

**Analyse d'une protéine biomarqueur d'intoxication par des agents neurotoxiques :
développement d'immunoabsorbants et de réacteurs enzymatiques, couplés en ligne à la
chromatographie liquide et à la spectrométrie de masse**

L'objectif de ce travail était de développer une méthode de traitement de l'échantillon permettant l'analyse par LC-MS/MS d'adduits formés entre des composés neurotoxiques organophosphorés (OPNA) et la butyrylcholinestérase (BuChE), protéine plasmatique. En vue d'une automatisation totale du processus analytique, une étape d'immunoextraction a été couplée à un réacteur de digestion enzymatique (IMER), suivie d'une analyse par microLC-MS/MS afin de détecter le peptide adduit par le neurotoxique. Tout d'abord, la synthèse d'IMER de pepsine a été optimisée. L'IMER le plus performant a été appliqué à la digestion de la BuChE afin d'analyser le peptide biomarqueur d'intoxication, par nanoLC-MS/MS. Un IMER de pepsine, de dimensions supérieures a pu être rapidement intégré à un système d'analyse microLC-MS/MS, permettant la digestion de la BuChE et l'analyse en ligne du peptide cible. Dans un second temps, une méthode d'extraction sélective a été développée par immobilisation de différents anticorps anti-BuChE sur un support solide appelé immunoabsorbant. Le protocole d'immunoextraction a été mis au point, puis les immunoabsorbants ont été caractérisés en termes de sélectivité et de rendement d'extraction. La faisabilité du couplage des immunoabsorbants au digesteur enzymatique a pu être clairement démontrée et ce dispositif automatisable a été appliqué à l'analyse de la BuChE de plasma humain, dopée par des OPNA. Cela a permis la détection rapide et sensible des adduits OPNA-BuChE, à partir de très faibles quantités de plasma.