

La spéciation en toxicologie

Carole Bresson, Frédéric Chartier et Éric Ansoborlo

Résumé La connaissance de la spéciation des éléments à l'état de trace et d'ultratrace dans les milieux biologiques et environnementaux est indispensable pour obtenir des informations sur leur mode d'action et leur devenir dans la biosphère et la géosphère. La détermination de la spéciation d'un élément dans un milieu donné est un véritable défi et nécessite de connaître les différentes approches méthodologiques et outils analytiques dédiés. Les principales techniques analytiques permettant d'obtenir des informations structurales, moléculaires, élémentaires et isotopiques sont décrites dans cet article. Un bref descriptif des techniques séparatives couplées aux techniques spectrométriques est reporté. Les techniques d'imagerie, dont l'objectif est d'établir la distribution spatiale *in situ* des éléments et des molécules dans divers échantillons solides, sont également abordées. La dernière partie traite du développement des microsystèmes analytiques dans la mesure où ils ouvrent des perspectives primordiales pour l'analyse de spéciation de faibles quantités d'échantillons.

Mots-clés Toxicologie, spéciation théorique, spéciation analytique, techniques d'analyses, microsystèmes analytiques.

Abstract **The speciation in toxicology**
The knowledge of the speciation of elements at trace and ultra-trace level in biological and environmental media is essential to gather information on their action mode and their fate in the biosphere and geosphere. Determining the speciation of an element in a given medium is a great challenge and requires the knowledge of the different methodological approaches and dedicated analytical tools. The main analytical techniques to obtain structural, molecular, elemental and isotopic information are described in this article. A brief description of separation techniques coupled to spectrometric techniques is reported. Imaging techniques which aim to obtain the *in situ* spatial distribution of elements and molecules in various solid samples are also discussed. The last part deals with the development of micro-analytical systems since they open crucial perspectives to speciation analysis of low sample amounts.

Keywords Toxicology, theoretical speciation, analytical speciation, analytical techniques, based-chips analytical systems.

Les enjeux de la spéciation en toxicologie

L'une des préoccupations sociétales majeures actuelles est de connaître l'impact et le devenir des métaux et des radionucléides (RN) générés par la recherche et l'industrie. La détermination de la concentration totale d'un élément n'est pas suffisante pour déterminer cet impact, la biodisponibilité d'un élément vis-à-vis d'organismes végétaux, animaux ou humains, sa mobilité, son accumulation et sa toxicité étant en effet gouvernées par sa spéciation [1]. La **spéciation**⁽¹⁾ désigne la distribution d'un élément selon différentes espèces chimiques dans un système, une **espèce chimique** étant la forme que peut prendre un élément et est définie par sa composition isotopique, son état électronique ou d'oxydation et/ou sa structure moléculaire ou complexe. Selon le domaine considéré, la spéciation peut décrire des processus différents. La **spéciation chimique**, de nature statique, décrit le processus opérationnel d'identification et de quantification d'une espèce chimique contenant un élément donné. La **spéciation biologique ou environnementale**, de nature plus dynamique, concerne la transformation d'une espèce en une autre par un processus dynamique

réactionnel. Dans le contexte de la toxicologie, de nombreuses questions vont alors se poser : sous quelle forme physico-chimique se trouve un élément avant incorporation/ingestion/transfert vers un organisme vivant quel qu'il soit ? Sous quelle forme sera-t-il transporté, accumulé et éliminé dans cet organisme ?

La connaissance de la spéciation des éléments est donc essentielle pour mieux comprendre et interpréter les mécanismes mis en jeu dans leur réactivité, leur toxicité, le rôle et la fonction des métaux essentiels et toxiques, et pour concevoir et développer des **décorporants**⁽²⁾ efficaces et sélectifs.

Ainsi, déterminer la spéciation d'un élément dans un milieu donné consiste à détecter, identifier, localiser et quantifier les différentes formes physico-chimiques sous lesquelles il se trouve. En plus des formes chimiques précédemment décrites, il s'agit également de déterminer les différentes formes physiques : répartition de l'élément entre formes solubles, colloïdales ou particulaires et phases solides, modes d'association et localisation physique, etc.

Actuellement, il n'existe pas « d'analyseur de spéciation » universel ; il est donc nécessaire de développer des outils expérimentaux permettant l'identification, la localisation et la quantification des différentes espèces d'un élément dans les

Différentes techniques d'analyse

Les termes suivis d'un astérisque* dans le texte sont définis ci-dessous.

CRDS : spectroscopie d'absorption en cavité résonante (« cavity ring down spectroscopy »).

DART : analyse directe en temps réel (« direct analysis in real time »).

DESI : désorption ionisation par électro-nébulisation (« desorption electrospray ionization »).

DRX : analyse par diffraction de rayons X (« X-ray diffraction analysis »).

EC : électrophorèse capillaire (« capillary electrophoresis »).

EDX : spectrométrie de rayons X à dispersion d'énergie (« X-ray energy dispersive spectrometry »).

EELS : spectroscopie de perte d'énergie des électrons (« electron energy loss spectroscopy »).

ESI-MS : ionisation par électro-nébulisation couplée à la spectrométrie de masse (« electrospray ionization mass spectrometry »).

EXAFS : « extended X-ray absorption fine structure ».

FTICR : résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (« Fourier transformed ion cyclotron resonance »).

FTIR : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (« Fourier transformed infrared spectroscopy »).

GC : chromatographie en phase gazeuse (« gas chromatography »).

GC-MS : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (« gas chromatography mass spectrometry »).

GDMS : spectrométrie de masse à décharge lumineuse (« glow discharge mass spectrometry »).

HILIC : chromatographie d'interactions hydrophiles (« hydrophilic interaction chromatography »).

HPLC : chromatographie liquide haute performance (« high performance liquid chromatography »).

ICP-AES : spectrométrie d'émission optique à source plasma à couplage inductif (« inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry »).

ICP-MS : spectrométrie de masse à source plasma à couplage inductif (« inductively coupled plasma-mass spectrometry »).

IMAC : chromatographie d'affinité pour ions métalliques immobilisés (« immobilized metal affinity chromatography »).

IR : spectroscopie infrarouge (« infrared spectroscopy »).

ITP : isotachophorèse (« isotachopheresis »).

LAESI : ablation laser couplée à l'ionisation par électrospray (« laser ablation electrospray ionization »).

LA-ICPMS : ablation laser couplée à la spectrométrie de masse à source plasma à couplage inductif (« laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry »).

LIBS : spectrométrie d'émission optique sur plasma produit par laser (« laser induced breakdown spectroscopy »).

LIF : fluorescence induite par laser (« laser induced fluorescence »).

MALDI : ionisation-désorption laser assistée par matrice (« matrix assisted laser desorption-ionization »).

PIXE : émission de rayons X induits par des particules (« particle induced X-ray emission »).

RBS : spectrométrie de rétrodiffusion de Rutherford (« Rutherford back scattering spectrometry »).

RMN : résonance magnétique nucléaire (« nuclear magnetic resonance »).

RPE : résonance paramagnétique électronique (« electron paramagnetic resonance »).

SEC : chromatographie d'exclusion stérique (« size exclusion chromatography »).

SIMS : spectrométrie de masse d'ions secondaires (« secondary ion mass spectrometry »).

SLRT : spectrofluorimétrie laser à résolution temporelle (« time-resolved laser induced fluorescence », TRLIF).

SNOM : microscopie optique en champ proche (« scanning near-field optical microscopy »).

STIM : microscopie ionique à transmission (« scanning transmission ion microscopy »).

TEM : microscope électronique à transmission (« transmission electron microscopy »).

TIMS : spectrométrie de masse à thermo-ionisation (« thermo-ionization mass spectrometry »).

UV-vis : spectroscopie UV-visible (« UV-visible spectroscopy »).

XANES : spectroscopie de structure au seuil d'absorption des rayons X (« X-ray absorption near edge structure »).

XAS : spectrométrie d'absorption des rayons X (« X-ray absorption spectrometry »).

XPS : spectrométrie de photoélectrons X (« X-ray photoelectron spectrometry »).

XRF : spectrométrie de fluorescence X (« X-ray fluorescence »).

échantillons. Le défi analytique permanent est alors d'obtenir une réponse sensible et spécifique, tout en conservant l'intégrité et la représentativité de l'échantillon. Il est également essentiel de considérer la forme physico-chimique de l'élément, le type d'échantillon (solution, interfaces solide-liquide, gazeux et solide) et la concentration des éléments d'intérêt. De la même façon, la stratégie développée dépendra de la nature de l'information recherchée et du type d'études ciblées, qui peuvent être fondamentales *via* l'étude de systèmes modèles ou l'étude d'échantillons réels, généralement dans des matrices complexes. Il est à noter qu'en amont de l'analyse de spéciation, de nombreux travaux sont initiés afin de développer des procédures adéquates d'échantillonnage, de conservation et de préparation d'échantillon strictes, procédures nécessaires pour ne pas modifier la répartition des formes chimiques et obtenir des résultats fiables.

Les méthodes et les techniques analytiques de spéciation

Il existe deux principales manières de réaliser des études de spéciation : l'approche par calcul et l'utilisation de techniques analytiques. La spéciation théorique consiste à calculer la répartition des différentes formes chimiques d'un élément dans un milieu donné à partir de constantes de stabilité thermodynamiques décrivant les équilibres chimiques impliqués. La spéciation théorique d'un élément dans des milieux biologiques ou environnementaux est souvent délicate. Ce sont en effet des milieux très complexes, dont la composition est généralement variable car soumise à des processus dynamiques, et les constantes thermodynamiques des espèces chimiques en présence sont très peu connues. C'est la raison pour laquelle l'analyse de spéciation par des techniques analytiques dédiées est la plupart du temps incontournable.

La spéciation théorique : approche par calcul (*in silico*)

Cette approche implique de connaître la composition du milieu et les équilibres physico-chimiques mis en jeu avec les constantes thermodynamiques associées. Il est alors possible de calculer :

- en solution : la solubilité, la précipitation et la répartition des différentes formes chimiques complexées dans le milieu donné, milieu parfaitement défini par sa composition, à savoir le pH, le potentiel redox (Eh), la force ionique, la concentration des cations et des anions avec identification des ligands ou complexants (composés minéraux, organiques, biologiques) ;
- dans un système solide-solution : la distribution de l'élément entre la phase liquide et la phase solide, en considérant la présence de colloïdes et particules, de substrats solides (surfaces minérales, interfaces biologiques...).

L'établissement des diagrammes de spéciation est généralement effectué au moyen d'outils théoriques, comme par exemple le code de calcul JCHESS [2], couplé à une base de données (e.g. OCDE/AEN) [3]. Ces calculs théoriques permettent, par exemple, de dimensionner les expérimentations *in vitro* ou *in vivo* en appréhendant des effets de concentration, de précipitation, d'oxydo-réduction... ou d'aider à interpréter les résultats.

Exemple : Sur la base de données thermodynamiques existant dans la littérature et incrémentées dans la base de données BASSIST [4], Ansoborlo *et coll.* [5] ont établi un

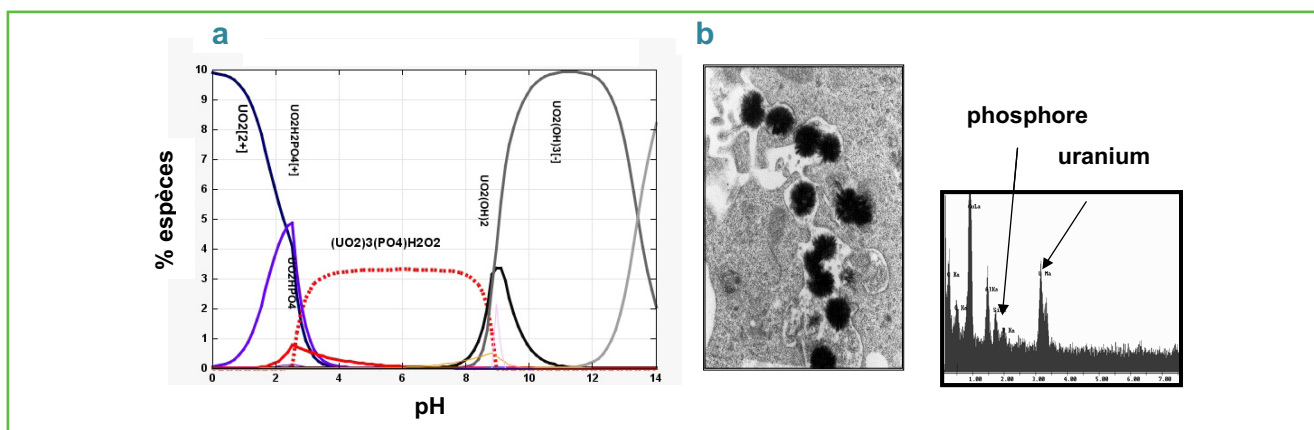


Figure 1 - (a) Spéciation théorique de l'ion uranyle ($[UO_2^{2+}] = 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) dans des cellules rénales [5], (b) précipitation intracellulaire de phosphate d'uranyle $(UO_2)_3(PO_4)_2 \cdot 4 H_2O$ à pH 5, suspectée par analyse MET-EDX* de lysosomes de cellules rénales LLC-PK1 en culture [6].

diagramme de spéciation de l'ion uranyle (pH 5, $[UO_2^{2+}] = 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) dans les cellules rénales (figure 1a) permettant de prédire la précipitation de l'uranium sous forme de phosphate d'uranyle, suspectée par Mirto *et coll.* [6] (figure 1b), observée par Carrière *et coll.* [7-8] et confirmée par EXAFS* [9].

La mise en œuvre d'une plate-forme incluant des techniques analytiques offre la possibilité de mener des études de spéciation sur des systèmes modèles simples, constitués d'un métal et d'un ligand d'intérêt biologique ou environnemental. Ainsi, des informations structurales, la stœchiométrie et les constantes de stabilité thermodynamiques des espèces sont déterminées, permettant l'alimentation des bases de données utilisées pour établir les diagrammes de spéciation théorique. Afin d'obtenir des données fiables, il est impératif de croiser les données acquises par ces techniques complémentaires. L'étude de ces systèmes simples est également un moyen pour le développement et la validation de méthodes analytiques dédiées qui pourront être appliquées à des milieux complexes.

La spéciation expérimentale : utilisation de techniques analytiques (in analytico)

De nombreuses techniques analytiques existent pour réaliser des études de spéciation, donnant des informations différentes et très souvent complémentaires (figure 2).

- Les techniques telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN*), la spectroscopie d'absorption X (XAS*), la spectroscopie UV-visible*, la spectroscopie laser résolue en temps (SLRT*)... permettent d'obtenir des **informations structurales** sur les espèces chimiques, comme le degré d'oxydation du métal, la stœchiométrie⁽³⁾ des espèces, la géométrie des complexes, les atomes donneurs impliqués dans la coordination, les longueurs de liaisons... Ces techniques permettent de travailler dans une large gamme de concentrations (10^{-1} à $10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$).
- Des **informations moléculaires**, telles que la caractérisation du ligand coordonné

au métal et la stœchiométrie des espèces, ainsi que le nombre d'espèces en solution, peuvent être obtenues par spectrométrie de masse à source d'ionisation électrospray (ESI-MS*), qui est une technique d'ionisation douce. L'identification structurale est possible grâce à l'utilisation de cellules de collision, qui permet une analyse en mode MS/MS. Malgré ce mode d'analyse en tandem, l'identification de grosses molécules telles que les protéines et les métalloprotéines reste un enjeu. Il est à noter que des analyses de spéciation par ESI-MS peuvent être menées sur des systèmes simples dans la mesure où les complexes en présence, les ligands et les métaux libres en solution peuvent être caractérisés et quantifiés. Bien que la spectrométrie de masse à source électrospray soit une technique d'analyse sensible (des concentrations inférieures à $10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ sont analysables), elle souffre souvent d'effets de matrice impliquant la suppression de signal et le manque de sensibilité pour l'analyse des échantillons biologiques. De plus, les interactions métal-ligands sont susceptibles d'être perdues dans la phase gazeuse, soulevant des questions sur la corrélation entre les espèces en solution et en phase gazeuse.

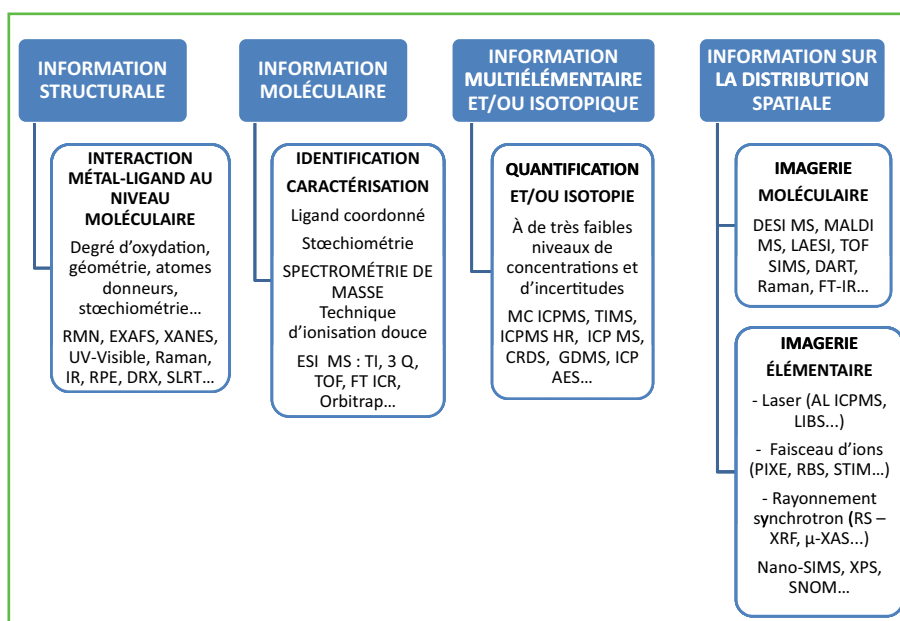


Figure 2 - Répartition de différentes techniques analytiques selon l'information recherchée (voir aussi glossaire).

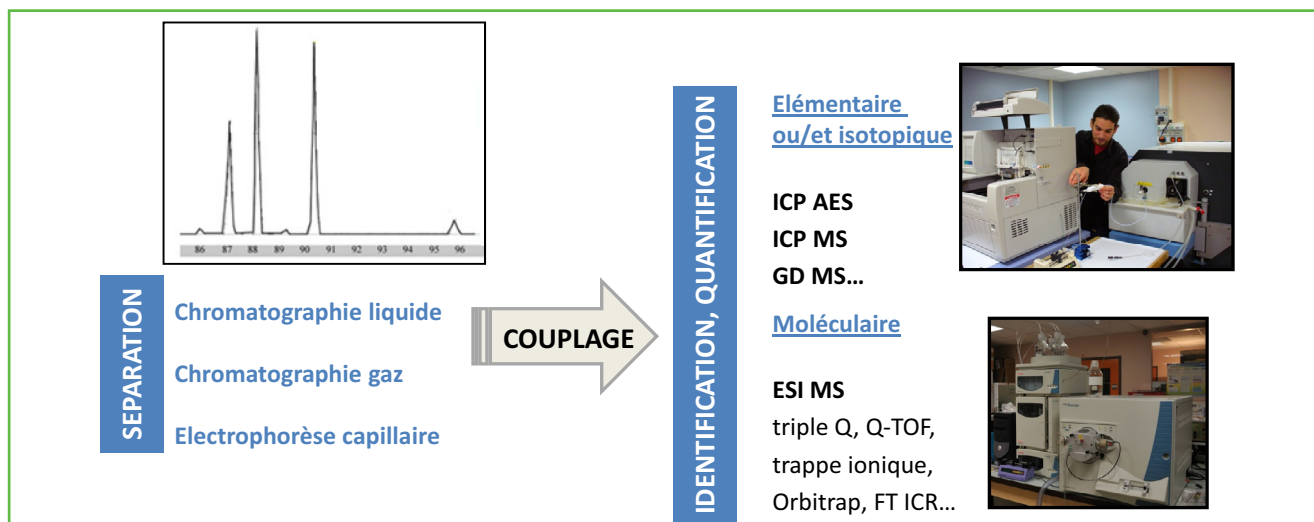


Figure 3 - Schéma de principe du couplage de techniques séparatives avec des techniques d'analyse élémentaire et moléculaire (CEA Saclay, Direction de l'Énergie Nucléaire, Département de Physico-Chimie).

• Des **informations multi-élémentaires et isotopiques** à de très faibles niveaux de concentrations (10^{-12} mol.L⁻¹) et d'incertitudes sont permises par la spectrométrie de masse à source plasma à couplage inductif (ICP-MS*). Ces avantages sont couplés à une bonne tolérance aux effets de matrice, offrant la possibilité d'analyser des échantillons complexes et variés. Dans le domaine de la spéciation appliquée à la toxicologie, l'ICP-MS est très utilisée pour l'analyse spécifique et quantitative des biomolécules contenant dans leur structure un métal ou un métalloïde. L'amélioration de la sélectivité de l'ICP-MS est possible par l'utilisation de cellules de collision/réaction, permettant de supprimer certaines interférences isobariques [10]. Néanmoins, les informations moléculaires et structurales ne sont pas accessibles, ce qui a rendu la combinaison de l'analyse moléculaire et élémentaire une approche prometteuse et un outil puissant pour étudier la spéciation *in vitro* et *in vivo*.

Ces deux techniques de spectrométrie de masse, ESI-MS et ICP-MS, peuvent également être utilisées comme détection en ligne suite à la séparation de plusieurs espèces en présence (figure 3). Les méthodes séparatives couplées en ligne à une technique de détection sensible et spécifique constituent un outil analytique incontournable pour l'analyse de spéciation dans les matrices d'intérêt dans le domaine environnemental, biologique ou nucléaire. Les principales techniques de séparation utilisées sont : i) l'électrophorèse capillaire (EC*) et ses dérivées comme l'isotachophorèse (ITP*) ; ii) la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS*) ; et iii) la chromatographie en phase liquide dont les modes de séparation les plus rencontrés sont la chromatographie d'échange d'ions, la chromatographie d'exclusion stérique (SEC*), la chromatographie de partage à polarité de phases inversée, la chromatographie d'appariement d'ions, la chromatographie d'affinité (IMAC*), et plus récemment la chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC*)....

En fonction des besoins en justesse et de la nature des espèces mises en jeu, la méthode de dilution isotopique est de plus en plus utilisée lors des études de spéciation par couplage entre les techniques séparatives et l'ICP-MS, pour quantifier précisément des composés organométalliques, même dans des matrices complexes [11-13]. La mise en œuvre de cette méthode nécessite l'utilisation d'espèces

enrichies isotopiquement et/ou d'espèces marquées, mais ces espèces ne sont pas toujours disponibles.

Étant donnée la complexité des matrices, il est courant d'avoir recours à de la chromatographie multidimensionnelle. Les fractions issues d'une première séparation chromatographique d'un échantillon sont récupérées et soumises à des séparations supplémentaires basées sur des principes différents. Par exemple, pour l'analyse d'échantillons biologiques, la SEC couplée à l'ICP-MS constitue une première étape de purification et de criblage de fractions protéiques/peptidiques contenant des métaux/radionucléides. En raison de la faible résolution de la SEC, les différentes fractions sont ensuite séparées plus finement grâce à un autre type de chromatographie (phase inverse, échange d'ions, HILIC...) couplée à l'ESI-MS haute résolution d'une part et à l'ICP-MS d'autre part. Ce type d'analyse multidimensionnelle permet ainsi d'accéder à la spéciation, c'est-à-dire l'identification et la quantification d'espèces chimiques contenant des métaux, des métalloïdes ou des radionucléides.

L'analyse de spéciation par des techniques analytiques couplées n'est réalisable que si les espèces à séparer sont suffisamment stables et inertes au regard de la séparation, ce qui assure la préservation de leur intégrité. Dans le cas contraire, il est extrêmement intéressant de considérer les techniques analytiques d'imagerie et de microlocalisation, dont l'objectif est d'établir la distribution quantitative spatiale *in situ* des éléments et des molécules dans divers échantillons solides. L'avantage de ces techniques est qu'elles ne nécessitent pas ou peu de préparation d'échantillons, susceptible de dégrader les espèces à analyser, et elles sont le plus souvent non destructives. Selon la technique utilisée, les informations obtenues sont différentes ; quelques-unes des techniques les plus répandues pour l'analyse de spéciation dans les échantillons biologiques et environnementaux sont déclinées ci-après.

• La détection, la localisation et l'identification de molécules à la surface de nombreux types d'échantillons, en d'autres termes la **distribution spatiale des molécules**, sont réalisables par certaines techniques de spectrométrie de masse. De nombreux composés incluant des protéines, des peptides, des polymères, mais aussi de petites molécules

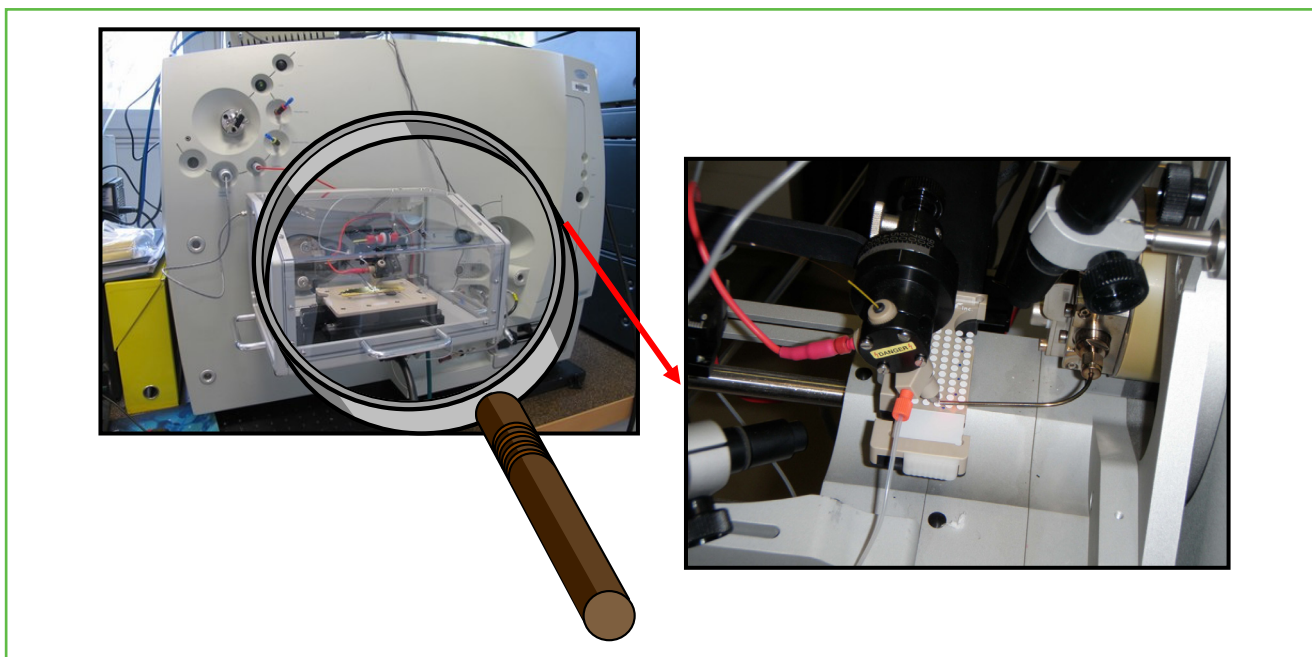


Figure 4 - Spectromètre de masse à source DESI pour l'étude de la distribution spatiale des molécules (CEA Saclay, Direction de l'Énergie Nucléaire, Département de Physico-Chimie).

telles que les lipides, peuvent être analysés dans une grande variété d'échantillons : tissus, verres, papiers, plastiques, etc. L'imagerie moléculaire est généralement réalisée en quatre étapes : la préparation éventuelle de l'échantillon, les processus de désorption-ionisation, l'enregistrement du spectre de masse des molécules d'intérêt point par point de la zone ciblée, et la reconstitution de la distribution des espèces (cartographie en deux dimensions). Les molécules peuvent être désorbées et ionisées par un laser (MALDI*), un faisceau d'ions primaires (SIMS*) ou un flux de gouttelettes chargées (DESI*). À titre d'exemple, le MALDI et le DESI (figure 4) permettent des analyses moléculaires *in situ* avec une résolution de l'ordre de 100 μm et le SIMS avec une résolution inférieure à 100 nm [14]. L'imagerie moléculaire connaît un essor considérable pour le diagnostic de maladies, le suivi thérapeutique, les sciences médico-légales, mais peut être également étendue à l'analyse de spéciation dans des tissus [15].

• La **distribution spatiale des métaux et des éléments avec une haute résolution ainsi que leur spéciation** dans des échantillons solides peuvent être déterminées par des techniques micro-analytiques d'imagerie par source laser, faisceau d'ions ou rayonnement synchrotron. Quelques techniques d'imagerie appliquées à des thématiques en toxicologie sont brièvement décrites ci-dessous :

– **Source laser** : la technique la plus répandue pour réaliser ces analyses est l'ablation laser couplée à la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (LA-ICPMS*). Cette dernière est très utilisée pour l'**analyse multi-élémentaire et isotopique** d'échantillons solides avec d'excellentes limites de détection (ng.g^{-1}) associée à sa capacité à fournir des informations à l'échelle de quelques dizaines de microns [16]. Après focalisation d'un faisceau laser sur l'échantillon, la matière ablatée est entraînée dans le plasma d'un ICPMS par un gaz inerte (argon ou hélium) où elle est atomisée puis ionisée. C'est une technique mature pour l'analyse d'échantillons géologiques [17], mais aussi des matériaux de haute

pureté, des semi-conducteurs, etc. L'application de LA-ICPMS dans la recherche biologique et médicale est plus délicate dans la mesure où les méthodes de quantification et les performances analytiques (en particulier la résolution spatiale et en profondeur) doivent être améliorées. Néanmoins, cette technique s'est développée ces dernières années pour la cartographie élémentaire de métaux dans des tissus [18-19] et la détection *in situ* de métalloprotéines dans des gels d'électrophorèse [20].

– **Faisceau d'ions** : la haute résolution obtenue avec ce type de technique découle du diamètre du faisceau d'ions, de l'ordre du micron, focalisé sur un échantillon solide. Les microsondes à faisceau de protons offrent la possibilité de réaliser l'imagerie quantitative de la distribution d'éléments avec une haute résolution spatiale (0,2-2 μm) et une haute sensibilité (de l'ordre du $\mu\text{g.g}^{-1}$). La combinaison des analyses des ions émis (STIM*), des rayons X émis (PIXE*) et des particules rétrodiffusées (RBS*) permet donc d'établir la **distribution spatiale in situ** et la **quantification multi-élémentaire de métaux et d'éléments à l'échelle cellulaire et subcellulaire** [21]. Ces techniques d'analyse sont donc des outils puissants pour contribuer à des études de toxicologie cellulaire, puisque la distribution intracellulaire quantitative de métaux à l'état de trace est obtenue. L'imagerie par faisceau d'ions est appliquée depuis quelques années dans la recherche sur le cancer, par exemple pour le suivi cellulaire du cis-platine [22], sur les maladies neurodégénératives à travers l'étude de la distribution intracellulaire du fer dans les neurones [23], et sur la toxicologie des métaux en mettant en évidence l'interaction de métaux toxiques avec les métaux essentiels à l'état de trace... [24] (figure 5).

– **Rayonnement synchrotron** : les progrès récents des installations de rayonnement synchrotron permettent d'obtenir des faisceaux de rayons X focalisés à mieux que le micromètre en spectroscopie d'absorption X (XAS). On peut ainsi atteindre en $\mu\text{-XAS}$ des **informations de spéciation au niveau cellulaire et subcellulaire** [25]. La principale application

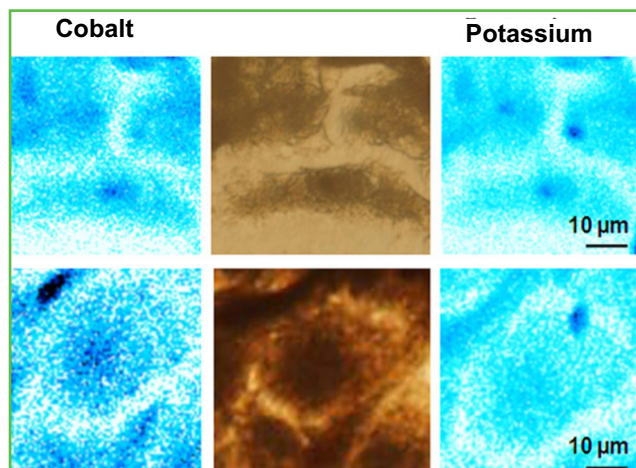


Figure 5 - Distribution du cobalt dans des cellules épithéliales humaines (HaCaT) exposées pendant 48 h à 400 µM de CoCl_2 , obtenue par microsonde faisceau d'ions [24]. Analyse par microscopie optique (centre) et cartographie du cobalt et du potassium obtenue par analyse PIXE.

de la μ -XAS est en μ -XANES*, qui est une sonde unique pour caractériser *in situ* le degré d'oxydation et la géométrie d'un métal dans les compartiments subcellulaires. Cette technique a été utilisée pour des études dans les domaines des maladies neurodégénératives, de la carcinogenèse des métaux, des mécanismes physiologiques des éléments traces et de la spéciation des métaux dans les procaryotes. Des métaux à différents degrés d'oxydation ont été identifiés dans les compartiments subcellulaires de différentes cellules, comme par exemple Fe(II)/Fe(III) et Cu(I)/Cu(II) dans des cellules neuronales, Cr(III)/Cr(VI) dans des cellules pulmonaires, Pt(II)/Pt(IV) dans des cellules tumorales et As(III)/As(V) dans des cellules hépatiques [25].

Les techniques d'analyse par microsondes à rayonnement synchrotron et faisceaux d'ions offrent probablement la meilleure association entre la sensibilité et la résolution spatiale.

Les microsystèmes analytiques pour l'analyse de la spéciation

Les systèmes d'analyse intégrés, appelés aussi « **micro total analytical system** » (μ TAS) ou **laboratoire sur puce**, consistent en des dispositifs miniaturisés comprenant tout ou partie des étapes du processus analytique (préparation des échantillons, séparation, détection, quantification). Le développement de systèmes analytiques miniaturisés a connu un essor considérable ces dernières années dans la mesure où ils présentent un grand nombre d'avantages : l'analyse de composés à l'état de trace ou d'ultratrace dans des matrices complexes, la diminution des volumes d'échantillons, de réactifs, de déchets chimiques, de temps d'analyse, et la possibilité de mise en œuvre d'analyses à haut débit et sur le terrain. Ces caractéristiques sont en adéquation avec les fortes demandes sociales actuelles. Les principales applications concernent la biologie (puces à ADN, à protéines...), mais de plus en plus d'applications en chimie analytique apparaissent actuellement. Typiquement, il s'agit de structures d'une dizaine de cm^2 comportant un réseau de canaux dont les dimensions sont de l'ordre de quelques dizaines de micromètres (figure 6) au sein desquels

une étape d'injection suivie d'une étape de séparation et enfin d'une étape de détection sont, par exemple, mises en œuvre.

Dans ces microsystèmes, la **séparation des espèces** joue un rôle fondamental pour l'analyse d'échantillons complexes. Cette séparation est basée soit sur l'utilisation du flux électrocinétique, soit sur un principe de chromatographie. Parmi les différentes techniques, l'**électrophorèse capillaire** (EC*) est très intéressante car elle permet des séparations efficaces, rapides et sur de très faibles volumes d'échantillon. Elle ne nécessite de plus qu'une instrumentation simple, facilement miniaturisable. L'EC sur microsystèmes est ainsi développée dans les domaines biomédical, pharmaceutique, environnemental, etc. [26-27]. Il est également possible d'utiliser une grande variété de techniques séparatives basées sur le principe de l'EC, comme l'**isotachophorèse** qui offre la possibilité de concentrer (jusqu'à un facteur 1 000) des analytes au cours de la séparation. L'isotachophorèse peut être mise en œuvre soit seule, soit en couplage avec l'électrophorèse capillaire de zone ou l'électrophorèse capillaire micellaire, pour le traitement amont des échantillons (pré-séparation, concentration, élimination de matrice), conduisant ainsi à des séparations rapides avec de très bonnes résolutions. L'isotachophorèse miniaturisée peut ainsi être employée pour l'étude de spéciation. Par exemple, les espèces SO_4^{2-} , Se(VI), Cr(VI) et As(V) ont pu être séparées en une seule injection [28]. Concernant la **séparation par mode chromatographique**, différentes voies sont étudiées comme la fonctionnalisation des canaux *in situ*, les structures dites COMOSS (« COllocated MOlonolith Support Structures ») constituées de réseaux de nanopiliers microfabriqués, les phases particulières, les phases monolithiques à base polymères continues et poreuses... Ces dernières font l'objet de nombreuses études pour la séparation d'ions inorganiques, de molécules et de biomolécules, et sont particulièrement bien adaptées aux microsystèmes. Elles possèdent en effet l'avantage de pouvoir être synthétisées *in situ*, éliminant ainsi les difficultés de remplissage.

Détection miniaturisée

La détection de composés après séparation sur microsystème est l'un des points clés et sans doute l'un des plus délicats à maîtriser. Cette détection peut être miniaturisée et implantée sur le microsystème de façon à disposer d'un système totalement autonome et utilisable sur site. On trouve alors de nombreux types de détection. En raison de sa sensibilité (limites de détection jusqu'à 10^{-10} - 10^{-12} mol.L⁻¹) et de sa sélectivité, la **détection par fluorescence** (LIF*) constitue la méthode la plus communément répandue en chromatographie liquide et en électrophorèse capillaire pour suivre les séparations sur des microsystèmes [29]. La **spectrométrie**

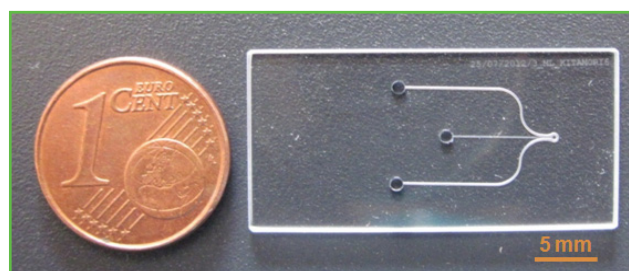


Figure 6 - Exemple de microsystème gravé dans du verre par ablation laser (CEA Saclay, Direction de l'Énergie Nucléaire, Département de Physico-Chimie).



Figure 7 - Couplage entre un microsystème séparatif par isotachophorèse et un ICP-MS pour l'analyse des lanthanides (collaboration CEA Saclay, Direction de l'Énergie Nucléaire, Département de Physico-Chimie et Université de Lyon 1) [36].

d'absorption UV-visible est très couramment utilisée en chromatographie liquide et en électrophorèse capillaire. Un système commercial dédié à la détection UV-visible sur des microsystèmes a été testé avec succès pour des problématiques biologiques [30] et environnementales [31]. La **détection par voie électrochimique** offre des possibilités de miniaturisation, est peu coûteuse et demande peu de puissance d'alimentation. La détection conductimétrique est, par exemple, de plus en plus appliquée pour détecter des espèces électroactives ou non sur les dispositifs microfluidiques [32] et se révèle prometteuse pour l'analyse des ions [33].

Détection à l'échelle du laboratoire

Un deuxième axe de détection particulièrement important consiste à coupler les microsystèmes séparatifs avec des spectromètres de masse de laboratoire de façon à conserver les performances analytiques tout en travaillant sur des microquantités d'échantillons. La spectrométrie de masse moléculaire de type ESI-MS est l'une des méthodes de détection les plus utilisées sur les microsystèmes pour les applications en biologie. Elle est couramment appliquée en raison de sa haute sensibilité vis-à-vis de la détection de composés organiques de haut poids moléculaire. Les débits des microfluides (nL- μ L/min) sont proches de ceux utilisés dans les sources nano- et micro-ESI, et des interfaces ont été développées entre le microsystème et l'ESI-MS [34]. En raison de leur forte sensibilité et sélectivité, l'ICP-AES* et l'ICP-MS sont également utilisées comme détecteurs pour les microsystèmes. Un couplage électrophorèse capillaire sur microsystème/ICP-MS pour caractériser la spéciation du chrome, du cuivre et de l'arsenic a par exemple été développé [35], ainsi qu'un couplage entre une séparation par isotachophorèse sur microsystème et un ICP-MS pour la séparation et la mesure isotopique des lanthanides [36] (figure 7).

Conclusions et perspectives

La connaissance de la spéciation est fondamentale dans de nombreux domaines d'étude, et en particulier en toxicologie humaine et environnementale, pour comprendre et interpréter les mécanismes mis en jeu dans la réactivité des éléments présents à l'état de traces et dimensionner les expérimentations associées. La détermination de la spéciation

d'un élément dans un échantillon, quel qu'il soit, implique de caractériser parfaitement le milieu, d'obtenir une réponse spécifique et sensible, de disposer de bases de données thermodynamiques partagées par les chimistes et les biologistes, et de croiser les méthodes d'études et les calculs théoriques. L'utilisation et le développement de techniques séparatives couplées aux techniques spectrométriques sont indispensables pour l'analyse de spéciation dans les milieux complexes rencontrés dans les domaines biologique, environnemental ou nucléaire.

Par ailleurs, les techniques analytiques d'imagerie et de microlocalisation sont de plus en plus développées pour établir la distribution spatiale *in situ* des éléments et des molécules dans divers échantillons solides. Les développements récents réalisés sur les microsondes à faisceau d'ions ou rayonnement synchrotron sont très prometteurs pour l'imagerie et la spéciation à l'échelle subcellulaire. L'essor considérable de la miniaturisation et de l'intégration d'outils analytiques sur puce est également un atout majeur pour le futur, car l'analyse de spéciation sur de très faibles quantités d'échantillons et sur le terrain sera réalisable.

Dans l'industrie du nucléaire, et en particulier au CEA, les études de spéciation ont été développées depuis une dizaine d'années avec de nouveaux outils analytiques afin de revisiter certains domaines de recherche. Par exemple, dans le domaine des sciences du vivant, la spéciation est indispensable pour l'identification de molécules cibles de radionucléides. De nombreux travaux portent également sur la connaissance de la spéciation des radionucléides dans les différentes étapes du cycle du combustible. En effet, dans la mesure où les différentes formes physico-chimiques gouvernent la solubilité et la distribution des éléments dans un milieu, la connaissance précise et quantitative de la spéciation des radionucléides est fondamentale pour la compréhension et la maîtrise des procédés.

Notes et références

- [1] L'étymologie du mot *spéciation* est issue du domaine des sciences du vivant et correspond à l'apparition de différence entre deux populations d'une même espèce, entraînant leur séparation entre deux populations (Larousse). Ce mot est maintenant couramment utilisé en chimie et en biologie.
- [2] *Décorporation* : traitement visant à éliminer de l'organisme, au moyen d'une substance chimique, des éléments radioactifs ou toxiques qui ont été incorporés. La substance chimique utilisée est appelée *décorporant* (JO 22/02/2009).
- [3] *Stœchiométrie* : étude des proportions molaires suivant lesquelles, au cours d'une réaction chimique, les réactifs se combinent et les produits se forment. Une réaction est dite stœchiométrique lorsque les quantités de réactifs sont dans des proportions molaires identiques à celles de l'équation chimique.
- [4] Templeton D.M., Ariese F., Cornelis R., Danielsson L.G., Muntau H., Van Leeuwen H.P., Łobinski R., Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches, *Pure Appl. Chem.*, **2000**, 72, p. 1453.
- [5] Van der Lee J., De Windt L., *JCHESS tutorial and cookbook/version 3.0. Users manual LHM/RD/02/13*, École des Mines de Paris, **2002**.
- [6] Bion L., *BASSIST: an applied thermodynamic database for radionuclide chemistry*, *Radiochim. Acta*, **2003**, 91, p. 633.
- [7] Ansoborlo E., Bion L., Doizi D., Moulin C., Lourenco V., Madic C., Cote G., Van der Lee J., Moulin V., Current and future radionuclide speciation studies in biological media, *Radiat. Prot. Dosim.*, **2007**, 127, p. 97.
- [8] Mirto H., Barrouillet M.P., Henge-Napoli M.H., Ansoborlo E., Fournier M., Cambar J., Influence of uranium(VI) speciation for the evaluation of *in vitro* uranium cytotoxicity on LLC-PK1 cells, *Hum. Exp. Toxicol.*, **1999**, 18, p. 180.
- [9] Carrière M., Avoscan L., Collins R., Carrot F., Khodja H., Ansoborlo E., Gouget B., Influence of uranium speciation on normal rat kidney (NRK-52E) proximal cell cytotoxicity, *Chem. Res. Tox.*, **2004**, 17, p. 446.
- [10] Carrière M., Khodja H., Avoscan L., Carrot F., Gouget B., Uranium(VI) complexation in cell culture medium: Influence of speciation on normal rat kidney (NRK-52E) cell accumulation, *Radiochim. Acta*, **2005**, 93, p. 691.

- [9] Carrière M., Proux O., Milgram S., Thiebault C., Avoscan L., Barre N., Den Auwer C., Gouget B., Transmission electron microscopic and X-ray absorption fine structure spectroscopic investigation of U repartition and speciation after accumulation in renal cells, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2008**, *13*, p. 655.
- [10] Gourgiotis A., Granet M., Isnard H., Nonell A., Gautier C., Stadelmann G., Aubert M., Durand D., Legand S., Chartier F., Simultaneous U/Pu separation and direct isotope ratio measurements by using CO₂ as gas in a collision/reaction cell based MC-ICPMS, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **2010**, *25*, p. 1939.
- [11] Rappel C., Schaumlöffel D., Absolute peptide quantification by lutetium labeling and nano HPLC-ICPMS with isotope dilution analysis, *Anal. Chem.*, **2009**, *81*, p. 385.
- [12] Schaumlöffel D., Giusti P., Preud'Homme H., Szpunar J., Lobinski R., Precolumn isotope dilution analysis in nano HPLC-ICPMS for absolute quantification of sulfur-containing peptides, *Anal. Chem.*, **2007**, *79*, p. 2859.
- [13] Heilmann J., Heumann K., Development of a species-unspecific isotope dilution GC-ICPMS method for possible routine quantification of sulfur species in petroleum products, *Anal. Chem.*, **2008**, *80*, p. 1952.
- [14] Chughtai K., Heeren R.M.A., Mass spectrometric imaging for biomedical tissues analysis, *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, p. 3237.
- [15] Dill A.L., Eberlin L.S., Ifa D.R., Cooks R.G., Perspectives in imaging using mass spectrometry, *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, p. 2741.
- [16] Becker J.S., Zoriy M., Matusch A., Wu B., Salber D., Palm C., Becker J.S., Bioimaging of metals by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS), *Mass. Spectrom. Rev.*, **2010**, *29*, p. 156.
- [17] Guillong M., Heimgartner P., Kopajčić Z., Gunther D., Gunther-Leopold I., A laser ablation system for the analysis of radioactive samples using inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2007**, *22*, p. 399.
- [18] McRae R., Bagchi P., Sumalekshmy S., Fahrni C.J., *In situ* imaging of metals in cells and tissues, *Chem. Rev.*, **2009**, *109*, p. 4780.
- [19] Wu B., Becker J.S., Imaging of elements and molecules in biological tissues and cells in the low-micrometer and nanometer range, *Int. J. Mass Spectrom.*, **2011**, *307*, p. 112.
- [20] Hare D., Austin C., Doble P., Quantification strategies for elemental imaging of biological samples using laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Analyst*, **2012**, *137*, p. 1527.
- [21] Ortega R., Devès G., Carmona A., Bio-metals imaging and speciation in cells using proton and synchrotron radiation X-ray microspectroscopy, *J.R. Soc. Interface*, **2009**, *6*, p. S649.
- [22] Sakurai S.H., Okamoto M., Hasegawa M., Satoh T., Oikawa M., Kamiya T., Arakawa K., Nakano T., Direct visualization and quantification of the anticancer agent, cis-diamminedichloro-platinum(II), in human lung cancer cells using in-air microparticle-induced X-ray emission analysis, *Cancer Sci.*, **2008**, *99*, p. 901.
- [23] Carmona A., Devès G., Ortega R., Quantitative micro-analysis of metal ions in subcellular compartments of cultured dopaminergic cells by combination of three ion beam techniques, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, *390*, p. 1585.
- [24] Ortega R., Bresson C., Fraysse A., Sandre C., Devès G., Gombert C., Tabarant M., Bleuet P., Sez nec H., Simionovici A., Moretto P., Moulin C., Cobalt distribution in keratinocyte cells indicates nuclear and perinuclear accumulation and interaction with magnesium and zinc homeostasis, *Tox. Lett.*, **2009**, *188*, p. 26.
- [25] Ortega R., Direct speciation analysis of inorganic elements in single cells using X-ray absorption spectroscopy, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **2011**, *26*, p. 23.
- [26] Wu D., Qin J., Lin B., Electrophoretic separations on microfluidic chips, *J. Chromatogr. A*, **2008**, *1184*, p. 542.
- [27] Rassi Z.E., Electrophoretic and electrochromatographic separation of proteins in capillaries: An update covering 2007-2009, *Electrophoresis*, **2010**, *31*, p. 174.
- [28] Prest J.E., Baldock S.J., Fielden P.R., Goddard N.J., Brown B.J.T., Inorganic arsenic and selenium determination using miniaturised isotachopheresis, *Microchim. Acta*, **2005**, *151*, p. 223.
- [29] Götz S., Karst U., Recent developments in optical detection methods for microchip separations, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2007**, *387*, p. 183.
- [30] Faure K., Loughran M., Glennon J.D., Microchip metal complex speciation: The nickel-bathophenanthroline disulfonic acid system, *Anal. Chim. Acta*, **2006**, *557*, p. 130.
- [31] Wakida S., Fujimoto K., Nagai H., Miyado T., Shibutani Y., Takeda S., On-chip micellar electrokinetic chromatographic separation of phenolic chemicals in waters, *J. Chromatogr. A*, **2006**, *1109*, p. 179.
- [32] Xu J.J., Wang A.J., Chen H.Y., Electrochemical detection modes for microchip capillary electrophoresis, *Trac-Trends Anal. Chem.*, **2007**, *27*, p. 125.
- [33] Chen G., Lin Y.H., Wang J., Monitoring environmental pollutants by microchip capillary electrophoresis with electrochemical detection, *Talanta*, **2006**, *68*, p. 497.
- [34] Uchiyama K., Nakajima H., Hobo T., Detection method for microchip separations, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2004**, *379*, p. 375.
- [35] Song Q.J., Greenway G.M., McCreedy T., Interfacing a microfluidic electrophoresis chip with inductively coupled plasma mass spectrometry for rapid elemental speciation, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **2004**, *19*, p. 883.
- [36] Vio L., Crétier G., Chartier F., Geertsen V., Gourgiotis A., Isnard H., Morin P., Rocca J.L., Coupling between chip based isotachopheresis and multi-collector inductively coupled plasma mass spectrometry for separation and measurement of lanthanides, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **2012**, *27*, p. 850.



C. Bresson



F. Chartier



E. Ansoborlo

Carole Bresson (auteur correspondant)

est ingénieure chercheur, spécialisée en développements analytiques (techniques séparatives couplées et spéciation) au CEA Saclay¹.

Frédéric Chartier

est chef de projets R & D Chimie analytique au CEA Saclay².

Éric Ansoborlo

est expert international du CEA dans les domaines de la radiotoxicologie et de la spéciation des radionucléides dans la biosphère³.

¹ CEA, DEN, DPC, SEARS, Laboratoire de Développement Analytique Nucléaire, Isotopique et Élémentaire, F-91191 Gif-sur-Yvette Cedex.

Courriel : carole.bresson@cea.fr

² CEA, DEN, Département de Physico-Chimie, F-91191 Gif-sur-Yvette Cedex.

Courriel : frederic.chartier@cea.fr

³ CEA, DEN, DRCP, CETAMA, Marcoule, F-30207 Bagnols-sur-Cèze Cedex.

Courriel : eric.ansoborlo@cea.fr



Société Chimique de France

facebook

La SCF sur Facebook, vous aimez ?
Parlez-en autour de vous,
et invitez vos amis et collègues à nous rejoindre !

• www.facebook.com/pages/Soci%C3%A9t%C3%A9-Chimique-de-France/114534205270205