

# Localisation et quantification de l'uranium dans les structures rénales de rongeurs exposés au nitrate d'uranyle par la technique LA-ICP-MS

**Spect'Atom 2019**  
**25-28 Juin 2019**  
**Montréal (Canada)**

Nagore GRIJALBA  
Alexandre LEGRAND  
Valérie HOLLER  
Céline BOUVIER-CAPELY

PSE-SANTE/SESANE/LRSI

MEMBRE DE

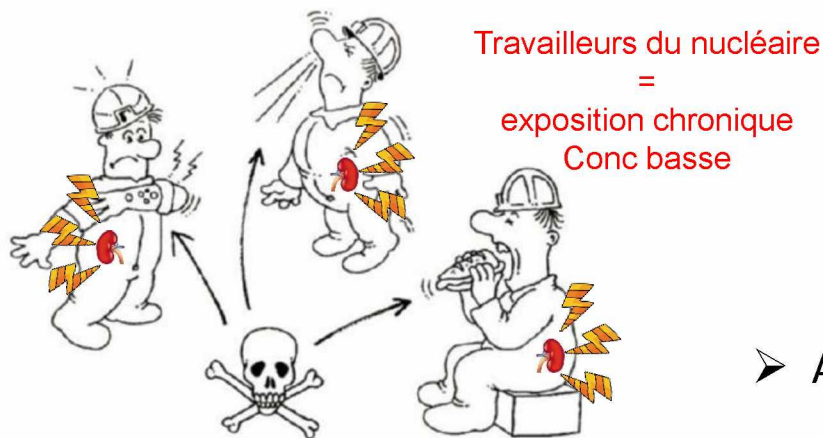
**ETSON**

EUROPEAN  
TECHNICAL SAFETY  
ORGANISATIONS  
NETWORK



# Uranium et Cancer du rein, un lien suspecté

## Données épidémiologiques et expérimentales



## Contamination à l'uranium (respiratoire, digestive, cutanée)

- Accumulation préférentielle dans le rein et le TCP (Tube Contourné Proximal)

[Tessier et al, 2012; Poisson et al, 2014; Homma-Takeda et al, 2015]

*Surmortalité par cancer du rein constatée dans une étude épidémiologique de mineurs d'uranium*

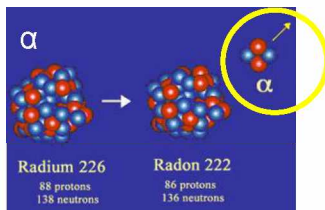
[Leuraud et al., 2011]

*Association entre exposition à l'uranium et cancer du rein controversée*

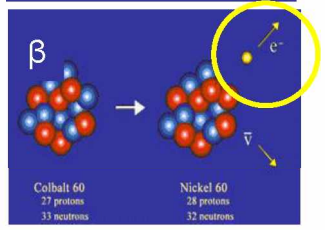
[Boice et al, 2018; Drubay et al., 2014; Ellis et al, 2018; Yiin et al, 2017; 2018]

*Manque des études...*

Energie des  $\alpha$ :  
4 MeV – 9 MeV



Energie des  $\beta$ :  
10 keV- 3 MeV

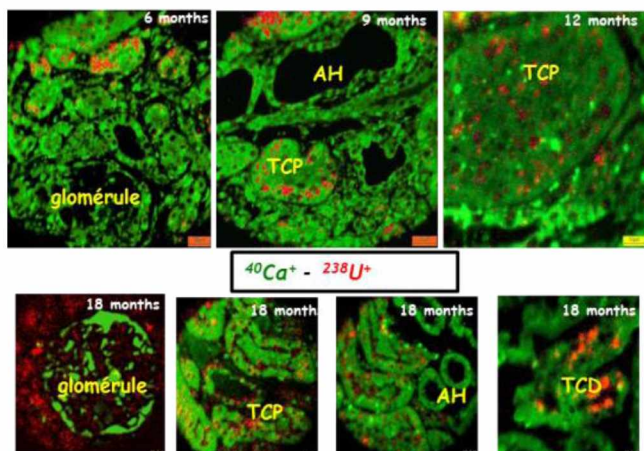


Energie des  $\gamma$ :  
60 keV – 3 MeV

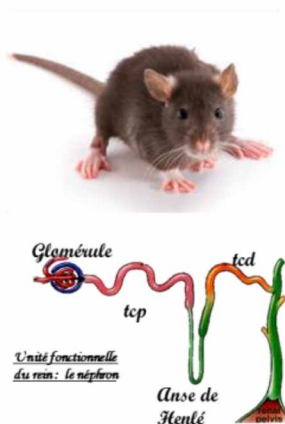


# Imagerie de la distribution d'uranium par SIMS

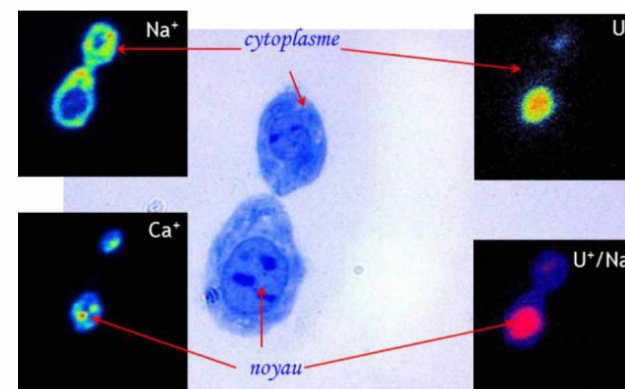
## EX-VIVO



C. Tessier, D. Suhard *et al.*  
*Microscopy and Microanalysis*, 18, 123-133 (2012)



## IN-VITRO



C. Rouas, D. Suhard *et al.*  
*Chem. Res. Toxicol.* 23(12), 1883-1189 (2010)

Y. Gueguen, D. Suhard *et al.*  
*Toxicology in vitro*, 30, 552-560 (2015)

Localisation préférentielle de U dans les TCP (cortex rénal)

Localisation préférentielle de U dans les noyaux dès 5 min d'exposition

Distribution **hétérogène** de l'U

**Cinétique très rapide**: entrée de l'U soluble au niveau cellulaire corrélée aux effets biologiques précoces

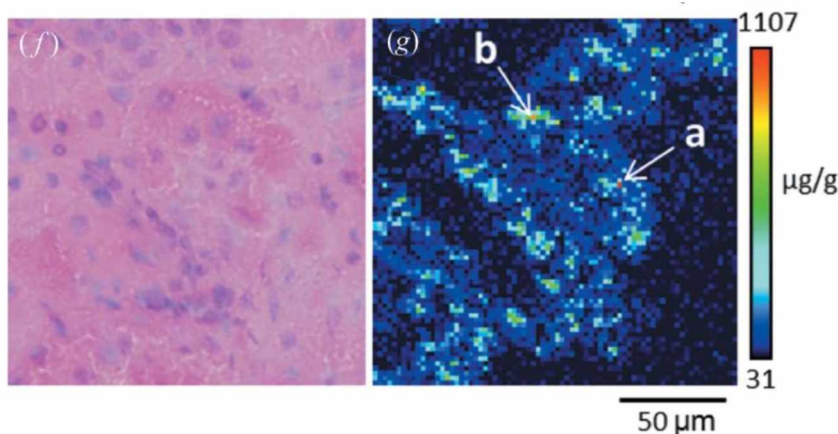
# Distribution d'uranium et quantification d'uranium

Très peu d'études



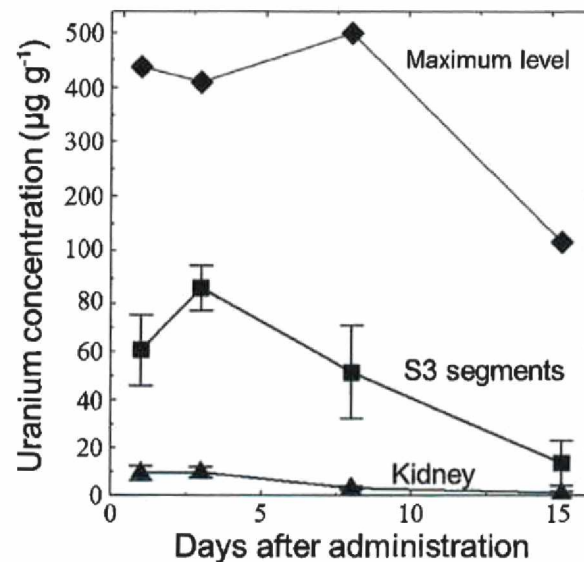
## ➤ Technique dérivée du SAX : $\mu$ XAFS

↪ Concentrations locales de U dans le rein



a, b : spots de U concentré

*Kitahara, J. Sync Rad, 2017*



*Homma-Takeda, J. Appl. Tox, 2015*

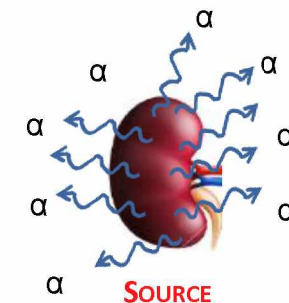
	Rein organe entier	Spots de U
Conc. U (µg/g)	8,9	948-1107



x 100 !!!

Quel impact sur l'organe?  
Risque d'effet cancérigène au niveau rénal

**Microdistribution et microquantification réaliste de U dans le rein**



## Ablation laser = technique d'échantillonnage

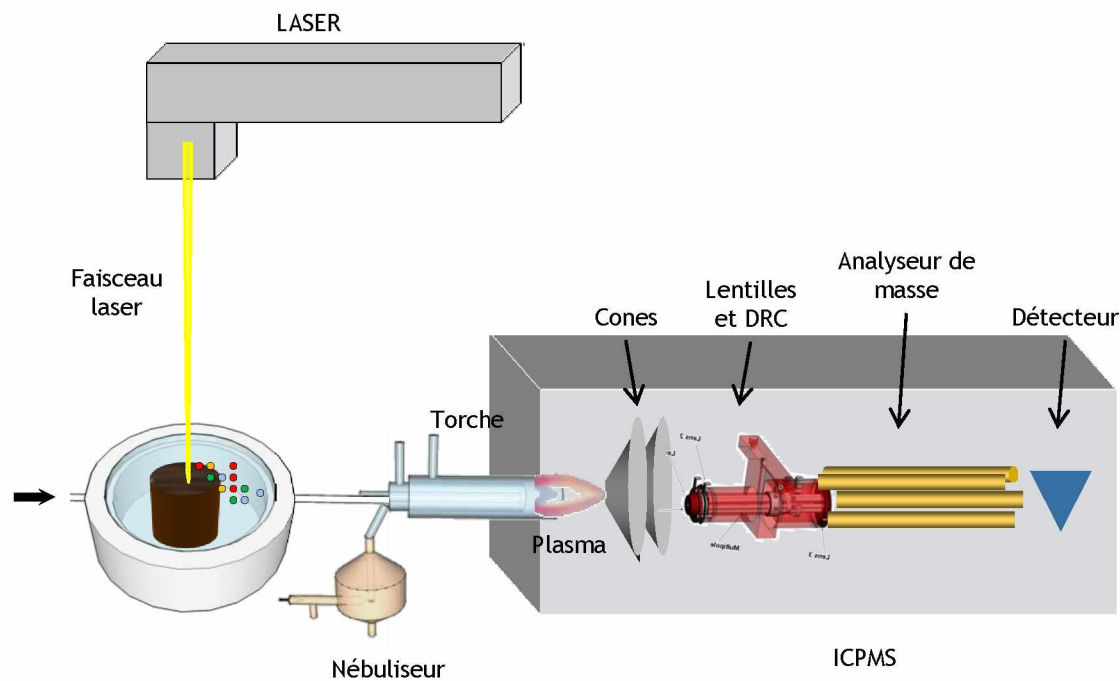


- ✓ Analyse directe de l'échantillon « sans » prétraitement
- ✓ Induit très peu ou pas de dégradation (dépend de l'échelle)
- ✓ Analyse à l'échelle micrométrique
- ✓ Quantification
- ✓ Faible risque de contamination



- ✓ Effets de matrice
- ✓ Manque d'étalons commercialisés

### Couplage Ablation Laser - Spectrométrie de Masse à Plasma Induit (LA-ICPMS)



## Quantification par LA-ICPMS: Etalonnage externe... avec étalon interne

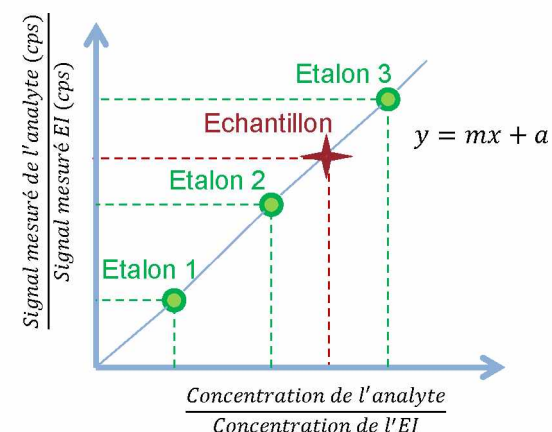
**Pourquoi** a t-on besoin d'un étalon interne?

- 1) Compenser l'effet matrice
- 2) Compenser les variations de la masse ablatée et transportée à l'ICP-MS
- 3) Compenser la dérive instrumentale pendant la journée d'analyse

**Caractéristiques** de l'étalon interne:

- 1) Se comporter d'une façon similaire à l'élément d'intérêt
- 2) Avoir une distribution homogène sur l'échantillon et l'étalonnage
- 3) Avoir une concentration connue (analyse ICP-MS, TOC, XRF...)

Construction d'une courbe d'étalonnage à partir des étalons avec une concentration connue



De façon générale, il s'agit d'un isotope minoritaire qui se trouve naturellement dans l'échantillon

Echantillons biologiques



$^{13}\text{C}$  ou  $^{43}\text{Ca}$

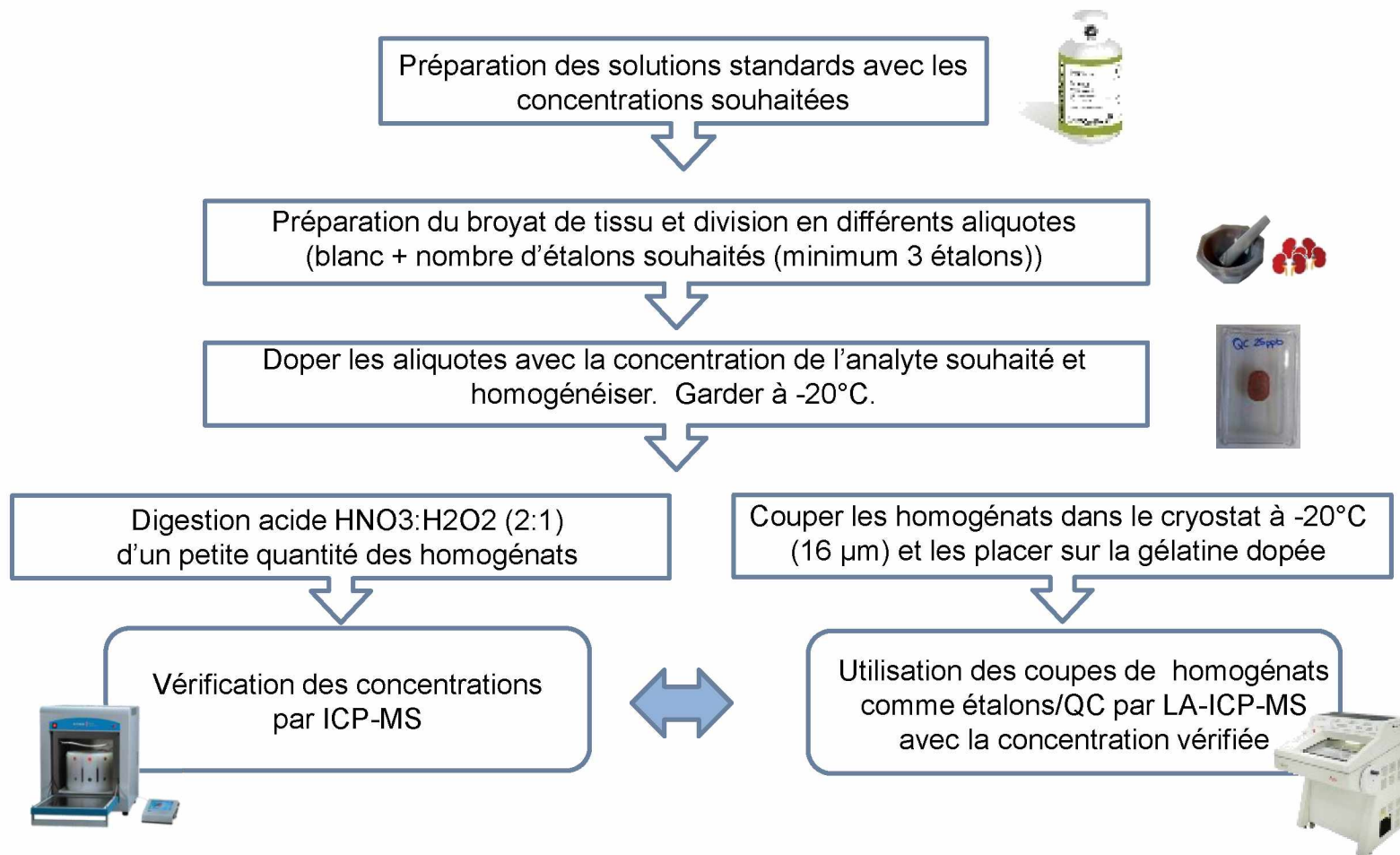
**Inconvénients:**

- 1) Bruit de fond parfois élevé quand il n'y pas d'ablation provenant des impuretés de l'argon, l'atmosphère et la ligne d'air
- 2) Masse atomique et premier potentiel d'ionisation (FIP = 11,26 eV) différents des autres éléments (FIP Uranium = 6,05 eV)
- 3) Distribution pas homogène à cause d'une distribution non-uniforme dans le tissu (eau)

C. Austin, F. Fryer et al. J. Anal. At. Spectrom., 2011

# Comment construire la courbe d'étalonnage pour la quantification?

## Etape 1 : Préparation des étalons matrix-matching et échantillons quality control (QC)



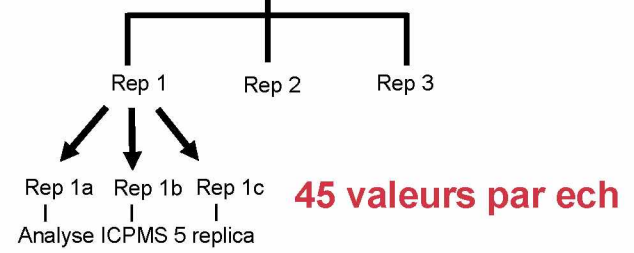
*Cette procédure est faite en double pour les étalons matrix-matched et les quality control (QC)*

*Quality control (QC): échantillons préparés avec une concentration de l'analyte connue pour valider l'exactitude et précision de la méthode analytique*

Guideline on bioanalytical method validation (EMA, 2018)

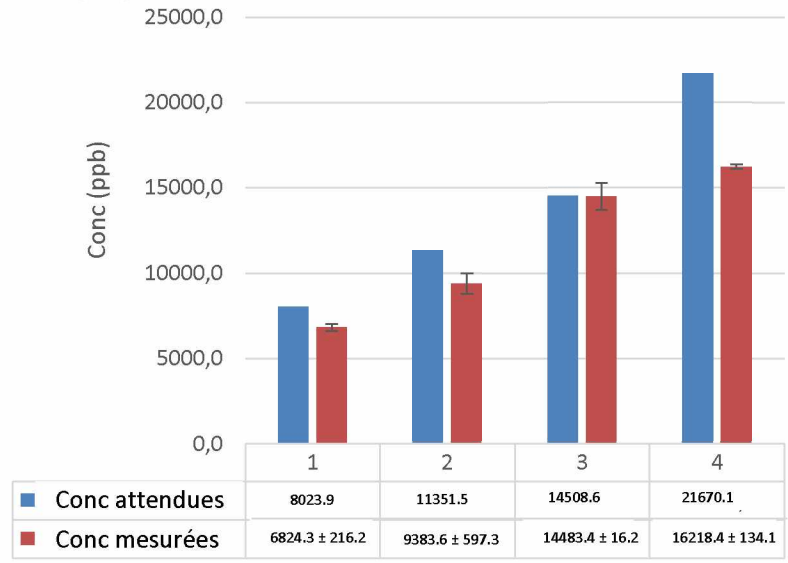
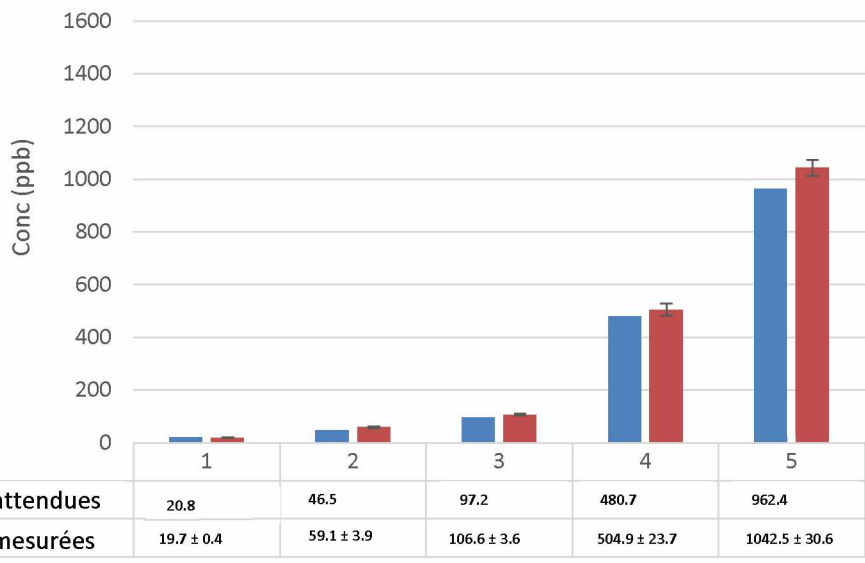


Division du broyat en aliquotes en fonction du nombre d'étalons souhaités et dopage selon la concentration fixée



Vérification de la *concentration réelle* d'uranium par ICPMS après digestion acide/ quantification *par dilution isotopique*

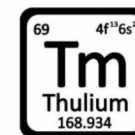
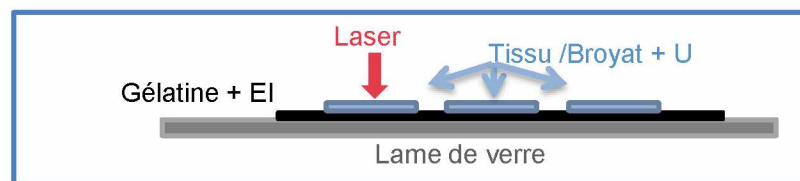
n=3



**Importance de valider les concentrations en ICPMS**

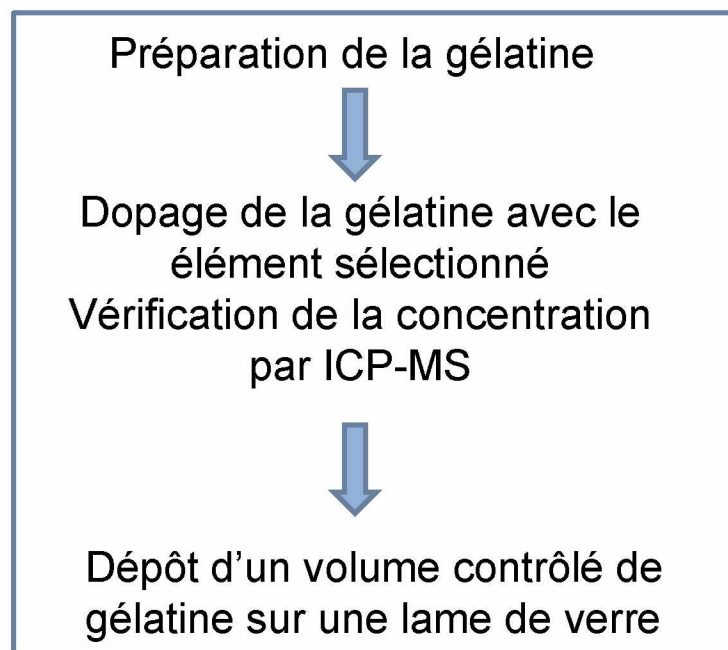


## Etape 2 : Inclusion de l'étalon interne qui sera ablaté en même temps que l'échantillon



First Ionisation Potential  $\approx 6.184$  eV

Gélatine dopée avec un élément pas présent dans l'échantillon avec propriétés similaires à l'analyte d'intérêt



Gélatine optimisée à 10%



Gélatine Type A  
X g

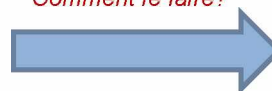


Etalon interne  
 $\approx \mu\text{L}$



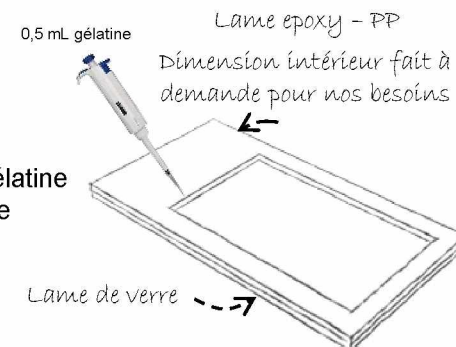
Eau Milli-Q  
100 - X g

Comment le faire?



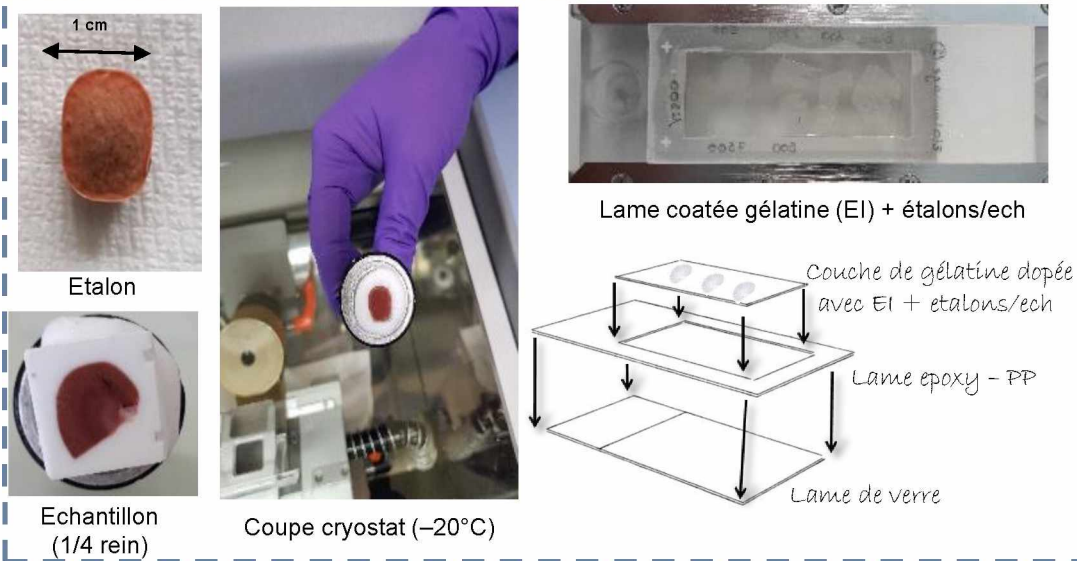
Agitation magnétique (80°C) douce pour éviter la formation de bulles

Dépôt d'une couche de gélatine sur une lame de verre

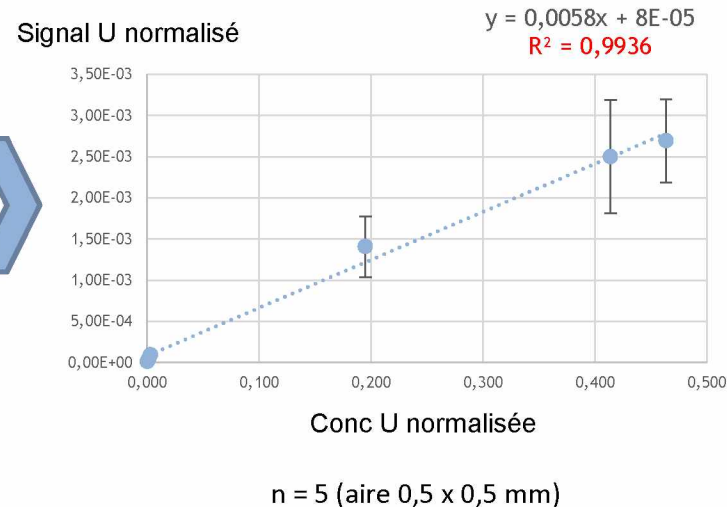


Séchage: 1h à température ambiante sur une surface plane.  
Maintenir à 4°C jusqu'à utilisation

Schéma général pour l'analyse quantitative  
LA-ICPMS des étalons/ech biologiques



Courbe d'étalonnage externe pour la quantification d'uranium



Quantification des Quality Control (QC)

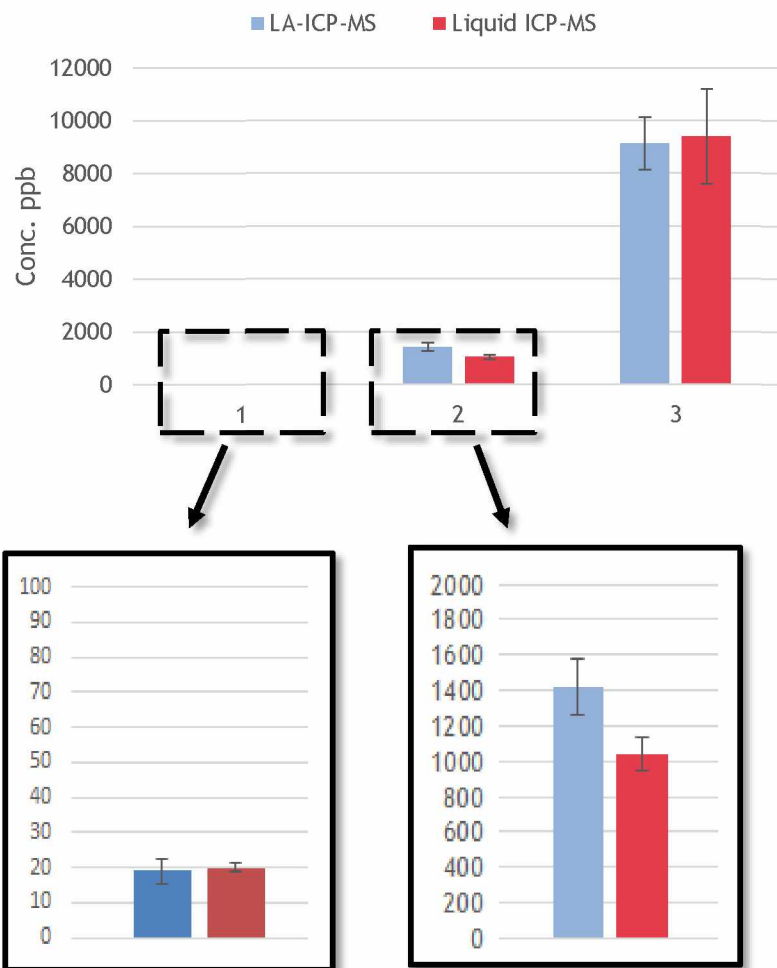
Pourquoi sont-ils nécessaires et comment sont-ils analysés?

**Guideline on bioanalytical method validation (EMA et FDA, 2018)**

- Échantillons dopés avec une concentration connue pour surveiller la performance de la méthode et garantir l'intégrité et validité des résultats
- Ils doivent tenir en compte la concentration attendue des échantillons
- Minimum 6 (low-, mid- and high-QC, en duplicata), intercalés dans la courbe d'étalonnage
- Analysés en triplicata

## Quantification des Quality Control (QC)

n = 3 (area 0,5 x 0,5 mm)

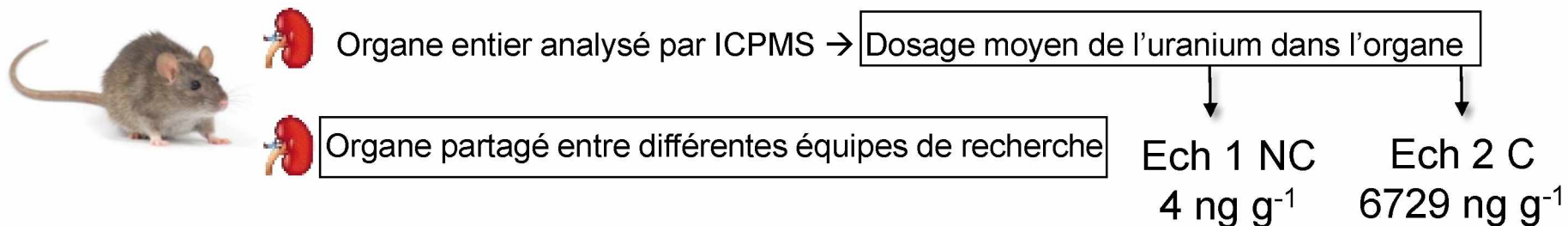


Le "re"calcul des concentrations des QC doit être entre 15-20% de sa valeur nominale (ID-ICPMS)

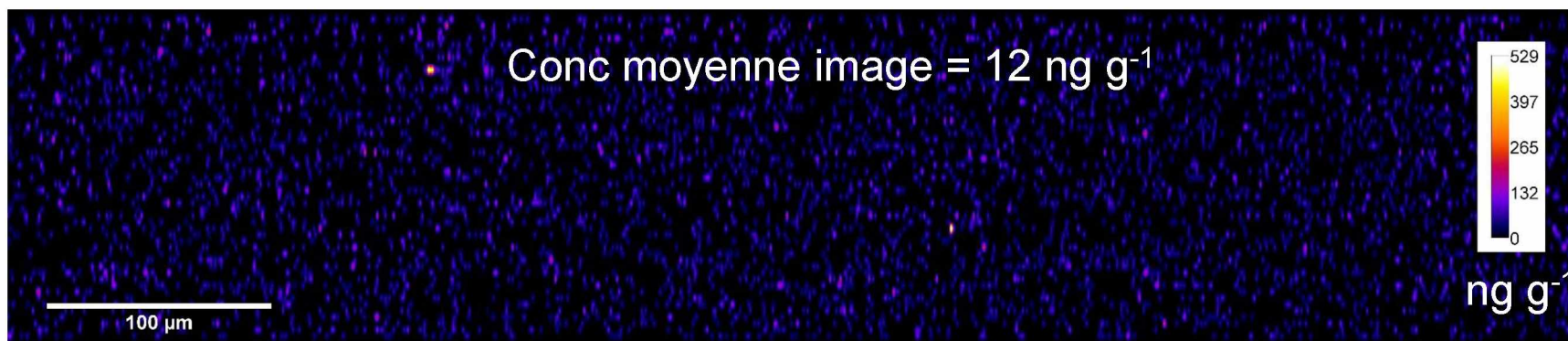
	Conc attendue ng g <sup>-1</sup> (Calculée par ID-ICPMS)	Conc obtenue ng g <sup>-1</sup> (Calculée par LA-ICPMS)
QC 1	20 ± 1	19 ± 3 (15% RSD)
QC 2	1042 ± 92	1420 ± 160 (11% RSD)
QC 3	9384 ± 1792	9128 ± 991 (10% RSD)

## Etape 3 : Application de la méthode à des échantillons réels – Partie 1

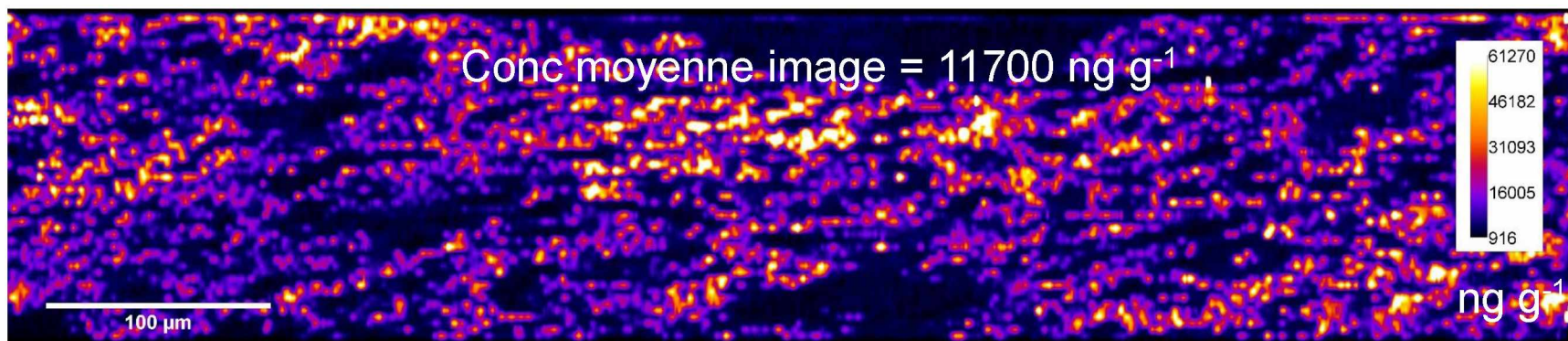
C. Poisson, J. Stefani et al. *Free Radical Research*, 48(10), 2014



Ech 1 NC - Cortex

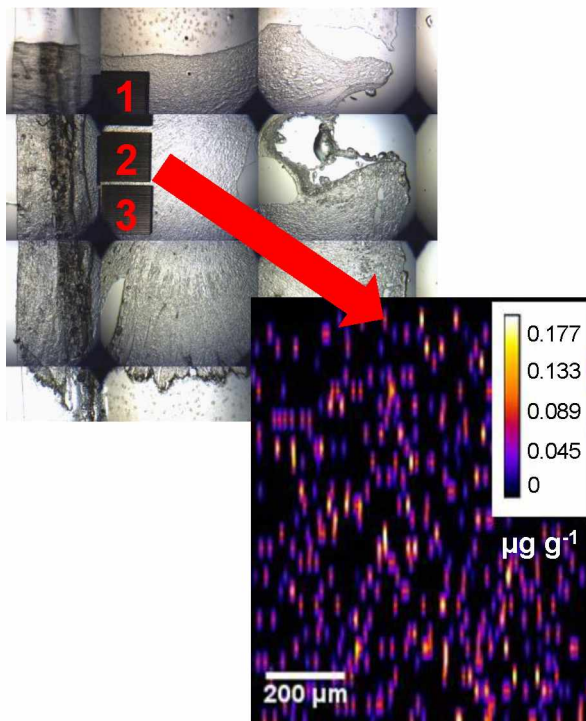


Ech 2 C - Cortex



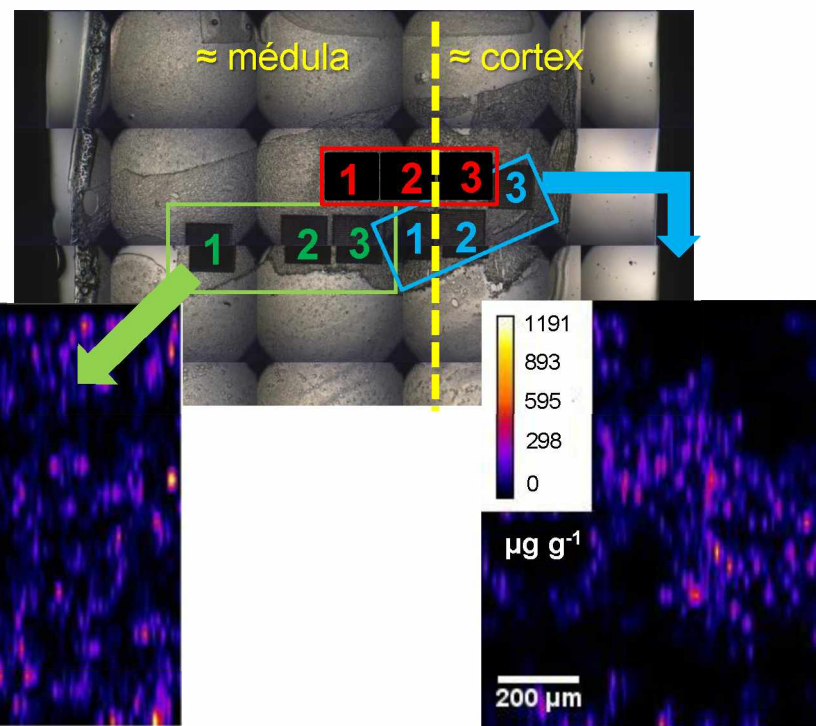
## Etape 3 : Application de la méthode à des échantillons réels – Partie 2

Ech 1 NC

4 ng g<sup>-1</sup>

Aire	Conc. Moyenne U µg/g
1	0.011
2	0.012
3	0.021

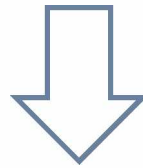
Ech 2 C

6729 ng g<sup>-1</sup>

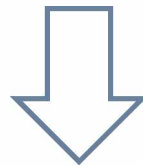
Aire	Conc. Moyenne U µg/g	Aire	Conc. Moyenne U µg/g	Aire	Conc. Moyenne U µg/g
1	0.143	1	0.584	1	18.321
2	0.386	2	0.825	2	53.840
3	0.424	3	1.926	3	45.382

Conc. ascendante médula → cortex, x 70

Développement d'une méthode analytique basée sur la production des étalons matrix-matching et l'introduction d'une gélatine dopée avec un étalon interne afin de localiser et quantifier l'uranium dans le tissu rénal



La performance de la méthode a été validée sur des échantillons QC selon les réquisits établis dans le guide pour la validation des méthodes bio-analytiques

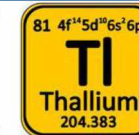
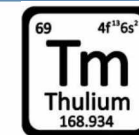


La méthode analytique a été appliquée à des échantillons réels et les résultats obtenus sont favorables et en accord avec les études retenues dans la bibliographie

*Merci pour votre attention*

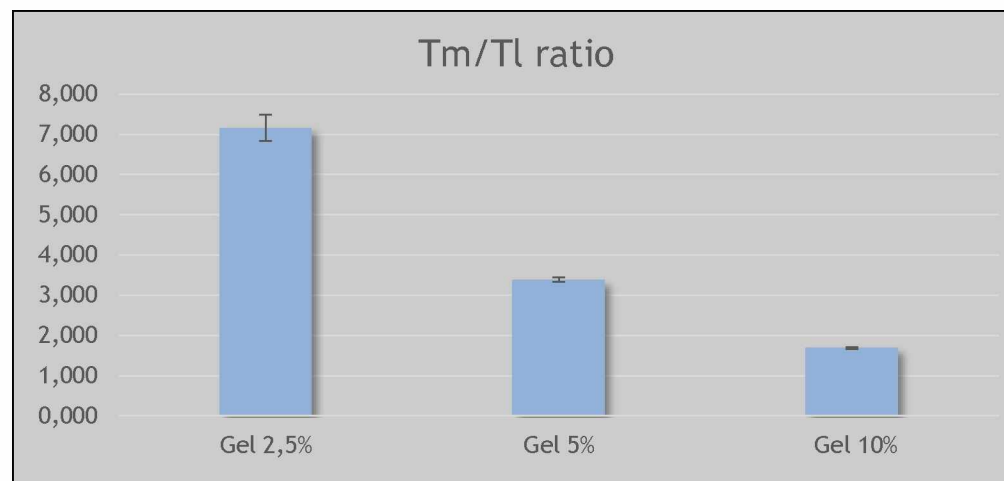


## Optimisation du % de gélatine et test d'homogénéité



First Ionisation Potential  $\approx$  6.184 eV et 6.108 eV

Hypothèse: contrôle de la migration des éléments pendant la phase de séchage de la gélatine (Tm/Tl  $\neq$  1).



Ablation de 9 répliques (0,5 x 0,5 mm) dans des gélatines 2,5%, 5% et 10% dopées avec Tm et Tl à 100 ppb

Confirmation par dosage ICPMS du bord et du centre des gélatines



2,5 et 5% : distribution non homogène  
 10% : distribution homogène du Tm et Tl  
 $[Tm]_{\text{bord}} \approx [Tm]_{\text{centre}}$   
 $Tm/Tl = 1,4 \pm 0,1$

30%  
 Difficile à manipuler  
 Présence de bulles d'air

10%

5%

