

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT, VALIDATION ET APPLICATION DE MÉTHODES D'ANALYSE
D'ULTRA-TRACE DU BÉRYLLIUM DANS DES MATRICES BIOLOGIQUES

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR VINCENT PAQUETTE

DÉCEMBRE 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

AVANT-PROPOS

Le projet mentionné dans ce mémoire s'inscrit dans le cadre d'un projet plus large ayant comme titre l'«Évaluation de la toxicité du béryllium en fonction de la forme chimique et de la taille des particules», sous la direction du docteur Joseph Zayed, professeur au département de santé environnementale et santé au travail de l'Université de Montréal, qui y agit comme chercheur principal. Ce projet est principalement financé par l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) et a comme co-chercheurs la docteure Ginette Truchon, chercheure à l'IRSST, le docteur Bruce Mazer, professeur à la faculté de médecine de l'université McGill, le docteur Gilles L'Espérance, professeur à l'école Polytechnique de Montréal, et le docteur Gaston Chevalier, professeur au département des sciences biologiques de l'Université du Québec à Montréal.

Je tiens à remercier monsieur Jacques Lesage, directeur du département d'expertise et service de laboratoire de l'IRSST pour m'avoir permis de réaliser ce projet dans son département. Également, j'aimerais remercier particulièrement la docteure Ginette Truchon, chercheure en toxicologie à l'IRSST, et le docteur Huu Van Tra, professeur au département de chimie de l'Université du Québec à Montréal, pour leur encadrement et pour leur co-direction dans l'accomplissement de ces travaux. Finalement, j'aimerais remercier chaleureusement madame Diane Cormier, technicienne au laboratoire, et monsieur Pierre Larivière, professionnel scientifique en chimie, pour leur participation active et leurs conseils judicieux pour l'accomplissement du projet. Sans oublier des remerciements spéciaux à monsieur Michel Marion, agent de recherche au département de chimie de l'Université du Québec à Montréal, pour avoir fourni si gentiment les échantillons provenant de rats et Monsieur Jean Lambert, professeur titulaire à la faculté de médecine de l'Université de Montréal, pour son aide dans le choix des traitements statistiques des données. Sans toutes ces personnes-ressources, ce mémoire et tout ce qui en découle n'aurait pas pu avoir lieu.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	ii
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	ix
LISTE DES SYMBOLES ET UNITÉS	xii
RÉSUMÉ	xiii
INTRODUCTION	1
1.1 Propriétés et utilisation du béryllium en milieu de travail	1
1.2 Effets sur la santé et réglementation	3
1.2.1 Influence de la taille et de la nature des particules de béryllium ...	6
1.3 Problématique de recherche	7
1.3.1 Digestion des échantillons	8
1.3.2 Analyse des échantillons	8
1.4 Méthodes existantes pertinentes pour l'analyse du béryllium dans les milieux biologiques concernés	10
1.5 Objectifs de cette étude	13
CHAPITRE II	
MATÉRIELS ET MÉTHODES	15
2.1 Provenance et conservation des échantillons biologiques	15
2.1.1 Animaux exposés aux poussières de béryllium	15
2.1.2 Échantillons utilisés pour l'optimisation et la validation des méthodes	17
2.1.3 Conservation des échantillons	17
2.2 Produits chimiques	17
2.2.1 Santé et sécurité relative à l'utilisation de l'acide perchlorique et du béryllium	19
2.3 Protocole des méthodes analytiques	19
2.3.1 Lavage, décontamination et choix de la verrerie	19
2.3.2 Préparation des échantillons	20
2.3.3 Méthode de digestion des échantillons	21

2.3.4	Vérification de la solubilité des poudres de béryllium	23
2.3.5	Méthode d'analyse	26
2.4	Validation des méthodes analytiques	35
2.4.1	Méthodes analytiques retenues	35
2.4.2	Vérification des sources de contamination	36
2.4.3	Validation des méthodes optimales retenues	37
2.5	Analyse des échantillons de souris	43
2.5.1	Méthodes utilisées pour les échantillons provenant de souris .	43
2.5.2	Contrôle de la qualité	44
2.5.3	Analyse statistique des données	45
CHAPITRE III		
RÉSULTATS ET DISCUSSION		53
3.1	Optimisation et développement des méthodes	53
3.1.1	Digestion des échantillons	53
3.1.2	Solubilité des poudres de béryllium	56
3.1.3	Analyse des échantillons par ICP-MS	59
3.1.4	Développement spécifique à la méthode avec H ₂ SO ₄	75
3.1.5	Méthodes analytiques retenues	79
3.2	Validation des méthodes	80
3.2.1	Évaluation des limites de détection et de quantification méthodologique	80
3.2.2	Évaluation de la précision	85
3.2.3	Évaluation de l'exactitude	87
3.2.4	Évaluation de l'entreposage des échantillons	90
3.3	Application des méthodes	92
3.3.1	Groupe contrôle et contamination	93
3.3.2	Considérations sur les tests statistiques	94
3.3.3	Poumons des souris exposées	95
3.3.4	Foies des souris exposées	97
3.3.5	Reins des souris exposées	99
3.3.6	Rates des souris exposées	101
3.3.7	Échantillons sanguins des souris exposées	103

3.3.8 Discussion sur les résultats obtenus	105
CONCLUSION	107
PERSPECTIVES	108
APPENDICE A	
CONTRÔLE DE LA QUALITÉ	109
BIBLIOGRAPHIE	115

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Nombre d'industries répertoriées au Québec étant susceptibles d'utiliser le béryllium, classées par secteur d'activité	2
1.2	Comparaison entre les courbes de clairance pulmonaire pour le Be et pour les autres éléments toxiques	5
2.1	Schéma de l'ICP-MS utilisé lors de l'étude	27
2.2	Schéma décisionnel pour les analyses statistiques utilisées	46
3.1	Optimisation de la puissance RF au plasma en présence d'acide sulfurique	61
3.2	Optimisation du temps d'acquisition des ions avec solution fortifiée 1 µg/L en Be	64
3.3	Choix de l'étalon interne selon la charge de la matrice	68
3.4	Variation individuelle des éléments selon la charge de la matrice	70
3.5	L'«effet de densité de charge»	71
3.6	Évaluation du lien entre la masse moyenne des organes digérés et la LDM obtenue par organe	82
3.7	Évaluation de la stabilité pour la méthode A	90
3.8	Évaluation de la stabilité pour la méthode B	91
A.1	Charte de contrôle pour les valeurs obtenues pour le MRC Seronorm ^{MC} avec la méthode A	110
A.2	Charte de contrôle pour les valeurs obtenues pour le MRC Seronorm ^{MC} avec la méthode B	111

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Comparaison des caractéristiques pour quatre instruments	9
2.1 Données concernant l'exposition des souris	16
2.2 Conditions de digestion à l'essai sur le rein de porc	23
2.3 Principaux paramètres utilisés pour l'ICP-MS	28
2.4 Conditions d'acquisition de l'ICP-MS	29
2.5 Présentation des formules utilisées pour le test ANOVA	50
3.1 Résultats des digestions à l'essai sur le rein de porc	54
3.2 Solubilisation de poudre de Be (métal) et BeAl avec la méthode de digestion $\text{HNO}_3 / \text{HClO}_4$ (3 : 1) en présence d'un échantillon de rein . .	57
3.3 Solubilisation de poudre de BeO avec différentes méthodes	58
3.4 Comparaison entre deux concentrations en étalon interne	73
3.5 Résultats obtenus avec calibration par ajout dosé sur des solutions fortifiées avec matrice d'acide sulfurique variable	76
3.6 Vérification des différentes récupérations avec et sans correction par addition à différents moments de la séquence d'analyse	78
3.7 Détermination de la LDM et de la LQM des méthodes validées	81
3.8 Comparaison des méthodes développées et des méthodes recensées dans la littérature pour les organes	83
3.9 Comparaison des méthodes développées et des méthodes recensées dans la littérature pour les échantillons sanguins	84
3.10 Mesures de variation des méthodes validées	86
3.11 Mesures de l'exactitude pour les méthodes validées	88
3.12 Mesures de récupération pour les matériaux de vérification inter-laboratoire de l'INSPQ	89
3.13 Vérification de la stabilité dépendant du matériel de conservation . . .	92
3.14 Concentrations de Be dans les matrices biologiques pour le groupe contrôle	93
3.15 Concentrations obtenues lors du dosage du Be dans la nourriture des souris	94

3.16	Concentrations de Be dans les poumons de souris en fonction de la nature et de la taille des particules de Be	96
3.17	Concentrations de Be dans les foies de souris en fonction de la nature et de la taille des particules de Be	98
3.18	Concentrations de Be dans les reins de souris en fonction de la nature et de la taille des particules de Be	100
3.19	Concentrations de Be dans les rates de souris en fonction de la nature et de la taille des particules de Be	102
3.20	Concentrations de Be dans les échantillons sanguins de souris en fonction de la nature et de la taille des particules de Be	104
A.3	Suivi des données obtenues pour le dosage des solutions de contrôle de la qualité avec la méthode A lors de l'analyse des échantillons provenant de souris exposées	112
A.4	Suivi des données obtenues pour le dosage des solutions de contrôle de la qualité avec la méthode B lors de l'analyse des échantillons provenant de souris exposées	114

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AMS	Spectrométrie de masse à accélérateur
ANOVA	Analyse de la variance
Ar	Argon
ASTDR	<i>Agency for toxic substances and disease registry</i>
ASTM	<i>American society for testing and material</i>
Ba	Baryum
BC	Béryllose chronique
Be	Béryllium
BeAl	Alliage béryllium-aluminium (formule chimique de Be ₅ Al)
BeLPT	Test de prolifération lymphocytaire au béryllium
Be (métal)	Béryllium métallique
BeO	Oxyde de béryllium
Bi	Bismuth
BRL	Blanc de réactif de laboratoire
Cd	Cadmium
Ce	Cérium
CEAEQ	<i>Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec</i>
CeO	Oxyde de cérium
Co	Cobalt
CO ₂	Dioxyde de carbone
Cr	Chrome
CV _A	Incertitude analytique
DRC	Cellule de réaction dynamique
ECM	Esters de cellulose mélangés
EI	Étalon interne
Ge	Germanium
H ₀	Hypothèse nulle
H ₁	Hypothèse alternative
HCl	Acide chlorhydrique
HClO ₄	Acide perchlorique
HEPA	Filtre à air haute efficacité pour les particules
HNO ₃	Acide nitrique
H ₂ O	Eau
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
H ₂ SO ₄	Acide sulfurique

ICP-AES	Plasma à couplage inductif couplé à la spectroscopie d'émission atomique
ICP-SFMS	Plasma à couplage inductif couplé à un spectromètre de masse utilisant un analyseur à secteur magnétique
ICP-MS	Plasma à couplage inductif couplé à un spectromètre de masse
In	Indium
INSPQ	<i>Institut national de santé publique du Québec</i>
IRSST	<i>Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail</i>
ISO	<i>Organisation internationale de normalisation</i>
LDI	Limite de détection instrumentale
LDM	Limite de détection méthodologique
Li	Lithium
LQM	Limite de quantification méthodologique
m	Pente de la droite d'étalonnage (sensibilité)
Mg	Magnésium
MRC	Matériel de référence certifié
m/z	Rapport masse sur charge
MC	Marque de commerce
n	Nombre d'échantillon ou de mesure
Na	Sodium
N/A	Non applicable
(NH ₄) ₂ H ₂ EDTA	Acide diammonium éthylènediaminetétraacétique
NH ₄ OH	Hydroxyde d'ammonium
Ni	Nickel
NIOSH	<i>National Institute for Occupational Safety and Health</i>
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
NO _x	Oxyde d'azote
O	Oxygène
OSHA	<i>Occupational Safety and Health Administration</i>
P	Valeur de probabilité statistique, de l'anglais « <i>p-value</i> »
Pb	Plomb
R	Ratio de conformité
R ²	Coefficient de corrélation
RF	Radio-fréquence
Rh	Rhodium
S	Soufre
Sc	Scandium
s.d.	Sans date (pour une référence)
SiO	Oxyde de silice

SO ₂	Dioxyde de soufre
Tb	Terbium
Th	Thorium
U	Uranium
U _{anal}	Incertitude analytique élargie
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
USFWS	<i>United States Fish & Wildlife Service</i>
VCE	Vérification continue de l'étalonnage
VEI	Haute et basse vérification de l'étalonnage initial
VLQ	Vérification de la limite de quantification
WHO	<i>World Health Organization</i>
χ^2	Khi-carré
Y	Yttrium

LISTE DES SYMBOLES ET UNITÉS

°C	Degré Celsius
AMU	Unité de masse atomique
amol	Attomole, soit 10^{-18} mol
cps	Nombre de compte par seconde
eV	Électron-Volt
g	Gramme
mg	Milligramme, soit 10^{-3} g
µg	Microgramme, soit 10^{-6} g
ng	Nanogramme, soit 10^{-9} g
pg	Picogramme, soit 10^{-12} g
kg	Kilogramme, soit 10^3 g
h	Heure
L	Litre
mL	Millilitre, soit 10^{-3} L
m	Mètre
m ³	Mètre cube
mm	Millimètre, soit 10^{-3} m
µm	Micromètre, soit 10^{-6} m
MHz	Mégahertz, soit 10^6 Hertz
min	Minute
mol	Mole
ms	Milliseconde, soit 10^{-3} s
m/m	Masse par masse
m/v	Masse par volume
s	Seconde
v/v	Volume par volume
v/v/v	Volume par volume par volume
V	Volt
W	Watt
%	Pourcentage

RÉSUMÉ

Certaines études suggèrent que la forme chimique et la taille des particules de béryllium aient un rôle important à jouer sur sa toxicité. Le but principal du projet est de développer et valider des méthodes fiables, ayant des limites de détection au niveau d'ultra-trace, pour permettre d'analyser de faibles teneurs en béryllium dans différentes matrices biologiques. Cette étude s'inscrit dans un projet plus large où des souris ont été exposées par inhalation au Be (métal), BeO et BeAl ($250 \mu\text{g}/\text{m}^3$, 6 h par jour, 14 jours). Les tissus et liquides biologiques suivants ont été prélevés sur les souris : sang, foie, poumon, rate et rein. Ils ont été digérés par une méthode, dans le cas des particules de Be (métal) et de BeAl, ou par une autre méthode, dans le cas de BeO. La méthode pour Be (métal) et BeAl consiste en une digestion humide avec un mélange (3 :1) d'acide nitrique et perchlorique, tandis que la méthode pour BeO requiert l'ajout supplémentaire d'acide sulfurique. Les échantillons ont été analysés par ICP-MS avec le ^6Li comme étalon interne. Les limites de détection méthodologiques ont été évaluées individuellement pour chaque matrice et chaque méthode. La limite de détection analytique moyenne est de 2 pg/mL en solution, ce qui correspond à l'équivalent de 0,02 ng/g de tissus biologiques. Dans le sang, elle est équivalente à 0,03 ng/mL. L'exactitude des méthodes a été confirmée à l'aide de matériel de référence certifié. Des méthodes fiables ont donc été développées, validées et ont des limites de détection parmi les meilleures de la littérature. Ces méthodes ont été utilisées pour évaluer la distribution du béryllium dans les différentes matrices biologiques en fonction de l'espèce chimique et de la taille des particules. Tel qu'attendu, les résultats toxicologiques ont démontré que la taille et la nature des particules de béryllium a une influence sur sa distribution dans l'organisme. Les méthodes développées ont démontré une sensibilité adéquate pour la grande majorité des échantillons analysés, démontrant ainsi leur efficacité face aux objectifs désirés du projet.

Mots clés : béryllium, digestion acide, matrice biologique, ICP-MS, ultra-trace

INTRODUCTION

1.1 Propriétés et utilisation du béryllium en milieu de travail

Le béryllium (Be) est un métal brillant gris de la deuxième famille (alcalino-terreux) du tableau périodique. Il a un nombre atomique de 4, une masse molaire de 9,01 g/mol, une température de fusion de 1 287 °C et un état d'oxydation de + 2 (World Health Organization (WHO), 2001). Il a été découvert en 1798 par Louis-Nicolas Vauquelin (Kolanz, 2001). Il est présent sous plusieurs formes, dont l'oxyde de béryllium (BeO), le béryllium métallique (Be (métal) ou Be⁰) et l'alliage béryllium-aluminium (BeAl), qui seront à l'étude dans ce projet. Présent dans la croûte terrestre, sa concentration moyenne y est de 2,8 à 5,0 mg/kg et il est extrait de deux minéraux, soit le béryl (un aluminosilicate qui contient jusqu'à 4 % de Be) et la bertrandite (qui contient moins de 1% de Be). Il n'est pas présent à l'état pur dans la nature. En milieu industriel, le Be est principalement utilisé sous forme d'oxyde (15%), sous sa forme métallique (10%) et sous forme d'alliage (75%) (WHO, 2001).

Le Be est reconnu pour accroître la dureté des alliages, leur résistance à la corrosion, ainsi que leur conductivité électrique et thermique. Le Be est six fois plus rigide que l'acier, trois fois plus léger que l'aluminium, résistant à la déformation thermique et à la pression, il a une capacité d'absorption de la chaleur élevée et est transparent aux micro-ondes ainsi qu'aux rayons-X (Institut national de santé publique du Québec (INSPQ), 2004; WHO, 2001). Ses nombreuses qualités expliquent son utilisation dans des secteurs très variés, dont l'aérospatiale, l'énergie nucléaire et l'armement (WHO, 2001). Au Québec, des études ont révélé qu'il y a plusieurs établissements où les travailleurs sont exposés au Be (INSPQ, 2004). D'ailleurs, Dion (Dion, 2007) a présenté lors d'une conférence des résultats d'une enquête sur les entreprises québécoises susceptibles d'utiliser le Be (voir figure 1.1).

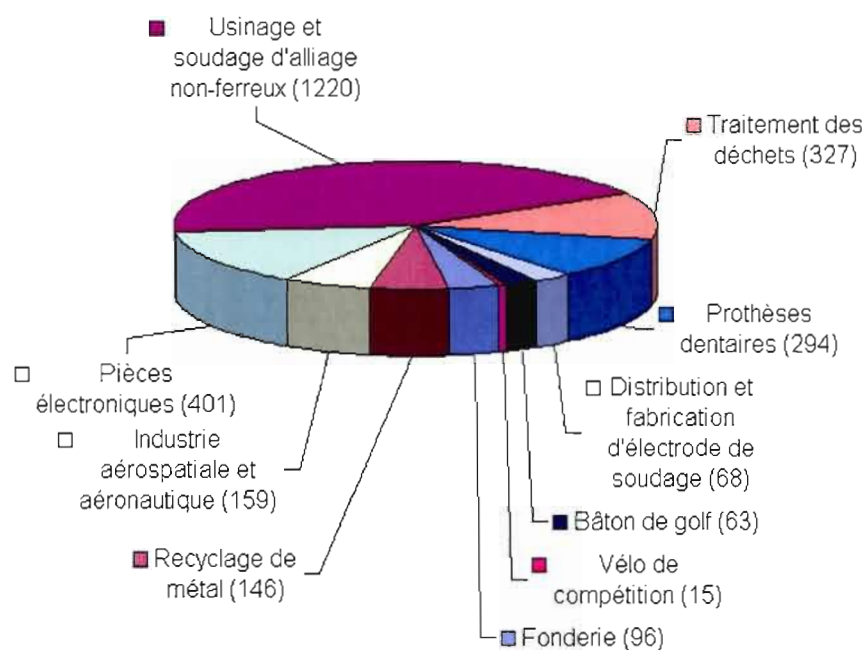


Figure 1.1 : Nombre d'industries répertoriées au Québec étant susceptibles d'utiliser le béryllium, classées par secteur d'activité (Source : Dion, 2007)

Les applications industrielles à l'échelle mondiale peuvent être classées selon la spéciation de Be utilisée (INSPQ, 2004; WHO, 2001) :

- Le Be (métal) est utilisé comme composant des disques à freins pour haute performance, dans les gyroscopes, dans l'industrie nucléaire comme réflecteur et modérateur de neutrons, comme fenêtre pour les tubes de rayons-X, ainsi que dans les systèmes optiques des satellites et dans l'industrie militaire (INSPQ, 2004; WHO, 2001).
- Le BeO, quant à lui, est utilisé dans l'industrie nucléaire et dans la fabrication de céramiques pour des applications diverses, dont l'automobile, les tubes à micro-ondes, les lasers et l'électronique, etc (INSPQ, 2004; WHO, 2001).
- Les alliages, principalement ceux fait à partir du cuivre, sont utilisés dans l'industrie aérospatiale, dans la fabrication de différents articles de sport, ainsi que dans les industries de l'électronique et dans la mécanique (INSPQ, 2004; WHO, 2001).

Bien que la source d'exposition principale soit d'origine professionnelle, il existe quand même un risque associé à l'exposition environnementale chez les individus résidant près d'usines traitant du Be, d'incinérateurs ou d'usines électriques utilisant du charbon ou de l'huile minérale (Apostoli et Schaller, 2001; Sanderson et al., 1999). Au niveau de la pollution atmosphérique, l'utilisation de combustibles fossiles (surtout le charbon) est responsable de 93% du Be atmosphérique, ce qui correspond à 187,1 tonnes par année. Le Be y est principalement rejeté sous sa forme oxydée. L'agence de la protection de l'environnement aux Etats-Unis (EPA, 1987) a d'ailleurs estimé en 1987 qu'un américain moyen ingérait 423 ng de Be par jour et la principale source de consommation était la nourriture (WHO, 2001).

1.2 Effets sur la santé et réglementation

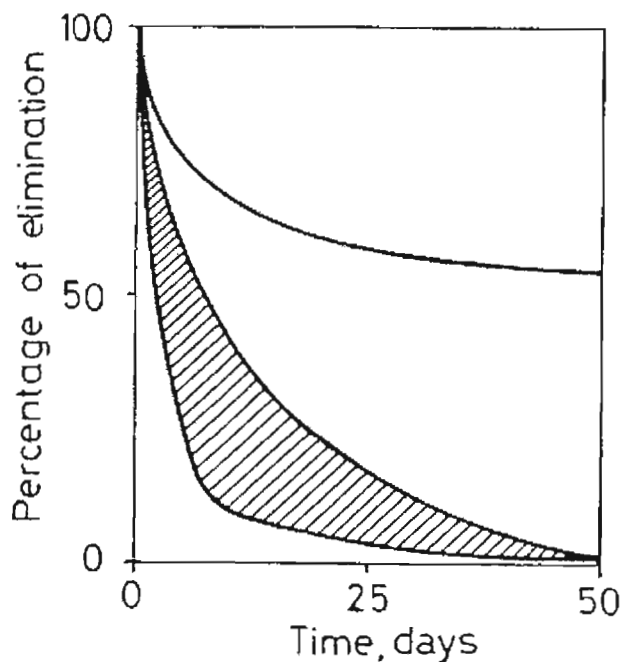
La béryllose chronique (BC), maladie mortelle causée par le Be, a été diagnostiquée au Québec pour la première fois en 1998 (INSPQ, 2004). Depuis, plusieurs spécialistes se sont penchés sur la question et la norme d'exposition du Be et de ses composés dans l'air en milieu de travail a été modifiée, passant de $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ à $0,15 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Québec, 2008). Cependant, il est important de spécifier que cette norme ne tient pas compte de la forme et du diamètre aérodynamique des particules de Be. Au Québec, le Be et ses composés sont reconnus dans la réglementation comme ayant un effet cancérigène démontré chez l'humain et comme étant un sensibilisant provoquant une réponse allergique de l'organisme. Sa recirculation est prohibée et l'exposition au Be doit être maintenue au minimum (Québec, 2008)

La principale voie d'exposition au Be pour les travailleurs est l'inhalation. Il n'existe cependant aucune étude recensée présentant des données relatives à la déposition et à l'absorption du Be dans les poumons chez l'humain. Suite à l'inhalation, le poumon est le principal organe cible. Des études d'inhalation chez les animaux ont démontré que le Be cause, entre autres, la pneumonie chimique, des

lésions granulomateuses, des fibroses, des hyperplasies, ainsi qu'une maladie spécifique au Be, la béryllose chronique (WHO, 2001).

La première étape de la maladie est la sensibilisation au Be. Cette étape est mise en évidence par le test de prolifération lymphocytaire au béryllium (BeLPT) et ne conduit pas nécessairement à une BC. Cependant, une étude de Newman et ses collaborateurs (2005) démontrent que les personnes sensibilisées progressent vers la BC avec un taux de 6 à 8 % par année. La BC, quant à elle, est la seconde étape de la maladie et est caractérisée par des granulomes non caséeux, au niveau des poumons, formés de cellules épithélioïdes géantes et entourés par des plasmocytes, des lymphocytes et des fibroblastes. Cette maladie d'hypersensibilité présente les mêmes symptômes que la sarcoïdose et peut causer la mort. Les symptômes associés à la BC sont, entre autres, la toux, la perte de poids, la dyspnée, des douleurs à la poitrine, la fatigue et l'hypertrophie du ventricule droit du cœur. La réponse inflammatoire aux antigènes spécifiques pour Be a été démontrée comme étant un processus de médiation cellulaire impliquant les cytokines. Il n'existe aucun traitement à la BC, quoique l'utilisation d'un corticostéroïde comme la Prednisone conduit à l'amélioration de la condition physique du patient (Agency for toxic substances and disease registry (ASTDR), 2002; Maier, 2001; Newman et al, 2005; Rossman, 2001). Une susceptibilité génétique à développer la BC a été démontrée par de nombreuses études (WHO, 2001).

Une étude réalisée par Rhoads et Sanders en 1985 (présentée dans ASTDR, 2002) a révélé que le BeO s'élimine de façon biphasique dans les poumons de rats, c'est-à-dire que le premier 30% de BeO est éliminé avec un temps de demi-vie de 2,5 jours et le reste du Be (70%) est éliminé avec un temps de demi-vie de 833 jours. Au niveau de l'organisme complet, l'élimination se fait en une seule étape selon une courbe exponentielle avec un temps de demi-vie de 356 jours (ASTDR, 2002). Aller (1990) présente d'ailleurs un graphique (figure 1.2) pertinent à ce sujet :



Comparison between the clearance curves for Be (—) and other toxic elements (▨).

Figure 1.2 : Comparaison entre les courbes de clairance pulmonaire pour le Be et pour les autres éléments toxiques (Source : Aller, 1990)

Le fait que 70 % du Be soit éliminé plus lentement est expliqué selon trois éléments : (1) Avec le temps, les précipités dans les poumons passent de la forme colloïdale vers la forme cristalline et ceci réduit leur taux de solubilisation. (2) L'inflammation des tissus autour des particules de Be les rend moins accessibles pour la solubilisation. (3) La formation de liens entre le Be et les protéines fermement ancrées dans les tissus pulmonaires. Du point de vue du cancer du poumon, le fait que le Be inhalé n'est pas rapidement éliminé augmente la charge pulmonaire et le risque de développer un cancer. De plus, le Be est reconnu pour être le seul métal toxique à démontrer une forte affinité avec le noyau des cellules et cette affinité est à l'origine de l'activité cancéreuse du Be (Aller, 1990).

Une étude a démontré la répartition suivante du Be dans les tissus humains : 0,21 mg/kg dans les poumons, 0,08 mg/kg dans le cerveau, 0,07 mg/kg dans les

reins, 0,07 mg/kg dans la rate, 0,04 mg/kg dans le foie, 0,04 mg/kg dans les muscles, 0,04 mg/kg dans les vertèbres, 0,03 mg/kg dans le cœur et 0,02 mg/kg dans les os (ASTDR, 2002 et Meehan et Smythe, 1967). Cependant, ces données proviennent d'une seule étude (Meehan et Smythe, 1967) et doivent être considérées à titre indicatif seulement.

1.2.1 Influence de la taille et de la nature des particules de béryllium

Plusieurs études épidémiologiques proposent une incidence de la grosseur et de la spéciation des particules contenant du Be sur les effets toxicologiques associés au Be (Martyny et al., 2000; WHO, 2001). Selon une étude effectuée sur des travailleurs de l'industrie nucléaire effectuant différentes tâches, la taille des particules pourrait être un facteur important impliqué dans la sensibilisation au Be (Kreiss et al., 1993).

Les granulomes pulmonaires associés à la BC se développent dans les régions d'échange gazeux du poumon. Ainsi, les particules les plus nuisibles de Be seraient celles de taille respirable ($< 5 \mu\text{m}$) (Kolanz, 2001; Ratney, 2001). Une importante étude épidémiologique entreprise en milieu industriel utilisant le Be démontre que les particules ayant un diamètre inférieur à $10 \mu\text{m}$ ont une relation plus significative avec le développement de la BC que les particules totales dans l'air. Cependant, il ne s'agit que d'une étude préliminaire qui comporte plusieurs limitations, dont la petitesse du nombre d'employés échantillonnés (Kent, Robbins et Madl., 2001). Il n'y a qu'une faible association dose-réponse entre les mesures gravimétriques d'exposition et la sensibilisation au Be et c'est pourquoi plusieurs auteurs suggèrent de mesurer l'exposition au Be dont le diamètre se situe entre $0,01 \mu\text{m}$ et $5 \mu\text{m}$. Cependant, des études toxicologiques plus poussées doivent être entreprises pour prouver la différence de réponse en fonction de la taille des particules (Henneberger et al., 2001; Kolanz, 2001; McCawley, Kent et Berakis 2001; Paustenbach, Madl et Greene, 2001).

La solubilité distincte des différentes formes chimiques du Be influence la rétention des particules au niveau pulmonaire. En effet, les particules peu solubles et de grosses tailles (plus grosses que 5 μm) seront éliminées par l'ascenseur mucociliaire et les macrophages, tandis que les petites particules plus solubles seront dissoutes dans les fluides pulmonaires. Une étude suggère que le BeO formé à basse température (500 °C) serait moins persistant dans les poumons que le BeO formé à haute température (1000 °C), ce dernier étant beaucoup moins soluble dans les fluides pulmonaires. La forme plus soluble aurait une vitesse de clairance plus rapide dans les poumons et aurait donc une toxicité différente que la forme moins soluble. Tel que mentionné pour la taille des particules, des études toxicologiques plus poussées doivent être entreprises afin de mettre en évidence la différence de réponse en fonction de la nature des particules (Finch et al., 1988; Paustenbach, Madl et Greene, 2001).

1.3 Problématique de recherche

Dans le but d'étudier la distribution du Be dans un organisme cible (ici, les souris) selon la taille et la nature des particules de Be, il manque des méthodes analytiques qui soient à la fois accessibles et spécifiques à l'analyse du Be, tout en démontrant une solubilisation efficace des poussières fines de Be pour les matrices biologiques. De plus, aucune méthode recensée (voir section 1.4) pouvant être appliquée sur les échantillons spécifiques à ce projet n'a été l'objet d'un processus de validation complet et rigoureux. Il n'existe également pas de consensus face à l'étalon interne qui est le plus efficace pour l'analyse du Be par ICP-MS. En ce qui concerne l'utilisation nécessaire de H_2SO_4 pour les poussières de BeO (qui sera démontré à la section 3.1.2.2), aucune méthode efficace et accessible permettant l'analyse par ICP-MS des échantillons digérés pour les matrices utilisées n'a été trouvée dans la littérature. Les méthodes doivent donc être développées en prenant soin de combler tous ces besoins spécifiques au projet.

1.3.1 Digestion des échantillons

Différentes méthodologies ont été développées dans le but de rendre une matrice biologique compatible avec les appareils d'analyse de métaux (voir 1.3.2). Il existe, dans la littérature moderne, une tendance vers la digestion par micro-ondes pour les tissus organiques et la solubilisation pour le sang. La digestion par micro-onde a l'avantage de présenter un temps de digestion moins long que les méthodes traditionnelles puisque la température de digestion n'est pas fonction du point d'ébullition des acides utilisés (Angerer et Schaller, 2003 et Mesko et al., 2006). Cette technique est d'ailleurs utilisée dans la méthode EPA 3052 (USEPA (United States Environmental Protection Agency), 1996) et par le USFWS (United States Fish & Wildlife Service) dans les méthodes analytiques 022 et 023 (USFWS, 2006) pour digérer les matrices à base organique. La solubilisation est utilisée, dans de nombreuses études, pour l'analyse de métaux dans le sang. Bien que cette technique soit rapide puisqu'elle ne requiert pas d'étape de digestion, elle ne permet pas nécessairement de solubiliser les éléments présents et elle souille l'instrument d'analyse, ce qui augmente le niveau d'entretien requis. (de Boer et al., 2004). Puisque qu'aucun appareil à micro-onde n'est disponible à l'IRSST et que la solubilisation des différentes espèces est un facteur déterminant pour l'étude, la méthode de digestion humide en milieu ouvert a été favorisée. Cette méthode, qui implique la destruction par oxydation de la matière organique à l'aide d'agents oxydants, requiert plus de vigilance de l'analyste, mais permet également l'utilisation de différents mélanges d'acides pour assurer une solubilisation complète de toutes les espèces étudiées (Angerer et Schaller, 2003). Elle est utilisée dans la méthode NIOSH 8005 (1994) pour digérer les tissus organiques et le sang.

1.3.2 Analyse des échantillons

Le tableau 1.1 présente une comparaison des techniques pour analyser les métaux en milieu biologique.

: Principales caractéristiques des techniques d'analyse élémentaire utilisées en biologie clinique (SAA-F : spectrométrie d'absorption atomique avec atomisation par flamme ; SAA-ET : spectrométrie d'absorption atomique avec atomisation électrothermique ; ICP-AES : spectrométrie d'émission optique couplée à un plasma induit par haute fréquence ; ICP-MS : spectrométrie de masse couplée à un plasma induit par haute fréquence ; LDD, LDQ : limites de détection, de quantification)

	SAA-F	SAA-ET	ICP-AES	ICP-MS
Nombre global d'éléments déterminables	> 68	> 50	> 75	> 75
Nombre d'éléments avec une LDQ < 10 µg/L	24	46	55	> 60
Sélectivité	++++	+++++	+++	+++
Gamme dynamique	10 ² -10 ³	10 ² -10 ³	10 ⁵ -10 ⁶	10 ⁸
LDD usuelles en biologie clinique (µg/L)	10-1000	1-50	5-50	0,1-10
Echantillon : concentration en sels dissous (g/L)	0,5-3	>30	1-30	0,1-0,4
Echantillon : volume minimum nécessaire (mL)	0,2	0,1-0,2	0,2-1	0,2-0,5
Cadence analytique	++	+	+++	+++
Utilisation en routine	++++	++	+++	++
Investissement financier	x 0,5	x 1	x 2	x 4

Tableau 1.1 : Comparaison des caractéristiques pour quatre instruments (Source : Moesch, 2007)

Comme il est possible d'observer au tableau 1.1, les deux techniques de plasma à couplage induit (ICP) permettent l'analyse de plus d'éléments et ce avec une meilleure sensibilité et une cadence analytique plus élevée que les deux autres techniques. L'ICP-MS est cependant la seule offrant la détermination isotopique et une gamme dynamique beaucoup plus élevée (10^8) que les autres techniques. La spectrométrie d'absorption atomique avec atomisation électrothermique reste cependant la plus sélective et celle avec le moins d'exigence pour la solution d'analyse (plus faible volume et accepte une concentration en sels dissous élevée). De tous ces appareils, l'ICP-MS est le plus onéreux (Moesch, 2007). Puisqu'il possède la meilleure sensibilité, l'ICP-MS sera utilisé lors de ce projet.

1.4 Méthodes existantes pertinentes pour l'analyse du béryllium dans les milieux biologiques concernés

Les méthodes de la littérature ont été choisies en fonction de leur limite de détection les plus basses possibles pour le Be et de leur application sur les matrices biologiques à l'étude, soit le sang, le foie, le poumon, la rate et le rein.

Dans le cas des tissus biologiques, la méthode NIOSH 8005 (1994) est suggérée pour doser une large gamme d'éléments présents dans le sang (10 g) ou dans des tissus organiques (2,0 g). Elle procède par une digestion acide sur plaque chauffante utilisant 10 mL d'un mélange 3 : 1 : 1 (v/v/v) HNO_3 : HClO_4 : H_2SO_4 suivi d'une analyse par ICP-AES (plasma à couplage inductif couplé à la spectroscopie d'émission atomique). La solution finale est composée d'une matrice de 10 % (v/v) d' H_2SO_4 et l'étalon interne suggéré est l'yttrium (Y). Verma, Ritchie et Shaw (2003) présentent l'utilisation d'une méthode assez rapprochée de la NIOSH 8005. En effet, 4 mL d'un mélange 3 : 1 (v/v) HNO_3 : HClO_4 est utilisé pour digérer 0,5 g de tissus organique. Le volume final est de 10 mL dans une solution de 1 % HNO_3 et son analyse se fait par spectrophotométrie d'absorption atomique par four au graphite. Aucune limite de détection n'est présentée pour la détermination du Be.

Engström et ses collaborateurs (2004) présentent une méthode pour l'analyse de plusieurs éléments, dont le Be, dans plusieurs types de tissus biologiques, dont le poumon, le foie et le rein. La méthode procède avec une digestion par micro-onde avec 5 mL d' HNO_3 concentré et une quantité maximale d'environ 1 gramme d'échantillon. Le volume final de 10 mL est analysé par étalonnage interne avec l'indium (In) et l'appareil utilisé pour l'analyse est un ICP-SFMS (plasma à couplage inductif couplé à un spectromètre de masse utilisant un analyseur à secteur magnétique). La limite de détection est calculée (trois fois l'écart-type du blanc) à partir de 11 blancs de digestion dilués 100 fois et la valeur rapportée est de 60 pg/g, donc d'environ 6 pg/mL à la lecture instrumentale.

Une autre méthode recensée (Chiarappa-Zucca et al., 2004) présente des limites de détection extrêmement basses en utilisant la spectrométrie de masse à accélérateur (AMS). Cette technique est utilisée pour déterminer le rapport isotopique $^{10}\text{Be}/^9\text{Be}$ dans plusieurs petites quantités d'organes (~200 mg), dont la rate, le rein, le foie et le poumon. La limite de détection est calculée dans des tissus contrôles et est de 0,8 amol de ^{10}Be . Ainsi, la plus petite quantité pouvant être déterminée est d'environ 2 pg de Be/g de foie de souris. L'analyse est faite en état solide. Calculée pour le foie, la variation intra-échantillon est de 12 % (n=10) et la variation inter-échantillon est de 27 % (n=10). Cette méthode n'est cependant pas applicable dans le cas présent car ^{10}Be est un radio-isotope non disponible commercialement et il n'y a pas d'AMS disponible pour réaliser ce projet. Cette méthode est présentée car elle est la méthode la plus sensible recensée pour l'analyse du Be en milieu biologique (Chiarappa-Zucca et al., 2004).

Dans le cas des échantillons sanguins, une méthode proposée par Delves (1999) consiste en une dilution 1 : 20 du sang avec NH_4OH , $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{EDTA}$ et le triton X-100 pour un volume final de 10 mL. Le NH_4OH lyse les cellules rouges, le $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{EDTA}$ garde les ions métalliques en solution et le triton X-100 dissout les membranes. L'analyse se fait par ICP-MS et les étalons internes utilisés sont le Li ou

le Sc. La récupération à partir d'échantillons sanguins fortifiés en Be est de 100 % (n=4) si le Sc est utilisé comme étalon interne et de 99,8 % (n=4) dans le cas du Li. La réplicabilité moyenne est de 2,5 % et la répétabilité est de 6,0 % (n=10). La limite de détection instrumentale est de 0,2 ng/mL, calculée à partir de trois fois l'écart-type de blancs. Une autre méthode (Heitland et Köster, 2006) consiste en une dilution de 0,5 mL de sang avec le triton X-100 et le NH₄OH pour un volume final de 5 mL. L'analyse se fait par ICP-MS (avec cellule de réaction) en utilisant le terbium (Tb) comme étalon interne. La récupération du matériel de référence est de 110 %, avec une réplicabilité de 2,5 % et une répétabilité de 13,4 %. La limite de détection instrumentale est de 2,4 pg/mL.

De Boer et ses collaborateurs (2004) ont publié une méthode multi-élémentaire d'analyse du sang qui fait appel à une méthode de dilution 1 : 10 du sang avec HNO₃ et triton X-100. L'analyse se fait par ICP-MS avec simple quadripôle. L'étalon interne utilisé est le ⁷²Ge et la limite de détection rapportée est de 0,3 ng/mL, calculée à partir de trois fois l'écart-type de blancs avec une correction pour les interférences spectrales résiduelles. L'exactitude mesurée par du matériel de référence certifié est de 108 ± 12 % (n=38). Une méthode proposée par Goullé et son équipe (2005) fait état d'une préparation comparable, mais en ajoutant du butanol à la solution de dilution (avec HNO₃ et triton X-100) pour un volume final de 4 mL pour 0,4 mL de sang. L'analyse est également faite par ICP-MS et l'étalon interne utilisé est le rhodium (Rh). La limite de détection rapportée est de 0,042 ng/mL, la réplicabilité est de 2,61 % et la répétabilité est de 2,78 %.

Une autre méthode proposée par Rodushkin et son équipe (2000) analyse plusieurs éléments, dont le Be, par ICP-SFMS. La méthode de préparation proposée consiste en une digestion micro-onde de 1 mL de sang avec 1,5 mL de HNO₃ concentré pour un volume final de 10 mL. La limite de détection méthodologique obtenue en utilisant l'indium (In) comme étalon interne est de 0,014 ng/mL. L'exactitude n'a pas été calculée pour le Be et la répétabilité est rapportée comme étant meilleure que 10 %.

Parmi les méthodes recensées, il y a un manque d'informations en ce qui concerne la capacité des méthodes à solubiliser les différentes espèces chimiques de Be. En plus, les méthodes utilisant la digestion par micro-ondes ne sont pas applicables pour ce projet puisque cet appareil n'est pas disponible à l'IRSST. Il n'y a aussi pas de consensus au niveau du choix de l'étalon interne et aucune méthode applicable n'a fait l'objet d'un processus de validation rigoureux de la précision et de l'exactitude afin de s'assurer de la justesse et de la fidélité des résultats obtenus.

1.5 Objectifs de cette étude

Tel que mentionné à la section 1.3, il y a un manque à combler dans la littérature face aux développements de méthodes analytiques, ayant fait l'objet d'un processus de validation complet et rigoureux, pour étudier la distribution du Be dans des matrices biologiques.

Les objectifs principaux de l'étude sont :

- De développer et valider des méthodes ayant des limites de détection au niveau d'ultra-trace pour permettre d'analyser la faible teneur en Be dans différentes matrices biologiques ;
- D'appliquer ces méthodes sur les échantillons de souris exposées aux poussières respirables ($< 5 \mu\text{m}$) et totales de Be (métal), de BeO et de BeAl.

Les caractéristiques requises pour les méthodes développées sont :

- Que les limites de détection soit les plus basses possibles, donc avec le meilleur rapport signal/bruit;
- Que la méthode soit la plus exacte et précise possible;
- Que la méthode soit fiable et spécifique au Be;
- Que les interférences soient minimales.

Les objectifs opératoires sont :

- D'optimiser la digestion des échantillons de façon à obtenir une matrice compatible avec le système d'introduction de l'ICP-MS et à minimiser les interférences non-spectroscopiques;
- De s'assurer que la méthode de digestion solubilise complètement les différentes particules de Be utilisées (Be (métal), BeO et BeAl)
- D'optimiser l'analyse par ICP-MS de façon à obtenir la plus haute sensibilité et stabilité possible;
- D'évaluer l'étalon interne le plus compatible avec les méthodes développées;
- De corriger les effets d'interférences causées par l'utilisation de H₂SO₄;
- De valider chaque méthode développée selon les critères du guide de l'IRSST (IRSST, 2006a), qui s'inspire d'organismes internationaux reconnus tel que NIOSH, ISO, OSHA et le CEAEQ.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Provenance et conservation des échantillons biologiques

2.1.1 Animaux exposés aux poussières de béryllium

Les échantillons dont l'analyse requiert le développement d'une méthode analytique proviennent de souris mâles (C3H/HeJ) âgées de neuf semaines (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME), qui ont été exposées aux fines particules de Be. Des études récentes démontrent que la souris est un modèle animal ressemblant à l'humain, du point de vue de la BC, de l'influx de lymphocytes T CD4⁺ dans les poumons, de la sensibilisation des lymphocytes T au Be, de l'inflammation interstitielle et de la formation de granulomes (ASTDR, 2002).

Ce mémoire fait partie d'un projet global ayant comme titre l'«Évaluation de la toxicité du Be en fonction de la forme chimique et de la taille des particules» (Zayed et al., 2004). Le projet global se base sur l'hypothèse principale que «les différentes formes chimiques de Be et les morphologies variables de ses particules ne représentent pas le même risque potentiel». Une conclusion souhaitée du projet est de démontrer que la norme devrait tenir compte de la forme chimique et de la taille des particules de Be.

Pour se faire, les souris ont été exposées au laboratoire d'inhalation de l'Université du Québec à Montréal. Séparées en groupe de 35 individus, les souris ont été exposées durant quatorze jours, à raison de six heures par jour, pendant trois semaines. Chaque groupe était exposé à une des particules de taille (respirable (< 5 µm) et totale) et de nature (Be (métal), BeO et BeAl) différentes. L'exposition

aux poussières sèches était à un niveau cible de $250 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de Be. Cette concentration étant nécessaire pour observer une augmentation de l'activité des cellules T dans le court laps de temps d'exposition au Be (Stiefel et al., 1980). Après sacrifice des souris, les organes (foie, poumon, rate et reins) et le sang sont prélevés et envoyés au laboratoire de l'IRSST dans le but d'être analysés selon les méthodes développées dans ce mémoire. Le tableau 2.1 présente les données relatives à l'exposition des souris.

Tableau 2.1 : Données concernant l'exposition des souris

<i>Nature des particules</i>	<i>Taille des particulesⁱ (μm)</i>	<i>Concentration de l'expositionⁱⁱ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)</i>
Be (métal)	4,1 ⁱⁱⁱ	285 ± 57
	1,5 ^{iv}	252 ± 64
BeO	0,4 ^{v, vi}	268 ± 47
	0,4 ^{v, vii}	247 ± 29
BeAl	6,49 ⁱⁱⁱ	276 ± 35
	4,37 ^{iv}	242 ± 45

ⁱ : Diamètre moyen aérodynamique

ⁱⁱ : Mesuré par ICP-MS

ⁱⁱⁱ : Dans ce mémoire, ces particules sont nommées : « Taille totale »

^{iv} : Dans ce mémoire, ces particules sont nommées : « Taille respirable »

^v : Dû à une erreur du fournisseur, seulement une taille de particule a été utilisée, mais sur deux groupes distincts

^{vi} : Dans ce mémoire, ces particules sont nommées : « Groupe 1 »

^{vii} : Dans ce mémoire, ces particules sont nommées : « Groupe 2 »

2.1.2 Échantillons utilisés pour l'optimisation et la validation des méthodes

À moins d'indication contraire, le sang utilisé pour le développement et la validation des méthodes provient de volontaires humains non exposés au Be. Les reins (Super C, Longueuil, Qc) et les foies (Provigo, Montréal, Qc) proviennent de porcs. Les rates et les poumons proviennent de rats mâles de souche Sprague-Dawley pesant entre 150 et 200 grammes (Charles River Canada Inc., Saint-Constant, Qc). À moins d'indication contraire, les matrices utilisées pour l'optimisation et la validation des méthodes sont le rein de porc et le sang humain, puisque ces matrices étaient disponibles en quantité suffisante pour effectuer toutes les étapes.

2.1.3 Conservation des échantillons

Le sang hépariné et les organes sont conservés à $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ dans des tubes en polyéthylène, jusqu'au moment de leur digestion.

2.2 Produits chimiques

Les poudres fines de béryllium métallique (99,10 %), d'oxyde de béryllium grade UOX (99 %+) et d'alliage composé de béryllium et d'aluminium (62,3 % de Be et 37,18 % de Al, donc une formule chimique de Be_5Al) utilisées pour l'exposition des souris et pour les essais de solubilisation proviennent tous de Brush Wellman (Elmore, Ohio). Les solutions étalons de béryllium (1 000 mg/L) de grade Claritas utilisées pour les courbes d'étalonnage proviennent de Spex Certiprep (Metuchen, NJ) et celles utilisées pour les solutions de contrôle de qualité (10 mg/L) proviennent de SCP Plasma Cal (Baie d'Urfé, Qc). Le matériel de référence certifié «Seronom^{MC} Trace elements whole blood L-2» provient de Accurate chemical & scientific corp. ($5,9 \pm 0,5\text{ }\mu\text{g/L}$ en Be, Westbury, NY) et les matériels de vérification inter-laboratoire

(Lot QMEQAS07B-03 à $0,950 \pm 0,159$ µg/L en Be, lot QMEQAS06B-02 à $1,74 \pm 0,29$ µg/L en Be et lot QMEQAS06B-08 à $4,43 \pm 0,44$ µg/L en Be) proviennent de l'institut national de santé publique (INSPQ, Québec, Qc).

Les solutions nécessaires à la préparation de la solution d'optimisation journalière de l'ICP-MS (Barium 1 000 mg/L, Béryllium 1 000 mg/L, Cérium 10 mg/L, Cobalt 1 000 mg/L, Indium 10 mg/L, Magnésium 1 000 mg/L, Plomb 1 000 mg/L, Thorium, 1 000 mg/L et Uranium 1 000 mg/L) sont toutes de grade Claritas et obtenues de Spex Certiprep (Metuchen, NJ).

L'acide nitrique de grade Optima (70% m/m, Fisher Scientific, Ottawa, ON) utilisé pour les digestions, pour les solutions de dilution, pour les solutions d'étalon interne et pour les solutions de rinçage est utilisé sans aucune autre purification. C'est également le cas pour l'acide sulfurique de grade Optima (95% m/m, Fisher Scientific, Ottawa, ON) utilisé pour les digestions, pour les solutions de dilution, pour les solutions d'étalon interne et pour les solutions de rinçage lors des digestions spécifiques à BeO. L'acide perchlorique de grade «Trace metal analysis» (70% m/m) utilisé pour les digestions provient de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ). Le Triton X-100 de grade Sigma Ultra provient de Sigma- Aldrich (St-Louis, MO). Le chlorure de sodium grade ACS utilisé pour la solution physiologique provient de Fisher Scientific (Ottawa, ON). L'isopropanol grade A.C.S. utilisé pour préparer les suspensions de BeO provient de chez Fisher Scientific (Ottawa, ON). L'argon liquide utilisé pour le fonctionnement de l'ICP-MS est d'une pureté supérieure à 99,99 % (Les gaz spéciaux MEGS Inc., St-Laurent, Qc). Sauf indication contraire, l'eau utilisée lors des différentes étapes de la méthode est purifiée avec un système Milli-Q Element A-10 (Millipore, Billerica, MA).

Les produits suivants sont utilisés dans le développement de la méthode analytique, mais ne sont pas retenus dans la méthode finale : Acide chlorhydrique grade optima (35 % m/m, Fisher Scientific, Ottawa, ON), peroxyde d'hydrogène grade suprapur (30 % m/m, EMD chemicals inc., Gibbstown, NJ), «Internal standard

mix Li6 (enriched 95 %), Sc, Ge, Y, In, Tb and Bi» (10 mg/L, Spex Certiprep, Metuchen, NJ) et une solution commerciale de Sc (10 mg/L, Spex Certiprep, Metuchen, NJ).

2.2.1 Santé et sécurité relative à l'utilisation de l'acide perchlorique et du béryllium

En raison des dangers reliés à la formation possible de perchlorate dans les pièces contenant du fer (Angerer et Schaller, 2003), toutes les digestions impliquant l'utilisation du HClO_4 sont réalisées sous une hotte en plexiglas spécialement conçue pour les digestions. En plus, par souci environnemental, toutes les vapeurs acides sont traitées par jet d'une solution aqueuse basique.

Les manipulations des poussières sèches de Be doivent se faire sous une hotte avec filtration d'air HEPA. Également, l'analyste doit porter un masque avec filtre P100 et un sarrau jetable. Durant les différentes manipulations, l'air est prélevé à l'aide de cassette 37 mm avec une ouverture de 4 mm (filtre ECM (esters de cellulose mélangés)) et la concentration de Be y est déterminée par ICP-MS. Des frottis avec chiffon humide sont également effectués à des endroits stratégiques pour vérifier la contamination en Be des surfaces de travail.

2.3 Protocole des méthodes analytiques

2.3.1 Lavage, décontamination et choix de la verrerie

La verrerie est nettoyée et décontaminée selon les protocoles standards de l'IRSST (IRSST, 2006b). La verrerie est d'abord nettoyée avec un détergent, puis est rincée à l'eau déminéralisée avant d'être transférée dans des bacs contenant une solution à 20 % (v/v) HNO_3 pour une période de 12 heures, pour fins de

décontamination. La verrerie est ensuite rincée trois fois à l'eau déminéralisée. Immédiatement après utilisation, la verrerie est plongée dans une solution environ 1 % (v/v) de détergent jusqu'à son nettoyage selon les étapes énumérées précédemment.

Lorsque les ballons doivent être réutilisés pour contenir exactement la même solution étalon, ils sont rincés plusieurs fois avec une solution 5 % (v/v) HNO_3 et de l'eau. À moins d'indication contraire, toute la verrerie utilisée est en polyéthylène, sauf les béchers de 50 mL pour la digestion, qui sont en Pyrex^{MC}. Les pièces de l'ICP-MS nécessitant un nettoyage sont entretenues selon les directives de Perkin Elmer. (Perkin Elmer, s.d.)

2.3.2 Préparation des échantillons

2.3.2.1 Nettoyage et préparation des tissus

Les échantillons de tissus organiques (foie, poumon, rate et rein) sont décongelés la veille de la digestion au réfrigérateur à 4 °C. Ils sont ensuite rincés avec une solution physiologique (isotonique) de chlorure de sodium 0,9 % (m/v) et épongés délicatement avec un papier de laboratoire. Les tissus de souris sont digérés dans leur intégralité pour s'assurer qu'il n'y a pas de problème d'homogénéité dans l'organe. Puis, chaque organe est transféré et pesé (Balance AG 204, Mettler Toledo, Columbus, OH) dans un bécher pré-taré pour la digestion.

2.3.2.2 Préparation des échantillons sanguins

Les échantillons sanguins sont décongelés la veille de la digestion au réfrigérateur à 4 °C. Le volume requis (maximum de 1 mL) de sang pour la digestion est pipeté et transféré dans un bécher pour la digestion.

2.3.3 Méthode de digestion des échantillons

La première partie de la méthode requiert la destruction complète des matrices organiques et la solubilisation des particules solides avant de procéder à l'analyse. En effet, l'analyse ne peut se faire sur la matière solide selon les techniques utilisées, il est donc important d'obtenir un mélange homogène et liquide pour les étapes subséquentes d'analyse. Bien qu'il n'y ait pas d'interférence chimique sur les isotopes analysés (^9Be et étalon interne), des interférences physiques peuvent avoir lieu si la solution d'analyse est trop chargée. En effet, l'ICP-MS ne peut supporter plus de 0,5 % (Perkin Elmer, s.d.) de matières totales dissoutes pour assurer une bonne qualité des résultats. Face à ce problème, la digestion en milieu humide est avantageuse du point de vue chimique, car elle implique une destruction de la matière organique à l'aide d'un ou de plusieurs agents oxydants formant ainsi des produits de réaction rejetés dans l'air (sous forme de composés volatils tel que CO_2 , SO_2 et NO_x) donc hors de la solution d'analyse. Les métaux dissous, quant à eux, sont en solution sous la forme ionique de composés solubles pour leur analyse subséquente dans une matrice compatible avec l'ICP-MS. Cette technique est reconnue pour minimiser les pertes d'échantillon dues à leur adsorption sur les parois du bécher. Cependant, une supervision constante de la réaction est requise pour éviter une contamination inter échantillon due aux possibles éclaboussures et une attention particulière doit être portée au choix de la pureté des acides utilisés pour éviter une contamination non désirée (Angerer et Schaller, 2003). La digestion par micro-ondes est évitée car elle n'est pas assez efficace pour solubiliser complètement toutes les tailles de particule de Be (Stefaniak et al., 2006).

2.3.3.1 Essais de méthodes de digestion

Plusieurs réactifs de digestion ont été testés sur le rein de porc en suivant un protocole général. Le protocole employé est le suivant : les échantillons préparés selon 2.3.2 sont placés sous la hotte à acide perchlorique. Un volume de 6 mL de

réactifs de digestion (voir tableau 2.2 sous la colonne «réactifs de digestion») est ajouté à chacun des bécher. Les béchers sont chauffés (voir tableau 2.2 sous la colonne «température de digestion ($^{\circ}\text{C}$)») avec une agitation mécanique constante de la plaque (SCL Medtech, Montréal, Qc). Lorsqu'il y a effervescence de la solution dans les béchers, ils sont retirés de la plaque pour une période de trente minutes. Après ce délai, ils sont remis sur la plaque et la digestion continue, avec agitation mécanique constante. Si la solution dans les béchers n'est pas complètement limpide lorsqu'il reste environ 1 mL d'acide, 3 mL de HNO_3 concentré sont ajoutés aux béchers. Cet ajout est repris jusqu'à obtention d'une solution limpide. Lorsque la solution claire est obtenue, elle est laissée sous le chauffage et agitation constante pour terminer l'évaporation à sec de la solution acide. Le résidu est ensuite remis en solution avec une solution de HNO_3 1 % (v/v) et transféré dans une éprouvette jetable en polyéthylène identifiée en prenant soin de bien rincer quantitativement le bécher trois fois. L'éprouvette est ensuite jaugée à 10 mL lorsque la solution est à la température de la pièce. Au besoin, l'échantillon est filtré avec une seringue à embout filtrant (Millex-HV, hydrophilic PVDF 0,45 μm , de la compagnie Millipore, Billerica, MA) dans une autre éprouvette jetable en polypropylène (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Allemagne). Les résidus post-évaporation sont évalués qualitativement avant et après la dissolution avec 10 mL d' HNO_3 1 % (v/v).

Tableau 2.2 : Conditions de digestion à l'essai sur le rein de porc

<i>Réactifs de digestion</i>	<i>Température de digestion (°C)ⁱ</i>
HNO ₃ concentré	150
HNO ₃ / H ₂ O ₂ (4 : 1)	150
HNO ₃ / H ₂ O ₂ (5 : 2)	150
HNO ₃ / H ₂ O ₂ (5 : 1)	175
HNO ₃ / HClO ₄ (4 : 1)	150
HNO ₃ / HClO ₄ (3 : 1)	175
HNO ₃ / HClO ₄ / H ₂ SO ₄ (6 : 2 : 1)	195

ⁱ : Température à la surface de la plaque chauffante

2.3.4 Vérification de la solubilité des poudres de béryllium

2.3.4.1 Pour les poudres de Be (métal) et de l'alliage BeAl

Des quantités d'environ 100 µg de poudre fine de Be (métal) ou d'environ 140 µg de poudre fine de l'alliage BeAl sont précisément pesées sur des filtres ECM (esters de cellulose mélangés, diamètre de 37 mm et porosité de 0,8 µm, de la compagnie SKC Inc., Eighty Four, PA) avec une micro-balance (précision de ± 2 µg, Balance MT5, Mettler Toledo, Columbus, OH) et transférées dans des béchers de digestion. Une masse de rein d'environ 400 mg est ajoutée aux béchers et la procédure de digestion optimale évaluée selon la section 2.3.3.1 est effectuée. La seule exception est que l'échantillon est dilué pour se situer à l'intérieur du domaine d'application de la méthode (voir section 2.3.5.7).

2.3.4.2 Pour les poudres de BeO

2.3.4.2.1 Sans la présence de tissus

Dans le but de vérifier rapidement et efficacement plusieurs méthodes de solubilisation complète des poudres fines de BeO, qui est seulement partiellement soluble dans plusieurs mélanges acides, la pesée est simplifiée en préparant les échantillons de BeO à partir d'une suspension. Une suspension est également plus sécuritaire, car elle réduit la manipulation de poudre sèche qui représente un danger plus important pour la santé (Stefaniak et al., 2006). Pour ce faire, environ 0,13 gramme de BeO est pesé précisément directement dans un ballon de 1 L en Pyrex^{MC}. Un agitateur magnétique est ensuite ajouté après avoir complété le volume au trait de jauge avec de l'isopropanol. Il est important pour la conservation de l'échantillon de toujours agiter modérément la suspension pour éviter d'avoir un dépôt de poudre. L'utilisation de suspension dans un alcool aliphatique (propanol) pour mesurer des quantités de poudre de Be a déjà été utilisée dans la littérature (Stefaniak et al., 2006). Lors des essais de solubilisation, un volume de 1 mL de la suspension est prélevé au milieu du ballon avec une pipette volumétrique en verre de 1 mL et transféré dans un bécher de digestion. La pipette est ensuite rincée soigneusement avec de l'isopropanol dans le bécher. Les échantillons ainsi préparés sont laissés sous une cage en plexiglas durant trois jours entiers pour assurer l'évaporation complète de l'isopropanol, car le HClO₄ réagit violemment avec ce dernier (Angerer et Schaller, 2003). Les échantillons sont ensuite soumis à une des trois méthodes de solubilisation suivantes :

Méthode de solubilisation no. 1 : Sous la hotte mentionnée en 2.2.1, un volume de 6 mL d'une solution contenant trois portions de volume de HNO₃ concentré pour une portion de volume de HClO₄ concentré est ajouté à chacun des béchers. Ces derniers sont chauffés à une température de surface de la plaque comprise entre 170 °C et 185 °C avec agitation mécanique constante. Lorsque l'évaporation de la solution acide est à

quasi-sec, ajouter un autre 6 mL de la solution acide trois pour un et recommencer les étapes de chauffage. Reprendre encore une fois les étapes d'ajout et de chauffage jusqu'à évaporation complète de la solution acide. Les échantillons sont ensuite dissous avec HNO_3 1 % (v/v), transférés dans un ballon jaugé et dilués avec HNO_3 1 % (v/v) pour se situer à l'intérieur du domaine d'application de la méthode (voir section 2.3.5.7).

Méthode de solubilisation no. 2 : Sous la hotte mentionnée en 2.2.1, un volume de 6 mL d'une solution contenant trois portions de volume de HNO_3 concentré pour une portion de volume de HClO_4 concentré est ajouté à chacun des béchers. Ces derniers sont chauffés à une température de surface de la plaque comprise entre 170 °C et 185 °C avec agitation mécanique constante. Lorsque l'évaporation de la solution acide est quasi-complétée, ajouter 3 mL d' HCl concentré et chauffer les béchers jusqu'à évaporation complète de la solution acide à une température de surface de la plaque comprise entre 170 °C et 185 °C avec agitation mécanique constante. Les échantillons sont ensuite dissous avec HNO_3 1 % (v/v), transférés dans un ballon jaugé et dilués avec HNO_3 1 % (v/v) pour se situer à l'intérieur du domaine d'application de la méthode (voir section 2.3.5.7).

Méthode de solubilisation no. 3 : Sous la hotte mentionnée en 2.2.1, 1 mL de H_2SO_4 concentré et 6 mL d'une solution contenant trois portions de volume de HNO_3 concentré pour une portion de volume de HClO_4 concentré sont ajoutés à chaque bécher. Ces derniers sont chauffés à une température de surface de la plaque comprise entre 170 °C et 185 °C avec agitation mécanique constante. Lorsqu'il reste environ 1 mL dans les béchers, la solution est chauffée à une température entre 195 °C et 210 °C avec une agitation mécanique constante pour terminer l'évaporation à quasi-sec de la solution acide. Les échantillons sont

ensuite dissous avec de l'eau, transférés dans un ballon jaugé et dilués avec HNO_3 1 % (v/v) pour se situer à l'intérieur du domaine d'application de la méthode (voir section 2.3.5.7).

2.3.4.2.2 Avec présence de tissus

Des quantités d'environ 260 μg de poudre fine de BeO sont précisément pesées sur des filtres ECM avec une micro-balance (avec une précision de $\pm 2 \mu\text{g}$) et transférées dans des béchers de digestion. Une masse de rein d'environ 400 mg est ajoutée aux béchers et la procédure de digestion est réalisée selon la procédure optimale déterminée en 2.3.4.2.1. La seule exception est que l'échantillon est dilué pour se situer à l'intérieur du domaine d'application de la méthode (voir section 2.3.5.7).

2.3.5 Méthode d'analyse

L'analyse est faite par spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif (ICP-MS). L'ICP-MS a été utilisé parce qu'il est l'appareil d'analyse inorganique disponible commercialement qui offre la meilleure sensibilité analytique pour une large gamme d'éléments. Un des avantages de la torche plasma est qu'elle permet l'atomisation et ensuite l'ionisation des éléments présents dans l'échantillon (de Hoffman et Stroobant, 2005). Ainsi, les ions $^9\text{Be}^+$ et ceux de l'étalon interne seront formés, puis séparés par l'analyseur du spectromètre de masse avant d'être quantifiés par le détecteur. Le profil observé sur le spectre de masse présentera ainsi deux signaux d'intérêt bien résolus au rapport m/z de l'étalon interne et à $m/z = 9$ (^9Be). La figure 2.1 présente les différentes composantes du système utilisé. L'analyse du Be par ICP-MS présente deux défis de taille du point de vue analytique dus à la faible masse molaire et au potentiel d'ionisation élevé du Be. L'optimisation instrumentale sera donc un élément important avant d'entreprendre les analyses. Il

est reconnu dans la littérature que les limites de détection des méthodes utilisant l'ICP-MS sont jusqu'à trois ordres de grandeur meilleures que celles utilisant la spectroscopie d'absorption atomique électrothermique, donc très adéquat pour les faibles concentrations d'éléments retrouvées en milieu biologique (Begerow, Turfeld et Dunemann, 2000). L'ICP-MS est maintenant très répandu en biochimie clinique en raison de ses qualités exceptionnelles, dont sa grande sensibilité, sa capacité à doser simultanément plusieurs isotopes d'un même élément, la rapidité d'analyse et la grande étendue de sa gamme dynamique linéaire (jusqu'à huit ordres de grandeur) (Moesch, 2007).

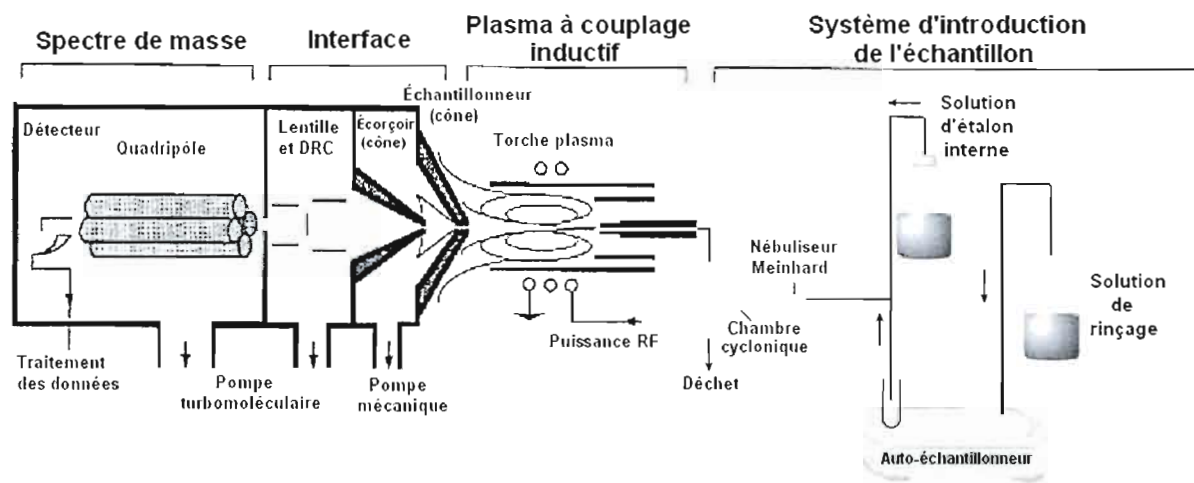


Figure 2.1 : Schéma de l'ICP-MS utilisé dans le projet (image inspirée de http://www.gso.uri.edu/icpms/how_does.htm)

2.3.5.1 Instrumentation

L'ICP-MS utilisé est le Elan DRC-II (PerkinElmer Life and Analytical Sciences Inc., Waltham, MA). Le tableau 2.3 présente les paramètres pertinents de l'appareil utilisé lors de l'étude.

Tableau 2.3 : Principaux paramètres utilisés pour l'ICP-MS

<i>Puissance RF ICP (W)</i>	1100
<i>Voltage RF (V)</i>	200
<i>Débit d'échantillonnage (mL/min)</i>	1,0
<i>Débit des gaz (L/min)</i>	
- <i>Plasma</i>	15
- <i>Auxiliaire</i>	1,2
- <i>Nébuliseur</i>	0,80-0,95
<i>Nébuliseur</i>	Meinhard en quartz
<i>Chambre d'aérosol</i>	Cyclonique en quartz
<i>Torche</i>	Deux tubes concentriques en quartz
<i>Générateur RF</i>	40 MHz, «free-running»
<i>Cône échantillonneur</i>	Platine, 1,1 mm de diamètre d'orifice
<i>Cône écorçoir</i>	Platine, 0,9 mm de diamètre d'orifice
<i>Profondeur d'échantillonnage des ions (mm)</i>	5,5
<i>Voltage du champ axial (V)</i>	225
<i>Mode de lentille</i>	Fixe sur voltage maximum du ⁹ Be
<i>Analyseur</i>	Quadripôle avec cellule DRC
<i>Cellule DRC</i>	Inactive
<i>Détecteur</i>	Détecteur à dynode discrète

2.3.5.2 Conditions d'utilisation de l'ICP-MS

Le tableau 2.4 présente les conditions d'acquisition des données spécifiques au projet pour l'appareil ICP-MS.

Tableau 2.4 : Conditions d'acquisition des données

Isotopes	⁹ Be et étalon interne
Masse molaire (AMU)	9,012 pour Be et étalon interne
Temps de séjour par AMU (ms)	500 pour Be et 150 pour l' étalon interne
Canaux MCA	1
Mode de balayage	Saut de pic
Nombre de balayage par lecture	60
Nombre de réplicat par lecture	3
Mode du détecteur	Double ⁱ

ⁱ : Détecteur basse concentration : pulsé, détecteur haute concentration : analogique

2.3.5.3 Optimisation de l'appareil avant analyse

Toutes les étapes de l'optimisation de l'appareil, sauf indication contraire, sont réalisées dans une solution de HNO₃ 0,5 % (v/v) contenant 10 µg/L de Ba et 1 µg/L des éléments suivants : Be, Ce, Co, In, Mg, Pb, Th et U. De plus, la puissance au plasma est toujours à 1100 Watts lors des différentes optimisations. Les étapes d'optimisation sont conformes à celles prescrites par Perkin Elmer (s.d.) et doivent rencontrer les spécifications recommandées par Perkin Elmer.

2.3.5.3.1 Optimisation quotidienne de l'ICP-MS

2.3.5.3.1.1 Optimisation du voltage de la lentille

Le voltage de la lentille est optimisé de façon à faire passer une droite sur les sommets des signaux pour les isotopes ⁹Be, ⁵⁹Co, ¹¹⁵In et ²³⁸U, de façon à obtenir une relation linéaire entre le voltage de la lentille et le rapport m/z. Ensuite, après toutes les étapes de l'optimisation, le voltage de la lentille est fixé à la valeur où le signal était le plus élevé pour l'isotope ⁹Be.

2.3.5.3.1.2 Optimisation de la pression d'argon au nébuliseur

La pression d'argon au nébuliseur est optimisée de façon à obtenir le rapport de signal pour les isotopes $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}/^{140}\text{Ce}$ inférieure à 3 %.

2.3.5.3.1.3 Vérification de la performance journalière

La valeur minimale du signal pour une série d'éléments doit être atteinte avant de commencer l'analyse d'une série de données. Elle doit être d'une valeur minimale de 500 cps pour l'isotope ^9Be , de 6 000 cps pour le ^{24}Mg (région des masses basses), de 30 000 cps pour l' ^{115}In (région des masses moyennes) et de 20 000 cps pour l' ^{238}U (région des masses hautes). De plus, le signal du bruit de fond doit être inférieur à 2 cps et il est évalué aux m/z de 8,5 et de 220. Également, le rapport de signal pour les isotopes $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}/^{140}\text{Ce}$ et $^{69}\text{Ba}^{++}/^{138}\text{Ba}^+$ doit être inférieur à 3%.

2.3.5.3.2 Optimisation semestrielle de l'appareil avant analyse

2.3.5.3.2.1 Optimisation de la calibration de masse et de la résolution au quadripôle

La calibration de masse et la résolution au quadripôle sont optimisées par le logiciel de façon à obtenir le signal le plus élevé et les pics les mieux résolus avec une solution 10 µg/L de chacun des isotopes suivants : ^6Li , ^9Be , ^{12}C , ^{24}Mg , ^{115}In , ^{140}Ce , ^{208}Pb and ^{232}Th . L'argon, qui est le gaz vecteur dans l'appareil, est également utilisé selon le rapport m/z correspondant à son dimère $^{76}\text{Ar}_2$.

2.3.5.3.2.2 Optimisation du détecteur double

L'optimisation de la réponse des détecteurs se fait avec une solution 250 µg/L contenant les isotopes suivants : ^6Li , ^9Be , ^{23}Na , ^{45}Sc , ^{52}Cr , ^{58}Ni , ^{59}Co , ^{60}Ni , ^{74}Ge , ^{89}Y , ^{111}Cd , ^{114}Cd , ^{115}In , ^{159}Tb , ^{208}Pb et ^{209}Bi . L'optimisation se fait au niveau de la section analogique du détecteur pour la corrélérer de façon linéaire avec la section pulsée (Perkin Elmer, s.d.). De cette façon, le détecteur couvre de 0 à 1×10^9 cps.

2.3.5.4 Rinçage de l'appareil pour éviter l'effet de matrice

2.3.5.4.1 Sans H_2SO_4

La solution de rinçage du système d'introduction de l'échantillon est composée de 4 % (v/v) de HNO_3 et de 0,01 % (v/v) de Triton X-100. Il est à noter que tout échantillon dépassant la concentration supérieure du domaine d'application (2.3.5.7) implique un rinçage supplémentaire de 300 secondes aux 90 secondes déjà prévues dans la méthode.

2.3.5.4.2 Avec H_2SO_4

La solution de rinçage du système d'introduction de l'échantillon est composée de 4 % (v/v) de HNO_3 et de 1 % (v/v) de H_2SO_4 . Il est à noter que tout échantillon dépassant la concentration supérieure du domaine d'application (2.3.5.7) implique un rinçage supplémentaire de 300 secondes aux 120 secondes déjà prévues dans la méthode.

2.3.5.5 *Choix de l'étalon interne*

2.3.5.5.1 *Solution sans H₂SO₄*

Le rapport de mélange entre l'échantillon et la solution d'étalon interne est d'environ 4 : 1 (échantillon : étalon interne) pour l'ajout en ligne au niveau du système d'introduction de l'ICP-MS. La solution de l'étalon interne est composée de 100 µg/L d'étalon interne, 1 % (v/v) de HNO₃ et de 0,004 % (v/v) de Triton X-100.

2.3.5.5.2 *Solution avec H₂SO₄*

Le rapport de mélange entre l'échantillon et la solution d'étalon interne est d'environ 4 : 1 (échantillon : étalon interne) pour l'ajout en ligne au niveau du système d'introduction de l'ICP-MS. La solution de l'étalon interne est composée de 100 µg/L d'étalon interne, 5 % (v/v) de H₂SO₄ et de 0,004 % (v/v) de Triton X-100.

2.3.5.5.3 *Détermination de l'étalon interne*

Le lithium (isotope ⁶Li), le scandium (isotope ⁴³Sc) et le germanium (isotope ⁷²Ge) ont été évalués comme étalon interne à 100 µg/L, chacun dans une solution composée de 1 % (v/v) de HNO₃ et de 0,004 % (v/v) de Triton X-100. Puisque cette solution est préparée à partir d'une solution multi-élémentaire, les éléments suivants sont également présents à 100 µg/L : Y, In, Tb et Bi. L'évaluation de l'étalon interne a été faite avec les solutions d'étalon ci-haut mentionnées (⁶Li, ⁴³Sc et ⁷²Ge) à des concentrations de Be de 1 µg/L et avec une matrice d'H₂SO₄ croissante à partir de 0 jusqu'à 12 % (v/v) en mesurant cinq réplicats par niveau de concentration d' H₂SO₄.

2.3.5.6 Choix de la méthode d'étalonnage

2.3.5.6.1 Étalonnage par calibration interne

L'étalonnage est fait en début d'analyse et est refait au besoin selon les résultats des solutions de contrôle de la qualité. Les droites d'étalonnage sont préparées à partir de solutions étalons, dans une matrice de 1 % (v/v) de HNO₃, aux concentrations suivantes : 0 µg/L, 0,05 µg/L, 0,10 µg/L, 0,20 µg/L, 0,35 µg/L, 0,50 µg/L, 0,75 µg/L, 1,00 µg/L et 2,00 µg/L. La concentration dans l'échantillon est déterminée selon l'équation suivante :

$$C_{\text{éch}} = (S_{\text{analyte}} / S_{\text{EI}}) / m \quad [1]$$

Où, $C_{\text{éch}}$ = Concentration de l'analyte en solution (ng/mL)

S_{analyte} = Signal de l'analyte

S_{EI} = Signal de l'étalon interne

m = Pente de la droite d'étalonnage (signal analyte étalon divisé par le signal de l'étalon interne en fonction de la concentration en µg/L de la solution étalon).

Puisque le logiciel soustrait automatiquement le nombre de comptes obtenu pour le blanc d'analyte, la droite d'étalonnage doit passer par l'origine du graphique. La linéarité minimale exigée pour la droite d'étalonnage est d'un coefficient de détermination (R^2) de 0,990 (IRSST, 2006a). Pour calculer la concentration de l'analyte dans le milieu biologique, la formule suivante est utilisée :

$$C_{\text{organe}} = (C_{\text{éch}} \times V_{\text{éch}}) / m_{\text{organe}} \quad [2]$$

Où, C_{organe} = Concentration dans l'organe (ng/g) ou le sang (ng/mL)

$V_{\text{éch}}$ = Volume de la solution analysée (mL)

m_{organe} = Masse de l'organe (g) ou volume de sang (mL)

$C_{\text{éch}}$ = Concentration de l'analyte en solution (ng/mL)

2.3.5.6.2 *Étalonnage par calibration interne avec correction par addition*

La méthode d'étalonnage utilisée pour les échantillons contenant H₂SO₄ est similaire à la section 2.3.5.6.1, sauf que la valeur obtenue pour la concentration de l'échantillon est corrigée par un ajout (fortifié) fait directement dans une partie aliquote de chaque échantillon et que la matrice des étalons est de 1 % (v/v) de H₂SO₄. Le volume d'ajout est minimal (50 µL dans 4950 µL) pour éviter une dilution de l'échantillon. La concentration corrigée est calculée comme suit :

$$C_{\text{corr}} = (C_{\text{avant}} / (\text{REC} / 100)) \quad [3]$$

Où, C_{corr} = Concentration corrigée de l'analyte en solution (ng/mL)

C_{avant} = Concentration avant correction de l'analyte en solution (ng/mL)

REC = Récupération de l'ajout (%), voir formule [4]

$$\text{REC} = (C_{\text{avec}} * (5000 / 4950) - C_{\text{avant}}) / (C_{\text{ajout}} * (5000 / 4950)) * 100 \quad [4]$$

Où, C_{avec} = Concentration de l'analyte en solution avec la fortification par ajout (ng/mL)

C_{ajout} = Concentration de l'analyte ajoutée dans C_{avec} (ng/mL), soit 0,5 ng/mL
(5000 / 4950) = Facteur ajouté pour tenir compte de la dilution de l'échantillon causé par le volume ajouté de la solution de fortification.

La concentration corrigée (C_{corr}) remplace ensuite $C_{\text{éch}}$ dans la formule de C_{organe} (équation [2]) pour calculer la concentration de l'analyte dans le milieu biologique.

2.3.5.6.3 *Étalonnage par ajouts dosés pour H₂SO₄*

Lors de l'optimisation de la méthode de correction la plus appropriée, la calibration par ajouts dosés a été essayée. Des échantillons de Be ayant des concentrations allant de 0 à 10 µg/L et ayant des concentrations d'H₂SO₄ allant de 0

à 5 % (v/v) ont été analysés. L'analyste ne connaissait pas les concentrations des solutions. Les échantillons ont été déterminés par deux séquences d'ajouts dosés, soit une calibration à 4 points (0 µg/L, 0,1 µg/L, 1,0 µg/L et 2,0 µg/L) et une calibration à 6 points (0 µg/L, 0,1 µg/L, 0,3 µg/L, 0,5 µg/L, 1,0 µg/L et 2,0 µg/L).

2.3.5.7 Domaine d'application

Le domaine d'application de la méthode analytique s'étend de la limite de quantification méthodologique (LQM) déterminée à la section 2.4.3.1 jusqu'à 2 µg/L (sans prendre en compte le facteur de dilution). Pour faciliter le traitement statistique des résultats, les valeurs entre LQM et la limite de détection méthodologique (LDM) sont rapportées selon le résultat obtenu. Également, les résultats en dessous de la limite de détection méthodologique seront rapportés comme étant égales à la moitié de la limite de détection méthodologique, ce qui est une façon répandue de compilation en analyse biologique (Goullé et al, 2004).

2.4 Validation des méthodes analytiques

2.4.1 Méthodes analytiques retenues

Les méthodes analytiques retenues seront le fruit du travail d'optimisation et de développement, dont les méthodes se situent à la section 2.3. Les résultats associés à ces méthodes, qui permettront la détermination des protocoles retenus, sont présentés à la section 3.1.

2.4.2 Vérification des sources de contamination

Il est important de vérifier toutes les sources possibles de contamination au Be, car elles sont reconnues comme étant l'un des facteurs principaux influençant les limites de détection en ICP-MS lors de l'analyse d'échantillons au niveau d'ultra-trace (Rodushkin, Ödman et Branth, 1999). En aucun moment une contamination en Be n'a été mesurée dans les sources mentionnées ci-dessous.

2.4.2.1 Réactifs

Tous les réactifs ont été vérifiés individuellement en quantité égale à celle utilisée pour les différentes manipulations selon la méthode d'analyse appropriée dans le but de vérifier la présence de contamination.

2.4.2.2 Matériel biologique

Tous les matériaux biologiques (sang et organe) ont été vérifiés individuellement en quantité égale à celle utilisée dans les différentes digestions selon la méthode de préparation (2.3.2), de digestion (2.3.3) et d'analyse appropriée (2.3.5). Cette vérification inclut le papier de laboratoire utilisé pour le nettoyage et la solution physiologique (chlorure de sodium 0,9 % (m/v)), qui est d'ailleurs vérifiée avant chaque analyse impliquant des organes. En ce qui concerne les souris exposés, se reporter à la section 2.5.

2.4.2.3 Filtre ECM

Dix filtres du même lot utilisé ont été digérés selon la méthode de digestion appropriée et analysés selon 2.3.5 pour déterminer leur contamination possible en Be.

2.4.2.4 Seringue filtrante

Cinq seringues filtrantes du même lot utilisé ont été remplies de 10 mL de HNO₃ 1 % (v/v). La solution filtrée dans une éprouvette en plastique a été analysée selon 2.3.5 pour déterminer une contamination possible en Be.

2.4.3 Validation des méthodes optimales retenues

Les méthodes analytiques sont validées selon le protocole standard de l'IRSST (IRSST, 2006a), qui tient comme sources OSHA (2003), NIOSH (Kennedy et al., 1994), le CEAEQ. (2002) et deux autres sources indépendantes (Bartley, 2004; Taylor, 1987). Les matrices utilisées pour la validation sont le rein de porc et le sang humain.

2.4.3.1 Évaluation des limites de détection et quantification

La LDM représente la plus basse concentration produisant un signal détectable pour un échantillon ayant suivi toutes les étapes de la méthode. Un signal détectable est un signal qui est statistiquement distinct de celui produit par un échantillon qui ne contient pas de Be (un blanc) dans les mêmes conditions expérimentales. Quant à elle, la limite de quantification de la méthode (LQM) représente la concentration

minimale pouvant être déterminée par la méthode d'analyse. (CEAEQ, 2002; IRSST, 2006a)

Les limites de détection sont déterminées à partir de l'analyse de la variation des résultats pour le Be de dix répliqués du même échantillon sur une même série de données. L'échantillon doit être traité et analysé selon la méthode analytique retenue (voir 3.1.5.1 pour la méthode A (sans H₂SO₄) et 3.1.5.2 pour la méthode B (avec H₂SO₄)) et la concentration de Be dans cet échantillon doit se situer dans un ratio entre quatre et dix fois la limite de détection pour s'assurer de ne pas surestimer ou sous-estimer la limite de détection (CEAEQ, 2002).

La limite de détection est définie comme étant trois fois la valeur de l'écart-type des concentrations (d'une solution dont la concentration est près de la limite de détection) de dix répliqués. Dans le cas de la limite de quantification, la valeur de l'écart type des concentrations de dix répliqués est multipliée par un facteur de dix.

Pour établir efficacement la limite de détection, la démarche de validation comporte la détermination d'un ratio de conformité R, voir équation [5]. Ainsi, la détermination de la LDM est jugée valide si la valeur de R est située entre 4 et 10. Cependant, une valeur de R inférieure à 4 signifie que la valeur de LDM obtenue est statistiquement plus basse que la valeur de LDM réelle. Dans le cas d'une valeur de R supérieure à 10, la limite de détection obtenue est statistiquement plus élevée que la limite de détection réelle (CEAEQ, 2002).

$$R = \frac{\bar{X}}{LDMo} \quad [5]$$

où, R= Ratio de conformité

\bar{X} = Concentration moyenne pour les 10 répliqués servant à établir la LDM

LDMo = Limite de détection obtenue pour la méthode

2.4.3.2 Évaluation de la réplicabilité

La réplicabilité est une mesure de la variation des résultats pour des échantillons traités de la même façon à l'intérieur d'une même séquence d'analyse, c'est-à-dire que les échantillons doivent être analysés le même jour, par le même analyste et en utilisant le même instrument. La réplicabilité est évaluée par l'analyse de six réplicats de rein pour chacune des quatre concentrations en Be suivantes (après dilution): 0,1 µg/L, 0,5 µg/L, 1,0 µg/L, 1,5 µg/L. La valeur maximale admise pour la réplicabilité est de 10 %. La formule mathématique pour calculer la réplicabilité est la suivante (IRSST, 2006a) pour un niveau de confiance de 95 % :

$$\text{Réplicabilité}(\%) = t_{\text{student}} \left(\frac{CV_{\text{moyen}}}{\sqrt{n}} \right) * 100 \quad [6]$$

Où, t_{student} = Valeur selon la table de student pour un niveau de confiance de 95%.

CV_{moyen} = Coefficient de variation moyen entre les niveaux de concentration

n = Nombre total de mesures sur tous les niveaux de concentration

Ce calcul est valide pour une probabilité bilatérale, donc l'écart est de chaque côté de la distribution normale (sous forme de cloche). Cette spécification est importante pour le choix de la valeur de t_{student} dans la table.

2.4.3.3 Évaluation de la répétabilité

La répétabilité est une mesure de la variation des résultats pour des échantillons traités de la même façon à l'intérieur de séquences d'analyse différentes, c'est-à-dire que les échantillons doivent être analysés en variant au moins un des paramètres suivants : la journée d'analyse, l'analyste ou l'instrument. La répétabilité est évaluée par l'analyse de six réplicats de rein pour chacune des quatre concentrations en Be

suivantes (après dilution): 0,1 µg/L, 0,5 µg/L, 1,0 µg/L, 1,5 µg/L. Pour chaque série de données, deux analystes ont procédé à l'analyse de trois séries de réplicats chacun à des journées différentes. La répétabilité obtenue ne doit pas être une valeur excédant les 10 %. La formule mathématique pour calculer la répétabilité est la suivante (IRSST, 2006a) pour un niveau de confiance de 95 % :

$$\text{Répétabilité}(\%) = t_{\text{student}} \left(\frac{CV_{\text{moyen}}}{\sqrt{n}} \right) * 100 \quad [7]$$

Où, t_{student} = Valeur selon la table de student pour un niveau de confiance de 95 %

CV_{moyen} = Coefficient de variation moyen entre les niveaux de concentration

n = Nombre total de mesures sur tous les niveaux de concentration

Ce calcul est valide pour une probabilité bilatérale, donc l'écart est de chaque côté de la distribution normale (sous forme de cloche). Cette spécification est importante pour le choix de la valeur de t_{student} dans la table.

2.4.3.4 Évaluation des incertitudes

L'incertitude analytique (déterminée selon ISO (1992) et Taylor et Kuyatt (1994)) est calculée en prenant en considération toutes les étapes, soit de la mesure de la quantité d'échantillon jusqu'au résultat fourni par l'appareil. Sont inclus dans le calcul (voir formule [8]) toutes les étapes de la préparation et d'analyse, en prenant soin d'inclure la variation des valeurs entre les journées et les analystes. L'incertitude analytique étendue (voir formule [9]), quant à elle, est également calculée selon ISO, mais en exécutant la détermination du facteur de couverture k selon une méthode dérivée par Bartley (2004). En effet, cette modification à la méthode ISO implique que le facteur k est déterminé à partir du nombre de degré de liberté et de la distribution χ^2 pour un niveau de confiance de 95 % (IRSST, 2006a).

Formule pour l'incertitude analytique (CV_A) en % à partir de série de données :

$$CV_A = \left[\sqrt{\left(\sqrt{\frac{CV_1 + CV_2 + CV_3 + CV_4}{h}} \right)^2 + (u_{qte})^2} \right] * 100 \quad [8]$$

Où, CV_i = Coefficient de variation des résultats pour un niveau de concentration donné i ($i= 1, 2, 3$ ou 4)

h = Nombre de niveaux de concentration

u_{qte} = Incertitude sur la quantité mesurée avec la balance (organe) ou une pipette (sang)

Selon cette formule, toutes les étapes du processus sont prises en compte, soit de la préparation jusqu'au dosage en prenant soin d'inclure l'incertitude due à la détermination de la quantité d'échantillon. Des échantillons similaires au calcul de la répétabilité sont utilisés.

Formule pour l'incertitude analytique étendue (U_{anal}) :

$$U = k * CV_A \quad \text{et} \quad k = \sqrt{\frac{DL}{\chi^2}} * V_{LNS} \quad [9]$$

Où, DL = Nombre de degré de liberté correspondant à la série servant à établir l'incertitude

χ^2 = Valeur de la table de χ^2 à 95% selon le nombre de degré de liberté

V_{LNS} = Valeur d'une variable aléatoire pour un niveau de confiance de 95 % suivant une loi normale standard (centrée réduite), donc une valeur de 1,96 pour une série bilatérale.

2.4.3.5 *Évaluation de la justesse*

L'évaluation de la justesse représente l'exactitude de la méthode sur un matériel de référence par rapport à sa valeur certifiée. N'ayant pas d'autre matériel disponible que le sang Seronorm^{MC} (voir section 3.2.3), toutes les méthodes analytiques ont été validées en utilisant ce matériel de référence. Pour ce faire, plusieurs réplicats de 1 mL de matériel de référence certifié (sang reconstitué) sont analysés selon les méthodes retenues et ce pour chaque méthode en plusieurs journées différentes.

La valeur certifiée est de $5,9 \pm 0,5$ ng/mL avec une gamme de valeurs acceptables situées entre 4,9 et 6,9 ng/mL. La justesse est le pourcentage de récupération atteint en comparaison à la valeur vraie.

2.4.3.6 *Effet de l'entreposage des échantillons*

La stabilité des échantillons est évaluée à partir d'échantillons préparés et analysés selon les méthodes retenues au premier jour (identifié comme jour 0) et les mêmes échantillons sont analysés de nouveau après une des quatre périodes suivantes : 7 jours, 14 jours, 21 jours et 28 jours. Les échantillons sont les mêmes que ceux de la réplicabilité (voir 2.4.3.2), qui fait office de valeur initiale. Entre les périodes d'analyse, les échantillons sont conservés au réfrigérateur à 6 °C. Les échantillons sont conservés, soit dans des éprouvettes jetables en polypropylène, soit dans des éprouvettes en verre, selon le cas. La récupération face au jour initial d'analyse est ensuite calculée pour chaque échantillon dans le but d'obtenir la stabilité relative moyenne pour chaque période. La solution est considérée stable si sa concentration a une variation inférieure à 10 % en comparaison avec l'analyse à la journée initiale.

2.4.3.7 Évaluation des valeurs à rejeter

Pour prendre la décision de rejeter une valeur obtenue de façon non discriminatoire, le test statistique de Grubbs est appliqué sur les séries de données obtenues (Taylor, 1987; Barnett et Lewis, 1994). Ce test calcule un facteur T et ce dernier est ensuite comparé aux valeurs du tableau de valeur T pour le rejet d'une valeur (Taylor, 1987) avec un niveau de confiance du rejet de 95% pour déterminer si la valeur est aberrante dans la série de données. La série doit être de distribution normale (voir 2.5.3.1). L'équation utilisée pour le test de Grubbs est la suivante (IRSST, 2006a et Taylor, 1987) :

$$T = \frac{|X_r - X_n|}{s} \quad [10]$$

Où, T = Facteur d'aberration de Grubbs (avec 95%)

X_r = Moyenne de la série de données

X_n = Valeur la plus grande ou la plus petite selon le cas

s = Écart-type de la série de données

Ainsi,

si $T \leq T_{\text{table}}$, la valeur obtenue n'est pas rejetée.

si $T > T_{\text{table}}$, la valeur obtenue est rejetée car elle est aberrante.

2.5 Analyse des échantillons de souris

2.5.1 Méthodes utilisées pour les échantillons provenant de souris

Les méthodes utilisées sont développées en fonction de la nature des particules auxquelles les souris ont été exposées. Il est à noter que les échantillons du groupe contrôle sont analysés selon chacune des méthodes développées (voir section

3.1.5). Les reins sont digérés par paire provenant de la même souris et le volume prélevé de sang est d'un maximum de 0,5 mL, selon la quantité disponible. Les organes sont digérés en entier car il n'est pas connu si la répartition du Be dans ceux-ci est homogène.

2.5.2 Contrôle de la qualité

Toutes les séquences d'analyse ont l'obligation d'avoir des valeurs acceptables pour les solutions de contrôle de la qualité présentées dans cette section.

2.5.2.1 Blancs de réactif de laboratoire

En plus des échantillons réguliers, trois béciers de digestion sont ajoutés à chaque série de 20 échantillons et contiennent uniquement les réactifs de digestion. Ils suivent le même parcours chimique que les échantillons.

2.5.2.2 Vérifications de l'étalonnage initial de l'instrument

Ces solutions sont des échantillons analysés immédiatement après l'étalonnage de l'instrument. Deux solutions, préparées avec une solution mère provenant d'une autre compagnie que celle servant à établir la droite d'étalonnage, sont analysées et leur concentration respective doit se situer à environ 25 % (basse VEI) et 75 % (haute VEI) de la courbe d'étalonnage. Les résultats doivent être à ± 10 % de la valeur cible et les résultats obtenus lors de l'analyse des échantillons de souris sont présentés en annexe aux tableaux A.3 (méthode A) et A.4 (méthode B).

2.5.2.3 Vérification continue de l'étalonnage

Une des solutions d'étalonnage (d'une concentration située entre 25 et 75 % du domaine d'application) est analysée à tous les 10 échantillons ou moins pour s'assurer que l'équation de la droite de calibration est toujours valide, donc qu'il n'y a pas eu de perte de sensibilité. Une re-calibration est nécessaire si la valeur est à $\pm 10\%$ de la valeur cible.

2.5.2.4 Vérification de la limite de quantification (VLQ)

La VLQ représente la mesure équivalente à la limite de quantification méthodologique et est évaluée après l'établissement de la droite d'étalonnage. La concentration mesurée doit être à $\pm 15\%$ de la valeur cible. Les résultats obtenus lors de l'analyse des échantillons de souris sont présentés en annexe aux tableaux A.3 (méthode A) et A.4 (méthode B).

2.5.2.5 Matériel de référence certifié (MRC)

Le MRC est l'analyse, en début et en fin de séquence d'analyse, du matériel de référence certifié «Serorm^{MC} Trace elements whole blood L-2». Ce matériel est la matrice la plus semblable disponible commercialement pour les échantillons à analyser. Une valeur est acceptable si elle se situe entre 4,9 et 6,9 ng/mL en Be. Les résultats sont reportés sur une charte de contrôle de la qualité (voir figure A.1 et A.2 en annexe) qui assure un suivi chronologique des valeurs obtenues.

2.5.3 Analyse statistique des données

Les séries de données recueillies, dont celles pour les échantillons de souris exposées, sont comparées entre elles selon la figure 2.2.

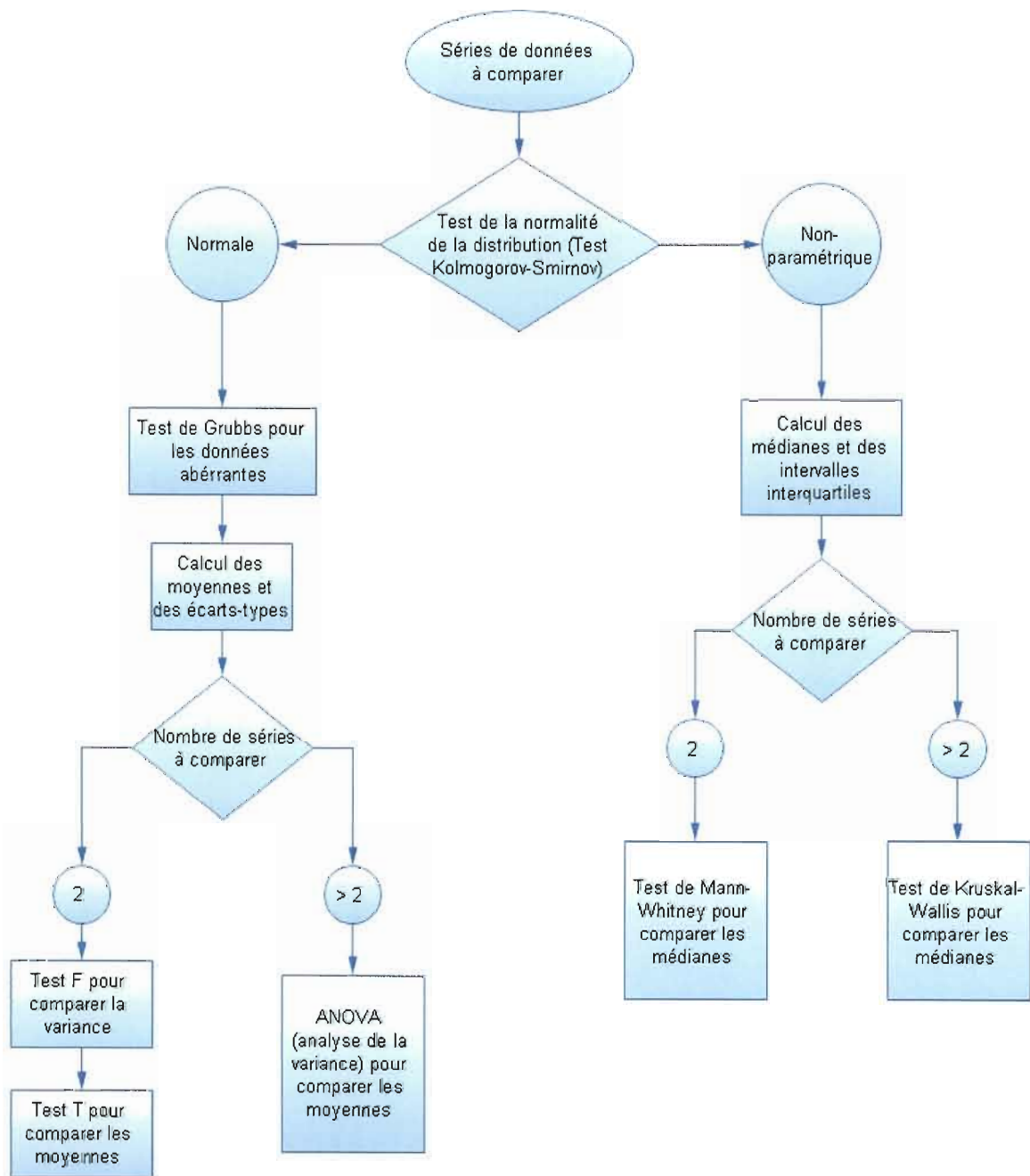


Figure 2.2 : Schéma décisionnel pour les analyses statistiques utilisées (inspiré par Miller et Miller, 2005 et Rosner, 2006)

Premièrement, la distribution des séries de données est évaluée individuellement par le test de Kolmogorov-Smirnov (voir section 2.5.3.1). Ensuite, si la distribution

est normale, le test de Grubbs (voir section 2.4.3.7), le calcul de la moyenne et de l'écart-type sont effectués. Si toutes les distributions à comparer sont normales, le test-T (voir section 2.5.3.2) ou ANOVA (voir section 2.5.3.3) est effectué selon le nombre de séries à comparer. Si la distribution est non-paramétrique, i.e. non normale, et qu'aucune transformation pour avoir une approximation de la normalité n'est possible, le calcul de la médiane et de l'intervalle interquartile sont effectués. L'étendue interquartile remplace ainsi l'écart-type comme mesure de dispersion. S'il y a présence de distribution non-paramétrique dans les séries à comparer, le test de Mann-Whitney (voir section 2.5.3.4) ou de Kruskal-Wallis (voir section 2.5.3.5) est effectué selon le nombre de séries à comparer (Miller et Miller, 2005 et Rossner, 2006). Tous les calculs statistiques sont réalisés avec le logiciel Minitab 15 (Minitab Inc., State College, PA) et la valeur de P (de l'anglais, «p-value») donné par ce logiciel est utilisée pour tirer les conclusions (confirmer ou rejeter l'hypothèse nulle, H_0) des différents tests en comparant la probabilité obtenue (P) à un niveau de confiance choisi.

2.5.3.1 Test de Kolmogorov-Smirnov

Ce test est recommandé pour évaluer la normalité d'une distribution lorsque le nombre d'échantillons est inférieur à 50. Ce test consiste à comparer la fonction de distribution cumulative obtenue pour les échantillons avec la fonction de distribution cumulative d'une distribution hypothétique normale. Un graphique contenant les fonctions hypothétiques et obtenues est tracé (valeurs de z (Voir équation [11]) en abscisse et valeurs de la fonction de distribution cumulative ($F(z)$) en ordonnée) et le logiciel de calcul vérifie la différence maximale sur l'ordonnée entre les deux fonctions. Le logiciel calcul ensuite une valeur de P statistique avec un niveau de confiance de 95% ($\alpha=0,05$) pour les hypothèses suivantes (Miller et Miller, 2005) :

H_0 = La distribution est normale (si $P \geq 0,05$)

H_1 = La distribution est non paramétrique (si $P < 0,05$)

La valeur de z (variable standardisée) pour l'axe des abscisses est calculée comme suit (Miller et Miller, 2005):

$$z = (x - \mu) / \sigma \quad [11]$$

Où, x = Valeur pour un échantillon

μ = Moyenne de la distribution

σ = Écart-type de la distribution

2.5.3.2 Test-t

Ce test simple consiste à comparer les moyennes de deux séries de distribution normale. Une valeur de t est calculée selon la formule [13] et cette dernière est comparée à la valeur de t critique provenant d'une table. Le calcul de t doit être précédé du test F (formule [12]) qui vérifie que les variances des deux séries sont comparables. Le logiciel de calcul Minitab permet également de calculer une valeur de P statistique avec un niveau de confiance de 95 % ($\alpha=0,05$) pour le test t (Miller et Miller, 2005).

Pour le test F (Miller et Miller, 2005):

$$F = s_1^2 / s_2^2 \quad [12]$$

Où s_1 et s_2 = Écart-type de la série ($s_1 > s_2$)

La valeur de F est ensuite comparée à celle d'une table, où (Miller et Miller, 2005):

H_0 = La variance est comparable entre les deux séries ($F \leq F_{table}$)

H_1 = La variance n'est pas comparable entre les deux séries ($F > F_{table}$)

Pour le test t (Miller et Miller, 2005):

$$t = \frac{|x_1 - x_2|}{s \sqrt{(1/n_1) + (1/n_2)}} \quad \text{et} \quad s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad [13]$$

Où, x_1 et x_2 = Moyenne de la série

s_1 et s_2 = Écart-type de la série

n_1 et n_2 = Nombre d'échantillon de la série

s = Écart-type groupé

Ainsi,

H_0 = Les moyennes sont égales (si $P \geq 0,05$ ou $t \leq t_{\text{table}}$)

H_1 = Les moyennes sont différentes (si $P < 0,05$ ou $t > t_{\text{table}}$)

Le logiciel Minitab permet également d'estimer le test t lorsque le test F démontre une variance inégale entre les séries, en modifiant la formule de s (écart-type commun), (Miller et Miller, 2005).

2.5.3.3 Analyse de la variance (ANOVA)

Lorsque plus de deux séries de distribution normale doivent être comparées, le test ANOVA est utilisé (tableau 2.6 et formule [14]). Il consiste à comparer les moyennes de plusieurs séries entres-elles pour vérifier s'il y a une différence significative entre ces moyennes ou si la différence observée n'est attribuable qu'aux erreurs non-systématiques. Ce test de calcul statistique assume l'homogénéité de la variance. Le logiciel de calcul Minitab permet de calculer une valeur de P statistique avec un niveau de confiance de 95 % ($\alpha=0,05$), (Miller et Miller, 2005).

Table 2.5 : Présentation des formules utilisées pour le test ANOVA
(Tiré de Miller et Miller, 2005)

Source de variation	Somme des carrés (SC)	Degré de liberté (DL)
inter-série	$\sum_i T_i^2 / n - T^2 / N$	h - 1
intra-série	SC _{total} - SC _{inter}	N - h
Total	$\sum_i \sum_j x_{ij}^2 - T^2 / N$	N - 1

Où, N = n*h = Nombre total de résultats

h = Nombre de séries

n = Nombre de résultat par séries

T_i = Somme des résultats de la série i

T = Somme de tous les résultats

x_{ij} = Valeur de la série de mesure

La valeur statistique F est ensuite calculée :

$$F = \frac{SC_{inter} / DL_{inter}}{SC_{intra} / DL_{intra}} \quad [14]$$

Où, SC = Somme des carrés

DL = Degré de liberté

Ainsi,

H₀ = Les moyennes sont égales (si P ≥ 0,05 ou F ≤ F_{table})

H₁ = Au moins une des moyennes est différente (si P < 0,05 ou F > F_{table})

2.5.3.4 Test de Mann-Whitney

Le test de Mann-Whitney est utilisé pour comparer deux séries de distributions non paramétriques. Il consiste à comparer leur médiane respective pour vérifier s'il y a une différence significative entre ces médianes. Il s'agit d'un test complexe qui consiste à trouver le nombre de résultats d'une série de données qui sont supérieurs aux valeurs des données de l'autre série. Cette comparaison sert à établir la valeur de P statistique avec un niveau de confiance de 95 % ($\alpha=0,05$), pour les hypothèses suivantes (Miller et Miller, 2005) :

H_0 = Les médianes sont égales (si $P \geq 0,05$)

H_1 = Les médianes sont différentes (si $P < 0,05$)

2.5.3.5 Test de Kruskal-Wallis

Lorsque plus de deux séries de distribution non paramétriques doivent être comparées, le test de Kruskal-Wallis est utilisé. Il consiste à comparer les médianes de plusieurs séries entre-elles pour vérifier s'il y a une différence significative entre ces médianes. Ce test compare la somme du carré des valeurs et le rang de ceux-ci selon l'équation statistique de χ^2 (voir formule [15]) avec des valeurs dans une table. Le logiciel de calcul Minitab permet ensuite de calculer une valeur de P statistique avec un niveau de confiance de 95 % ($\alpha=0,05$), (Miller et Miller, 2005).

Pour des séries A, B, C, etc. l'équation de χ^2 est :

$$\chi^2 = \frac{12}{N^2 + N} \left(\frac{R_A^2}{n_A} + \frac{R_B^2}{n_B} + \frac{R_C^2}{n_C} + \dots \right) - 3(N + 1) \quad [15]$$

Où, $N = n_A + n_B + n_C + \dots$

n_A, n_B, n_C = Nombre de mesures pour la série A, B ou C

R_A, R_B, R_C = Rang total de la série A, B ou C

Ainsi,

H_0 = Les médianes sont égales (si $P \geq 0,05$)

H_1 = Au moins une des médianes est différente (si $P < 0,05$)

CHAPITRE III

RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Optimisation et développement des méthodes

Le développement et l'optimisation ont été réalisés sur toutes les étapes, de la préparation des échantillons à leur analyse par ICP-MS.

3.1.1 Digestion des échantillons

Le tableau 3.1 présente les différents mélanges réactionnels qui ont été testés lors du développement de la partie «digestion» du projet. Ces essais ont été faits sur des quantités de reins de porc équivalentes à ce qui est utilisé dans le cas des souris exposées aux poussières, soit environ 200 mg par rein. Le rein de porc est utilisé comme matrice biologique car il est disponible dans les marchés locaux en quantité suffisante pour faire toutes les étapes de développement et de validation. Selon ce qui a été observé dans les essais préliminaires, il est l'organe à l'étude le plus ardu à traiter puisqu'il comprend des parties fibreuses difficilement digérables. L'efficacité de la digestion est évaluée de manière qualitative en observant les résidus présents dans les béchers après l'évaporation à sec et en vérifiant si ces résidus peuvent se dissoudre dans HNO_3 1 % (v/v). Une solution limpide est attendue après reconstitution des échantillons avec l'acide dilué (Angerer et Schaller, 2003). L'important, avec les résultats de cette section, est d'obtenir une digestion complète le plus rapidement possible. Une digestion incomplète pourrait résulter en des problèmes instrumentaux ou en un précipité qui pourrait entraîner le Be et ainsi affecter la justesse des résultats (Angerer et Schaller, 2003). De plus, il est connu dans la littérature qu'une simple dilution, dans le cas du sang, ne permet

pas l'analyse de grandes quantités d'échantillons, due au blocage rapide de l'injecteur de la torche de l'ICP-MS causé par les protéines dénaturées (Rodushkin et al., 2000). Le tableau 3.1 présente les différentes conditions de digestion testées selon les protocoles mentionnés en 2.3.3.1.

Tableau 3.1 : Résultats des digestions à l'essai sur le rein de porc

<i>Réactifs de digestion</i>	<i>Température de digestion (°C)ⁱ</i>	<i>Durée de la digestion (heures)</i>	<i>État de la digestion</i>
HNO ₃ concentré	150	5	incomplète
HNO ₃ / H ₂ O ₂ (4 : 1)	150	5	Incomplète
HNO ₃ / H ₂ O ₂ (5 : 2)	150	5	Incomplète
HNO ₃ / H ₂ O ₂ (5 : 1)	175	5	Incomplète
HNO ₃ / HClO ₄ (4 : 1)	150	5	Incomplète
HNO ₃ / HClO ₄ (3 : 1) ^{ii, iii, iv}	175	3,5	Complète ^{ii, iii}
HNO ₃ / HClO ₄ / H ₂ SO ₄ (6 : 2 : 1) ^{ii, v}	195	5	Complète ⁱⁱ

ⁱ : Température à la surface de la plaque chauffante

ⁱⁱ : Digestion également vérifiée sur du sang humain et sur le foie de porc

ⁱⁱⁱ : Digestion également vérifiée sur des poumons, des rates et des reins de rats

^{iv} : Mélange de réactifs retenus dans la méthode A (voir 3.1.5.1)

^v : Mélange de réactifs retenus dans la méthode B (voir 3.1.5.2)

Comme il était prévisible, la digestion utilisant uniquement HNO_3 concentré n'a pas résulté en une digestion complète (résidu post-évaporation important), car ce réactif est reconnu comme n'étant pas assez puissant pour digérer efficacement toute la matière organique en plus de former des composés nitro stables et insolubles qui affectent certainement la qualité de la digestion (Angerer et Schaller, 2003). Contrairement à ce qui était attendu, le mélange réactionnel $\text{HNO}_3 / \text{H}_2\text{O}_2$ n'est également pas assez efficace pour digérer toute la matière organique, même en procédant à deux ajouts de H_2O_2 à des moments différents. L'augmentation de la température de digestion, dans ce cas, n'a pas donné d'amélioration notable de l'état de la digestion.

Le mélange $\text{HNO}_3 / \text{HClO}_4$ n'a pas montré une digestion adéquate dans les premières conditions d'utilisation, soit pour un ratio 4 : 1 et pour une température de 150 °C. Les conditions ont donc été optimisées pour obtenir une digestion adéquate et un ratio 3 : 1 avec une température de digestion plus élevée. Ces dernières conditions ont permis d'obtenir une digestion adéquate dans un délai raisonnable. Le HClO_4 concentré est reconnu comme étant l'agent oxydant le plus puissant utilisé dans les digestions de matières organiques (Angerer et Schaller, 2003). C'est donc ces conditions qui seront utilisées pour le reste des digestions. Il est à noter qu'un ajout supplémentaire de H_2SO_4 concentré est requis dans le mélange réactionnel pour traiter les particules de BeO de manière efficace (voir section 3.1.2.2). Contrairement à tous les autres acides mentionnés qui jouent le rôle d'agent oxydant, le H_2SO_4 prend plutôt le rôle d'agent de solubilisation. Puisque le H_2SO_4 concentré a un point d'ébullition élevé (339 °C), l'azéotrope formé a un point d'ébullition plus élevé qu'avec la méthode sans H_2SO_4 et la réaction peut ainsi avoir lieu à des températures plus élevées pour permettre un temps d'évaporation plus court. Le cas de H_2SO_4 sera discuté plus en détail à la section 3.1.4.

Les méthodes de digestion développées ressemblent à celles utilisées par le NIOSH (1994) et par Verma et ses collaborateurs (2003). En effet, la méthode sans H_2SO_4 utilise le même mélange d'acides que Verma, tandis que la méthode avec

H₂SO₄ utilise un mélange 6 : 2 : 1 (v/v/v) HNO₃ : HClO₄ : H₂SO₄, plutôt que le mélange 3 : 1 : 1 (v/v/v) HNO₃ : HClO₄ : H₂SO₄ proposé dans la méthode NIOSH 8005. Cependant, la comparaison entre ces méthodes n'est valide que pour la préparation des échantillons et l'analyse est différente en plusieurs points.

3.1.2 Solubilité des poudres de béryllium

Pour assurer des résultats exacts, il est important d'assurer une solubilisation complète des poudres. D'ailleurs, il est connu dans la littérature que le Be et ses composés ne sont pas biotransformés dans l'organisme (WHO, 2001), donc possiblement présents sous la même forme chimique que dans les poudres fines utilisées. Si la forme inorganique des particules est dissoute et que la matière organique est détruite (tel que démontré en 3.1.1), l'analyse devrait tenir compte de la totalité du Be présent. La section 3.1.2.1 présente les résultats pour Be (métal) et BeAl selon la méthode de digestion HNO₃ / HClO₄ (3 : 1) et la section 3.1.2.2 présente les résultats pour BeO, qui, comme il le sera démontré subséquemment, nécessite une attention particulière.

3.1.2.1 Be (métal) et BeAl

Étant donné la grande solubilité des poudres de Be (métal) et BeAl dans les mélanges d'acides concentrés (Stefaniak et al., 2006), les tests ont été faits directement en présence d'organe (voir section 2.3.4.1) pour confirmer les taux de récupération attendus et le tableau 3.2 en présente les résultats.

Tableau 3.2 : Solubilisation de poudres de Be (métal) et BeAl avec la méthode de digestion HNO₃ / HClO₄ (3 : 1) en présence d'un échantillon de rein

<i>Espèce chimique</i>	<i>Récupération de Be (%)</i>
Be (métal)	103 ± 2 % (n=11) ⁱ
BeAl	100 ± 4 % (n=11) ⁱⁱ

ⁱ : masse moyenne de 200 µg de Be (métal) (équivalent de 198 µg en Be selon pureté fournie)

ⁱⁱ : masse moyenne de 230 µg de BeAl (équivalent de 143 µg en Be selon pureté fournie)

Comme il était attendu, ces deux formes chimiques de Be se solubilisent très bien dans le milieu acide de digestion, avec des taux de récupération avoisinant les 100%. Malheureusement, les récupérations obtenues dans les matrices biologiques par ces tests ne peuvent être confirmées sans aucun doute, car il n'existe aucun matériel de référence certifié de particule de Be solide (Stefaniak et al., 2006).

3.1.2.2 BeO

Il est connu dans la littérature que les particules de BeO formées à haute température (celles utilisées lors de l'étude) se solubilisent seulement en condition particulière (Stefaniak et al., 2006). Le tableau 3.3 présente les principaux tests effectués pour solubiliser BeO.

Tableau 3.3 : Solubilisation de poudre de BeO avec différentes méthodes

<i>Mélange réactionnel</i>	<i>Matrice</i>	<i>Récupération de Be (%)</i>
Une attaque HNO ₃ / HClO ₄ (3 : 1)	Filtre ECM	75 ± 9 % (n=6) ^{iv}
Trois attaques HNO ₃ / HClO ₄ ⁱ	Sans filtre	81 ± 4 % (n=12) ^v
HNO ₃ / HClO ₄ et HCl ⁱⁱ	Sans filtre	77 ± 3 % (n=12) ^v
HNO ₃ / HClO ₄ et H ₂ SO ₄ ⁱⁱⁱ	Sans filtre	97 ± 3 % (n=5) ^v
HNO ₃ / HClO ₄ et H ₂ SO ₄ ⁱⁱⁱ	Filtre ECM + Organe	99 ± 2 % (n=12) ^{vi}

ⁱ : méthode de solubilisation no. 1 (section 2.3.4.2.1)

ⁱⁱ : méthode de solubilisation no. 2 (section 2.3.4.2.1)

ⁱⁱⁱ : méthode de solubilisation no. 3 (section 2.3.4.2.1), **méthode retenue**

^{iv} : masse moyenne d'environ 250 µg de BeO (équivalent de 90 µg en Be)

^v : masse d'environ 265 µg de BeO (équivalent de 96 µg en Be) provenant de suspension mise directement dans les bécher

^{vi} : masse moyenne d'environ 260 µg de BeO (équivalent de 94 µg en Be)

Parmi les différents mélanges réactionnels essayés selon le tableau 3.3, seulement le mélange avec H₂SO₄ concentré parvient à un résultat de récupération avoisinant les 100 %. Ceci était attendu, car selon la littérature (Ashley, Brisson et Jahn, 2006), H₂SO₄ concentré est requis pour assurer une dissolution complète des particules de BeO et ainsi obtenir des valeurs plus exactes dans les échantillons inconnus. Cependant, l'acide fluorhydrique aurait également pu être utilisé, selon Ashley et ses collaborateurs (2006), mais son utilisation aurait causé des problèmes d'incompatibilité avec les pièces en verre de l'ICP-MS. Il est à noter que dans le but d'accélérer la digestion, le volume de H₂SO₄ concentré a été diminué de moitié lors des tests finaux en présence d'organe et les taux de récupération (99 ± 2 %) se sont révélés très satisfaisants.

3.1.3 Analyse des échantillons par ICP-MS

3.1.3.1 Optimisation des conditions instrumentales

Plusieurs des conditions instrumentales sont conformes aux prescriptions du fabricant de l'appareil (Perkin Elmer, s.d.), dont le voltage RF, le débit d'échantillonnage, le débit des gaz (plasma et auxiliaire), la torche, le générateur RF, la profondeur d'échantillonnage des ions, le voltage du champ axial, l'analyseur et le détecteur (voir tableau 2.3). En ce qui concerne les autres paramètres, ils seront discutés dans les sections suivantes

3.1.3.1.1 Système d'introduction de l'échantillon

L'utilité du système d'introduction des échantillons est d'assurer que l'échantillon est sous la forme d'un aérosol. En effet, le système d'introduction est le «talon d'Achilles» de l'ICP-MS, car seulement 1 à 2 % de la quantité totale d'échantillon est envoyée vers la torche plasma sous forme d'aérosol. Le nébuliseur Meinhard^{MC}, qui est de type pneumatique concentrique, a été choisi car il offre une excellente stabilité et forme des gouttelettes très fines, ce qui augmente la sensibilité instrumentale. La taille des gouttelettes est très importante, car la torche plasma est moins efficace pour dissocier les grosses gouttelettes. Le désavantage principal de ce type de nébuliseur est qu'il se bloque facilement si la matrice utilisée est trop chargée. L'utilité de la chambre cyclonique est d'assurer que seulement les plus fines gouttelettes sont envoyées à la torche plasma en séparant les gouttes par la force centrifuge. La chambre d'aérosol cyclonique est donc utilisée car elle est reconnue pour avoir une excellente sensibilité parce qu'elle offre une efficacité d'échantillonnage très élevée (Taylor, 2001; Thomas, 2004; Perkin Elmer, s.d.).

Le débit d'argon au niveau du nébuliseur est l'élément clé lors de l'optimisation quotidienne de l'appareil ICP-MS. Le rapport de signal $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}/^{140}\text{Ce}$ est ainsi

optimisé pour avoir un résultat inférieur à 3 %. Il est connu dans la littérature que si ce rapport est respecté, le plasma devrait être assez efficace pour atomiser toute molécule et ainsi ne former que des ions libres, car le lien Ce – O se décompose très difficilement. Ceci aura comme effet de s'assurer quotidiennement que le plasma est assez performant, car un plasma échouant ce test n'aura également pas suffisamment d'énergie résiduelle pour assurer l'ionisation des éléments ayant un potentiel d'ionisation élevé, comme c'est le cas pour le Be. En d'autres termes, l'atteinte du bon rapport $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}/^{140}\text{Ce}$ assure que les effets de matrice causés par une perte de charge au plasma sont négligeables et ainsi éviter de «refroidir» le plasma, ce qui aurait comme effet de réduire l'efficacité d'ionisation et augmentera la formation d'ion moléculaire (McCurdy et Potter 2001; Perkin Elmer, s.d.). L'optimisation de ce paramètre est importante à un point tel qu'un débit d'argon trop faible au niveau du nébuliseur (rapport $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}/^{140}\text{Ce}$ trop bas) aura comme effet de réduire significativement la sensibilité en apportant moins d'échantillon vers la torche et en encourageant la formation d'ions doublement chargés (Perkin Elmer, s.d.).

3.1.3.1.2 Plasma à couplage inductif

La torche plasma est le lieu de génération des ions, qui seront ensuite analysés. Le plasma formé doit avoir assez d'énergie pour ioniser les analytes présents, mais sans avoir une énergie trop élevée pour ioniser les atomes à leur deuxième potentiel d'ionisation. Ce paramètre est vérifié quotidiennement par le rapport $^{69}\text{Ba}^{++}/^{138}\text{Ba}$ avant chaque analyse. Le baryum est utilisé car il est reconnu pour avoir le potentiel de deuxième ionisation le plus faible des éléments et il est facilement atteignable dans les conditions d'utilisation d'un ICP-MS (Perkin Elmer, s.d.; Taylor, 2001). En ce qui concerne la méthode $\text{HNO}_3 / \text{HClO}_4$ (3 : 1), la puissance RF au plasma est ajustée selon les spécifications du manufacturier. Il est à noter d'autres puissances RF ont quand même été essayées, mais sans différence significative sur les résultats obtenus. Cependant, puisque la dissolution de BeO requiert l'utilisation

d' H_2SO_4 concentré, qui est un acide non conventionnel en ICP-MS, une optimisation est nécessaire et elle est présentée à la figure 3.1.

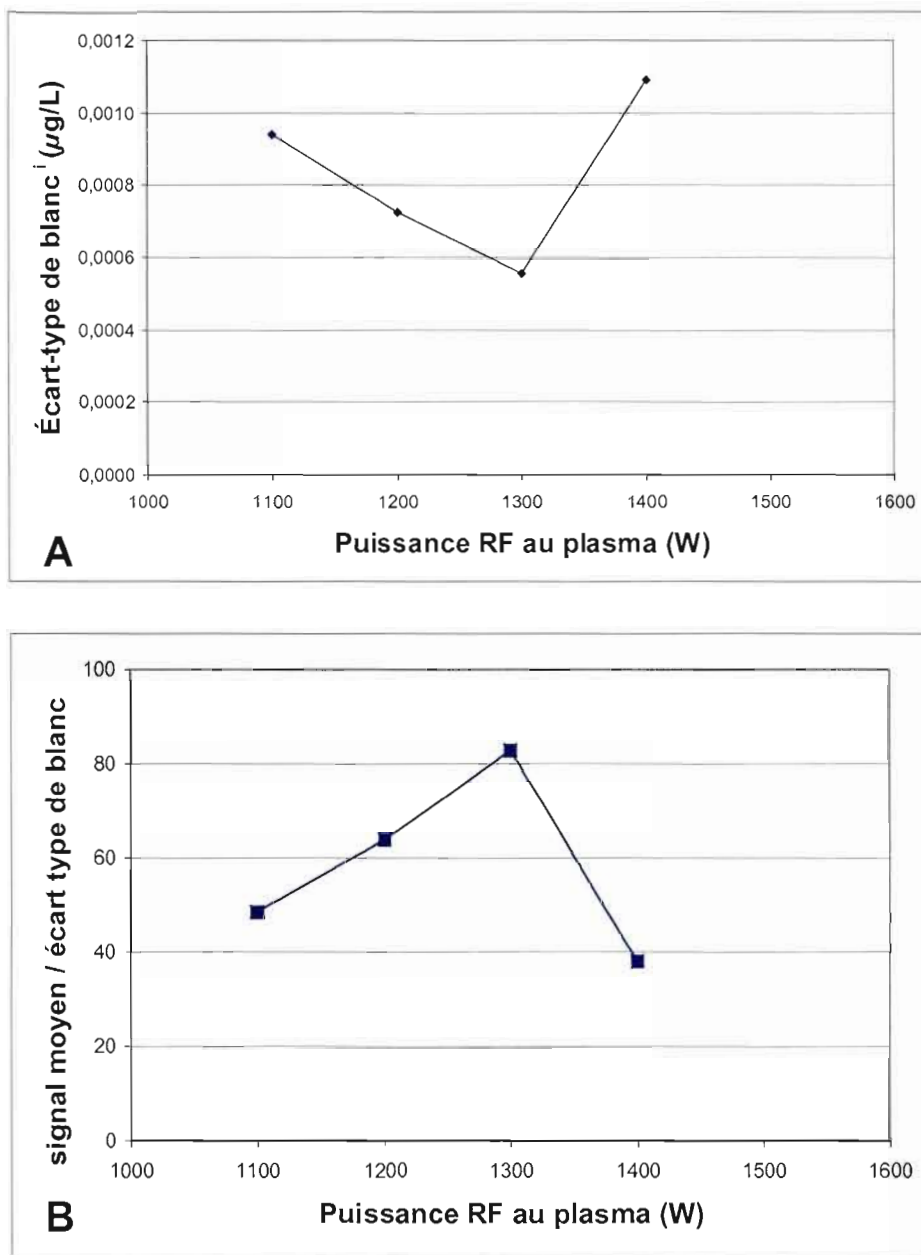


Figure 3.1 : Optimisation de la puissance RF au plasma en présence d'acide sulfurique (A) optimisation de la limite de détection. (B) optimisation de la performance analytique

ⁱ: Correspond à l'écart-type de la concentration mesurée en µg/L sur dix blancs (reins digérés avec HNO_3 / HClO_4 / H_2SO_4 (6 : 2 : 1) et ne contenant pas de Be)

Cette optimisation (figure 3.1A) a été réalisée avec des échantillons de reins digérés avec $\text{HNO}_3 / \text{HClO}_4 / \text{H}_2\text{SO}_4$ (6 : 2 : 1) et l'objectif est d'obtenir le meilleur (le plus faible) écart-type de la concentration entre plusieurs réplicats identiques selon la puissance RF au plasma. La puissance de 1300 Watts correspond donc à ce point et cette valeur est utilisée pour les échantillons traités avec $\text{HNO}_3 / \text{HClO}_4 / \text{H}_2\text{SO}_4$ (6 : 2 : 1). Il faut quand même garder en tête que la puissance au plasma a une influence beaucoup moins importante que le débit d'argon au nébuliseur et que ce dernier doit être optimisé de façon quotidienne (Perkin Elmer, s.d.).

En ce qui concerne la courbe obtenue, les valeurs pour les écarts-types élevés à des puissances RF inférieures à 1300 W sont probablement causées par la stabilité du plasma en présence de matrices chargées, telle que H_2SO_4 . Pour les valeurs avec un écart-type élevé à des puissances RF supérieures à 1300 W, ceci pourrait être relié au fait que le bruit de fond est augmenté avec l'augmentation de la puissance RF au plasma à cause de la concentration en ions provenant de la matrice qui fait l'effet de densité de charge (voir 3.1.3.3.1). La puissance RF de 1300 W représente donc le juste milieu entre l'instabilité du plasma causée par la charge de la matrice et l'effet de densité de charge causé par la matrice.

De la même façon, la figure 3.1B présente l'optimisation du signal analytique en rapportant le meilleur rapport du signal moyen sur l'écart-type du blanc également fait sur dix mesures d'échantillon ne contenant pas de Be (blanc d'organe digéré avec HNO_3 / HClO_4 / H_2SO_4 (6 : 2 : 1)). La meilleure performance analytique est ainsi obtenu, tout comme pour la figure 3.1A, à une puissance RF au plasma de 1300 W.

3.1.3.1.3 Choix des cônes et lentille à l'interface

La majorité des utilisateurs d'ICP-MS utilise les cônes en nickel pour leurs analyses, mais, puisque H_2SO_4 est utilisé dans certaines digestions, les conditions corrosives nécessitent l'utilisation de cônes en platine. Ces cônes sont beaucoup plus coûteux, mais également beaucoup plus résistants aux conditions mentionnées (Thomas, 2004; Perkin Elmer, s.d.).

L'optimisation du voltage de la lentille en ICP-MS est une question épineuse. En effet, certains auteurs recommandent d'utiliser un voltage de lentille supérieur à la valeur de l'optimisation, d'autres d'utiliser un voltage inférieur, d'autres un voltage égal à la valeur d'optimisation. Certains recommandent même de n'utiliser aucun voltage sur la lentille (Stewart et Olesik, 1999). Puisque la matrice est le principal responsable des pertes de signal (interférences) et que l'effet de densité de charge (voir section 3.1.3.3.1) a lieu à l'interface, il a été proposé par une équipe de chercheur (Wang et al., 1990) d'optimiser la lentille dans la matrice analytique de façon à obtenir le signal le plus élevé pour l'analyte d'intérêt. Cette stratégie a été évaluée et il a été observé que le voltage obtenu dans des échantillons de matrices digérées selon les méthodes appropriées est similaire à celui obtenu dans la solution d'optimisation mentionnée en 2.3.5.3. La solution d'optimisation semble donc un choix approprié dans l'optimisation quotidienne du voltage de la lentille sur l'analyte ^9Be , optimisation nécessaire car le voltage augmente de façon significative selon son utilisation.

3.1.3.1.5 Analyse des ions

Il est important de mentionner qu'aucune interférence de type spectrométrique n'est présente sur les isotopes ^9Be et ^6Li dans les conditions expérimentales utilisées, ce qui aura comme effet de simplifier l'analyse des ions en se concentrant uniquement sur les paramètres pouvant améliorer l'écart-type de la concentration entre des réplicats identiques, donc le calcul de la limite de détection instrumentale. Le temps d'acquisition représente les paramètres clés (le temps de séjour par AMU et le nombre de balayages par lecture) et son optimisation est présentée à la figure 3.2.

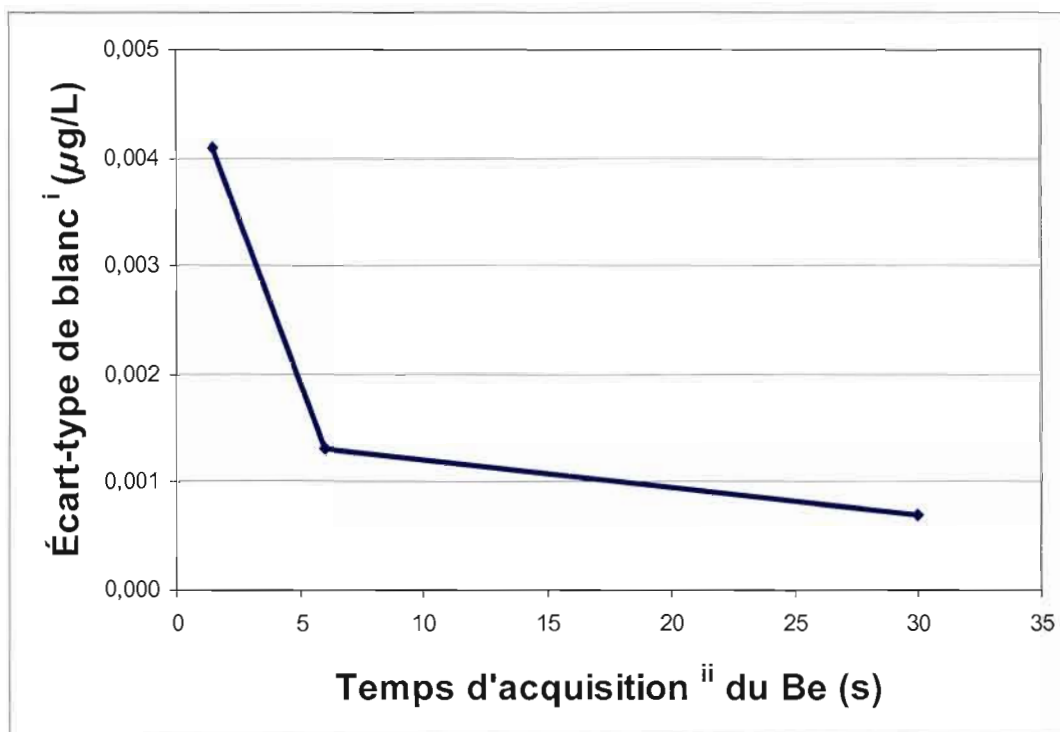


Figure 3.2 : Optimisation du temps d'acquisition des ions avec solution fortifiée 1 µg/L en Be

ⁱ: Correspond à l'écart-type de la concentration mesurée (µg/L) sur dix blancs

ⁱⁱ: Le temps d'acquisition (s) représente le temps de séjour par AMU x nombre de balayage par lecture et ce pour chacun des trois réplicats d'analyse

L'optimisation du temps d'intégration des ions vise à assurer un meilleur (le plus faible) écart-type de la concentration entre plusieurs réplicats, tout en ne dépassant pas le volume de 5 mL d'échantillon pour permettre l'analyse d'échantillon en duplicata. Les résultats démontrent une faible amélioration en passant de 6 secondes à 30 secondes. Avec un temps d'acquisition supérieur à 30 secondes, une dilution supplémentaire serait nécessaire et ne ferait qu'augmenter la quantité minimale de Be pouvant être quantifiée dans les matrices biologiques. Le temps d'intégration de 30 secondes est donc celui utilisé, car il n'est pas non plus possible d'avoir un volume inférieur à 10 mL pour des considérations expérimentales et pour éviter que la concentration en matière dissoute soit trop élevée. En décortiquant le temps d'acquisition, trois paramètres pouvant être individuellement traités en sont tirés. Premièrement, les temps de séjour pour ^9Be et ^6Li sont différents. En effet, puisque ^6Li est toujours à concentration élevée (100 $\mu\text{g/L}$ initialement), il est possible de l'analyser pour période moins longue tout en obtenant un résultat adéquat. Ainsi, l'isotope de concentration moindre (^9Be) influencera le plus la sensibilité et doit donc être analysé plus longtemps. Puis, pour améliorer la sensibilité, le nombre de balayage par isotope doit être le plus grand possible, tout en évitant d'avoir moins de trois réplicats de lecture pour la validité statistique minimale. (Perkin Elmer, s.d.; Thomas, 2004)

3.1.3.1.6 Évaluation du temps de rinçage (effet mémoire)

L'effet mémoire correspond à l'observation d'une concentration d'analyte détectable provenant de l'échantillon précédent dans la séquence d'analyse et est causé par la déposition d'échantillons sur les cônes de l'ICP-MS ou par l'accumulation de résidu contenant l'analyte dans le système d'introduction (nébuliseur ou chambre cyclonique) ou d'ionisation (torche et son injecteur) de l'ICP-MS (Perkin Elmer, s.d.). Cet effet a été évalué pour les deux méthodes retenues à deux niveaux de concentration. Premièrement, l'effet mémoire du premier niveau est vérifié à chaque séquence d'analyse avec un blanc d'analyte (dans 1 % HNO_3) lu

directement après le dernier point de la droite d'étalonnage (2 µg/L) et aucun effet mémoire n'a jamais été observé, c'est à dire que la concentration de Be dans le blanc était inférieure à la LDM. Le deuxième niveau est évalué avec un blanc d'analyte (dans 1 % HNO₃) lu directement après le passage d'une solution 20 µg/L en Be (soit dix fois la limite supérieure du domaine d'application) et, également dans ce cas, aucun effet mémoire n'a été détecté avec dix réplicats par méthode, c'est à dire que la concentration de Be dans le blanc était inférieure à la LDM. Le deuxième niveau requiert cependant un rinçage supplémentaire de 300 secondes. Il est donc possible de conclure que, dans les conditions expérimentales utilisées, l'effet mémoire n'a pas été observé.

3.1.3.3 Choix et évaluation de l'étalon interne

3.1.3.3.1 Choix de l'étalon interne

Le rôle de l'étalon interne est de compenser pour les interférences physiques pouvant affecter le signal de l'analyte d'intérêt. Ces interférences physiques affectant la réponse analytique sont, entre autres, la tension de surface du mélange, la viscosité de l'échantillon, les différences dans la formation et la sélection des gouttelettes au niveau de l'aérosol formé, la température de l'échantillon, le blocage partiel du nébuliseur, les effets de matrice, etc. Il doit également corriger les dérives (instabilité) des lectures de l'appareil qui ont lieu à mesure que la séquence d'analyse progresse. Habituellement, pour être efficace, un étalon interne doit se comporter de façon similaire à l'analyte d'intérêt, c'est-à-dire que sa masse molaire et son potentiel d'ionisation doit être le plus rapproché de celle de l'analyte d'intérêt. Sans oublier que l'étalon interne ne doit pas déjà être présent dans l'échantillon avant son ajout, ni interférer avec l'analyte d'intérêt (Perkin Elmer, s.d.; Taylor, 2001).

Trois étalons internes ont été essayés dans le cadre de ce projet, soit le ${}^6\text{Li}$, le ${}^{72}\text{Ge}$ et le ${}^{43}\text{Sc}$. Ces étalons sont utilisés car il y a très peu d'interférence chimique significative connue pour ceux-ci (de Boer et al., 2004). Le ${}^6\text{Li}$ a été choisi puisque la masse de l'isotope utilisé est près de celle du Be (respectivement de $m/z = 6$ et de $m/z = 9$) (Montaser et Golightly, 1987). Le Ge a été sélectionné car son potentiel de première ionisation est rapproché de celui du Be (respectivement de 7,90 eV et de 9,32 eV) (Montaser et Golightly, 1987). Quant au Sc, il est l'étalon interne de choix dans une majorité de laboratoire analysant le Be, car il est permis de corriger une large gamme d'éléments de faible masse molaire dans les analyses multi élémentaires (Brisson et al., 2006).

En faisant varier la charge de la matrice, il est possible de vérifier si l'étalon interne choisi réagit de la même manière que le Be, c'est-à-dire s'il corrige les effets de matrice pouvant affecter le signal. Dans ce cas, l' H_2SO_4 est utilisé comme matrice, car il est reconnu pour engendrer beaucoup d'effets de matrice en ICP-MS (Takahashi et Youno, 2003) et qu'il doit être utilisé pour solubiliser BeO. La figure 3.3 présente les résultats obtenus pour les étalons internes vérifiés et une explication suivra aux figures 3.4 et 3.5. La section 2.3.5.5 présente les détails méthodologiques relatifs à cette figure.

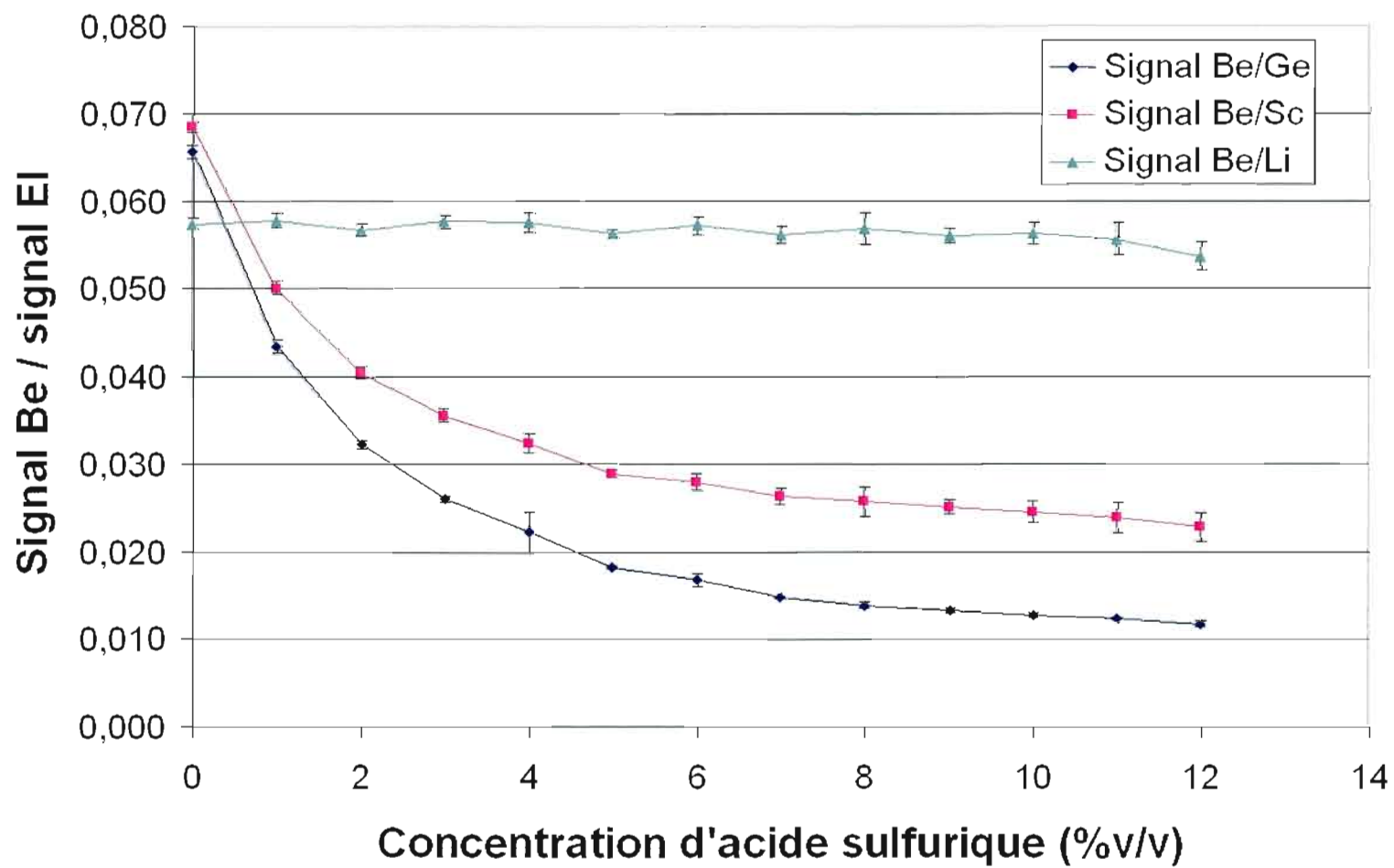


Figure 3.3 : Choix de l'étalon interne (EI) selon la charge de la matrice

La figure 3.3 indique que le signal de Be corrigé par le ${}^6\text{Li}$ (rapport Be / Li) est le seul à ne pas varier significativement en fonction de la charge de la matrice. Ceci démontre une stabilité du rapport pour cet étalon interne, qualité qui était recherchée par cette expérience. Le ${}^6\text{Li}$ sera donc l'étalon interne de choix dans le projet. De plus, à partir de la figure 3.3, il est possible d'observer que le rapport (analyte / étalon interne) varie considérablement dans le cas du ${}^{43}\text{Sc}$ et du ${}^{72}\text{Ge}$. Ceci indique que ces deux étalons internes ne seraient pas assez efficaces pour corriger le signal du Be lorsque la charge de la matrice est importante et lorsqu'elle est différente de celle des étalons servant à établir la courbe de calibration. Il serait donc préférable d'éviter l'utilisation de ces étalons internes car ils vont induire une valeur erronée lors du dosage d'échantillons réels si la matrice des échantillons est significativement différente de celle des solutions étalons. Pour expliquer ce phénomène, il faut d'abord se pencher sur le signal obtenu individuellement pour chaque isotope en cause (voir figure 3.4). La figure 3.4 sera suivie d'une explication théorique.

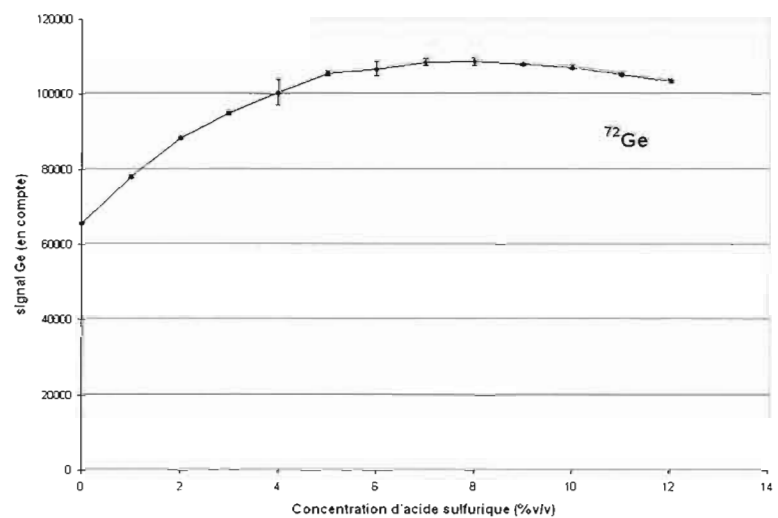
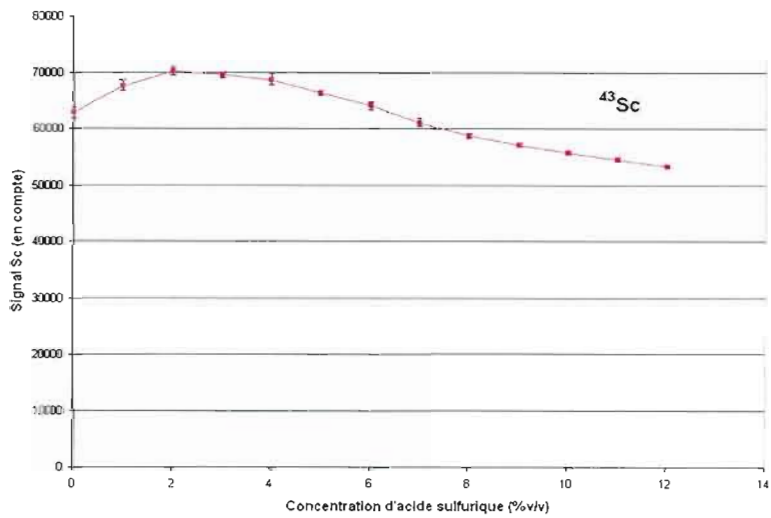
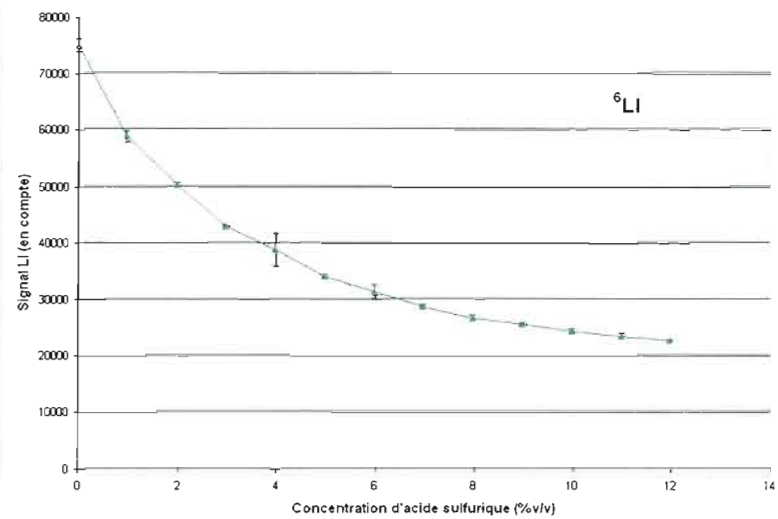
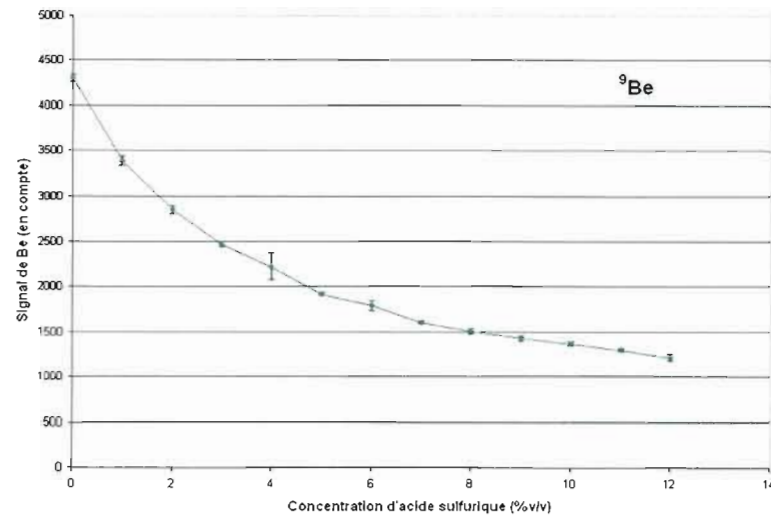


Figure 3.4 : Variation individuelle du signal des éléments selon la charge de la matrice

La figure 3.4 permet d'observer que le signal est différent dépendant de l'isotope étudié. En regardant attentivement les profils de la figure 3.4, il est possible de noter que le ${}^9\text{Be}$ et le ${}^6\text{Li}$ présentent des courbes très similaires, ce qui explique la linéarité observée à la figure 3.3 pour le rapport ${}^9\text{Be} / {}^6\text{Li}$. L'augmentation de la charge de la matrice fait baisser drastiquement les signaux de ${}^9\text{Be}$ et de ${}^6\text{Li}$, mais fait augmenter ceux de ${}^{43}\text{Sc}$ et ${}^{72}\text{Ge}$. L'augmentation pour ces deux derniers isotopes explique la non linéarité observée à la figure 3.3 pour les signaux ${}^9\text{Be} / {}^{43}\text{Sc}$ et ${}^9\text{Be} / {}^{72}\text{Ge}$. Pour expliquer le phénomène observé, l'«effet de densité de charge» est utilisé et est présenté à la figure 3.5.

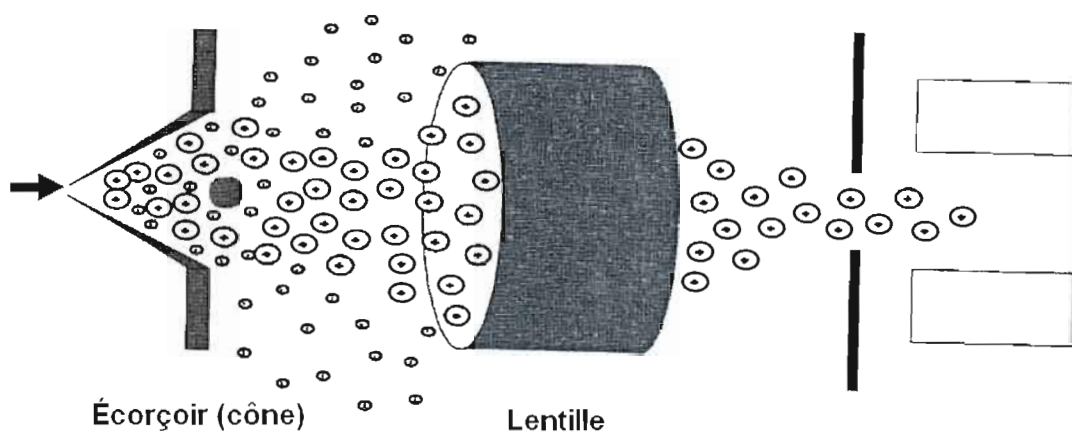


Figure 3.5 : L'«effet de densité de charge» (Source : Perkin Elmer, s.d.)

Selon le phénomène de l'«effet de densité de charge» (de l'anglais «*space charge effect*»), les ions de petites masses sont repoussés hors du faisceau d'ions par les ions de masses plus élevées avant leur entrée dans la lentille (zone sous pression du vide), car les ions sont tous chargés positivement et la loi de Coulomb stipule que deux charges de même signe se repoussent. Les ions de masse plus élevées (avec une énergie cinétique plus élevée) repoussent d'une force plus grande les ions de petites masses. La fraction des petits ions dans le faisceau sera donc diminuée et ainsi le signal apparent sera également diminué (Busch, 2004; Stewart et Olesik, 1999). Ceci explique pourquoi le signal de ${}^9\text{Be}$ et de ${}^6\text{Li}$ chute drastiquement avec l'augmentation de la charge de la matrice, car la matrice contient alors une grande quantité d'ions (O et S) de masse supérieure à ces deux

isotopes. Comme le ^{43}Sc et le ^{72}Ge ont une masse élevée, ce phénomène n'abaisse pas leur signal avec l'augmentation de la charge de la matrice (Perkin Elmer, s.d.; Thomas, 2004).

Si le phénomène en cause aurait plutôt été la «surcharge du plasma», le ^{72}Ge aurait été un meilleur étalon interne car ce phénomène est un amenuisement du pouvoir ionisant (énergie) de la torche plasma due à une trop forte concentration de la matrice. Ainsi, l'étalon interne (^{72}Ge), ayant le potentiel d'ionisation le plus rapproché de celui de l'analyte (^9Be), aurait été favorisé pour réagir de la même manière que le Be au changement dans la matrice, phénomène qui n'a pas été observé selon la figure 3.3 (Perkin Elmer, s.d.).

3.1.3.3.2 Concentration de l'étalon interne

L'étalon interne est ajouté «en ligne», c'est-à-dire que la pompe péristaltique le transporte à la même vitesse que l'échantillon et ils sont mélangés dans un bloc de mixage en forme de «T» avant la nébulisation des gouttelettes. Cette configuration a comme avantage d'être plus rapide que l'ajout de volume d'étalon interne dans tous les échantillons et elle minimise aussi les erreurs dues au pipetage. Cependant, cette configuration implique une dilution de l'échantillon et elle ne corrige pas pour les erreurs pouvant provenir de l'étape de préparation ou de l'évaporation des échantillons avant analyse (Perkin Elmer, s.d.; Taylor, 2001).

La concentration de l'étalon interne a été optimisée à partir d'échantillons digérés avec 3 : 1 HNO_3 / HClO_4 . Les mêmes échantillons sont utilisés pour les deux concentrations (10 et 100 $\mu\text{g/L}$) dans le but d'éviter une variation provenant de la préparation des échantillons. Les résultats obtenus sont présentés au tableau 3.4.

Tableau 3.4 : Comparaison entre deux concentrations en étalon interne

<i>Matrice</i>	<i>Récupération moyenne (%) pour différentes concentrations d'étalon interne</i>	
	⁶ Li 10 µg/L	⁶ Li 100 µg/L
Aucune	97 ± 4 (n=3)	94 ± 4 (n=3)
Tissus ⁱ	96 ± 3 (n=12)	94 ± 3 (n=12)
<i>Valeur Pⁱⁱ pour le test-T pour comparer les groupes avec aucune matrice</i>		0,41
<i>Valeur Pⁱⁱ pour le test-T pour comparer les groupes avec tissus</i>		0,12

ⁱ : Organes utilisés : foie, poumon, rate et rein

ⁱⁱ : une valeur de P inférieure à 0,05 (95%) correspond à une différence significative entre les groupes comparés et inversement une valeur de P supérieure à 0,05 (95%) indique qu'il n'y a aucune différence statistique entre les groupes comparés

Cette étape a été réalisée pour les trois étalons internes à l'étude, mais seulement les résultats pour l'étalon interne retenue (⁶Li) sont présentés. Dans ce cas, il est possible d'affirmer avec un pourcentage de confiance de 95 % qu'il n'existe aucune différence significative (la valeur de P est supérieure à 0,05) entre l'utilisation de l'étalon interne (⁶Li) à une concentration de 10 µg/L et de 100 µg/L. Ainsi, il sera préféré d'utiliser une concentration plus élevée d'étalon interne dans le but de combler d'éventuelle contamination en Li. Il est à noter que de telles contaminations peuvent également être corrigées mathématiquement, tel que démontré à la section 3.1.3.3.3. Cependant, il est important de ne pas avoir une concentration d'étalon interne trop élevée, pour ne pas dépasser le nombre d'ions maximal (2×10^6 cps) du détecteur de basse concentration (pulsée), ce qui occasionnerait un changement de détecteur et ainsi augmenterait l'erreur analytique (Perkin Elmer, s.d.)

3.1.3.3.3 Interférence sur l'étalon interne

Dans les conditions utilisées pour ce projet, il n'existe qu'une source possible d'interférence sur l'étalon interne retenue (^6Li) et cette interférence est due à de possible contamination en Li dans les échantillons. En effet, l'abondance isotopique à l'état naturel du Li est de 7,5 % pour le ^6Li et de 92,5 % pour le ^7Li (Montaser et Golightly, 1987). Il est possible de corriger mathématiquement cette interférence selon les équations suivantes :

$$\text{Intensité } ^6\text{Li} = \text{intensité totale (m/z=6)} - \text{contribution de Li (éch.)} \quad [16]$$

$$\text{Intensité } ^6\text{Li} = \text{intensité totale (m/z=6)} - (7,5 \% / 92,5 \%) * \text{signal (m/z=7)} \quad [17]$$

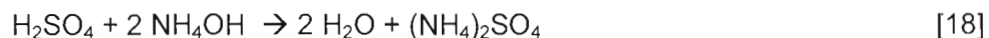
Cependant, plusieurs échantillons ont été vérifiés pour le signal à $m/z=7$ et les valeurs observées étaient négligeables par rapport à la concentration élevée de ^6Li présente dans la solution d'étalon interne. Il n'est donc pas nécessaire de rallonger l'analyse par la mesure à $m/z = 7$. Si la méthode est appliquée sur du sang humain, cette correction serait envisageable car l'utilisation possible d'antidépresseur contenant du Li fausserait les résultats (Moesch, 2007). Également, une contamination peut provenir de l'anti-coagulant utilisé dans le cas d'un prélèvement de sang, si celui-ci contient de l'héparine de lithium (Delves, 1999). L'anti-coagulant est essentiel pour empêcher la polymérisation des fibrogènes vers la fibrine (Krachler et Irgolic, 1999). Dans le cas d'étude utilisant le Sc comme étalon interne, celui-ci subit une interférence possible avec l'ion SiO^+ , qui provient de l'équipement fait en quartz (de Boer et al., 2004).

3.1.4 Développement spécifique à la méthode avec H₂SO₄

Les échantillons avec BeO, requérant H₂SO₄, a demandé des modifications à la méthode, car ce réactif n'est pas usuellement employé en ICP-MS en raison de sa haute viscosité, son point d'ébullition élevé et sa tendance à engendrer plusieurs effets de matrice (Takahashi et Youno, 2003). Tel que mentionné en 3.1.2.2, l'utilisation de H₂SO₄ concentré est essentielle pour assurer une solubilisation complète des particules de BeO. Les problèmes mentionnés ont une répercussion sur la stabilité instrumentale, qui entraîne une chute importante et rapide de la récupération lors de la séquence d'analyse.

3.1.4.1 Considération sur la digestion

L'ajout de H₂SO₄ concentré aux réactifs de digestion modifie le comportement des solutions lors de la réaction. Bien qu'il permette une digestion à des températures plus hautes en raison de sa température d'ébullition élevée (Angerer et Schaller, 2003), il occasionne également certains problèmes. Même si la digestion est quasi-complète, il reste certains résidus organiques qui forment une croûte insoluble lorsque la digestion est amenée à sec à des températures de digestion plus élevées que 210 °C. Ainsi, la température maximale de digestion est bien en dessous de la température d'ébullition de H₂SO₄ concentré (339 °C) empêchant alors l'évaporation complète du réactif. La stratégie de conserver H₂SO₄ après la digestion est également utilisée dans la méthode NIOSH 8005 (1994). L'ajout d'une base (ammoniaque) pour neutraliser H₂SO₄ a été tenté, mais la réaction de neutralisation [18] permet uniquement d'évaporer l'excédant d'eau et ne règle en rien le problème des ions de masse élevée qui causent l'«effet de densité de charge».



3.1.4.2 Considération sur l'analyse instrumentale

Bien que H_2SO_4 augmente énormément la viscosité du mélange, la pompe péristaltique du système d'échantillonnage de l'ICP-MS assure un débit constant de liquide, même si la viscosité des échantillons est différente (Thomas, 2004). Cependant, la viscosité très différente entre les échantillons pourrait peut-être causer un problème au niveau de la formation des gouttelettes. Ainsi, le triton X-100 est utilisé comme agent surfactant dans la solution d'étalon interne pour favoriser et uniformiser la formation de gouttelettes fines lors de la nébulisation des échantillons en diminuant la tension de surface du liquide (Perkin Elmer, s.d.). Le triton X-100 aiderait également à réduire le blocage de l'injecteur de la torche (Rodushkin et al., 2000). De plus, la haute viscosité de H_2SO_4 fait que l'entretien de l'appareil est plus exigeant que lorsqu'il n'est pas utilisé. Ainsi, entre chaque séquence d'analyse, le nébuliseur et l'injecteur de la torche plasma doivent être nettoyés avec du méthanol (il s'agit d'un solvant organique polaire utilisé pour solubiliser les dépôts récalcitrants) pour assurer des résultats de qualité.

Pour corriger les valeurs erronées provenant de l'effet de matrice causé par H_2SO_4 (Thomas, 2004), la méthode d'ajouts dosés a d'abord été essayée et les résultats sont présentés au tableau 3.5 et la méthode est présentée en 2.3.5.6.2.

Tableau 3.5 : Résultats obtenus avec calibration par ajouts dosés sur des solutions fortifiées avec matrice d'acide sulfurique variable

<i>Concentration de Be dans les échantillons ($\mu\text{g/L}$)</i>	<i>Nombre d'étalon de calibration par échantillon</i>	<i>Écart relatif à la valeur vraie (%)</i>	<i>Coefficient de variation (%)</i>
Entre 0 et 2,0	4	101 \pm 20 % (n=44)	20
	6	109 \pm 10 % (n=10)	9
< 0,5	4	105 \pm 30 % (n=14)	29
	6	114 \pm 9 % (n=6)	8

En plus d'être très exigeante en manipulation, la méthode d'ajouts dosés n'a pas démontrée une efficacité intéressante du point de vue de la variabilité. En effet, avec un coefficient de variation moyen (pondéré pour le nombre de réplicat) de 18% pour tous les échantillons et de 23% pour les échantillons moins concentrés (qui sont plus susceptibles de représenter la quantité de Be retrouvée dans les échantillons de souris), cette méthode n'obtient pas la précision requise pour une méthode analytique validée selon le protocole IRSST (2006a). Les coefficients de variation sont quand même plus acceptables lorsque la droite de calibration est composée de 6 points, mais toujours en deçà des valeurs obtenues lors de l'évaluation de l'incertitude analytique avec la méthode retenue (voir section 3.2.2).

Une variante de la méthode d'ajouts dosés a donc été employée, il s'agit de l'étalonnage par calibration interne avec correction par addition. Dans cette méthode, une addition est faite à chaque échantillon pour corriger la valeur obtenue par la courbe d'étalonnage interne. Cette méthode est à la fois plus rapide que l'ajout dosé et parvient à corriger adéquatement les valeurs obtenues, comme le démontre le tableau 3.6 qui présente une compilation des valeurs obtenues avec le matériel de référence certifié Seronorm^{MC} lors de toutes les séquences d'analyses impliquant des échantillons de souris digérés par H₂SO₄. La correction est à la fois faite pour la stabilité temporelle des lectures et pour les éventuelles différences de matrice entre les différents échantillons et les solutions étalons. Le volume d'ajout est minimal (50 µL dans 4950 µL) pour éviter une dilution de l'échantillon fortifié, ce qui causerait une fausse correction car la matrice de la solution fortifiée doit être la plus identique possible à celle de la solution non-fortifiée. De plus, la solution d'étalon interne a été modifiée pour cette méthode de correction en augmentant la concentration en H₂SO₄ pour combler d'éventuels écarts entre les échantillons. En ayant des matrices plus semblables lors de l'ionisation, la correction faite par l'addition est minimisée dans sa correction des écarts entre la matrice de chaque échantillon et celle des solutions étalons.

Tableau 3.6 : Vérification des différentes récupérations avec et sans correction par addition à différents moments de la séquence d'analyse

<i>Moment d'analyse</i>	<i>Valeurs obtenues sans correction (ng/mL)</i>	<i>Valeurs obtenues avec correction (ng/mL)</i>	<i>Valeur attendueⁱ (ng/mL)</i>
Début	5,2 ± 0,3 (n=24)	5,5 ± 0,2 (n=24)	5,4 – 6,4
Fin	4,2 ± 0,8 (n=23)	5,5 ± 0,5 (n=23)	
<i>Valeur Pⁱⁱ pour le test-T pour la comparaison des séries de valeurs obtenues sans correction en début et en fin d'analyse</i>			0,00
<i>Valeur Pⁱⁱ pour le test-T pour la comparaison des séries de valeurs obtenues avec correction en début et en fin d'analyse</i>			1,00
<i>Valeur Pⁱⁱ pour le test-T pour la comparaison des séries de valeurs obtenues en début d'analyse avec et sans correction</i>			0,00
<i>Valeur Pⁱⁱ pour le test-T pour la comparaison des séries de valeurs obtenues en fin d'analyse avec et sans correction</i>			0,00

ⁱ: Il s'agit de la valeur analytique donnée par le fournisseur

ⁱⁱ: une valeur de P inférieure à 0,05 (95%) correspond à une différence significative entre les groupes comparés et inversement une valeur de P supérieure à 0,05 (95%) indique qu'il n'y a aucune différence statistique entre les groupes comparés

Ainsi, selon le tableau 3.6, il existe une différence significative (les valeurs de P sont inférieures à 0,05) entre les valeurs obtenues en début et en fin des séquences d'analyse lorsque aucune correction n'est utilisée. Le contraire est observé (la valeur de P est supérieure à 0,05) lorsque la correction est utilisée, prouvant ainsi que la stabilité est assurée à l'intérieur d'une séquence d'analyse par la méthode de calibration choisie. Il est également intéressant de noter que les valeurs obtenues sans correction sont significativement plus éloignées de la valeur attendue que les valeurs obtenues avec correction. D'ailleurs, l'effet de matrice est également corrigé, car les valeurs obtenues avec correction sont à l'intérieur de l'intervalle analytique attendu pour le matériel de référence certifié.

3.1.5 Méthodes analytiques retenues

Cette section présente les deux méthodes retenues en fonction des espèces de Be. La méthode «A» est utilisée en présence des espèces Be (métal) et BeAl, tandis que la méthode «B» est utilisée pour le BeO.

3.1.5.1 Sans ajout de H_2SO_4 (pour Be (métal) et BeAl), «méthode A»

Les protocoles analytiques de préparation et de digestion des échantillons sont énoncés en 2.3.2 et en 2.3.3. Pour le Be (métal) et le BeAl, les réactifs de digestion utilisés sont un mélange 3 : 1 HNO_3 / $HClO_4$ à une température de digestion finale située entre 170 °C et 180 °C. Le temps requis de digestion avec ce mélange est d'environ 3,5 heures. Le résidu post-évaporation est remis en solution avec 10 mL d'une solution de HNO_3 1 % (v/v).

La méthode d'analyse retenue est à la section 2.3.5. Le temps d'acquisition présumé de 30 secondes et le rinçage initialement proposé (voir section 2.3.5.4.1) sont conservés. L'étalon interne optimal est 6Li à une concentration de 100 µg/L.

3.1.5.2 Avec ajout de H_2SO_4 (pour BeO), «méthode B»

Les protocoles analytiques de préparation et de digestion des échantillons sont énoncés en 2.3.2 et en 2.3.3. L'expérimentation a démontré que l' H_2SO_4 doit être utilisé pour solubiliser complètement BeO. Les réactifs de digestion utilisés sont un mélange 6 : 2 : 1 HNO_3 / $HClO_4$ / H_2SO_4 à une température de digestion située entre 175 °C et 185 °C. Lorsque la solution limpide est obtenue, elle est chauffée à une température entre 195 °C et 205 °C avec une agitation mécanique constante pour continuer l'évaporation de la solution acide jusqu'à un volume d' H_2SO_4 restant

d'environ 140 µL. Le temps requis de digestion avec ce mélange est d'environ 5 heures. Le résidu post-évaporation est remis en solution avec 14 mL d'eau.

La méthode d'analyse retenue est à la section 2.3.5. Le temps d'acquisition présumé de 30 secondes et le rinçage initialement proposé pour H₂SO₄ (voir section 2.3.5.4.2) sont conservés. L'étalon interne optimal est ⁶Li à une concentration de 100 µg/L. L'expérimentation a démontré qu'en présence d'H₂SO₄, la puissance RF au plasma doit être augmentée à 1300 W et que la méthode d'étalonnage par calibration interne avec correction par addition (voir section 2.3.5.6.2) est la plus appropriée.

3.2 Validation des méthodes

Bien qu'il s'agisse de méthodes analytiques en milieu biologique, la validation a été effectuée selon les règles appliquées pour les échantillons environnementaux, qui sont reconnues comme étant plus sévères, car il n'y a pas de critère clair établi face à la validation de méthode analytique en milieu biologique (IRSST, 2006a).

3.2.1 Évaluation des limites de détection et de quantification méthodologique

L'évaluation des LDM est un des paramètres les plus important dans le cadre de ce projet, car il est attendu que les concentrations dans les tissus biologiques seront très faibles. Les valeurs obtenues pour les LDM et les LQM selon les deux méthodes sont présentées au tableau 3.7. Il est à noter que ces limites ne tiennent pas compte du calcul de la dilution dans le volume final, elles sont donc les limites les plus basses pouvant être déterminées à la lecture instrumentale selon la méthode d'analyse.

Tableau 3.7 : Détermination de la LDM et de la LQM des méthodes validées

Méthode	Matrice	LDM (pg/mL)	LQM (pg/mL)	LDM (ng/g) ^{iv}	LQM (ng/g) ^{iv}
Méthode A ⁱⁱ	Foie	2,7	9,0	0,020	0,067
	Poumon	1,5	4,9	0,091	0,30
	Rate	2,1	7,0	0,11	0,37
	Rein	1,7	5,6	0,042	0,14
	Sang	2,2	7,2	0,022 ng/mL	0,073 ng/mL
	1 % HNO ₃ ⁱ	0,7	2,5	N/A	N/A
Méthode B ⁱⁱⁱ	Foie	2,6	8,5	0,027	0,091
	Poumon	1,3	4,3	0,094	0,31
	Rate	2,7	8,9	0,23	0,75
	Rein	2,1	6,8	0,075	0,25
	Sang	2,0	6,8	0,028 ng/mL	0,093 ng/mL
	1 % H ₂ SO ₄ ⁱ	1,2	4,0	N/A	N/A

ⁱ : Cette valeur correspond à la limite de détection instrumentale (LDI)

ⁱⁱ : Pour un volume final de 10 mL

ⁱⁱⁱ : Pour un volume final de 14 mL

^{iv} : Rapportée pour la masse d'organe digérée (en g), sauf pour le sang qui est pour 1 mL de sang digéré.

Les LDM obtenues pour les deux méthodes sont toutes dans la même gamme, soit entre 1,3 et 2,7 pg/mL, quelle que soit la matrice biologique mise à l'essai. Évidemment, les LDI sont légèrement inférieures aux valeurs obtenues pour les LDM, car aucun élément de la matrice biologique (organique et inorganique) ne vient causer de variation dans le signal (effet de matrice) dans le cas de la détermination des LDI. Les LDM et les LQM sont également rapportées en fonction de la masse d'organe, mais comme le démontre la figure 3.6, il est laborieux de rapporter la LDM en fonction de la masse d'organe digérée car il n'y a aucune corrélation entre la

masse d'organe digérée et la LDM obtenue. D'autres facteurs, tel que la composition chimique ou le type d'organe serait plutôt en cause.

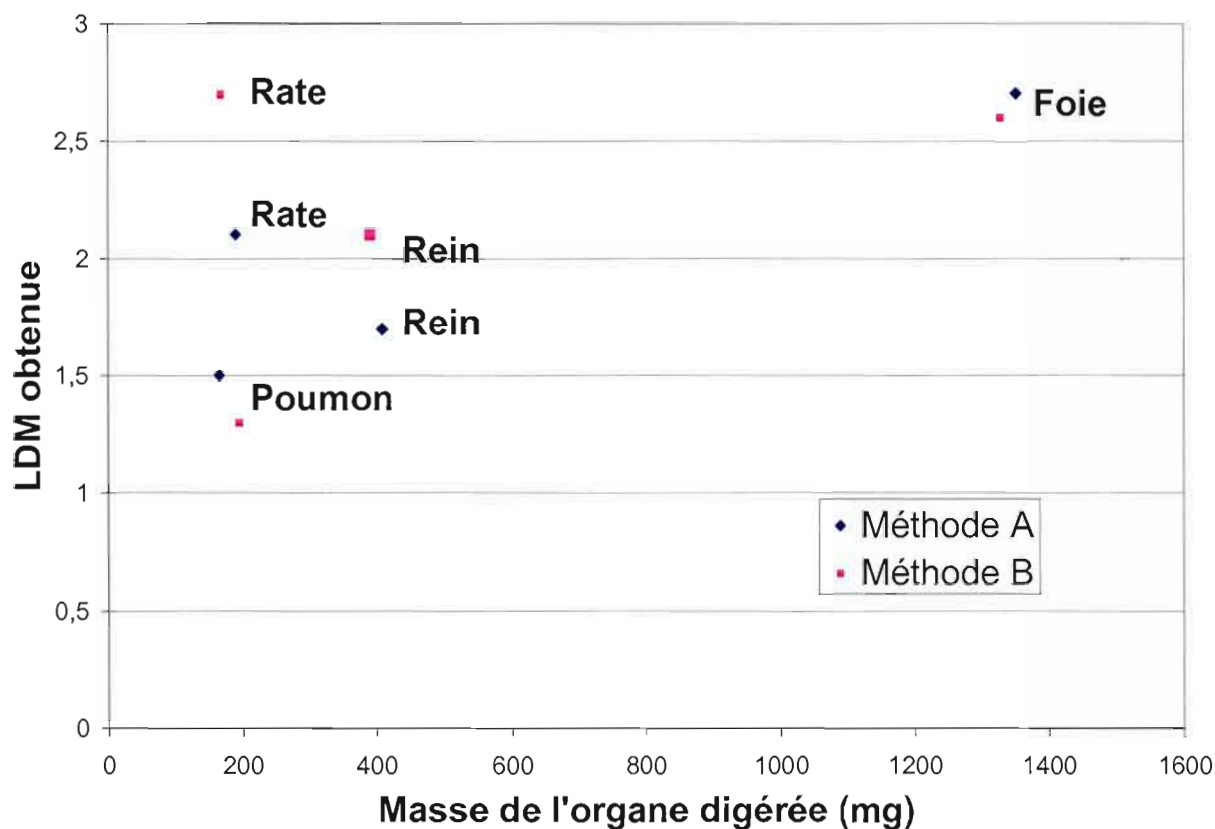


Figure 3.6 : Évaluation du lien entre la masse moyenne des organes digérés et la LDM obtenue par organe

Ainsi, selon le CEAEQ (équation [5]), tout auteur utilisant un blanc d'analyte comme échantillon serait possiblement dans l'erreur car $R \ll 4$ et ceci signifie que la LDM obtenue est statistiquement meilleure (plus basse) que la LDM réelle. Malheureusement, toutes les méthodes de la littérature recensées (voir section 1.4) utilisent un blanc d'analyte pour la détermination de la LDM. Une expérience faite au laboratoire a révélée que selon cette technique de mesure, la méthode A aurait une LDM de 0,4 pg/mL, soit environ deux fois meilleure que la valeur de LDI rapportée. Donc, tel que rapporté par Miller et Miller (2005), il est effectivement difficile de comparer les LDM entre les méthodes, car la méthode de calcul varie d'un auteur à l'autre. Il est quand même intéressant d'observer que même avec une technique de

mesure plus rigoureuse, les LDM obtenues sont majoritairement meilleures que celles recensées dans la littérature à la section 1.4. Et ceci même si certains auteurs utilisent un ICP-SFMS et que celui-ci est reconnu pour obtenir de meilleures limites de détection (Engström et al., 2004), car cet instrument a un bruit de fond très faible et une meilleure transmission des ions que l'ICP-MS avec analyseur quadripolaire (Roduskin, Ödman et Branth, 1999), tel que celui utilisé dans la présente étude. Le tableau 3.8 compare les limites de détection obtenues avec ceux recensées dans la littérature pour les organes.

Tableau 3.8 : Comparaison des méthodes développées et des méthodes recensées dans la littérature pour les organes

<i>Méthodes</i>		<i>Limite de détectionⁱ</i>	<i>Quantité de Be la plus basse pouvant être mesurée dans un organeⁱⁱⁱ (pg)</i>
Méthodes développées	Méthode A	2,0 pg/mL	20 pg
	Méthode B	2,2 pg/mL	31 pg
Méthodes recensées	Chiarappa-Zucca et al (2004)	0,8 amol de ¹⁰ Be ⁱⁱ	2 pg
	Engström et al. (2004)	6 pg/mL	60 pg

ⁱ : Limite de détection calculée dans la solution d'analyse (à la lecture instrumentale)

ⁱⁱ : Méthode à l'état solide

ⁱⁱⁱ : Pour des organes pesant un maximum de 2 g

En ce qui concerne les organes, seulement la méthode de Chiarappa-Zucca (2004) a une limite de détection meilleure que celles des méthodes développées, mais en utilisant un appareil AMS et un isotope ^{10}Be , qui n'est pas disponible pour réaliser le présent projet. Il est intéressant de noter que les méthodes développées présentent des meilleures LDM que Engström (2004), qui utilise pourtant un ICP-SFMS, qui est supposé être plus performant que l'ICP-MS employé ici. Le tableau 3.9 compare les différentes limites de détection obtenues avec ceux recensées dans la littérature pour les échantillons sanguins.

Tableau 3.9 : Comparaison des méthodes développées et des méthodes recensées dans la littérature pour les échantillons sanguins

<i>Méthodes</i>		<i>Limite de détectionⁱ</i> <i>(pg/mL)</i>	<i>Concentration de Be la plus basse pouvant être déterminée dans le sang</i> <i>(pg/mL)</i>
Méthodes développées	Méthode A	2,2	22
	Méthode B	2,0	28
Méthodes recensées	Rodushkin et al (2000)	1,4	14
	Heitland et Köster (2006)	2,4	24
	Goullé et al (2005)	4,2	42
	Delves (1999)	10	200
	de Boer et al (2004)	30	300

ⁱ: Limite de détection calculée dans la solution d'analyse (à la lecture instrumentale)

En ce qui concerne les échantillons sanguins, la seule méthode (Rodushkin et al., 2000) présentant des LDM légèrement meilleures que celles validées pour les présentes méthodes a été réalisée avec un ICP-SFMS. Les raisons principales avancées pour expliquer les LDM très basses rapportées dans la présente étude sont les suivantes :

- Une digestion complète de la matrice organique (contrairement à une simple dilution) qui réduit significativement les effets de matrice;
- Un temps d'intégration plus long dû au fait que l'étude se concentre seulement sur un élément, contrairement à plusieurs études qui analysent plusieurs éléments à la fois;
- Un étalon interne (^6Li) sélectionné spécifiquement pour l'analyse de Be et optimisé pour la matrice d'analyse.

Il faut également noter que les méthodes recensées dans la littérature sont en grande majorité des méthodes d'analyse multi-élémentaire et elles ne seraient pas applicables sur ce projet, car leur efficacité n'a pas été prouvée relativement à la solubilisation des poudres fines spécifiques à certains composés chimiques, en l'occurrence le Be pour le présent projet. Entre autres, les méthodes de Rodushkin et collaborateurs (2000) et de Engström et collaborateurs (2004) utilisent la digestion micro-onde, qui a été démontrée inefficace pour dissoudre complètement des particules de Be (Stefaniak et al., 2006). Elles ne sont donc présentées que pour fin de comparaison statistique.

3.2.2 Évaluation de la précision

La précision, aussi appelée fidélité, représente le calcul de la réplicabilité et de la répétabilité de la méthode. Elle correspond à la variation attendue entre plusieurs résultats de dosage pour un échantillon à un même niveau de concentration en utilisant le même protocole expérimental (CEAEQ, 2002; IRSST, 2006a). D'autres

mesures de variation ont également été calculées (voir tableau 3.10), dont la linéarité de la droite (coefficient de détermination R^2) et les incertitudes.

Tableau 3.10 : Mesures de variation des méthodes validées

Méthode	R^2 moyen	Répliquabilité	Répétabilité	CV_A^i	U_{anal}^{ii}
Organe – A	0,9999	1,0 %	2,2 %	4,6 %	12 %
Sang – A		1,5 %	1,7 %	3,6 %	9,2 %
Organe – B	0,9999	3,0 %	2,9 %	7,5 %	19 %
Sang -B		2,5 %	2,7 %	6,9 %	18 %

ⁱ : Incertitude analytique (ISO, 1992)

ⁱⁱ : Incertitude analytique élargie (certitude = 95%) (ISO, 1992)

La répliquabilité et la répétabilité des méthodes validées sont toutes bien en deçà des critères minimaux requis (répliquabilité < 10 %, répétabilité < 10 %) selon le guide de l'IRSST (2006a). Il est normal d'observer des valeurs un peu plus élevées pour la répétabilité, dans trois cas sur quatre, car la répétabilité exige de modifier des paramètres pour vérifier si les résultats sont consistants d'une journée à l'autre et d'un analyste à l'autre, ce qui inclut donc plus de variables. Cependant, les valeurs sont très rapprochées face à celles obtenues pour la répliquabilité, ce qui démontre une très bonne robustesse des méthodes d'analyse. Également, la méthode A présente des valeurs de précision environ deux fois meilleures que celles de la méthode B. Ceci est dû au fait que la méthode B inclut une correction par addition, qui requiert une mesure additionnelle pour le dosage des échantillons, donc une lecture qui induit une erreur supplémentaire.

La linéarité de la méthode est évaluée par le calcul du coefficient de détermination et les valeurs moyennes obtenues sont largement supérieures au critère minimal requis ($R^2 \geq 0,990$) selon le guide de l'IRSST (2006a). L'incertitude analytique représente le coefficient de variation d'une méthode analytique et les

valeurs obtenues (sous les 10 %) sont très acceptables. Comme dans le cas de la réplicabilité et de la répétabilité, les valeurs d'incertitude sont supérieures pour la méthode B. L'incertitude analytique élargie, quant à elle, est une plus large gamme d'incertitudes couvertes en ajoutant un facteur de couverture avec un niveau de confiance établi à 95 % (IRSST, 2006a).

3.2.3 Évaluation de l'exactitude

Précédemment, il a été déterminé que les méthodes développées ont une très bonne précision, mais la valeur obtenue doit également être juste. Le calcul de l'exactitude, également appelé justesse, correspond à l'étroitesse de l'accord entre les valeurs moyennes de concentration obtenues par les méthodes développées et la valeur attendue pour un MRC (CEAEQ, 2002). La justesse doit être vérifiée avec un échantillon ayant la matrice la plus rapprochée de celle des échantillons qui seront déterminés pour vérifier efficacement toutes les possibilités d'interférence, dont les effets de matrice. Ainsi, puisque aucun matériel certifié contenant du Be dans des organes biologiques n'est disponible commercialement, seulement des échantillons sanguins pourront être utilisés dans le calcul de l'exactitude. D'ailleurs, d'autres auteurs déplorent ce fait et suggèrent évidemment de pallier à ce problème (Watters et al., 2006). En plus, le Be contenu dans le matériel disponible est déjà sous forme soluble, donc ne vérifie en rien la solubilité des particules et aucun MRC contenant des particules de Be non-solubles dans des matrices biologiques n'est disponible commercialement (Stefaniak et al., 2006). Les résultats obtenus pour l'exactitude des méthodes sont présentés au tableau 3.11.

Tableau 3.11 : Mesures de l'exactitude pour les méthodes validées

Méthode	Valeur obtenue de Be (ng/mL)	Valeur analytique certifiée (ng/mL)	Valeurs acceptables certifiées (ng/mL)	Justesse (%)
Méthode A	5,2 ± 0,2 (n=74)	5,9 ± 0,5 ⁱ	4,9 – 6,9 ⁱ	88 %
Méthode B	5,6 ± 0,4 (n=36)			95 %

ⁱ : Valeurs fournies sur le certificat d'analyse

Selon le tableau 3.11, la justesse des méthodes validées est en deçà des critères minimaux requis, soit à l'intérieur des valeurs acceptables certifiées. Bien qu'elle soit plus longue, la méthode B présente des résultats plus juste que la méthode A. Ceci peut s'expliquer par le fait que, par sa méthode de calibration avec correction par addition, la méthode B corrige plus de facteurs, dont la stabilité de la réponse dans le temps et les effets de matrice. Cependant, la méthode B est moins reproductible que la méthode A, ce qui était attendu puisque la correction utilisée avec la méthode B nécessite la prise de deux lectures. Ainsi, la méthode A est priorisée lorsque BeO n'est pas présent dans les échantillons. En ce qui concerne précisément les valeurs d'exactitude, la valeur est arbitraire puisque la valeur certifiée n'est pas nécessairement de 5,9 ng/mL, mais elle se situe dans une gamme entre 5,4 et 6,4 ng/mL. En fait, une analyse par ajouts dosés révèle que la concentration serait plutôt de 5,4 ± 0,1 ng/mL (n=6). Cette valeur a également été confirmée par une analyse faite par un laboratoire extérieur qui obtient une valeur de 5,4 ng/mL.

Les résultats journaliers du MRC sont également reportés sur une charte de contrôle (voir annexe A.1 et A.2), qui assure un suivi temporel des concentrations obtenues. Les valeurs devraient toutes se situer entre les deux lignes jaunes. Cependant, si la valeur critique limite (correspondant à 75 % de la valeur vraie) est dépassée (ligne rouge), la séquence d'analyse n'est pas tenue en compte et doit être recommencée depuis le début. Les résultats obtenus pour les valeurs de MRC

(voir figure A.1 et A.2 en annexe) durant plusieurs semaines démontrent l'efficacité et la robustesse des méthodes développées. En effet, les résultats sont situés entre les bornes de valeur acceptable (jaune) dans plus de 98,5 % des cas pour la méthode A et dans plus de 98 % des cas pour la méthode B.

Pour confirmer que les méthodes sont exactes, des échantillons sanguins en vérification inter-laboratoire ont également été analysés et les résultats sont rapportés au tableau 3.12.

Tableau 3.12 : Mesures de récupération pour les matériaux de vérification inter-laboratoire de l'INSPQ

<i>Matériel de vérification inter-laboratoire</i>	<i>Méthode</i>	<i>Valeur obtenue de Be (ng/mL)</i>	<i>Valeur analytique rapportée (ng/mL)</i>	<i>Récupération (%)</i>
QMEQAS06B-02	Méthode A	1,66 ± 0,09 (n=6)	1,74 ± 0,29 ⁱ	95,4 %
	Méthode B	1,79 ± 0,04 (n=4)		104 %
QMEQAS07B-03	Méthode A	0,84 ± 0,04 (n=5)	0,950 ± 0,159 ⁱ	88 %
	Méthode B	0,89 ± 0,04 (n=4)		94 %
QMEQAS06B-08	Méthode A	4,2 ± 0,1 (n=6)	4,43 ± 0,44 ⁱ	94 %
	Méthode B	4,37 ± 0,06 (n=4)		98,6 %

ⁱ : Valeurs fournies sur le rapport d'analyse de l'INSPQ

Les résultats obtenus pour la récupération de ces matériaux sont presque en majorité un peu supérieurs à ceux obtenus pour la justesse au tableau 3.11. Cependant, comme ce matériel n'a pas la même portée qu'un MRC, les valeurs du MRC seront celles à considérer lors de l'évaluation de l'exactitude. Il faut également mentionner qu'il est normal d'observer de tel écart lors de l'analyse d'échantillon biologique et c'est pourquoi les valeurs de concentration acceptables sont sur une large gamme.

3.2.4 Évaluation de l'entreposage des échantillons

Puisque l'appareil ICP-MS n'est pas toujours disponible et que son utilisation requiert parfois plusieurs journées d'optimisation avant d'atteindre les critères minimaux mentionnés en 2.3.5.3, la stabilité des solutions digérées doit être évaluée. La stabilité est donc évaluée une fois par semaine durant quatre semaines (voir méthode à la section 2.4.3.6) et les résultats sont présentés aux figures 3.7 et 3.8.

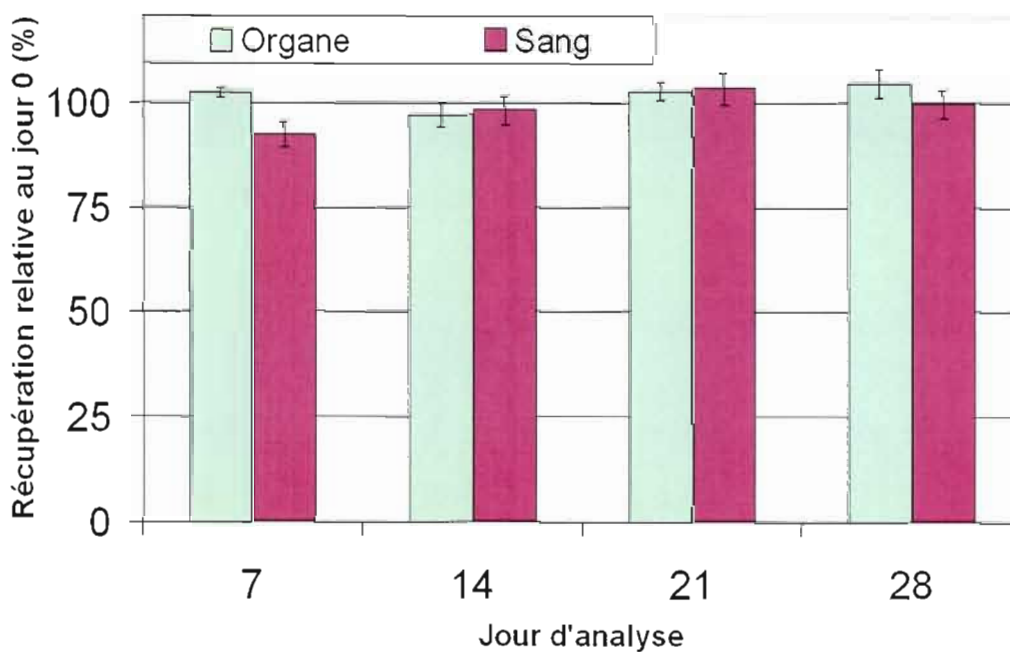


Figure 3.7 : Évaluation de la stabilité pour la méthode A

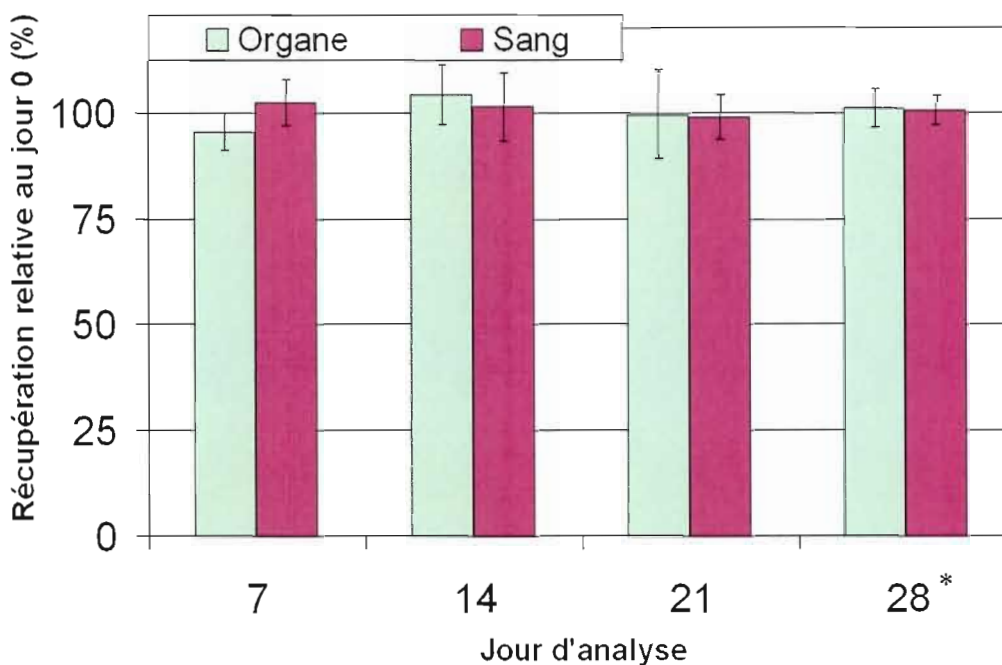


Figure 3.8 : Évaluation de la stabilité pour la méthode B

* : En raison d'un problème instrumental, il n'y a que 6 valeurs pour les organes au jour d'analyse 28, plutôt que 7.

Comme le démontre les deux figures précédentes, l'entreposage des échantillons sur une période maximale de 28 jours ne cause aucun problème face à la stabilité des solutions. Il est à noter qu'une valeur (figure 3.7, sang au jour d'analyse 7, valeur de 92,3 %) est un peu plus faible que la valeur de la journée zéro, mais toujours au-dessus du critère de stabilité minimal de 90 % requis selon le guide de l'IRSST (2006a). La conservation des échantillons a été vérifiée dans deux types d'éprouvettes, soit en polypropylène et en verre. Les résultats sont présentés au tableau 3.13.

Tableau 3.13 : Vérification de la stabilité dépendant du matériel de conservation

<i>Méthode - matrice</i>	<i>Stabilité (%) dépendant du matériel de conservation</i>	
	Polypropylène	Verre
Méthode A - organe	101 ± 4 (n=16)	103 ± 4 (n=12)
Méthode A - sang	99 ± 5 (n=16)	97 ± 6 (n=12)
Méthode B - organe	99 ± 8 (n=15)	102 ± 7 (n=12)
Méthode B - sang	101 ± 6 (n=16)	101 ± 6 (n=12)
<i>Valeur Pⁱ pour le test-T de comparaison des matériaux avec méthode A - organe</i>		0,20
<i>Valeur Pⁱ pour le test-T de comparaison des matériaux avec méthode A - sang</i>		0,35
<i>Valeur Pⁱ pour le test-T de comparaison des matériaux avec méthode B - organe</i>		0,32
<i>Valeur Pⁱ pour le test-T de comparaison des matériaux avec méthode B - sang</i>		1,00

ⁱ: une valeur de P inférieure à 0,05 (95%) correspond à une différence significative entre les groupes comparés et inversement une valeur de P supérieure à 0,05 (95%) indique qu'il n'y a aucune différence statistique entre les groupes comparés

Les résultats du tableau 3.13 démontrent qu'il n'y a aucune différence statistiquement significative (les valeurs de P sont supérieures à 0,05) concernant la stabilité des solutions digérées par la méthode A ou B entre les différents matériaux de conservation utilisés. Il revient donc à l'analyste de décider du type d'éprouvette qui lui convient entre les deux matériaux étudiés.

3.3 Application des méthodes

Les méthodes validées ont été appliquées sur des échantillons de souris exposées à différentes particules de Be afin de vérifier si la taille et l'espèce chimique de ces particules a une influence sur la distribution du Be dans l'organisme. Tel que mentionné précédemment, les organes sont digérés en entier, car il n'est pas connu si la répartition du Be dans ceux-ci est homogène.

3.3.1 Groupe contrôle et contamination

Premièrement, il est important de s'assurer qu'aucune contamination significative n'a lieu lors des expositions des souris ou du traitement des échantillons. Ainsi, les échantillons du groupe contrôle proviennent de souris qui ont été exposées à de l'air pur sans particules de Be et les échantillons prélevés sont digérés par les deux méthodes de digestion. Le tableau 3.14 présente les résultats obtenus pour la concentration de Be dans les matrices biologiques pour le groupe contrôle.

Tableau 3.14 : Concentrations de Be dans les matrices biologiques pour le groupe contrôle

<i>Méthode de digestion</i>	<i>Matrice biologique</i>	<i>Concentration moyenne de Be (ng/g)ⁱ</i>
Méthode A	Poumon	< LDM (0,1 ng/g ⁱⁱ ; 0,14 g ⁱⁱⁱ) (n=8)
	Foie	0,037 ± 0,005 (n=19)
	Rate	< LDM (0,6 ng/g ⁱⁱ ; 0,034 g ⁱⁱⁱ) (n=19)
	Rein	< LDM (0,04 ng/g ⁱⁱ ; 0,44 g ⁱⁱⁱ) (n=16)
	Sang	< LDM (0,05 ng/mL ⁱⁱ ; 0,44 mL ^{iv}) (n=20)
Méthode B	Poumon	< LDM (0,1 ng/g ⁱⁱ ; 0,13 g ⁱⁱⁱ) (n=4)
	Foie	< LDM (0,03 ng/g ⁱⁱ ; 1,3 g ⁱⁱⁱ) (n=11)
	Rate	< LDM (1 ng/g ⁱⁱ ; 0,035 g ⁱⁱⁱ) (n=13)
	Rein	< LDM (0,06 ng/g ⁱⁱ ; 0,46 g ⁱⁱⁱ) (n=12)
	Sang	< LDM (0,07 ng/mL ⁱⁱ ; 0,41 mL ⁱⁱⁱ) (n=10)

ⁱ : L'unité de concentration de Be dans le sang est en ng/mL

ⁱⁱ : Il s'agit de la LDM pour la masse et l'organe

ⁱⁱⁱ : Il s'agit de la masse moyenne utilisée pour la détermination de cette LDM

^{iv} : Il s'agit du volume moyen utilisé pour la détermination de cette LDM

Les résultats sont majoritairement sous les LDM évaluée pour chaque matrice et méthode. Seulement les échantillons de foies digérés par la méthode A ont une valeur de concentration moyenne supérieure à la LDM. Comme le foie est impliqué dans plusieurs activités métaboliques (Marieb, 2000), la source de contamination pourrait être la nourriture des souris, comme le montre le tableau 3.15.

Tableau 3.15 : Concentrations obtenues lors du dosage du Be dans la nourriture des souris

<i>Nourriture</i>	<i>Concentration de Be</i>
Nourriture sèche ⁱ	29 ± 3 ng/g (n=6)
Eau ⁱ	0,0008 ± 0,0005 ng/mL (n=6) ⁱⁱ

ⁱ : Analyse selon la méthode A (voir section 2.4.1.1)

ⁱⁱ : En utilisant la LDI de la méthode A, soit 0,0007 ng/mL (voir section 3.2.1)

Une concentration de Be est détectée dans l'eau avec une valeur supérieure à la LDI de la méthode A. En ce qui concerne la nourriture sèche, une contamination est observée et pourrait être la source des petites concentrations détectées dans certains foies de souris du groupe contrôle.

3.3.2 Considérations sur les tests statistiques

La normalité des distributions est évaluée selon le test de Kolmogorov-Smirnov (voir section 2.5.3.1). Lorsque ce test a révélé que certaines distributions n'étaient pas normales, différents types de transformation (transformation racine-carrée, transformation logarithmique, transformation réciproque, etc.) ont été essayés pour obtenir une approximation adéquate de la normalité (Kutner et al, 2005). Il n'a pas été possible de faire une approximation adéquate de la normalité sur plusieurs séries de données, les procédures non-paramétriques ont donc été utilisées. Ces procédures, moins puissantes que les tests statistiques utilisés pour les séries de distribution normale, sont appliquées sur toutes les séries, pour comparer les

médianes, dans le but d'uniformiser la démarche statistique. De plus, puisque la nature et la taille des particules sont deux variables complètement confondues, celles-ci sont traitées indépendamment pour les tests statistiques.

3.3.3 Poumons des souris exposées

Les poumons sont le lieu d'échange gazeux avec l'organisme (Marieb, 2000). Après l'inhalation des aérosols de particules, ces dernières se déposent dans les poumons par différents mécanismes de dépôt. Les mécanismes pertinents aux particules étudiées sont (Roberge et al., 2004) :

- Le dépôt par impaction dans la région rhinopharyngée et qui touche les particules de diamètre aérodynamique supérieur à 3 μm ;
- La diffusion causée par le mouvement aléatoire des particules touche les particules de diamètre aérodynamique inférieure à 0,5 μm et est le plus important mécanisme pour le dépôt dans les bronchioles et les alvéoles;
- La sédimentation dans les bronches et les bronchioles pour les particules de diamètre aérodynamique entre 1 et 3 μm ;

Dépendant de l'endroit du dépôt et des propriétés chimiques, différents mécanismes auront lieu pour éliminer les particules. Si les particules se logent dans la région du rhinopharynx et de l'arbre trachéo-bronchique, elles seront éliminées par une couche muqueuse qui transporte les particules pour être recrachées ou avalées. Si les particules se logent dans les alvéoles, elles seront dissoutes lentement dans les fluides pulmonaires ou éliminées par les phagocytes (Roberge et al., 2004). Un autre mécanisme, la translocation, est possible pour les particules ultra fines (ayant au moins une dimension inférieure à 0,1 μm) inhalées et consiste au passage des particules du poumon vers le sang à travers les membranes. (Donaldson et Borm, 2007). Lorsque les particules sont solubilisées ou subissent la translocation, ils se dispersent dans l'organisme vers des organes cibles, ce qui

explique qu'une quantité de Be sera retrouvée dans les tissus à l'essai dans ce projet (Donaldson et Borm, 2007 et Roberge et al., 2004). Le tableau 3.16 présente les résultats obtenus pour la concentration de Be dans les poumons de souris en fonction de la nature et de la taille des particules de Be.

Tableau 3.16 : Concentrations de Be dans les poumons de souris en fonction de la nature et de la taille des particules de Be

<i>Nature des particules</i>	<i>Taille des particulesⁱ</i>	<i>Concentration moyenne de Be dans les poumons ($\mu\text{g/g}$)</i>	<i>Concentration médiane (intervalle interquartile) de Be dans les poumons ($\mu\text{g/g}$)</i>
Be (métal)	Totale	2,1 \pm 0,8 (n=12)	2,4 (1,0)
	Respirable	12 \pm 3 (n=14)	12,3 (2,6)
BeO	Groupe 1 ⁱⁱ	77 \pm 15 (n=13)	76 (18)
	Groupe 2 ⁱⁱⁱ	92 \pm 13 (n=11)	94 (24)
BeAl	Totale	0,7 \pm 0,2 (n=10)	0,65 (0,25)
	Respirable	2 \pm 1 (n=14)	1,5 (1,1)
<i>Valeur de P^{iv} pour le test Mann-Whitney entre les deux tailles de particules pour le Be (métal)</i>			0,00
<i>Valeur de P^{iv} pour le test Mann-Whitney entre les deux tailles de particules pour le BeO</i>			0,03
<i>Valeur de P^{iv} pour le test Mann-Whitney entre les deux tailles de particules pour le BeAl</i>			0,00
<i>Valeur de P^{iv} pour le test Kruskal-Wallis entre les trois natures des particules pour la taille totaleⁱⁱ</i>			0,00
<i>Valeur de P^{iv} pour le test Kruskal-Wallis entre les trois nature des particules pour la taille respirableⁱⁱⁱ</i>			0,00

ⁱ: Pour le diamètre aérodynamique moyen, se référer au tableau 2.1

ⁱⁱ: Pour fins de tests statistiques, le groupe 1 est utilisé dans les comparaisons de particules de tailles totales

ⁱⁱⁱ: Pour fins de tests statistiques, le groupe 2 est utilisé dans les comparaisons de particules de tailles respirables

^{iv}: une valeur de P inférieure à 0,05 (95%) correspond à une différence significative entre les groupes comparés et inversement une valeur de P supérieure à 0,05 (95%) indique qu'il n'y a aucune différence statistique entre les groupes comparés

Le poumon est l'organe où le plus de Be a été retrouvé, quelle que soit la taille des particules et la nature de ces particules. Aussi, il est donc normal d'y observer une quantité très élevée de BeO, qui est difficilement solubilisé dans les fluides pulmonaires (Stefaniak et al., 2005). Une différence statistiquement significative a été observée entre tous les groupes comparés, ce qui montre que la taille et la nature des particules de Be influencent sa distribution au niveau des poumons. Il est cependant surprenant d'observer une différence statistiquement significative entre les deux groupes de BeO, car les particules y ont la même taille. Cette différence est possiblement due au niveau d'exposition des souris (une concentration en Be de $268 \pm 47 \mu\text{g}/\text{m}^3$ pour le groupe 1 et une concentration en Be de $247 \pm 29 \mu\text{g}/\text{m}^3$ pour le groupe 2).

3.3.4 Foies des souris exposées

Le foie est un organe qui remplit plusieurs fonctions métaboliques et régulatrices. Il métabolise d'ailleurs plusieurs protéines sanguines (Marieb, 2000). Le tableau 3.17 présente les résultats obtenus pour la concentration de Be dans les foies de souris en fonction de la nature et de la taille des particules de Be.

Tableau 3.17 : Concentrations de Be dans les foies de souris en fonction de la nature et de la taille des particules de Be

<i>Nature des particules</i>	<i>Taille des particulesⁱ</i>	<i>Concentration moyenne de Be dans les foies (ng/g)</i>	<i>Concentration médiane (intervalle interquartile) de Be dans les foies (ng/g)</i>
Be (métal)	Totale	1 ± 1 (n=30)	0,81 (0,35)
	Respirable	3 ± 6 (n=37)	1,64 (0,80)
BeO	Groupe 1 ⁱⁱ	3 ± 4 (n=38)	1,3 (2,9)
	Groupe 2 ⁱⁱⁱ	4 ± 5 (n=35)	1,8 (4,5)
BeAl	Totale	1 ± 1 (n=31)	0,28 (0,21)
	Respirable	11 ± 34 (n=38)	0,7 (4,2)
<i>Valeur de P^{iv} pour le test Mann-Whitney entre les deux tailles de particules pour le Be (métal)</i>			0,00
<i>Valeur de P^{iv} pour le test Mann-Whitney entre les deux tailles de particules pour le BeO</i>			0,04
<i>Valeur de P^{iv} pour le test Mann-Whitney entre les deux tailles de particules pour le BeAl</i>			0,00
<i>Valeur de P^{iv} pour le test Kruskal-Wallis entre les trois nature des particules pour la taille totaleⁱⁱ</i>			0,00
<i>Valeur de P^{iv} pour le test Kruskal-Wallis entre les trois natures des particules pour la taille respirableⁱⁱⁱ</i>			0,01

ⁱ : Pour le diamètre aérodynamique moyen, se référer au tableau 2.1

ⁱⁱ : Pour fins de tests statistiques, le groupe 1 est utilisé dans les comparaisons de particules de tailles totales

ⁱⁱⁱ : Pour fins de tests statistiques, le groupe 2 est utilisé dans les comparaisons de particules de tailles respirables

^{iv} : une valeur de P inférieure à 0,05 (95%) correspond à une différence significative entre les groupes comparés et inversement une valeur de P supérieure à 0,05 (95%) indique qu'il n'y a aucune différence statistique entre les groupes comparés

Lorsque le test statistique de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les tailles de particules de chaque espèce, une différence statistiquement significative a été observée pour les trois espèces. Également, lorsque le test statistique de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer la nature des particules pour chaque taille,

une différence statistiquement significative a été observée pour les deux tailles. Les résultats statistiques obtenus pour ces tests tendent à démontrer que la taille et la nature des particules de Be influencent sa distribution au niveau du foie.

3.3.5 Reins des souris exposées

Le rein est un organe important dans l'homéostasie en maintenant la composition et le volume du sang dans le corps. En plus d'éliminer les substances en excès et les déchets, il assure l'équilibre entre les électrolytes et l'eau dans le sang (Marieb, 2000). Son importance dans le traitement du sang pourrait le faire interagir avec le Be dans le corps. Le tableau 3.18 présente les résultats obtenus pour la concentration de Be dans les reins de souris en fonction de la nature et de la taille des particules de Be.

Tableau 3.18 : Concentrations de Be dans les reins de souris en fonction de la nature et de la taille des particules de Be

<i>Nature des particules</i>	<i>Taille des particulesⁱ</i>	<i>Concentration moyenne de Be dans les reins (ng/g)</i>	<i>Concentration médiane (intervalle interquartile) de Be dans les reins (ng/g)</i>
Be (métal)	Totale	1 ± 1 (n=30)	0,31 (0,13)
	Respirable	2 ± 4 (n=37)	0,90 (0,34)
BeO	Groupe 1 ⁱⁱ	1,3 ± 0,8 (n=38)	1,1 (1,3)
	Groupe 2 ⁱⁱⁱ	3 ± 4 (n=35)	1,3 (1,1)
BeAl	Totale	2 ± 4 (n=31)	0,6 (2,1)
	Respirable	18 ± 36 (n=38)	3 (18)
<i>Valeur de P^{iv} pour le test Mann-Whitney entre les deux tailles de particules pour le Be (métal)</i>			0,00
<i>Valeur de P^{iv} pour le test Mann-Whitney entre les deux tailles de particules pour le BeO</i>			0,06
<i>Valeur de P^{iv} pour le test Mann-Whitney entre les deux tailles de particules pour le BeAl</i>			0,01
<i>Valeur de P^{iv} pour le test Kruskal-Wallis entre les trois natures des particules pour la taille totaleⁱⁱ</i>			0,00
<i>Valeur de P^{iv} pour le test Kruskal-Wallis entre les trois nature des particules pour la taille respirableⁱⁱⁱ</i>			0,01

ⁱ : Pour le diamètre aérodynamique moyen, se référer au tableau 2.1

ⁱⁱ : Pour fins de tests statistiques, le groupe 1 est utilisé dans les comparaisons de particules de tailles totales

ⁱⁱⁱ : Pour fins de tests statistiques, le groupe 2 est utilisé dans les comparaisons de particules de tailles respirables

^{iv} : une valeur de P inférieure à 0,05 (95%) correspond à une différence significative entre les groupes comparés et inversement une valeur de P supérieure à 0,05 (95%) indique qu'il n'y a aucune différence statistique entre les groupes comparés

Une différence statistiquement significative a été observée sur tous les groupes comparés pour les reins, sauf entre les deux tailles de particules de BeO. Puisqu'il n'y a pas d'écart significatif entre le diamètre aérodynamique moyen de ces deux tailles (voir tableau 2.1), aucune conclusion quant à la différence au niveau de la

taille des particules de BeO ne peut être tirée. Les autres résultats tendent à démontrer une différence quant à la distribution du Be dans les reins en fonction de la nature et de la taille des particules.

3.3.6 Rates des souris exposées

La rate sert à filtrer le sang et le débarrasser de plusieurs débris en détruisant les érythrocytes abîmés et renvoie plusieurs produits de cette dégradation vers le foie. Elle est également impliquée dans l'immunité du corps (Marieb, 2000). Le tableau 3.19 présente les résultats obtenus pour la concentration de Be dans les rates de souris en fonction de la nature et de la taille des particules de Be.

Tableau 3.19 : Concentrations de Be dans les rates de souris en fonction de la nature et de la taille des particules de Be

<i>Nature des particules</i>	<i>Taille des particulesⁱ</i>	<i>Concentration moyenne de Be dans les rates (ng/g)</i>	<i>Concentration médiane (intervalle interquartile) de Be dans les rates (ng/g)</i>
Be (métal)	Totale	0,9 ± 0,8 (n=12)	0,58 (0,54)
	Respirable	2 ± 4 (n=16)	1,18 (0,79)
BeO	Groupe 1 ⁱⁱ	2 ± 2 (n=13)	1,6 (4,0)
	Groupe 2 ⁱⁱⁱ	6 ± 8 (n=11)	2,4 (4,7)
BeAl	Totale	0,3 ± 0,2 (n=10)	0,15 (0,24)
	Respirable	1 ± 2 (n=14)	0,22 (0,53)
<i>Valeur de P^{iv} pour le test Mann-Whitney entre les deux tailles de particules pour le Be (métal)</i>			0,01
<i>Valeur de P^{iv} pour le test Mann-Whitney entre les deux tailles de particules pour le BeO</i>			0,25
<i>Valeur de P^{iv} pour le test Mann-Whitney entre les deux tailles de particules pour le BeAl</i>			0,88
<i>Valeur de P^{iv} pour le test Kruskal-Wallis entre les trois natures des particules pour la taille totaleⁱⁱ</i>			0,00
<i>Valeur de P^{iv} pour le test Kruskal-Wallis entre les trois nature des particules pour la taille respirableⁱⁱⁱ</i>			0,00

ⁱ : Pour le diamètre aérodynamique moyen, se référer au tableau 2.1

ⁱⁱ : Pour fins de tests statistiques, le groupe 1 est utilisé dans les comparaisons de particules de tailles totales

ⁱⁱⁱ : Pour fins de tests statistiques, le groupe 2 est utilisé dans les comparaisons de particules de tailles respirables

^{iv} : une valeur de P inférieure à 0,05 (95%) correspond à une différence significative entre les groupes comparés et inversement une valeur de P supérieure à 0,05 (95%) indique qu'il n'y a aucune différence statistique entre les groupes comparés

Une différence statistiquement significative a été observée sur tous les groupes comparés, sauf entre les deux tailles de particules de BeO et de BeAl. Tel que mentionné précédemment, il n'y a pas d'écart significatif entre le diamètre aérodynamique moyen des deux tailles de poussières de BeO (voir tableau 2.1), aucune conclusion quant à la différence au niveau de la taille des particules de BeO ne peut donc être tirée. Également, les concentrations obtenues pour les deux tailles de poussières de BeAl sont en majorité situées sous la LDM, le résultat du test statistique Mann-Whitney entre les deux tailles de poussières ne devrait donc pas être pris en compte. Les autres résultats tendent à démontrer une différence quant à la distribution du Be dans les rates.

3.3.7 Échantillons sanguins des souris exposées

Le sang sert à transporter plusieurs éléments dans l'organisme, dont l'oxygène, les éléments nutritifs, les hormones, les déchets et les molécules impliquées dans l'immunité (Marieb, 2000). Le Be est d'ailleurs transporté dans le corps par le sang. Il a été démontré dans la littérature que le Be se lie à deux classes de protéines, soit les préalbumines et les γ -globulines (ASTDR, 2002). L'analyse du sang entier a été favorisée face à l'analyse uniquement du sérum, car il n'est pas connu si le Be peut se lier aux érythrocytes ou aux fibrogènes, qui ne sont pas présents dans le sérum (Krachler et Irgolic, 1999). Le tableau 3.20 présente les résultats obtenus pour la concentration de Be dans les échantillons sanguins de souris en fonction de la nature et de la taille des particules de Be.

Tableau 3.20 : Concentrations de Be dans les échantillons sanguins de souris en fonction de la nature et de la taille des particules de Be

<i>Nature des particules</i>	<i>Taille des particulesⁱ</i>	<i>Concentration moyenne de Be dans le sang (ng/mL)</i>	<i>Concentration médiane (intervalle interquartile) de Be dans le sang (ng/mL)</i>
Be (métal)	Totale	0,11 ± 0,04 (n=28)	0,106 (0,030)
	Respirable	1 ± 3 (n=36)	0,198 (0,047)
BeO	Groupe 1 ⁱⁱ	0,3 ± 0,7 (n=38)	0,070 (0,082)
	Groupe 2 ⁱⁱⁱ	0,4 ± 1,3 (n=35)	0,121 (0,028)
BeAl	Totale	2 ± 11 (n=31)	0,070 (0,080)
	Respirable	17 ± 37 (n=37)	1 (12)
<i>Valeur de P^{iv} pour le test Mann-Whitney entre les deux tailles de particules pour le Be (métal)</i>			0,00
<i>Valeur de P^{iv} pour le test Mann-Whitney entre les deux tailles de particules pour le BeO</i>			0,00
<i>Valeur de P^{iv} pour le test Mann-Whitney entre les deux tailles de particules pour le BeAl</i>			0,00
<i>Valeur de P^{iv} pour le test Kruskal-Wallis entre les trois nature des particules pour la taille totaleⁱⁱ</i>			0,01
<i>Valeur de P^{iv} pour le test Kruskal-Wallis entre les trois natures des particules pour la taille respirableⁱⁱⁱ</i>			0,00

ⁱ : Pour le diamètre aérodynamique moyen, se référer au tableau 2.1

ⁱⁱ : Pour fins de tests statistiques, le groupe 1 est utilisé dans les comparaisons de particules de tailles totales

ⁱⁱⁱ : Pour fins de tests statistiques, le groupe 2 est utilisé dans les comparaisons de particules de tailles respirables

^{iv} : une valeur de P inférieure à 0,05 (95%) correspond à une différence significative entre les groupes comparés et inversement une valeur de P supérieure à 0,05 (95%) indique qu'il n'y a aucune différence statistique entre les groupes comparés

Une différence statistiquement significative a été observée entre tous les groupes comparés pour les échantillons sanguins. Cependant, les résultats pour les poussières de Be totale, BeAl totale, BeO groupe 1 et 2 sont situés entre la LDM et la LQM de leur méthode respective, donc dans une gamme où leur dosage est imprécis.

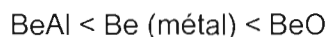
3.3.8 Discussion sur les résultats biologiques obtenus

Les deux méthodes développées ont démontré une sensibilité adéquate pour la grande majorité des échantillons analysés, démontrant ainsi leur efficacité face aux objectifs désirés. Les résultats ont démontré ce qui était attendu dans l'hypothèse du projet (Zayed et al, 2004), soit que la taille et la nature des particules de Be a une influence sur la distribution du Be dans l'organisme.

Au niveau de la taille des particules de Be, seulement les particules de Be (métal) et de BeAl sont comparés, car il n'y a pas de différence significative entre les deux tailles de particules de BeO utilisées. Dans le cas des particules de BeAl, la différence entre les deux tailles est petite, mais suffisamment significative pour étudier la différence de distribution entre les deux tailles. Dans les échantillons biologiques à l'étude pour les souris exposées à Be (métal) et BeAl, une différence statistiquement significative pour la distribution du Be a été observée entre les deux tailles de particules. Comme règle générale, les particules de plus petites tailles étaient en concentration supérieure dans toutes les matrices biologiques. Ceci était attendu, car ces particules se rendront plus aisément dans les alvéoles pulmonaires, endroit où leur élimination de l'organisme est la plus compliquée et leur entrée dans le reste de l'organisme est possible.

Au niveau de la nature des particules de Be, la comparaison est ardue car les particules utilisées n'étaient pas exactement de la même taille entre les différentes espèces. Ainsi, la comparaison s'est faite entre les espèces en appariant les tailles

les plus rapprochées. Aucune tendance particulière n'a été observée face à la concentration de Be dans les reins et le sang. Cependant, pour les poumons, les foies et les rates, la tendance suivante a été observée pour les concentrations tissulaires de Be :



La différence observée au niveau de la distribution du Be dans l'organisme est en partie due à la capacité des fluides pulmonaires à dissoudre les différentes natures de particules. Ainsi, puisque BeO est la moins soluble des espèces étudiées, sa rétention au niveau des poumons sera plus importante. Également, puisque les particules de BeO utilisées ont un diamètre aérodynamique plus petit que celui des particules de Be (métal) et de BeAl utilisées, celles-ci se rendront plus facilement dans les alvéoles pulmonaires.

Les résultats obtenus dans cette section, face à la distribution de Be dans l'organisme, seront d'intérêt pour les toxicologues qui devront traiter de manière plus approfondie les conséquences de ces différences, car une différence de distribution pourrait mener à une différente réponse toxicologique.

CONCLUSION

L'objectif principal de l'étude consistait à développer et valider des méthodes ayant des limites de détection au niveau d'ultra-trace pour permettre d'analyser la faible teneur en Be dans différentes matrices biologiques. Le développement et la validation de deux méthodes ont donc été réalisés pour tenir compte de la solubilité des espèces de poudre de béryllium utilisées pour l'étude, tout en contrôlant les interférences. Une première méthode (méthode A) est utilisée pour les particules de béryllium métallique et d'alliage béryllium-aluminium. Une deuxième méthode (méthode B) plus complexe traite spécifiquement de l'analyse pour les particules d'oxyde de béryllium. Les limites de détection méthodologiques obtenues (~ 2 pg/mL sans tenir compte du volume de dilution) sont parmi les meilleures de la littérature. La validation de la méthode a été effectuée conformément au protocole de l'IRSST (IRSST, 2006a) et la réplicabilité (méthode A : ~ 1 %, méthode B : ~ 3 %) et la répétabilité (méthode A : ~ 2 %, méthode B : ~ 3 %) obtenues sont conformes aux critères maximaux de 10 % permis. L'incertitude analytique ISO a également été calculée et est de 4 % pour la méthode A et de 7 % pour la méthode B. L'exactitude des méthodes a été confirmée avec du matériel de référence certifié (méthode A : 88 %, méthode B : 95 %) et les échantillons digérés peuvent être entreposés sans problème durant une période allant jusqu'à 28 jours.

Pour soutenir la validation des méthodes développées, celles-ci ont été appliquées sur des échantillons provenant de souris exposées aux poussières de Be (métal), BeAl et BeO. L'application de ces méthodes a permis d'établir les profils de distribution du Be dans les différentes matrices biologiques à l'étude (foie, poumon, rate, rein, sang). Ces profils ont permis d'établir des différences statistiquement significatives pour les différentes espèces de Be et en fonction de la distribution granulométrique de ces poussières.

PERSPECTIVES

Les méthodes ont été développées et validées pour répondre aux exigences spécifiques d'un projet visant à étudier la distribution du Be dans l'organisme en fonction de la taille et de la nature des particules (Zayed et al., 2004). Cependant, plusieurs autres applications sont envisageables.

Premièrement, la validation ayant été effectuée sur du sang humain, les méthodes peuvent être directement exploitées dans des études épidémiologiques portant sur l'analyse du Be dans du sang provenant de population de travailleurs. Cette étude serait très pertinente, car il n'y a eu récemment que très peu d'avancement dans le domaine de la surveillance biologique du Be (Apostoli et Schaller, 2001) et pourrait apporter des nouveaux indices sur l'exposition des travailleurs. Deuxièmement, il est reconnu que le dosage du Be dans les poumons de personnes défuntés aide à distinguer entre l'atteinte de béryllose chronique ou de sarcoïdose pulmonaire. Cette distinction ne serait pas évidente sans cette analyse (Verma, 2003) et les méthodes développées s'appliquent très bien à cette matrice. Les LDM très basses obtenues pourraient aider à distinguer des cas qui auparavant n'étaient pas détectés.

Également, les méthodes sont efficaces pour plusieurs matrices biologiques et pourraient, sans trop d'effort, être appliquées à l'analyse du Be dans plusieurs autres milieux biologiques ou organiques.

APPENDICE A

CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

A.1	Charte de contrôle pour les valeurs obtenues pour le MRC Seronorm ^{MC} avec la méthode A	110
A.2	Charte de contrôle pour les valeurs obtenues pour le MRC Seronorm ^{MC} avec la méthode B	111
A.3	Suivi des données obtenues pour le dosage des solutions de contrôle de la qualité avec la méthode A lors de l'analyse des échantillons provenant de souris exposées	112
A.4	Suivi des données obtenues pour le dosage des solutions de contrôle de la qualité avec la méthode B lors de l'analyse des échantillons provenant de souris exposées	114

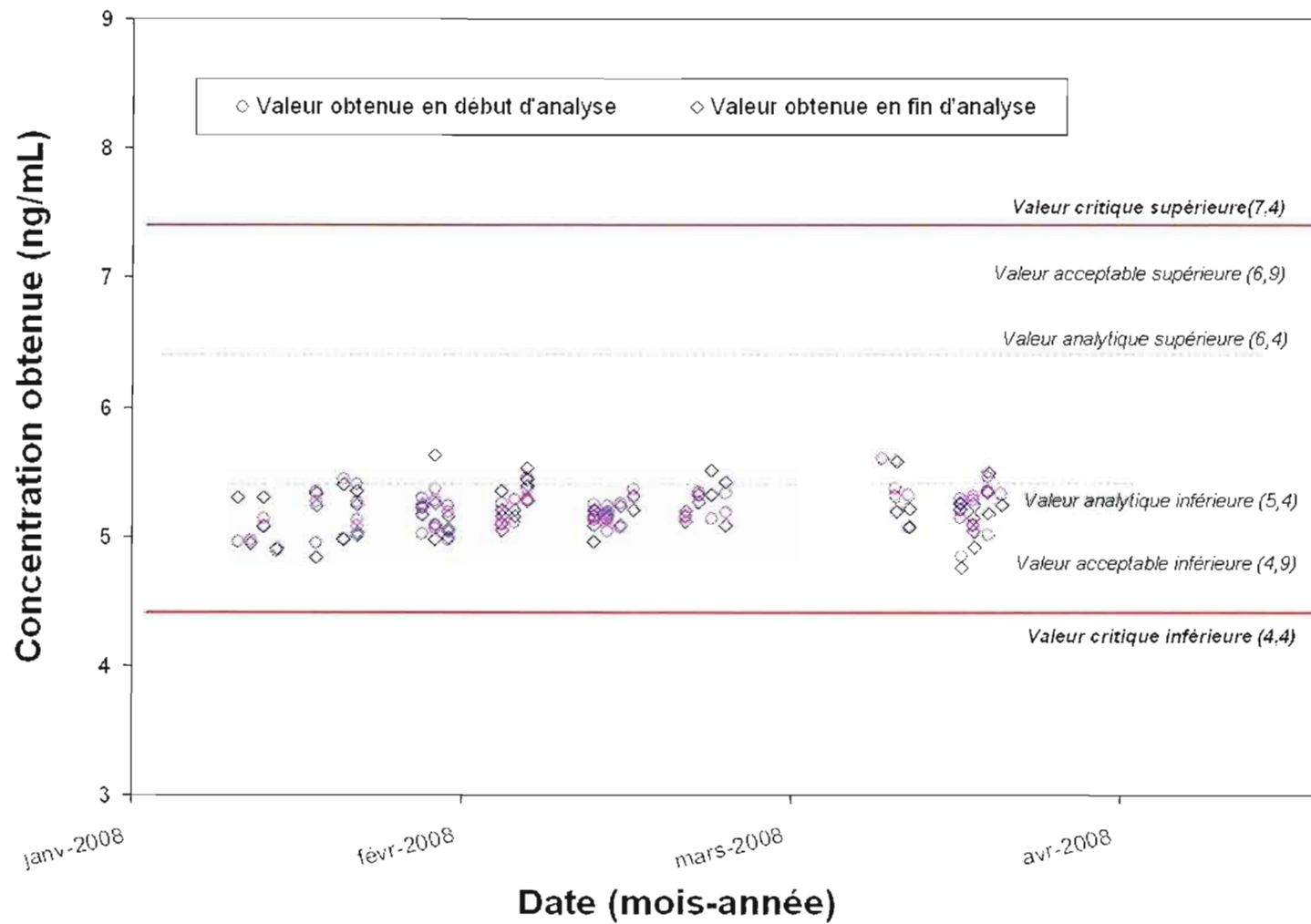


Figure A.1 : Charte de contrôle pour les valeurs obtenues pour le MRC Seronorm^{MC} avec la méthode A

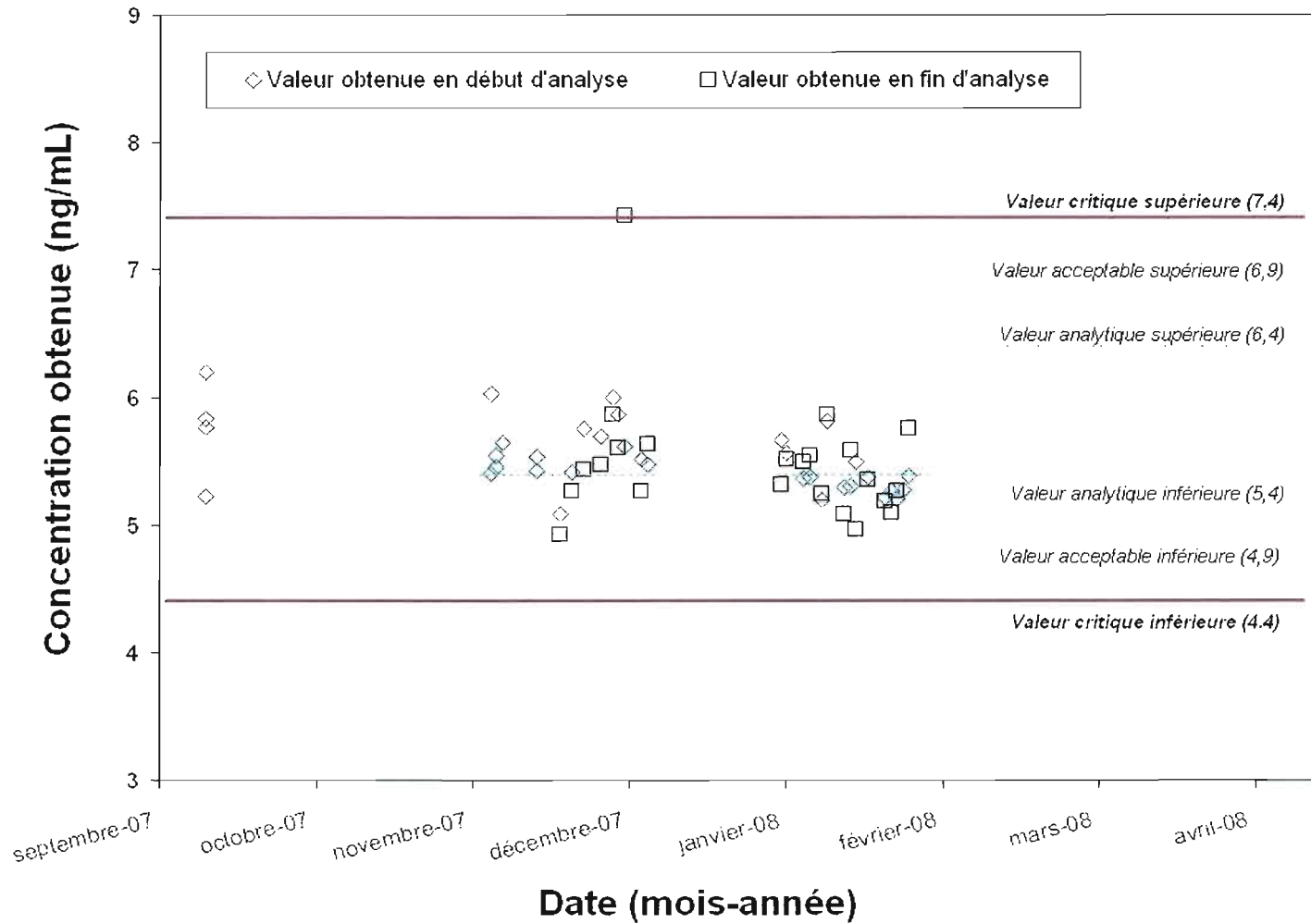


Figure A.2 : Charte de contrôle pour les valeurs obtenues pour le MRC Seronorm^{MC} avec la méthode B

Tableau A.3: Suivi des données obtenues pour le dosage des solutions de contrôle de la qualité avec la méthode A lors de l'analyse des échantillons provenant de souris exposées

Date d'analyse	Valeur acceptable (ng/mL)			Valeur acceptable pour le coefficient de détermination (R ²) > 0,990
	basse VEI 0,45 - 0,55	haute VEI 1,35 - 1,65	VLQ 0,0085 - 0,0115	
05/02/2008	0,46	1,39	0,0103	0,99996
06/02/2008	0,46	1,38	0,0096	0,99983
07/02/2008 (série 1)	0,46	1,40	0,0100	0,99992
07/02/2008 (série 2)	0,46	1,43	0,0096	0,99996
08/02/2008	0,48	1,43	0,0096	0,99993
11/02/2008 (série 1)	0,48	1,44	0,0106	0,99944
11/02/2008 (série 2)	0,48	1,42	0,0091	0,99956
11/02/2008 (série 3)	0,47	1,41	0,0097	0,99905
13/02/2008 (série 1)	0,47	1,42	0,0093	0,99998
13/02/2008 (série 2)	0,47	1,39	0,0094	0,99995
14/02/2008 (série 1)	0,47	1,40	0,0095	0,999998
14/02/2008 (série 2)	0,48	1,39	0,0097	0,99983
14/02/2008 (série 3)	0,47	1,41	0,0097	0,99994
14/02/2008 (série 4)	0,49	1,41	0,0099	0,99996
19/02/2008 (série 1)	0,48	1,42	0,0096	0,99995
19/02/2008 (série 2)	0,48	1,43	0,0091	0,99999
19/02/2008 (série 3)	0,47	1,40	0,0095	0,99996
19/02/2008 (série 4)	0,47	1,39	0,0100	0,99994
20/02/2008 (série 1)	0,48	1,41	0,0102	0,99998
20/02/2008 (série 2)	0,47	1,44	0,0095	0,99991
20/02/2008 (série 3)	0,48	1,42	0,0101	0,99982
20/02/2008 (série 4)	0,47	1,41	0,0106	0,99995
21/02/2008 (série 1)	0,47	1,41	0,0086	0,99989
21/02/2008 (série 2)	0,47	1,44	0,0101	0,99974
21/02/2008 (série 3)	0,47	1,42	0,0097	0,99993
21/02/2008 (série 4)	0,47	1,41	0,0088	0,99994
25/02/2008 (série 1)	0,48	1,44	0,0092	0,99997
25/02/2008 (série 2)	0,47	1,43	0,0097	0,99994
25/02/2008 (série 3)	0,47	1,44	0,0103	0,99998
25/02/2008 (série 4)	0,47	1,42	0,0088	0,99999
26/02/2008 (série 1)	0,47	1,44	0,0100	0,99994
26/02/2008 (série 2)	0,47	1,42	0,0094	0,99990
27/02/2008 (série 1)	0,47	1,44	0,0090	0,99996
27/02/2008 (série 2)	0,48	1,44	0,0095	0,99997
27/02/2008 (série 3)	0,47	1,41	0,0103	0,99997
27/02/2008 (série 4)	0,48	1,43	0,0101	0,99996

Tableau A.3 (suite)

Date d'analyse	Valeur acceptable (ng/mL)			Valeur acceptable pour le coefficient de détermination (R ²) > 0,990
	basse VEI 0,45 - 0,55	haute VEI 1,35 - 1,65	VLQ 0,0085 - 0,0115	
03/03/2008 (série 1)	0,48	1,40	0,0096	0,99998
03/03/2008 (série 2)	0,47	1,42	0,0096	0,99996
03/03/2008 (série 3)	0,47	1,41	0,0093	0,99993
03/03/2008 (série 4)	0,47	1,41	0,0097	0,99993
04/03/2008 (série 1)	0,47	1,42	0,0091	0,99996
04/03/2008 (série 2)	0,48	1,43	0,0096	0,99991
04/03/2008 (série 3)	0,47	1,42	0,0085	0,99998
04/03/2008 (série 4)	0,48	1,42	0,0083	0,99998
05/03/2008 (série 1)	0,48	1,45	0,0088	0,99999
05/03/2008 (série 2)	0,48	1,43	0,0087	0,99992
06/03/2008 (série 1)	0,47	1,43	0,0089	0,99991
06/03/2008 (série 2)	0,48	1,43	0,0088	0,99999
10/03/2008 (série 1)	0,47	1,42	0,0095	0,99995
10/03/2008 (série 2)	0,47	1,41	0,0088	0,99995
11/03/2008 (série 1)	0,48	1,44	0,0091	0,99996
11/03/2008 (série 2)	0,48	1,41	0,0095	0,99998
12/03/2008 (série 1)	0,47	1,42	0,0090	0,99999
12/03/2008 (série 2)	0,48	1,41	0,0095	0,99998
13/03/2008 (série 1)	0,47	1,44	0,0098	0,99993
13/03/2008 (série 2)	0,48	1,41	0,0101	0,99995
25/03/2008 (série 1)	0,47	1,42	0,0090	0,99995
26/03/2008 (série 1)	0,48	1,40	0,0090	0,99993
26/03/2008 (série 2)	0,47	1,43	0,0088	0,99998
27/03/2008 (série 1)	0,47	1,39	0,0097	0,99999
27/03/2008 (série 2)	0,47	1,41	0,0090	0,99998
31/03/2008 (série 1)	0,47	1,41	0,0098	0,99998
31/03/2008 (série 2)	0,47	1,41	0,0097	0,99997
31/03/2008 (série 3)	0,48	1,42	0,0088	0,99983
31/03/2008 (série 4)	0,47	1,43	0,0102	0,99984
01/04/2008 (série 1)	0,48	1,41	0,0092	0,99994
01/04/2008 (série 2)	0,47	1,41	0,0092	0,99998
01/04/2008 (série 3)	0,48	1,40	0,0088	0,99984
01/04/2008 (série 4)	0,48	1,42	0,0098	0,99996
02/04/2008 (série 1)	0,47	1,42	0,0094	0,99999
02/04/2008 (série 2)	0,48	1,42	0,0102	0,99997
02/04/2008 (série 3)	0,48	1,42	0,0099	0,99983
02/04/2008 (série 4)	Erreur	1,41	0,0094	0,99995
03/04/2008 (série 1)	0,48	1,44	0,0097	0,99996

Tableau A.4: Suivi des données obtenues pour le dosage des solutions de contrôle de la qualité avec la méthode B lors de l'analyse des échantillons provenant de souris exposées

Date d'analyse	Valeur acceptable (ng/mL)			Valeur acceptable pour le coefficient de détermination (R^2) > 0,990
	basse VEI 0,45 - 0,55	haute VEI 1,35 - 1,65	VLQ 0,0085 - 0,0115	
03/12/2007	0,46	1,45	0,0087	0,99950
05/12/2007	0,47	1,45	0,0088	0,99989
07/12/2007	0,50	1,49	0,0112	0,99981
10/12/2007	0,47	1,45	0,0092	0,99986
12/12/2007	0,52	1,55	0,0110	0,99993
13/12/2007	0,48	1,47	0,0090	0,99998
14/12/2007	0,49	1,47	0,0104	0,99985
17/12/2007	0,49	1,46	0,0111	0,99987
18/12/2007	0,51	1,48	0,0102	0,99990
10/01/2008	0,48	1,46	erreur	0,99985
11/01/2008	0,46	1,41	0,0106	0,99977
14/01/2008	0,47	1,45	0,0113	0,99993
15/01/2008	0,48	1,45	0,0112	0,99989
17/01/2008	0,48	1,46	0,0114	0,99997
18/01/2008	0,47	1,44	0,0114	0,99994
21/01/2008	0,48	1,43	0,0101	0,99998
22/01/2008	0,47	1,42	0,0113	0,99998
23/01/2008	0,47	1,41	0,0112	0,99994
25/01/2008	0,47	1,43	0,0101	0,99989
28/01/2008	0,47	1,43	0,0106	0,99989
29/01/2008	0,48	1,43	0,0114	0,99964
30/01/2008	0,49	1,45	erreur	0,99994
31/01/2008	0,49	1,43	0,0112	0,99990
01/02/2008	0,48	1,42	0,0102	0,99995

BIBLIOGRAPHIE

Agency for toxic substances and disease registry (ATSDR). 2002. «Toxicological profile for beryllium». U.S. Department of health and human services, 270 p.

Aller, A.J. 1990. «The clinical significance of beryllium». *Journal of trace elements and electrolytes in health and disease*, vol. 4, no. 1, p. 1-6

Angerer, Jürgen et Karl-Heinz Schaller. 2003. *Digestion procedures for the determination of metals in biological materials*. Volume 8 de *Analyses of hazardous substances in biological materials*. Bonn (Allemagne): WILEY-VCH, 330 p.

Apostoli, P. et K.H. Schaller. 2001. «Urinary beryllium - a suitable tool for assessing occupational and environmental beryllium exposure?». *International archives of Occupational and Environmental health*, vol. 74, p. 162-166

Ashley, Kevin, Michael J. Brisson et Steven D. Jahn. 2006. «Standard methods for beryllium sampling and analysis: Availabilities and needs» *Journal of ASTM international*, vol. 3, no. 1 (janvier), p. 15-26

Bartley, D.L. 2004. «Analytical performance criteria – reconciling traditional accuracy assessment with the ISO guide to the expression of uncertainty in measurement (ISO/GUM) », *Journal of occupational and environmental hygiene*, 1:D37-D41

Barnett V. et T. Lewis. 1994. *Outliers in statistical data*. 3^e Edition, Angleterre : Wiley, 604 p.

Begerow, J., M. Turfeld et L. Dunemann. 2000. «New horizons in human biomonitoring of environmentally and occupationally relevant metals – sector-field ICP-MS versus electrothermal AAS». *Journal of atomic spectrometry*, vol. 15, p. 347-352

Brisson, Michael J., Amy A. Ekechukwu, Kevin Ashley et Steven D. John. 2006. «Opportunity for standardization of beryllium sampling and analysis». *Journal of ASTM international*, vol. 3, no. 1, p. 3-14

Busch, Ken. 2004. «Space charge in mass spectrometry». *Spectroscopy*, vol. 19, no. 6, p. 35-38

Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ). 2002. *Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie*, document DR-12-VMC, 27 p.

Chiarappa-Zucca, Marina L., Robert C. Finkel, Roger E. Martinelli, Jeffery E. McAninch, David O. Nelson et Kenneth W. Turteltaub. 2004. «Measurement of beryllium in biological samples by accelerator mass spectrometry : Applications for studying chronic beryllium disease» *Chemical research in toxicology*, vol. 17 p. 1614-1620

de Boer, Jan L.M., Rob Ritsema, Sjoerd Piso, Hans van Staden et Wilbert van den Beld. 2004. «Practical and quality-control aspects of multi-element analysis with quadrupole ICP-MS with special attention to urine and whole blood». *Analytical and bioanalytical chemistry*, no. 379, p. 872-880

de Hoffman, Edmond et Vincent Stroobant. 2005. *Spectrométrie de masse*. 3^e édition. Paris: Dunod, 425 p.

Delves, Trevor. 1999. «Valid analytical measurements in clinical applications of ICP-MS». *VAM bulletin*, no. 20, p. 16-21

Dion, Chantal. 2007. «Beryllium in the workplace : Québec's plan». Philadelphie : *The 3rd annual international conference on beryllium disease*, 16-19 octobre, 17 p.

Donaldson, Ken et Paul Borm. 2007. *Particle toxicology*. Floride : CRC Press, 434 p.

Engström, Emma, Anna Stenberg, Svetlana Senioukh, Roland Edelbro, Douglas C. Baxter et Ilia Rodushkin. 2004. «Multi-elemental characterization of soft biological tissues by inductively coupled plasma-sector field mass spectrometry». *Analytica chimica acta*, vol. 151, p. 123-135

Finch, Gregory L., James A. Mewhinney, Arthur F. Edison, Mark D. Hoover et Simon J. Rothenberg. 1988. «In vitro dissolution characteristics of beryllium oxide and beryllium metal aerosols». *Journal of aerosol science*, Vol. 19, no. 3, p. 333-342

Goullé, Jean-Pierre, Loïc Mahieu, Julien Castermant, Nicolas Neveu, Laurent Bonneau, Gilbert Lainé, Daniel Bouige et Christian Lacroix. 2005. «Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair». *Forensic science International*, no. 153, p. 39-44

Goullé, Jean-Pierre, Loïc Mahieu, Nicolas Neveu, Daniel Bouige, Julien Castermant, Gilbert Laine, Marie-Pascale Nouveau, Roseline Gehanne et Christian Lacroix. 2004. «Dosage multiélémentaire des métaux et métalloïdes dans les milieux biologiques par ICP-MS : valeurs usuelles chez 100 témoins». *Annales de toxicologie analytique*, vol. 16, no. 4, p. 261-268

Heitland, Peter et Helmut D. Köster. 2006. «Biomonitoring of 37 trace elements in blood samples from inhabitants of northern Germany by ICP-MS». *Journal of trace elements in medicine and biology*, no. 20, p. 253-262

Henneberger, Paul K., Debra Cumro, David D. Deubner, Michael S. Kent, Michael McCawley et Kathleen Kreiss. 2001. «Beryllium sensitization and disease among long-term and short-term workers in a beryllium ceramics plant». *International archives of Occupational and Environmental health*, vol. 74, p. 167-176

Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et sécurité du travail (IRSST). 2006a «Développement, mise au point et validation d'une méthode analytique», Document I-G-020, 15 p.

Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et sécurité du travail (IRSST). 2006b «Lavage de la verrerie». Document I-G-006, 4 p.

Institut national de santé publique du Québec (INSPQ). 2004. «Le test sanguin de prolifération lymphocytaire au béryllium (BeLPT)». Santécom, INSPQ-2004-018, 71 p.

International Organization for Standardization (ISO). 1992. *Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM)*, Genève : ISO, 91 p.

Kennedy, E.R., T.J. Fischbach, R. Song, P.M. Eller et S.A. Shulman. 1994 « Guidelines for air sampling and analytical method development and evaluation », *NIOSH technical report*, 160 p.

Kent, Michael S., Thomas G. Robins et Amy K. Madl . 2001. «Is total mass or mass of alveolar-deposited airborne particles of beryllium a better predictor of the prevalence of disease? A preliminary study of a beryllium processing facility». *Applied occupational and environmental hygiene*, vol. 16, no. 5, p.539-558

Kolanz, Marc E. 2001. «Introduction to beryllium: Uses, regulatory history, and disease». *Applied occupational and environmental hygiene*, vol. 16, no. 5, p. 559-567

Krachler, M. et K.J. Irgolic. 1999. «The potential of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the simultaneous determination of trace elements in whole blood, plasma and serum». *Journal of trace element in medicine and biology*, vol.13, p. 157-169

Kreiss, Kathleen, Margaret M. Mroz, Boguang Zhen, John W. Martyny et Lee S. Newman. 1993. «Epidemiology of beryllium sensitization and disease in nuclear workers». *American review of respiratory disease*, vol. 148, p. 985-991

Kutner, Michael H., Christopher J. Nachtsheim, John Neter et William Li. 2005. *Applied linear statistical models*. 5^e édition. New York: McGraw-Hill Irwin, 1396 p.

- Maier, Lisa A. 2001. «Beryllium health effects in the era of the beryllium lymphocyte proliferation test». *Applied occupational and environmental hygiene*, vol. 16, no. 5, p. 514-520
- Marieb, Elaine N. 2000. *Biologie humaine*. 6^e édition. Saint-Laurent : Renouveau pédagogique, 542 p.
- Martyny, John W., Mark D. Hoover, Margaret M. Mroz, Kimberly Ellis, Lisa A. Maier, Karen L. Sheff, Lee S. Newman. 2000 «Aerosols generated during beryllium machining». *Journal of occupational and environmental medicine*, vol. 42, no. 1, p. 8-18
- McCawley, Michael A., Michael S. Kent et Michael T. Berakis. 2001. «Ultrafine beryllium number concentration as a possible metric for chronic beryllium disease risk». *Applied occupational and environmental hygiene*, vol. 16, no. 5, p. 631-638
- McCurdy, Ed. et Don Potter. 2001. «Optimising ICP-MS for the determination of trace metals in high matrix samples». *Spectroscopy Europe*, vol. 13, no. 3, p.14-20
- Meehan, W.R. et L.E. Smythe. 1967. «Occurrence of beryllium as a trace element in environmental materials». *Environmental Science & Technology*, vol. 1, p. 839-844
- Mesko, Márcia Foster, Diogo Pompéu de Moraes, Juliano Smanioto Barin, Valderi Luiz Dressler, Günter Knapp et Érico Marlon de Moraes Flores. 2006. «Digestion of biological materials using the microwave-assisted sample combustion technique». *Microchemical Journal*, vol. 82, p. 183-188
- Moesch, Christian. 2007. «Utilisation de l'ICP-MS en biologie clinique». *Annales de toxicologie analytique*, vol. 19, no. 1, p. 11-21
- Miller, James N. et Jane C. Miller. 2005. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. 5^e édition. Angleterre : Pearson, 268 p.
- Montaser, Akbar et D.W. Golightly.1987. *Inductively coupled plasmas in analytical atomic spectrometry*. New York: editions VCH, 660 p.
- National institute for occupational safety and health (NIOSH). 1994. «ELEMENTS in blood or tissue (8005)». *NIOSH manual of analytical methods*, 4^e édition, 6 p.
- Newman, Lee S., Margaret M. Mroz, Ronald Balkissoon et Lisa A. Maier. 2005. «Beryllium sensitisation progresses to chronic beryllium disease». *American journal of respiratory and critical care medicine*, vol. 171, p. 54-60
- Occupational safety and health administration (OSHA). 2003 «Evaluation guidelines for air sampling methods utilizing chromatographic analysis», *Industrial hygiene chemistry division*, 47 p.

Paustenbach, Dennis J., AmyK. Madl et Jessica F. Greene. 2001. «Identifying an appropriate occupational exposure limit (OEL) for beryllium : Data gaps and current research initiatives». *Applied occupational and environmental hygiene*, vol. 16, no. 5, p. 527-538

Perkin Elmer. s.d. «Inductively coupled plasma mass spectrometry with ELAN software». NO220008 Rev. B, 339 p.

Québec, Commission de la santé et de la sécurité au travail (CSST). 2008. *Règlement sur la santé et la sécurité du travail (RSST)*. L.R.Q. c. S-2.1, r.19.01 Québec: Éditeur officiel du Québec

Ratney, Ronald S. 2001. «Is beryllium disease a fossil? - Not yet», *International archives of Occupational and Environmental health*, vol. 74, p. 159-161

Rhoads, K. et Sanders, C.L. 1985. «Lung clearance, translocation, and acute toxicity of arsenic, beryllium, cadmium, cobalt, lead, selenium, vanadium, and ytterbium oxides following deposition in rat lung» *Environmental Research*, vol. 36, p. 359-378

Roberge, Brigitte, Jan-Érik Deadman, Michel Legris, Luc Ménard et Marc Baril. 2004. *Manuel d'hygiène du travail : Du diagnostic à la maîtrise des facteurs de risque*, Montréal : Modulo-Griffon, 738 p.

Rodushkin, Iliia, Fredrik Ödman et Stefan Branth. 1999. «Multielement analysis of whole blood by high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry». *Fresenius journal of analytical chemistry*, no. 364, p. 338-346

Rodushkin, Iliia, Fredrik Ödman, Richard Olofsson et Mikael D. Axelsson. 2000. «Determination of 60 elements in whole blood by sector field inductively coupled plasma mass spectrometry». *Journal of analytical atomic spectrometry*, no. 15, p. 937-944

Rosner, Bernard. 2006. *Fundamentals of biostatistics*. 6^e édition. Californie: Thomson Brooks/Cole, 876 p.

Rossmann, Milton D. 2001. «Chronic beryllium disease : A hypersensitivity disorder». *Applied occupational and environmental hygiene*, vol. 16, no. 5, p. 615-618

Sanderson, Wayne T., Paul K. Henneberger, John Martyny, Kimberly Ellis, Margaret M. Mroz et Lee S. Newman. 1999. «Beryllium contamination inside vehicles of machine shop workers». *Applied Occupational and Environmental Hygiene*, vol. 14, p. 223-230

Stefaniak, A.B., R.A. Guilmette, G.A. Day, M.D. Hoover, P.N. Breyse et R.C. Scripsick. 2005. «Characterization of phagolysosomal simulant fluid for study of beryllium aerosol particle dissolution». *Toxicology in Vitro*, vol. 19, p.123-134

Stefaniak, A.B., M.D. Hoover, G.A. Day, A.A. Ekechukwu, G.E. Whitney, C.A. Brink et R.C. Scripsick. 2006. «Characteristics of beryllium oxide and beryllium metal powders for use as reference materials» *Journal of ASTM international*, vol. 3 no. 1 (janvier), p. 47-61

Stewart, Ian I. et John W. Olesik. 1999. «Time-resolved measurements with single droplet introduction to investigate space-charge effects in plasma mass spectrometry». *Journal of American society for mass spectrometry* vol. 10, p. 159-174

Stiefel, T., K. Schulze, H. Zorn et G. Tölg. 1980. «Toxicokinetic and toxicodynamic studies of beryllium». *Archives of toxicology*, vol. 45, p. 81-92

Takahashi, Junichi et Kouichi Youno. 2003. «Analysis of impurities in semiconductor grade sulfuric acid using the agilent 7500cs ICP-MS». *Agilent Technologies*, 6 p.

Taylor, Barry N. et Chris E. Kuyatt. 1994. «Guidelines for evaluating and expressing the uncertainty of NIST measurement results». NIST technical note 1297, 20 p.

Taylor, Howard E.. 2001. *Inductively coupled plasma-mass spectrometry : Practices and techniques*. San Diego : Academic Press, 294 p.

Taylor, John Keenan, 1987, *Quality assurance of chemical measurements*, Boca Raton (FL) : Lewis Publishers, 352 p.

Thomas, Robert. 2004. *Practical guide to ICP-MS*. New York : Marcel Dekker, 324 p.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1996. «EPA method 3052: Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices». CD-ROM: Revision 0, 20 p.

United States Fish & Wildlife Service (USFWS). visité le 6 juin 2006. «Trace Element Research Laboratory (TERL)». http://www.fws.gov/chemistry/methods_terl_lab.htm

Verma, D.K., A.C. Ritchie et M.L. Shaw. 2003. «Measurement of beryllium in lung tissue of a chronic beryllium disease case and cases with sarcoidosis». *Occupational medicine*, vol. 53, p. 223-227

Wang, Jiansheng, Wei-Lung Shen, Brenda S. Sheppard, E. Hywel Evans, Joseph A. Caruso et Fred L. Fricke. 1990. «Effect of ion-lens tuning and flow injection on non-spectroscopic matrix interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry». *Journal of analytical atomic spectrometry*, vol. 5, p. 445-449

Watters, Robert L. Jr., Mark D. Hoover, Gregory A. Day et Aleksandr B. Stefaniak. 2006. «Opportunity for development of reference materials for beryllium». *Journal of ASTM international*, vol. 3, no. 1, p.29-46

World health organization (WHO). 2001. «Beryllium and beryllium compounds». Genève : Concise international chemical assessment document 32, 72 p.

Zayed, Joseph, Bruce Mazer, Gaston Chevalier, Ginette Truchon, Gilles L'Esperance, Suzanne Philippe, Pierre Larivière, Yves Cloutier et Lise Gareau. 2004. «Évaluation de la toxicité du béryllium en fonction de la forme chimique et de la taille des particules». Projet IRSST no. 099-320 (en cours), 18 p.