

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE 2006

THÈSE N° 341/1

MISE AU POINT DU DOSAGE DE
MÉTABOLITES DE TOXIQUES DE
GUERRE ORGANOPHOSPHORÉS

THÈSE

POUR LE DIPLOME DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 12 décembre 2006 à Limoges

Par



François JOACHIM

Né le 4 Avril 1982 à Limoges (Haute-Vienne)

JURY

Monsieur CARDOT, *Professeur* PRÉSIDENT
Monsieur MOESCH, *Professeur* JUGE
Madame Marie-Françoise DREYFUSS, *M.C.* JUGE
Monsieur Bernard BRASME, *Ingénieur CRSSA*..... DIRECTEUR DE THÈSE

MAITRE DE CONFERENCES :

ALLAIS Daovy	PHARMACOGNOSIE
BASLY Jean- Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, MATHEMATIQUES, INFORMATIQUE
CARDI Patrice	PHYSIOLOGIE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE
COMBY Francis	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DELEBASSEE Sylvie	BACTERIOLOGIE - VIROLOGIE
DREYFUSS Marie-Françoise	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
JAMBUT Anne Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
LAGORCE Jean-François	CHIMIE ORGANIQUE (en disponibilité)
LARTIGUE Martine	PHARMACODYNAMIE
LIAGRE Bertrand	SCIENCES BIOLOGIQUES
LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE
MOREAU Jeanne	IMMUNOLOGIE
PARTOUCHE Christian	NEUROLOGIE-ENDOCRINOLOGIE
POUGET Christelle	PHARMACIE GALENIQUE
ROUSSEAU Annick	BIOMATHEMATIQUES
SIMON Alain	CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE
TROUILLAS Patrick	BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE PHARMACEUTIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE
VIGNOLES Philippe	BIOMATHEMATIQUES

PROFESSEUR CERTIFIE

MARBOUTY Jean-Michel

ANGLAIS

ATER A MI-TEMPS

BEGAUD-GRIMAUD Gaëlle

Scé M. le Prof. BOTINEAU

COURTIOUX Bertrand

Scé M. le Prof. DREYFUSS

LE JEUNE Anne-Hélène

Scé M. le Prof. BOTINEAU

MOUSSEAU Yoanne

Scé M. le Prof. DREYFUSS et MOESCH

SAMARA Maha

Scé M. le Prof. OUDART

YAHIAOUI Samir

Scé M. le Prof. BUXERAUD

A mon président de thèse,

Monsieur Philippe CARDOT

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury. J'ai eu le privilège de recevoir votre enseignement à la faculté de pharmacie de Limoges. Soyez assuré de ma reconnaissance et mon profond respect.

A mon directeur de thèse,

Monsieur Bernard Brasme

Vous m'avez fait l'honneur de m'encadrer dans l'accomplissement de ce travail et m'avait guidé dans les recherches. Merci de votre disponibilité et vos explications toujours très pédagogiques. Veuillez trouver ici le témoignage de ma gratitude.

Aux membres du jury,

Madame Marie-Françoise DREYFUSS et Monsieur Christian MOESH

Vous me faites l'honneur de siéger parmi les membres du jury et d'apporter vos compétences à la critique de ce travail. Je vous adresse mes respectueux remerciements.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à **Monsieur Denis DAVELOOSE** pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Biospectrométrie du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées.

A Madame Corinne GREGOIRE, Monsieur Denis DAVELOOSE, Monsieur Bertrand LEFEBVRE et Monsieur Bernard BRASME. Soyez chaleureusement remerciés pour votre sympathie, votre bonne humeur et vos précieux conseils.

A Julie,

Pour ton amour de tous les jours.

A mes parents,

Qui m'ont soutenu tout au long de mes études de pharmacie.

A mes amis de lycée, de fac, de faluche...

Qui m'ont permis de passer des moments inoubliables tout au long de ces années d'études

LISTE DES ABRÉVIATIONS UTILISÉES

ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
ACN	Acétonitrile
AP2C	Appareil Portatif de Contrôle de la Contamination chimique
CEB	Centre d'Etudes du Bouchet, Paris
CF-FAB	Bombardement d'atomes rapides en flux continu
CHMPA	Acide cyclohexylméthylphosphonique
CIAC	Convention d'Interdiction des Armes Chimiques
CIS	Cool Injector Sample
CRSSA	Centre de Recherches du Service de Santé des Armées
CtL50	Concentration létale qui tue 50% de la population testée (mg/min/m ³)
DFP	Diisopropylfluorophosphate
DL50	Dose létale qui tue 50 % de la population testée (mg/kg)
DMAEPA	Diméthylamidoéthylphosphate
DMPMPA	Acide 1,2-diméthylpropylméthylphosphonique
DSM	Déméthon -S- méthyl
DSTL	Defense Science and Technology Laboratory, UK
ECD	Détecteur par capture d'électron (<i>Electron Capture Detector</i>)
EI*	Ionisation par impact électronique
EI	Etalon interne
EMPA	Acide éthylméthylphosphonique
ESI-	Ionisation négative par electrospray
ESI+	Ionisation positive par electrospray
FID	Détecteur à ionisation de flamme (<i>Flame Ionization Detector</i>)
FPD	Détecteur à photométrie de flamme (<i>Flame Photometric Detector</i>)
GC/CPG	Chromatographie gazeuse
HBSS	Hanks Buffer Salt Solution
HEPT	Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique
HFBI	Heptafluorobutyrylimidazole
HLB	Hydrophile Liphophile Balanced
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
i-BuMPA	Acide isobutylméthylphosphonique

IMPA	Acide isopropylméthylphosphonique
IPD	Indirect Photometric Detection
LC	Chromatographie liquide
LLE	Liquid – Phase Extraction
LOD	Limite de détection (<i>limit of detection</i>)
LOQ	Limite de quantification (<i>limit of quantitation</i>)
MAD	Diméthyl phosphoramidothioate / méthamidophos
MAX	Mixed Anion eXchange
MeOH	Méthanol
MEP	Monoéthylphosphate
MPA	Acide méthylphosphonique
MRM	Détection de réactions multiples (<i>Multiple Reaction Monitoring</i>)
MS	Spectrométrie de masse
MS-MS	Spectrométrie de masse en tandem
NICI	Ionisation chimique négative
NOPs	Neurotoxiques organophosphorés
NPD	Détecteur azote-phosphore (<i>Nitrogen-Phosphorus Detector</i>)
OIAC	Organisation pour l'Interdiction des Armes Chimiques
PFBBr	Bromure de pentafluorobenzyle
PICI	Ionisation chimique positive
PMPA	Acide Pinacolylméthylphosphonique
POX	Diéthyl P-nitrophényl phosphate / paraoxon
PTV/LV	Programmed Temperature Vaporizer / Grandes Volumes
RMPAs	Acides Alkylméthylphosphoniques
SIM	Détection d'ions sélectionnés (<i>Single Ion Monitoring</i>)
SLME	Surfactant Less Microemulsion
SNA	Système nerveux autonome
SNC	Système nerveux central
SPD	Détecteur Soufre-Phosphore (<i>Sulfur Phosphore Detector</i>)
SPE	Solid – Phase Extraction
SRM	Détection de réactions sélectionnées (<i>Single Reaction Monitoring</i>)
TCA	Acide trichloroacétique
TFA	Acide trifluoroacétique
TFAA	Anydride trifluoroacétique
UV	Détecteur ultra-violet

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Mécanisme d'action des agents neurotoxiques [52].....	5
Figure 2 : Étapes de la décontamination [58].....	10
Figure 3 : L'AP2C [57].....	10
Figure 4 : Moyens de protection contre les NOPs [58].....	11
Figure 5 : Produits de dégradation des principaux NOPs [46].....	13
Figure 6 : Matériel utilisé pour l'étude du passage percutané de composés organophosphorés.....	20
Figure 7 : Différents types de conditionnements pour la SPE	21
Figure 8 : Principe de l'extraction en phase solide [51].....	22
Figure 9 : Schéma d'un chromatogramme	24
Figure 10 : Réaction chimique de la dérivation des RMPAs par le PFBBR	25
Figure 11 : Illustration de l'équation de VAN DEEMTER	29
Figure 12 : Schéma d'un chromatographe phase gazeuse.....	30
Figure 13 : Schéma de l'injecteur split-splitless [43].....	31
Figure 14 : Schéma de l'injecteur à température programmable [43]	32
Figure 15 : Schéma du détecteur thermoionique [43].....	33
Figure 16 : Chromatogramme des esters de EMPA, PMPA et MPA pour une concentration mise en jeu de 530 nmol/L	42
Figure 17 : Chromatogramme du DMPMPA : concentration mise en jeu : 240 nmol/L.....	47
Figure 18 : Linéarité de la réponse pour l'EMPA, en fonction du volume injecté	48
Figure 19 : Linéarité de la réponse pour le PMPA, en fonction du volume injecté.....	49
Figure 20 : Linéarité de la réponse pour le MPA, en fonction du volume injecté	50
Figure 21 : Injection d'une même quantité en RMPA, en faisant varier les volumes	50
Figure 22 : Graphe de la réponse en fonction de la concentration d'EMPA mise en jeu (dilution des esters)	52
Figure 23 : Graphe de la réponse en fonction de la concentration de PMPA mise en jeu (dilution des esters)	52
Figure 24 : Graphe de la réponse en fonction de la concentration de MPA mise en jeu (dilution des esters)	53

Figure 25 : Graphe de la réponse en fonction de la concentration en EMPA mise en jeu (dilution des acides)	54
Figure 26 : Graphe de la réponse en fonction de la concentration en PMPA mise en jeu (dilution des acides)	55
Figure 27 : Graphe de la réponse en fonction de la concentration en MPA mise en jeu (dilution des acides)	55
Figure 28 : Gammes « extraite » et « non extraite » de PMPA dans l'HBSS.....	59
Figure 29 : Représentation graphique de la droite de calibration du PMPA dans l'HBSS.....	61
Figure 30 : Représentation graphique de la droite de calibration du PMPA dans l'ACN.....	63

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Formules et propriétés physico-chimiques des principaux NOPs [52, 57, 58]	6
Tableau II : Techniques analytiques utilisées pour le dosage des RMPAs dans le sang et l'urine	15
Tableau III : Propriétés physico-chimiques comparées des NOPs et de leurs similis	18
Tableau IV : Toxicité percutanée comparée des NOPs et de leurs similis	18
Tableau V : Paramètres du PTV/LV	36
Tableau VI : Les différents protocoles de SPE testés pour extraire les RMPA	44
Tableau VII : Rendement d'extraction du PMPA dans l'eau (n=10)	57
Tableau VIII : Rendement d'extraction des PMPA et DMPMPA dans l'HBSS (n=1)	57
Tableau IX : Rendement d'extraction du PMPA dans l'eau (n=1)	58
Tableau X : Rendement d'extraction du PMPA dans l'HBSS (n=5)	58

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
I. LES NEUROTOXIQUES ORGANOPHOSPHORÉS (NOPs).....	3
I.1. Historique	
I.2. Formules et propriétés physico-chimiques des NOPs	
I.3. Mécanisme d'action des NOPs	
I.4. Toxicité et symptomatologie d'une intoxication	
I.5. Prise en charge d'une intoxication aux NOPs	
I.6. Moyens de protection contre les NOPs	
I.7. Métabolisme et élimination des NOPs : les acides alkylméthylphosphoniques	
II. ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE DES RMPAS DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES : SYNTHÈSE	14
III. PRÉSENTATION DU PROJET DE RECHERCHE	16
IV. MATÉRIEL ET MÉTHODE UTILISÉS.....	21
IV.1. L'extraction solide-liquide (la SPE)	21
IV.1.1. Principe	
IV.1.2. Justification du choix de la SPE	
IV.2. La chromatographie gazeuse (GC)	23
IV.2.1. Principe	
IV.2.2. Les paramètres fondamentaux en GC	
IV.2.2.1 Paramètres caractérisant la rétention	
IV.2.2.2 Paramètres caractérisant la séparation	
IV.2.3. Appareillage	
IV.2.3.1. Gaz vecteur	
IV.2.3.2. Injecteur	
IV.2.3.3. Colonne	
IV.2.3.4. Détecteur	

V. OPTIMISATION DE LA TECHNIQUE DE DOSAGE DES RMPAS.....	34
V.1. Détection des EMPA, PMPA et MPA par PTV/LV-GC-NPD	34
V.1.1. Choix des conditions chromatographiques et des paramètres d'injection du PTV/LV	
V.1.2. Schéma type du run chromatographique	
V.1.2.1. Injecteur CIS-4 en PTV/LV	
V.1.2.2. Four et colonne chromatographique	
V.1.3. Choix des conditions de dérivation et rendement	
V.1.4. Purification post dérivation	
V.1.5. Résumé du protocole optimal pour la détection des RMPAs	
V.2. Mise au point de l'extraction en phase solide	43
V.2.1. Choix du type de cartouche SPE	
V.2.2. Optimisation du protocole d'extraction du PMPA	
V.3. Choix de l'étalon interne	46
VI. RÉSULTATS.....	48
VI.1. Mise au point de la détection des EMPA, PMPA et MPA	48
VI.1.1. Apport de l'injection en mode PTV/LV	
VI.1.2. Linéarité de la réponse, pour un volume constant injecté	
VI.1.2.1. En diluant les esters des RMPAs (première approche)	
VI.1.2.2. En diluant les RMPAs avant dérivation	
VI.2. Résultats de la mise au point de l'extraction du PMPA sur Oasis HLB 1cc.....	56
VI.2.1. Répétabilité de l'extraction du PMPA en solution aqueuse	
VI.2.2. Répétabilité du rendement d'extraction du PMPA dans l'HBSS	
VI.3. Résultats de la mise au point du dosage du PMPA par PTV/LV-GC-NPD.....	60
VI.3.1. Rendement global de la méthode	
VI.3.2. Linéarité de la méthode et quantification : réalisation d'une courbe de calibration	
VI.3.3 Estimation de la LOD et de la LOQ	

VII. EXEMPLE D'UNE APPLICATION DE LA MÉTHODE DE DOSAGE DU PMPA MISE AU POINT.....	62
VIII. DISCUSSION.....	64
VIII.1. Résultats de la mise au point de la méthode.....	64
VIII.2. Perspectives.....	65
VIII.3. Problèmes rencontrés.....	66
CONCLUSION.....	67
BIBLIOGRAPHIE.....	69
ANNEXES.....	74
Annexe 1 : Présentation du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées (CRSSA).....	75
Annexe 2 : Chromatogrammes des différents ACN testés comme milieu de dérivation, entre 10 et 13,1 min.....	79
Annexe 3 : Observation de l'efficacité de l'extraction liquide-liquide sur les impuretés totales, en FID, entre 10 et 13,1 min.....	81
Annexe 4 : Composition du milieu HBSS.....	82
Annexe 5 : Définitions limites de détection et de quantification.....	83

INTRODUCTION

Les agents organophosphorés, en plus de leur large utilisation en tant qu'insecticides, constituent pour certains de redoutables armes chimiques dont l'emploi au sein des conflits armés représente aujourd'hui une infraction à la loi internationale ainsi qu'une violation des droits de l'homme [19]. La première utilisation des armes chimiques dans les temps modernes a eu lieu durant la Première Guerre mondiale ; l'armée allemande utilisa le chlore puis un autre gaz en Avril 1915 à Ypres en Belgique d'où son nom : l'ypérite. De nombreux autres gaz (asphyxiants et vésicants) furent développés pendant la Grande Guerre. Suite à la vive réaction que les horreurs de la guerre avaient suscitée dans le public, l'usage des armes chimiques et bactériologiques a été banni par la Convention de Genève en Juin 1925. Cependant, la possession et la mise au point put continuer et ainsi, les gaz neurotoxiques tels que le tabun, le sarin, le soman ou encore le VX furent développés, massivement produits, stockés et utilisés au cours de nombreux conflits internationaux, par exemple par l'Irak dans le conflit Iran-Irak dans les années 1980 ou contre les populations kurdes d'Halabjah en 1988 [54, 56, 59]. En 1993, après des années de négociation, une nouvelle convention voit le jour, visant à interdire l'emploi, mais aussi la production, le stockage et l'exportation d'armes chimiques : la Convention Internationale d'Interdiction des Armes Chimiques (CIAC). Cette convention a été ratifiée aujourd'hui par plus de 150 pays, et l'Organisation pour l'Interdiction des Armes Chimiques (OIAC), basée à La Haye, a pour mission de s'assurer du respect de la convention [56].

Malgré la CIAC, les armes chimiques continuent de représenter une menace sérieuse et réaliste. En effet, le meurtre d'un homme de 28 ans au gaz VX à Osaka en 1994 [48], les attentats au gaz sarin de Matsumoto en Juin 1994 qui fit 600 victimes dont 7 morts [31], et ceux perpétrés par des membres de la secte Aum c'est à dire les attentats de la gare de Yokohama en Avril 1995 qui fit 700 intoxiqués et surtout du métro de Tokyo en Mars 1995 qui fit 12 morts et plus de 5000 intoxiqués [33], ont entraîné une réelle prise de conscience du risque que peuvent représenter ces armes chimiques aux mains de sectes ou de groupes terroristes.

Ces incidents ont accéléré le développement de la prise en charge des victimes d'intoxication aux gaz organophosphorés. Pour prouver de façon irréfutable une intoxication aiguë ou chronique pour certaines populations à risque ou pour montrer l'efficacité d'un traitement, la mise au point de méthodes analytiques de détection, d'identification et de quantification des produits purs et/ou de leurs métabolites dans les milieux biologiques est indispensable.

Notre travail s'inscrit dans ce cadre et consiste en la mise au point du dosage de certains acides alkylméthylphosphoniques (RMPAs), métabolites des gaz neurotoxiques organophosphorés (NOPs), par chromatographie gazeuse couplée à un détecteur azote-phosphore.

Nous avons décidé de nous concentrer sur 3 métabolites : l'acide éthylméthylphosphonique (métabolite intermédiaire spécifique du gaz VX), l'acide pinacolylméthylphosphonique (métabolite intermédiaire spécifique du soman) et l'acide méthylphosphonique (métabolite final des processus d'hydrolyse des deux gaz précédents) car le soman et le VX sont des priorités dans les travaux de recherche actuels du CRSSA.

Après un rappel général sur les gaz neurotoxiques organophosphorés, nous détaillerons le matériel et les méthodes utilisés. Enfin, nous présenterons les résultats et discuterons des différentes étapes de la mise au point du dosage de ces métabolites.

I. LES NEUROTOXIQUES ORGANOPHOSPHORÉS (NOPs)

I.1. Historique

C'est en travaillant sur de nouveaux insecticides organophosphorés qu' I.G Farben, un allemand, a découvert en 1937 les neurotoxiques organophosphorés. Egalement dénommés « gaz de combat », ils constituent de nos jours de redoutables armes chimiques, qui sont définies par l'ONU comme étant « toute substance chimique qui, à cause de ses effets sur l'organisme vivant, peut entraîner la mort, une perte temporaire de performances, ou, une lésion permanente aux humains ou aux animaux ». Il faut rappeler que certains gaz non neurotoxiques sont également des gaz de combat : les gaz asphyxiants (phosgène, chlore...) et les gaz vésicants (lewisite, ypérite...). Les NOPs sont aussi appelés des agents innervants.

Les allemands firent ainsi la synthèse du sarin, du cyclohexylsarin et du tabun vers 1937, puis du soman en 1944, sans pour autant les utiliser lors de la seconde guerre mondiale 1939-45. Après la guerre, en 1952, ce sont les britanniques qui mirent au point une nouvelle catégorie d'organophosphorés encore plus puissants, la classe V et plus particulièrement, le VX [53].

NB : Le tabun produit par les Allemands contenait généralement 5 % à 20 % de chlorobenzène servant de solvant et de stabilisateur.

Le sarin, le soman, le tabun, le VX ou encore le VX russe constituent les principaux NOPs et sont classés en deux catégories :

- les agents G pour « German Agents » :

- * GA : le tabun
- * GB : le sarin
- * GD : le soman
- * GF : le cyclohexylsarin

- les agents V ou A (VX = A4)

- * VX
- * VX russe (R-VX)

Les NOPs sont réglementés par la Convention Internationale d'Interdiction des Armes Chimiques (CIAC), ouverte à la signature le 13 Janvier 1993 à Paris. Cette convention interdit l'emploi, la production, le stockage et l'exportation d'armes chimiques. Cette convention a été ratifiée aujourd'hui par plus de 150 pays, et l'Organisation pour l'Interdiction des Armes Chimiques (OIAC), basée à La Haye, a pour mission de s'assurer du respect de la convention, en inspectant les sites militaires et industriels du monde entier [56].

I.2. Formules et propriétés physico-chimiques des NOPs (cf. tableau I)

Les NOPs sont des produits chimiques liquides à température ambiante, incolores, inodores et sans saveur. Ils sont légèrement solubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques. Ils ont tous une densité de vapeur élevée (supérieure à 1) indiquant que les vapeurs de ces agents sont lourdes. En fait, leur densité plus élevée que celle de l'air leur permet de demeurer au sol.

Les agents G (tabun, sarin, cyclohexylsarin, soman) sont des dérivés des acides fluoro-phosphonique et cyano-phosphonique. Ce sont des liquides suffisamment volatils pour être utilisés sous forme d'aérosols et pour agir sur les voies respiratoires. Cependant, leur action par voie cutanée est possible. Facilement entraînés par le vent, aisément détruits par hydrolyse, il s'agit de toxiques peu ou non permanents [50].

Les agents V (VX, VX russe) sont des dérivés de l'acide thio-phosphonique, appartenant à la série des pesticides amitons. Le VX est un liquide très peu volatil dont le danger est lié à une pénétration par voie percutanée. Toxiques persistants, par suite de leur faible volatilité et de leur plus grande résistance à l'hydrolyse que les agents G ; leur épandage entraîne une contamination du sol, de la végétation, du matériel, ce qui crée un danger de contact et de transfert de contamination, qui peut selon les conditions (notamment de température), persister de plusieurs heures à quelques jours [50].

I.3. Mécanisme d'action des NOPs [52]

Le mécanisme principal d'action des NOPs est le blocage de la dégradation de l'acétylcholine (ACh) au niveau des synapses cholinergiques par inhibition des acétylcholinestérases (AChE). Les NOPs, très lipophiles, franchissent toutes les barrières physiologiques (peau, barrière hématoencéphalique) et se fixent de façon covalente au site estérasique des AChE (*cf. figure 1*) aussi bien au niveau du SNC que du SNA et des muscles. Cette liaison covalente NOP-AChE est irréversible.

L'accumulation induite de l'ACh entraîne une hyperstimulation des récepteurs cholinergiques avec syndrome muscarinique, nicotinique et central à l'origine d'une détresse respiratoire aiguë, de convulsions et d'un coma. La mort survient par hypoxie majeure, d'origine centrale et périphérique (obstruction des voies respiratoires et paralysie des muscles respiratoires).

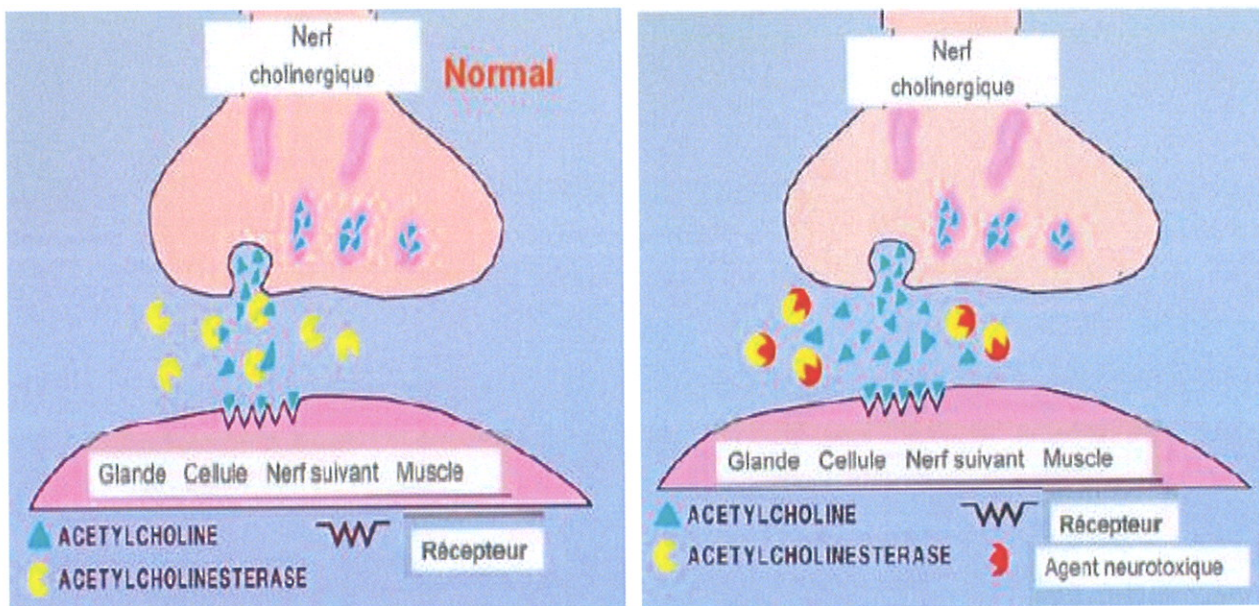
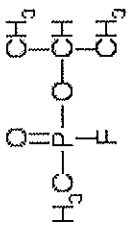
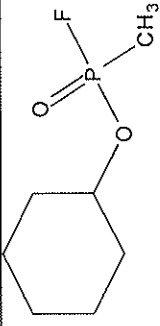
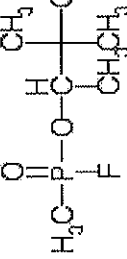
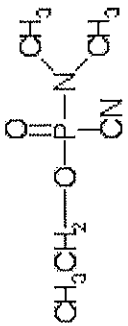
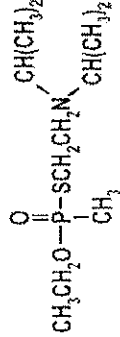


Figure 1 : Mécanisme d'action des agents neurotoxiques [52]

NOP	Formule chimique	Point d'ébullition	Densité vapeur (air = 1)	Point de fusion	Indice Viscosité (25 °C)	CtL ₅₀ mg.mn/m ³	DL ₅₀ mg/kg	Volatilité mg/m ³	Type de danger	Persistance
Sarin		158 °C	4,9	-56°C	-	100	24	17000	Liq+vap	2h à 10°C 10mn à 40°C
Cyclohexyl sarin		239°C	6,2	-30°C	-	-	-	434	-	-
Soman		198°C	6,3	-70°C	-	70	0,4	3000	Liq+vap	3j à 10°C <24h à 40°C
Tabun		246 °C	5,6	-49°C	2,18	400	14	612	Liq+vap	3j à 10°C <24h à 40°C
VX		298°C	9,2	-51°C	-	50	0,14	10	liquide	1sem à 10°C <2j à 40°C

Remarque :

DL₅₀ : Quantité qui tue 50 % de la population (mg/kg).

CtL₅₀ : Exposition qui tue 50 % de la population (mg.min/m³).

I.4. Toxicité et symptomatologie d'une intoxication

La toxicité des NOPs va dépendre de plusieurs paramètres qui sont la toxicité propre de l'agent neurotoxique (fonction de ses propriétés physico-chimiques), de la durée d'exposition, de la dose absorbée par l'organisme et de la voie de pénétration du toxique [57]. Les premiers signes cliniques seront respiratoires après inhalation de vapeurs, oculaires après contact cutanéomuqueux. Les signes cliniques des agents innervants, se manifestent rapidement après l'exposition (délai de moins de 1 minute à 60 minutes).

* Après une exposition de courte durée à des vapeurs neurotoxiques, les effets observés sont :

- myosis (mydriase trompeuse en phase initiale), nausées, vomissements, rhinorrhée, salivation abondante, oppression thoracique, respiration sifflante avec toux, larmoiement.

* Après absorption ou une exposition prolongée à des vapeurs neurotoxiques, les signes cliniques résultent de l'aggravation des syndromes muscarinique, nicotinique et central :

- hypersécrétions salivaires, nasales, et surtout bronchiques,
- fasciculations, myoclonies, convulsions,
- contracture des muscles lisses d'innervation parasympathique : bronchospasme, coliques, défécation et miction involontaires,
- paralysie des centres respiratoires,
- troubles cardiovasculaires non spécifiques et variables (bradycardie, tachycardie)
- syndrome convulsif pouvant être à l'origine de lésions irréversibles du SNC [50].

Le décès peut survenir rapidement.

Pour illustrer la toxicité des NOPs, par exemple du VX, il faut savoir que, absorbée par la peau, une seule goutte de VX de la taille d'une tête d'épingle suffit largement à causer la mort [56]. Ainsi, la concentration atmosphérique létale du VX est de 50 mg.mn/m³. Par comparaison, celle du chlore est de 19000 mg.mn/m³ et celle du gaz moutarde 1500 mg.mn/m³ [53].

I.5. Prise en charge d'une intoxication aux NOPs [49, 50]

En cas d'attaque chimique aux NOPs, suspectée ou avérée, la prise en charge repose sur la décontamination pour éviter une propagation inter-humaine du toxique par contact, et l'aggravation de l'intoxication. Dans l'attente de l'identification de l'agent, la décontamination est indispensable et doit être réalisée le plus rapidement possible : elle ne se conçoit que par un personnel entraîné et protégé sur les plans cutané et respiratoire, nous en détaillerons les éléments dans la rubrique suivante.

Les traitements spécifiques ne seront envisagés d'emblée qu'en cas de forte suspicion d'intoxication. En raison de cette situation exceptionnelle, le choix et les modalités d'administration des médicaments peuvent différer des cadres validés par l'Autorisation de Mise sur le Marché. Compte-tenu du risque vital, les restrictions classiques d'utilisation des médicaments ne s'appliquent pas dans tous les cas : en particulier, les spécificités liées à l'âge ou au terrain (femme enceinte ou allaitant) sont à adapter en fonction des niveaux de risque.

La décontamination comporte 4 phases :

* l'adsorption du toxique liquide ou solide déposé sur les parties découvertes, à l'aide de poudres adsorbantes : terre à foulon, talc, farine, sable fin (à défaut une autre poudre). En pratique, dès la prise en charge des victimes, la poudre est répandue sur toutes les parties découvertes du blessé et sur toute surface contaminée accidentellement.

* le déshabillage complet des victimes, symptomatiques ou non. Le déshabillage permet de réduire la contamination d'environ 80 %. Les vêtements sont enlevés et/ou découpés. Au cours de cette opération, les vêtements contaminés doivent être rabattus vers l'extérieur afin de ne pas être en contact avec la peau de la victime. Il faut répandre immédiatement une poudre adsorbante sur les surfaces accidentellement contaminées. Les vêtements retirés sont placés dans des sacs poubelles étanches en matière plastique. Les ciseaux ayant servi au découpage des vêtements seront décontaminés par immersion dans de l'eau de Javel entre chaque victime traitée.

* l'inactivation du toxique : les victimes déshabillées sont aspergées (en protégeant les yeux) par pulvérisation d'une solution polyvalente de décontamination à 2,5° chlorométriques (8 g/L de chlore actif) pendant 5 à 10 minutes.

* le déplacement du toxique par rinçage au moyen d'une douche prolongée. Un rinçage abondant sera effectué. Les yeux seront protégés, avant décontamination avec du sérum physiologique et les cheveux seront lavés avec du savon liquide.

En plus de la décontamination systématique rapide, le premier traitement symptomatique à instaurer est l'oxygénothérapie, libérer les voies aériennes et en cas de besoin mettre en place une ventilation artificielle.

Le traitement spécifique de l'intoxication repose sur trois classes pharmacologiques : les anticholinergiques, les réactivateurs de cholinestérases ou oximes et les anticonvulsivants.

L'anticholinergique utilisé est le sulfate d'atropine (ampoule de 1 mg), administré par bolus de 2 mg en IV lente, à renouveler toutes les 5 à 10 minutes jusqu'à assèchement des sécrétions muqueuses et bronchiques.

Les oximes sont des agents nucléophiles qui ont une plus grande affinité pour les NOPs que l'AChE de sorte qu'ils fixent le résidu organophosphoré sous forme d'oxime phosphorylée. L'oxime utilisée est le méthylsulfate de pralidoxime (ampoule de 200 mg de Contrathion®).

Les anticonvulsivants sont utilisés pour lutter contre l'anxiété et la crise convulsive. Deux produits sont préférentiellement utilisés à titre curatif : Le clonazepam (ampoule de 1 mg de Rivotril®) et le midazolam (ampoules de 5 mg et 10 mg d'Hypnovel®).

L'efficacité de la décontamination peut être validée au moyen de l'Appareil portatif de contrôle de la contamination chimique (AP2C : cf. figure 3). Ce photomètre détecte les éléments organophosphorés et organosoufrés à faible distance par photométrie d'émission. Par conséquent il permet de mettre en évidence indirectement la présence d'un neurotoxique organophosphoré et/ou de l'ypérite [42].



Figure 2 : Étapes de la décontamination [58]



Figure 3 : l'AP2C [57]

Remarque : dans un contexte militaire, une telle prise en charge peut ne pas être compatible avec le degré d'urgence de la situation. C'est pourquoi chaque combattant dispose d'une seringue auto-injectable à 3 compartiments, l'injection devant être réalisée directement à travers les vêtements de protection dans le muscle quadriceps dès l'apparition des premiers signes d'intoxication. Cette seringue contient l'ensemble des molécules nécessaires au traitement.

I.6. Moyens de protection contre les NOPs [37]

La protection des personnels militaires contre les neurotoxiques organophosphorés s'appuie sur des mesures de protection individuelle et collective.

La protection individuelle repose sur le port d'un scaphandre chimique composé de plusieurs couches de tissus afin d'arrêter les gouttes toxiques et de purifier l'air, et sur le port de masque munis de cartouches filtrantes constituées d'un filtre de charbon actif et d'un filtre « antiaérosols », et également sur des moyens de détection d'alerte et de contrôle sensible tel que le papier détecteur modèle F1 (*cf. figure 4*), employé pour la recherche de toxiques liquides.

La protection collective consiste en l'utilisation de détecteurs dits Detindiv (*cf. figure 4*), permettant la détection de NOPs sous forme gazeuse, et de l'appareil AP2C.

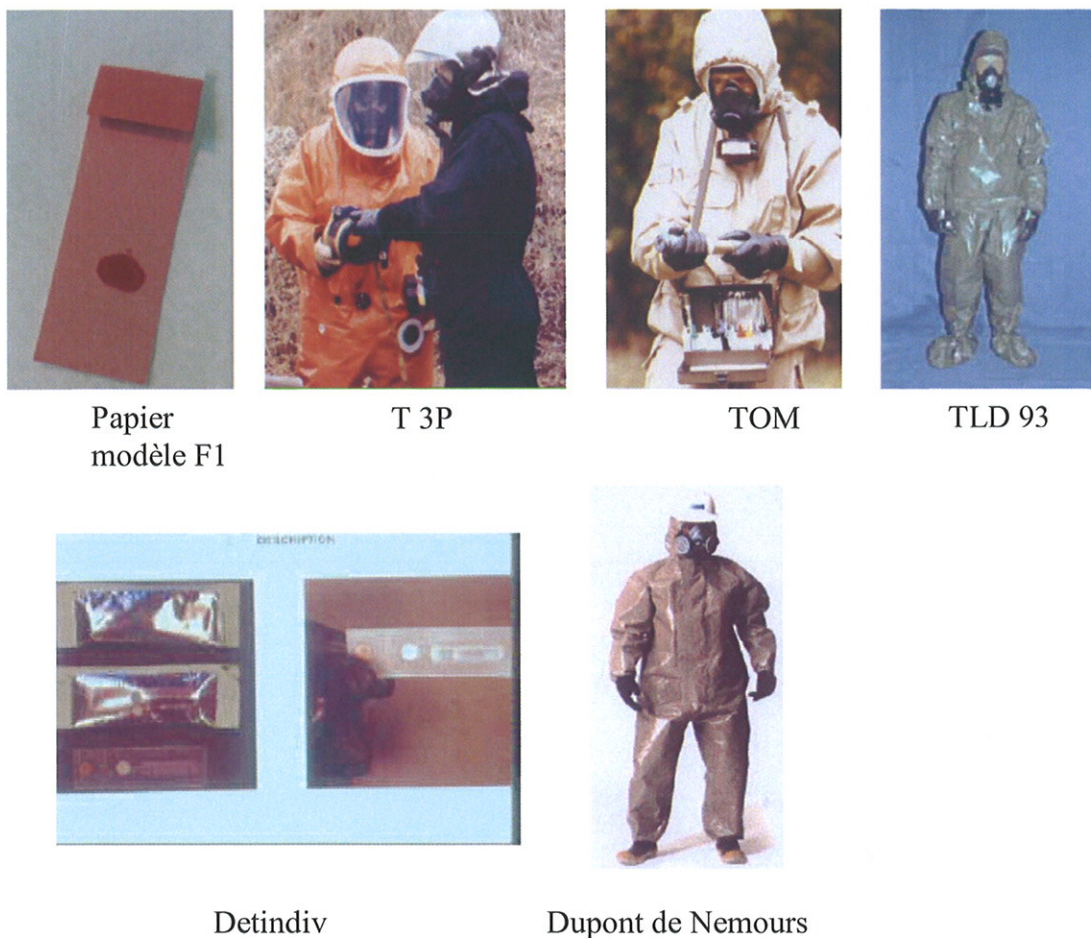


Figure 4 : Moyens de protection contre les NOPs [58]

I.7. Métabolisme et élimination des NOPs : les acides alkylméthylphosphoniques

Après pénétration dans l'organisme par voie percutanée, respiratoire ou oculaire, les NOPs sont rapidement absorbés puis, soit distribués dans l'organisme où ils se lient de façon irréversible aux AChE, soit éliminés avant d'agir par différentes voies de dégradation (oxydation, hydrolyse...).

Ainsi, Les NOPs peuvent être hydrolysés en des métabolites qui sont non toxiques : les acides alkylméthylphosphoniques (RMPAs). Deux voies de dégradation sont majoritaires chez l'homme : l'hydrolyse spontanée et l'hydrolyse enzymatique par des phosphorylphosphatases [11, 45].

Après cette première hydrolyse, les gaz sarin, VX, et soman subissent une seconde hydrolyse beaucoup plus lente, conduisant au même métabolite terminal : l'acide méthylphosphonique (MPA) [21], alors que dans le cas du tabun, le monoéthylphosphate (MEP) est obtenu (*cf. figure 5*).

Ces acides, inactifs et rendus plus hydrophiles, vont être excrétés majoritairement par voie urinaire [55]. L'excrétion urinaire des RMPAs est caractérisée par une rapide augmentation jusqu'à un taux maximum qui survient quelques heures après l'exposition. Environ 90% de la dose de départ est éliminée au cours des premières 48-72h. Après cette phase d'élimination, on peut encore détecter des traces de ces métabolites jusqu'à environ 15 jours après exposition ; cela dépend de l'intensité de l'exposition aux NOPs et de la limite de détection de la méthode analytique utilisée [41].

NB : un seul métabolite possède des propriétés toxiques équivalentes au produit parent. Il s'agit du EA-2192, métabolite du VX par oxydation et non par hydrolyse [32].

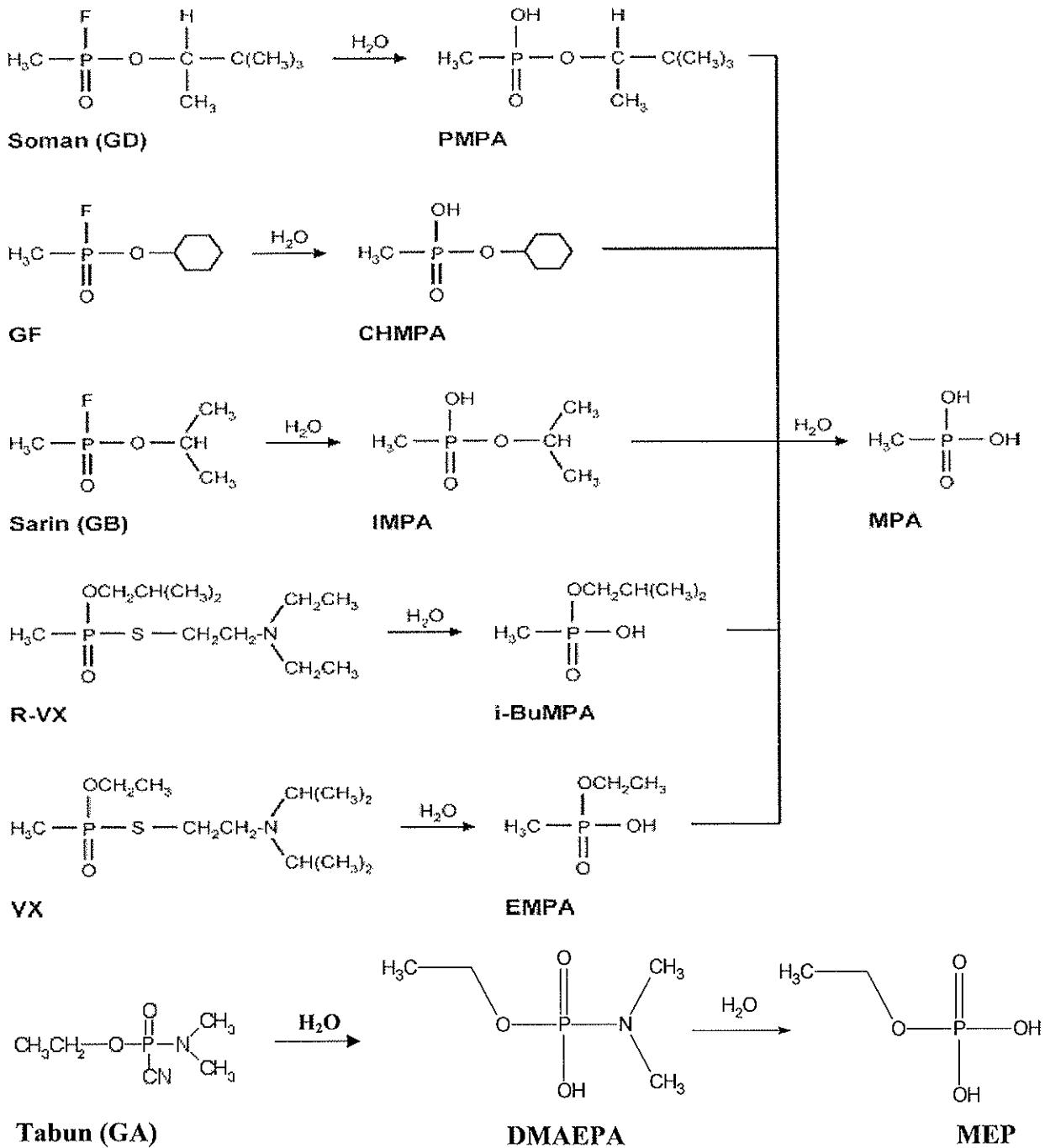


Figure 5 : Produits de dégradation des principaux NOPs [46]

II. ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE DES RMPAS DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES : SYNTHÈSE

La persistance des produits d'hydrolyse des NOPs dans les urines (on peut encore détecter des traces de ces métabolites jusqu'à environ 15 jours après exposition) permet de les utiliser comme marqueurs d'une intoxication. Ainsi, la mise au point de méthodes analytiques de détection, d'identification et de quantification des RMPAs dans les milieux biologiques est indispensable pour prouver de façon irréfutable une intoxication aiguë ou chronique, pour montrer l'efficacité d'un traitement, pour disposer d'un outil dosimétrique...

Un grand nombre de publications scientifiques recense des méthodes d'analyses des RMPAs. Nous avons limité notre étude bibliographique de ces méthodes aux seuls milieux biologiques (sang et urine), avec une extraction liquide-liquide (LLE), solide-liquide (SPE) ou par distillation azéotrope qui sont les trois techniques les plus utilisées.

Nous ne ferons pas référence aux publications décrivant des méthodes d'analyse des RMPAs dans l'eau [4, 25, 39, 46, 47], celles décrivant des méthodes de dosage des RMPAs dans le milieu environnemental [8, 27, 40] ou celles décrivant d'autres méthodes d'extraction, par exemple la SLME [37].

Deux méthodes chromatographiques sont citées par les auteurs : la chromatographie gazeuse et la chromatographie liquide, précédées de différentes étapes de prétraitement et d'extraction de l'échantillon.

Il ressort de l'analyse globale de la littérature, une prévalence d'emploi de la chromatographie gazeuse précédée d'une extraction solide-liquide.

Le tableau II est un inventaire des techniques analytiques utilisées pour le dosage des RMPAs dans le sang et l'urine.

*Tableau II : Techniques analytiques utilisées pour le dosage
des RMPAs dans le sang et l'urine*

Auteurs	Matrice	Extraction	Technique analytique	RMPA(s) dosé(s)
Driskell <i>et al.</i> (2002) [10]	Urine	Distillation azéotropique	GC/PICI-MS-MS (SRM)	PMPA, EDMPA, EMPA, CHMPA, IMPA
Riches <i>et al.</i> (2004) [41]	Urine	SPE	GC/NICI-MS	PMPA, EMPA, IMPA, CHMPA, i-BuMPA
Barr <i>et al.</i> (2004) [2]	Urine	LLE	GC/PICI-MS-MS (MRM)	IMPA, PMPA, i-BuMPA, CHMPA
Nakajima <i>et al.</i> (1998) [34]	Urine	SPE	GC/FPD	IMPA, MPA
Minami <i>et al.</i> (1997) [29]	Urine	SPE	GC/FPD	IMPA, EMPA
Hui et Minami (2000) [15]	Urine	LLE	GC/FID	IMPA, EMPA
Hayes <i>et al.</i> (2004) [13]	Urine	-	LC/ESI+/MS-MS (MRM)	MPA, EMPA, IMPA, CHMPA, PMPA
Butler et Conoley (> 2002) [6]	Urine	SPE	GC/PICI-MS-MS	IMPA, MPA
Shih <i>et al.</i> (1991) [44]	Sang Urine	SPE	GC/EI*-MS (SIM)	IMPA, PMPA, CHMPA
Kataoka et Seto (2003) [24]	Plasma Urine	SPE	GC/EI*-MS	IMPA, EMPA, PMPA, MPA
Miki <i>et al.</i> (1999) [28]	Urine Plasma	SPE	GC/EI*-MS	IMPA, EMPA, PMPA
Fredriksson <i>et al.</i> (1995) [12]	Urine Sérum	SPE	GC/NICI-MS GC/NICI-MS-MS	MPA, EMPA, IMPA, PMPA, i-BuMPA
Abou-Qare et Abou Donia, (2001) [1]	Plasma Urine	SPE	LC/UV	MPA
Tsuchihashi <i>et al.</i> (1998) [48]	Sérum	LLE	GC/EI*-MS GC/PICI-MS GC/ PICI-MS-MS	EMPA
Katagi <i>et al.</i> (1997) [21]	Sérum	SPE	LC/IPD (SPD-UV detector)	IMPA, PMPA, EMPA, MPA
Noort <i>et al.</i> (1998) [35]	Sérum	LLE	LC/ ESI+/MS-MS (MRM) LC/ESI-/MS-MS (MRM)	IMPA
Katagi <i>et al.</i> (1997) [22]	Sérum	LLE	GC/EI*-MS (SIM)	EMPA
Katagi <i>et al.</i> (1999) [23]	Sérum	SPE	GC/CF-FAB-MS (SIM)	EMPA, PMPA, IMPA
Jakubowski <i>et al.</i> (2004) [17]	Plasma	SPE	GC/PICI-MS (SIM)	IMPA

III. PRÉSENTATION DU PROJET DE RECHERCHE [5, 18, 26]

Notre travail s'inscrit dans un projet de recherche du CRSSA intitulé « Choix, mise en place et validation de modèles cutanés in vitro en vue de déterminer l'efficacité de dispositifs protecteurs et décontaminants de la peau vis-à-vis des agents neurotoxiques organophosphorés et de l'ypérite » qui consiste en une étude multicentrique initiée par le département de Toxicologie du CRSSA, et dont le principal investigateur est le Pharmacien Principal JOSSE D. Il a pour objectifs :

- de déterminer le profil de pénétration percutanée et les paramètres toxicocinétiques des NOPs et agents vésicants (ypérite), surtout au cours des premières heures suivant la contamination.
- d'évaluer l'efficacité protectrice ou décontaminante de produits actuellement disponibles ou en cours de mise au point et de la comparer à celle des produits de référence en dotation dans les armées françaises ou étrangères.

Les études sur modèle animal sont nécessaires à la validation d'un dispositif de décontamination. Cependant, pour des raisons principalement éthiques mais aussi économiques et pratiques, le modèle animal n'est pas un modèle de choix pour réaliser un criblage de nouveaux dispositifs de protection ou de décontamination cutanée. C'est pourquoi une étude sur modèles cutanés in vitro a été privilégiée. De plus, les propriétés des modèles cutanés in vitro sont aujourd'hui bien connues du fait de leur large utilisation dans le domaine pharmaceutique pour modéliser l'absorption percutanée de substances toxiques ou de médicaments ainsi que pour tester et cribler des produits à propriétés protectrices, décontaminantes ou curatives de la peau.

A terme, lorsqu'un ou plusieurs modèles cutanés in vitro seront validés, ce travail sera suivi d'études visant à développer de nouveaux dispositifs protecteurs et décontaminants de la peau vis-à-vis des agents chimiques de guerre (NOPs et ypérite). Ce projet est actuellement financé par le Service de Santé des Armées.

Les explants de peau ont été choisis en fonction des critères suivants :

- caractéristiques histologiques aussi proches que possible de celles de la peau humaine *in vitro*,
- facilité d'approvisionnement
- coût

De ce fait, deux types d'explants ont été retenus : des explants de porc et de peau humaine. Les explants de peau humaine proviennent d'excédents opératoires de chirurgie plastique (abdominoplasties et mammoplasties). Les explants cutanés d'origine porcine sont préparés à partir d'oreilles de porc fournies par les abattoirs de la ville de Grenoble. Ces échantillons cutanés sont conservés à -20°C pendant 6 mois au maximum et leur intégrité est déterminée avant chaque manipulation par la mesure de la Perte Insensible en Eau (PIE) à l'aide d'un Tewameter de Courage et Khazaka type TM 210 MONADERM. Les expérimentations sont menées sur peau entière débarrassée de l'hypoderme.

Les protocoles d'étude de pénétration percutanée sont mis au point dans un premier temps avec des similis des agents neurotoxiques [26], choisis en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques proches de celles des agents d'intérêt (*cf. tableau III*), de leur moindre toxicité (*cf. tableau IV*), de leur coût et des données bibliographiques disponibles.

Dans le cas des NOPs, ont été retenus comme similis :

- le diisopropylfluorophosphate (DFP)
- le déméthon -S- méthyl (DSM)
- le diéthyl P-nitrophényl phosphate ou paraoxon (POX)
- le diméthyl phosphoramidothioate ou méthamidophos (MAD)

Tableau III : Propriétés physico-chimiques comparées des NOPs et de leurs similis*

NOPs	MM (g/mol)	LogP (o/w)	d	Tv (mmHg)	Simili	MM (g/mol)	Log P (o/w)	d	Tv (mmHg)
Sarin (GB)	140,1	0,30	1,102	$2,2 \cdot 10^0$	DPF	184,2	1,13	1,055	$5,8 \cdot 10^{-1}$
Soman (GD)	182,2	1,78	1,025	$3,1 \cdot 10^{-1}$					
Cyclohexylsarin (GF)	180,2								
VX	267,4	2,09	1,008	$1,1 \cdot 10^{-4}$	DSM	230,3	1,32	1,207	$3,0 \cdot 10^{-4}$
Pesticides (-oxon)					POX	275,2	1,98	1,274	$1,1 \cdot 10^{-6}$
					MAD	141,1	-0,80	1,300	$1,5 \cdot 10^{-5}$

* données communiquées par le département de Toxicologie du CRSSA

MM : Masse Molaire

Log P : coefficient de partage octanol/eau

d : densité

Tv : tension de vapeur à 20°C

Tableau IV : Toxicité percutanée comparée des NOPs et de leurs similis [20]

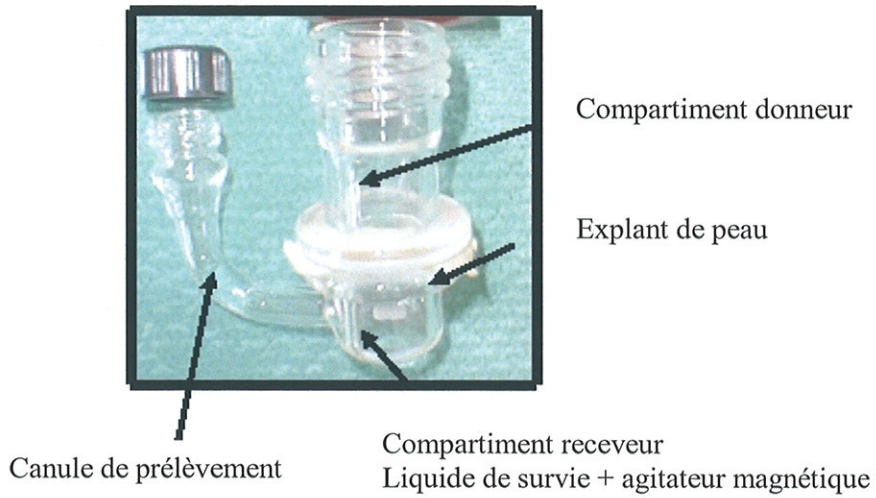
NOPs	Toxicité voie percutanée (DL50 mg/kg)	Simili	Toxicité voie percutanée (DL50 mg/kg)	
Sarin (GB)	28 (homme) 0,925 (lapin)	DFP	117 (lapin)	
Soman (GD)	0,70 (homme)			
VX	0,86 (homme)	DSM	86 (rat)	
Pesticides (parathion-éthyl)			POX	50 (lapin) 21 (rat)
			MAD	50 à 110 (plusieurs espèces)

Une fois les protocoles de pénétration percutanée des gaz validés grâce aux similis, les expérimentations pourront se faire dans un deuxième temps avec les NOPs.

Le passage des NOPs ou de leur similis à travers les explants cutanés est étudié au moyen de cellules de Franz en pyrex, dites à diffusion statique, et munies d'un compartiment receveur de 5 mL. Au sein de celles-ci, la surface de peau exposée est de 1,76 cm² et est maintenue dans des conditions proches des conditions physiologiques grâce à un liquide de survie placé au contact du derme : le tampon HBSS (composition en **Annexe 4**, p.83) ou solution saline de Hanks contenant 1% d'un mélange streptomycine - pénicilline. L'ensemble du dispositif est placé dans un bain thermostaté à 39°C et la température de la peau est maintenue à ~ 32°C. Ce dispositif ainsi qu'une cellule de Franz sont représentés par *la figure 6*.

Il est donc important de mettre au point des méthodes de dosage des métabolites des NOPs dans le milieu HBSS pour accéder aux données cinétiques de pénétration de ces produits. C'est dans ce cadre initial que notre travail s'inscrit avant que ne soit imaginée la transposition de la technique analytique aux urines et produits sanguins.

Cellule à diffusion statique



Dispositif d'étude de la cinétique percutanée des NOPs

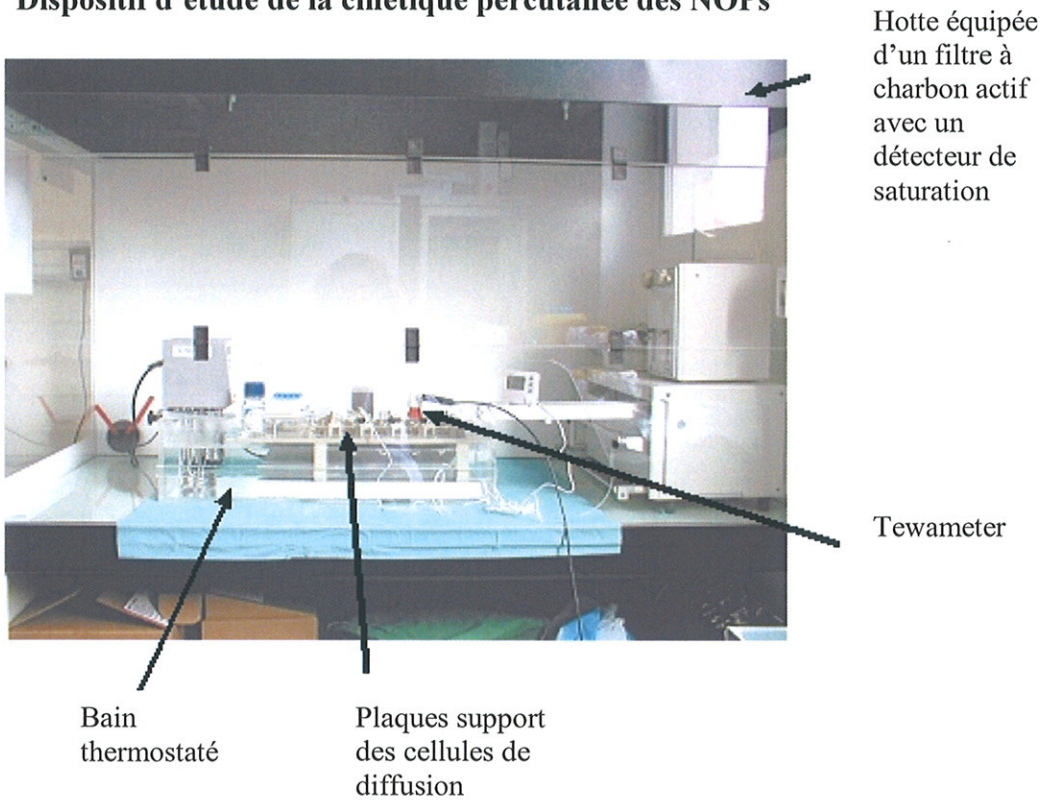


Figure 6 : Matériel utilisé pour l'étude du passage percutané de composés organophosphorés

IV. MATÉRIEL ET MÉTHODE UTILISÉS

Notre travail porte sur la mise au point d'une méthode analytique de dosage de métabolites de neurotoxiques organophosphorés : l'EMPA pour le gaz VX, le PMPA pour le soman et le MPA qui est le métabolite terminal commun à ces deux NOPs.

La méthode mise en œuvre s'appuiera sur une technique de chromatographie gazeuse couplée à un détecteur NPD et précédée d'une extraction solide-liquide (SPE) qui a pour but de purifier l'échantillon, ainsi que de concentrer le produit d'intérêt lors de l'analyse de traces.

IV.1. L'extraction solide-liquide (la SPE) [38]

IV.1.1. Principe

La SPE est basée sur la distribution des solutés entre une phase liquide, la solution-échantillon, et une phase solide adsorbante. Le transfert sélectif du composé d'intérêt se fait alors en deux temps : on assiste tout d'abord au passage du ou des solutés d'un milieu liquide à un milieu solide dont le but est de les retenir, puis à l'élution du soluté d'intérêt par un solvant approprié ayant pour rôle de rompre les interactions soluté-matrice de la phase solide. Ces interactions doivent donc être réversibles, de type Van der Waals, électrostatiques, ou liaisons hydrogène.

Il existe différents conditionnements pour les phases solides utilisées pour la SPE comme les plaques multi-puits et les colonnes-seringues que nous avons utilisées (*cf. figure 7*).

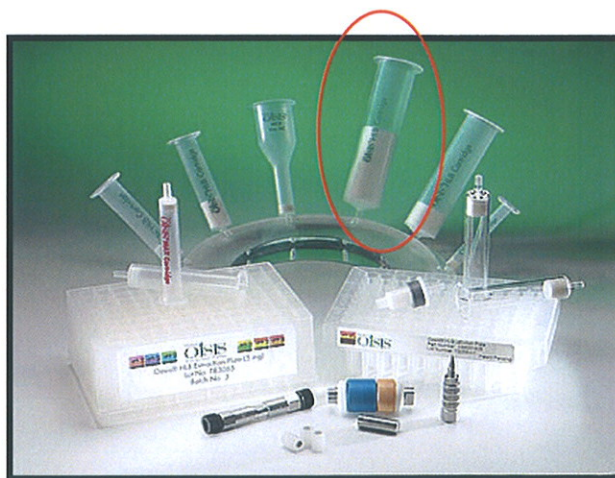


Figure 7 : Différents types de conditionnement pour la SPE

Deux types de phases solides peuvent être utilisés :

- les supports hydrophobes, qui couvrent tous les domaines de polarité et doivent leur nom à leur mécanisme de rétention basé sur des interactions hydrophobes, tels les silices greffées par des chaînes hydrocarbonées, les polymères de styrène divinylbenzène et les phases de carbone,
- et les phases induisant un mode de rétention sélectif, par exemple les phases mixtes nommées parfois résines échangeuses d'ions qui sont constituées de silices greffées par des chaînes alkyles et des dérivés de type ammoniums quaternaires ou acide benzène sulfonique responsables d'interactions électrostatiques.

Comme le schématise la *figure 8*, la SPE se décompose généralement en quatre étapes :

- le **conditionnement** de la phase solide, permettant l'activation, le rinçage et la saturation de la phase adsorbante.
- la **rétention** des solutés sur la phase solide après dépôt de l'échantillon.
- le **rinçage** de la colonne.
- l'**élution** conduisant au recueil de l'analyte d'intérêt par percolation.

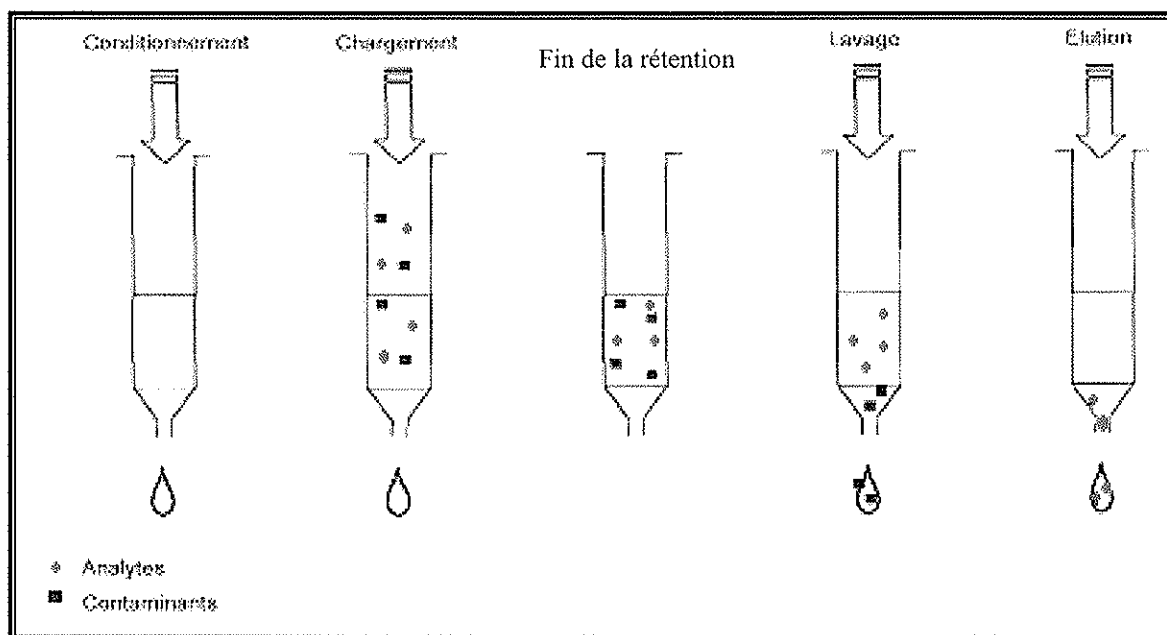


Figure 8 : Principe de l'extraction en phase solide [51]

IV.1.2. Justification du choix de la SPE

La SPE a été choisie en fonction des données bibliographiques qui en font la méthode d'extraction la plus utilisée pour l'analyse de traces. De plus, la SPE est utilisée dans la publication sur laquelle nous allons nous baser pour l'extraction de l'EMPA, le MPA et le PMPA [41].

Cette technique présente le double avantage d'isoler et de concentrer l'espèce à doser en utilisant de faibles volumes d'élution. En outre, tandis que l'extraction liquide-liquide utilise de grands volumes de solvants et peut aboutir à la formation d'émulsions quelquefois difficiles à rompre, la SPE présente de nombreux avantages : elle tolère une large gamme de solvants, l'extraction en phase solide se réalise rapidement, est automatisable, permet des économies importantes de solvant, de temps de manipulation, et concourt à la réduction des risques liés à l'utilisation de solvants organiques au laboratoire. Ainsi, la SPE est aujourd'hui une méthode de choix pour la préparation d'échantillons en vue d'une analyse ultérieure malgré des difficultés à obtenir une bonne reproductibilité.

IV.2. La chromatographie gazeuse (GC) [43]

Le choix de la chromatographie gazeuse s'explique par plusieurs raisons :

- c'est la méthode la plus utilisée dans les publications scientifiques traitant de dosage des RMPAs,
- nous avons la possibilité de travailler en larges volumes, permettant d'améliorer les limites de détection et de coupler la GC avec un détecteur NPD, spécifique des composés phosphorés et azotés, ce qui allège le chromatogramme par rapport à un détecteur qui est moins spécifique comme le FID par exemple,
- la répétabilité des mesures en GC est très bonne, les temps de rétention des composés sont très reproductibles et les variations sont moins importantes qu'en chromatographie liquide.

IV.2.1. Principe

La chromatographie en phase gazeuse est une méthode de séparation, d'identification et de quantification des constituants d'un mélange gazeux. La séparation est basée sur la répartition des analytes entre deux phases non miscibles :

- une phase stationnaire, solide ou liquide, déposée ou greffée soit sur la paroi interne de la colonne soit sur un support poreux et inerte la remplissant,
- une phase mobile constituée d'un gaz inerte, nommé gaz vecteur.

Cette technique se caractérise par la vitesse et la qualité de la séparation. Après avoir parcouru la totalité de la colonne, les analytes sont détectés à son extrémité, donnant lieu au chromatogramme, représentation graphique du signal en fonction du temps (*cf. figure 9*). La forme, la hauteur des pics chromatographiques et la distance qui les sépare nous permettent d'apprécier la qualité de la séparation et de quantifier les substances éluées.

La séparation s'effectuant en phase gazeuse, la GC s'adresse non seulement aux gaz mais aussi à tout composé susceptible d'être volatilisé par élévation de température. Cependant, cette contrainte limite l'emploi de la GC à l'étude de substances thermostables et suffisamment volatiles ou volatilissables.

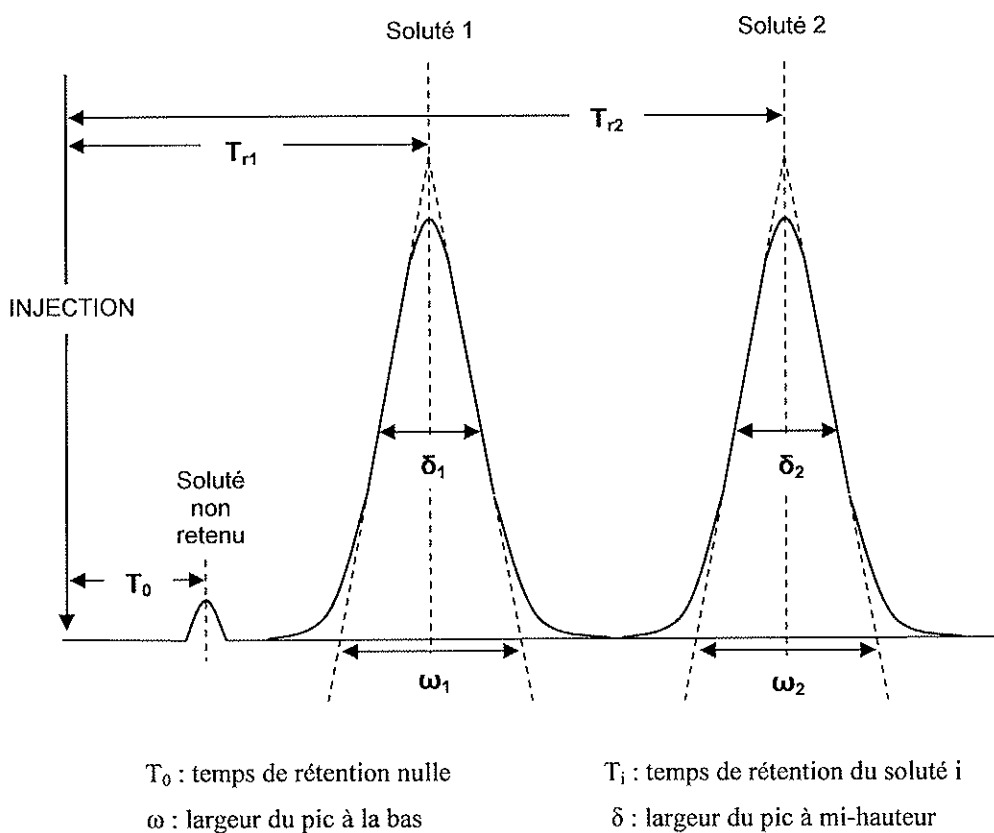


Figure 9 : Schéma d'un chromatogramme

Certaines molécules organiques polaires qui tendent à s'adsorber sur les phases support des colonnes ou peu volatiles peuvent être analysés par GC après un processus chimique qui s'appelle la **dérivation**. Cette transformation est basée sur des réactions diverses de silylation, d'alkylation ou alcoylation et d'acylation : on peut ainsi augmenter la volatilité, réduire l'adsorption des composés.

Nous concernant, les métabolites que nous cherchons à doser (EMPA, MPA, PMPA) sont des composés peu volatils et nécessitent donc une dérivation pour éliminer les groupements polaires OH et les rendre volatils à des températures compatibles avec la GC (< 300°C en général).

Pour notre travail, l'agent de dérivation choisi est le bromure de pentafluorobenzyle (PFBBr). La réaction consiste en une substitution nucléophile qui aboutit à la formation d'un ester d'acide méthylphosphonique, qui sera donc la molécule détectée.

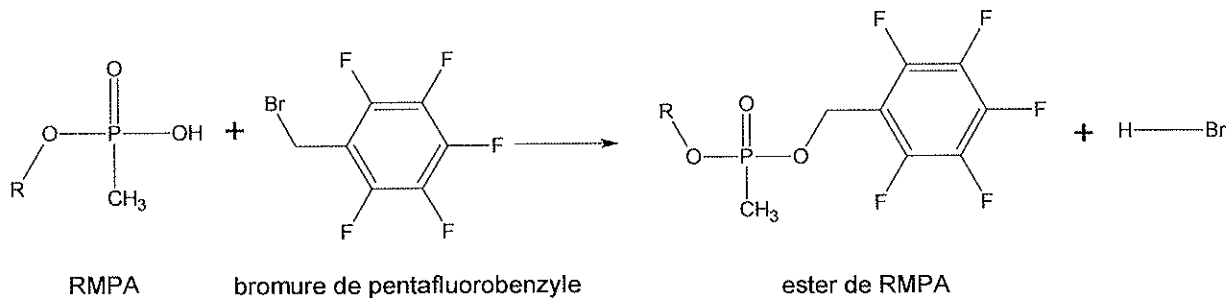


Figure 10 : Réaction chimique de la dérivation des RMPAs par le PFBBr

Le PFBBr a été choisi comme agent de dérivation en vue d'une future quantification des RMPAs en GC/NICI-MS. En effet, les cinq atomes de fluor, avec leur effet électro-attracteur, vont conférer au noyau benzénique un caractère électrophile. Ainsi, ce noyau pourra capter les électrons thermalisés, générés par des ionisations successives du gaz réactionnel ajouté (comme le méthane), sous l'impact des électrons énergétiques issus de la source du spectromètre masse. L'espèce générée, après capture d'électrons, est donc un ion négatif accéléré et envoyé au détecteur.

IV.2.2. Les paramètres fondamentaux en GC

Pour un système chromatographique donné, on caractérise la distribution de chaque analyte entre les deux phases par son coefficient de partage (ou coefficient de distribution) K. Cette grandeur dépend de la nature et de la température de la colonne ainsi que du gaz vecteur employé.

$$K = C_s / C_m$$

avec Cs et Cm les concentrations respectives de l'analyte à l'équilibre dans les phases stationnaire et mobile

IV.2.2.1 Paramètres caractérisant la rétention

*** Le temps de rétention T_r :**

Il représente le temps écoulé (en minutes) entre l'injection de l'échantillon et l'apparition du maximum du pic chromatographique de l'analyte d'intérêt. Il dépend essentiellement du débit du gaz vecteur et de la température de la colonne.

*** Le volume de rétention V_r :**

Il s'agit du volume de phase mobile nécessaire pour éluer un composé.

$$V_r = V_m + (K \times V_s) \quad \text{ou} \quad V_r = T_r \times D$$

V_m et V_s : volumes respectifs de phase mobile (volume mort) et de phase stationnaire contenus dans la colonne
 D : le débit, supposé constant, de la phase mobile

Le temps de rétention et le volume de rétention sont des grandeurs caractéristiques d'un analyte, pour une colonne donnée et des conditions expérimentales fixées. En analyse qualitative, ces grandeurs permettent d'identifier les espèces éluées.

*** Le facteur de capacité k' :**

Il se définit comme le rapport des quantités de soluté se trouvant dans les phases stationnaire et mobile.

$$\begin{aligned} k' &= K \times (V_s / V_m) \\ &= (V_r - V_m) / V_m \\ &= (T_r - T_0) / T_0 \end{aligned}$$

avec T_0 le temps d'élution d'un produit non retenu sur la colonne ou temps mort ou temps de rétention nulle

Ainsi, le facteur de capacité permet de caractériser la rétention d'un soluté en s'affranchissant des paramètres géométriques de la colonne : k' est d'autant plus grand que le soluté est fortement retenu, d'où trouver un compromis entre un temps de rétention suffisamment long pour permettre une séparation correcte et une durée d'analyse qui ne soit pas excessive.

IV.2.2.2 Paramètres caractérisant la séparation

*** La sélectivité :**

Le facteur de sélectivité α apprécie la distance entre les sommets de deux pics consécutifs.

$$\alpha = (T_{r2} - T_0) / (T_{r1} - T_0) = k'_2 / k'_1 = K_2 / K_1$$

l'indice 2 étant l'indice du composé le plus retenu

*** La résolution R_s :**

Elle mesure le degré de séparation de deux pics voisins et est définie par la relation suivante :

$$R_s = 2 \times (T_{r2} - T_{r1}) / (\omega_2 - \omega_1)$$

avec ω la largeur du pic à la base définie, après triangulation du pic, comme la distance entre les points d'intersection des tangentes d'inflexion avec la ligne de base

Il est considéré que la séparation de deux composés est correcte lorsque la résolution est supérieure à 1,2.

*** L'efficacité :**

L'efficacité d'une colonne mesure son aptitude à générer des pics très fins, et se définit, par le nombre de plateaux théoriques N que la colonne contient par unité de longueur (exprimée en mètres). Selon la théorie des plateaux, la colonne est considérée comme un milieu discontinu formé d'une succession de zones fictives nommées plateaux. On admet alors que :

- le gaz vecteur progresse dans la colonne par pas successifs, de plateau en plateau,
- le coefficient de partage est constant tout au long de la colonne est indépendant de la concentration de soluté dans un plateau,
- l'équilibre des concentrations de soluté entre les deux phases est instantané
- la totalité du soluté se trouve dans le premier plateau au moment de l'injection.

En réalité, la phase mobile progresse de manière continue au sein de la colonne. Ainsi, les pics d'élution peuvent être assimilés à des courbes de Gauss dont l'écart-type σ , exprimé en unité de temps, est lié au nombre de plateaux théoriques par la relation suivante :

$$\sigma^2 = T_r^2 / N$$

et

$$N = 16 \times (T_r / \omega)^2 = 5,54 \times (T_r / \delta)^2$$

avec δ la largeur du pic à mi-hauteur

En général, une diminution de N traduit l'apparition de lacunes ou de chemins préférentiels dans la structure du lit de la phase stationnaire, donc une perte d'efficacité de la colonne.

On définit également la hauteur équivalente à un plateau théorique, H ou HEPT. Elle représente l'efficacité d'une colonne pour un soluté et une phase stationnaire donnés, et permet de comparer entre elles des colonnes de différentes longueurs.

$$\text{HEPT} = L / N$$

avec L la longueur de la colonne en mm

Ainsi, la colonne est d'autant plus efficace que la HEPT est petite.

* La théorie cinétique et l'équation de VAN DEEMTER :

La théorie des plateaux néglige le fait que la chromatographie est un phénomène dynamique résultant du passage continu de la phase mobile sur la phase stationnaire. En revanche, la théorie cinétique, basée sur l'équation de VAN DEEMTER, relie la HEPT à la vitesse d'écoulement de la phase mobile et à différents facteurs qui ne sont pas pris en considération par la théorie précédente.

$$\text{HEPT} = A + (B / \bar{u}) + C\bar{u}$$

avec \bar{u} la vitesse linéaire moyenne du gaz vecteur

A la diffusion turbulente

B la diffusion longitudinale

C la résistance au transfert de masse

Dans cette équation, les constantes A, B et C propres à la colonne, caractérisent chacune un phénomène différent d'élargissement des pics :

- la diffusion turbulente A correspond à la dispersion de trajet des molécules, liée aux irrégularités de remplissage et au diamètre moyen des particules de support.
- la diffusion longitudinale B correspond au phénomène de déplacement des molécules vers l'avant et l'arrière.
- la résistance au transfert de masse C dépend de l'épaisseur moyenne du film de phase stationnaire, de sa viscosité limitant la diffusion de l'analyte et du facteur de capacité de la colonne.

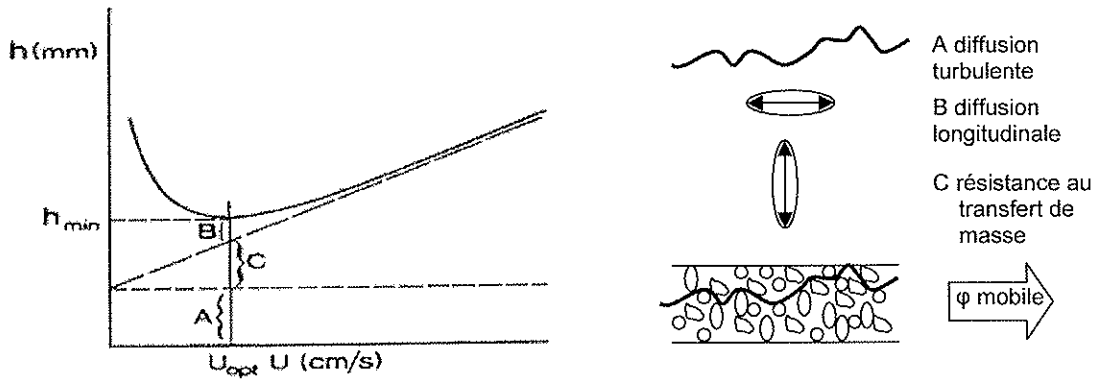


Figure 11 : Illustration de l'équation de VAN DEEMTER

L'hyperbole $HEPT = f(\bar{u})$ montre qu'il existe, pour chaque colonne, un débit optimal correspondant à la valeur de \bar{u} pour laquelle la HEPT est minimale.

Enfin, la HEPT varie avec la température de manière identique à ce qui est constaté pour le débit :

$$HEPT = A' + (B' / \theta) + C'\theta$$

avec θ la température du gaz vecteur

Il existe donc également une température optimale pour une HEPT minimale. En effet, la température, en modifiant la tension de vapeur des composés donc leur volatilité, intervient sur le partage des molécules entre la phase mobile et la phase stationnaire. Ainsi, toute augmentation de température entraîne une diminution des valeurs de rétention et de la largeur des pics.

Lorsque dans un mélange, les temps de rétention des composés sont très différents les uns des autres, il est difficile de les séparer en une seule opération à température constante. Dans ce cas, la programmation de température permet, tout en accélérant la chromatographie, d'obtenir de bonnes séparations. Elle consiste à débiter la séparation à une température suffisamment basse pour éliminer les composés les moins retenus, puis la température s'élève progressivement pour éluer les autres solutés dans des temps rapides et sous forme de pics étroits.

IV.2.3. Appareillage

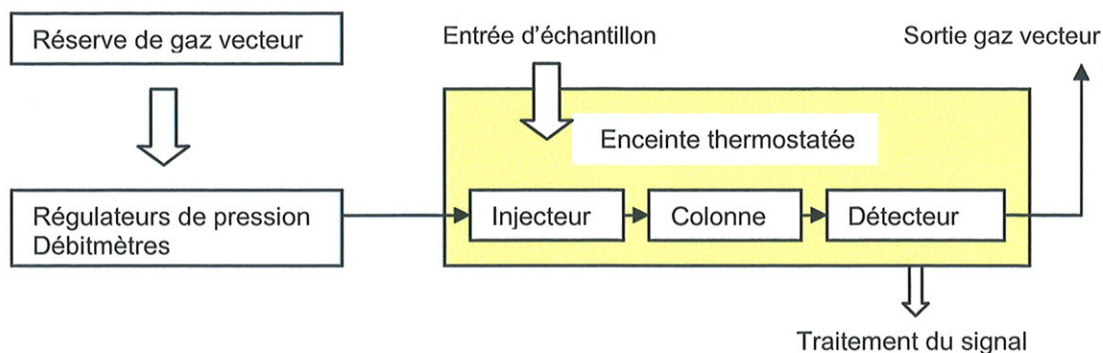


Figure 12 : Schéma d'un chromatographe phase gazeuse

Le chromatographe en phase gazeuse utilisé pour notre dosage est un HP 6890A, Agilent technologies.

IV.2.3.1. Gaz vecteur

La phase mobile utilisée doit répondre aux conditions suivantes :

- ne pas interférer au niveau de la détection et avoir une pureté compatible avec le détecteur,
- être sèche et inerte vis-à-vis de l'échantillon, de la phase stationnaire et du chromatographe,
- avoir une faible masse moléculaire et être très diffusible de manière à éviter les turbulences.

Le choix du gaz vecteur est directement responsable de la sensibilité du détecteur, de l'efficacité de la colonne et de la forme des pics chromatographiques obtenus.

Le gaz vecteur utilisé pour notre GC est l'Hélium qualité N55 - Air liquide.

IV.2.3.2. Injecteur

Les injections ont été réalisées à l'aide d'un échantillonneur automatique, le modèle MPS2 de chez GERSTEL associant un porte-échantillon à une seringue, permettant de mieux maîtriser la reproductibilité des injections. Le portoir peut être refroidi et régulé en température par effet Pelletier.

L'injecteur utilisé est un modèle de chez GERSTEL : le CIS-4, qui a pour caractéristiques de pouvoir fonctionner en mode split/splitless et en programmation de température (PTV : Programmed Temperature Vaporizer). L'insert (ou liner) utilisé pour ce dosage est rempli de laine de verre, spécifique pour retenir les pesticides et autres organophosphorés.

* **Mode split-splitless** : les volumes injectés sont de l'ordre de 1 ou 2 μL .

En mode split, la vanne de fuite (ou vanne de split) divise le débit de gaz vecteur en deux fractions dont la plus importante est éliminée et entraîne avec elle la majeure partie de l'échantillon introduit. Ce mode d'injection est utilisé pour colonnes capillaires à faible capacité et est très utilisé lors du couplage GC-SM, évitant ainsi la saturation du spectromètre de masse. Par contre, il présente l'inconvénient majeur de ne pas être adapté à l'analyse de traces. Dans ce cas, il est possible de l'utiliser en mode splitless (fermeture de la vanne split), réservé à l'introduction d'échantillons en solution très diluée.

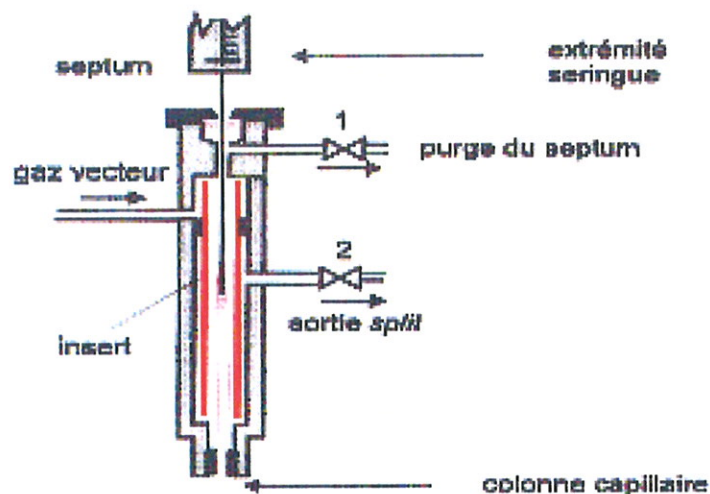


Figure 13 : Schéma de l'injecteur split-splitless [43]

* **Le PTV/LV : injecteur à température programmable à Large Volume**

Le principal avantage des injecteurs PTV/LV est de pouvoir injecter de grands volumes d'échantillon, ce qui est un moyen simple et efficace d'abaisser la limite de détection des composés que l'on recherche. Le PTV/LV est ainsi très utilisé dans l'analyse de traces.

Un système de refroidissement (azote liquide) permet d'injecter l'échantillon à froid. La température doit être choisie en fonction des propriétés physico-chimiques du solvant (température d'ébullition, tension de vapeur). En effet, avec l'apport d'un certain débit d'hélium (« venting flow ») en circuit « fermé » dans l'injecteur, le solvant est volatilisé et éliminé par la vanne split, en conservant une grande quantité de composés que l'on veut détecter (dans notre cas les esters de RMPA). Ces valeurs de température, de « venting flow », ainsi que la durée du venting doivent être optimisées pour éliminer le maximum de solvant, sans éliminer les composés d'intérêt.

Enfin, après passage en mode splitless (fermeture de la vanne split), un système de chauffage rapide permet en quelques secondes de volatiliser les produits d'intérêt qui seront reconcentrés par condensation en tête de colonne.

Le principal inconvénient du PTV/LV est la conséquence directe de l'injection d'un grand volume de solution soit une plus grande quantité en composés recherchés mais hélas aussi d'impuretés non volatilisées avec le solvant. Ainsi, la charge maximale de la colonne est atteinte avec des concentrations beaucoup plus basses qu'en injection splitless, surtout si on injecte un mélange de produits.

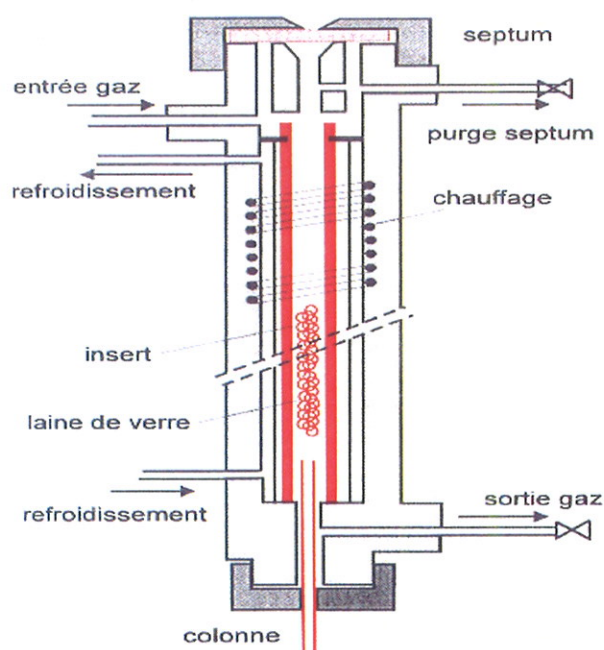


Figure 14 : Schéma de l'injecteur à température programmable [43]

IV.2.3.3. Colonne

Nous avons utilisé deux colonnes capillaires, disponibles dans le laboratoire : une HP5 et une HP5-MS qui ont sensiblement les mêmes caractéristiques (30m de longueur et respectivement 0,32 et 0,25mm de diamètre). La charge maximum respective est estimée à 250ng et 150ng. Au-delà, l'efficacité est diminuée.

Remarque : il est nécessaire de couper la colonne du côté injecteur et du côté du détecteur de temps en temps et donc de réduire sa longueur pour maintenir la finesse des pics chromatographiques obtenus. Ainsi, les temps de rétention de tous les composés sont diminués mais de façon proportionnelle.

IV.2.3.4. Détecteur

La méthode mise au point utilise un détecteur thermoionique dit « NPD » ou détecteur azote phosphore, du fait de sa spécificité pour les composés azotés et phosphorés. Il est donc particulièrement adapté pour la détection des métabolites des NOPs, avec une limite de détection de l'ordre de 0,1 pg dans les conditions optimales.

Dans le NPD, l'échantillon et le gaz vecteur passent au travers d'un plasma d'hydrogène/air, ce qui conduit à la production d'ions et de particules chargées. Une électrode en céramique, formée d'un sel alcalin, est responsable de sa plus grande spécificité pour les composés azotés (électrode en bromure de rubidium) ou phosphorés (électrode en chlorure de sodium).

Le faible ratio hydrogène/air, de l'ordre de 1/20, ne peut pas soutenir une flamme, minimisant l'ionisation des hydrocarbures, tandis que les ions d'alcali sur la surface de l'électrode en céramique facilitent l'ionisation des composés organiques d'azotes et de phosphore. Le courant de sortie est proportionnel au nombre d'ions collectés. Il est détecté par un électromètre, converti sous forme numérique et envoyé à une unité de sortie.

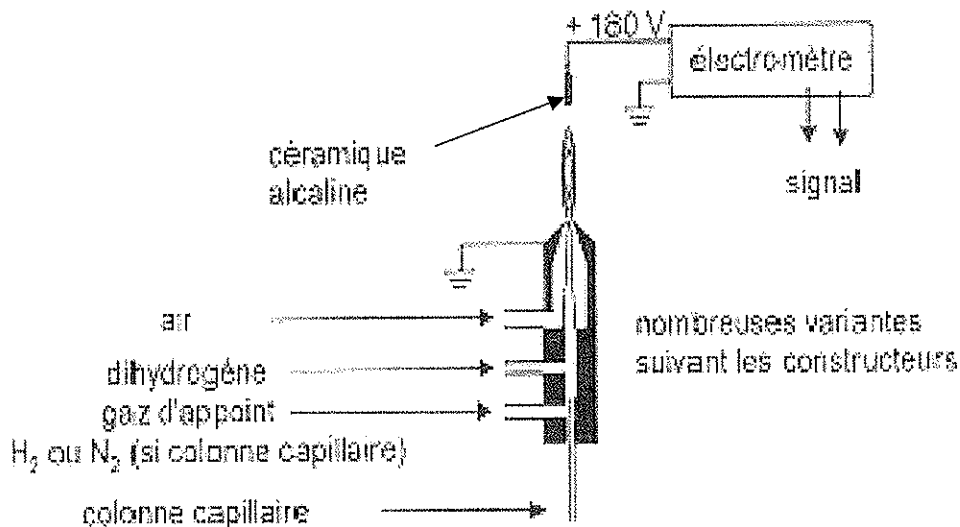
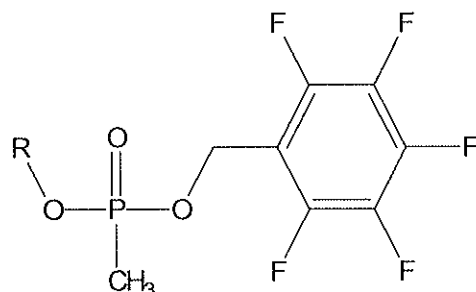


Figure 15 : Schéma du détecteur thermoionique [43]

V. OPTIMISATION DE LA TECHNIQUE DE DOSAGE DES RMPAS

V.1. Détection de l'EMPA, PMPA et MPA par PTV/LV-GC-NPD

Rappel : Après dérivation, les RMPAs sont sous la forme d'esters pentafluorobenzylés, qui seront donc les composés détectés, de formule générale :



Par commodité, nous parlerons de détection de RMPAs sous-entendu d'esters pentafluorobenzylés de RMPAs.

V.1.1. Choix des conditions chromatographiques et des paramètres d'injection du PTV/LV

Certaines conditions initiales ont été établies en fonction des données bibliographiques [41], des pratiques habituelles du laboratoire de Biospectrométrie du CRSSA et du matériel disponible, pour être dans les meilleures conditions possibles pour détecter les RMPAs, notamment :

- la nature de la colonne (HP5 et HP5-MS),
- la nature du gaz vecteur (He) et son débit (1,7mL/mn),
- les paramètres du détecteur : température : 320°C, débit des différents gaz (H₂ : 3 mL/mn, air : 60mL/mn, azote : 8,3 mL/mn)
- la montée en température du four (20°C/mn)

D'autres paramètres ont nécessité une optimisation, notamment tous ceux concernant l'injection en mode PTV (*cf. tableau V*). Ces paramètres ont été optimisés à partir de 3 contraintes et objectifs suivants :

- Le choix du solvant de reprise (CH_2Cl_2), pour sa température d'ébullition basse (37°C).
- Pouvoir injecter **90 μL** d'échantillon (seringue de 100 μL), tout en restant linéaire concernant la réponse du détecteur en fonction du volume injecté dans une gamme « larges volumes » (de 10 à 90 μL).
- Eliminer un maximum de solvant, de manière à augmenter la durée de vie de la bille NPD.

Remarques :

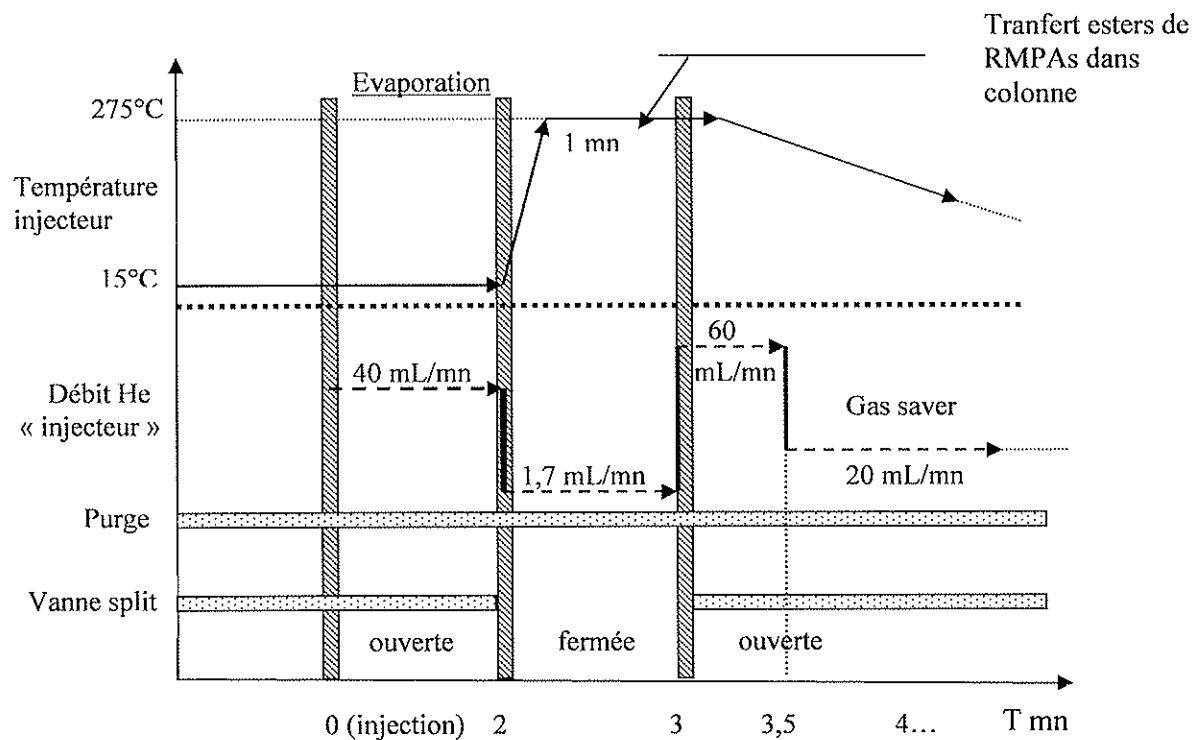
- La seringue de 100 μL est rincée au dichlorométhane une fois avant prélèvement de l'échantillon et une fois après injection.
- La bille NPD ne sera alimentée en hydrogène qu'à partir de la 5^{ème} minute du run : ainsi, le passage du résidu de solvant CH_2Cl_2 (vers 3 mn) se fera sur une bille éteinte, pour préserver celle-ci.

Tableau V : Paramètres du PTV/LV

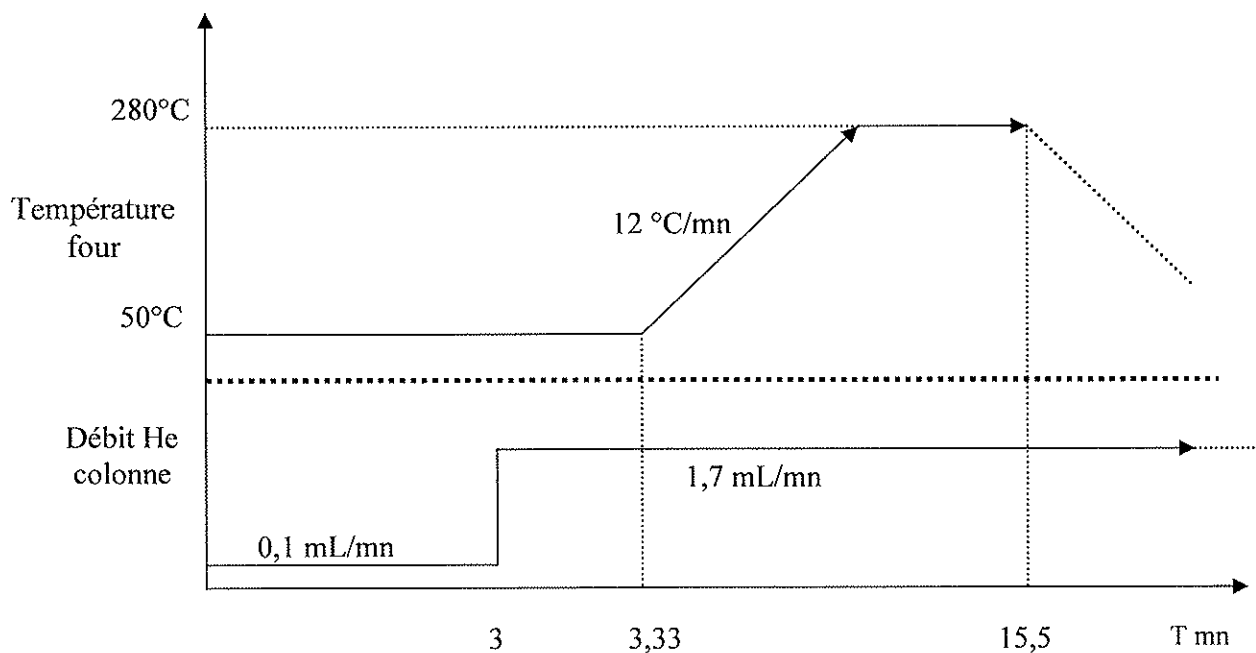
Paramètres	Valeurs testées	Valeur optimale retenue
Température d'évaporation du solvant CH ₂ Cl ₂	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 10°C ✓ 15°C ✓ 20°C ✓ 25°C ✓ 30°C 	15°C
Durée d'évaporation	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 1,5 mn ✓ 2 mn ✓ 2,5 mn ✓ 3 mn 	2 mn
Débit d'hélium pendant l'évaporation (« venting flow »)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 35 mL/mn ✓ 37,5 mL/mn ✓ 40 mL/mn ✓ 42,5 mL/mn ✓ 45 mL/mn ✓ 50 mL/mn ✓ 70 mL/mn ✓ 80 mL/mn 	40 mL/mn
Vitesse d'injection des 90µL	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 3 µL/s ✓ 5 µL/s ✓ 8 µL/s 	5 µL/s

V.1.2. Schéma type du run chromatographique en PTV/LV

V.1.2.1. Injecteur CIS-4 en PTV/LV



V.1.2.2. Four et colonne chromatographique



V.1.3. Choix des conditions de dérivation et rendement

Tous les paramètres de dérivation ont été choisis en fonction des données bibliographiques [41] :

- le choix du milieu de dérivation : l'acétonitrile,
- le volume dans lequel se déroule la dérivation : 500 μL ,
- le temps et la température permettant la réaction chimique : 90°C pendant 45 mn,
- le choix et la quantité de la base neutralisant la formation de l'acide HBr lors de la dérivation : 20mg de K_2CO_3 ,
- le volume de PFBBr (laboratoires PIERCE) : 10 μL
- le volume de reprise après dérivation : 300 μL de CH_2Cl_2

Dans ces conditions de dérivation, le DSTL [41] a obtenu les rendements suivants :

- pour l'EMPA : 68%
- pour le PMPA : 47%
- le MPA n'était pas étudié et nous n'avons pas trouvé de données bibliographiques donnant un rendement pour le MPA, utilisant le PFBBr comme agent de dérivation.

Faute de pouvoir synthétiser ou nous procurer les esters pentafluorobenzylés de RMPAs, nous utiliserons par défaut ces rendements de dérivation, pour quantifier. Ne disposant pas de données pour le MPA, nous serons limité à la détection qualitative de cet acide.

Cette étape de dérivation a été la source du principal problème rencontré lors de cette mise au point c'est-à-dire la présence d'impuretés, plus ou moins importantes, pouvant ou non interférer avec la détection des esters de RMPA. Ceci a déjà été mis en évidence par Fredricksson et al. en 1995. Ils ont constaté que des impuretés de solvants, dérivées par le PFBBr, interféraient avec la détection d'esters de RMPA en GC-FID et également en GC-ECD [12].

Dans notre cas, il s'est avéré que cette contamination provient essentiellement d'impuretés présentes dans l'acétonitrile, dérivées par le PFBBr, et ensuite détectées par le détecteur NPD. Ces impuretés ont pour inconvénient de surcharger la colonne en plus de potentiellement masquer les esters de RMPA à faible dose si le temps de rétention de ces impuretés correspond à celui d'un ester d'acide alkylméthylphosphonique.

Ainsi, nous avons testé 5 « acétonitrile » (ACN) différents, comme milieu de dérivation :

- ACN HPLC grade JT BAKER
- ACN HPLC grade SODIPRO
- ACN HPLC grade FRUTAROM
- ACN pesticide free ACROS
- ACN pestipur SDS

L'ACN choisi sera celui qui génère le moins d'impuretés interférentes dans l'intervalle de temps où sont élués les esters de RMPA c'est-à-dire entre 10 et 13 minutes pour l'EMPA, le MPA et le PMPA. Les chromatogrammes obtenus sont présentés en **Annexe 2** (p. 80 et 81).

Résultats :

En comparant ces chromatogrammes, nous avons constaté que :

- les impuretés sont qualitativement et quantitativement différentes d'un ACN à un autre, même si on peut retrouver parfois des impuretés communes.
- les impuretés ne sont pas toujours dérivées de façon reproductible d'un essai à l'autre pour un même ACN.
- les 2 ACN dont les impuretés dérivatisées interfèrent le moins avec l'EMPA, le PMPA et le MPA sont l'ACN « pestipur » SDS et l'ACN HPLC grade JT Baker, que nous utiliserons donc pour la suite de la mise au point.

Afin d'essayer de remédier à ce problème d'impuretés, nous avons testé d'autres solvants comme milieu de dérivation dans le but de remplacer l'ACN : l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane et l'acétone.

Mais il s'est avéré que la dérivation des RMPAs ne s'effectue quantitativement que dans l'ACN.

V.1.4. Purification post dérivation

Dans le but d'éliminer ou tout du moins de diminuer la quantité donc l'intensité des pics chromatographiques correspondants à ces impuretés et à l'excès de PFBBBr, nous avons testé plusieurs méthodes de purification post dérivation. Nous avons contrôlé ces essais à l'aide d'un détecteur FID (détecteur non spécifique) pour visualiser tous les composés présents après dérivation.

Dans un premier temps, nous avons testé une extraction solide-liquide avec une cartouche Florisil Elut Bond 1000 mg, adaptée du protocole du DSTL [41]. Nous avons rapidement abandonné cette piste car on éluait en plus des esters de RMPA d'intenses et très nombreuses impuretés provenant certainement d'une dégradation de la phase solide. Ces impuretés, même si nous ne savons pas si elles sont détectées par le détecteur NPD, surchargent la colonne de façon importante et concourent donc à diminuer son efficacité.

Dans un deuxième temps, nous avons tenté de purifier le mélange résultant de la dérivation à l'aide d'une extraction liquide-liquide (LLE) avec un solvant apolaire non miscible à l'ACN : nous avons choisi l'hexane et réalisé une extraction volume à volume (ajout de 500µL hexane HPLC PROLABO).

Ensuite, nous prélevons un volume constant de la phase ACN qui est la phase inférieure contenant les esters de RMPA et nous mettons en œuvre la poursuite du protocole (évaporation, reprise par CH₂Cl₂, injection).

Cette LLE a donné de bons résultats et a permis ainsi d'éliminer certaines impuretés et d'en diminuer d'autres. Nous avons vérifié auparavant que les esters de RMPAs ne sont pas retenus par l'hexane. Les chromatogrammes montrant l'efficacité de cette LLE sont présentés en **Annexe 3** (p.82).

Cette fois avec le détecteur NPD, en comparant les chromatogrammes avec et sans LLE, il n'y a pas de différence visible. Cependant, l'effet de cette LLE constaté en FID incite à penser que la réponse en NPD sera d'autant meilleure à de fortes concentrations en RMPAs, proches de la charge maximale de la colonne.

V.1.5. Résumé du protocole optimal pour la détection des RMPAs

Prenons pour exemple l'analyse pour une concentration en RMPAs de $5,3 \times 10^{-13}$ mol/ μ L ou 530 nmol/L :

- préparation des solutions mères d'EMPA, PMPA, et MPA dans l'ACN de façon à avoir la même concentration dans les trois solutions. Les produits standard de EMPA, MPA et PMPA proviennent du laboratoire ALDRICH.

- mélange des 3 acides phosphoniques et dilutions successives dans l'ACN pour avoir au final une concentration de 530 nmol/L. Dans un volume de 500 μ L, la quantité de chaque RMPA est de $2,65 \times 10^{-10}$ moles. **On parlera ici de concentration et quantité de RMPA mises en jeu.**

- dérivation de ce mélange de RMPAs :

* ajout de 10 μ L de PFBBBr

* ajout de 20mg de K₂CO₃

* réaction chimique pendant 45mn à 90°C

La quantité d'esters de RMPA (en tenant compte des rendements de dérivation déterminés par le DSTL), est de :

$$n_{\text{PMPA}} = 1,25 \times 10^{-10} \text{ moles et } n_{\text{EMPA}} = 1,80 \times 10^{-10} \text{ moles}$$

- extraction liquide-liquide volume à volume (ajout 500 μ L Hexane), prise de 400 μ L de la phase ACN dans laquelle se trouvent les esters de RMPAs :

$$n_{\text{PMPA}} = 1,00 \times 10^{-10} \text{ moles}$$

$$n_{\text{EMPA}} = 1,44 \times 10^{-10} \text{ moles}$$

- évaporation de ces 400 μ L sous N₂ à 50°C et reprise par 300 μ L de CH₂Cl₂.

$$C_{\text{PMPA}} = 3,34 \times 10^{-13} \text{ mol}/\mu\text{L ou } 334 \text{ nmol/L}$$

$$C_{\text{EMPA}} = 4,8 \times 10^{-13} \text{ mol}/\mu\text{L ou } 480 \text{ nmol/L}$$

On parlera ici de concentrations de RMPA injectées, calculées avec les rendements d'extraction.

- injection de 90 μ L.

Résultat : le chromatogramme obtenu est représenté sur la figure 16

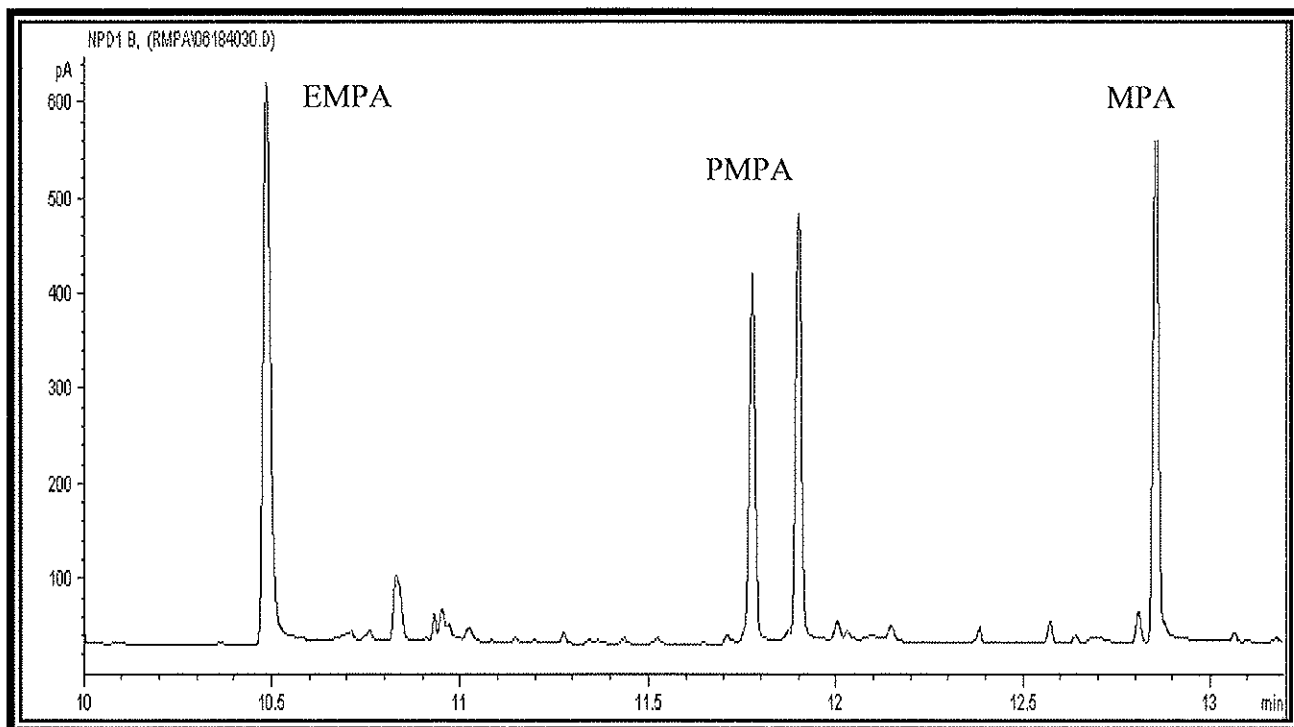


Figure 16 : Chromatogramme des esters de EMPA, PMPA et MPA pour une concentration mise en jeu de 530 nmol/L

Nous pouvons constater que l'EMPA apparaît sous la forme d'un seul pic chromatographique ainsi que le MPA. Le PMPA, en revanche, sort sous la forme de 2 pics.

Le soman - à l'origine du PMPA - est en réalité composé de 4 énantiomères (dus à la présence de deux atomes asymétriques dans sa structure : un carbone et le phosphore), dont la toxicité est d'ailleurs très différente (en terme de vitesse d'inhibition de l'AChE des facteurs supérieurs à 50000 ont été rapportés [3], Les isomères $P_{(-)}C_{(-)}$ étant les plus toxiques). Cependant, les colonnes HP5-MS et HP5, comme d'ailleurs la colonne Innovax, ne sont pas capables de séparer les 4 isomères. Ainsi, De Bisschop, en 1985 [9], a montré que le premier pic élué correspond aux 2 isomères présentant des pouvoirs rotatoires opposés pour les atomes de carbone et de phosphore $P_{(+)}C_{(-)}$ et $P_{(-)}C_{(+)}$ et le pic suivant comme celui de l'élution des espèces ayant le même pouvoir rotatoire des carbone et phosphore $P_{(+)}C_{(+)}$ et $P_{(-)}C_{(-)}$. La proportion des aires est sensiblement de type 45/55.

La séparation des 4 énantiomères est cependant réalisable, imparfaitement, sur une colonne chirasil L-valine [3].

V.2. Mise au point de l'extraction en phase solide

Le but de notre travail est de mettre au point une seule et même méthode permettant d'extraire par SPE, l'EMPA, le PMPA et le MPA de l'HBSS et ultérieurement de l'urine.

Dans le département Toxicologie du CRSSA, des explants cutanés, au travers desquels est étudié le passage de neurotoxiques organophosphorés, sont maintenus dans des conditions proches des conditions physiologiques grâce à un liquide de survie appelé HBSS placé au contact du derme.

Le choix de l'urine se situera plus dans le contexte d'expertise toxicologique.

V.2.1. Choix du type de cartouche SPE

Afin de sélectionner le type de cartouche qui donnera les meilleurs rendements, nous avons réalisé un essai d'extraction des RMPAs dans l'eau avec une concentration de 890 nmol/L, en comparant trois protocoles avec deux types de cartouches, disponibles au sein du laboratoire et susceptibles d'extraire les RMPAs (*cf. tableau VI*).

Tableau VI : Les différents protocoles de SPE testés pour extraire les RMPA

Protocole CEB	Protocole DSTL [41]	Protocole avec cartouche MAX, échangeuse d'anions
<p>Cartouche : Oasis HLB 1cc</p> <p>Principe : on « force » un milieu très acide pour favoriser la forme moléculaire des RMPA, qui est la forme retenue par la phase solide HLB</p>	<p>Cartouche : Oasis HLB 1cc</p> <p>Principe : on « force » un milieu très acide pour favoriser la forme moléculaire des RMPA, qui est la forme retenue par la phase solide HLB</p>	<p>Cartouche : Oasis MAX 1cc</p> <p>Principe : on « force » un milieu basique pour favoriser la forme ionisée des RMPA, qui est retenue par la phase MAX</p>
<p>- <u>conditionnement</u> :</p> <p>1mL ACN 1mL MeOH 1mL eau désionisée 166µL HCL 0,1N</p> <p>- <u>charge</u> : 1mL échantillon</p> <p>- <u>rinçage</u> : 333µL HCL 0,1N</p> <p>- <u>séchage</u></p> <p>- <u>élution</u> : 2 x 750µL ACN</p>	<p>- <u>conditionnement</u> :</p> <p>1mL ACN 1mL (eau + 1% TCA) (pas de TFA disponible dans le laboratoire)</p> <p>- <u>charge</u> : 1mL échantillon + 150µL (eau + 10%TCA)</p> <p>- <u>rinçage</u> : 1mL eau + 1% TCA</p> <p>- <u>séchage</u></p> <p>- <u>élution</u> : 2 x 750µL ACN</p>	<p>- <u>conditionnement</u> :</p> <p>1mL ACN 1mL MeOH</p> <p>- <u>charge</u> : 1mL échantillon + NH₄OH qsp pH = 11</p> <p>- <u>rinçage</u> :</p> <p>1mL (eau + 5% NH₄OH) 1mL MeOH</p> <p>- <u>séchage</u></p> <p>- <u>élution</u> : 2 x 750µL (ACN + 2% HCOOH)</p>

Résultats :

	Protocole CEB Cartouche : Oasis HLB 1cc	Protocole DSTL [41] Cartouche : Oasis HLB 1cc	Protocole avec cartouche OASIS MAX 1cc
Rendement d'extraction	- EMPA : non détecté - PMPA : 60,1 et 69,6% - MPA : non détecté	- EMPA : non détecté - PMPA : 65,8 et 85,6% - MPA : non détecté	- EMPA : 46,2% - PMPA : 79,6 et 97,2% - MPA : non détecté

Les rendements fluctuent et démontrent qu'on ne pourra pas s'affranchir d'un étalon interne. Avec la cartouche Oasis HLB, seul le PMPA c'est-à-dire le plus hydrophobe de nos RMPA, a été retenu et élué. Les 2 autres acides méthylphosphoniques, l'EMPA et le MPA, plus hydrophiles, ne sont pas ou très peu retenus par ce type de cartouche (le DSTL a obtenu un rendement de 24% pour l'EMPA [41]).

Avec la cartouche Oasis MAX, le PMPA et l'EMPA sont extraits. Nous avons constaté que les meilleurs résultats ont été obtenus avec cette cartouche MAX 1cc ; cependant, nous ne disposons pas du nombre de cartouches suffisant pour améliorer le protocole et le délai d'approvisionnement est incompatible avec le temps qui nous restait imparti.

Aussi, nous avons donc choisi faute de mieux la cartouche Oasis HLB 1cc, disponible en grande quantité dans le laboratoire, et le protocole retenu est celui du DSTL.

En conséquence, nous avons donc décidé de nous attacher uniquement au dosage du PMPA dans l'HBSS et l'urine, d'autant plus qu'il est le métabolite spécifique du soman, prioritaire dans les travaux de recherche actuels du CRSSA.

V.2.2. Optimisation du protocole de SPE pour l'extraction du PMPA

Principe : Le pKa des RMPA étant compris entre 2 et 3, le pH a donc une importance capitale pour favoriser la forme moléculaire des RMPA. Nous avons décidé de fixer un pH ~ 1,2, ajusté avec de l'HCl 1N, pour maîtriser le pH quelque soit le milieu dans lequel se trouve les RMPAs (HBSS, urine).

Le protocole de SPE devient alors :

conditionnement	charge	rinçage	séchage	élution
- 1mL ACN - 1mL eau + HCl 1N qsp pH=1,2	1mL échantillon + HCl 1N qsp pH=1,2	1mL eau + HCl 1N qsp pH=1,2	5minutes sous vide	2 x 750µL ACN

Après élution, l'éluat de environ 1,5 mL est évaporé à sec sous azote et repris par 500µL d'ACN pour être dans les conditions de la dérivation. La suite du protocole est inchangée.

V.3. Choix de l'étalon interne (EI)

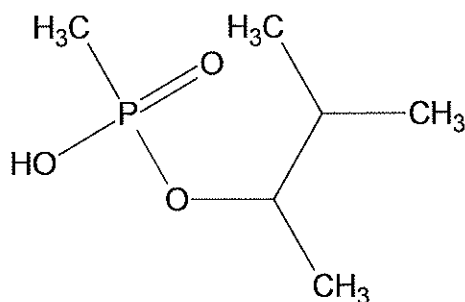
L'utilisation d'un étalon interne est primordiale pour deux raisons :

- d'une part, il permet de s'affranchir de toutes les variations de l'intensité de la réponse du détecteur NPD, dues au vieillissement de cette électrode spécifique.
- d'autre part, l'utilisation d'un EI permet de pallier à toutes les fluctuations du rendement d'extraction de la SPE, dues à l'efficacité intrinsèque de chaque cartouche mais aussi à des variations éventuelles de température, pH, vitesse d'écoulement (et d'échanges)...

Trois étalons internes ont été testés :

- l'acide diéthylméthylphosphonique (CEB)
- l'acide 1,2-diméthylpropylethylphosphonique (CEB)
- l'acide 1,2-diméthylpropylméthylphosphonique (LGC PROMOCHEM, 1g/L dans MeOH)

Notre choix final s'est porté sur l'acide 1,2-diméthylpropylméthylphosphonique (DMPMPA) dont la structure est très proche du PMPA :



Acide 1,2-diméthylpropylméthylphosphonique

Faute d'information spécifique, nous avons décidé de considérer le rendement de dérivation du DMPMPA identique à celui du PMPA c'est à dire de 47% car la fonction OH est accessible au PFBBBr d'une façon identique pour ces deux acides.

Le DMPMPA est élué sous la forme de deux pics (*cf. figure. 17*).

Un seul des ces pics servira à faire les rapports d'aires et de concentration avec le PMPA : nous avons choisi le premier pic car il souffre moins de la coélution d'impuretés et son intégration en est plus aisée.

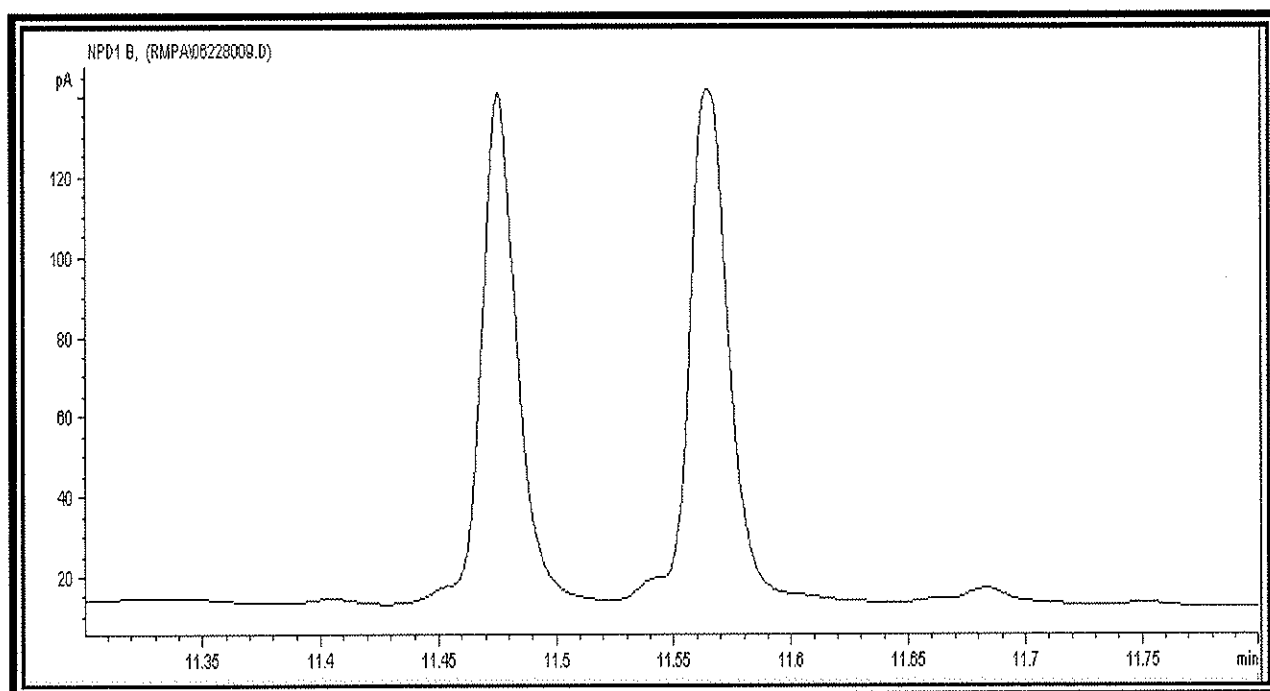


Figure 17 : Chromatogramme du DMPMPA (concentration mise en jeu : 240 nmol/L)

VI. RÉSULTATS

VI.1. Mise au point de la détection des EMPA, PMPA et MPA

VI.1.1. Apport de l'injection en mode PTV/LV

Les différents essais de mise au point du PTV/LV ont été réalisés sans étalon interne.

L'objectif était d'avoir une réponse linéaire entre 10 et 90 μL injectés, tout en éliminant le maximum de solvant.

Les figures 18, 19, 20 montrent les résultats obtenus pour une concentration de 7800 nmol/L de chaque RMPA mise en jeu, avec les paramètres optimaux de PTV/LV (cf. tableau V, p. 36).

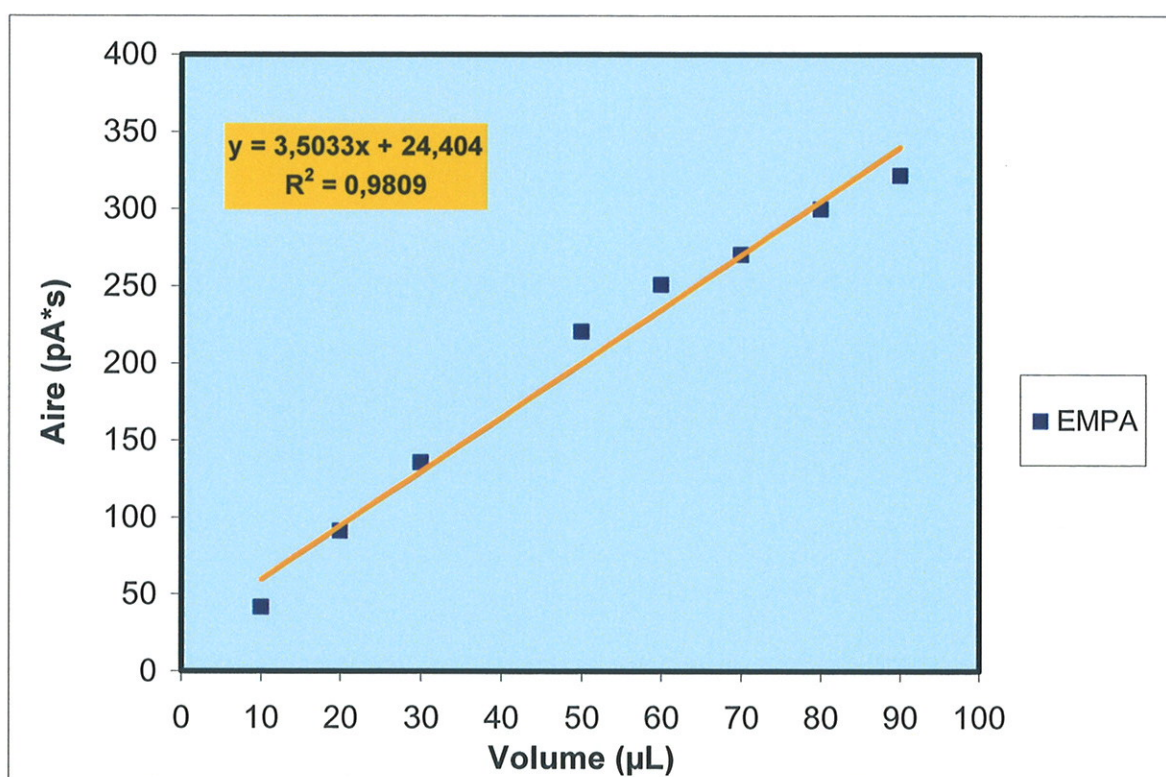


Figure 18 : Linéarité de la réponse pour l'EMPA, en fonction du volume injecté

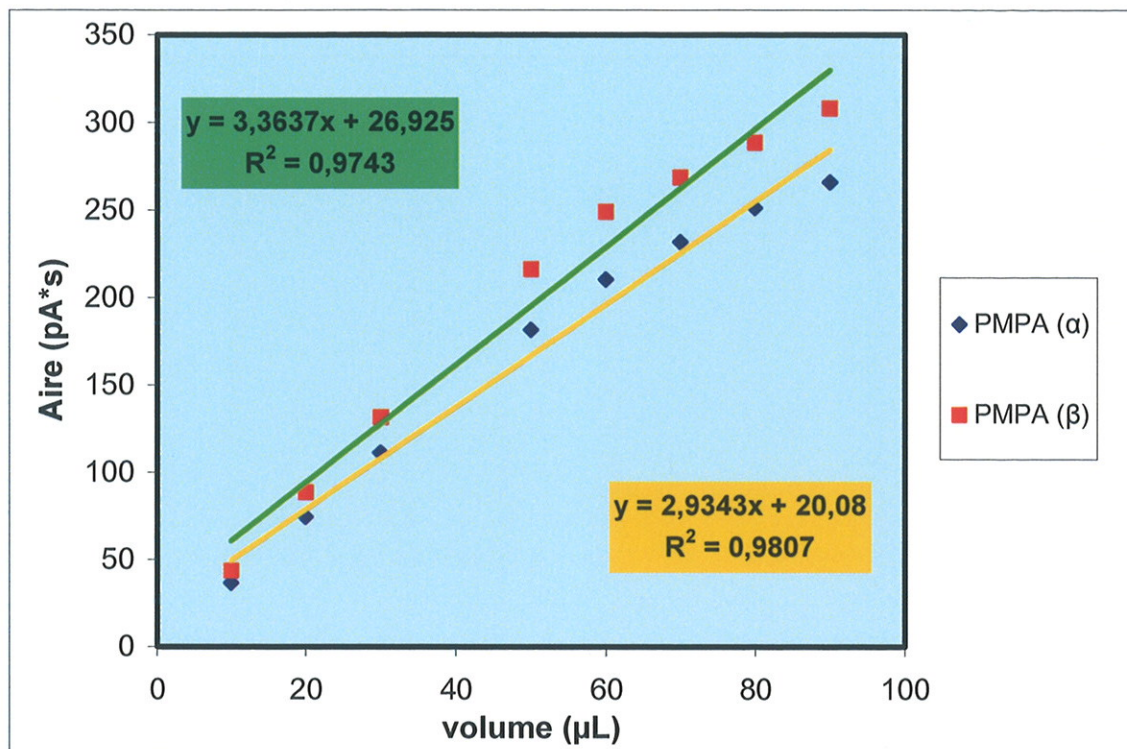


Figure 19 : Linéarité de la réponse pour le PMPA, en fonction du volume injecté

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer la différence de pente pour les 2 couples de diastéréoisomères de PMPA. Elle peut provenir :

- soit d'une discrimination au niveau de l'évaporation dans le PTV/LV. Pour un grand volume, la quantité de PMPA β qui passe dans la colonne est plus importante que celle de PMPA α (rapport supérieur à 55/45)
- soit le rapport des quantités est 45/55 en tête de colonne mais ensuite nous avons une réponse du détecteur modulée en fonction de l'accessibilité des atomes de phosphore des 4 énantiomères, et ainsi, pour une quantité croissante en esters de PMPA, les atomes de phosphore pour le couple $P_{(+)}C_{(+)} / P_{(-)}C_{(-)}$ sont plus « accessibles » que pour le couple $P_{(+)}C_{(-)} / P_{(-)}C_{(+)}$. Cette dernière hypothèse est certainement la plus plausible.

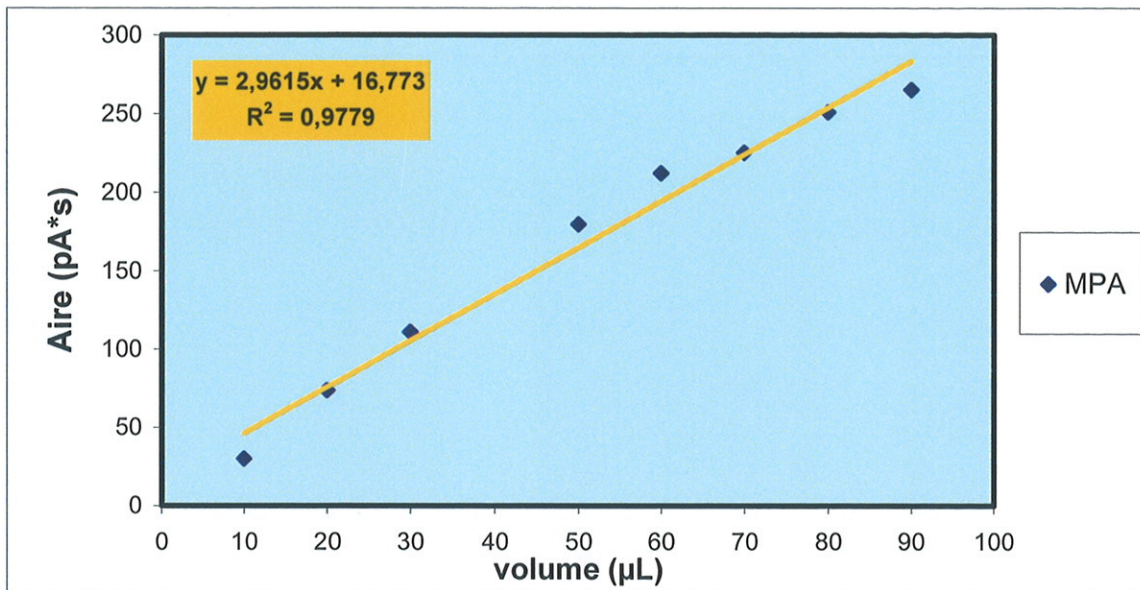


Figure 20 : Linéarité de la réponse pour le MPA, en fonction du volume injecté

La différence d'aire entre les RMPAs pour une même quantité injectée est due aux différents rendements de dérivation et aux différences de « réponses » des atomes de phosphore.

En conclusion, les paramètres déterminés pour la programmation du PTV/LV permettent d'injecter jusqu'à 90µL d'échantillon, tout en observant la quasi linéarité de la réponse du détecteur. L'injection de 90µL laisse entrevoir un gain de sensibilité de l'ordre de 10^2 .

Afin de cerner l'origine du faible écart à la linéarité, nous avons injecté la même quantité de RMPAs à l'aide de volumes d'injection différents. Sur la figure 21 sont reportés les résultats obtenus.

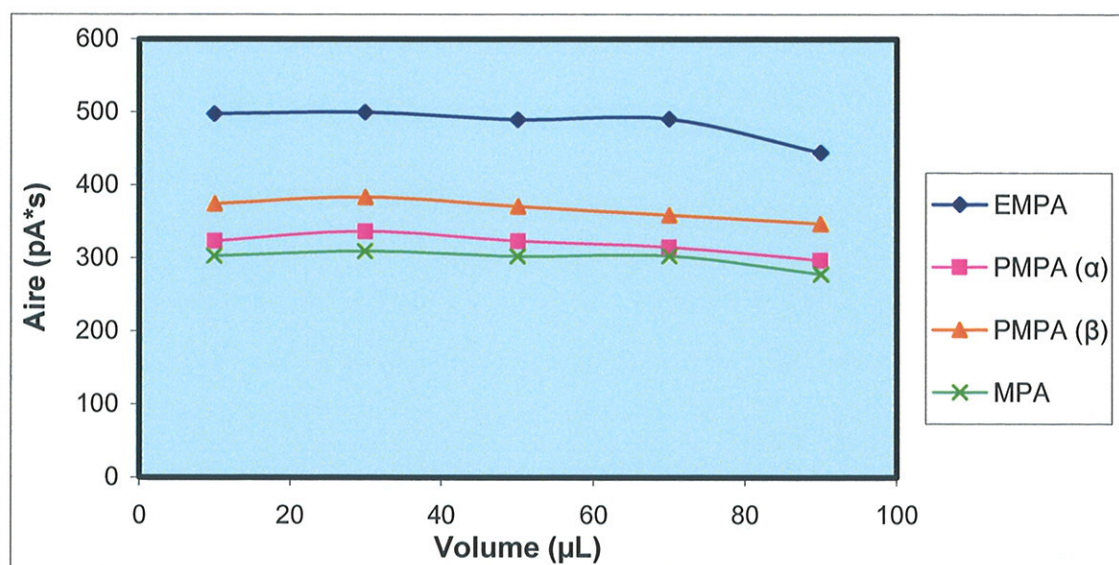


Figure 21 : Injection d'une même quantité en RMPA, en faisant varier les volumes

Nous constatons une diminution légèrement plus accentuée de la réponse du détecteur à partir de 70 μ L injectés. Si une réponse linéaire est celle attendue, ce qui importe est de disposer d'une courbe de réponse, les écarts à la linéarité restant faibles ($R^2 > 0,97$).

De plus, pour une même quantité injectée, les deux profils de PMPA α et β sont identiques. Ceci confirme que la différence de pente constatée sur la *figure 19* est bien due à une différence de réponse du détecteur quand la quantité injectée augmente : les atomes de phosphore pour le couple $P_{(+)}C_{(+)} / P_{(-)}C_{(-)}$ sont plus « accessibles » que pour le couple $P_{(+)}C_{(-)} / P_{(-)}C_{(+)}$.

VI.1.2. Linéarité de la réponse, pour un volume constant injecté

VI.1.2.1. En diluant les esters de RMPA (première approche)

Préparation des échantillons :

- préparation de 500 μ L d'une solution à $7,8 \times 10^{-10}$ mol/ μ L de chaque RMPA dans l'ACN
- dérivation
- évaporation et reprise par 300 μ L de CH_2Cl_2
- **dilution des esters de RMPAs** au 1/100, 1/500, 1/1000, 1/5000 et 1/10000 dans CH_2Cl_2 pour établir une gamme de concentrations.
- injection de 90 μ L.

Remarque :

- le fait de diluer le produit de la dérivation permet de diluer également les impuretés du solvant de dérivation (ACN) pouvant masquer les esters de RMPAs. A ce stade, nous ignorions l'existence de ces impuretés. Ainsi, le protocole d'extraction liquide-liquide après dérivation n'était pas encore utilisé.

Les figures 22, 23, 24 reproduisent les résultats enregistrés. Nous avons choisi une représentation log-log pour avoir une meilleure lisibilité en terme d'espacement des points expérimentaux.

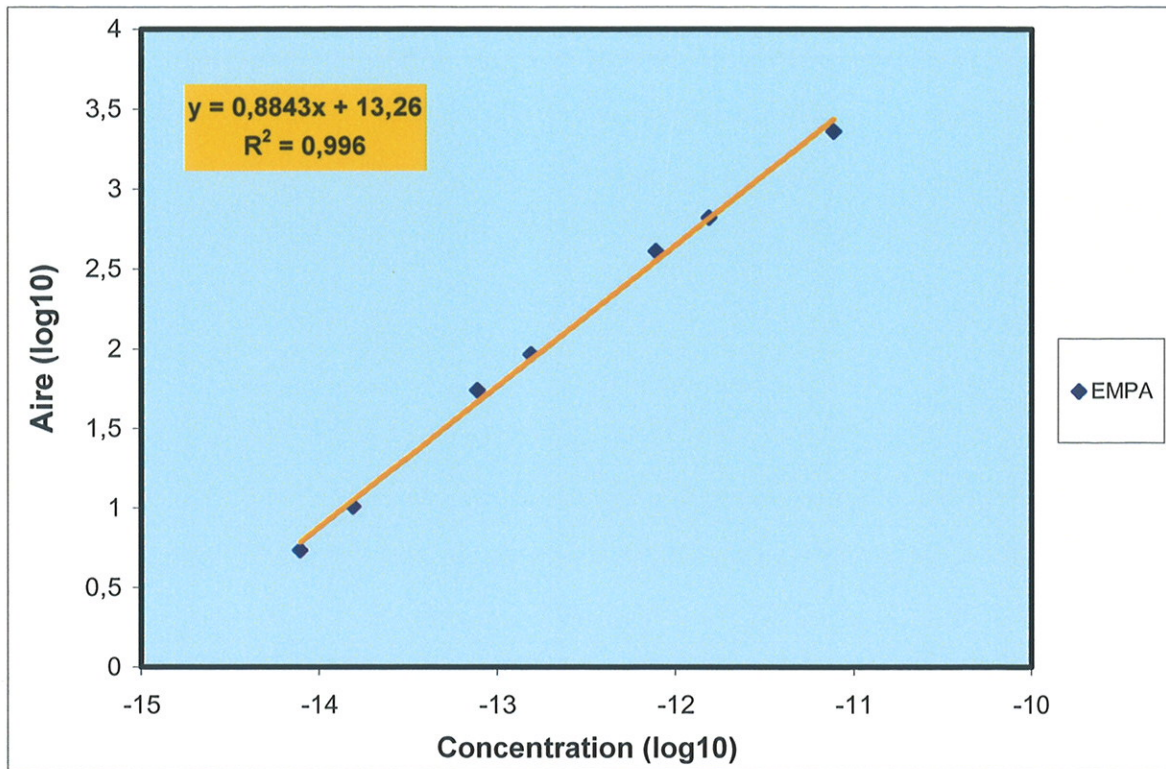


Figure 22 : Graphe de la réponse en fonction de la concentration d'EMPA mise en jeu.
(dilution des esters)

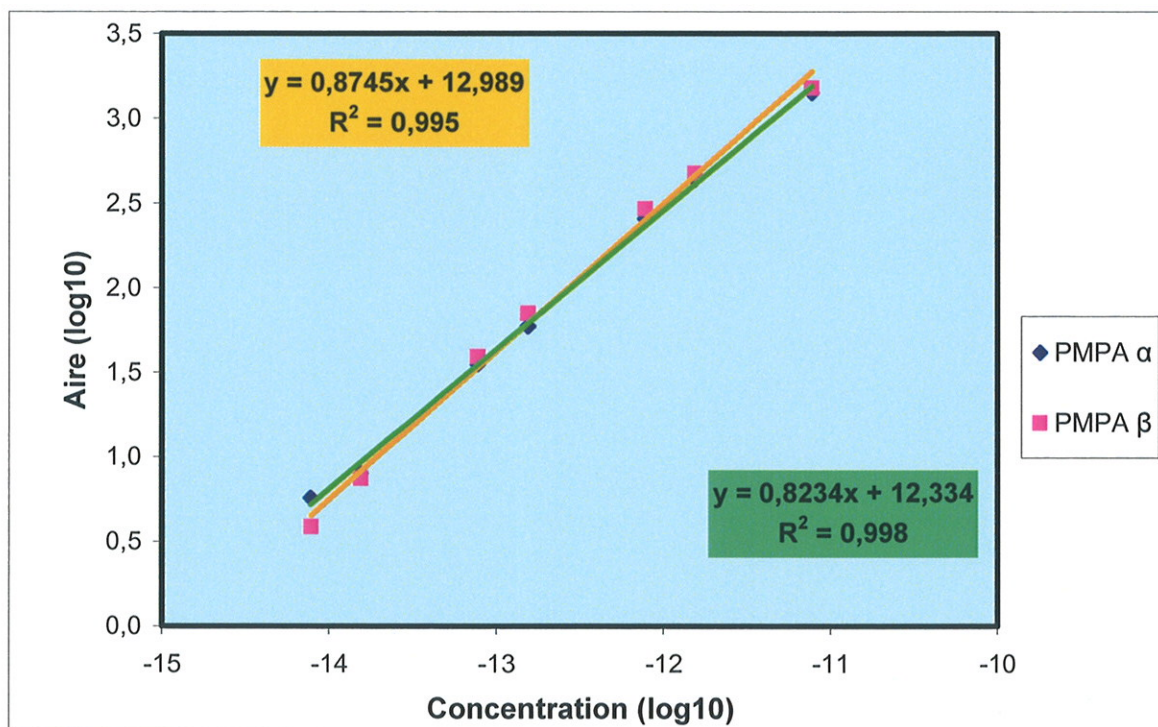


Figure 23 : Graphe de la réponse en fonction de la concentration de PMPA mise en jeu.
(dilution des esters)

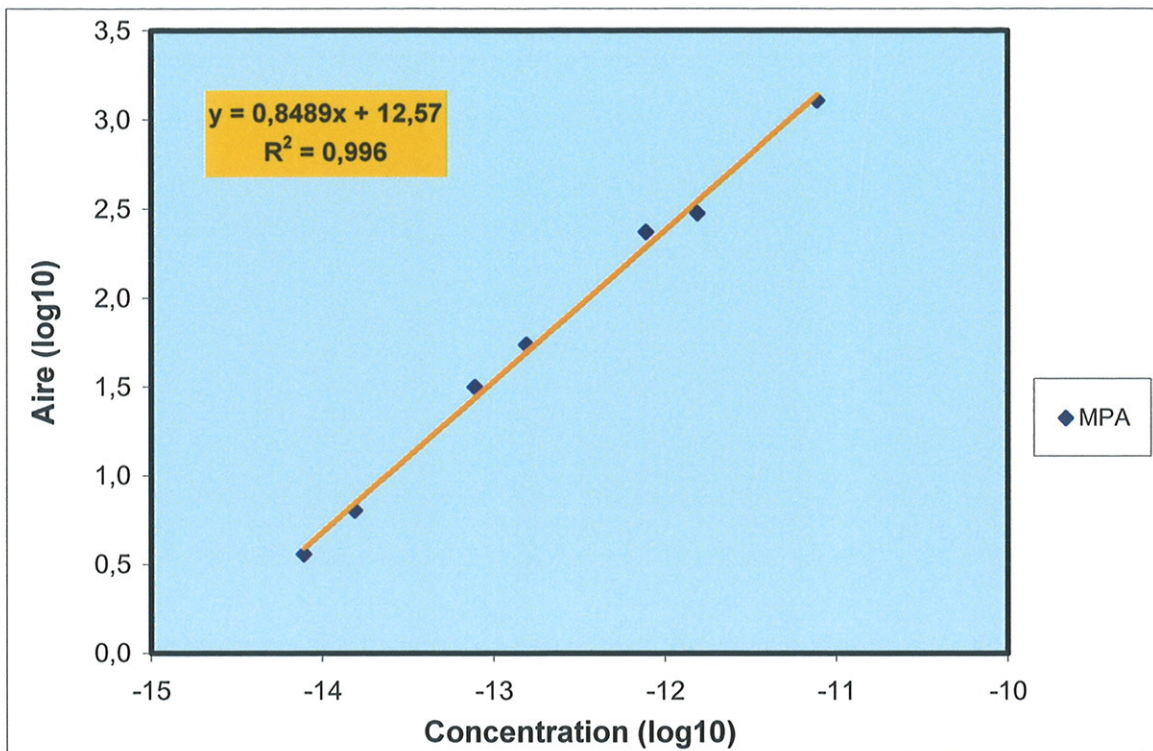


Figure 24 : Graphe de la réponse en fonction de la concentration de MPA mise en jeu.
(dilution des esters)

Conclusion : La détection est linéaire ($R^2 > 0,995$) entre 7,8 et 7800 nmol/L de RMPAs mise en jeu. Nous retrouvons le même ordre de réponse pour ce qui est des réponses relatives $EMPA > PMPA \beta > PMPA \alpha \sim MPA$.

VI.1.2.2. En diluant les RMPA avant dérivation

Cette étape consiste en un rapprochement des situations réelles.

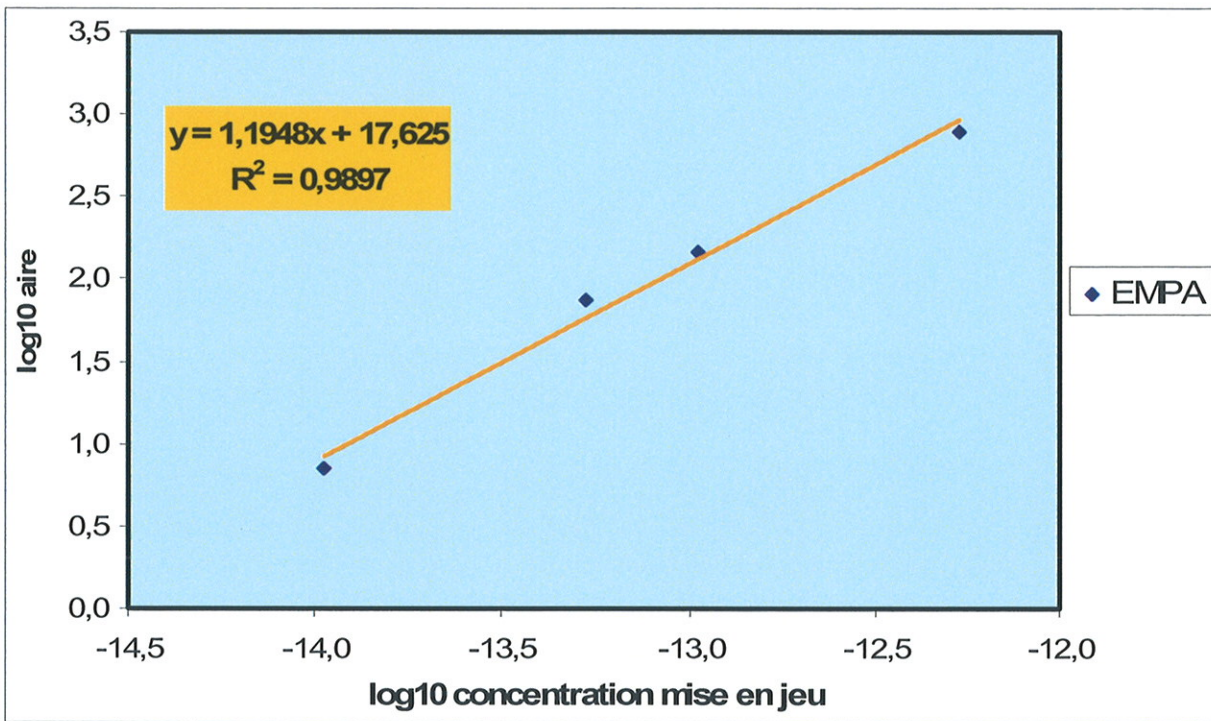
Remarques :

- C'est le même protocole que l'on devra appliquer pour déterminer la concentration en RMPAs dans un échantillon X (en effet, nous ne pourrons pas diluer a priori les esters de RMPAs, puisque ne connaissant pas la concentration dans l'échantillon X).
- A ce stade, nous avons optimisé l'extraction liquide-liquide post dérivation.

Préparation des échantillons :

- préparation de 500 μ L d'une solution à $5,3 \times 10^{-10}$ mol/ μ L de chaque RMPA dans l'ACN.
- **dilutions des RMPAs** au 1/1000, 1/5000, 1/10000, 1/50000 et 1/100000 dans ACN. Nous obtenons donc une gamme comportant cinq niveaux de concentrations mises en jeu compris entre 5,3 et 530 nmol/L (5,3 ; 10,6 ; 53 ; 106 ; 530 nmol/L).
- dérivation, extraction liquide-liquide,
- prise de 400 μ L de la phase ACN contenant les esters de RMPA,
- évaporation et reprise par 300 μ L de CH₂Cl₂
- injection de 90 μ L.

Les résultats sont représentés par les *figures 25, 26 et 27.*



*Figure 25 : Graphe de la réponse en fonction de la concentration en EMPA mise en jeu.
(dilution des acides)*

La concentration la plus basse de la gamme (5,3 nmol/L) n'est pas détectée pour l'EMPA, en raison d'un bruit de fond trop important au temps de rétention de l'EMPA. La détection est cependant ensuite linéaire ($R^2 \sim 0,99$) entre 10,6 et 530 nmol/L.

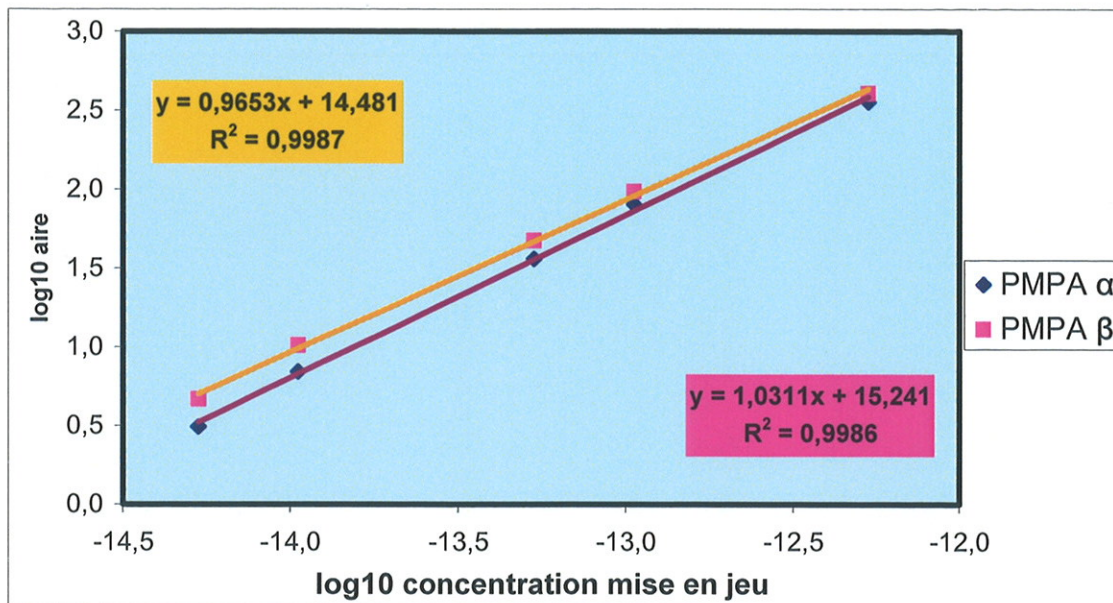


Figure 26 : Graphe de la réponse en fonction de la concentration en PMPA mise en jeu.
(dilution des acides)

Le bruit de fond au temps de rétention du PMPA étant plus faible, nous pouvons intégrer le PMPA à 5,3 nmol/L mise en jeu. La détection est linéaire ($R^2 \sim 0,999$) pour l'ensemble de la gamme, de 5,3 et 530 nmol/L.

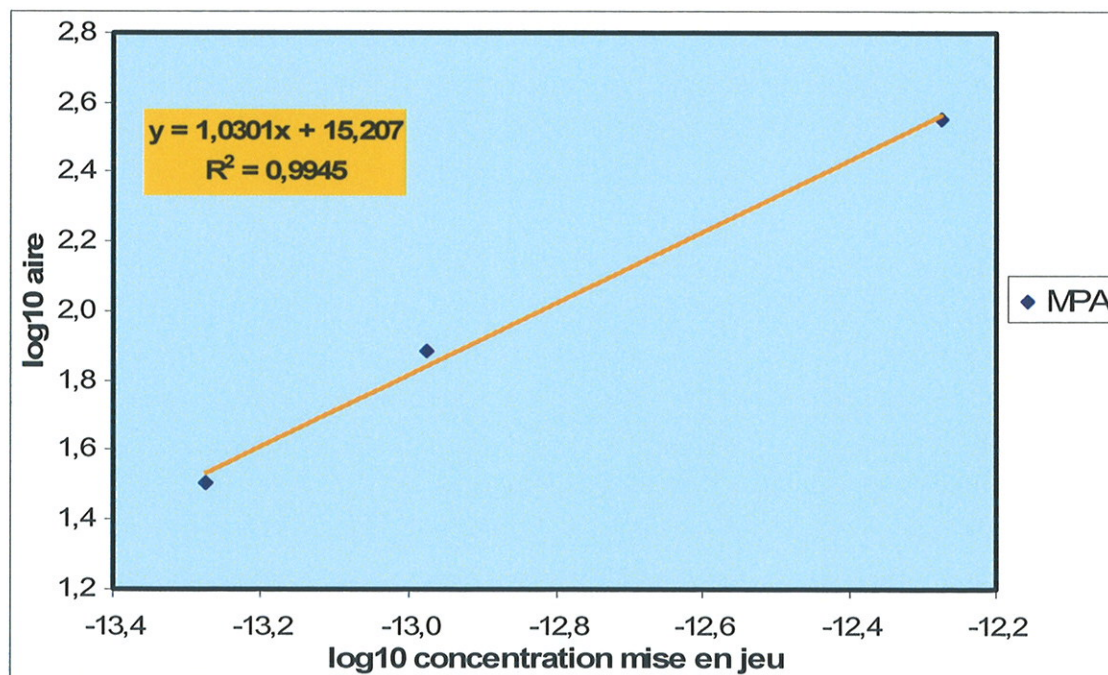


Figure 27 : Graphe de la réponse en fonction de la concentration en MPA mise en jeu.
(dilution des acides)

Pour le MPA, on note la présence d'une impureté éluée au même temps de rétention empêchant la détection et l'intégration du pic de MPA pour des concentrations mises en jeu inférieures à 53 nmol/L. La détection est linéaire ($R^2 \sim 0,99$) pour les concentrations supérieures.

Ainsi, deux raisons nous ont poussé à abandonner momentanément le dosage du MPA et de l'EMPA et de nous concentrer uniquement sur le PMPA:

- la présence d'impuretés interférant avec les esters de MPA et EMPA, empêchant la détection pour des concentrations basses,
- et la difficulté voire l'impossibilité d'extraire ces deux acides par la cartouche Oasis HLB.

VI.2. Résultats de la mise au point de l'extraction du PMPA

VI.2.1. Répétabilité de l'extraction du PMPA en solution aqueuse

Nous avons réalisé les premiers essais d'extraction du PMPA à partir de solutions aqueuses. Un essai a porté sur 10 cartouches, pour observer la reproductibilité du rendement d'extraction à une concentration donnée.

Le protocole de SPE est celui qui a été optimisé (*cf. V.2.2, p.46*).

La concentration en PMPA mise en jeu est de 1270 nmol/L.

Ainsi, la quantité détectée en esters de PMPA (si l'extraction est de 100%) correspond à une concentration injectée de 570 nmol/L (rendement de dérivation : 47% et LLE : 80%).

Remarque :

- le rendement d'extraction est défini par le rapport des réponses obtenues d'une part après extraction d'une solution de PMPA de concentration connue et d'autre part sans extraction d'une solution de PMPA de même concentration dans l'ACN.

Tableau VII : Rendement d'extraction du PMPA dans l'eau (n=10)

	PMPA (α)	PMPA (β)
Aire (pA*s) « non extrait » (n=1)	353,512	418,669
Aire (pA*s) « extrait » (n=10)	307,567	405,950
Rendement d'extraction moyen	87,0 %	97,0 %
Ecart type	21,8 %	17,7 %
Coefficient de variation	25,1 %	18,2 %

Les résultats sont relativement satisfaisants en terme de valeur de rendement d'extraction. Ils le sont moins en terme de coefficients de variation (situés vers 20%). Progresser dans la difficulté en passant à l'extraction des RMPA dans l'HBSS justifie la mise en œuvre d'un étalon interne, non pas avant dérivation, mais avant la SPE.

VI.2.2. Répétabilité de l'extraction de PMPA dans l'HBSS.

Il faut dans un premier temps s'assurer que le DMPMPA se comporte comme le PMPA et qu'il fait preuve des mêmes variations de rendement d'extraction selon le milieu et selon l'essai.

Dans un premier temps, nous avons réalisé l'extraction du PMPA et de son étalon interne dans l'HBSS d'une part et en solution aqueuse d'autre part, et ce, en essai unique, pour comparer l'extraction dans ces deux milieux. La concentration de PMPA mise en jeu dans l'HBSS et la solution aqueuse est de 1270 nmol/L et celle du DMPMPA est de 120 nmol/L.

Tableau VIII : Rendement d'extraction des PMPA et DMPMPA dans l'HBSS (n=1)

	PMPA (α)	PMPA (β)	DMPMPA (α)
Aire (pA*s) non extrait (n=1)	147, 696	168,497	13,334
Aire (pA*s) extrait (n=1)	153,980	175,069	12,349
Rendement d'extraction	103,9 %	104,2%	92,6 %

Tableau IX : Rendement d'extraction du PMPA dans l'eau (n=1)

	PMPA (α)	PMPA (β)	DMPMPA (α)
Aire (pA*s) non extrait (n=1)	147,696	168,497	13,334
Aire (pA*s) extrait (n=1)	80,833	96,729	6,171
Rendement d'extraction	54,4 %	57,4 %	46,3 %

Conclusions :

- le PMPA est extrait de l'HBSS avec un très bon rendement de l'ordre de 100%.
- les rendements d'extraction de DMPMPA et du PMPA décrivent les mêmes fluctuations.
- si nous comparons les résultats, en terme d'intensité de réponse, obtenus ici et ceux de l'essai de reproductibilité dans l'eau (cf. tableau VII), nous constatons que pour une concentration identique en PMPA, la réponse du détecteur est nettement plus faible (d'un facteur 3) : ceci démontre l'usure de la bille NPD et donc l'obligation de recourir à un étalon interne pour s'affranchir aussi de ces fluctuations.

Dans un deuxième temps, pour confirmer ces résultats, nous avons réalisé un essai d'extraction du duo PMPA et DMPMPA dans l'HBSS, sur 5 cartouches, pour observer la reproductibilité. La concentration de PMPA mise en jeu dans l'HBSS est de 1270 nmol/L et celle du DMPMPA est de 240 nmol/L.

Tableau X : Rendement d'extraction du PMPA dans l'HBSS (n=5)

	PMPA (α)	PMPA (β)	DMPMPA (α)	Rapport PMPA(α)/EI	Rapport PMPA(β)/EI
Aire (pA*s) non extrait (n=5)	113,96 \pm 4,7	131,77 \pm 5,7	24,73 \pm 2,3	4,63 \pm 0,3	5,35 \pm 0,4
Aire (pA*s) extrait (n=5)	99,97 \pm 15,0	116,41 \pm 14,0	20,45 \pm 6,2	5,01 \pm 0,4	6,02 \pm 0,8
Rendement d'extraction	87,7 % \pm 13,1	88,3 % \pm 10,6	82,9 % \pm 9,8		

Les valeurs sont exprimées sous la forme : moyenne \pm 1 écart type

Les rapports PMPA/EI sont constants quelque soit le rendement de la cartouche. Ainsi, l'étalon interne remplit son rôle consistant à corriger d'une part les variations du rendement d'extraction de la cartouche Oasis HLB 1cc et d'autre part de la sensibilité de la bille NPD.

Maintenant, il reste à vérifier que les « traceurs-tracés » se comportent également à l'identique quelque soit le rapport des concentrations en PMPA et DMPMPA. Nous comparons donc une gamme extraite et une gamme non extraite du PMPA dans HBSS, comportant six niveaux de concentration compris entre 2,54 et 1270 nmol/L (2,54 ; 12,7 ; 25,4 ; 127 ; 254 ; 1270 nmol/L). La concentration en DMPMPA est, elle, constante et égale à 240 nmol/L pour chaque point de gamme.

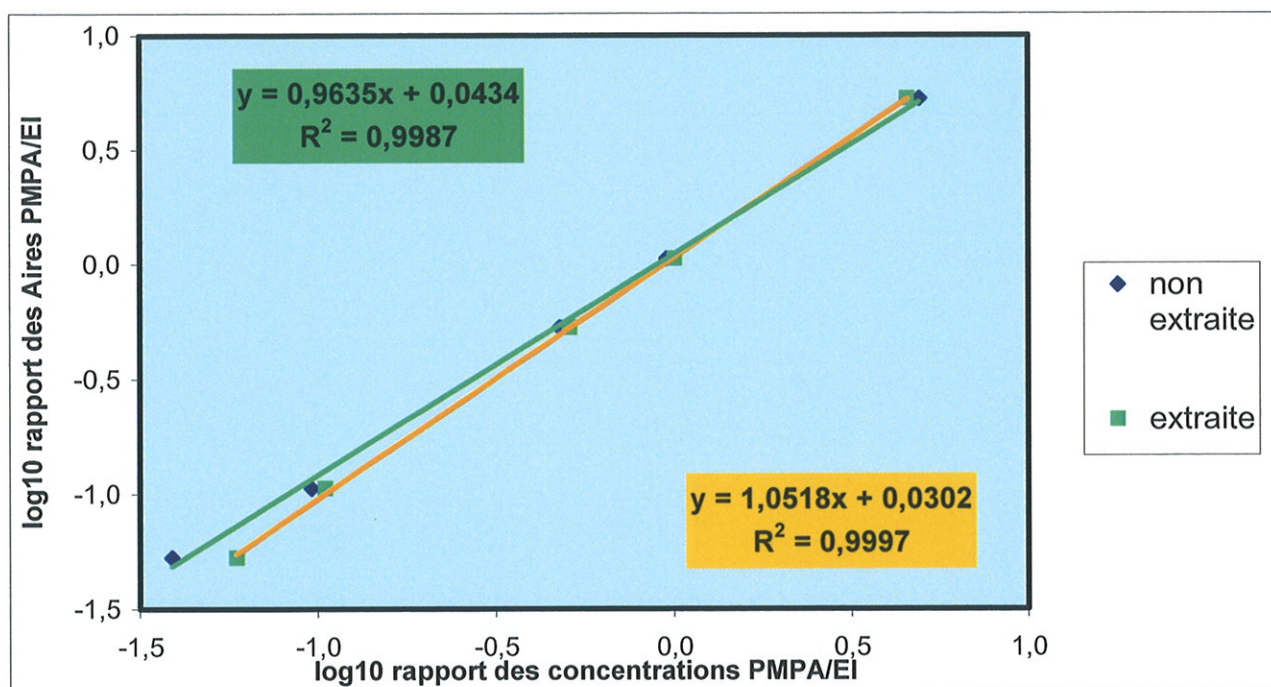


Figure 28 : Gammes « extraite » et « non extraite » de PMPA dans l'HBSS

Les droites « extraite » et « non extraite » présentent toutes les deux une pente proche de 1, ceci démontre que les **rendements de dérivation du DMPMPA et du PMPA sont identiques ou subissent les mêmes fluctuations, et ce quelque soit le rapport des concentrations traceur/tracé.**

Ainsi, quelque soit le traitement que l'on fait subir au PMPA et au DMPMPA, le rapport des aires reste constant.

VI.3. Résultats de la mise au point du dosage du PMPA dans HBSS par PTV/LV-GC-NPD

VI.3.1. Rendement global de la méthode

Le rendement global de la méthode de dosage du PMPA dans l'HBSS tient compte :

- du rendement d'extraction : 88 %
- du rendement de dérivation : 47 %
- de la prise de 4/5 de la quantité d'esters de PMPA lors de l'extraction liquide-liquide

Le rendement global est donc de 32,8%.

VI.3.2. Linéarité de la méthode et quantification : réalisation d'une courbe de calibration

Préparation de la gamme :

- Deux gammes de calibration ont été établies comportant six niveaux de concentration de PMPA dans HBSS compris chacune d'elle entre 2,54 et 1270 nmol/L (2,54 ; 12,7 ; 25,4 ; 127 ; 254 ; 1270 nmol/L), et dopée par une concentration de 240 nmol/L de DMPMPA, de manière à avoir 500µL d'échantillon PMPA/DMPMPA. Ensuite, ces échantillons sont traités selon l'ensemble de la procédure de SPE et de dosage mise au point.

Nous établissons la droite d'étalonnage en reportant pour chaque point de gamme, exprimé par le rapport des concentrations d'acides mis en jeu PMPA/DMPMPA, le rapport des aires des pics des esters de PMPA /DMPMPA.

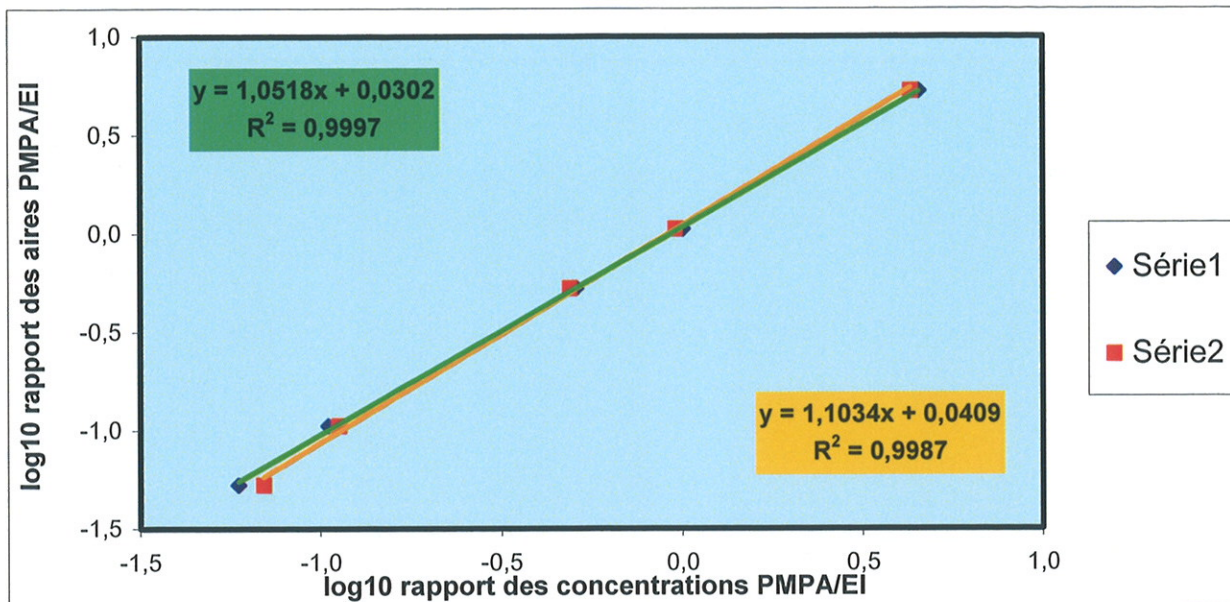


Figure 29 : Représentation graphique de la droite de calibration du PMPA dans l'HBSS

La réponse pour la concentration la plus basse (2,54 nmol/L) mise en jeu est à la limite du bruit de fond. On atteint ici les limites en terme de seuil de détection.

Nous avons démontré que l'étalon interne et le PMPA se comportaient de la même manière puisqu'ils ont les mêmes rendements de dérivation et d'extraction. **Ainsi, cette courbe de calibration sert à la fois à déterminer les rapports de concentrations en esters de PMPA/DMPMPA injectés et aussi celles en acides correspondants mis en jeu.**

En concentrations injectées, c'est-à-dire après traitement selon l'ensemble du protocole, les six niveaux de concentrations de PMPA deviennent compris entre 1,38 et 693 nmol/L (1,38 ; 6,93 ; 13,8 ; 69,3 ; 138 ; 693 nmol/L). La concentration injectée de DMPMPA pour chaque point de la gamme d'étalonnage est, elle, de 132 nmol/L.

VI.3.3 Estimation de la LOD et de la LOQ (définitions Annexe 5, p.83)

Il est très difficile d'estimer le bruit de fond, car celui-ci est dépendant de l'état de la bille du détecteur NPD, mais nous pouvons considérer que le bruit de fond est peu différent de la réponse obtenue avec une concentration de 1,38 nmol/L de PMPA (car on est à la limite de pouvoir intégrer les pics).

Ainsi, nous pouvons estimer la limite de détection de la méthode à approximativement à 4 nmol/L ou 0,7 ng/mL. Cette valeur peut être nettement améliorée à chaque mise en place d'une bille NPD neuve. La limite de quantification, si l'on considère qu'elle est égale à 10x le bruit de fond, peut être estimée à 14 nmol/L ou 2,5 ng/mL.

VII. EXEMPLE D'UNE APPLICATION DE LA MÉTHODE DE DOSAGE DU PMPA MISE AU POINT

Problématique :

Dans le cadre des travaux de recherche du laboratoire de Toxicologie du CRSSA sur la réactivité albumine - soman, les résultats obtenus en titrant l'activité résiduelle de l'albumine laissent à penser que le soman utilisé est en concentration plus faible que celle escomptée (5 mg/mL en théorie). Trois hypothèses ont été formulées pour expliquer ces résultats :

- soit le soman a été dégradé en PMPA avant réaction avec l'albumine,
- soit la concentration en soman est inférieure à celle théorique (5mg/mL),
- soit il existe une enantiospécificité : seuls certains isomères du soman peuvent se lier à l'albumine (liaison phosphore du soman avec une thyrosine spécifique de l'albumine)

Le but ultime de ces travaux est l'éventuelle utilisation d'une albumine humaine (dont la synthèse par des levures a été mise au point cette année par des japonais), modifiée par mutagenèse afin d'augmenter la réactivité de l'albumine pour les NOPs d'un facteur au moins 100000, pour servir alors de « scavenger » aux NOPs avant qu'ils n'inhibent l'AChE.

En RMN ^{31}P , la solution mère de soman montre uniquement les pics caractéristiques du soman, donc la première hypothèse (dégradation quantitative du soman avant réaction) est écartée.

Notre travail a été de calculer la concentration du soman utilisé pour rejeter ou non la deuxième hypothèse. L'échantillon de soman a été traité de la manière suivante :

- hydrolyse de 100 μL de soman par 10 μL de NaOH 5N. Ainsi, tout le soman a été transformé en PMPA (vérifié en RMN ^{31}P). La concentration en PMPA théorique est alors de 4,5 mg/mL
- dilution au 1000^{ème} dans l'isopropanol ($C_{\text{PMPA}} = 4,5 \text{ mg/L}$ ou 25000 nmol/L)
- dilution au 100^{ème} dans l'acétonitrile ($C_{\text{PMPA}} = 250 \text{ nmol/L}$) pour être dans la gamme de calibration établie, dopée par une concentration de 240 nmol/L de DMPMPA de façon à obtenir 500 μL en PMPA/DMPMPA. Ensuite, le protocole du dosage du PMPA peut s'appliquer dans son ensemble (sauf la partie extraction SPE).

Auparavant, nous avons donc établi une gamme de calibration (*cf. Figure 30*) comportant cinq niveaux de concentration de PMPA dans l'acétonitrile compris entre 12,7 et 1270 nmol/L (12,7 ; 25,4 ; 127 ; 254 ; 1270 nmol/L), et dopée par une concentration de 240 nmol/L de DMPMPA.

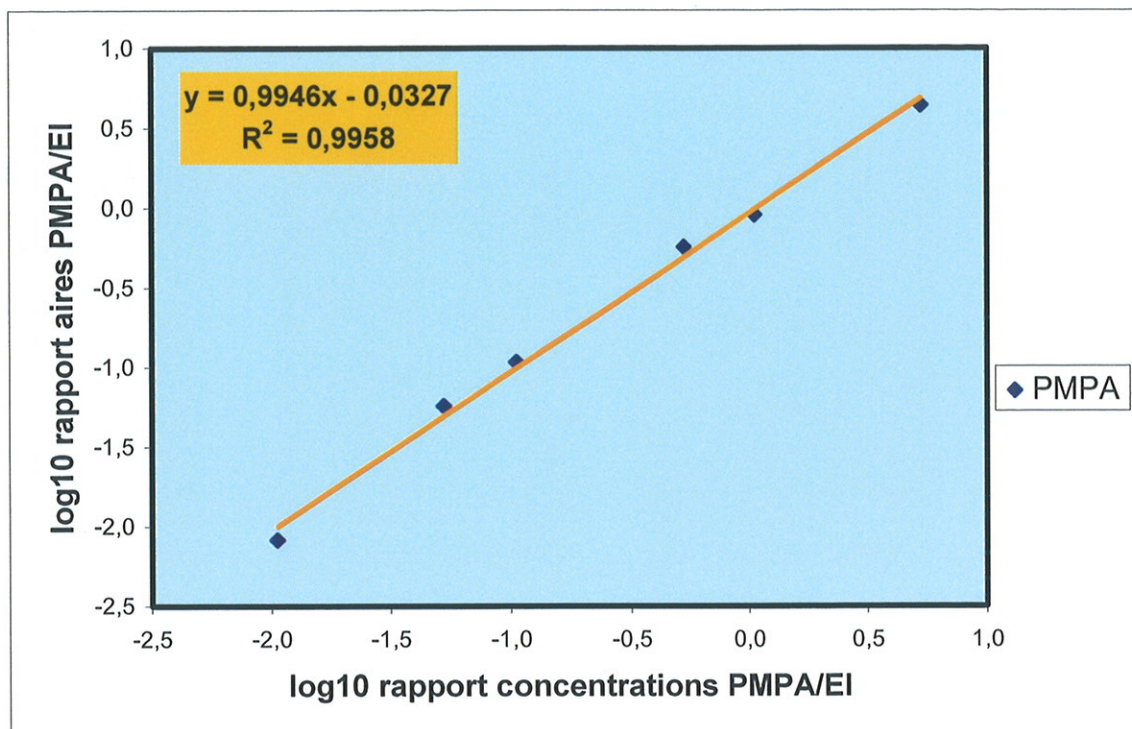


Figure 30: Représentation graphique de la droite de calibration du PMPA dans l'ACN

Dans le cas de notre échantillon à doser, le \log_{10} du rapport d'aire PMPA / DMPMPA = 0,0054.

Donc : $0,0054 = 0,9946 X - 0,0327 \rightarrow X = 0,0383 \rightarrow X$ étant le \log_{10} du rapport des concentrations PMPA/DMPMPA, et la concentration en DMPMPA mise en jeu étant de 240 nmol/L, la concentration en PMPA mise en jeu est de : 262 nmol/L.

Ainsi, la concentration en PMPA dans l'échantillon est de 4,77 mg/mL avant dilution dans l'isopropanol. **La concentration du soman est donc de 5,24 mg/mL (théorie 5 mg/mL)**, écartant donc la seconde hypothèse.

Ainsi, les résultats inattendus lors du titrage de l'albumine après réaction du soman proviennent vraisemblablement d'une énantiospécificité c'est-à-dire que seuls certains des 4 isomères du soman réagissent avec l'albumine. Pour déterminer quels isomères réagissent avec l'albumine, Des essais en RMN ^{31}P et en PTV/LV-GC-NPD avec une colonne chirale sont en cours.

VIII. DISCUSSION

VIII.1. Résultats de la mise au point de la méthode

Dans ce travail, nous avons mis au point une méthode de dosage du PMPA, métabolite intermédiaire spécifique du soman, par PTV/LV-GC-NPD dans un liquide de survie (l'HBSS) au contact du derme, permettant de se rapprocher des conditions physiologiques.

Le rendement de la méthode est de 38,2% après les étapes d'extraction, de dérivation et de purification par extraction liquide-liquide. Ce rendement, plutôt faible, est majoritairement dû à l'étape de dérivation.

La réponse est linéaire pour des concentrations en PMPA injectées entre 6,93 et 693 nmol/L. Pour la concentration maximale, nous sommes limité par la charge maximale de la colonne qui est de 150 ng du fait de l'épaisseur du film de 0,25 μ m.

La limite de détection estimée est approximativement de 0,7 ng/mL et la limite de quantification de 2,5 ng/mL. Cependant, ces limites peuvent être nettement améliorées : en ayant constaté l'usure rapide de la bille du détecteur NPD, tout changement de bille améliore nettement le seuil de détection.

En comparaison, la limite de détection du dosage du PMPA dans l'urine par GC-NICI-MS (SIM) est de 0,1 ng/mL [41]. Ainsi, malgré la complexité moindre de la matrice HBSS, nous restons nettement moins sensible en PTV/LV-GC-NPD que en NICI-MS puisque nous faisons moins bien en injectant pourtant un volume beaucoup plus important.

Il reste que ce qui a été mis au point au cours de ce travail :

- les paramètres d'injection LV sur PTV,
- le choix de l'étalon interne,
- la démonstration de la pertinence de celui-ci,
- le protocole de SPE
- les conditions du run chromatographique,

sont autant d'éléments transposables sans modification à une détection NICI-MS.

VIII.2. Perspectives

Cette méthode devra faire l'objet d'une validation analytique pour confirmer les résultats obtenus et permettre ainsi une utilisation en routine. A terme, la méthode une fois validée, nous pourrions doser le PMPA dans des échantillons provenant du département toxicologie du CRSSA, dans le cadre de l'étude de la pénétration percutanée du soman.

Cette méthode pourra être étendue au dosage du PMPA dans l'urine, après transposition de l'extraction. Avoir une méthode de quantification du PMPA dans cette matrice serait très intéressant pour évaluer le taux d'intoxication au soman d'un militaire ou d'un civil dans les zones de conflit ou lors d'un attentat, pour prouver l'efficacité d'un traitement, pour disposer d'outils analytiques performants en cas de recours en contentieux...

Cette méthode de dosage du PMPA dans l'HBSS pourrait être améliorée et étendue à d'autres acides alkylméthylphosphoniques, mais cela nécessiterait plusieurs conditions, différentes suivant les RMPAs concernés :

- La cartouche Oasis HLB n'extrait que les RMPAs les plus hydrophobes (CHMPA, PMPA, IMPA...) avec de bons rendements de l'ordre de 90%. Afin d'extraire les RMPAs plus hydrophiles (MPA et EMPA), il faudrait mettre au point une extraction sur un autre type de cartouche (Oasis MAX pour l'EMPA, Sep PAK pour le MPA [1]).
- L'utilisation d'un acétonitrile de meilleure qualité que les cinq testés ou redistillés. Ainsi, après dérivation, il y aurait moins d'impuretés interférant avec l'élution des RMPAs.
- Il existe la possibilité de tester d'autres agents de dérivation (TFAA, HFBI...) qui pourraient peut-être occasionner un meilleur rendement et être plus spécifiques des RMPAs ; nous avons vu que le PFBBR a été utilisé dans le but de poursuivre à l'avenir sur NICI-MS.
- Pour augmenter la sensibilité de la méthode, deux éventualités pourraient être envisagées :
 - * le couplage GC-NICI-MS en mode SIM
 - * le couplage GC-MS-MS en mode MRM, matériel non disponible au laboratoire de Biospectrométrie actuellement.

VIII.3. Problèmes rencontrés

Nous avons été confronté à plusieurs problèmes majeurs qui concourent à rendre obligatoire l'utilisation d'un étalon interne:

- l'évaporation lors de la dérivation. Cette étape nécessitant une température très élevée pour que la réaction chimique se déroule (90°C pendant 45mn.), nous avons parfois observé une évaporation du solvant (l'ACN) due à des bouchons défailants, d'où l'impossibilité de prendre en compte ces échantillons.

- une lente évaporation du dichlorométhane dans les échantillons prêts à être injectés, dans le réfrigérateur ou dans le porte-échantillon de l'injecteur à 5°C (pourtant bien sertis). Ceci a pour conséquence de concentrer les esters de RMPA, si l'injection est trop éloignée dans le temps de l'instant de la reprise de l'échantillon par le dichlorométhane.

- l'usure de la bille du NPD : En injectant de larges volumes à des cadences relativement importantes, la bille du NPD s'use assez rapidement, nécessitant son changement. En effet, nous avons pu observer une diminution de sensibilité relativement importante pour une même expérience effectuée entre une bille neuve et une bille ayant reçue une centaine d'injections en larges volumes.

- la nécessité de couper assez fréquemment la colonne du côté injecteur et côté détecteur, plus souvent qu'en conditions standard d'utilisation, pour maintenir la finesse des pics chromatographiques. En effet, en large volume, nous augmentons certes la quantité de produit d'intérêt mais également les impuretés qui encrassent la tête de colonne et à la sortie sous forme de poussières de carbone, du fait de la température élevée du détecteur (320°C).

- la nécessité de garder une température basse et constante dans le laboratoire à cause de l'emploi du dichlorométhane comme solvant d'injection. En effet, une température trop haute dans la pièce (occasionnée, par exemple, par une défaillance de la climatisation), favorisait la présence de bulles d'air dans la seringue lors du prélèvement à cause de la différence de température entre l'échantillon maintenu à 5°C et le corps de la seringue (T° ambiante), d'où des variations du volume de prélèvement.

CONCLUSION

Malgré la Convention de Genève et la Convention d'Interdiction de Armes Chimiques, la menace représentée par les agents neurotoxiques organophosphorés de guerre que sont entre autres le tabun, le sarin, le soman, le cyclohexylsarin et le VX, reste d'actualité. Le risque est persistant aussi bien dans un contexte militaire dans les zones de conflit que pour la population civile. Les attentats au gaz sarin perpétrés par la secte Aum au Japon dans les années 1990 ont confirmé la possibilité d'un emploi terroriste des agents neurotoxiques organophosphorés aussi appelés NOPs.

De ce fait, l'identification et la quantification de ces NOPs et/ou de leurs métabolites dans les milieux biologiques est indispensable pour diagnostiquer une intoxication d'unités militaires soumises à une attaque chimique, pour la prise en charge des populations civiles victimes d'éventuels attentats aux NOPs ou pour démontrer l'efficacité d'un traitement préventif ou curatif.

Nous proposons dans ce travail, la mise au point d'une technique de dosage de l'acide pinacolylméthylphosphonique (PMPA), métabolite spécifique inactif du gaz soman. La méthode a été développée pour un milieu biologique de synthèse (HBSS), par chromatographie gazeuse couplée à un détecteur azote-phosphore, précédée d'une extraction solide-liquide et d'une dérivation au PFBBr. L'étalon interne est l'acide 1,2-diméthylpropylméthylphosphonique. Le rendement global de la méthode est 38,2 %, comprenant les rendements d'extraction (88%), dérivation (47%) et la prise de 80% de la quantité totale d'esters de PMPA obtenus lors de l'étape d'extraction liquide-liquide nécessaire pour purifier le résultat de dérivation.

La linéarité de la réponse a été démontrée entre 6,93 et 693 nmol/L. Les limites de détection et de quantification estimées de la méthode sont approximativement égales à 4 et 14 nmol/L soit 0,7 et 2,5 ng/mL.

Au départ, nous pensions pouvoir doser également par cette méthode l'acide éthylméthylphosphonique (EMPA), métabolite spécifique du gaz VX, et l'acide méthylphosphonique (MPA), métabolite non spécifique commun à de nombreux NOPs. Cependant, la cartouche Oasis HLB utilisée ne permettant pas de retenir ces deux métabolites, le dosage de ces deux derniers a été momentanément abandonné.

La méthode de dosage mise au point et optimisée pourrait, à l'avenir, l'être davantage de manière à en augmenter la sensibilité. Pour ce faire, l'emploi de solvants de meilleure qualité (ACN notamment) ou par distillation et l'utilisation de la GC-NICI-MS en mode SIM ou de la GC-MS-MS en mode MRM, sont envisageables.

BIBLIOGRAPHIE

➤ Livres, Publications

- [1] ABU-QARE W., ABOU-DONIA B. Simultaneous analysis of sarin, pyridostigmine bromide and their metabolites in rat plasma and urine using HPLC. *Chromatographia* (2001) 53: 251-255.
- [2] BARR J.R., DRISKELL W.J., ASTON L.S. *et al.* Quantitation of metabolites of the nerve agent sarin, soman, cyclohexylsarin, VX, and Russian VX in human urine using isotope-dilution gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* (2004) 28: 372-378.
- [3] BENSCHOP H.P., BIJLEVED E.C., OTTO M.F. *et al.* Stabilization and gas chromatographic analysis of the four stereoisomers of 1,2,2-trimethylpropyl methylphosphonofluoridate (soman) in rat blood. *Anal Biochem* (1985) 151: 242-253.
- [4] BLACK R.M., READ R.W. Application of liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry, and tandem mass spectrometry, to the analysis and identification of degradation products of chemical warfare agents. *J Chromatogr A* (1996) 759: 79-92.
- [5] BOUDRY I., JOSSE D., BRASME B. *et al.* Kinetics of organophosphates percutaneous penetration using in-vitro skin models. Involvement for the design of new skin decontamination strategies. Poster in: Decon 2004 Symposium. 2004 May 17-20; Tampa (FL), USA.
- [6] BUTLER J. AND CONOLEY M. Analysis of methylphosphonic acid (MPA), a metabolite of sarin, by tandem GC mass spectrometry and positive ion chemical ionization. Application on note 10016, Thermo electron corporation > 2002.
- [7] CHAPUZET E., MERCIER N., BERVOAS-MARTIN S. *et al.* Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : stratégie de validation, *Stp Pharma Pratiques* (1997) 7: 169-194.
- [8] D'AGOSTINO P.A., HANCOCK J.R., PROVOST L.R. Determination of sarin, soman and their products in soil by packed capillary liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr A* (2000) 912: 291-299.
- [9] DE BISSCHOP H.C., VAN DRIESSCHE E.E., ALBERTY M.L.M. *et al.* In vitro detoxification of soman in human plasma. *Fund and Applied Toxicol* (1985) 5: S175-S179.
- [10] DRISKELL W.J., SHIH M., NEEDHAM L.L. *et al.* Quantitation of organophosphorus nerve agent metabolites in human urine using isotope dilution gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* (2002) 26: 6-10.
- [11] FREDRIKSSON T. Hydrolysis of soman and tabun (two organophosphorus cholinesterase inhibitors) in cutaneous tissues. *Acta Derm-Venereol* (1969) 49: 490-492.

- [12] FREDRIKSSON S.A., HAMMARSTROM L.G., HENRIKSSON L. *et al.* Trace determination of alkyl methylphosphonic acids in environmental and biological samples using gas chromatography/negative-ion chemical ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* (1995) 30: 1133-1143.
- [13] HAYES T.L., KENNY D.V., HERNON-KENNY L. Feasibility of direct analysis of saliva and urine for phosphonic acids and thiodiglycol-related species associated with exposure to chemical warfare agents using LC-MS/MS. *J med Chem Def* (2004) 2: 1-5.
- [14] HUBERT P., NGUYEN-HUU J.J., BOULANGER B. *et al.* Validation des procédures analytiques quantitatives ; harmonisation des démarches. *Stp Pharma Pratiques* (2003) 3: 101-138.
- [15] HUI D.M., MINAMI M. Monitoring of fluorine samples of patients involved in the Tokyo sarin disaster, in connection with the detection of other decomposition products of sarin and the by-products generated during sarin synthesis. *Clinica Chimica Acta* (2000) 302: 171-188.
- [16] ICH-Q2A. Text on validation of analytical procedures, International Conference of Harmonisation (1995).
- [17] JAKUBOWSKI E.M., MCGUIRE J.M., EVANS R.A. *et al.* Quantitation of fluoride ion released sarin in red blood cell samples by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry using isotope dilution and large-volume injection. *J Anal Toxicol* (2004) 28: 357-363.
- [18] JOSSE D., BOUDRY I. Choix, mise en place et validation de modèles cutanés in vitro en vue de déterminer l'efficacité de dispositifs décontaminants de la peau vis-à-vis des agents neurotoxiques et de l'hypérite. Département de toxicologie : Centre de Recherches du Service de santé des armées : Opération prc 2003-27.
- [19] KARALLIEDDE L., WHEELER H., MACLEHOSE R. *et al.* Possible immediate and long term health effects following exposure to chemical warfare agents. *Public Health* (2000) 114: 238-248.
- [20] KARALLIEDDE L., FELDMAN S., HENRY J. *et al.* Organophosphates and health. Londres : imperial college press ; 2001
- [21] KATAGI M., NISHIKAWA M., TATSUNO M. *et al.* Determination of the main hydrolysis products of organophosphorus nerve agents, methylphosphonic acids, in human serum by indirect photometric detection ion chromatography. *J Chromatogr B* (1997) 698: 81-88.
- [22] KATAGI M., NISHIKAWA M., TATSUNO M. *et al.* Determination of the main hydrolysis product of O-ethylS-2-diisopropylaminoethyl methylphosphonothiolate, ethylmethylphosphonic acid, in human serum. *J Chromatogr B* (1997) 689: 327-333.
- [23] KATAGI M., TATSUNO M., NISHIKAWA M., *et al.* On-line solid-phase extraction liquid chromatography-continuous flow frit fast atom bombardment mass spectrometric and tandem mass spectrometric determination of hydrolysis products of nerve agents alkyl methylphosphonic acids by p-bromophenacyl derivatization. *J Chromatogr A* (1999) 833: 169-179.

- [24] KATAOKA M., SETO Y. Discriminative determination of alkyl methylphosphonates and methylphosphonate in blood plasma and urine by gas chromatography-mass spectrometry after ter-butyldimethylsilylation. *J Chromatogr B* (2003) 795: 123-132.
- [25] KOSTIAINEN R., BRUINS A.P. Identification of degradation products of some chemical warfare agents by capillary electrophoresis-ion spray mass spectrometry. *J chromatogr* (1992) 634: 113-118.
- [26] LEFEUVRE Leslie. Analyse toxicologique des composés organophosphorés : application au diisopropylfluorophosphate, simili du sarin et du soman. Thèse de docteur en pharmacie : Université Claude Bernard – Lyon 1, faculté de pharmacie, 2005. 175 p.
- [27] LE MOULLEC S., BEGOS A., PICHON V. *et al.* selective extraction of organophosphorus nerve agent degradation products by molecularly imprinted solid-phase extraction. *J Chromatogr A* (2006) 1008: 7-13.
- [28] MIKI A., KATAGI M., TSUCHIHASHI H. *et al.* Determination of alkylmethylphosphonic acids, the main metabolites of organophosphorus nerve agents, in biofluids by gas chromatography-mass spectrometry and liquid-liquid-solid-phase-transfer-catalysed pentafluorobenzoylation. *J Anal Toxicol* (1999) 23: 86-93.
- [29] MINAMI M., HUI D.M., KATSUMATA M. *et al.* Method for the analysis of the methylphosphonic acid metabolites of sarin and its ethanol-substituted analogue in urine as applied to the victims of the Tokyo sarin disaster. *J Chromatogr B* (1997) 695: 237-244.
- [30] MINAMI M., HUI D.M., WANG Z. *et al.* Biological monitoring of metabolites of sarin and its by-products in human urine samples. *J Toxicol Sci* (1998) 23, supplement II: 250-254.
- [31] MORITA H., YANAGISAWA N., NAKAJIMA T. *et al.* Sarin poisoning in Matsumoto, Japan. *Lancet* (1995) 346: 290-293.
- [32] MUNRO N.B., TALMAGE S.S., GRIFFIN G.D. *et al.* The sources, fate, and toxicity of chemical warfare agent degradation. *Environmental Health Perspectives* (1999) 107: 933-960.
- [33] NAGAO M., TAKATORI T., MATSUDA Y. *et al.* Definitive evidence for the acute sarin poisoning diagnosis in the Tokyo subway. *Toxicol and Applied pharmacol* (1997) 144: 198-203.
- [34] NAKAJIMA T., SASAKI K., OZAWA H. *et al.* Urinary metabolites of sarin in a patient of the Matsumoto sarin incident. *Arch Toxicol* (1998) 72: 601-603.
- [35] NOORT D., HULST A.G, PLATENBURG H.J.M.D *et al.* Quantitative analysis of O-isopropyl methylphosphonic acid in serum samples of Japanese citizens allegedly exposed to sarin: estimation of internal dosage. *Arch Toxicol* (1998) 72: 671-675.

- [36] PARDASANI D., PALIT M., GUPTA A.K. *et al.* Microemulsion mediated in situ derivatization-extraction and gas chromatography-mass spectrometric analysis of alkylphosphonic acids. *J Chromatogr A* (2006) 1108: 166-175.
- [37] PEYTEL E. Intoxications par les organophosphorés et les neurotoxiques ; aspects respiratoires. Thèse de docteur en médecine. Université Claude Bernard – Lyon 1, 1991.
- [38] PICHON V., DELAUNAY-BERTONCINI N., HENNION M.C. Dernières évolutions dans la préparation d'échantillons liquides pour l'analyse par chromatographie en phase liquide. *Spectra Analyse* (2001) 221 : 16-22.
- [39] PURDON J.G., PAGOTTO J.G., MILLER R.K. Preparation, stability and quantitative analysis by gas chromatography and gas chromatography-electron impact mass spectrometry of tert-butyldimethylsilyl derivatives of some alkylphosphonic and alkyl methylphosphonic acids. *J chromatogr* (1989) 475: 261-272.
- [40] RICHARDSON D.D., SADI B.B.M., CARUSO J.A. Reversed phase ion-pairing HPLC-ICP-MS for analysis of organophosphorus chemical warfare agent degradation products. *J Anal At Spectrom* (2006) 21: 396-403.
- [41] RICHES J., MORTON I., READ R.W. *et al.* The trace analysis of alkylphosphonic acids in urine using gas chromatography-ion traps negative ion tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* (2005) 816: 251-258.
- [42] RICORDEL I., RENAUDEAU C., BELLIER B. *et al.* Analyses de contrôle de la décontamination chimique. *Techniques de l'ingénieur, traité d'analyse et caractérisation 2002 ; P4 : P3265-1 – P3265-23.*
- [43] ROUESSAC F., ROUESSAC A. *Analyse chimique ; méthodes et techniques instrumentales modernes. 6^{ème} édition. Paris : Dunod ; 2004.*
- [44] SHIH M.L., SMITH J.R., MCDONAGLE J.D. *et al.* Detection of metabolites of toxic alkylmethylphosphonates in biological samples. *Biol Mass Spectrom* (1991) 20: 717-723.
- [45] SHIH M.L., MCDONAGLE J.D., DOLZINE T.W. *et al.* Metabolite pharmacokinetics of soman, sarin and GF in rats and biological monitoring of exposure to toxic organophosphorus agents. *J Applied Toxicol* (1994) 14: 195-199.
- [46] SHU Y.R., SU A.K., LIU J.T. Screening of nerve agent degradation products by MALDI-TOFMS. *Anal Chem* (2006) 78: 4697-4701.
- [47] SMITH J.R., SHIH M.L. Analysis of the degradation compounds of chemical warfare agents using liquid chromatography/mass spectrometry. *J Applied Toxicol* (2001) 21: S27-S34.
- [48] TSUCHIHASHI H., KATAGI M., NISHIKAWA M. *et al.* Identification of metabolites of nerve agent VX in serum collected from a victim. *J Anal Toxicol* (1998) 22: 383-388.

➤ Sites Internet

- [49] AFSSAPS. fiche n°1 : « conduite à tenir en situation d'urgence avant identification de l'agent chimique responsable ». Juillet 2003. Disponible sur : <http://www.urgences-serveur.fr/IMG/pdf/piratox2.pdf> (consulté le 21/07/06).
- [50] AFSSAPS. Fiche n°2 : « Neurotoxiques organophosphorés » (NOPs). Juillet 2003. Disponible sur : <http://www.urgences-serveur.fr/IMG/pdf/piratox1.pdf> (consulté le 21/07/06).
- [51] ANSERMOT N. Dosage sanguin d'immunosuppresseurs : mise au point d'une méthode d'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Genève, 2004, 166 p. Disponible sur : http://www.hcuge.ch/Pharmacie/ens/dess/diplome_na.pdf (consulté le 21/07/06).
- [52] ASSOCIATION DEVELOPPEMENT INFORMATIQUE SECURITE (Assodis). Les agressifs de guerre. Disponible sur : <http://www.assodis.free.fr/toxique.html> (consulté le 21/07/06).
- [53] CENTRE DE TOXICOLOGIE DU QUEBEC (ctq). Toxicologie et mesures d'urgences. Bulletin d'information toxicologique, vol 14, n°3, juillet 1998. Disponible sur : <http://www.ctq.qc.ca/jui98urg.html> (consulté le 21/07/06).
- [54] L'ENCYCLOPEDIE DE L'AGORA. Arme Chimique. Disponible sur : http://www.agora.qc.ca/mot.nsf/Dossiers/Arme_chimique (consulté le 21/07/06).
- [55] INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. ORGANOPHOSPHORUS INSECTICIDES : a general introduction (IPCS). Environmental Health Criteria 63, 1986. Disponible sur : <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc63.htm> (consulté le 22/07/06).
- [56] OPCW. L'essentiel sur le désarmement chimique. Disponible sur : http://www.opcw.org/basic_facts/html/bf2k3_fr.html (consulté le 25/07/06).
- [57] RENAUDEAU C. Rappels physico-chimiques et toxicologiques appliqués aux risques chimiques. 2^{ème} colloque des pharmaciens de sapeurs-pompiers, Toulouse, Nov 2004. Disponible sur : <http://www.ordre.pharmacien.fr/upload/ActuStruc/rappels-physicochimiques-toxicologiques.pdf#search=%22renaudeau%20chimiques%20powerpoint%22> (consulté le 25/07/06).
- [58] RENAUDEAU C. Scénarios et effets potentiels d'une attaque chimique. Les actes de malveillance. Société Française de Radioprotection, Paris, Avril 2005. Disponible sur : <http://www.sfrp.asso.fr/MAN/pdf/scenario%20attaque%20chimique.pdf#search=%22renaudeau%20chimiques%20powerpoint%22> (consulté le 25/07/06).
- [59] QUID 2006 – Défense Nationale – Armes et matériel – Armes biologiques et chimiques. Disponible sur : http://www.quid.fr/2006/Defense_Nationale/Armes_Biologiques_Et_Chimiques/2 (consulté le 21/07/06).

ANNEXES

Annexe 1 : Présentation du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées (CRSSA)

* Le service de santé des armées :

Le service de santé des armées est un service interarmées, qui a pour mission d'assurer, en toutes circonstances, le soutien médical et sanitaire des forces armées et des organismes placés sous l'autorité du Ministre de la Défense. Il est compétent en matière de soins, d'aptitude médicale et d'expertise, de prévention, d'enseignement et de recherche dans les domaines : médical, paramédical, dentaire, pharmaceutique et vétérinaire.

Par tradition, il contribue aux missions à caractère humanitaire, dans le cadre du règlement de crises régionales ou dans celui de catastrophes naturelles ou technologiques, sur décision du gouvernement. Il concourt également au service public hospitalier, grâce aux hôpitaux des armées qui accueillent toutes les catégories de patients, militaires et civils, même sans lien avec le Ministère de la Défense.

Dans cette logique de mission de soutien des forces, le dispositif actuel est articulé autour de 5 pôles complémentaires et indispensables à la satisfaction de l'ensemble des besoins :

- Les écoles
- Les hôpitaux
- La médecine d'unité
- Le ravitaillement
- La recherche

* La recherche au service de santé des armées :

La recherche, au sein du service de santé des armées, s'appuie sur une structure fonctionnelle mettant en jeu des réseaux d'experts et des établissements. Les établissements de recherche et les équipes hospitalières qui contribuent à la « fonction recherche », sont particulièrement sollicités par les Etat-majors dans la préparation des opérations sous menace nucléaire, radiologique, biologique et chimique (NRBC), pour apporter des éléments d'aide à la décision opérationnelle, grâce notamment aux outils de surveillance épidémiologique et à la compétence analytique de leur experts.

Ils sont également sollicités sur décision interministérielle pour la préparation et la mise en œuvre des contre-mesures médicales des plans d'urgence gouvernementaux (Biotox, Piratome, Piratox).

Dans les domaines liés à la sécurité, les équipes des établissements de recherche et les équipes hospitalières apportent une contribution significative : sécurité des vols, sécurité et performances des équipements militaires, sécurité des plongeurs, surveillance médicale des risques liés à l'environnement en opérations extérieures...

*Le centre de recherches du service de santé des armées (CRSSA) :

- Présentation générale du CRSSA :

Le centre de recherches du service de santé des armées Emile Pardé est situé à La Tronche, à proximité de Grenoble, en Isère. Il est implanté au centre d'une métropole scientifique internationale et d'un site universitaire très actif. Il succède à l'hôpital militaire « Emile Pardé » dont il a gardé le nom, qui est celui du sous-lieutenant Pardé Emile, résistant, mort pour la France au cours des combats du maquis de l'Oisans en Août 1944.

- Missions :

Le centre de recherches assure des missions interarmées de recherche, d'expertise et de formation, en particulier pour la protection médicale contre les risques d'agressions NRBC. Il est l'un des deux laboratoires « 1^{er} échelon » intervenant en cas de crise bioterroriste. Par exemple, entre octobre et décembre 2001, le CRSSA a pris en charge plus de 750 analyses dans le cadre du plan Biotox.

Le CRSSA mène également des études en physiologie humaine sur la vie en condition extrême (altitude, chaleur, grand froid) et sur la gestion des « stress opérationnels », notamment sur la prévention et le traitement du « stress de combat ». Son expertise est mise à profit pour l'évaluation des contraintes physiopathologiques des équipements militaires du fantassin (il participe aux études sur le système du combattant débarqué (FELIN)) et sur les facteurs d'environnement psychosociologique en opérations extérieures.

Tous ces aspects essentiels pour les armées imposent des relations étroites, d'une part avec les instituts de médecine Navale, Tropicale et Aéronautique, les Hôpitaux d'Instruction des Armées, les armées via les états majors et la Délégation Générale à l'Armement (DGA), et d'autre part avec des organismes de recherche de niveau national (CEA, CNRS,...) ou international (TNO, DSTL,...)

- Organisation générale :

Le CRSSA est placé sous l'autorité de la Direction Centrale du Service de Santé des Armées (DCSSA) relevant du Ministre de la Défense.

Il est divisé en quatre départements spécialisés dans les domaines scientifiques et techniques suivants :

- Biologie des rayonnements
- Biologie des agents transmissibles
- Toxicologie
- Facteurs humains

Les unités de recherches sont soutenues par des services spécialisés :

- Service de biologie appliquée
- Service de microscopie et d'imagerie électronique
- Service informatique
- Service instrumentation et recherches technologiques
- Espace échanges scientifiques
- Service de biospectrométrie

C'est au sein de ce dernier service que j'ai effectué mon stage.

- Personnels :

Le CRSSA compte environ 220 personnes qui sont regroupées en 2 catégories :

→ Le personnel civil du ministère de la défense qui comprend 135 personnes parmi lesquels nous trouvons essentiellement les catégories suivantes :

- Fonctionnaires et assimilés : ce sont des agents de l'Etat (ingénieurs, techniciens, personnel administratif...). Certains sont directement rattachés au SSA alors que d'autres sont détachés de la DGA : ce sont des chercheurs et des techniciens mis à la disposition du CRSSA par l'Etablissement Technique Central de l'Armement (ETCA).

- Ouvriers d'Etat : ce sont des personnels de soutien

→ Le personnel militaire :

Il comprend 85 personnes parmi lesquels nous trouvons :

- Des Officiers (pharmaciens, médecins, vétérinaires, officiers du corps technique et administratif)
- Des Militaires infirmiers et techniciens des hôpitaux des armées (MITHA)
- Des Sous-officiers
- Des Engagés volontaires du service de santé des armées (VSSA)

- Budget :

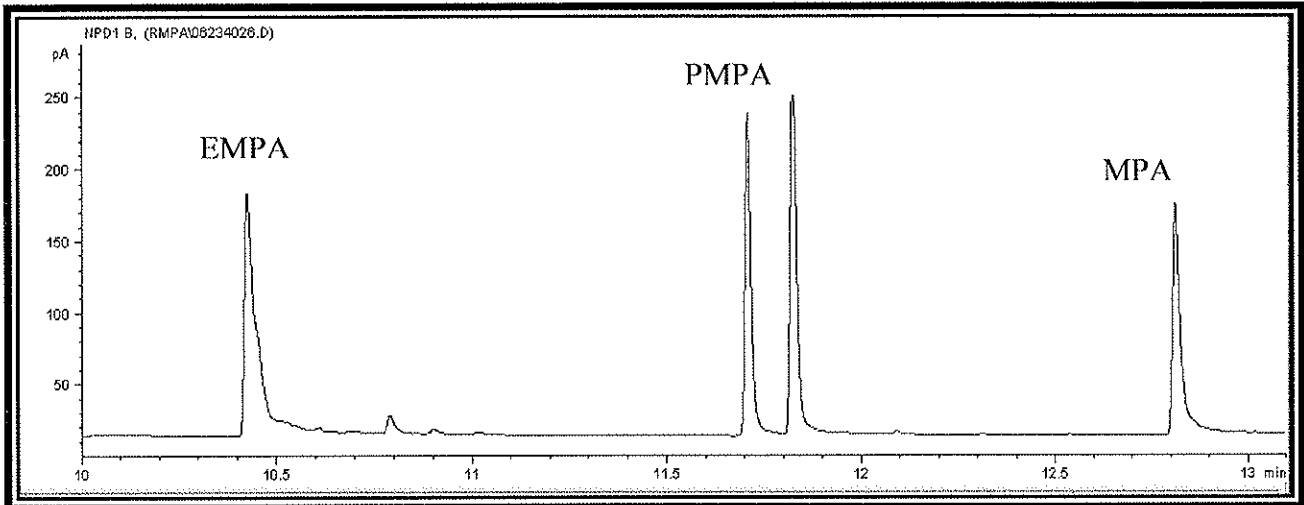
Les crédits budgétaires destinés au Ministère de la Défense sont répartis en 4 sections : Terre, Air, Marine et Services Communs dont fait partie le SSA. Les ressources financières sont pour l'essentiel assurées par la Direction centrale du service de santé des armées pour ce qui concerne le fonctionnement et les infrastructures, et la DGA ainsi que les états majors pour ce qui est de la recherche.

Le budget du CRSSA se décompose en deux parties: le budget de fonctionnement (rémunération d'activité du personnel, travaux d'entretien,...) et d'un budget d'équipement (investissements techniques et industriels, infrastructures, logistique opérationnelle...). Aussi, le budget total du CRSSA s'élevait en 2005 à 17.800.000 euros.

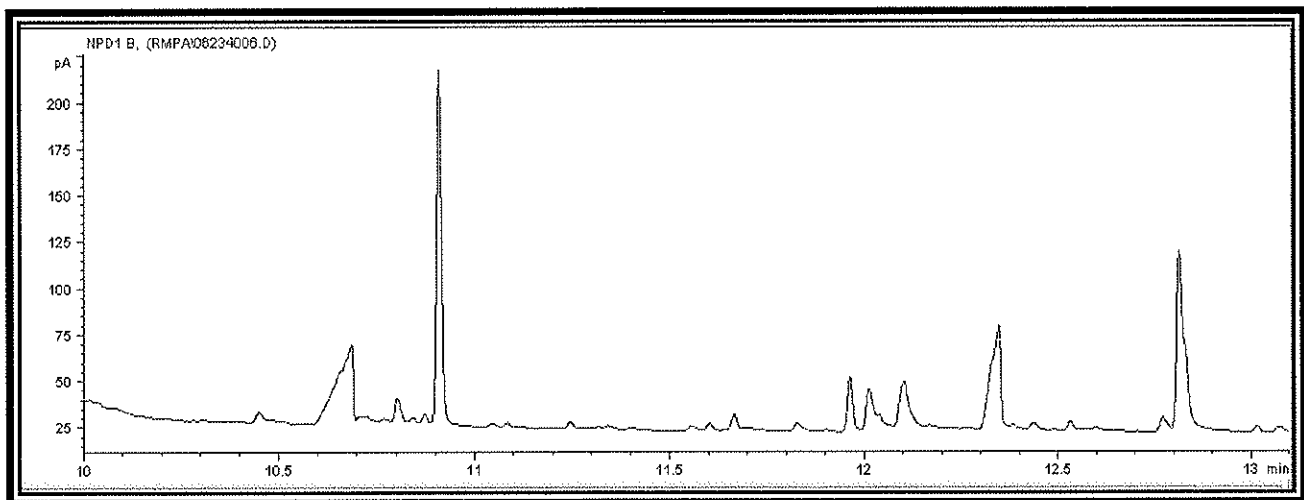
* Le service de Biospectrométrie :

Le service de Biospectrométrie a la responsabilité d'analyses quantitatives et qualitatives. Il est constitué de 4 personnels civils : deux ingénieurs et deux techniciens de laboratoire. Le laboratoire possède plusieurs types de chaînes de mesures dans des configurations différentes et complémentaires (GC-MS ; LC-MS/MS ; GC-NPD...).

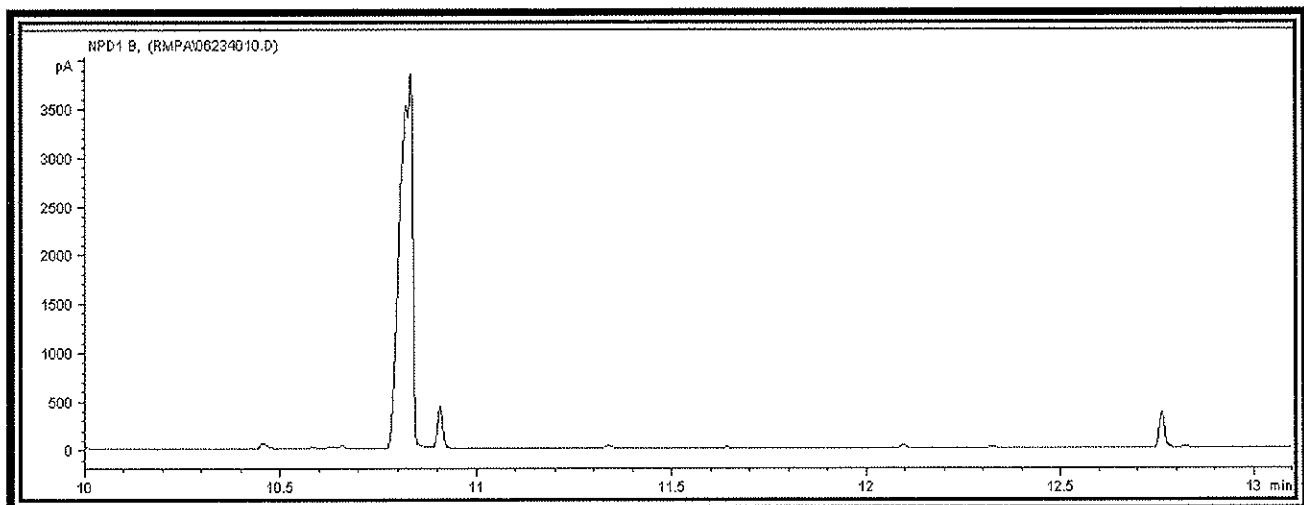
Annexe 2 : Chromatogrammes des différents ACN testés comme milieu de dérivation, entre 10 et 13,1 mn.



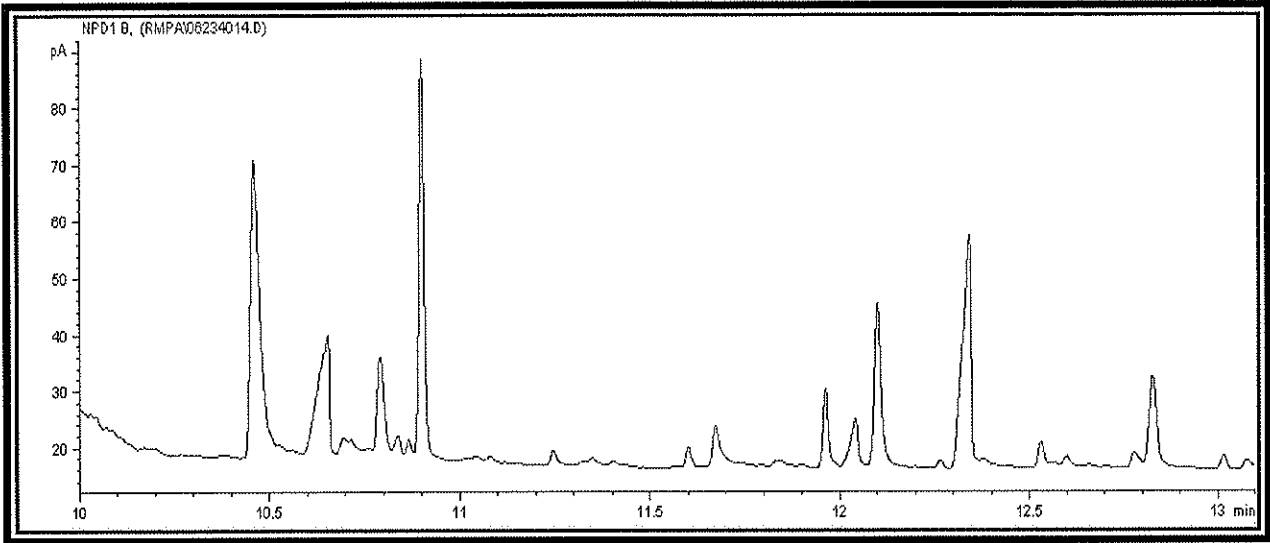
EMPA, MPA et PMPA dans les mêmes conditions, pour bien voir quelles sont les impuretés interférentes avec les RMPA



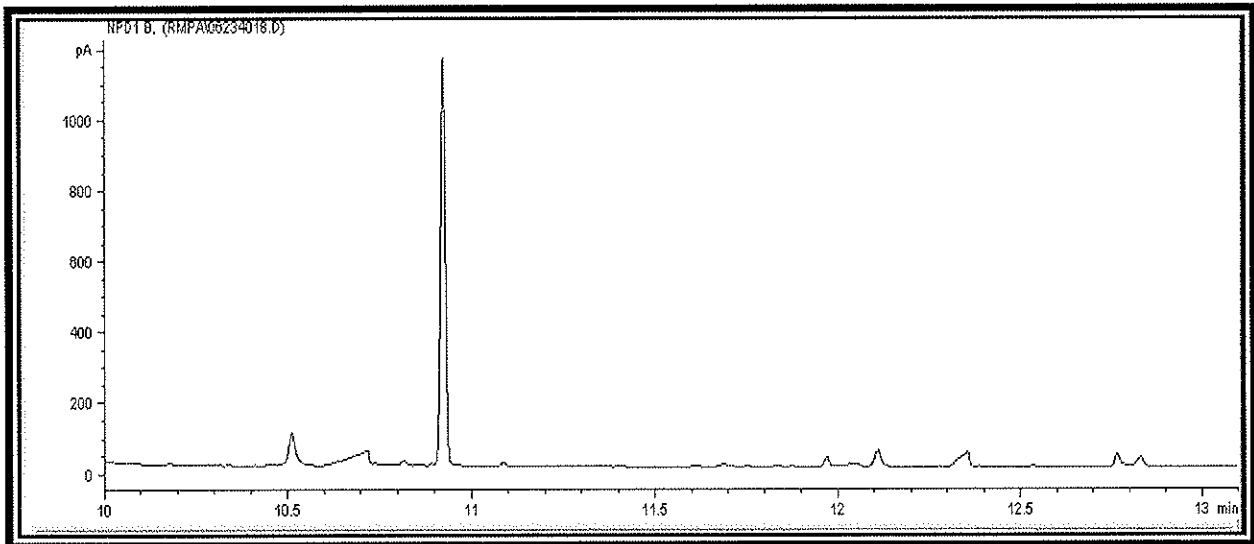
ACN HPLC Jt BAKER



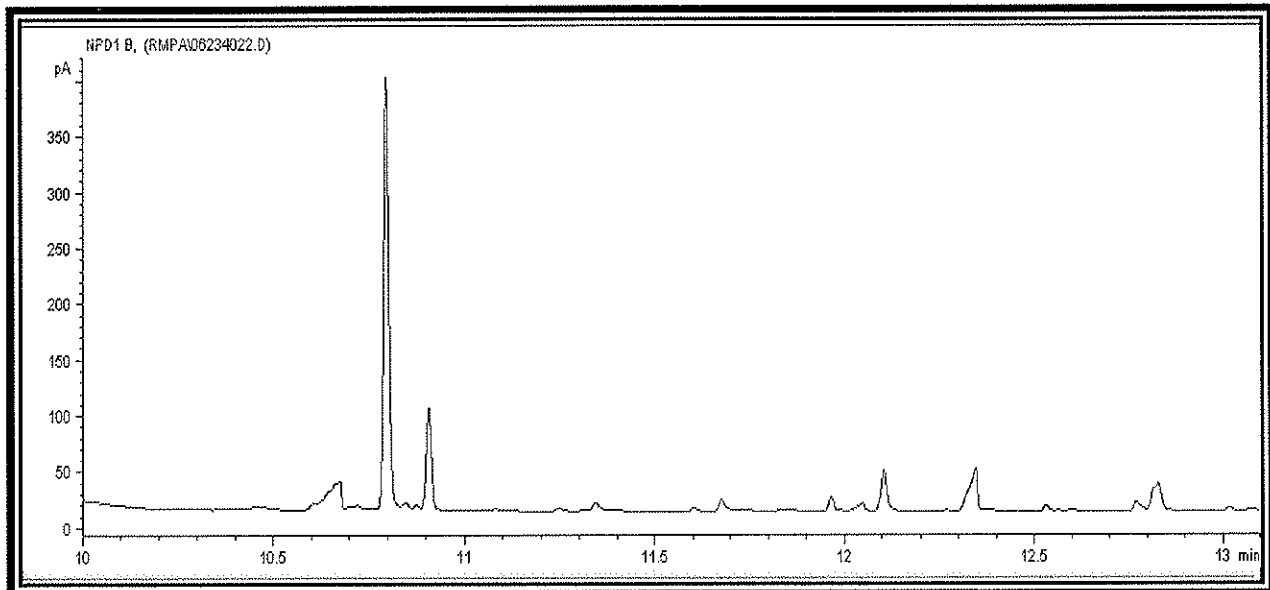
ACN HPLC SODIPRO



ACN FRUTAROM

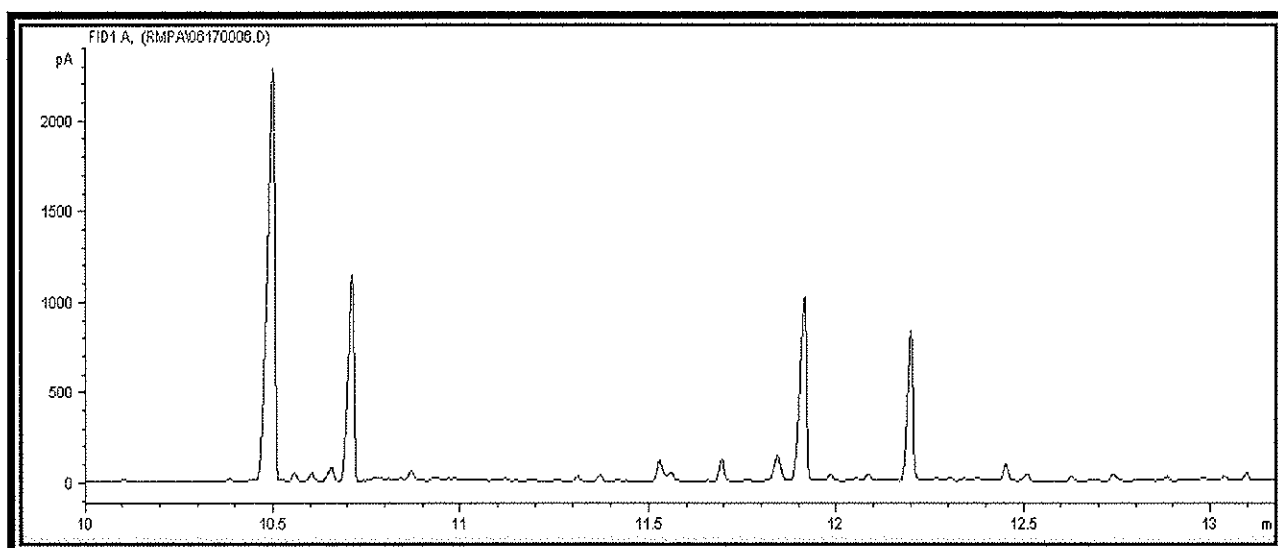


ACN « pesticide free » ACROS

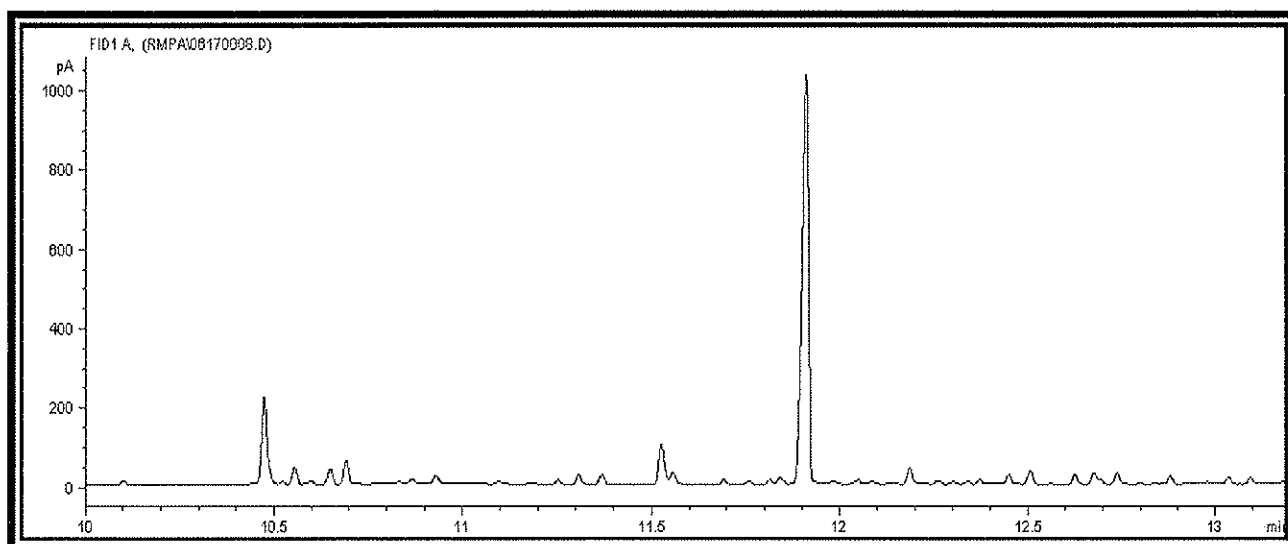


ACN « pestipur » SDS

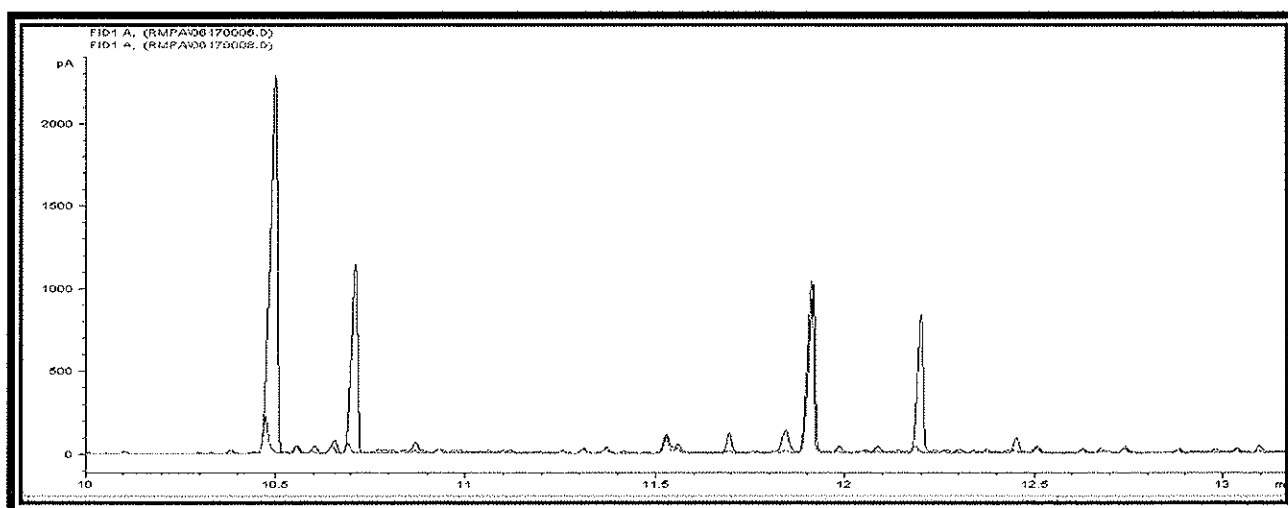
Annexe 3 : Observation de l'efficacité de l'extraction liquide-liquide sur les impuretés totales, en FID, entre 10 et 13,1 mn.



Impuretés totales post dérivation en FID, SANS extraction liquide-liquide



Impuretés totales post dérivation en FID, AVEC extraction liquide-liquide



Comparaison des 2 chromatogrammes précédents

Annexe 4 : Composition du milieu HBSS

Composants	g/l
SELS INORGANIQUES	
CaCl ₂ (anhydre)	–
CaCl ₂ .2H ₂ O	–
KCl	0,40
KH ₂ PO ₄	0,06
MgCl ₂ .6H ₂ O	–
MgSO ₄ (anhydre)	–
MgSO ₄ .7H ₂ O	–
NaCl	8,00
NaHCO ₃	0,35
Na ₂ HPO ₄	0,048
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	–
AUTRES COMPOSANTS	
D-Glucose	1,00
Rouge de phénol	–

Annexe 5 : Définitions limites de détection et de quantification

Limite de détection :

La limite de détection d'une procédure analytique correspond à la plus faible concentration qui peut-être distinguée, d'un blanc réalisé dans les mêmes conditions. Cependant, on ne peut garantir ni la précision ni l'exactitude de cette valeur. On accepte communément le fait que cette valeur soit trois fois supérieure au bruit de fond de la procédure [14].

Limite de quantification :

Le seuil de quantification est conventionnellement défini comme étant la plus petite quantité d'analyte pouvant être quantifié dans un échantillon, avec une exactitude et une fidélité appropriées [16]. Il est possible de rencontrer également un seuil de quantification dit supérieur par opposition au seuil de quantification inférieur préalablement défini, représentant la quantité maximale de produit d'intérêt pouvant être quantifiée avec une fidélité et une exactitude appropriées [7]. De même que pour la limite de détection, on admet couramment que la limite de quantification soit dix fois supérieure au bruit de fond de la procédure.

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;*
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;*
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

BON A IMPRIMER N° 361

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

JOACHIM François

Mise au point du dosage de métabolites de toxiques de guerre organophosphorés

Th. D. Pharm., Limoges, 2006.

Résumé :

Dans un contexte international tendu, les attentats au gaz sarin dans les années 1990 ont démontré la possibilité d'un emploi terroriste des agents neurotoxiques organophosphorés (NOPs) comme arme chimique. Le développement de méthodes de dosage des traces de NOPs et de leurs métabolites dans les milieux biologiques est donc indispensable pour la prise en charge et la protection des populations civiles et militaires.

Ce travail est consacré à la mise au point du dosage de l'acide pinacolylméthylphosphonique (PMPA), métabolite spécifique du gaz soman, dans un milieu biologique de synthèse (HBSS), par chromatographie gazeuse couplée à un détecteur azote-phosphore, précédée d'une extraction solide-liquide ($R = 88\%$) et d'une dérivation au PFBBr ($R = 47\%$). Cette méthode est linéaire ($R^2 > 0,99$) entre 12,7 et 1270 nmol/L et présente des limites de détection et de quantification respectivement de 0,7 ng/mL et 2,5 ng/mL. Cette méthode de dosage pourra être étendue au dosage du PMPA dans l'urine, après transposition de l'extraction.

Dans une première approche, le dosage par cette méthode de l'acide éthylméthylphosphonique (métabolite du VX) et de l'acide méthylphosphonique (métabolite terminal de nombreux NOPs) avait été envisagé ; pour différentes raisons, ce dosage a été momentanément abandonné. Cependant, cette partie pourra être réalisée ultérieurement lors du passage à une détection par spectrométrie de masse.

Mots clés : Neurotoxiques organophosphorés, acides alkylméthylphosphoniques, chromatographie gazeuse, injection large volume, détecteur thermoionique, cinétique transcutanée

Summary :

In a fraught international context, attacks with gas sarin in the 1990th showed the potential use of nerve agents (NOPs) as chemical warfare agents. The development of sensitive methods for trace analysis of nerve agents and their metabolites within biological samples is necessary to look after and protect civil and military populations.

This work presents a sensitive method for quantitation of pinacolylphosphonic acid (PMPA), specific metabolite of soman, in a synthetic biological medium, HBSS, by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detector, after a solid-phase extraction ($R = 88\%$) and a PFBBr derivatization ($R = 47\%$). This method is linear ($R^2 > 0,99$) between 12,7 and 1270 nmol/L and its limits of detection and quantitation are respectively 0,7 ng/mL and 2,5 ng/mL. This method could be extended to the dosage of PMPA in urine after adaptation of extraction.

In first approach, we investigated the quantitation of ethylmethylphosphonic acid (metabolite of VX) and methylphosphonic acid (final metabolite of many nerve agents). For different reasons, this dosage was abandoned. Nevertheless, this part could be further carried out using mass spectrometry detection.

Key Words : Nerve agents, alkylmethylphosphonic acids, gas chromatography, large volume injection, nitrogen-phosphorus detector, transdermal kinetics

JURY

Monsieur Philippe CARDOT, *Professeur*PRÉSIDENT
Monsieur Christian MOESCH, *Professeur*.....JUGE
Madame Marie-Françoise DREYFUSS, *Maître de conférence*.....JUGE
Monsieur Bernard BRASME, *Ingénieur*.....DIRECTEUR DE THÈSE