

Développement de nouvelles méthodes de traitement et d'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) de biomarqueurs sanguins de toxiques de guerre

Les vésicants sont de agents toxiques fortement alkylants utilisés comme agents de guerre pouvant réagir avec les protéines du sang, dont l'albumine formant des adduits stables. Ces adduits de durée de vie comprise entre 20 et 25 jours peuvent être utilisés comme biomarqueurs pour mettre en évidence à posteriori l'exposition à ces agents. L'objectif de cette thèse a été le développement d'une méthode de traitement de l'échantillon et d'analyse par LC-MS. Le suivi des biomarqueurs de cinq vésicants en milieu pur a été possible en chromatographie liquide en mode RP ainsi qu'en mode HILIC. Les sensibilités de ces méthodes vis-à-vis de deux familles de biomarqueurs des vésicants adduits sur l'albumine ont permis de sélectionner l'enzyme à utiliser pour réaliser l'étape de digestion enzymatique, à savoir la protéinase K. Une procédure d'extraction sur phase solide (SPE) en ligne a été développée sur supports commerciaux afin de traiter les digestats et faciliter le suivi des peptides adduits lors de leur suivi en matrice réelle. La précipitation protéique, fréquemment rencontrée dans les procédures décrites dans la littérature et la réduction protéique au DTT jamais appliquée au suivi des vésicants ont été étudiées. Ainsi, l'impact de ces étapes sur le signal en LC-MS du tripeptide adduit par SM dans le cas l'analyse d'un plasma incubé par SM a été mesurée, ces étapes n'ont pas conduit à un gain dans la sensibilité et n'ont donc pas été maintenues afin de réduire la durée globale d'analyse. La digestion en ligne sur un réacteur d'enzyme immobilisée (IMER), en remplacement de l'étape de digestion en solution fortement consommatrice d'enzymes, a été envisagée afin de pouvoir automatiser l'ensemble de la procédure d'analyse. Les IMER de protéinase K développés ont montré une plus faible activité que l'enzyme libre mais ont malgré tout permis de mettre en évidence l'adduction de SM sur le site d'adduction suivi par détection du biomarqueur associé via une méthode totalement automatisable.