.

N° Pic	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
m/z	58	60	63	65	68	69	70	71	77	79	81	89	91	115	127

Toutefois, comme ces solutions contiennent des éléments (H, O, N, Cl, S) présents dans nos échantillons, certaines interférences peuvent être expliquées. Cependant, puisque l'énergie de dissociation des molécules et des espèces présentes dans ces acides peut différer de celle des produits présents dans nos échantillons. Dans notre cas, ces tables ne serviront donc qu'à aider à estimer les différents ions polyatomiques présents dans le plasma ICP ou formés lors de l'échantillonnage du plasma par le MS.

En comparant les trois balayages de la Figure 45, nous remarquons que seules les masses 58 et 60 subissent une diminution d'intensité avec l'augmentation du pourcentage en propanol dans le solvant. Ces masses correspondent à différents isotopes du nickel qui est le matériau de notre cône échantillonneur. Puisque le plasma entre en contact avec ce cône, un peu de nickel de l'orifice est arraché, atomisé et ionisé et va entrer dans le filtre de masse. On remarque que la diminution du signal est plus importante lors de l'introduction des premiers 5% de propanol. Cette diminution de l'intensité peut surtout s'expliquer par le refroidissement du plasma dû à la présence de solvant organique ou peut-être, à un degré moindre, par une oxydation plus faible du nickel en présence de carbone provenant de l'alcool. Ces deux effets vont croître avec l'augmentation du pourcentage de solvant organique.

Cette étude nous permet également d'observer que les signaux aux masses du ^{63}Cu , ^{65}Cu , ^{64}Zn et ^{66}Zn peuvent être affectés par des interférences spectrales lors de l'analyse en présence de solvant organique.

En effet, le refroidissement dû à l'introduction de produits organiques peut également favoriser la formation d'autres molécules polyatomiques dans la zone de recombinaison. Ce phénomène pourrait expliquer l'augmentation de plusieurs signaux. Avant de tenter d'expliquer les divers signaux, notons que les balayages ont été effectués avec des cônes échantillonneurs qui avaient déjà été utilisés pour l'analyse des MT et, par conséquent, les ions polyatomiques observés pourraient être également composés des éléments trouvés dans la MT, comme le soufre.

La formation des ions polyatomiques $^{35}\text{Cl}^{14}\text{N}_2^+$ et $^{37}\text{Cl}^{14}\text{N}_2^+$ peut être la cause de l'augmentation des signaux aux masses 63 et 65. Cependant, le rapport des intensités devrait être de 3:1 à cause du rapport isotopique du chlore, ce qui n'est pas le cas.

L'augmentation importante de l'intensité à la masse 68 peut provenir des ions polyatomiques $^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}_2^+$, $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^{16}\text{O}^+$ et $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}_2\text{H}^+$. Les rapports des abondances isotopiques montrent que parmi ces molécules, la molécule pouvant être également responsable d'une augmentation du signal à la masse 70 proviendrait de $^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}_2\text{H}^+$ puisque le rapport $^{35}\text{Cl}:^{37}\text{Cl}$ est de 3:1, soit un rapport supérieur à tous les autres isotopes qui composent les autres molécules. De plus, il est possible qu'une partie du signal à la masse 70 provienne de la molécule $^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^{16}\text{O}^+$ puisque la quantité d'argon présente est très importante. La formation de $^{35}\text{Cl}_2$ à la masse 70 est, quant à elle, presque inexistante puisque aucun signal n'est observé à la masse 74.

Les signaux présents à la masse 79 et 81 font partie du pic à la masse 80 qui correspond à $^{40}\text{Ar}_2$. Cette région est « sautée » lors du balayage de masse puisque la concentration de cette molécule est trop importante de sorte qu'elle sature le détecteur.

Malheureusement, il nous est impossible de déterminer avec certitude toutes les contributions présentes aux différentes masses car chaque élément possède plusieurs isotopes et l'interprétation devient très complexe. Cependant, ces balayages montrent que la désolvatation du solvant avec le système de nébulisation thermique est incomplète et que la présence de solvant organique amène une augmentation du signal de fond. L'augmentation de l'intensité observée à certaines masses ne reflète pas nécessairement une augmentation du nombre de molécules dues à la présence du solvant organique, mais peut aussi être expliquée par une modification de la répartition des énergies dans le plasma modifiant ainsi la distribution des diverses espèces dans le plasma ou lors de l'échantillonnage.

Le spectre de masse observé dépend énormément du système de nébulisation utilisé. A titre d'exemple les spectres de masse obtenus avec les mêmes solvants (Tris-HCl et Tris-HCl:10% propanol) et avec deux systèmes de nébulisation différents sont représentés aux Figures 46 et 47. Alors que des augmentations de certains signaux du signal de fond sont observées lorsque le TSP est utilisé comme nébuliseur (Figure 46), l'utilisation d'un nébuliseur pneumatique conventionnel (Figure 47) entraîne la diminution de tous les signaux. La moins bonne qualité de l'aérosol produit par le système de nébulisation pneumatique et son transport moins efficace vers le plasma

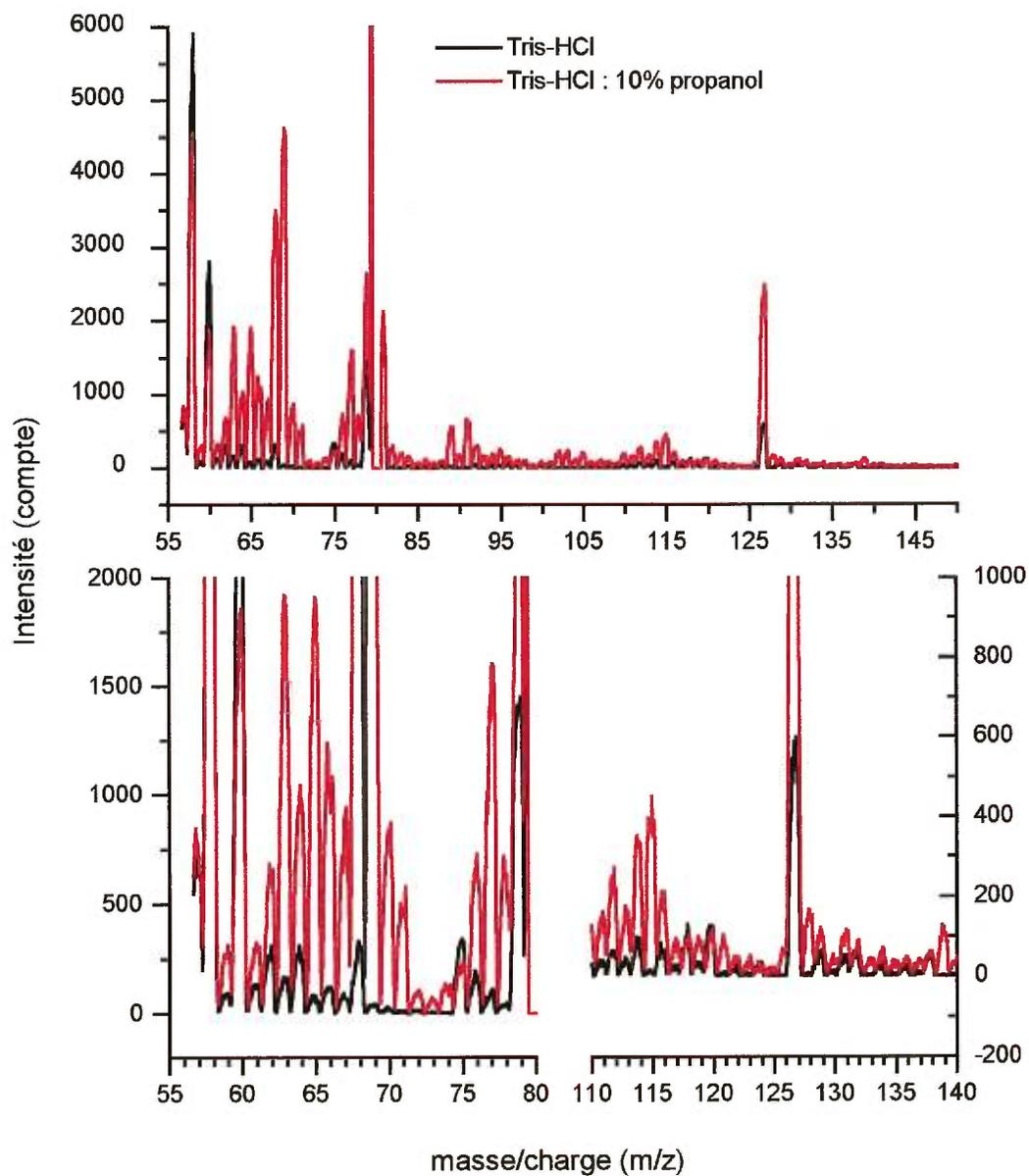


Figure 46: Spectre de masse par ICP-MS avec le système à nébulisation thermique et les chambres de nébulisation «U» et cyclone pour différentes compositions de solvants.

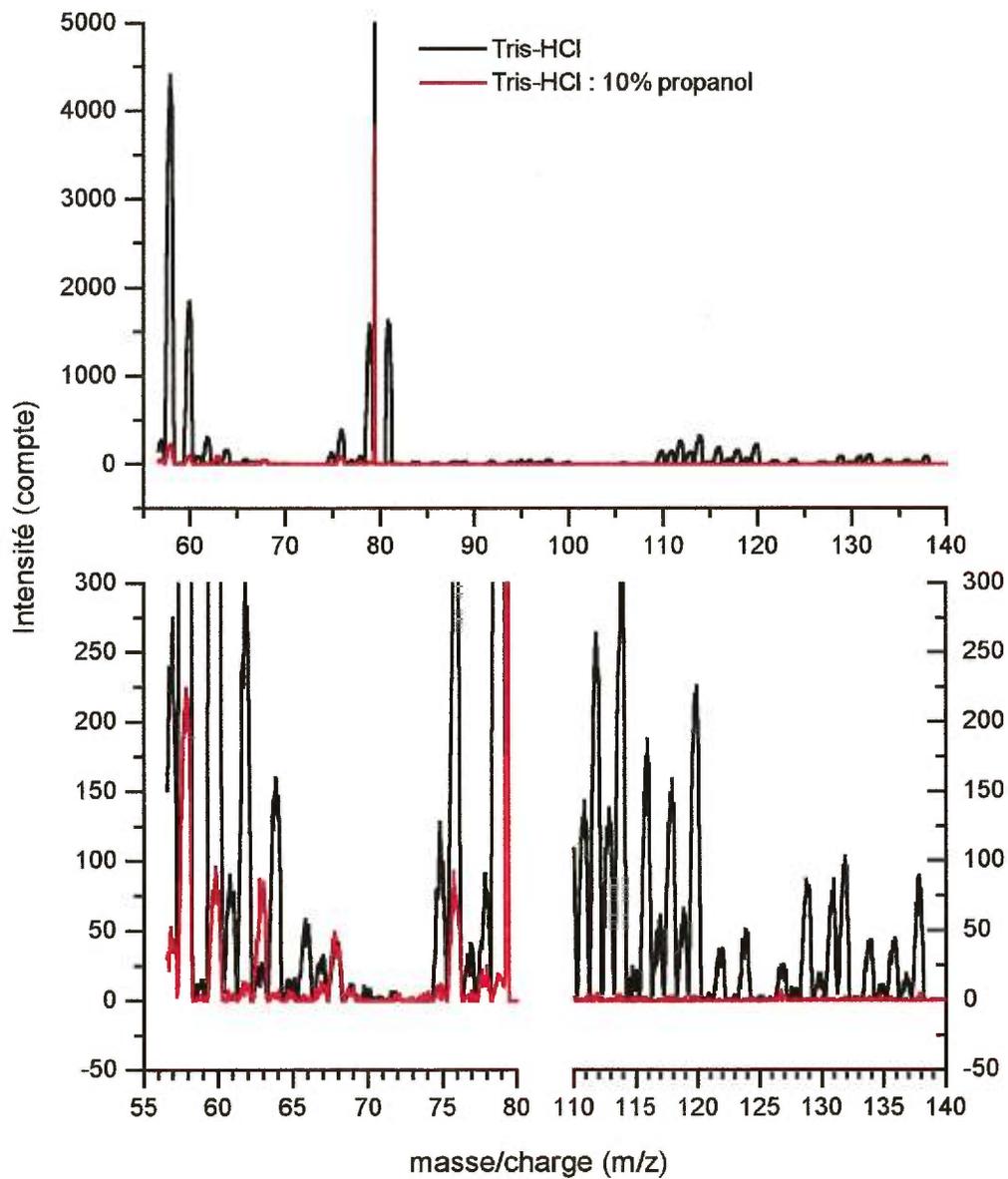


Figure 47: Spectre de masse par ICP-MS avec le système de nébulisation pneumatique et la chambre de nébulisation Scott pour différentes compositions de solvants.

entraînent une diminution assez importante des intensités entre 61 et 78 uma. Nous avons déjà discuté de ces effets dans la section III.3.4. Un seul signal semble augmenter à 63 uma. Ce signal peut être expliqué par la formation d'amas mais ceci est difficile à vérifier.

III.5.2. INFLUENCE DU N-PROPANOL SUR LE SIGNAL ANALYTIQUE

Cette expérience permet de déterminer si la présence du propanol a une influence sur l'intensité du signal ainsi que sur sa reproductibilité. La présence du Tris-HCl pourrait également affecter la réponse des métaux. De plus, dans un système ICP-MS, l'orifice de l'interface entre le plasma ICP et le MS est relativement petit (≈ 1 mm), une concentration élevée de sel peut créer une obstruction partielle de l'orifice et ainsi diminuer le signal analytique. Les influences du propanol et du Tris-HCl sur le signal et la reproductibilité seront déterminées par la mesure du spectre de masse obtenu par aspiration continue d'une solution contenant 10 $\mu\text{g/L}$ de chacun des éléments d'intérêt avec le nébuliseur pneumatique (Meinhard) et la chambre de nébulisation de type Scott refroidie à une température de -5°C .

En premier lieu, les conditions optimales du plasma et de détection ont été obtenues avec une solution de 10 $\mu\text{g/L}$ de cuivre, zinc, cobalt et cadmium dans l'acide nitrique 2%. Cette mesure servira également de référence pour le reste de l'étude. Par la suite, en gardant les mêmes conditions expérimentales, des solutions de même concentration en métaux ont été préparées dans différents solvants et ont été étudiées par ICP-MS.

Un ou deux des isotopes les plus abondants de chacun de ces métaux ont été étudiés. La Figure 48 représente la variation des intensités mesurées pour les éléments d'intérêt (Cu, Zn et Cd) et pour le cobalt à titre d'étalon interne. Pour chaque élément, on a mesuré le signal successivement dans les solutions suivantes : trois solutions "aqueuses" (eau : 2% HNO_3 , eau, eau:Tris-HCl) et trois solutions "organiques" (eau:2% HNO_3 :10% propanol, eau:10% propanol et eau:Tris-HCl:10% propanol).

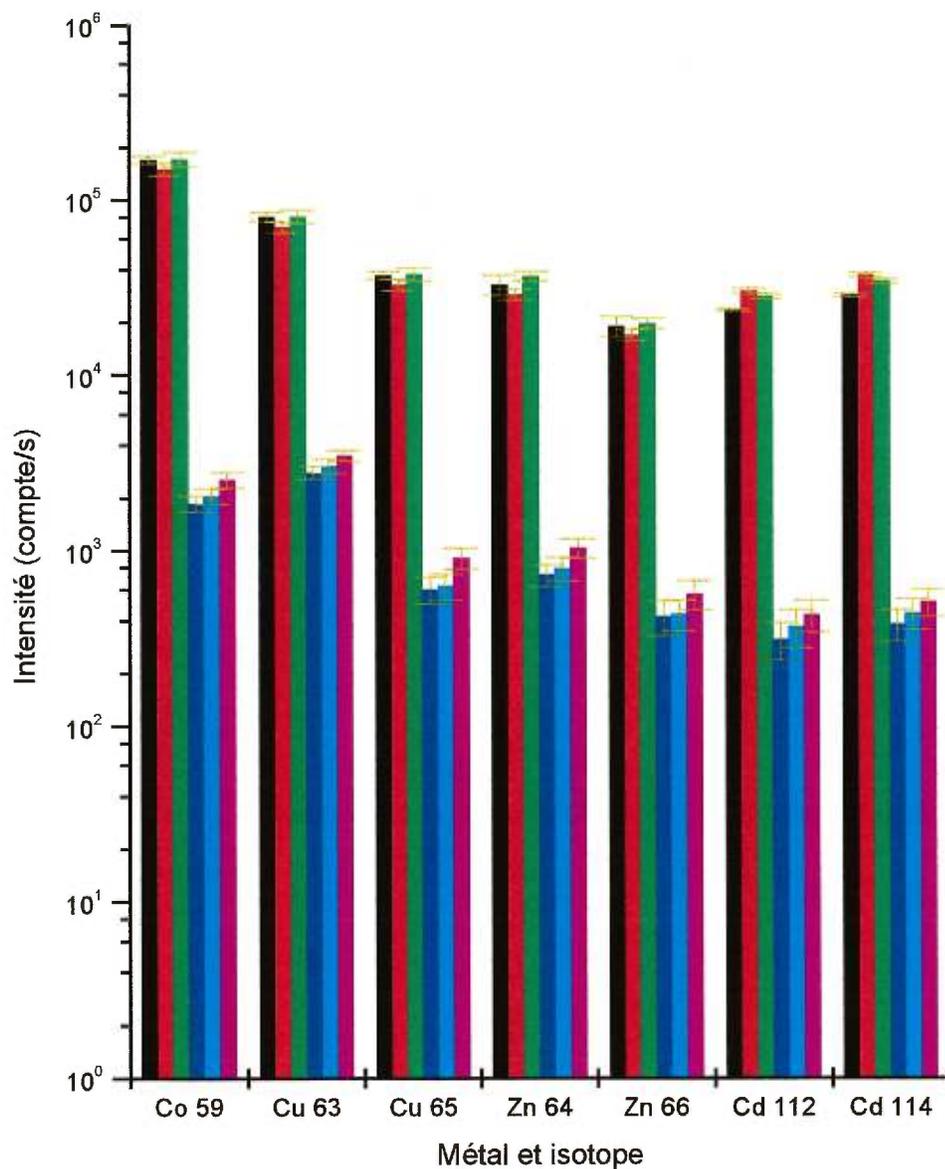


Figure 48: Influence du solvant sur le signal en aspiration continue avec un nébuliseur Meinhard et une chambre Scott refroidie à -5 °C pour une solution de 10 µg/L en métal; (■) 2% HNO₃, (■) Eau pure, (■) Tris-HCl, (■) 2% HNO₃:10% propanol, (■) Eau:10% propanol, (■) Tris-HCl:10% propanol.

La Figure 48 montre que pour les trois solutions "aqueuses" le signal pour chacun des éléments mesurés est à peu près constant et ne dépend pas du solvant. Par contre, on observe une diminution de l'intensité du signal de l'ordre de deux décades en présence de propanol. Cette diminution est due à la présence du solvant organique et résulte d'une dégradation de la qualité de l'aérosol et de son transport vers le plasma qui va modifier les caractéristiques du plasma (Section III.3.4).

La Figure 49A représente le signal normalisé par mole d'élément et donne ainsi la variation de sensibilité pour les divers éléments et les divers isotopes. La précision des mesures est également donnée et est de l'ordre de 5%. La Figure 49B montre la perte de sensibilité pour les éléments en présence du solvant organique de même que la précision qui est de l'ordre de 15%.

Pour étudier la présence éventuelle d'effets mémoires, l'expérience suivante a été faite. Entre chaque changement de solvant, la solution contenant les éléments dans l'acide nitrique 2% a été aspirée afin de vérifier si le solvant précédent amenait des effets mémoires ou avait modifié de manière irréversible les conditions du ICP-MS (ex.: blocage de l'orifice du cône d'interface). Nous avons noté que l'intensité du signal dû aux analytes dans l'acide nitrique 2% reste constante après chaque changement de solvant et qu'il n'y a pas d'effets mémoire significatifs présents. Pour minimiser les variations qui pourraient venir du système de nébulisation, les intensités ont été normalisées en prenant le signal du ^{59}Co comme étalon interne. Les résultats sont rapportés à la Figure 50 et nous voyons que les effets mémoire sont absents ou négligeables.

Afin d'évaluer si les résultats observés pour l'effet de solvant étaient les mêmes en mode d'injection continue de l'échantillon ou en mode d'injection discontinue, l'injection de 100 μL d'une solution de 10 $\mu\text{g/L}$ des métaux (Cu, Zn, Cd, Co) dans le Tris-HCl dans les différents solvants servant de liquide d'appoint a été effectuée (Figure 51). Les signaux ont été évalués par la mesure de l'aire du signal transitoire résultant de l'injection d'un volume fini d'échantillon dans le plasma. On constate les mêmes observations que celles faites précédemment. Les divers solvants "aqueux" ne provoquent pas de variation significative du signal, par contre l'introduction d'un solvant "organique" diminue

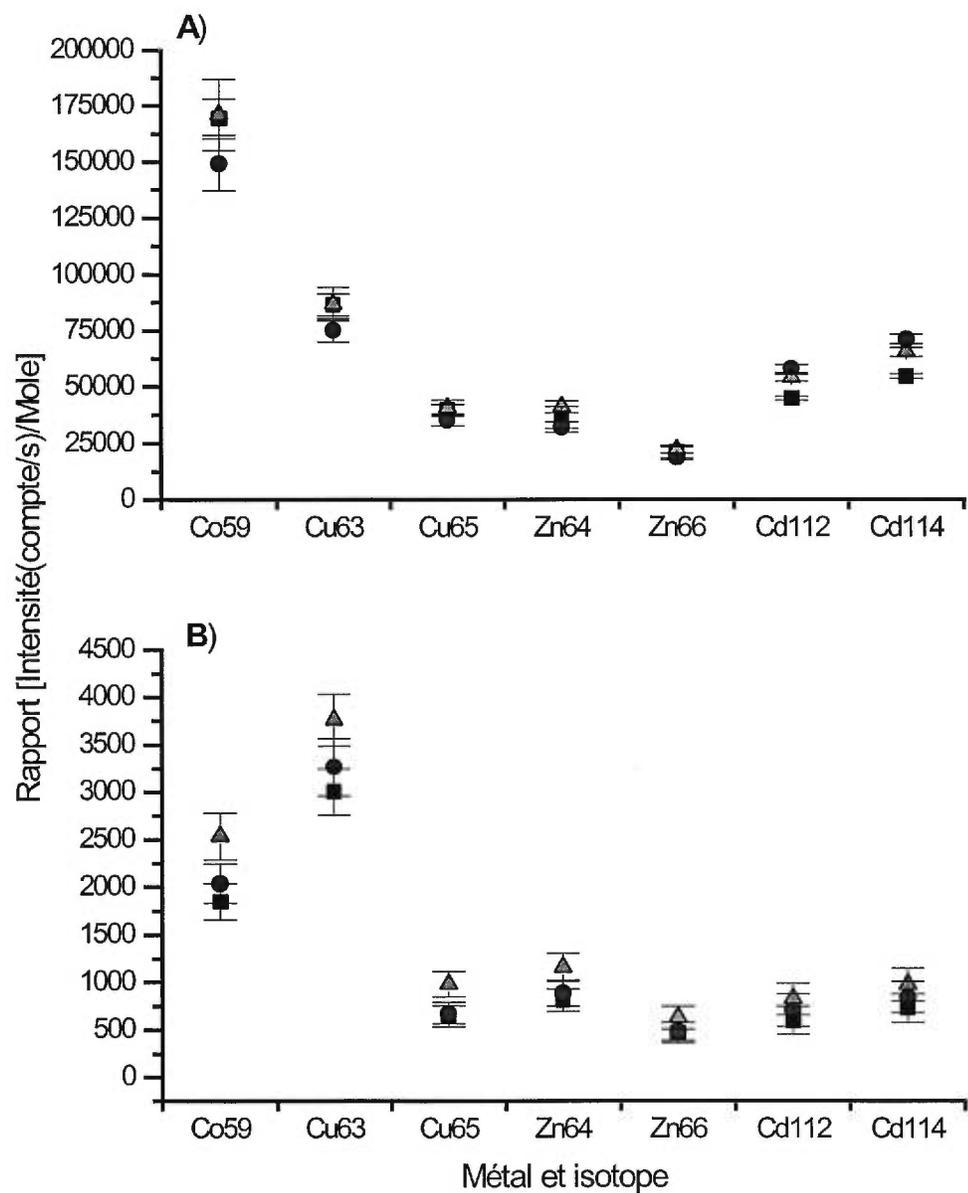


Figure 49: Influence des solvants sur le signal pour différents éléments avec le nébuliseur pneumatique et la chambre de nébulisation Scott en aspiration continue. **A)** Sans solvant organique et **B)** avec 10% n-propanol; (■) 2% HNO₃, (●) eau pure, (▲) Tris-HCl.

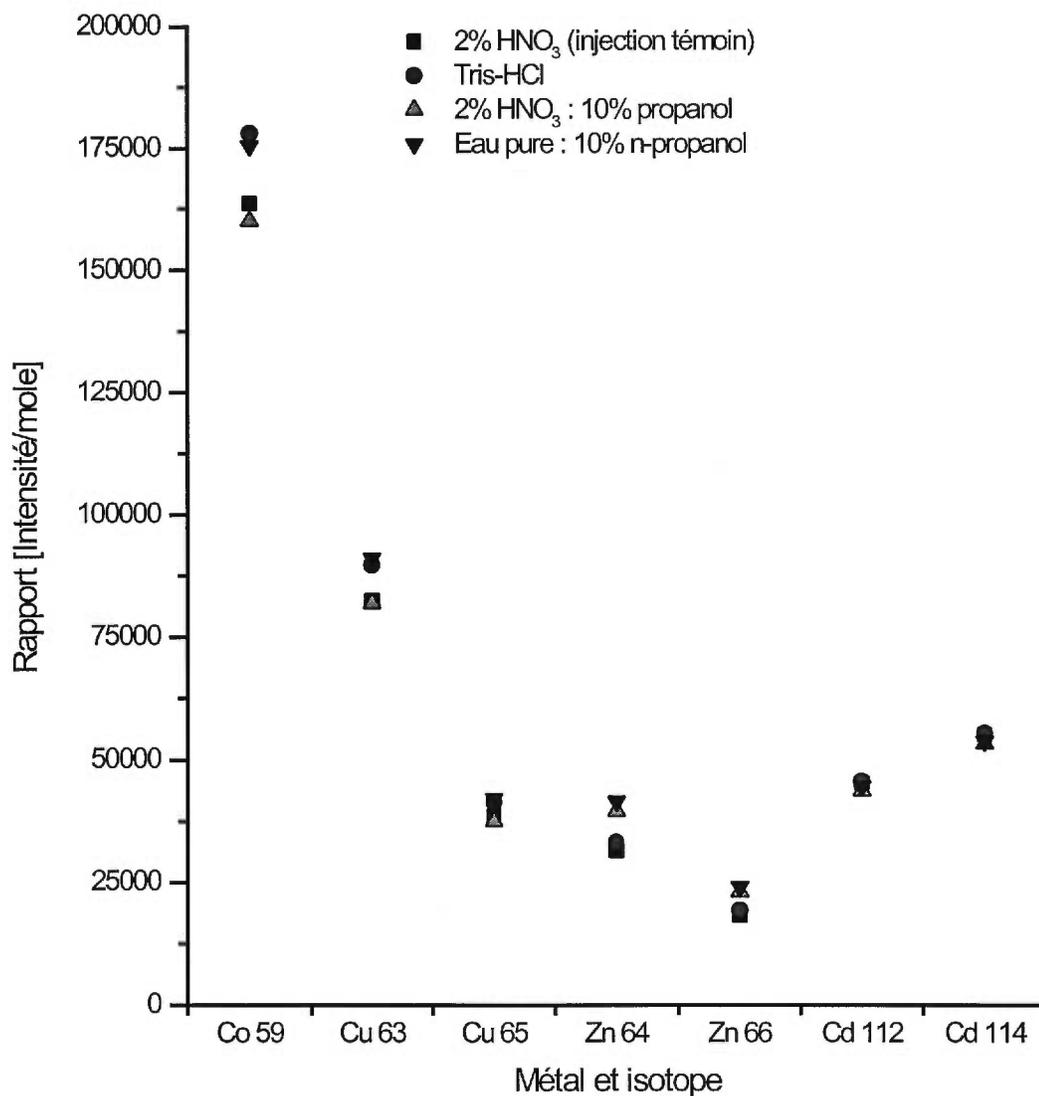


Figure 50: Détermination de l'effet mémoire de différentes compositions de solvants sur le signal d'une solution 2% HNO₃ contenant 10 µg/L en métal. Le nébuliseur pneumatique concentrique et la chambre Scott ont été utilisés. Le signal est normalisé par le nombre de mole de chaque élément, lequel a été normalisé par rapport à celui du ⁵⁹Co.

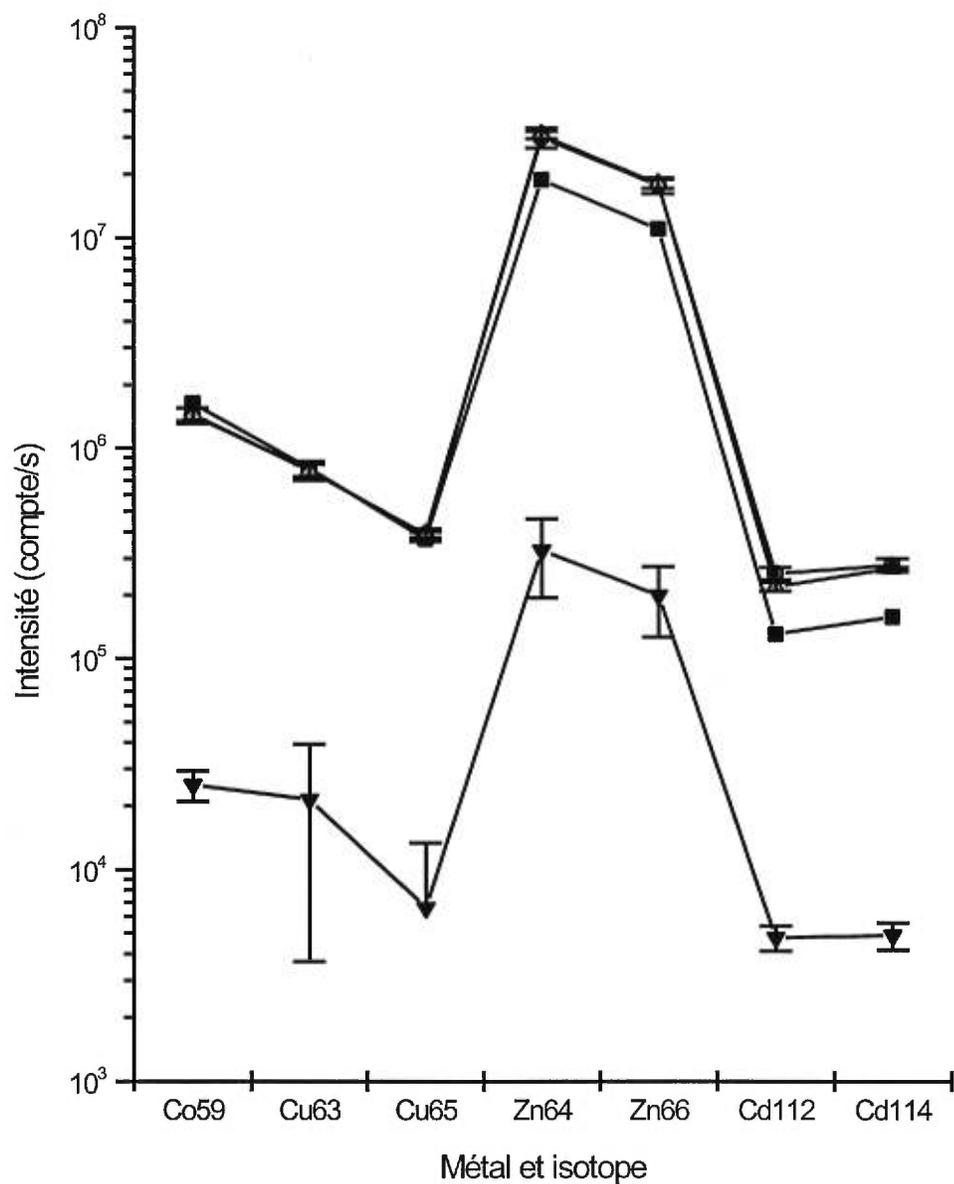


Figure 51: Influence du solvant sur le signal des éléments en mode d'injection discontinue d'échantillon. Volume : 100 μ L d'une solution de 10 μ g/L en métal avec un nébuliseur pneumatique et une chambre de nébulisation Scott refroidie à -5 °C ; (■) 2% HNO₃, (●) Eau pure, (▲) Tris-HCl, (▼) Tris-HCl:10% propanol.

fortement l'intensité du signal. La présence d'un solvant porteur organique affecte donc également le signal d'un échantillon "aqueux". Dans toutes ces expériences, comme la quantité de métaux injectée est la même, le signal observé dépend de la qualité de l'aérosol et de la perturbation du plasma par le solvant porteur. Comme nous l'avons déjà indiqué la diminution en présence de solvant organique est expliquée par la variation de la qualité de l'aérosol, de l'efficacité de son transport vers le plasma et des perturbations que l'aérosol apporte au plasma. De plus, le refroidissement produit par l'aérosol "organique" peut engendrer des recombinaisons pour former des ions moléculaires chargés. En effet, aux masses 64 et 66 des isotopes du zinc on constate que les signaux sont d'une décade supérieure à ceux des autres métaux et il est probable que des ions moléculaires, dus à la présence de Tris-HCl et de propanol, peuvent expliquer cette hausse.

Une étude de la reproductibilité du signal en présence de différents solvants a été faite durant cette même expérience. Les résultats sont présentés aux Figures 52 et 49A et la reproductibilité est exprimée par l'écart-type relatif sur trois mesures. Les fluctuations sont particulièrement importantes dans la région de 63 à 66 uma, région où nous avons constaté la présence d'espèces moléculaires relativement importantes. Comme montré précédemment (Figure 48), la présence de propanol a fait diminuer le signal d'un facteur de 100. Pour certains éléments, cette chute d'intensité est tellement forte pour une concentration de 10 µg/L en métal que le signal d'analyte se perd dans le signal de fond. Par conséquent, les variations du « signal » enregistrées peuvent être dues au bruit du signal de fond.

Cette expérience a été faite avec un système de nébulisation pneumatique et une chambre Scott dont l'efficacité de désolvation de l'aérosol n'est pas très bonne. L'emploi d'un système à nébuliseur thermique (TSP) pourrait être intéressant puisque ce système permet une meilleure désolvation.

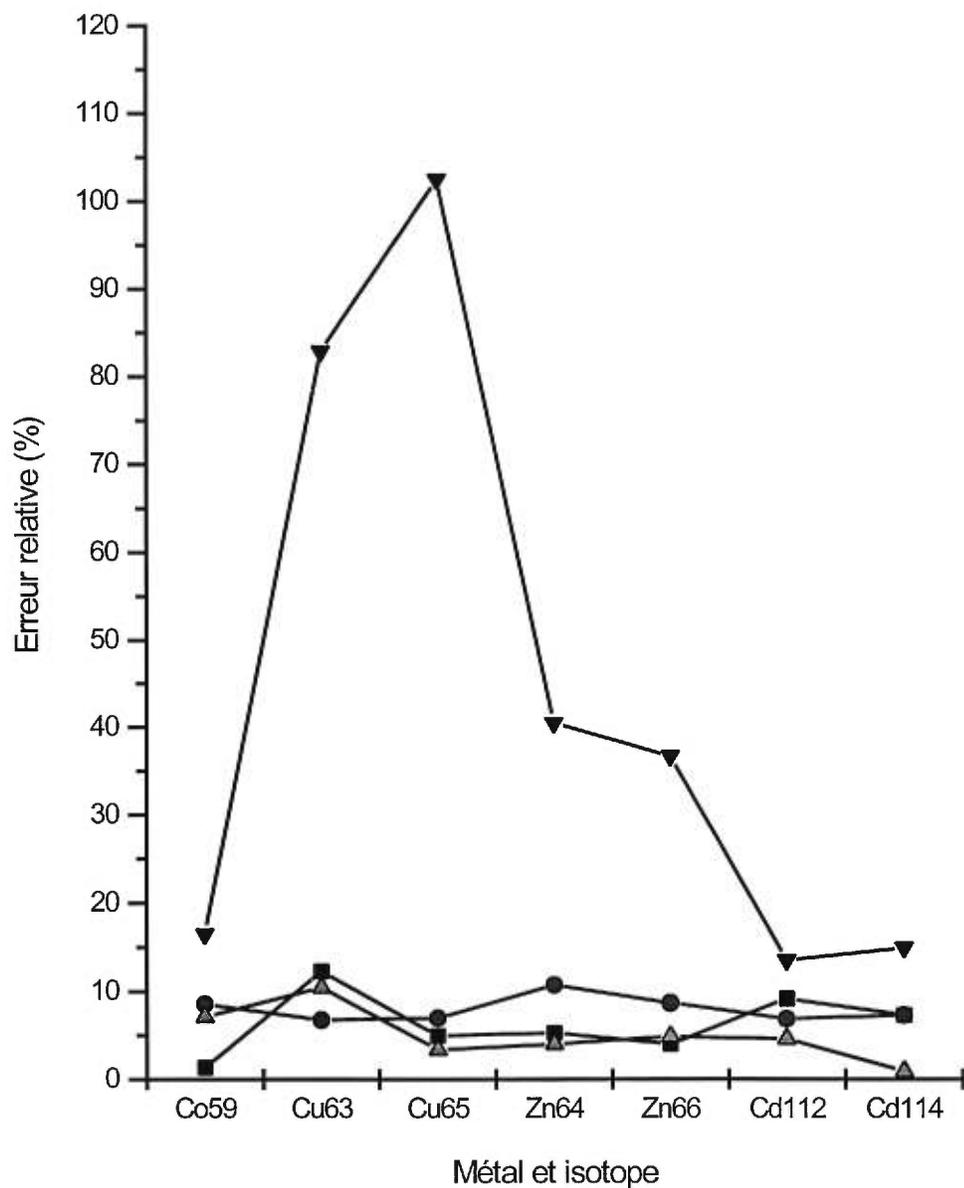


Figure 52: Influence des solvants sur la reproductibilité de la surface suite à l'injection de 100 μL d'une solution de 10 $\mu\text{g/L}$ en métal avec un nébuliseur pneumatique et une chambre Scott refroidie à -5°C ; (■) 2% HNO_3 , (●) Eau pure, (▲) Tris-HCl, (▼) Tris-HCl:10% propanol.

III.5.3. INFLUENCE DE L'UTILISATION D'UN NÉBULISEUR THERMIQUE SUR LE SIGNAL

Comme nous l'avons vu précédemment (Section III.3.4) l'utilisation d'un nébuliseur thermique combiné à une chambre de nébulisation refroidie permet de diminuer la quantité de solvant organique introduite dans le plasma. Celui-ci aura donc plus d'énergie disponible pour atomiser et ioniser les espèces contenues dans l'aérosol et nous espérons que la forte baisse de signal de près de deux décades, qui avait été observée, pourra être compensée de cette façon. Afin d'identifier les causes qui pourraient expliquer l'augmentation du signal observée pour le TSP, une étude comparative a été faite entre le nébuliseur pneumatique et le nébuliseur thermique (TSP). Un système de désolvatation en « U » et une chambre de nébulisation cyclone refroidie ont été utilisés pour les deux types de nébuliseurs. Toutefois les conditions optimales de fonctionnement du plasma et du nébuliseur ont été utilisées pour chacun de ces montages.

Comme dans l'expérience précédente, 100 μL d'une solution de Cd (10,5 μM) et de Co (0,85 μM) dans le Tris-HCl ont été introduits dans le plasma. Le liquide d'appoint est l'éluant utilisé en HPLC, soit une solution de Tris-HCl:10% propanol. La Figure 53 représente la variation des intensités mesurées par spectrométrie de masse pour une injection de cette solution en utilisant les deux modes de nébulisation.

Tout d'abord, la position du pic nous indique que le volume mort du système de nébulisation pneumatique est plus grand que celui du TSP. La hauteur du pic obtenue pour tous les isotopes est plus grande pour le TSP et de même, la largeur du pic est plus petite avec le TSP qu'avec le nébuliseur pneumatique, soit de 65 et 140 s respectivement. L'aire du signal du Cd obtenue avec le TSP est environ deux fois plus forte que celle obtenue avec le nébuliseur pneumatique si l'on considère le signal brut. Pour améliorer la précision des expériences et permettre de meilleures comparaisons, nous avons normalisé le signal de Cd par celui de Co (étalon interne) et dans ce cas, l'augmentation de l'aire du signal du TSP par rapport au signal du nébuliseur pneumatique est de 1,6.

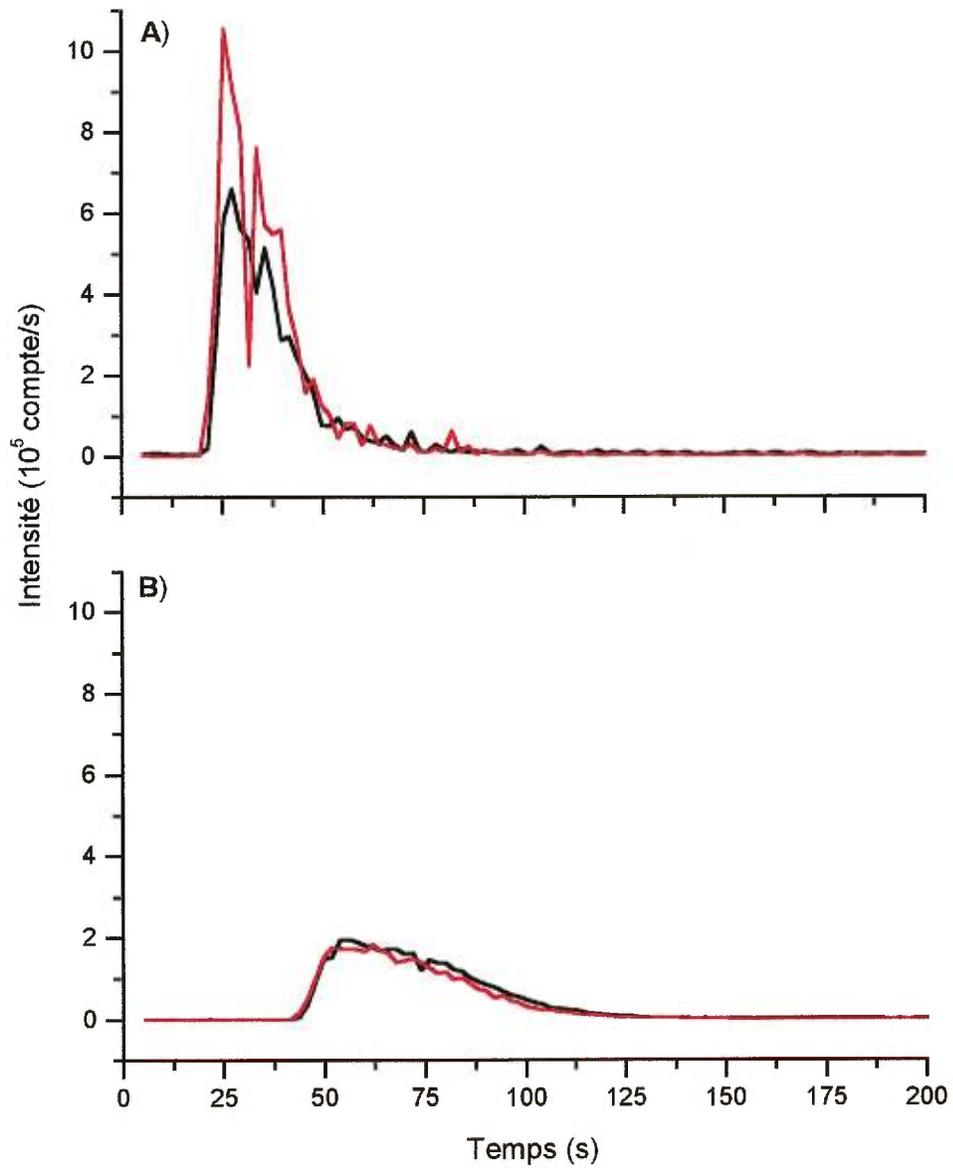


Figure 53: Comparaison des chromatogrammes pour une injection de 100 μL d'une solution de 10,5 μM de Cd libre et de 0,85 μM de Co libre pour différents nébuliseurs : (—) ^{59}Co , (—) ^{114}Cd ; **A)** TSP, **B)** nébuliseur pneumatique.

L'expérience a été répétée en injectant du cadmium sous forme liée dans une MT. Les signaux obtenus sont représentés à la Figure 54. Comme précédemment, on constate que le volume mort est plus grand avec le nébuliseur pneumatique que pour le TSP. La hauteur du maximum pour le TSP est supérieure à celle obtenue pour le nébuliseur pneumatique. De même les surfaces sous les pics sont plus élevées avec le TSP qu'avec le nébuliseur pneumatique. Une augmentation des aires de l'ordre de 1,6 est observée sans normalisation interne par le signal dû au cobalt et après normalisation, l'augmentation est de 1,4, donc légèrement inférieure à ce qui avait été observé avec le cadmium libre.

Les variations du signal brut peuvent être dues à des irrégularités dans la formation de l'aérosol ou au transport de cet aérosol au plasma. Si la condensation de solvant organique est trop importante, un bouchon liquide temporaire est formé causant un court arrêt du transport de l'aérosol. Cette condensation s'effectue à la sortie du TSP en bordure de la chambre de désolvatation (chambre en « U ») car la différence de température y est la plus importante. Ces fluctuations affecteront la reproductibilité de l'analyse.

Comme pour les deux formes métalliques du cadmium (libre ou lié aux MT), le rapport entre le signal obtenu avec le TSP et le nébuliseur pneumatique est supérieur à un, on peut conclure que: i) la meilleure qualité de l'aérosol, ii) son efficacité de transport, iii) sa désolvatation et/ou iv) son temps de résidence dans le plasma sont les facteurs à considérer pour expliquer l'amélioration du signal analytique du cadmium pour le TSP.

Pour bien caractériser l'origine des améliorations, si nous regardons d'abord la qualité de l'aérosol, nous avons déjà vu que lorsque le solvant était identique, les gouttelettes d'aérosol formées par le TSP étaient probablement plus petites à cause du diamètre du capillaire et de la désolvatation partielle produite dans le TSP.

En ce qui concerne le transport, la chambre de nébulisation en « U » possède un tube interne dont le diamètre interne est très faible comparé à celui d'une chambre Scott normalement utilisée avec un nébuliseur pneumatique. Ce faible diamètre pourrait entraîner une « condensation » partielle de l'aérosol primaire à l'entrée de la chambre, ce

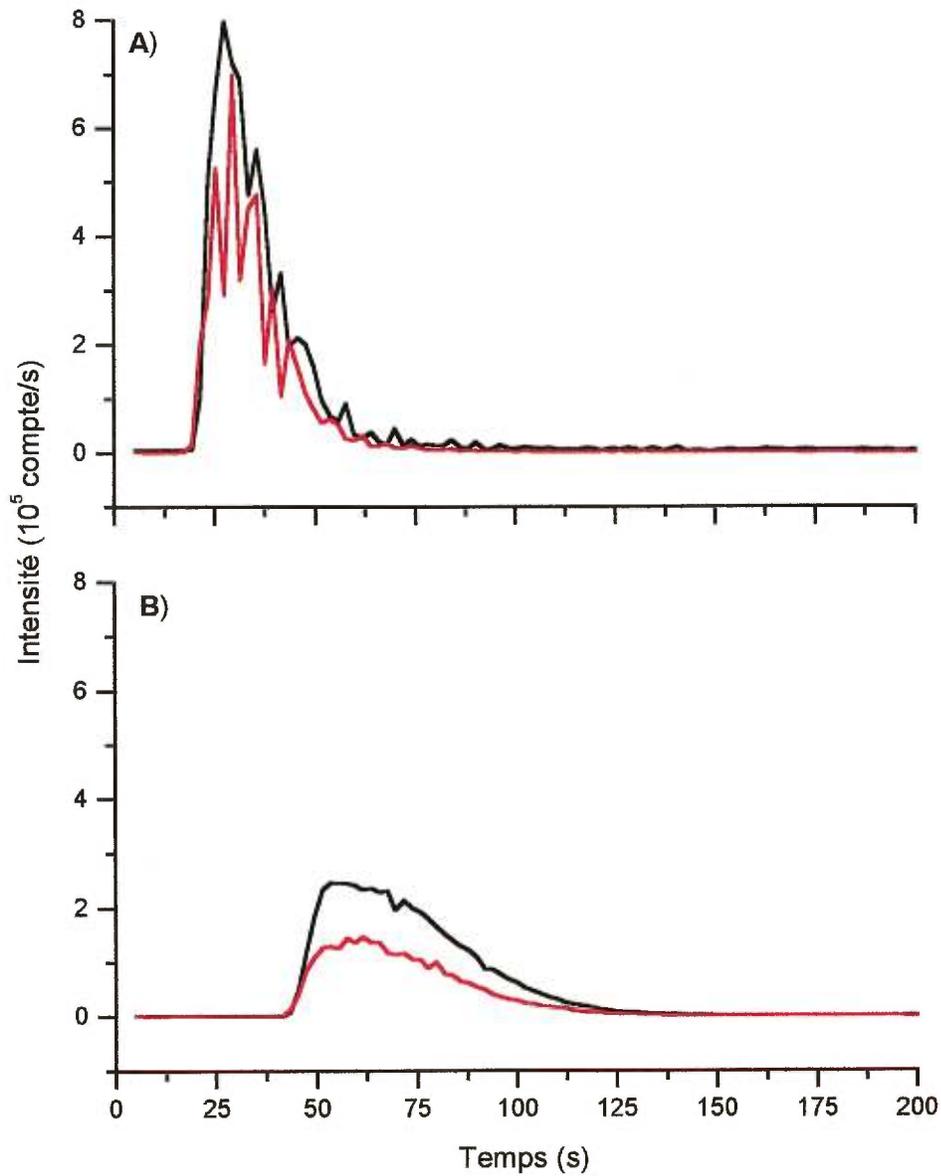


Figure 54: Comparaison des chromatogrammes pour une injection de 100 μL d'une solution de 10,5 μM de Cd-MT et de 0,85 μM de Co libre pour différents nébuliseurs : (—) ^{59}Co , (—) ^{114}Cd ; **A)** TSP, **B)** nébuliseur pneumatique.

qui amènerait une diminution du signal. En effet, le panache de l'aérosol primaire dépend du diamètre du capillaire d'aspiration de la solution à analyser, de la vitesse du gaz de nébulisation ou de transport et de la géométrie. Le capillaire du nébuliseur pneumatique est de plus faible dimension que celui du TSP et le débit du gaz de nébulisation et de transport du nébuliseur pneumatique est plus important alors que débit du gaz porteur est plus faible avec le TSP. Par conséquent, le panache généré par le nébuliseur pneumatique est plus large et un plus grand nombre de gouttelettes sont dirigées vers les parois du tube condenseur (Wiederin *et al.*, 1991). Ceci a pour effet de diminuer l'efficacité de transport de l'aérosol vers le plasma et donc de diminuer le signal analytique du TSP comparé à celui du nébuliseur pneumatique. En ce qui concerne la désolvation des aérosols, elle dépend du diamètre des gouttelettes et de la chambre de désolvation. Comme la chambre est identique pour les deux systèmes, nous pouvons admettre que son effet sera identique dans les deux cas. Par contre, comme les gouttelettes sont plus petites avec le TSP, nous prévoyons une meilleure désolvation avec celui-ci.

L'augmentation de la hauteur est due à une diminution de l'élargissement du pic. Comme nous venons de le mentionner, la largeur du pic produit avec le TSP est deux fois moindre que celle du pic formé avec le nébuliseur pneumatique. Ce facteur devient intéressant puisqu'il s'avère un avantage avec l'emploi d'un système chromatographique et nous serons donc en mesure de préserver en bonne partie la qualité de la séparation.

Si nous nous intéressons aux limites de détection, nous observons des fluctuations plus importantes dans le signal de la ligne de base avec le nébuliseur thermique et ceci pourrait affecter la limite de détection. Ces fluctuations feront également diminuer la reproductibilité éventuelle des injections, mais peuvent être corrigées par l'utilisation du cobalt comme étalon interne. Effectivement, on observe une variation inférieure à 5% avec la correction par le cobalt.

III.5.4. EFFICACITÉ DE SÉPARATION

L'efficacité de la séparation des isoformes a été étudiée en améliorant les meilleures conditions trouvées avec le ICP-AES. Même si la présence de propanol amène une baisse importante du signal, la limite de détection attendue en spectrométrie de masse devrait être meilleure que celle de la spectroscopie d'émission atomique. A un

temps donné, nous pouvons donc tolérer une baisse de signal et un “étalement” des pics chromatographiques en vue d'améliorer la séparation des isoformes de la métallothionéine. La séparation initiale effectuée (section III.4.2) avec le spectromètre d'émission atomique à plasma inductif a été reprise pour permettre la comparaison des résultats obtenus avec les deux systèmes de détection. Différents gradients d'élution ont été étudiés et la composition et les vitesses des gradients sont présentées graphiquement à la Figure 55. Sur cette même figure, on a rapporté le signal du ^{114}Cd en fonction du temps et on peut ainsi déterminer la qualité de la séparation des isoformes de la MT contenant du cadmium. Comme précédemment la résolution a été calculée à partir des pics obtenus par déconvolution. Les caractéristiques des séparations obtenues pour les MT sont représentées au Tableau XII pour deux isotopes du cadmium. La possibilité d'utiliser plusieurs isotopes du même élément permet de vérifier la reproductibilité des séparations. Le gradient de 0,48% propanol/min (Figure 55D) donne une séparation adéquate et reproductible.

Les chromatogrammes ont aussi été enregistrés en détectant des isotopes du zinc et du cuivre (Figure 56). Aucun signal de zinc n'a été détecté au moment de l'élution des MT contenant du cadmium. Pour le cuivre, on observe de faibles signaux à des temps de rétention correspondant à l'élution temps de rétention de la MT-1 et de la MT-2. Cependant, ces intensités sont faibles et la présence d'un signal de fond important rend la détermination et la quantification très difficile. En effet, l'augmentation du signal de fond se produit au fur et à mesure que le contenu en propanol augmente dans le gradient d'élution. A la fin du gradient on maintient le passage d'une solution de 10% propanol : Tris-HCl pendant 120 s pour ensuite retourner à une solution de Tris-HCl . On remarque la présence d'un "plateau" autour de 1400 s pour les isotopes du zinc et du cuivre. Ce "plateau" correspond à la fin du gradient d'élution. La présence de ce "plateau" ainsi qu'un signal de fond élevé provient des interférences spectroscopiques qui proviennent des ions polyatomiques produit par la décomposition du solvant dans le plasma (section III.5.1). Puisque la quantité de solvant organique présente varie dans le temps, ce signal sera variable.

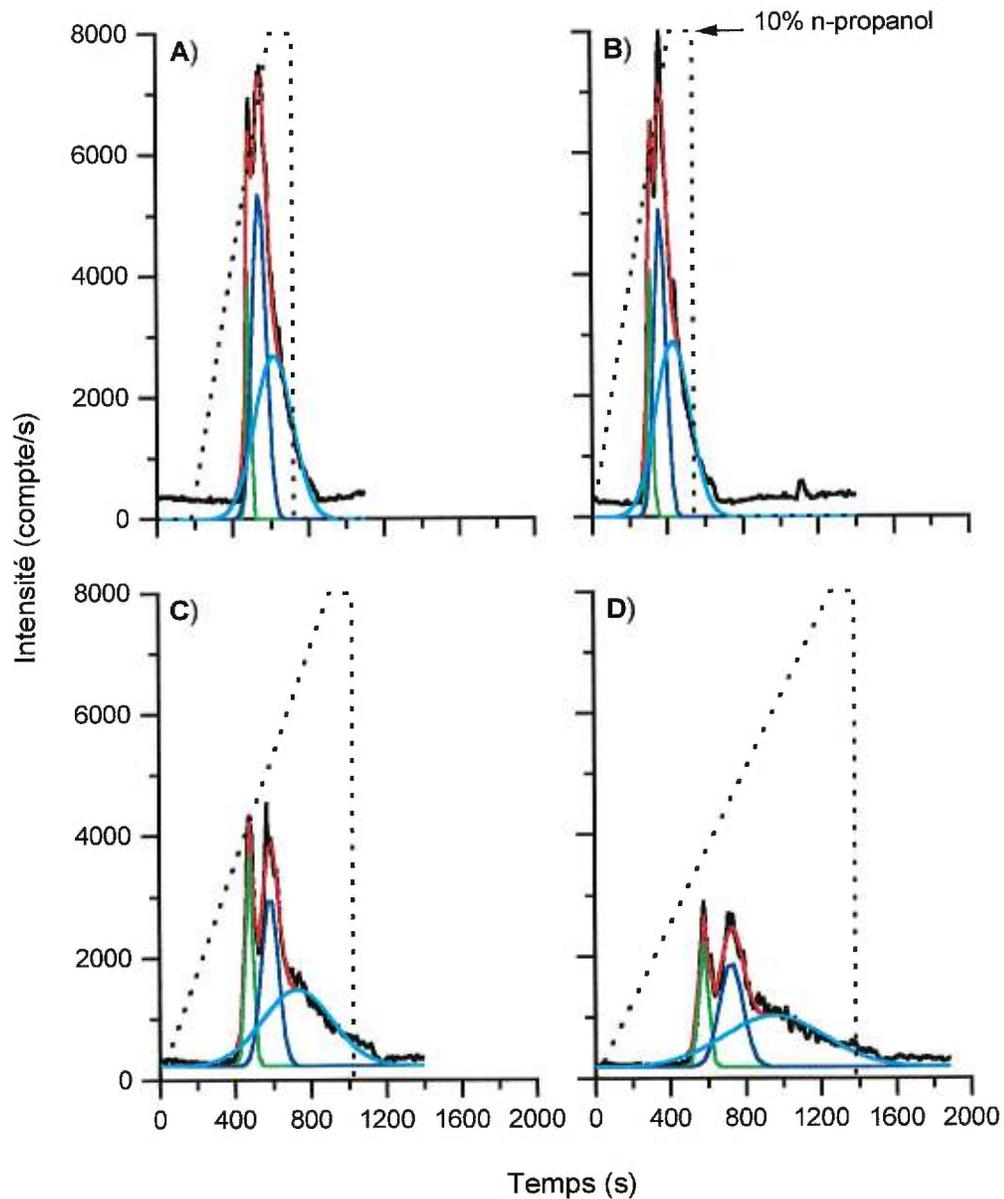


Figure 55: Étude du gradient par le signal du ^{114}Cd sur la séparation des isoformes de la MT. **A)** Elution isocratique suivie d'un gradient 1,43%/min propanol, **B)** Gradient 1,43%/min propanol, **C)** Gradient 0,71%/min propanol et **D)** Gradient de 0,48%/min propanol. Les déconvolutions suivent une équation gaussienne. (—) ^{114}Cd , (—) Déconvolution totale, (—) MT-2, (—) MT-1, (—) pic 3, (- - -) Gradient en propanol.

Tableau XII: Caractéristiques des pics chromatographiques pour des conditions d'élution choisies lors de la séparation des isoformes de la MT de foie de lapin par ICP-MS.

Gradient de 0,48%/min n-propanol							
Élément	Pic	T _r (s)	Aire	Hauteur	Rs ^a	L ^b	LD ^c (μM)
¹¹² Cd	1 (MT-2)	577	1,07x10 ⁵	1923	1,4	63	
	2 (MT-1)	736	1,98x10 ⁵	1312	0,4	159	
	3	926	4,66x10 ⁵	691		761	
¹¹⁴ Cd	1 (MT-2)	577	1,27x10 ⁵	2048	1,4	63	0,02
	2 (MT-1)	736	2,64x10 ⁵	1704	0,5	159	0,1
	3	958	5,63x10 ⁵	830		761	0,3
Gradient de 0,71%/min n-propanol							
Élément	Pic	T _r (s)	Aire	Hauteur	Rs ^a	L ^b	
¹¹² Cd	1 (MT-2)	476	1,44x10 ⁵	2867	1,3	71	
	2 (MT-1)	594	2,48x10 ⁵	2206	0,5	118	
	3	735	4,85x10 ⁵	1037		494	
¹¹⁴ Cd	1 (MT-2)	476	1,72x10 ⁵	3481	1,7	47	
	2 (MT-1)	594	3,03x10 ⁵	2795	0,5	94	
	3	735	5,72x10 ⁵	1250		494	

^a Résolution déterminée avec les valeurs d'une corrélation gaussienne et calculée selon : $2(T_{r2}-T_{r1})/(L_2+L_1)$

^b Largeur à la base du pic du lissage.

^c Limite de détection pour un temps d'intégration de 0,2s

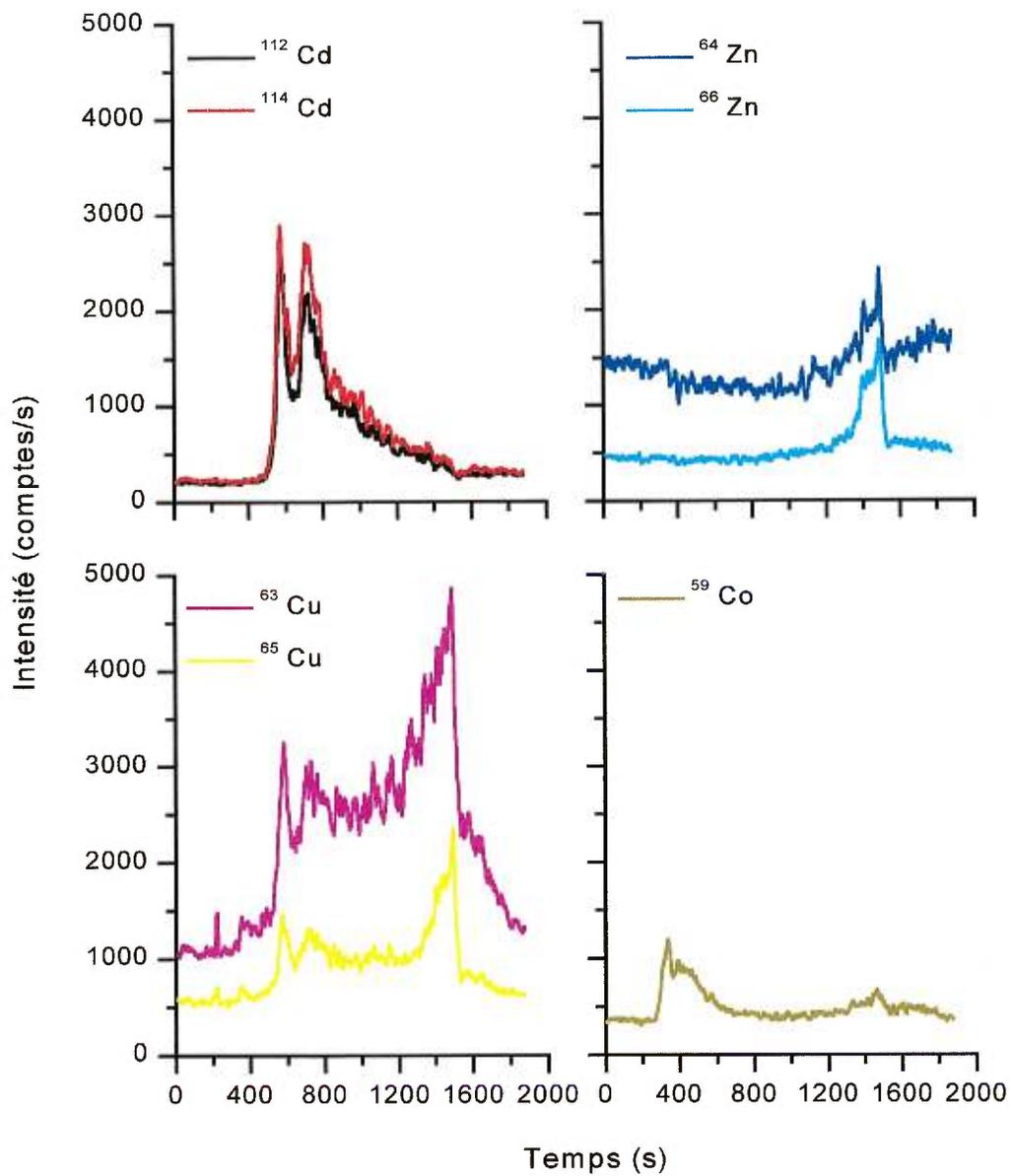


Figure 56: Chromatogramme pour la séparation des isoformes de la MT de foie de lapin (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pour un gradient de 0,48%/min propanol.

III.5.5. COMPARAISON DE LA SÉPARATION ENTRE TSP ET MEINHARD

Une comparaison des signaux des analytes et de leur séparation en fonction du mode de nébulisation a été faite pour permettre d'évaluer les qualités du système de nébulisation thermique. Pour cette expérience, le nébuliseur pneumatique utilisé est du type Meinhard avec une chambre de nébulisation de type Scott refroidie à -5°C . Le système chromatographique est le même pour les deux modes de nébulisation.

Comme nous avons vu antérieurement, la présence de solvant organique peut amener une diminution importante du signal (section III.5.2). Afin de connaître l'évolution du signal de fond en présence d'un gradient d'élution avec l'emploi d'un nébuliseur pneumatique, une injection de $100\ \mu\text{L}$ de Tris-HCl qui constitue le solvant de nos solutions de MT, a été effectuée (Figure 57). Effectivement, on observe pour toutes les masses à l'exception de la masse 63 une diminution du signal de fond. Quoique le début du gradient soit appliqué dès l'injection, il prend un certain temps pour que les combinaisons de solvants arrivent au plasma et ce temps correspond au volume mort du système. Par conséquent, la chute du signal observée correspond au moment où les gouttelettes qui arrivent au plasma contiennent du propanol. De plus, on remarque que la diminution du signal est proportionnelle à l'augmentation du pourcentage de propanol dans le solvant et qu'à la fin du gradient, lorsque le solvant ne contient que du Tris-HCl, le signal de fond revient à son niveau de départ. Il est intéressant de constater que ce comportement est contraire au comportement observé avec le TSP. Lorsque le TSP est utilisé, le signal de fond croît avec l'augmentation du pourcentage de propanol (Figure 56). Bien que le système de pompage soit identique dans les deux cas, les différences peuvent provenir des différences d'aérosol et de l'efficacité de transport entre les deux systèmes (section III.3.4, p.81).

L'augmentation du signal après la chute initiale observée à la masse 63, doit être directement reliée à la présence de propanol. Selon les dimensions des gouttelettes et leur quantité dans le plasma, l'effet de refroidissement local peut provoquer une diminution importante dans l'efficacité d'atomiser. Puisque le temps de résidence des gouttelettes dans le plasma est faible, l'évaporation et l'atomisation ne sont pas complètes pour des gouttelettes de diamètre élevé. En effet, Boorn (Boorn *et al.*, 1980) a montré

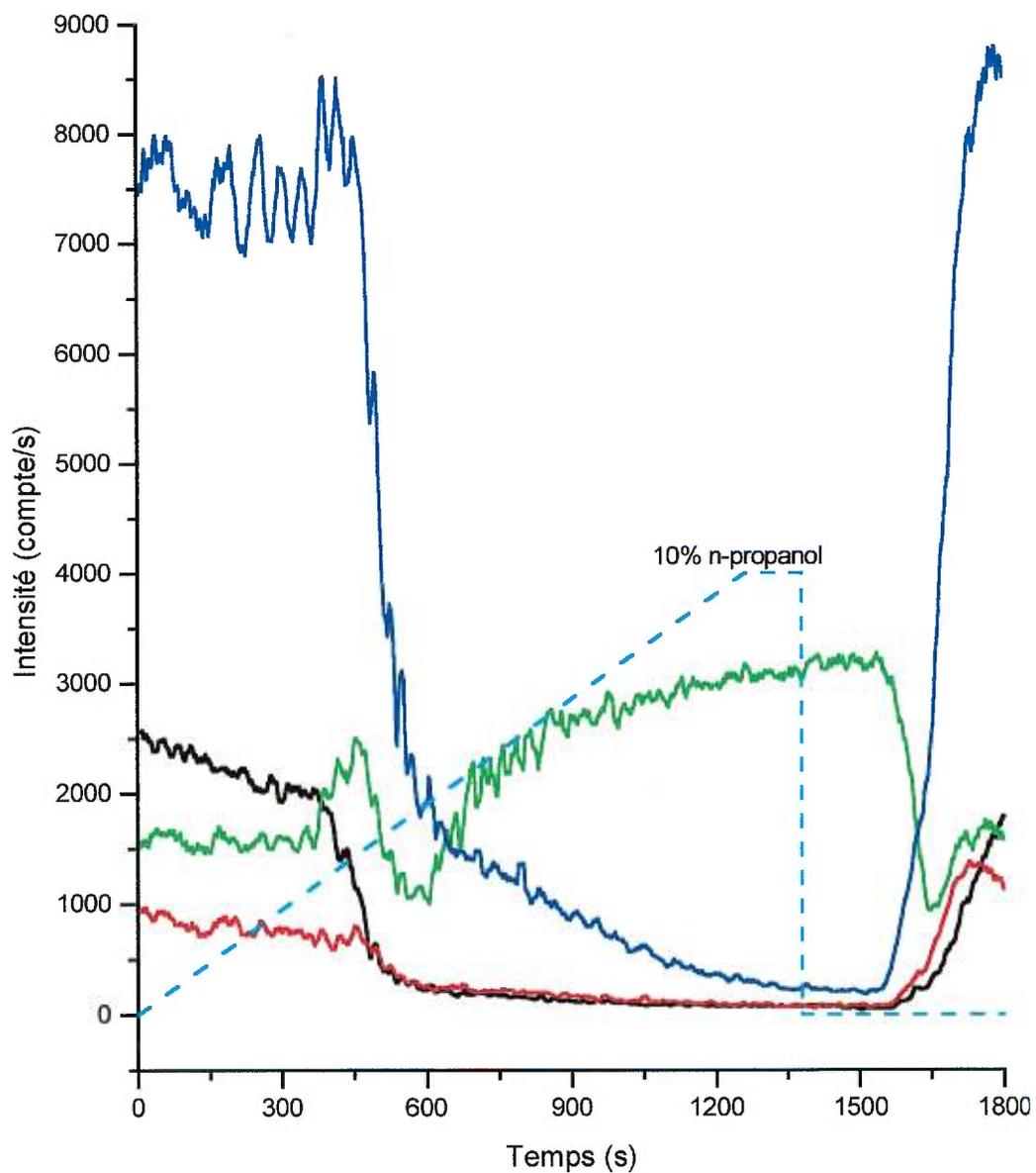


Figure 57: Signaux ICP-MS à différentes masses suite à l'injection d'une solution Tris-HCl. Un nébuliseur pneumatique et une chambre Scott refroidie à -5°C ont été utilisés. m/z : (—) 114 (Cd), (—) 59 (Co), (—) 63 (Cu), (—) 64 (Zn), (---) programmation du gradient d'éluion.

théoriquement avec un système pneumatique l'influence du solvant organique sur l'efficacité d'évaporation lors du transport de la gouttelette vers le plasma. Ces pertes sont quasi inexistantes avec le propanol. Lors de l'emploi du TSP, il a été mentionné que la réponse à la masse 63 pouvait provenir de la formation de la molécule ClN_2^+ . Cependant, pour le nébuliseur pneumatique, cette hypothèse ne peut être confirmée puisque la masse 65 ne montre aucune augmentation du signal de fond. Cette affirmation provient du fait que le chlore possède deux isotopes de masse 35 et 37 selon un rapport de 3:1. Il est présentement impossible de déterminer avec certitude la molécule ou la particule responsable de cette augmentation.

Par la suite nous avons procédé à la séparation des isoformes de la MT en injectant 100 μL d'une solution de 3,3 μM de MT de foie de lapin (Figure 58). On observe toujours la présence des deux isoformes liant le cadmium. De plus, on observe une présence importante de cuivre alors que le zinc n'apparaît toujours pas. On constate que le signal du cuivre lié à la MT est plus important que celui du zinc. Nous ne connaissons pas la quantité de cuivre dans la MT de foie de lapin alors que la quantité de zinc est connue. Dans cette expérience, nous devons également signaler la faible intensité du signal du cadmium à la figure 57 obtenue avec le TSP comparativement à celle obtenue à l'aide du nébuliseur pneumatique (figure 59). Cette différence s'explique par une stabilité à long terme très variable de l'instrument et dans ce cas le temps écoulé entre ces deux mesures est d'environ 30 jours.

La Figure 59 représente la comparaison des signaux de ^{114}Cd et de ^{63}Cu entre le système de nébulisation thermique et le système de nébulisation pneumatique de type Meinhard, pour un temps écoulé de sept jours. Une injection de 100 μL de 3,3 μM de MT a été effectuée. La programmation d'élution pour la séparation des isoformes est la même que celle employée avec le TSP. On remarque que le signal est beaucoup plus important avec le TSP puisqu'il effectue une désolvatation antérieure au plasma. Toutefois, il est également possible qu'une partie de ce signal provienne d'interférences spectroscopiques dues à la fragmentation de la protéine. Cependant, il est impossible de déterminer avec certitude l'ampleur de la contribution pour cette interférence.

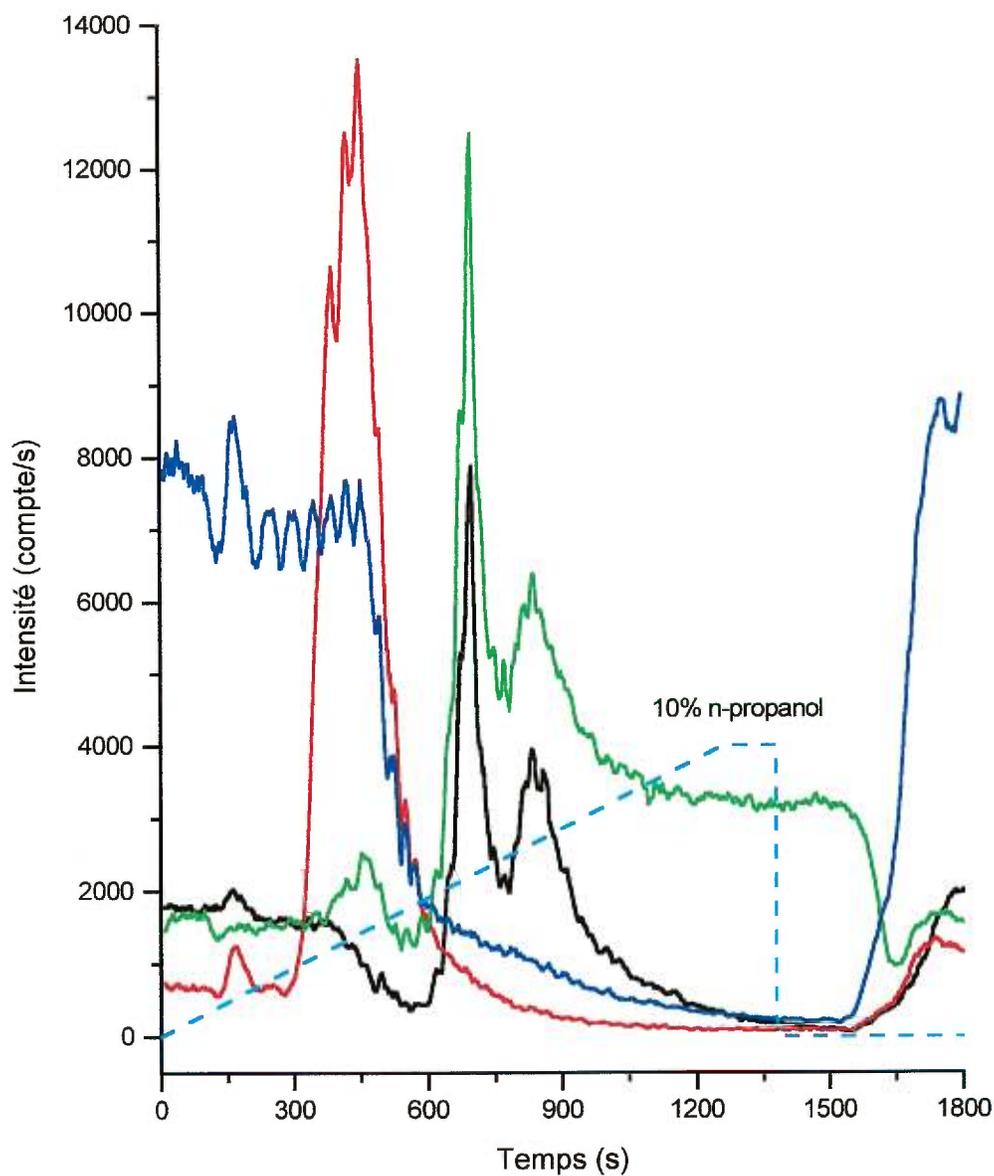


Figure 58: Signaux ICP-MS à différentes masses suite à l'injection de 100 μ L d'une solution de 3,3 μ M en MT de foie de lapin. Un nébuliseur pneumatique et une chambre Scott refroidie à -5°C ont été utilisés. m/z : (—) 114 (Cd), (—) 59 (Co), (—) 63 (Cu), (—) 64 (Zn), (---) programmation du gradient d'éluion.

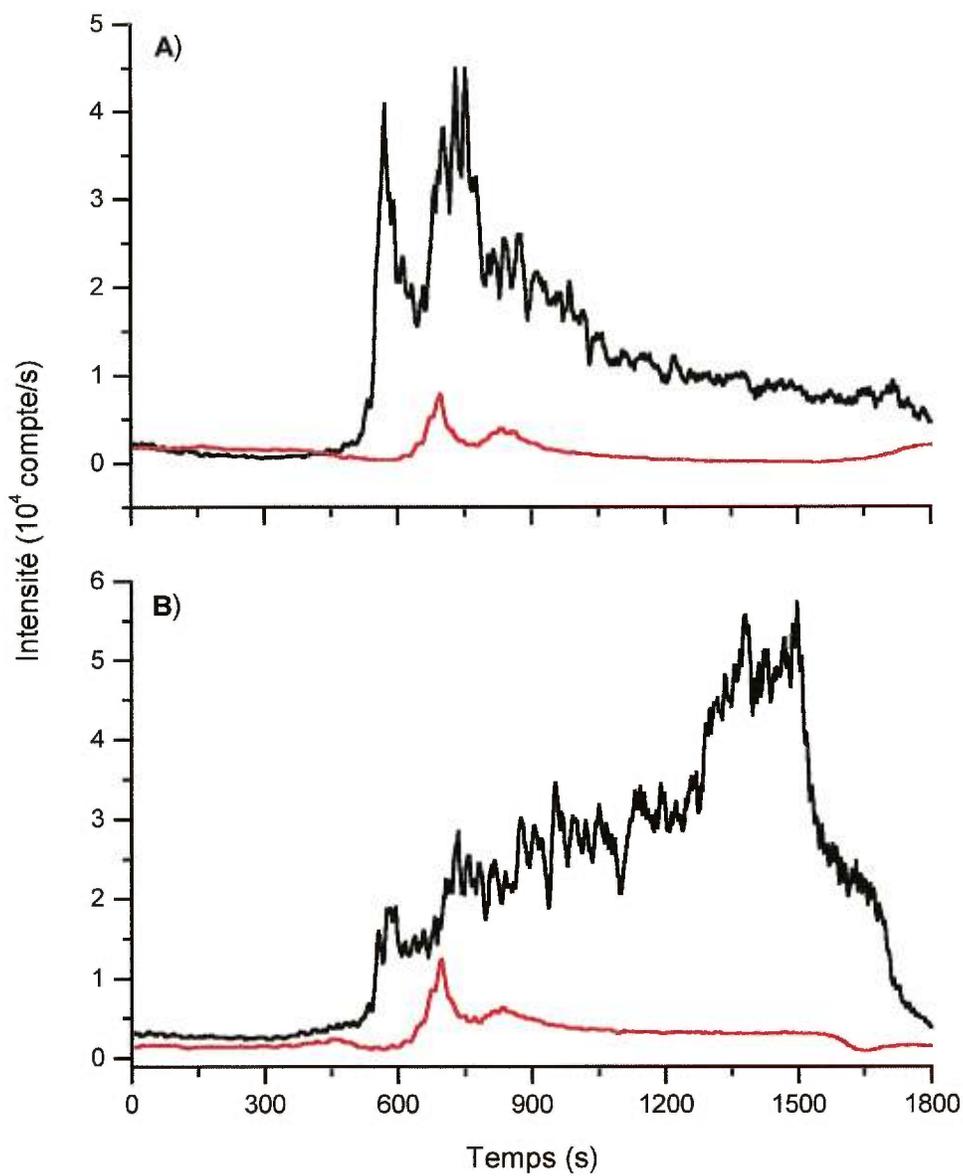


Figure 59: Comparaison des signaux du cadmium et du cuivre entre le nébuliseur thermique (TSP) et le nébuliseur pneumatique (Meinhard) pour la séparation des isoformes de la MT de foie de lapin (3,3 μ M). (—) TSP, (—) Meinhard; **A)** m/z 114 (Cd) et **B)** m/z 63 (Cu).

Le bruit associé au signal est beaucoup plus élevé avec le TSP qu'avec le nébuliseur pneumatique. L'instabilité observée pour le TSP peut provenir d'une condensation importante qui s'effectue à l'entrée de la chambre de désolvatation (chambre en « U »). En effet, on observe une certaine périodicité dans ces fluctuations. Cette condensation amène une discontinuité dans le flot gazeux expliquant les variations sur les signaux. Dans le cas du système Meinhard-Scott, aucune condensation importante n'est observée puisque le diamètre interne du tube central de la chambre est aux environs de 2 cm, ce qui est quatre fois supérieures à celui de la chambre de désolvatation du système thermique. Pour résoudre l'effet de condensation, il suffirait d'élargir les tubes internes des chambres afin que la condensation ne perturbe pas la nébulisation. Le volume mort de la chambre Scott ne semble pas contribuer de façon significative à la perte de résolution. Toutefois, l'épaulement observé après la MT-1 dans le cas du système TSP est absent avec le système pneumatique.

Par la suite, une injection de 100 μL de MT 3,3 μM a été effectuée afin de comparer les deux systèmes sans la présence de la colonne chromatographique pour le signal du cadmium (Figure 60). On observe, avec une solution de Tris-HCl comme liquide porteur, que la surface donnée par le TSP est inférieure à celle du système pneumatique. L'élargissement du signal provenant du nébuliseur Meinhard est relié au volume de rinçage de la chambre de nébulisation. La Figure 60 montre que le TSP augmente légèrement le signal de fond. Comme il a été mentionné antérieurement, cette augmentation provient d'espèces polyatomiques ou de molécules suite à la recombinaison d'atomes ou de particules mais dont l'identité ne peut être déterminée exactement.

Avec le TSP, le signal du cadmium est peu affecté par la présence de solvant organique. Cependant, avec le nébuliseur pneumatique, le solvant organique provoque une diminution de deux décades de l'intensité du signal. Ces résultats corroborent les résultats observés à la section III.5.2. Cette diminution s'explique par les variations de la qualité d'aérosol et de son transport. Toutefois, il est aussi possible qu'une partie de ce signal proviennent d'une interférence isobarique provenant de fragments de la protéine. Cette hypothèse peut expliquer l'augmentation du signal par rapport à un liquide porteur composé de Tris-HCl. En effet, la Figure 61 qui donne le signal à la masse 63, permet

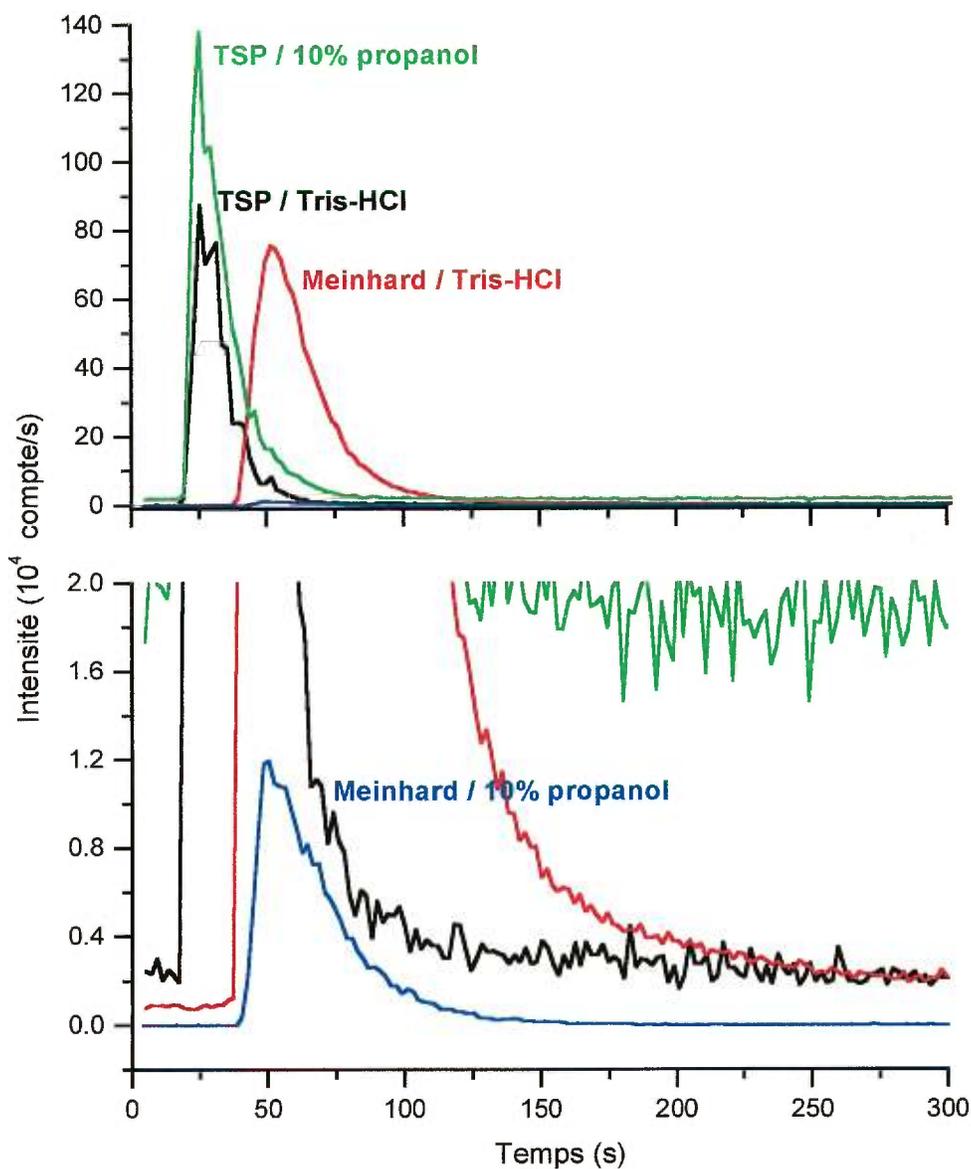


Figure 60: Effet du solvant sur le signal du ^{114}Cd pour différents systèmes de nébulisation en l'absence de colonne chromatographique (injection de $100\ \mu\text{L}$ de MT étalon à $3,3\ \mu\text{M}$; $[\text{Cd}] = 10,5\ \mu\text{M}$). *Tris-HCl*; (—) TSP, (—) nébuliseur pneumatique, *Tris-HCl : 10% propanol*; (—) TSP, (—) nébuliseur pneumatique.

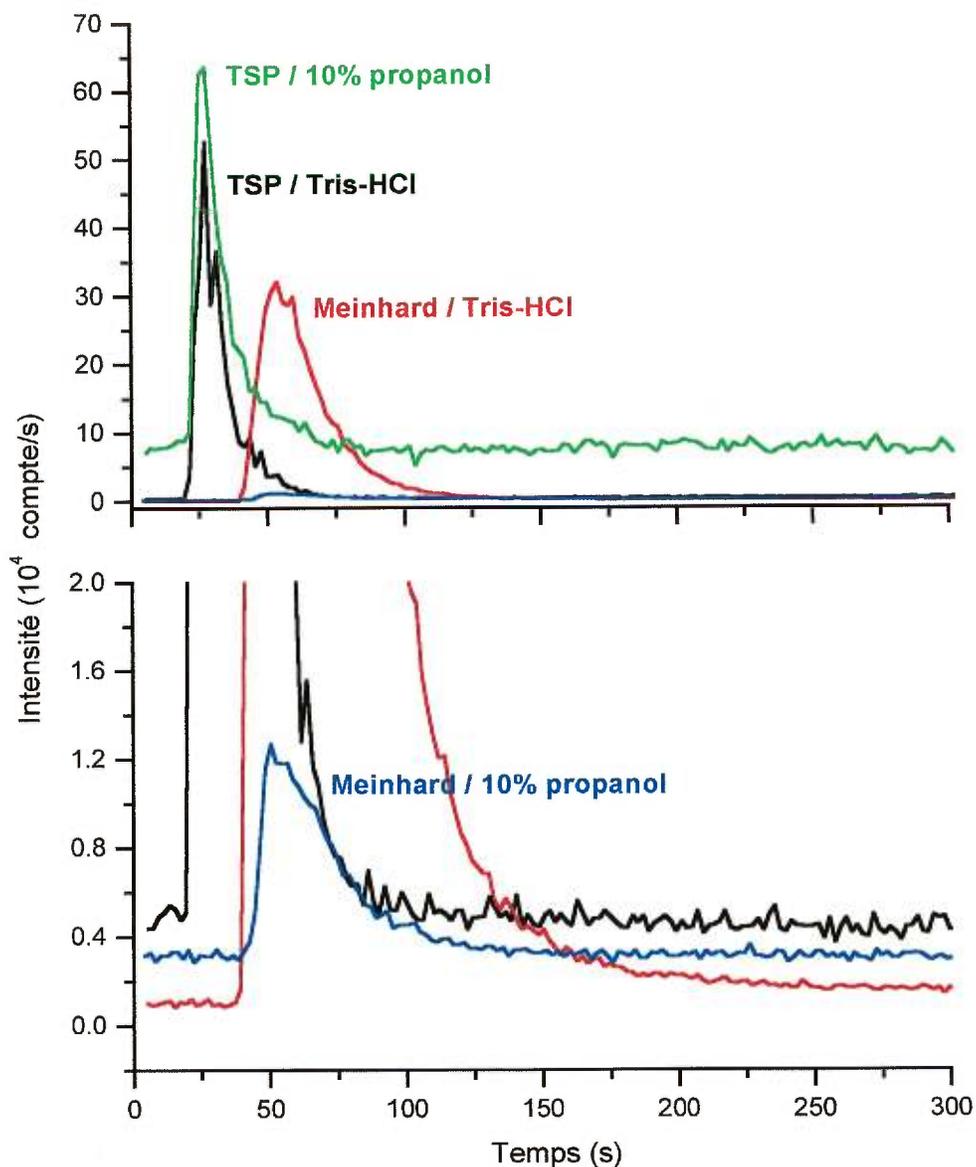


Figure 61: Effet du solvant sur le signal du ⁶³Cu pour différents systèmes de nébulisation en l'absence de colonne chromatographique (injection de 100 μM de MT étalon à 3,3 μM; [Cd] = 10,5 μM). *Tris-HCl*; (—) TSP, (—) nébuliseur pneumatique, *Tris-HCl:10% propanol*; (—) TSP, (—) nébuliseur pneumatique.

d'appuyer cette hypothèse puisque le contenu en cuivre dans la métallothionéine de foie de lapin doit être très inférieur à celui du cadmium. Par conséquent, le signal élevé à cette masse serait dû à la présence importante de fragments de la protéine ainsi que de molécules ou de particules polyatomiques.

Par conséquent, l'emploi du TSP améliore généralement le signal en présence de solvant organique mais il génère également une augmentation du signal de fond dont l'importance varie en fonction de la masse étudiée. Ce point devient important lorsqu'une quantification est désirée. Les variations provoquées (bruit) par le système de nébulisation thermique deviennent également des limites puisqu'elle peuvent détériorer considérablement les limites de détection. Par ailleurs, le volume mort du système de nébulisation thermique permet une amélioration légère de la qualité de la séparation qui n'est toutefois pas très importante.

III.5.6. SÉPARATION DES MT ENVIRONNEMENTALES

Nous avons procédé à la séparation et à l'analyse des isoformes de la MT dans les conditions optimales obtenues avec le nébuliseur thermique. La Figure 62 illustre les chromatogrammes des isoformes de la MT de foie de lapin (3,3 μM) et de la MT de moule détectés à la masse du cadmium.

Pour la séparation des MT de foie de lapin, nous avons procédé à la déconvolution des pics comme précédemment et nous observons la présence de trois pics correspondant à la MT-2, la MT-1 et un troisième pic. Si nous comparons cette séparation à celle obtenue avec la détection ICP-AES, nous constatons que les isoformes de notre étalon (MT de foie de lapin) sont mieux séparés avec le ICP-MS. Comme il a été mentionné à la section III.5.4, l'augmentation de la sensibilité du spectromètre de masse nous a permis d'améliorer la séparation en réduisant la vitesse du gradient. Par contre, cette sensibilité ne semble pas assez importante pour détecter le cadmium et suivre la séparation des isoformes de la MT de moule. De plus, on remarque que la variation du signal de fond pour la détection par spectrométrie de masse est supérieure à celle observée avec la détection par émission atomique. Cette variation provient du temps d'intégration. En effet, ce temps d'intégration pour le ICP-AES, qui possède un système de détection en simultané, est d'une seconde pour chacune des raies analysées,

alors que pour le ICP-MS, qui possède un système de détection en quasi simultané, le temps d'intégration est de 0,2 seconde.

En ce qui concerne les légères montées vers la fin du chromatogramme, elles correspondent au pallier où le mélange comportant 10% de propanol est maintenu.

Pour pouvoir comparer nos résultats avec ceux obtenus en ICP-AES, nous avons répété l'expérience en retirant la colonne chromatographique.³ Les résultats obtenus pour le cadmium sont illustrés à la Figure 63 alors que la Figure 64 représente les résultats obtenus pour le cuivre et le zinc. Dans cette expérience, nous avons injecté un volume de 100 μL de MT (de foie de lapin ou de branchies de moule) avec, comme liquide porteur, une solution de Tris-HCl. Comme nous l'avions observé plus tôt, ce liquide porteur donne un spectre de masse plus simple et les interférences spectrales dues à la matrice sont faibles, voire inexistantes. À partir des mesures de la Figure 63 et si l'on utilise la MT de foie de lapin comme étalon, on trouve que la concentration du cadmium présent dans la MT de moule est faible et est de l'ordre de 1 μM . Elle est du même ordre que celle trouvée par Couillard (2 μM), mais on remarque une variation importante entre les deux essais effectués sur la MT étalon. Toutefois, à partir de ces mesures, il est possible d'estimer la limite de détection pour le cadmium à 0,1 μM .

Les mêmes mesures peuvent être effectuées pour le zinc, et la concentration en zinc dans la MT de branchies de moules est de l'ordre de 3 μM , ce qui correspond à la concentration trouvée par Couillard (3 μM). Quant à la limite de détection pour le zinc, elle est estimée à 0,1 μM . Pour le cuivre, comme aucune valeur de référence n'est connue pour la MT de foie de lapin, nous ne pouvons que conclure que la concentration en cuivre dans la MT de moule est de l'ordre de 0,5 fois celle de la MT de foie de lapin.

³ Mentionnons que la MT de moule analysée par ICP-AES et par ICP-MS ne proviennent pas du même échantillon, mais ces moules possèdent un même degré de contamination selon les résultats de Couillard (communication personnelle).

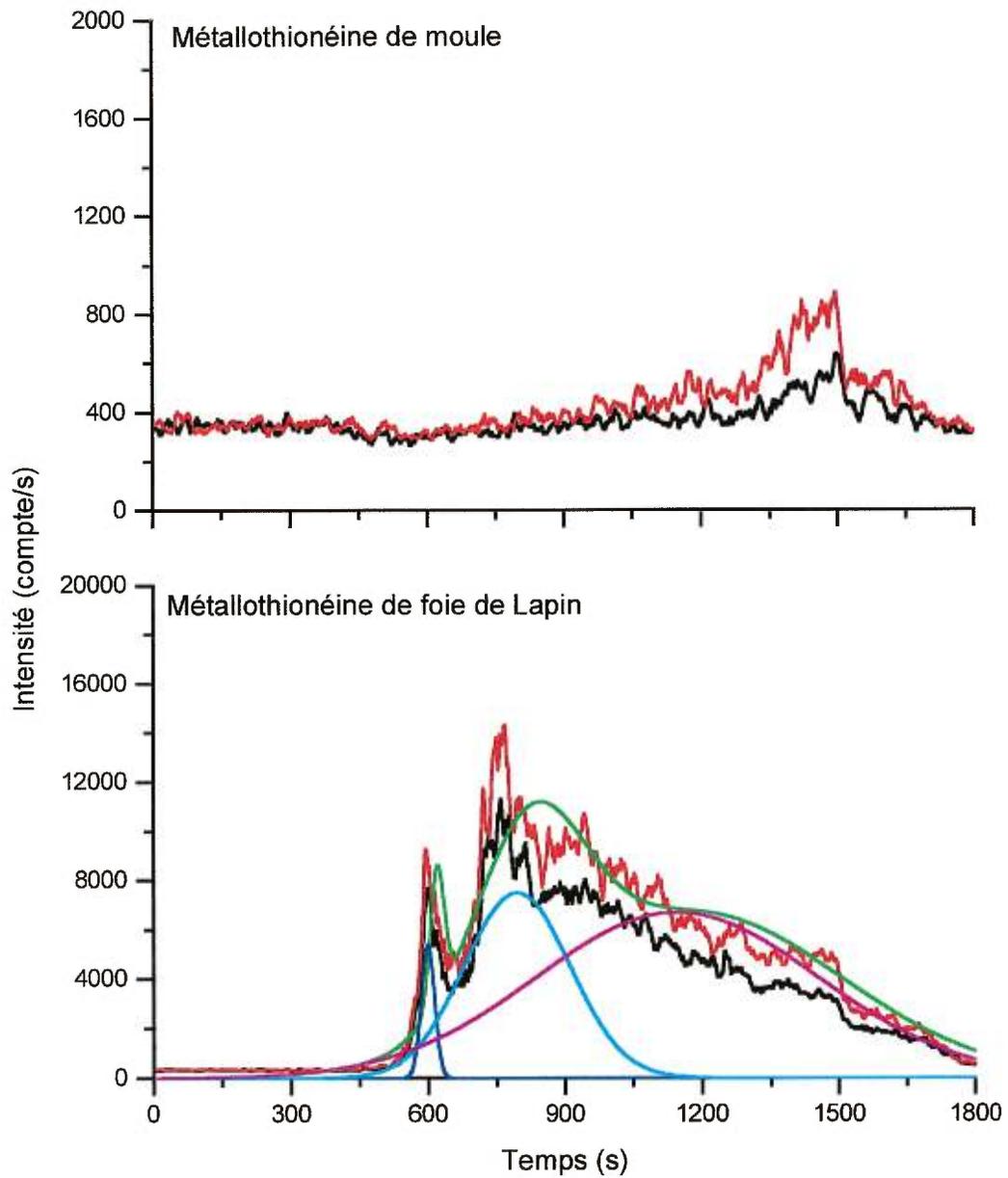


Figure 62: Chromatogramme des isoformes de MT provenant de la moule et du foie de lapin pour une injection de 100 μL ; (—) ^{112}Cd , (—) ^{114}Cd , (—) MT-2, (—) MT-1, (—) pic 3

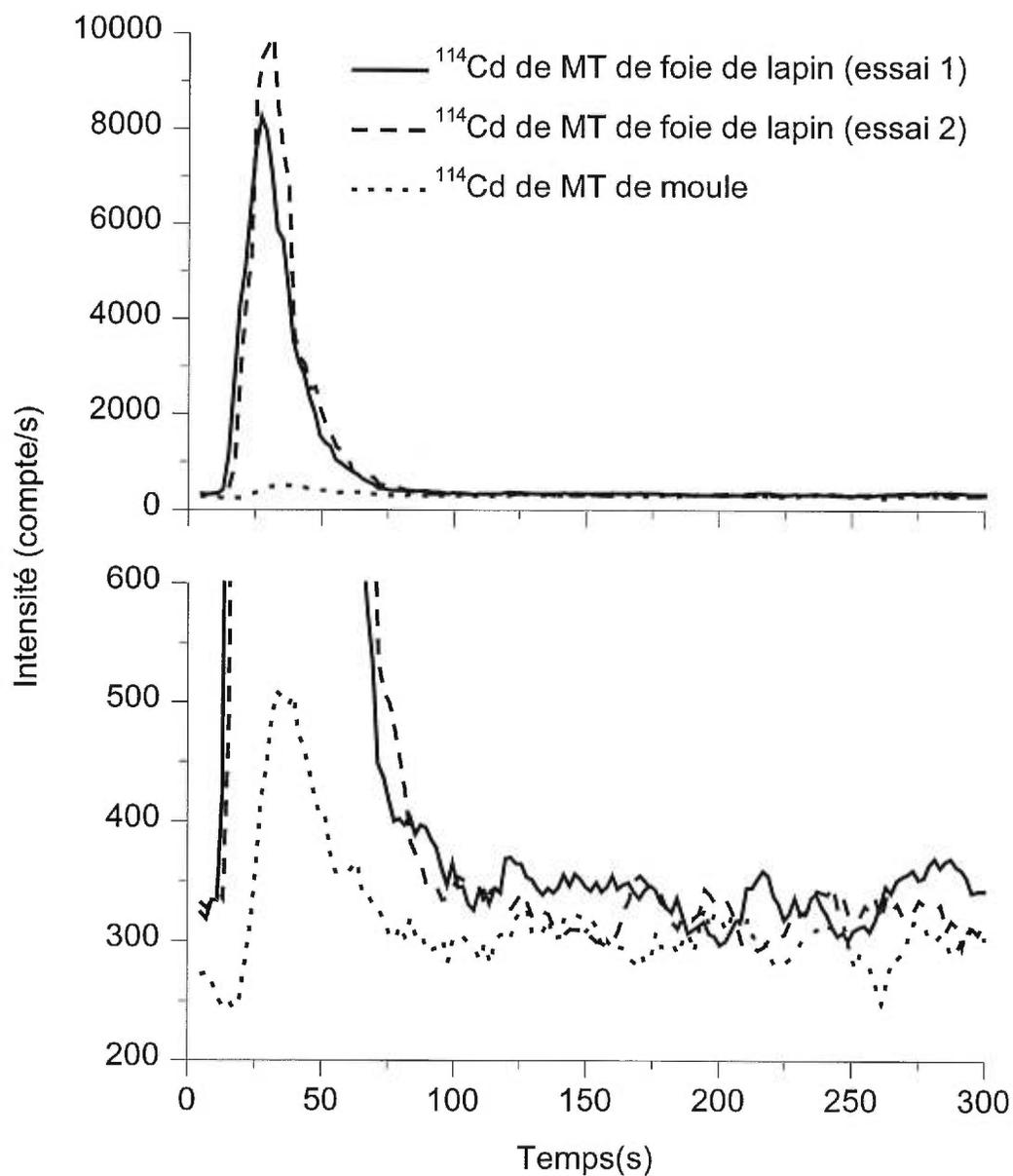


Figure 63: Signal de cadmium par nébulisation thermique pour des MT de foie de lapin et de MT de branchies de moule en l'absence de colonne chromatographique (liquide porteur: Tris-HCl).

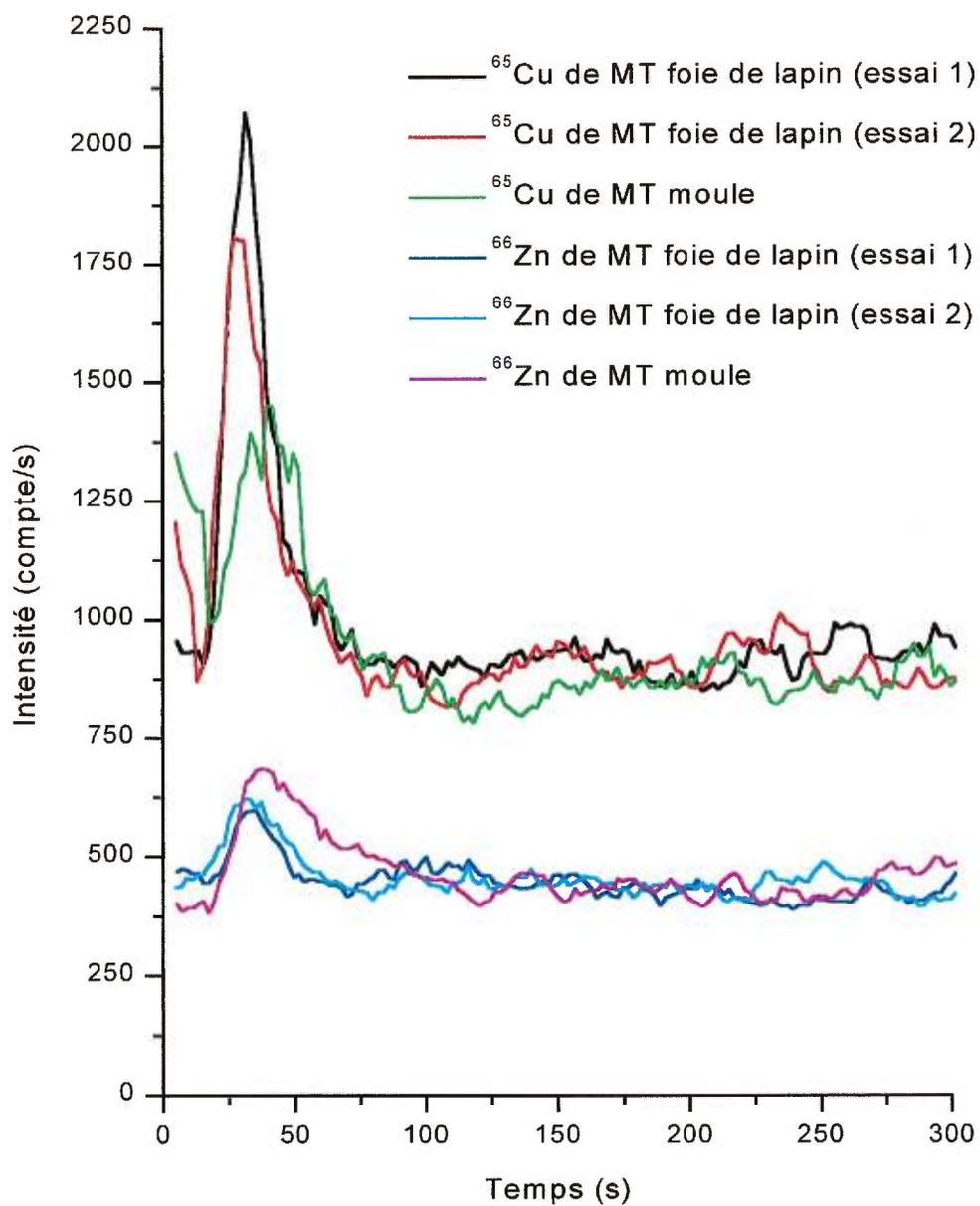


Figure 64: Signal de cuivre et zinc par nébulisation thermique pour des MT de foie de lapin et de MT de branchies de moule en l'absence de colonne chromatographique (liquide porteur: Tris-HCl).

Chapitre IV: CONCLUSION

Pour effectuer des études environnementales des effets de la pollution par les métaux lourds, de nombreux systèmes d'analyse ont été étudiés. Les méthodes permettant l'analyse totale du contenu total en métaux lourds sont de plus en plus performantes, par contre le nombre de méthodes permettant la spéciation des éléments est encore limité.

Parmi les espèces chimiques qui semblent jouer un rôle important dans le domaine de l'étude de la pollution environnementale par les métaux lourds, la métallothionéine semble susciter un intérêt croissant. De plus, comme elle est présente sous diverses isoformes, le problème analytique devient plus complexe. La séparation des isoformes de la métallothionéine et la quantification des métaux lourds (cadmium, zinc, cuivre) liés à ces protéines pourraient donner des informations quant à leur efficacité en tant que biomarqueur de pollution.

La chromatographie liquide de partage en phase apolaire polymérique est une des approches potentiellement les plus efficaces pour effectuer ces études car elle n'affecte pas les liens métal : thiolate. Pour obtenir une bonne séparation des isoformes de la MT la présence de solvants organiques est nécessaire. Cette présence des solvants peut cependant être « nuisible » au système de détection utilisé pour la chromatographie. Dans notre cas, nous nous sommes intéressés à détecter les métaux de la MT par spectrométrie d'émission atomique et par spectrométrie de masse à plasma ICP. Nous savons que la présence d'un solvant organique peut influencer la stabilité du plasma ICP et son habilité à ioniser et/ou exciter les analytes. Nous avons donc étudié des approches qui permettent de minimiser ces perturbations et nous avons développé un nébuliseur non conventionnel, le nébuliseur thermique (TSP), qui, en permettant une désolvation partielle de l'aérosol liquide formé par le nébuliseur, devrait permettre une amélioration des performances analytiques.

Dans un premier temps, nous avons démontré au cours de ces travaux que la présence de solvant organique dans des échantillons injectés dans un plasma ICP avec un TSP augmentait le signal analytique de nos analytes (Cd, Cu, Zn, Co) par rapport à un système de nébulisation pneumatique concentrique conventionnel. Cet effet est obtenu

par l'amélioration de la qualité de l'aérosol, son efficacité de transport vers le plasma et sa désolvation partielle, et donc se traduit généralement par une augmentation du signal analytique. Cependant, il faut éviter d'introduire l'aérosol en trop grande quantité dans le plasma pour éviter une surcharge de celui-ci provoquant ainsi une diminution du signal suite au refroidissement local du plasma produit par la présence d'un excès de solvant. L'utilisation d'une chambre de désolvation améliore cette situation.

De manière plus quantitative, le signal analytique qui a été observé avec le TSP en ICP-AES est d'environ quatre fois plus fort que celui obtenu avec un nébuliseur pneumatique concentrique. Cependant, pour approfondir notre compréhension du fonctionnement des nébuliseurs thermiques, la caractérisation complète de l'aérosol (primaire, secondaire et tertiaire) devient essentielle et devrait être l'objet d'études ultérieures.

Au niveau des paramètres de fonctionnement optimaux du nébuliseur thermique, nous avons trouvé que le meilleur débit du gaz porteur était 0,8 L/min, que la meilleure température de nébulisation était de 275 °C et que dans ces conditions optimales le débit de liquide est 1,1 mL/min. Des débits de liquide inférieurs à 0,8 mL/min engendrent une nébulisation à l'intérieur du nébuliseur qui provoque à long terme un blocage de celui-ci. Le TSP que nous avons développé est un très bon prototype, mais pourrait être amélioré en développant un système de chauffage plus complexe et ajustable tout le long du capillaire de nébulisation.

Un autre effet observé avec le système ICP-AES est la présence des interférences spectrales (bandes moléculaires du système NO) provenant de la présence de produits organiques dans le solvant. Ces interférences compliquent la quantification du zinc et du cadmium à des faibles concentrations, et des études faites avec des plasmas à plus haute puissance pourraient minimiser ces interférences.

Nous avons réalisé le couplage LC-ICP-AES pour essayer de séparer et de quantifier les isoformes des MT de deux organismes (foie de lapin et branchies de moule). La séparation des isoformes est acceptable, la quantification du cadmium est possible avec des MT de lapin, mais elle ne l'est pas avec des MT de moules. Pour les autres métaux, nous avons montré que les contaminations par le zinc étaient difficiles à contrôler et semblaient provenir principalement de la colonne chromatographique. Nous

avons également observé que la présence de la colonne chromatographique semblait provoquer la perte du signal du cuivre. Par contre, d'autres expériences faites plus tard en ICP-MS ne semblent pas donner ce problème. La détection des isoformes de MT est donc limitée lorsque le système de détection est la spectrométrie d'émission atomique à plasma ICP. Pour augmenter la sensibilité, il faudrait peut-être effectuer une préconcentration des échantillons avant l'analyse.

Les études effectuées par ICP-MS avec un système de nébulisation pneumatique démontrent que la présence de solvant organique engendre une diminution du signal de deux décades sur l'ensemble des masses à l'exception de la masse 63. L'hypothèse de la formation d'amas a été envisagée, mais est difficile à vérifier compte tenu de la résolution de notre spectromètre de masse. Pour le nébuliseur thermique, il a été observé que l'augmentation de la composition en solvant organique provoquait une augmentation de l'intensité du spectre de masse et rendait le spectre de masse plus complexe à des masses inférieures à 89 uma. Des études supplémentaires devraient être envisagées pour mieux documenter les différentes interférences isobariques en ICP-MS en présence de solvant organique, et pour les atténuer, l'utilisation de plasmas mixtes argon-oxygène devrait être envisagée. Ces résultats montrent également qu'une chambre de désolvatation plus efficace doit être envisagée afin de réduire davantage la quantité de solvant organique qui se rend au plasma et, ainsi, réduire l'intensité du signal de fond.

Du point de vue quantitatif, l'emploi d'un nébuliseur thermique améliore la réponse des aires d'un facteur 1,6 comparée à celle du nébuliseur pneumatique.

Le couplage LC-ICP-MS a permis de séparer les isoformes MT-1 et MT-2 de la MT de foie de lapin (étalon) avec un gradient allant de 0 à 10% de propanol à raison de 0,48%/min de propanol. Dans ces conditions, nous avons pu estimer les concentrations en cadmium et en zinc dans des MT de foie de lapin, mais pas des MT de branchies de moule. De plus, contrairement à ce qui a été observé en ICP-MS, la présence de la colonne ne semble pas avoir affecté le signal du cuivre lorsque le nébuliseur pneumatique est utilisé. Il est actuellement impossible d'expliquer cette observation et d'autres études seraient nécessaires.

La séparation des isoformes de la MT étalon par HPLC avec détection par absorption UV a montré qu'il est possible de retrouver trois isoformes. Lorsque la

détection est effectuée par ICP-AES ou ICP-MS, les séparations ne sont plus aussi bonnes pour les trois isoformes puisque ces systèmes nécessitent un débit liquide plus important pour devenir compatible avec le nébuliseur thermique. En utilisant des techniques de filtrages numériques et de déconvolution, nous pouvons cependant séparer trois pics dont deux correspondent aux deux isoformes MT-1 et MT-2, le troisième est attribué à une MT inconnue ou dénaturée.

L'utilisation du cobalt comme étalon interne permet de corriger convenablement les fluctuations des signaux lors des injections successives d'échantillons en ICP-AES. Ceci est intéressant puisque l'utilisation de cet étalon est faite dans des conditions qui sont loin d'être idéales et qu'elle permet d'obtenir de bonnes corrections. Cependant, en ICP-MS, le choix du cobalt comme étalon interne est plus problématique car cet élément se situe dans une région propice aux interférences isobariques lorsque le nébuliseur thermique est utilisé en présence de solvant organique.

L'utilisation de la MT de foie de lapin est intéressante pour l'optimisation de la séparation et la quantification de certains métaux. Cependant, il faut signaler que pour la quantification, l'utilisation de cette MT ou d'autres MT disponibles commercialement ne permettra pas toujours une quantification complète pour tous les éléments présents (Cu, Cd, Zn). En effet, les valeurs des concentrations totales de métaux ne sont pas toujours fournies et de plus, leurs isoformes ne sont pas pures, de sorte que leur identification est difficile. Bien que la limite de détection soit meilleure en ICP-MS (0,1 μM) qu'en ICP-AES (4 μM), celle-ci est cependant limitée, voire insuffisante, pour l'analyse des isoformes de la MT d'organismes marins.

Nous avons également montré qu'il était possible d'effectuer une analyse semi-quantitative de quelques métaux liés à la MT de foie de lapin en l'absence de colonne chromatographique et dans un cas en présence de la colonne. En effet, les résultats obtenus par ICP-AES et ICP-MS concordent avec ceux obtenus par Couillard en absorption atomique avec un atomiseur électrothermique et les concentrations trouvées en zinc et cadmium sont respectivement de l'ordre de 1 μM .

Pour améliorer les performances des systèmes d'analyse basés sur le couplage HPLC-ICP en émission atomique ou en spectrométrie de masse, nous pouvons d'abord suggérer d'améliorer le nébuliseur thermique, la chambre de nébulisation et de

désolvation. Ces améliorations du TSP pourraient provenir d'un contrôle (variable le long du capillaire, température plus élevée, etc.) plus complexe et efficace du chauffage du capillaire du TSP. Pour les chambres de nébulisation et de désolvation, on peut suggérer un meilleur design pour améliorer la qualité de l'aérosol et de son transport ainsi que sa désolvation. D'autres systèmes de nébulisation peuvent être envisagés, comme par exemple les nébuliseurs à injection totale, dont le développement a été remarquable ces deux dernières années.

Ces améliorations devraient permettre d'étendre le champ d'application des méthodes développées et améliorer l'analyse des isoformes de la MT *in vitro*. La méthode d'analyse *in vitro* permettrait d'étudier la spécificité des isoformes envers les métaux. Elle pourrait aussi permettre d'étudier s'il existe une spécificité des MT selon l'organe de synthèse. De plus, il serait intéressant de connaître l'influence des concentrations des divers métaux sur le processus de détoxification. Enfin, pour arriver à des analyses *in vitro*, de nouvelles stratégies analytiques devront être envisagées.

BIBLIOGRAPHIE

- Aaseth J. et Norseth T., 1986; « Copper » De : *Handbook on the Toxicology of Metals : volume II*, 2^{ème} édition, (éd. L. Friberg, G.F.Nordberg et V.B. Vouk), Elsevier, Amsterdam.
- Beach L.R. et Palmiter R.D., 1981; *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **78**, p.2110
- Benson W.H. et Di Giulio R.T., 1992; « Biomarkers in Hazard Assessments of Contaminated Sediments. » De : *Sediment Toxicity Assessment*, (éd. G.A. Jr. Burton) Lewis publishers, Boca Raton
- Bethune J.L., Bidreau A.J., Kägi J.H.R. et Vallee B.L., 1979; *Metallothionein*, (éd. J.H.R. Kägi et M. Nordberg) Birkhäuser Verlag, Basel
- Billhorn R.B., Sweedler J.V., Epperson P.M. et Denton M.B., 1987; *Appl. Spectro.*, **41(7)**, p.1114
- Boorn A.W., Cresser M.S. et Browner R.F., 1980; *Spectrochim. Acta*, **35B**, p.823
- Bremner I. et Beattie J.H., 1990; *Annu. Rev. Nutr.*, **10**, p.63
- Brouwer M. et Brouwer-Hoexum T., 1991; *Arch. Biochem. Biophys.*, **290**, p.207
- Browner R.F. 1987; « Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopy : part 2 applications and Fundamentals » De : *Chemical Analysis : A series of Monographs on Analytical Chemistry and its Applications*, vol. **90**, (éd. P.W.J.M. Boumans), John Wiley & Sons, N.Y.
- Burton L.L. et Horlick G., 1992; *Spectrochim. Acta Electronica* **47B**, E1621
- Cantilena L.R. et Klaasen C.D., 1982; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **63**, p.173
- Chilvers D.C. et Bennett B.G., 1987; *Summary Exposure Assessment for Zinc*, (éd. MARC), MARC report, London

- Churchill J.E., Scholz G. et Kwok F., 1989; *Bioch. Biophys. Acta*, **996**, p.181
- Cook J.S., DiLuzio N.R. et Hoffman E.O., 1975; *Crit. Rev. Microbiol.*, **3**, p.201
- Cousins R.J., 1985; *Physiol. Rev.*, **65**, p.238
- Dallinger R., 1994; *Appl. Biochem. Biotech.*, **48**, p.27
- Date A.R. et Gray A.L. 1989; *Application of Incuctively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, (éd. Date A.R. and Gray A.L.), Blackie & Son, N.Y.
- Dziewatkoski M.P., Daniels L.B. et Olesik J.W., 1996; *Anal. Chem.*, **68**, p.1101
- Elgersma J.W., Blake J., Maessen F.J.M.J., 1991; *Spectrochim. Acta*, **46B**, p.1073
- Engel D.W. et Brouwer M., 1984; *Mar. Environ. Res.*, **13**, p.177
- Engel D.W. et Roesijadi G., 1987; « Metallothioneins : A Monitoring Tool » De : *Pollution Physiology of Estuarine Organisms*, (éd. W.B. Vernberg, A. Calabrese, F.P. Thurberg et F.J. Vernberg) The Bell W. Baruch Library in Marine Science, **17**, University of South Carolina Press
- Engel D.W. et Vaughan D.S., 1996; *Hum. Ecol. Risk Assess.*, **2**, p.257
- Fowler B.A., Hildebrand C.E., Kojima Y. et Webb M., 1987; « Nomenclature of Metallothionein » De : *Metallothionein 2 : Experientia Suppl. 52*, (éd. J.H.R. Kägi et Y. Kojima), Birkhäuser Verlag, Basel
- French J.B., Etkin B. et Jong R., 1994; *Anal. Chem.* **66**, p.685
- Friberg L., Kjellström T. et Nordberg G.F., 1986; « Cadmium » De : *Handbook on the Toxicology of Metals : volume II*, 2^{ème} édition, (éd. L. Friberg, G.F.Nordberg et V.B. Vouk), Elsevier, Amsterdam
- Gick G.G. et McCarty K.S., 1982; *J. Biol. Chem.*, **15**, p.9048

- Greenfield S. et Montaser A., 1992; « Common RF Generators, Torches and Sample Introduction Systems », De: *Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry*, 2^{ème} édition, (éd. A. Montaser et D.W. Golightly), VCH, N.Y.
- Hamer D.H., Thiele D.J. et Lemontt J.E., 1985; *Science*, **228**, p.685
- Hildebrand C.E., Tobey R.A. et Campbell E.W., 1979; *Exp. Cell Res.*, **124**, p.237
- Hobbs S.E. et Olesik J.W., 1993; *Spectrochim. Acta*, **48B**, p.817
- Horlick G. et Shao Y., 1992; « Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry for Elemental Analysis », De: *Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry*, 2^{ème} édition, (éd. A. Montaser et D.W. Golightly), VCH, N.Y.
- Huggett R.J., Kimerle R.A., Mehrle P.M. and Bergman H.L., 1992; *Biomarkers : Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*, Lewis Publishers, Boca Raton
- Hunziker P.E. et Kägi, J.H.R., 1985; *Biochem. J.*, 231, p.375
- Jacob C., Maret W. et Vallee B.L., 1998; *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **USA 95**, p.3489
- Jiang L.J., Maret W et Vallee B.L., 1998; *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **USA 95**, p.3483
- Kabzinski A.K.M. et Takagi T., 1995; *Biomed. Chrom.*, **9**, p.123
- Kägi J.H.R. et Kojima Y., 1987; « Chemistry and Biochemistry of Metallothioneins » De : *Metallothionein 2 : Experientia Suppl. 52*, (éd. J.H.R. Kägi et Y. Kojima), Birkäuser Verlag, Basel
- Kägi J.H.R. et Schäffer A., 1988; *Biochemistry*, **27**, p.8509
- Kägi J.H.R., 1991; « Overview of Metallothionein » De : *Methods in Enzymology vol.205: Metallobiochemistry Part B : Metallothionein and Related Molecules*, (éd. J.F. Riordan et B.L. Vallee), Academic Press Inc., San Diego

- Klaverkamp J.F., MacDonald W.A., Duncan D.A. et Wagemann R., 1984; « Metallothionein and Acclimation to Heavy Metals in Fish : A Review. » De : *Contaminant Effects on Fisheries*, (éd. V.W. Cairns, P.V. Hodson et J.O. Nriagu), Wiley, N.Y.
- Kojima Y., 1991; « Definitions and Nomenclature of Metallothionein » De : *Methods in Enzymology vol.205: Metallobiochemistry Part B : Metallothionein and Related Molecules*, (éd. J.F. Riordan et B.L. Vallee), Academic Press Inc., San Diego
- Koropchak J.A. et Conner T.S., 1994; *J. Anal. Atomic Spectrom.*, **9**, p.899
- Koropchak J.A., Aryamanya-Mugisha H. et Winn D.H., 1988; *J. Anal. Atomic Spectrom.*, **3**, p.799
- Lee D.H.K., 1972; *Environmental Sciences, Metallic Contaminants and Human Health*, (éd. D.H.K. Lee, E.W. Hewson et D. Okun), Academic Press , N.Y.
- Maret W. et Vallee B.L., 1998; *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **95**, p.3478
- May T.W. et Wiedmeyer R.H., 1998; *Atomic Spectroscopy*, **19**, p.150
- Mazzucotelli A et Rivaro P., 1995; *Microchemical Journal*, **51**, p.231
- McComish M.F. et Ong J.H., 1988; « Trace Metals » De : *Environmental Inorganic Chemistry : Properties, Processes and Estimation Methods*, (éd. I. Bodek, W.J. Lyman, W.F. Reehl et D.H. Rosenblatt), Pergamon Press, N.Y.
- Moore G.L., 1989; De : *Introduction to Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry*, Analytical Spectroscopy Library, volume 3, Elsevier, Amsterdam
- Niessen W.M.A. et van der Greef J., 1992; « Liquid Chromatography-Mass Spectrometry : Principles and Applications » De : *Chromatographic Sciences*, **vol. 58**, (éd. W.M.A. Niessen et J. van der Greef), Marcel Dekker, N.Y.
- Nordberg G.F., 1984; *Environ. Health Perspect.*, **54**, p.213

- Nordberg G.F., Kjellström T. et Nordberg M., 1985; De : *Cadmium and Health : A Toxicological and Epidemiological Appraisal*, Chapitre 6, (éd. L. Friberg, C.-G. Elinder, T. Kjellström et G.F.Nordberg), CRC-Press, Boca Raton
- NRC, Subcommittee on Zinc, 1979; *Zinc*, (Committee on Medical and Biologic Effects of Environmental Polluants, Division of Medical Sciences Assembly of Life Sciences National Research Council), University Park Press, Baltimore
- NRCC, 1979; Effects of Cadmium in the Canadian Environment, (éd. NRCC : Subcommittee on heavy metals and certain other elements), NRCC Publication #16743, Ottawa
- Nriagu J.O., 1990; *Environment*, **32**, p.7
- Ochiai E.I., 1988; *J. Chem. Educ.*, **65**, p.943
- Ochiai E.I., 1995; *J. Chem. Educ.*, **72**, p.479
- Olesik J.W. et Bates L.C., 1995; *Spectrochim. Acta*, **50B**, p.285
- Olesik J.W. et Dziewatkoski M.P., 1996; *J. Amer. Soc. Mass Spectom.*, **7**, p.362
- Purdom P.W. et Anderson S.H., 1980; « Minerals » De : *Environmental Science : Managing the Environment*, (éd. P.W. Purdom et S.H. Anderson), Charles E. Merrill Publishing Company, Columbus
- Reader J. et Corliss C.H., 1992; *NIST Standard Reference Database 38 : NIST Spectroscopic Properties of Atoms and Atomic Ions Database*, (Database Software Developed by : W.G. Mallard, G.R. Dalton et J.W. Gallagher)
- Roesijadi G. et Fowler B.A., 1991; « Purification of Invertabrate Metallothioneins » De : *Methods in Enzymology vol.205: Metallobiochemistry Part B : Metallothionein and Related Molecules*, (éd. J.F. Riordan et B.L. Vallee), Academic Press Inc., San Diego
- Roesijadi G., 1981; *Mar. Environ. Res.*, **4**, p.167

- Schlenk D., 1996; *Hum. Ecol. Risk Assess.*, **2**, p.251
- Seymour C.A. 1987; « Copper Toxicity in Man » De : *Copper in Animals and Man; volume II*, (éd. J.McC.Howell and J.M.Gawthorne), CRC Press, Boca Raton
- Spear P.A. et Pierce R.C., 1980; *Copper in the Aquatic Environment : Chemistry distribution and toxicology*, (éd. NRCC : Associate Committee on Scientific Criteria for Environmental Quality), NRCC Publication #16454, Ottawa
- Spear P.A., 1981; *Le Zinc dans l'Environnement Aquatique: Chimie, Répartition et Toxicologie*, (éd. CNRC : Comité associé sur les critères scientifiques concernant l'état de l'environnement), CNRC Publication #17590, Ottawa
- Suzuki K.T., Sunaga H., Aoki Y. et Yamamura M., 1983; *J. Chromatogr.*, **281**, p.159
- Szpunar J., Pellerin P., Makarov A., Doco T., Williams P, Medina B. et Lobinski R., 1998; *J. Anal. Atomic Spectrom.*, **13**, p.749
- Templeton D.M. et Cherian M.G., 1991; « Toxicological Significance of Metallothionein » De : *Methods in Enzymology vol.205: Metallobiochemistry Part B : Metallothionein and Related Molecules*, (éd. J.F. Riordan et B.L. Vallee), Academic Press Inc., San Diego
- Udom U.O. et Brady F.O., 1980; *Biochem. J.*, **187**, p.329
- Vallee B.L. et Ulmer D.D., 1972; *Ann. Rev. Biochem.*, **41**, p.91
- Vestal M.L. et Fergusson G.J., 1985; *Anal. Chem.*, **57**, p.2373
- Wang D.C., Couillard Y., Campbell P.G.C. et Jolicoeur P., 1999; *Can. J. Fish. Aquatic Sci.*, **56**, p.774
- Webb M., 1979; « The Metallothioneins » De : *The chemistry, Biochemistry, and Biology of Cadmium*, (éd. M. Webb), Elsevier North-Holland Biomedical Press, N.Y.
- Wiederin D.R. et Houk R.S., 1991; *Appl. Spectrosc.*, **9**, p. 1408

Winge R.K., Fassel V.A., Peterson V.J. et Floyd M.A., 1982; *Appl. Spectrosc.*, **36**, p.218

Zeng J., Heuchell R., Schaffner W. et Kägi J.H.R., 1991; *FEBS Lett.*, **279**, p.310

Zeng J., Vallee B.L. et Kägi J.H.R., 1991a; *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **88**, p.9984