



HAL
open science

Développement d'outils analytiques pour l'analyse de biomarqueurs de longue durée de vie de l'ypérite dans les échantillons biologiques

Florine Hallez

► **To cite this version:**

Florine Hallez. Développement d'outils analytiques pour l'analyse de biomarqueurs de longue durée de vie de l'ypérite dans les échantillons biologiques. Biochimie [q-bio.BM]. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS137 . tel-03481991

HAL Id: tel-03481991

<https://theses.hal.science/tel-03481991>

Submitted on 15 Dec 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE SORBONNE UNIVERSITE

ED 388

Spécialité : Chimie Analytique

Présentée par

Florine HALLEZ

Pour obtenir le grade de

Docteur de Sorbonne Université

Développement d'outils analytiques pour l'analyse de biomarqueurs de longue durée de vie de l'ypérite dans les échantillons biologiques

Thèse dirigée par Mme Valérie PICHON (Pr)

Soutenue le 24 Septembre 2021, devant le jury composé de :

M. Carlos AFONSO , Professeur, Université de Rouen	Rapporteur
M. Marcel VAN DER SCHANS , Docteur, TNO, Pays-Bas	Rapporteur
M. Ludovic BELLOT-GURLET , Professeur, Sorbonne Université	Examineur
M. Vincent DELATOUR , Docteur, LNE, Paris	Examineur
M^{me} Valérie PICHON , Professeur, Sorbonne Université	Directrice de thèse
M^{me} Anne BOSSEE , Docteur, DGA	Membre invitée
M^{me} Audrey COMBES , Maître de conférences, ESPCI, Paris	Membre invitée
M^{me} Charlotte DESOUBRIES , Docteur, DGA	Membre invitée

*UMR Chimie, Biologie et Innovation 8231 CNRS/ESPCI
Laboratoire Sciences Analytiques, Bioanalytiques et Miniaturisation
Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la ville de Paris (ESPCI Paris)
10 rue Vauquelin 75005 Paris*

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Carlos Afonso ainsi que le Docteur Marcel van der Schans d'avoir accepté de juger la qualité de mes travaux de thèse en tant que rapporteurs. J'adresse également mes remerciements au Professeur Ludovic Bellot-Gurlet et au Docteur Vincent Delatour qui ont accepté d'examiner ce manuscrit.

Je remercie ma directrice de thèse, le Professeur Valérie Pichon, qui m'a initiée et formée à la recherche scientifique et qui m'a donné l'opportunité de réaliser ma thèse au sein du Laboratoire de Sciences Analytiques, Bioanalytiques et Miniaturisation. Merci pour son encadrement, sa disponibilité et ses précieux conseils qui ont permis le bon déroulement de ce projet. Je la remercie également de m'avoir permis de présenter mes résultats lors de congrès nationaux et internationaux.

J'adresse également mes remerciements au Docteur Audrey Combès pour son implication tout au long de ces trois années de thèse et pour tout le temps qu'elle a consacré à ce projet en répondant à mes nombreuses questions.

Je souhaite également remercier les Docteurs Charlotte Desoubries et Anne Bossée de la DGA NRBC qui ont suivi, encadré et corrigé ces travaux de thèse. Merci pour votre implication et vos suggestions qui ont grandement contribué au bon déroulement de cette thèse.

Mes remerciements s'adressent également à Cindy Dubois, Grégoire Delaporte et Andréa Gordien qui ont gentiment accepté de me livrer des échantillons afin de garantir la bonne avancée de mes travaux.

Je remercie Pablo Mas, élève ingénieur en troisième année à l'Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la ville de Paris, qui, en tant que stagiaire, a contribué au bon déroulement de la fin de ce projet de thèse. Merci pour son aide et son enthousiasme.

J'adresse un grand merci à tous les permanents du laboratoire pour les bons moments partagés et pour leur aide à des moments clés de mes travaux. Je tiens tout particulièrement à remercier le Docteur Christophe Chendo pour ses précieux conseils en spectrométrie de masse et pour sa disponibilité, ainsi que pour sa bonne humeur permanente.

Je remercie également tous les doctorants, post-doctorants et stagiaires que j'ai pu rencontrer au laboratoire au cours des trois dernières années. J'adresse tout d'abord mes remerciements à Stan, Thomas et Julien qui m'ont aidée à trouver mes marques au LSABM et avec lesquels j'ai passé d'inoubliables moments. Un merci tout particulier à l'attention de Marine, avec laquelle j'ai fait mes

débuts au laboratoire et qui a été ma camarade de congrès tout au long de ma thèse (même lorsque l'on a risqué d'être renversées par un tramway à Istanbul !). Ce fût un réel plaisir d'être ta secrétaire au cours de ces trois dernières années, Marinette, et promis, on écrira un jour l'histoire de Graffiti le petit charbon. Un grand merci également à Clément pour son aide inestimable en informatique et pour avoir sauvé toutes mes données au moment de la rédaction de ce manuscrit. Sans toi ce manuscrit n'aurait jamais été terminé à temps alors merci infiniment. Merci à Romain pour ses blagues et ses anecdotes quotidiennes qui ont fait de moi la championne du Trivial Pursuit. Ce fut un réel plaisir de partager ton bureau (surtout quand tu apportais des Pim's et des chocolats pour nourrir mon esprit). Merci à Pauline pour sa gentillesse, nos discussions sur Disney et pour tous les fous rires que l'on a pu avoir le midi grâce à elle (le plus souvent à ses dépens). Merci Paupau tous les desserts que tu as bien voulu partager avec moi et pour tes talents en dessin (Labinocle va trôner fièrement au-dessus de mon futur bureau !). Merci à Fanny pour sa bonne humeur et son rire communicatif (et ses connaissances en tueurs en série, je me suis sentie moins seule !). Enfin, merci à Cécile pour sa gentillesse et toutes les discussions que l'on a pu avoir ensemble sur le cinéma.

Je tiens à remercier toute ma famille, qui m'a soutenue et encouragée tout au long de ma thèse. Enfin, merci à Bili pour son soutien infaillible et inébranlable. Merci de m'avoir poussée à me dépasser et à donner le meilleur de moi-même. Merci de m'avoir écoutée pendant des heures sans comprendre un mot de ce que je disais. Merci d'avoir toujours cru en moi, d'avoir chassé mes doutes et d'avoir fait en sorte que je sois plus forte que mes craintes. Tu as été mon pilier, ma force et mon essentiel. Merci à l'infini.

AVERTISSEMENT AU LECTEUR

Cette thèse est rédigée comme une succession de chapitres, certains construits sur la structure d'articles publiés ou soumis, pouvant se lire indépendamment. Cette organisation peut par conséquent engendrer des changements entre les langues Française et Anglaise, ainsi que certaines redondances entre les différentes sections matériels et méthodes ou les introductions.

SOMMAIRE

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS.....	9
LISTE DES ABREVIATIONS.....	11
INTRODUCTION GENERALE	15
CHAPITRE I : METHODES ANALYTIQUES MISES EN ŒUVRE POUR LA SURVEILLANCE D'EXPOSITION A L'YPERITE A COURT ET MOYEN TERMES DANS LES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES.....	23
I.1. PROPRIETES ET MECANISME D'ACTION DE L'YPERITE	23
I.2. METABOLITES DE COURTE DUREE DE VIE DE L'YPERITE	25
I.2.1. Généralités	25
I.2.2. Analyse des métabolites issus de l'hydrolyse et/ou de l'oxydation de l'ypérite	27
I.2.2.1. Analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	32
I.2.2.2. Analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse	37
I.2.3. Analyse des métabolites issus de la réaction de l'ypérite avec le glutathion	40
I.2.3.1. Analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	44
I.2.3.2. Analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse	46
I.2.4. Limitations de l'intérêt des produits d'hydrolyse/oxydation et des métabolites β -lyase comme biomarqueurs d'exposition à l'ypérite	50
I.3. BIOMARQUEURS DE L'YPERITE A MOYEN TERME : ADDUITS COVALENTS AVEC LES MACROMOLECULES	54
I.3.1. Réaction de l'ypérite avec les macromolécules biologiques.....	54
I.3.2. Adduits formés avec l'ADN.....	55
I.3.2.1. Sites d'alkylation de l'ADN.....	55
I.3.2.2. Méthodes d'analyse des adduits ADN-ypérite par marquage radioactif et immunochimie	57
I.3.2.3. Méthodes d'analyse des adduits ADN-ypérite par chromatographie en phase liquide.....	59
I.3.2.4. Procédures de préparation des échantillons biologiques pour l'analyse des adduits ADN-ypérite	65
I.3.2.5. Limitations des adduits ADN-ypérite comme biomarqueurs d'exposition	70
I.3.3. Adduits formés avec l'albumine et la kératine.....	70
I.3.3.1. Analyse des adduits formés avec l'albumine plasmatique.....	75
I.3.3.2. Alkylation des résidus acide aspartique et acide glutamique	79
I.3.3.3. Adduits formés avec la kératine	80
I.4. CONCLUSIONS	80

CHAPITRE II : ANALYSE DES ADDUITS AVEC L'HEMOGLOBINE DANS LES ECHANTILLONS SANGUINS POUR LA CONFIRMATION RETROSPECTIVE A LONG TERME D'EXPOSITION A L'YPERITE 85

II.1. ETAT DE L'ART SUR LES METHODES D'ANALYSE DES ADDUITS HEMOGLOBINE-YPERITE.....	85
II.1.1. Structure de l'hémoglobine et réaction avec l'ypérite	85
II.1.2. Procédures d'extraction et de purification de l'hémoglobine des échantillons sanguins	89
II.1.2.1. Hémolysé des érythrocytes	89
II.1.2.2. Isolement et purification de l'hémoglobine contenue dans les hémolysats.....	90
II.1.3. Procédures d'isolement et d'analyse des adduits hémoglobine-ypérite.....	91
II.1.4. Conclusions	95
II.2. DEVELOPMENT OF A LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY (LC-MS/MS) METHOD FOR THE ANALYSIS OF TRYPTIC DIGEST OF HUMAN HEMOGLOBIN EXPOSED TO SULFUR MUSTARD.....	97
II.2.1. Introduction	98
II.2.2. Material and methods.....	101
II.2.2.1. Chemicals	101
II.2.2.2. Apparatus and LC-MS or LC-MS/MS analysis	102
II.2.2.3. Evaluation of the retention potential of the trap column	103
II.2.2.4. In-solution and LC-MS/MS analysis of the digest	103
II.2.3. Results and discussion.....	103
II.2.3.1. Evaluation of the trapping capacity of the trap column.....	103
II.2.3.2. Analysis of the tryptic digest of non-alkylated human hemoglobin.....	104
II.2.3.3. Analysis of the tryptic digest of hemoglobin exposed to sulfur mustard.....	108
II.2.3.4. Influence of the concentration of sulfur mustard on the alkylation	119
II.2.4. Conclusion	120

CHAPITRE III : DEVELOPPEMENT DE REACTEURS ENZYMATIQUES IMMOBILISES POUR L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE L'HEMOGLOBINE ADDUITE PAR L'YPERITE125

III.1. ETAT DE L'ART SUR LES REACTEURS ENZYMATIQUES IMMOBILISES	125
III.1.1. Principe des IMERs	125
III.1.2. Sélection des protéases	126
III.1.3. Sélection du support d'immobilisation	128
III.1.3.1. Techniques d'immobilisation non covalente.....	128
III.1.3.2. Supports pour l'immobilisation covalente des protéases	128
III.1.4. Couplage des IMERs avec les techniques analytiques	132
III.1.5. Applications des IMERs	134
III.1.5.1. Profilage de protéines	134
III.1.5.2. Etude de la glycosylation de protéines.....	135
III.1.5.3. Identifications d'inhibiteurs enzymatiques	135
III.1.5.4. Analyse quantitative de protéines	135

III.1.6. Conclusions	136
III.2. DEVELOPMENT OF AN IMMOBILIZED-TRYPSIN REACTOR COUPLED TO LIQUID CHROMATOGRAPHY AND TANDDEM MASS SPECTROMETRY FOR THE ANALYSIS OF HUMAN HEMOGLOBIN ADDUCTS WITH SULFUR MUSTARD.....	138
III.2.1. Introduction	138
III.2.2. Material and methods.....	140
III.2.2.1. Chemicals	140
III.2.2.2. Apparatus and LC-MS/MS analysis.....	141
III.2.2.3. Preparation of the trypsin-based IMER	142
III.2.2.4. Quantification of trypsin grafter on IMER	142
III.2.2.5. Digestion procedures	143
III.2.2.6. Statistical tests.....	143
III.2.3. Results and discussion.....	143
III.2.3.1. Preparation of the trypsin IMERs and evaluation of their grafting yields	143
III.2.3.2. Development of the hemoglobin digestion procedure on IMER	144
III.2.3.3. Digestion of alkylated hemoglobin on trypsin IMER and comparison with in-solution digestion	149
III.2.4. Conclusion.....	154
CHAPITRE IV : ANALYSE DES ADDUITS HEMOGLOBINE-YPERITE DANS LE SANG TOTAL APRES EXTRACTION DE LA PROTEINE DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES	157
IV.1. ANALYSIS OF LONG-LIVED SULFUR MUSTARD-HEMOGLOBIN ADDUCTS IN BLOOD SAMPLES BY OFF-LINE RED BLOOD CELLS LYSIS AND ON-LINE COUPLING OF DIGESTION ON AN IMMOBILIZED-TRYPSIN REACTOR WITH LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY	158
IV.1.1. Introduction	158
IV.1.2. Material and methods	160
IV.1.2.1. Chemicals	160
IV.1.2.2. Apparatus and LC-MS/MS analysis.....	161
IV.1.2.3. Synthesis of the trypsin-based IMER.....	162
IV.1.2.4. Development of an extraction and purification procedure of hemoglobin from blood samples	162
IV.1.2.5. On-line digestion of hemoglobin on IMER	166
IV.1.2.6. Statistical test	166
IV.1.3. Results and discussion	166
IV.1.3.1. Development of an extraction and purification procedure of hemoglobin from blood samples	166
IV.1.3.2. Application of the optimized procedure to blood samples exposed to sulfur mustard	172
IV.1.3.3. Digestion on the trypsin IMER of the hemoglobin extracted from spiked blood samples and LC-MS/MS analysis of the resulting alkylated peptides	175
IV.1.4. Conclusion.....	182
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	185

ANNEXES.....	189
ANNEXE 1 : SUPPLEMENTARY MATERIALS FOR ARTICLE 1	191
ANNEXE 2 : SUPPLEMENTARY MATERIALS FOR ARTICLE 2	201
ANNEXE 3 : SUPPLEMENTARY MATERIALS FOR ARTICLE 3	208
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	219
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	225

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

“Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the analysis of tryptic digest of human hemoglobin exposed to sulfur mustard” F. Hallez, A. Combès, C. Desoubries, A. Bossée, V. Pichon, Journal of Chromatography B, 1163 (2021) 122518.

COMMUNICATIONS ORALES

Symposiums internationaux

F. Hallez, A. Combès, C. Desoubries, A. Bossée, V. Pichon. *“Development of an immobilized-trypsin reactor coupled to liquid chromatography and mass spectrometry for the analysis of long-lived adducts of sulfur mustard with hemoglobin in blood samples”*, 3rd International Conference CBRNE Research and Innovation, 20-23 Mai 2019, Nantes (France).

S. Perchepied, **F. Hallez**, A. Combès, N. Delaunay, V. Pichon. *“Potential of immobilized enzymatic reactors coupled with liquid chromatography and mass spectrometry for the structural elucidation or the quantitative analysis of target proteins”*, 48th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2019), 16-20 Juin 2019, Milan (Italie).

F. Hallez, A. Combès, C. Desoubries, A. Bossée, V. Pichon. *“Development of an immobilized-trypsin reactor coupled to liquid chromatography and mass spectrometry for the analysis of long-lived adducts of sulfur mustard with hemoglobin in blood samples”*, XX Euroanalysis Conference (Euroanalysis 2019), 1-5 Septembre 2019, Istanbul (Turquie).

F. Hallez, A. Combès, C. Desoubries, A. Bossée, V. Pichon. *“Development of immobilized-trypsin reactors coupled on-line to liquid chromatography and tandem mass spectrometry for the analysis of long-lived sulfur mustard-hemoglobin adducts in blood samples”*, 15th International Symposium on Biochromatography and Nanoseparations (SBCN 2021), 17-20 Mai 2021. *Visioconférence*.

Symposiums nationaux

F. Hallez, A. Combès, C. Desoubries, A. Bossée, V. Pichon. *“Développement d’outils analytiques pour l’analyse de biomarqueurs de longue durée de vie de l’ypérite dans les échantillons biologiques”*, 1^{ère} Ecole Thématique du Club Jeunes de l’AFSEP, 12-15 Mai 2019, Montpellier (France). **Prix de la meilleure communication orale.**

COMMUNICATIONS PAR AFFICHE

F. Hallez, A. Combès, C. Desoubries, A. B V. Pichon. *“Développement d’un réacteur enzymatique immobilisé couplé à la chromatographie liquide et à la spectrométrie de masse pour l’analyse d’adduits hémoglobine-ypérite dans les échantillons sanguins”*, 13^{ème} Congrès Francophone sur les Sciences Séparatives et les couplages de l’AFSEP (SEP 2019), 25 - 28 Mars 2019, Paris (France).

F. Hallez, A. Combès, C. Desoubries, A. Bossée, V. Pichon. *“Development on an immobilized-trypsin reactor coupled to liquid chromatography and mass spectrometry (LC-MS) for the analysis of long-lived adducts of*

sulfur mustard with hemoglobin in blood samples”, 48th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 16 - 20 Juin 2019 (HPLC 2019), Milan (Italie).

F. Hallez, A. Combès, C. Desoubries, A. Bossée, V. Pichon. “*Development of an immobilized-trypsin reactor coupled to liquid chromatography and mass spectrometry for the analysis of sulfur mustard adducts with hemoglobin in blood samples*”, Journée de l’Ecole Doctorale 388, 24 Juin 2019, Paris (France).

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac	groupe acétyle COCH ₃ (<i>acetyl group</i> COCH ₃)	d.i.	diamètre interne (<i>internal diameter, i.d.</i>)
ACN	acétonitrile (<i>acetonitrile</i>)	DMSO	diméthylsulfoxyde (<i>dimethylsulfoxide</i>)
AcNa	acétate de sodium (<i>sodium acetate, NaAc</i>)	DSH	acide 2-(3,5-bis(mercaptométhyl)phénoxy)acétique (<i>2-(3,5-bis(mercaptomethyl)phenoxy)acetic acid</i>)
AcNH₄	Acétate d'ammonium (<i>ammonium acetate, NH₄Ac</i>)	DTT	dithiothréitol (<i>dithiothreitol</i>)
AcOEt	acétate d'éthyl (<i>ethyl acetate, EtOAc</i>)	E/S	rapport enzyme sur substrat (<i>enzyme to substrate ratio</i>)
ADN	acide désoxyribonucléique (<i>deoxyribonucleic acid, DNA</i>)	EC	électrophorèse capillaire (<i>capillary electrophoresis, CE</i>)
AE-	adduit Ala-Glu-	EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
(HETE)-	(hydroxyéthylthioéthyl)-Val-Ser-Lys-	EIC	chromatogramme d'ion extrait (<i>extracted ion chromatogram</i>)
VSKL	Leu (<i>Ala-Glu-(hydroxyethylthioethyl)-Val-Ser-Lys-Leu adduct</i>)	ELISA	dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (<i>enzyme-linked immunosorbant assay</i>)
AF	acide formique (<i>formic acid, FA</i>)	ESI^{+/-}	ionisation par électrospray en mode positif/négatif (<i>positive/negative electrospray ionization</i>)
Ala	alanine	FITC	isothiocyanate de fluorescéine (<i>fluorescein isothiocyanate</i>)
ARN	acide ribonucléique (<i>ribonucleic acid, RNA</i>)	Fmoc	chlorure de 9-fluoroenylmethoxycarbonyl (<i>9-fluoroenylmethoxycarbonyl chloride</i>)
BAPNA	N _α -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide	GB	globules blancs (<i>white blood cells, WBCs</i>)
BCA	test à l'acide bicinchoninique (<i>bicinchoninic acid assay</i>)	GC	chromatographie en phase gazeuse (<i>gas chromatography</i>)
Bis-G	bis[2-(guanine-7-yl)éthyl]sulfide (<i>bis[2-(guanine-7-yl)ethyl]sulfide</i>)	Glu	acide glutamique (<i>glutamic acid</i>)
CGR	culot de globules rouges (<i>red blood cells, RBCs</i>)	GSH	glutathion (<i>glutathione</i>)
CH₂Cl₂	dichlorométhane (<i>dichloromethane</i>)	Hb	hémoglobine (<i>hemoglobin</i>)
CIAC	convention sur l'interdiction des armes chimiques (<i>chemical weapons convention, CWC</i>)	HD	ypérite (<i>sulfur mustard, SM</i>)
CID	fragmentation induite par collision (<i>collision-induced dissociation</i>)	HETE	hydroxyéthylthioéthyl (<i>hydroxyethylthioethyl</i>)
CNBr	bromure de cyanogène (<i>cyanogen bromide</i>)		
CV	coefficient de variation (<i>relative standard deviation, RSD</i>)		
CWA	agent chimique de guerre (<i>chemical warfare agent</i>)		
Cys	cystéine (<i>cysteine</i>)		

HETE-CP	adduit (S-[2-[(hydroxyéthyl)thio]éthyl])-Cys-Pro ((S-[2-[(hydroxyéthyl)thio]éthyl])-Cys-Pro adduct)	LDD	limite de détection (<i>limit of detection, LOD</i>)
HETE-CPF	adduit (S-[2-[(hydroxyéthyl)thio]éthyl])-Cys-Pro-Phe ((S-[2-[(hydroxyéthyl)thio]éthyl])-Cys-Pro-Phe adduct)	LDQ	limite de quantification (<i>limit of quantification, LOQ</i>)
HETE-Glu	adduit hydroxyéthylthioéthyl-acide glutamique (<i>hydroxyethylthioethyl-glutamic acid adduct</i>)	Leu	leucine
HETE-His	adduit hydroxyéthylthioéthyl-histidine (<i>hydroxyethylthioethyl-histidine adduct</i>)	LLE	extraction liquide/liquide (<i>liquid-liquid extraction</i>)
HETE-Val	adduit hydroxyéthylthioéthyl-valine (<i>hydroxyethylthioethyl-valine adduct</i>)	Lys	lysine
HFBA	anhydride/acide heptafluorobutyrique (<i>heptafluorobutyric anhydride/acid</i>)	MeOH	méthanol (<i>methanol</i>)
HFBI	heptafluorobutyrylimidazole	MRM	suivi de réactions multiples (<i>multiple reaction monitoring</i>)
His	histidine	MS	spectrométrie de masse (<i>mass spectrometry</i>)
HPLC	chromatographie en phase liquide à haute performance (<i>high performance liquid chromatography</i>)	MS/MS	spectrométrie de masse en tandem (<i>tandem mass spectrometry</i>)
HRMS	spectrométrie de masse à haute résolution (<i>high resolution mass spectrometry</i>)	MSMTESE	1-méthylsulfinyl-2-[2-(méthylthio)éthylsulfonyl]éthane (<i>1-methylsulfinyl-2-[2-(methylthio)ethylsulfonyl]ethane</i>)
HS	espace de tête (headspace)	MW	poids moléculaire (<i>molecular weight</i>)
HuBuChE	butyrylcholinestérase humaine (<i>human butyrylcholinesterase</i>)	n.d.	non déterminé (<i>not determined</i>)
ID	dilution isotopique (<i>isotope dilution</i>)	N³-HETEA	N ³ -[2-[(2-hydroxyéthyl)thio]éthyl]-adénine (<i>N³-[2-[(2-hydroxyethyl)thio]ethyl]-adenine</i>)
IE	ionisation électronique (<i>electron ionization, EI</i>)	N⁷-HETEG	N ⁷ -[2-[(2-hydroxyéthyl)thio]éthyl]-guanine (<i>N⁷-[2-[(2-hydroxyethyl)thio]ethyl]-guanine</i>)
IEC	chromatographie d'échange d'ions (<i>ion exchange chromatography</i>)	NaHCO₃	bicarbonate de sodium (<i>sodium bicarbonate</i>)
IMAC	chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (<i>immobilized metal affinity chromatography</i>)	NCI	ionisation chimique en mode négatif (<i>negative chemical ionization</i>)
IMER	réacteur enzymatique immobilisé (<i>immobilized enzyme reactor</i>)	NH₄HCO₃	bicarbonate d'ammonium (<i>ammonium bicarbonate</i>)
iPrOH	isopropanol	NHS	N-hydroxysuccinimide
LC	chromatographie en phase liquide (<i>liquid chromatography</i>)	O⁶-HETEG	O ⁶ -[2-[(2-hydroxyéthyl)thio]éthyl]-guanine (<i>O⁶-[2-[(2-hydroxyethyl)thio]ethyl]-guanine</i>)
		OIAC	organisation pour l'interdiction des armes chimiques (<i>organization for the prohibition of chemical weapons, OPCW</i>)

PBS	tampon phosphate salin (<i>phosphate saline buffer</i>)	SEC	chromatographie d'exclusion stérique (<i>size exclusion chromatographie</i>)
PCI	ionisation chimique en mode positif (<i>positive chemical ionization</i>)	Ser	sérine (<i>serine</i>)
PFBCI	chlorure de pentafluorobenzoyle (<i>pentafluorobenzoyl chloride</i>)	SIM	Suivi sélectif d'ions (<i>single ion monitoring</i>)
PFPTH	pentafluorophénylthiohydantoïne (<i>pentafluorophenylthiohydantoin</i>)	SLE	extraction liquide/liquide assistée sur support solide (<i>supported liquid extraction</i>)
PFPTIC	isothiocyanate de pentafluorophényl (<i>pentafluorophenyl isothiocyanate</i>)	SMO	sulfoxyde d'ypérite (<i>sulfur mustard sulfoxide</i>)
Phe	phénylalanine (<i>phenylalanine</i>)	SMO₂	sulfone d'ypérite (<i>sulfur mustard sulfone</i>)
PITC	isothiocyanate de phényle (<i>phenyl isothiocyanate</i>)	SPE	extraction sur phase solide (<i>solid phase extraction</i>)
PP	précipitation de protéines (<i>protein precipitation</i>)	TBDMSCI	chlorure de <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl (<i>tert-butyltrimethylsilyl chloride</i>)
Pro	proline	TCT	Injection par thermodésorption et piégeage à froid (<i>thermodesorption cold-trap</i>)
PRS	acide propylsulfonique (<i>propylsulfonic acid</i>)	TDG	thiodiglycol
PTA	thioacétate de potassium (<i>potassium thioacetate</i>)	TDGO	sulfoxyde de thiodiglycol (<i>thiodiglycol sulfoxide</i>)
PVDF	polyfluorure de vinylidène (<i>polyvinylidene fluoride</i>)	TFA	acide trifluoroacétique (<i>trifluoroacetic acid</i>)
RPLC	chromatographie de partage à polarité de phase inverse (<i>reverse phase liquid chromatography</i>)	TFF	filtration à flux tangentiel (<i>tangential flow filtration</i>)
rpm	rotations par minute (<i>rotations per minute</i>)	TIC	courant d'ions total (<i>total ion current</i>)
SAX	support échangeur d'anions de type fort (<i>strong anion exchanger</i>)	TiCl₃	trichlorure de titane (<i>titanium trichloride</i>)
SBETE	1,1'-sulfonylbis[2-(éthylthio)éthane] (<i>1,1'-sulfonylbis[2-(ethylthio)ethane]</i>)	TPCK	chlorométhylcétone de 6-(1-tosylamido-2-phényl)éthyl (<i>6-(1-tosylamido-2-phenyl)ethyl chloromethyl ketone</i>)
SBMSE	1,1'-sulfonylbis[2-(méthylsulfinyl)éthane] (<i>1,1'-sulfonylbis[2-(methylsulfinyl)ethane]</i>)	TRIS	tris(hydroxyméthyl)aminométhane (<i>tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>)
SBMTE	1,1'-sulfonylbis[2-(méthylthio)éthane] (<i>1,1'-sulfonylbis[2-(methylthio)ethane]</i>)	UHPLC	chromatographie liquide à ultra haute performance (<i>ultra high performance liquid chromatography</i>)
SBSNAE	1,1'-sulfonylbis[2-S-(N-acétylcystéinyl)éthane] (<i>1,1'-sulfonylbis[2-S-(N-acetylcysteiny)ethane]</i>)	Val	valine
SDS	dodécylsulfate de sodium (<i>sodium dodecylsulfate</i>)		

INTRODUCTION GENERALE

Bien que le développement, la production, le stockage et l'utilisation des armes chimiques soient strictement prohibés par la Convention sur l'Interdiction des Armes Chimiques (CIAC), traité international de désarmement signé à Paris par 165 pays en Septembre 1993 et entré en vigueur en Avril 1997, l'exposition des populations civiles ou militaires à des agents chimiques de guerre, qu'elle soit intentionnelle ou accidentelle, demeure une préoccupation majeure. L'utilisation du gaz sarin, agent organophosphoré et neurotoxique, a ainsi été démontrée en 2013 puis en 2017 en Syrie. Ce même gaz a également été utilisé dans les années 1990 lors d'attaques terroristes au Japon. Par ailleurs, si la destruction des stocks d'armes chimiques déclarés par les Etats signataires est rigoureusement encadrée par l'Organisation pour l'Interdiction des Armes Chimiques (OIAC), institution indépendante chargée d'assurer l'application de la CIAC et de vérifier les engagements pris par les différents signataires, des réserves non déclarées ont été découvertes dans certains pays. Ainsi, suite à la guerre civile en Lybie en 2011, d'importantes quantités non déclarées d'ypérite, agent vésicant fortement alkylant, ont été découvertes. Cet agent chimique a également été utilisé lors du conflit militaire Iran-Irak dans les années 1980 et lors d'attaques en Syrie en 2015. De même, le risque d'exposition accidentelle reste très élevé, du fait de la présence résiduelle en Europe de nombreux obus à l'ypérite non utilisés datant de la Première Guerre Mondiale ou de l'abandon de munitions en Chine par les troupes Japonaises lors de la Seconde Guerre Mondiale. Par conséquent, les problèmes de diagnostic d'exposition à l'ypérite restent d'actualité et nécessitent le développement de méthodes analytiques rapides, fiables, sensibles et robustes pour confirmer l'exposition supposée. L'objectif de ce projet de recherche a donc été de mettre au point de nouvelles procédures analytiques permettant de mettre en évidence sans ambiguïté une exposition à l'ypérite.

La preuve d'intoxication par un agent de guerre peut être apportée par la détection directe de cet agent ou par la mise en évidence de biomarqueurs d'expositions, présents dans les matrices biologiques telles que le sang, l'urine ou la peau. La recherche des métabolites excrétés dans les urines apparaît comme l'une des manières les plus simples de confirmer une exposition à l'ypérite. En effet, la majeure partie de l'agent chimique absorbé est éliminée sous forme de métabolites urinaires et l'urine ne requiert pas de techniques invasives pour sa récupération. En outre, elle ne contient généralement pas de protéines ni de lipides, ce qui facilite l'extraction et la purification des composés d'intérêt. Cependant, c'est une matrice variable en termes de pH (gamme usuelle entre 5,5 et 7) et de concentration en composants organiques et inorganiques, ce qui peut donc compliquer la détection des analytes d'intérêt par spectrométrie de masse. A l'inverse, la récupération d'échantillons sanguins

ou de tissus autres que les cheveux est invasive et nécessite un personnel médical compétent pour le prélèvement des échantillons, mais la composition du sang est plus constante que celle des urines. En outre, la fenêtre de détection des métabolites urinaires est très réduite, ce qui en fait des biomarqueurs de très faible durée de vie. Toutefois, en cas d'exposition à l'ypérite de populations vivant dans des territoires isolés, les échantillons biologiques des victimes ne sont souvent disponibles que plusieurs jours voire plusieurs semaines après la date d'intoxication. De fait, d'autres biomarqueurs, de plus longue durée de vie que les métabolites urinaires, doivent être utilisés afin de prouver une exposition à l'ypérite. Les adduits que l'ypérite forme avec les protéines et l'ADN (acide désoxyribonucléique) apparaissent alors comme des biomarqueurs idéaux.

L'analyse et l'étude des adduits formés avec l'ADN permettent de comprendre les effets mutagènes observés après exposition à l'ypérite et le rôle joué par l'agent chimique dans le développement de cancers et autres pathologies. Cependant, bien qu'ayant une durée de vie nettement supérieure à celle des métabolites urinaires, les adduits ADN-ypérite présentent une fenêtre de détection d'un mois maximum dans les fluides biologiques tels que le sang ou l'urine. En effet, des processus de réparation enzymatique séparent la partie adduite du reste du squelette de l'ADN, limitant ainsi la durée de détection de ces adduits, pouvant être qualifiés de biomarqueurs à moyen-terme.

Les adduits que l'ypérite forme avec les protéines présentes dans le sang ou les tissus biologiques tels que la peau ont une durée de vie similaire à celle des protéines natives. Si ces durées sont de l'ordre de quelques dizaines de jours pour la plupart des protéines, notamment pour l'albumine plasmatique ou la kératine de la peau, les adduits formés avec l'hémoglobine présentent l'avantage d'être détectables dans l'organisme jusqu'à 120 jours après une exposition à l'ypérite, ce qui fait de ces adduits une cible de choix pour la confirmation d'empoisonnement à long terme.

L'hémoglobine (Hb) est une protéine tétramérique composée de quatre chaînes polypeptidiques identiques deux à deux : deux chaînes alpha (globine α) et deux chaînes bêta (globine β). Au cours des années 1990, des analyses d'hémoglobine extraite d'échantillons de sang exposés à de très fortes teneurs en ypérite par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) ont permis d'identifier 11 sites d'adduction sur la protéine. Cependant, à l'heure actuelle, la principale méthode d'analyse des adduits ypérite-hémoglobine cible uniquement les adduits formés au niveau des deux valines N-terminales de la protéine. Qui plus est, cette procédure est très chronophage, le traitement des échantillons sanguins durant plus de deux jours et demi au sein des laboratoires du département d'analyses chimiques de la Direction Générale de l'Armement (DGA). En outre, cette méthode manque de sensibilité et de répétabilité et nécessite une étape de dérivation supplémentaire en amont de l'analyse des adduits par chromatographie liquide ou gazeuse (GC), ce

qui rend le traitement des échantillons laborieux. De plus, des études précédentes ont démontré que l'alkylation de l'ypérite sur les deux sites ciblés représentaient moins de 2% de l'alkylation totale induite sur l'hémoglobine lors d'une exposition à l'ypérite.

L'objectif de ce travail de recherche a donc été de développer une nouvelle approche analytique permettant de confirmer une exposition à l'ypérite à long terme, tout en s'affranchissant des limitations de la procédure conventionnelle. Pour cela, une approche basée sur la digestion enzymatique de l'hémoglobine par une protéase (*e.g.* la trypsine) a été retenue. En effet, cette approche permet de digérer les protéines et d'obtenir des fragments peptidiques. Dans le cadre de cette étude, la digestion de l'hémoglobine exposée à l'ypérite conduit ainsi à l'obtention d'un mélange de peptides non modifiés et de peptides alkylés, qui seront analysés par chromatographie en phase liquide de partage à polarité de phase inversée, couplée à la spectrométrie de masse en tandem (RPLC-MS/MS). L'identification des peptides correspondant aux différents pics observés sur les chromatogrammes est réalisée par comparaison des masses déterminées expérimentalement avec les masses théoriques des peptides générés par des outils bio-informatiques. Cette technique permet ainsi d'identifier les peptides résultant de la digestion enzymatique de l'hémoglobine adduite par l'ypérite, et notamment de distinguer les peptides alkylés des peptides non alkylés. Par ailleurs, l'étude des spectres de fragmentation des peptides alkylés, grâce à une détection en mode « *product ion* », permet de localiser précisément et par conséquent d'identifier sans ambiguïté les résidus alkylés de l'hémoglobine.

La digestion enzymatique est généralement réalisée en solution, selon une procédure longue et souvent fastidieuse. De fait, afin d'améliorer la méthode analytique mise au point au cours de cette thèse, des supports sur lesquels les enzymes ont été immobilisées ont été développés, de manière à surmonter les limites imposées par la digestion en solution. Ainsi, la durée de l'étape de digestion sur les réacteurs à enzymes immobilisées (IMER) est considérablement réduite, passant de plusieurs heures à quelques dizaines de minutes. En outre, l'immobilisation des protéases permet de fortement limiter leur autodigestion, ce qui conduit à des analyses qualitatives et quantitatives plus fiables pour les protéines ciblées. Enfin, les IMERs pouvant être conditionnés dans des pré-colonnes, il est possible de coupler l'étape de digestion directement en ligne avec l'analyse par LC-MS/MS des peptides résultants. Ce couplage permet l'automatisation de l'analyse et une augmentation de sa sensibilité et de sa fiabilité, en réduisant le nombre de manipulations des échantillons.

Les IMERs ont déjà été utilisés pour des applications variées, par exemple comme aide à la caractérisation de la glycosylation de protéines. Des IMERs à base de pepsine ont également été utilisés pour la détection et la quantification de biomarqueurs d'exposition à des agents de guerre

alkylants ou à des composés organophosphorés. Toutefois, ce projet de recherche constitue la première utilisation répertoriée d'IMERs à base de trypsine pour la digestion d'hémoglobine adduite par l'ypérite couplée en ligne avec l'analyse LC-MS/MS des peptides alkylés résultants.

Un premier chapitre est dédié à l'état de l'art sur les méthodes développées au cours des dernières décennies pour l'analyse des biomarqueurs d'exposition à l'ypérite présentant une durée de vie inférieure à un mois. Cette partie détaille en particulier les méthodes d'analyse par GC-MS et LC-MS des métabolites urinaires, après leur extraction de la matrice biologique, ainsi que l'évolution des procédures appliquées pour l'extraction et l'analyse des adduits formés avec l'ADN.

Le second chapitre de ce manuscrit est centré sur les adduits que l'ypérite forme avec l'hémoglobine. Ainsi, une première partie est consacrée à la présentation des méthodes référencées dans la littérature pour l'analyse des adduits hémoglobine-ypérite, notamment la procédure de dégradation d'Edman modifiée, méthode actuellement principalement utilisée pour analyser les adduits que l'ypérite forme avec les résidus N-terminaux des chaînes de globine α et de globine β . Cette partie présente également les principales méthodes utilisées dans la littérature pour extraire et purifier l'hémoglobine à partir de matrices biologiques, et s'attache notamment à souligner les difficultés rencontrées avec ces méthodes. La deuxième partie de ce chapitre porte sur l'étude expérimentale qui a été réalisée au cours de ce projet pour l'identification des sites d'adduction de l'hémoglobine et la mise au point d'une méthode d'analyse par LC-MS/MS de l'ensemble des peptides alkylés résultant de la digestion tryptique en solution de l'hémoglobine adduite par l'ypérite en milieu pur.

Afin de s'affranchir des difficultés liées à la digestion enzymatique en solution, l'intérêt des IMERs de trypsine pour la digestion de l'hémoglobine adduite a été étudié dans un troisième chapitre, dont la première partie est consacrée à l'état de l'art sur les IMERs en décrivant notamment le principe et la synthèse des IMERs, ainsi que leurs principaux domaines d'application. La seconde partie de ce chapitre porte sur les résultats expérimentaux obtenus lors de l'application des IMERs de trypsine synthétisés en laboratoire à la digestion de l'hémoglobine adduite par l'ypérite en milieu pur, et à la comparaison des résultats avec ceux obtenus après une digestion en solution, notamment en termes de sensibilité et de répétabilité.

Enfin, un quatrième et dernier chapitre est consacré à l'application de l'ensemble de la procédure analytique mise au point dans les deux chapitres précédents à l'analyse d'échantillons de sang humain exposés *in vitro* à l'ypérite. Dans un souci de simplification de la procédure de traitement des échantillons sanguins, ce chapitre est dédiée à l'étude expérimentale réalisée au cours de ce projet de recherche pour l'optimisation de l'extraction de l'hémoglobine du sang, en comparant notamment plusieurs méthodes de lyse des érythrocytes et de filtration des lysats résultants. La procédure

optimisée a par la suite été appliquée à des échantillons de sang humain incubés avec différents niveaux de concentration en ypérite et l'hémoglobine ainsi extraite a été digérée sur IMER de trypsine, avant analyse LC-MS/MS des peptides alkylés résultants.

CHAPITRE I

METHODES ANALYTIQUES MISES EN ŒUVRE POUR LA
SURVEILLANCE D'EXPOSITION A L'YPERITE A COURT
ET MOYEN TERMES DANS LES ECHANTILLONS
BIOLOGIQUES

Chapitre I : Méthodes analytiques mises en œuvre pour la surveillance d'exposition à l'ypérite à court et moyen termes dans les échantillons biologiques

I.1. Propriétés et mécanisme d'action de l'ypérite

L'ypérite (sulfure de 2,2'-dichlorodiéthyle), plus communément appelée gaz moutarde, est un composé carcinogène, cytotoxique et fortement vésicant, provoquant de sérieuses brûlures au niveau de la peau, des yeux et des poumons. Synthétisée sous forme pure en 1886, elle a été utilisée comme arme chimique pour la première fois en 1917 [1] et est responsable de plus de 80% des blessures chimiques observées durant la Première Guerre Mondiale, avec plus de 1,3 million de soldats exposés et près de 90 000 morts [2]. L'ypérite a également été utilisée dans les années 1980 lors du conflit Iran-Irak [3,4]. En raison de sa faible volatilité, de sa toxicité élevée, de sa simplicité de production et du manque d'antidote, l'ypérite représente une menace lors d'attaques terroristes [5] et a été utilisée à de nombreuses reprises lors d'attaques chimiques en Syrie au cours des dernières années [6,7]. De plus, le risque d'exposition accidentelle reste très élevé dans certaines régions, notamment en Chine et en Europe, du fait de la présence résiduelle dans l'environnement de nombreuses munitions à l'ypérite abandonnées lors de la Première et de la Seconde Guerres Mondiales. Avec le temps, ces munitions se corrodent, libérant ainsi de l'ypérite qui représente une menace pour les populations civiles et les écosystèmes. De nombreux cas d'exposition accidentelle ont ainsi été reportés [8–11].

En tant qu'agent bi-fonctionnel alkylant, l'ypérite réagit avec de nombreux nucléophiles biologiques pour former des adduits hydroxyéthylthioéthyl (HETE). Après introduction de l'agent chimique dans l'organisme, un ion épisulfonium très réactif est rapidement formé via une substitution nucléophile intramoléculaire de l'un des atomes de chlore par l'atome de soufre (**Figure 1**), rendant l'ypérite intacte très difficilement détectable *in vivo* [12]. Cet ion réagit avec l'eau, la forme réduite du glutathion (GSH) ou les sites nucléophiles des macromolécules telles que l'ADN ou les protéines. Les métabolites et les adduits ainsi formés ont des durées de vie plus longues que celle de l'ypérite intacte, allant de quelques jours à plusieurs mois, et peuvent donc être utilisés comme biomarqueurs d'exposition lors d'analyses d'échantillons biologiques tels que le sang, les urines ou la peau.

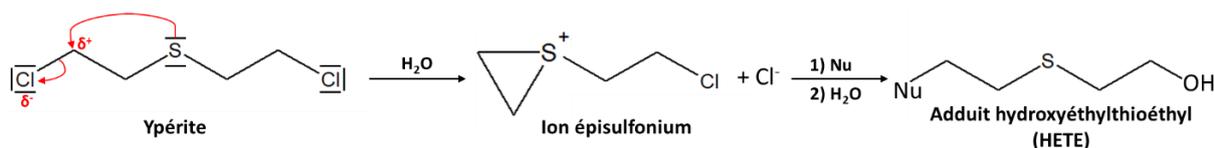


Figure 1. Réaction de l'ypérite avec un nucléophile biologique (Nu) pour former un adduit hydroxyéthylthioéthyl (HETE), après formation de l'ion épisulfonium par substitution nucléophile.

Les biomarqueurs d'exposition à l'ypérite sont généralement classés en quatre catégories selon les nucléophiles ciblés [13] : (i) les métabolites issus des réactions d'hydrolyse et/ou d'oxydation de l'ypérite [14], (ii) les métabolites résultant de la réaction de l'ypérite avec le glutathion [8,15], (iii) les adduits formés avec l'ADN [16] et (iv) les adduits résultant de l'alkylation des protéines [17]. Les principaux biomarqueurs de l'ypérite sont représentés en **Figure 2**.

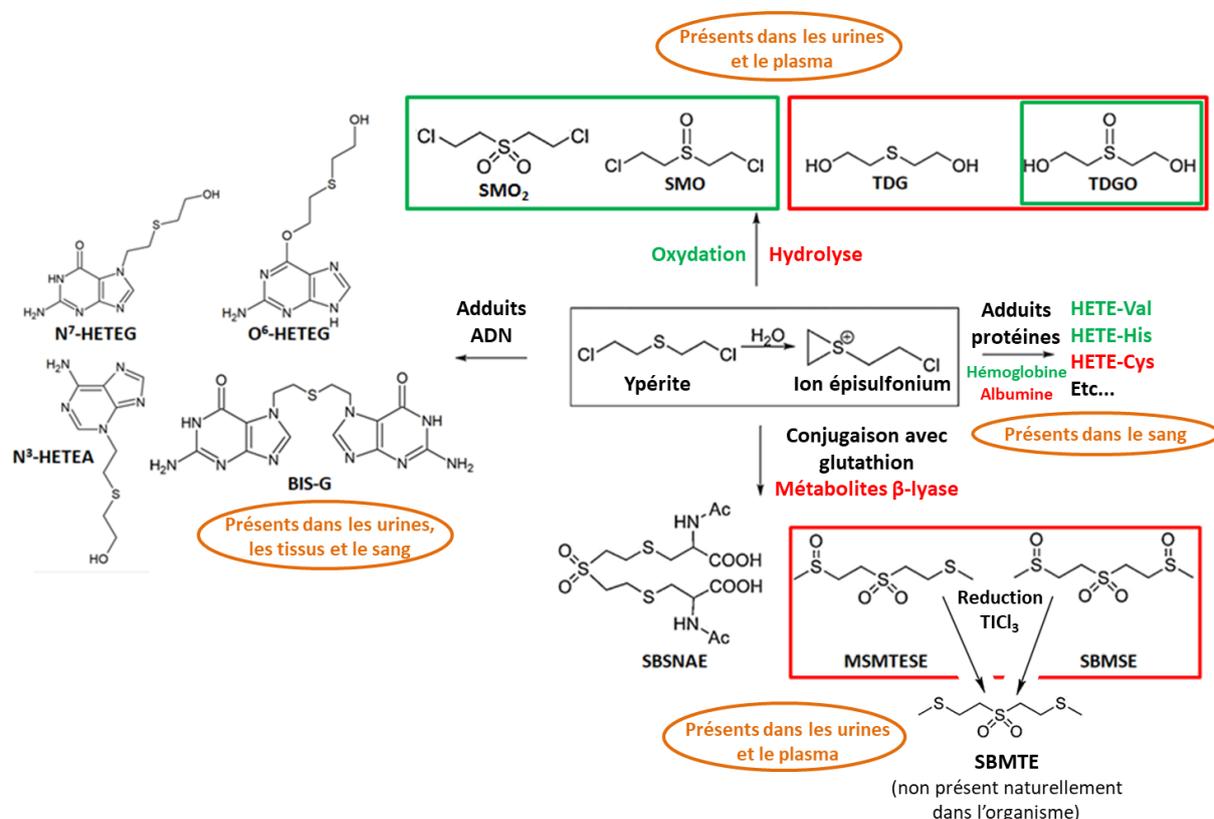


Figure 2. Représentation des principaux biomarqueurs de l'ypérite, issus des réactions d'hydrolyse et/ou d'oxydation, de la réaction avec le glutathion et de l'alkylation de l'ADN ou des protéines. **SMO** : sulfoxyde d'ypérite ; **SMO₂** : sulfone d'ypérite ; **TDG** : thiodiglycol ; **TDGO** : sulfoxyde de thiodiglycol ; **SBSNAE** : 1,1'-sulfonylbis[2-S-(N-acétylcystéinyl)éthane] ; **SBMTE** : 1,1'-sulfonylbis[2-(méthylthio)éthane] ; **MSMTESE** : 1-méthylsulfinyl-2-[2-(méthylthio)éthylsulfonyl]éthane ; **SBMSE** : 1,1'-sulfonylbis[2-(méthylsulfinyl)éthane] ; **N⁷-HETEG** : N⁷-[2-[(2-hydroxyéthyl)thio]éthyl]-guanine ; **O⁶-HETEG** : O⁶-[2-[(2-hydroxyéthyl)thio]éthyl]-guanine ; **N³-HETE** : N³-[2-[(2-hydroxyéthyl)thio]éthyl]-adenine ; **Bis-G** : bis[2-(guanine-7-yl)éthyl]sulfide ; **HETE-Val** : hydroxyéthylthioéthyl valine ; **HETE-His** : hydroxyéthylthioéthyl histidine ; **HETE-Cys** : hydroxyéthylthioéthyl cystéine ; **TiCl₃** : trichlorure de titane ; **Ac** : groupe acétyle (COCH₃). Adapté de [13].

Ce chapitre recense donc les principales approches analytiques développées au cours des 50 dernières années pour l'analyse des biomarqueurs de courte et moyenne durées de vie de l'ypérite dans les matrices biologiques, notamment l'urine et le sang, ainsi que leurs avantages et limitations respectifs.

I.2. Métabolites de courte durée de vie de l'ypérite

I.2.1. Généralités

Dans un environnement compétitif, l'ion épisulfonium réagit préférentiellement avec des nucléophiles mous, tels que la fonction thiol du résidu cystéine du tripeptide glutathion. Le glutathion, résultant de la condensation de résidus acide glutamique, cystéine et glycine, existant à l'état réduit et oxydé, est présent dans toutes les cellules de l'organisme et fait partie du mécanisme de défense de ce dernier contre les agents alkylants. Dans des conditions physiologiques, la réaction de l'ypérite avec la forme réduite du glutathion (GSH) est en compétition avec le nucléophile le plus abondant, *i.e.* l'eau. Le métabolisme de l'ypérite est alors dominé par des réactions chimiques (par opposition à des réactions enzymatiques) avec le glutathion et l'eau, accompagnées par une oxydation de l'atome de soufre en sulfoxyde ou sulfone. Les permutations variées de ces réactions, sur l'un ou l'autre des deux atomes de chlore, combinées à des voies métaboliques divergentes pour les produits de réaction avec le glutathion, conduisent à la formation d'un nombre important de métabolites, principalement excrétés dans les urines.

A l'heure actuelle, cinq métabolites sont principalement suivis pour confirmer une exposition à l'ypérite. Deux de ces métabolites, le thiodiglycol (TDG) et son produit d'oxydation, le sulfoxyde de thiodiglycol (TDGO), dérivent d'une simple réaction d'hydrolyse de l'ypérite (voir **Figure 2**). Les trois autres métabolites sont formés suite à la réaction de l'ypérite avec le glutathion : 1,1'-sulfonylbis[2-(méthylsulfinyl)éthane] (SBMSE), 1-méthylsulfinyl-2-[2-(méthylthio)éthylsulfonyl] éthane (MSMTESE) et 1,1'-sulfonylbis[2-S-(N-acétylcystéinyl)éthane] (SBSNAE) [18]. Cependant, d'autres métabolites tels que le sulfoxyde d'ypérite (SMO) et la sulfone d'ypérite (SMO₂), résultant de l'oxydation directe de l'atome de soufre, présentent un intérêt pour la confirmation rétrospective d'exposition à l'agent chimique.

- **Thiodiglycol (TDG) et sulfoxyde de thiodiglycol (TDGO)**

L'analyse des urines d'individus exposés à l'ypérite a mis en évidence le fait que le TDGO était excrété à des concentrations beaucoup plus élevées que le TDG, qui est un métabolite urinaire très minoritaire [13,14,19–21]. Boyer *et al.* [20] ont ainsi montré que, dans des échantillons d'urine fraîche, près de 13% des métabolites issus de l'hydrolyse de l'ypérite étaient sous forme de TDG, les 87% restants étant

présents sous forme de TDGO. Les auteurs ont également remarqué qu'au bout de 8 mois de stockage à -20°C, plus aucune trace de TDG n'était détectée dans les échantillons. Cependant, la concentration totale en produits d'hydrolyse n'avait pas évolué, démontrant ainsi que tout le TDG était sous sa forme oxydée et donc qu'il continuait de s'oxyder, même à -20°C. Il doit également être noté que le traitement des échantillons d'urine avec de l'acide chlorhydrique (HCl) concentré ou avec une enzyme β -glucuronidase, qui rompt la liaison osidique des glucuronides, a permis d'augmenter considérablement les quantités de TDG et TDGO détectées [20,22,23]. En effet, les conjugués ester de ces métabolites sont ainsi hydrolysés, et donc davantage de TDG et TDGO sont excrétés dans les urines. Ainsi, Boyer *et al.* [20] ont établi que près de 41% des espèces existaient sous forme de conjugués ester dans les urines, démontrant ainsi que l'étape d'hydrolyse de ces conjugués était indispensable lors de l'analyse du TDG et du TDGO.

- **Sulfoxyde d'ypérite (SMO)**

Le sulfoxyde d'ypérite (SMO) a été identifié comme métabolite pour la première fois dans les années 1960 [24] mais est apparu comme très minoritaire dans les urines de rats exposés à l'ypérite [25]. De fait, le SMO est très peu utilisé comme biomarqueur urinaire d'exposition à l'ypérite et est rarement inclus dans les méthodes d'analyses développées. Cependant, une étude menée sur du plasma de rat a montré que SMO était un composé majoritaire dans le système circulatoire des rats après une exposition à l'ypérite, avec des concentrations plasmatiques élevées pouvant être détectées dans les 12 premières heures suivant l'intoxication [15]. Tout comme le TDG et le TDGO, le SMO est apparu dans le plasma et les urines des rongeurs dans les 15 premières minutes suivant l'exposition à l'ypérite. Par conséquent, les résultats obtenus lors de cette étude suggèrent que le SMO, même présent en faible concentration, peut être utilisé comme biomarqueur plasmatique pour prouver un empoisonnement à l'ypérite, mais seulement dans les premières heures suivant une exposition supposée. C'est très certainement pour cela que le SMO est rarement utilisé comme biomarqueur d'exposition à l'ypérite, contrairement aux métabolites résultant de la réaction de l'agent chimique avec le glutathion.

- **Métabolites formés à partir de la réaction de l'ypérite avec le glutathion**

Si de nombreux métabolites ont été observés chez les animaux, et notamment chez le rat [25], seuls trois produits de réaction ont été retrouvés dans les urines humaines après exposition à l'ypérite [19]. Ces métabolites ont été identifiés dans les années 1990 [19,23,25] (**Figure 2**). Deux de ces produits, le MSMTSE et le SBMSE, résultent du métabolisme ultérieur du conjugué bis-S-glutathion, formé par la réaction d'une molécule d'ypérite avec deux molécules de glutathion, grâce à l'action d'une enzyme β -lyase générant la rupture de la liaison S-C du résidu cystéine, suivie d'une S-méthylation. Le troisième

biomarqueur présent dans les urines et dérivant de la réaction de l'ypérite avec le glutathion est le SBSNAE. Ce composé est obtenu suite à une métabolisation par dégradation en dérivé acide mercapturique. Récemment, deux nouveaux conjugués avec le glutathion ont été détectés et identifiés pour la première fois dans des échantillons de foie humain exposés *in vitro* à l'ypérite : 2-((2-(S-glutathionyl)éthyl)thio)éthyl phosphate et 2-((2-(S-glutathionyl)éthyl)thio)éthanol [26]. Cependant, leur utilité comme potentiels biomarqueurs d'exposition à l'ypérite n'a pas encore été étudiée.

I.2.2. Analyse des métabolites issus de l'hydrolyse et/ou de l'oxydation de l'ypérite

Les principales méthodes décrites dans la littérature pour l'analyse des métabolites résultant de l'hydrolyse et/ou de l'oxydation de l'ypérite sont détaillées dans les paragraphes suivants et résumées dans le **Tableau 1**.

Tableau 1. Principales méthodes pour l'analyse des métabolites résultant de l'hydrolyse et/ou de l'oxydation de l'ypérite dans les matrices biologiques.

Métabolite	Matrice biologique	Pré-traitement de l'échantillon	Procédure d'extraction et de purification	Rendement d'extraction	Agent de dérivation	Méthode d'analyse	Colonne analytique et gaz vecteur/phase mobile	Sensibilité	Référence
TDG	Urine (humain)	Hydrolyse enzymatique des conjugués (<i>Helix pomatia</i> , 37°C, 1 nuit) ; conversion en ypérite (HCl concentré, 100°C)	HS (Tenax-GC) ; TCT (CP-Sil 5, 300 mm x 0.5 mm, 5 µm)	20-30%	Aucun	GC-IE-MS (<i>full scan</i>)	Colonne capillaire artisanale SE-30 (50 m x 0,6 mm) Hélium	n.d.	[27]
TDG	Urine (humain)	Conversion en ypérite (HCl concentré, 120°C)	HS (Tenax-TA) ; TCT (CP-Sil 5 CB, 300 mm x 0.5 mm, 5 µm)	75%	Aucun	GC-IE-MS (<i>full scan</i>)	CP-Sil 5 CB (50 m x 0,3 mm, 5 µm) Hélium	LDD : 1 ng.mL ⁻¹ (urine)	[30]
TDG	Urine (humain)	Hydrolyse enzymatique avec β-glucuronidase (T _{amb} , 1h)	Acidification ; dérivation ; centrifugation ; lavage	95%	HFBA (60°C, 1h)	GC-IE-MS (SIM)	DB-5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) Hélium	LDD : 1 ng.mL ⁻¹ (urine)	[31]
TDG	Sang total ou érythrocytes (singe) Plasma (cochon)	PP (acétone pour plasma et 1% HCl pour sang total ou CGR) ; hydrolyse des conjugués ester (NaOH, 70°C, 90 min)	LLE (AcOEt ou acétate de propyle) ; dérivation ; neutralisation de l'agent de dérivation ; SPE (Bon Elut® silice vierge)	n.d.	PFBCI (T _{amb} , 10 min)	GC-NCI(CH ₄)-MS (SIM)	DB-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) Hélium	LDD : 0,16 pg.mL ⁻¹ (HD dans plasma)	[60]
TDG	Plasma (humain)	PP (acétone) ; hydrolyse des conjugués ester (NaOH, 70°C, 2h)	LLE (AcOEt) ; dérivation ; SPE (Bon Elut® silice vierge)	n.d.	PFBCI (T _{amb} , 10 min)	GC-NCI(CH ₄)-MS (SIM)	DB-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) Hélium	LDQ : 0,01 pg.mL ⁻¹ (HD dans plasma)	[61]

Métabolite (suite)	Matrice biologique	Pré-traitement de l'échantillon	Procédure d'extraction et de purification	Rendement d'extraction	Agent de dérivation	Méthode d'analyse	Colonne analytique et gaz vecteur/phase mobile	Sensibilité	Référence
TDG	Sang (humain) Urine (humain)	Urine : hydrolyse acide (37°C, 48h) ou enzymatique (37°C, 24h)	SLE (terre de diatomées, AcOEt) ; SPE (C18 pour sang ou Florisil® pour urine) ; dérivation	50-70% (sang) 60-80% (urine)	PFBCI (T _{amb} , 5 min)	GC-NCI(CH ₄)-MS (SIM)	OV-1701 (25 m x 0,22 mm, 0,25 µm) Hélium	LDD : 1 ng.mL ⁻¹ (sang et urine)	[22]
TDGO seul ou TDG et TDGO	Urine (humain)	Analyse conjointe : réduction en TDG (TiCl ₃ , 75°C 1h ou 40°C 16h)	SLE (terre de diatomées, AcOEt/MeOH (100:7 v/v) pour TDGO seul ou AcOEt pour analyse conjointe) ; SPE (Florisil®) ; dérivation	49% (TDGO seul) 67% (analyse conjointe)	PFBCI (T _{amb} , 2 min)	GC-NCI(CH ₄)-MS (SIM)	OV-1701 (25 m x 0,22 mm, 0,25 µm) ou BP-10 (25 m x 0,22 mm, 0,25 µm) Hélium	LDD : 2 ng.mL ⁻¹ (urine)	[32]
TDG seul ou TDG et TDGO	Urine (lapin)	Analyse conjointe : réduction en TDG (TiCl ₃ , 75°C, 1h) ; neutralisation avec NaOH	SPE (Florisil®) ; dérivation ; lavage avec tampon AcNa ; SPE (Florisil®)	n.d.	PFBCI (50°C, 10 min)	ID-GC-NCI(CH ₄)-MS (SIM)	HP-5MS (25 m x 0,2 mm, 0,33 µm) Hélium	LDD : 0,1 ng.mL ⁻¹ LDQ : 0,3 ng.mL ⁻¹ (urine)	[13]
TDG et TDGO	Urine (humain)	Réduction en TDG (TiCl ₃ , 75°C, 1h) ; hydrolyse acide (37°C, 48h) ou enzymatique (37°C, 24h)	SLE (terre de diatomées, AcOEt) ; SPE (Florisil®) ; dérivation	n.d.	PFBCI (T _{amb} , 5 min)	GC-NCI(CH ₄)-MS/MS (MRM)	BP-10 (25 m x 0,22 mm, 0,25 µm) Hélium	LDD : 0,1 ng.mL ⁻¹ (urine)	[33]
SMO	Plasma (cochon)	Aucun	LLE (CH ₂ Cl ₂)	21%	Aucun	GC-PCI(CH ₄)-MS (SIM)	DB-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) Hydrogène	LDD : 17,4 ng.mL ⁻¹ LDQ : 87 ng.mL ⁻¹ (plasma)	[36]

Métabolite (suite)	Matrice biologique	Pré-traitement de l'échantillon	Procédure d'extraction et de purification	Rendement d'extraction	Agent de dérivation	Méthode d'analyse	Colonne analytique et gaz vecteur/phase mobile	Sensibilité	Référence
TDG seul ou TDG et TDGO	Urine (humain)	Analyse conjointe : réduction en TDG (TiCl ₃ , 75°C, 1h) ; neutralisation (NaOH) Optionnel : hydrolyse enzymatique (37°C, 16h) avec β-glucuronidase	SPE (Oasis® HLB) ; dérivation ; LLE (heptane)	52% (TDG seul) n.d. (analyse conjointe)	HFBI (50°C, 30 min)	GC-PCI(CH ₄)-MS/MS (MRM)	Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 μm) Hélium	LDD : 0,2 ng.mL ⁻¹ (urine)	[14]
TDG et TDGO	Urine (humain)	Hydrolyse enzymatique avec β-glucuronidase (37°C, 1 nuit) : réduction en TDG (TiCl ₃ , 75°C, 1h) ; neutralisation (NaOH)	SPE (Oasis® HLB) ; dérivation ; LLE (CH ₂ Cl ₂)	28%	HFBA (50°C, 30 min)	ID-GC-PCI(isobutane)-MS/MS (MRM)	DB-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 μm) Hélium	LDD : 0,5 ng.mL ⁻¹ (urine)	[20]
TDG et TDGO	Plasma (rat)	PP [ACN-MeOH (4:1, v/v)] ; centrifugation	Aucune	101% (TDG) 118% (TDGO)	Aucun	ID-LC-ESI ⁺ -MS/MS (MRM)	Zorbax-C ₁₈ (100 mm x 3,0 mm, 3,5 μm) NH ₄ HCO ₂ 5 mM et MeOH (gradient)	LDQ : 5 ng.mL ⁻¹ (TDG), 0,5 ng.mL ⁻¹ (TDGO) (plasma)	[40]
TDG	Urine (humain)	Aucun	SPE (charbon actif)	69%	Aucun	LC-ESI ⁻ -MS/MS (MRM)	Zorbax Eclipse Plus C ₁₈ (100 mm x 2,1 mm, 3 μm) H ₂ O/MeOH ; 0,1% AF (gradient)	LDD : 5 ng.mL ⁻¹ (urine)	[38]
SMO et SMO₂	Sang total (rat)	PP (ACN) ; centrifugation	Dérivation ; centrifugation	79% (SMO et SMO ₂)	DSH (80°C, 30 min)	ID-HPLC-ESI ⁻ -MS/MS (MRM)	Capcell Core C ₁₈ (100 mm x 2,1 mm, 2,7 μm) 0,1% AF dans H ₂ O et ACN (gradient)	LDQ : 1 ng.mL ⁻¹ (SMO), 0,2 ng.mL ⁻¹ (SMO ₂) (sang)	[41]

Métabolite (suite)	Matrice biologique	Pré-traitement de l'échantillon	Procédure d'extraction et de purification	Rendement d'extraction	Agent de dérivation	Méthode d'analyse	Colonne analytique et gaz vecteur/phase mobile	Sensibilité	Référence
TDG	Urine (humain)	Dilution (AcNH ₄ 1 M)	SPE (Oasis® HLB)	74%	Aucun	UHPLC-ESI ⁺ -MS/MS (MRM)	Zorbax Eclipse Plus C ₁₈ (150 mm x 2,1 mm, 1,8 µm) MeOH/AcNH ₄ 0,2 mM ; 0,1% AF (gradient)	LDD : 0,25 ng.mL ⁻¹ LDQ : 0,5 ng.mL ⁻¹ (urine)	[39]
TDG, TDGO et SMO	Plasma (rat)	PP [ACN-MeOH (4:1, v/v)] ; centrifugation	Aucune	111% (TDG) 108% (TDGO) 97% (SMO)	Aucun	UHPLC-ESI ⁺ -MS/MS (MRM)	Zorbax Eclipse Plus C ₁₈ (100 mm x 3,0 mm, 1,8 µm) NH ₄ HCO ₂ 5 mM et MeOH (gradient)	LDQ : 5 ng.mL ⁻¹ (TDG), 0,5 ng.mL ⁻¹ (TDGO), 0,05 ng.mL ⁻¹ (SMO) : (plasma)	[15]

ACN : acétonitrile ; **AcNa** : acétate de sodium ; **AcNH₄** : acétate d'ammonium ; **AcOEt** : acétate d'éthyle ; **DSH** : acide 2-(3,5-bis(mercaptométhyl)phénoxy)acétique ; **ESI^{+/+}** : ionisation par électrospray en mode positif/négatif ; **GC** : chromatographie en phase gazeuse ; **HD** : ypérite ; **HFBA** : anhydride heptafluorobutyrique ; **HFBI** : heptafluorobutyrylimidazole ; **HPLC** : chromatographie liquide à haute performance ; **HS** : analyse par espace de tête ; **ID** : dilution isotopique ; **IE** : ionisation électronique ; **LC** : chromatographie en phase liquide ; **LDD** : limite de détection ; **LDQ** : limite de quantification ; **LLE** : extraction liquide/liquide ; **MRM** : suivi de réactions multiples ; **MS** : spectrométrie de masse ; **MS/MS** : spectrométrie de masse en tandem ; **NaHCO₃** : bicarbonate de sodium ; **NCI** : ionisation chimique négative ; **n.d.** : non déterminé ; **PCI** : ionisation chimique positive ; **PFBCI** : chlorure de pentafluorobenzoyle ; **PP** : précipitation de protéines ; **PTA** : thioacétate de potassium ; **rpm** : rotations par minute ; **SIM** : suivi sélectif d'ions ; **SLE** : extraction liquide/liquide assistée sur support solide ; **SMO** : sulfoxyde d'ypérite ; **SMO₂** : sulfone d'ypérite ; **SPE** : extraction sur phase solide ; **T_{amb}** : température ambiante ; **TDG** : thiodiglycol ; **TDGO** : sulfoxyde de thiodiglycol ; **TiCl₃** : trichlorure de titane ; **UHPLC** : chromatographie liquide à ultra haute performance.

I.2.2.1. Analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Dans les années 1980, les premières méthodes d'analyse de biomarqueurs spécifiques à une exposition à l'ypérite présents dans les urines ciblaient l'ypérite non métabolisée ainsi que le TDG [27–30]. Wils *et al.* [27,30] ont ainsi développé des méthodes permettant d'analyser le TDG urinaire, après purification de l'urine par extraction sur phase solide (SPE) avec un support hydrophobe C₁₈, en convertissant le métabolite en ypérite par réaction avec de l'acide chlorhydrique (HCl) concentré à des températures comprises entre 100 et 120°C. Avec ces méthodes, l'espace de tête (« headspace »), correspondant à la phase gazeuse située au-dessus de la solution et contenant l'ypérite, est piégé sur un tube d'adsorption rempli d'une phase Tenax-GC (carbone graphique poreux) ou Tenax-TA (polymère poreux hydrophobe) avant d'être analysé par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), avec une ionisation par impact électronique (IE) et une détection en mode *full scan*, permettant de détecter tous les ions présents dans la gamme de masse m/z 25-500. Si, dans un premier temps, l'analyse semi-quantitative du TDG par étalonnage externe s'est avérée difficile avec une limite de détection (LDD) de quelques ng.mL⁻¹ [27], l'utilisation du TDG deutéré comme étalon interne a permis d'abaisser la LDD d'un facteur 2 [30]. Cependant, cette LDD est limitée par la procédure non optimisée de purification par SPE [30]. En outre, la reproductibilité des analyses quantitatives à ce niveau de concentration est relativement mauvaise [30]. Enfin, cette méthode présente l'inconvénient de ne pas être spécifique au TDG. En effet, d'autres métabolites peuvent être convertis en ypérite lors du traitement avec HCl.

Par la suite, de nombreuses méthodes ont été développées pour l'analyse du TDG et/ou du TDGO dans les urines [14,19,20,22,23,25,31–33]. Ces deux métabolites peuvent être analysés séparément [19,20,22,23,25,31,32] ou conjointement [8,14,19,20,23,25,32,33]. A la fin des années 1980, Black *et al.* [22] ont mis au point une méthode GC-MS avec ionisation chimique en mode négatif (NCI) pour l'analyse du TDG sous forme de son dérivé bis(pentafluorobenzoate) dans les urines, le sang ou le plasma. Après ajout du TDG deutéré comme étalon interne, les composés d'intérêt (TDG et étalon interne) ont été extraits des matrices biologiques avec de l'acétate d'éthyle par extraction liquide/liquide assistée sur support solide (SLE, sur un support terre de diatomées). Les extraits organiques ont ensuite été purifiés par SPE, sur phase de silice greffée C₁₈ pour les échantillons de sang ou de plasma, ou sur support polaire Florisil® (silicate de magnésium) dans le cas des urines. En effet, l'urine contenant de nombreuses molécules polaires, une purification sur phase polaire a été préférée pour une plus forte rétention des composés les plus polaires, qui peuvent ainsi être éliminés. Les extraits obtenus ont été dérivés avec du chlorure de pentafluorobenzoyl (PFBCl) dans de la pyridine. Le dérivé bis(pentafluorobenzoate) du TDG résultant de l'étape de dérivation a été identifié par la

détection de son ion moléculaire M^- (m/z 510) et une LDD de $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ a été atteinte. Un inconvénient majeur de cette méthode réside toutefois dans le fait que la grande majorité du courant ionique est concentrée dans l'ion moléculaire M^- . Si cela permet d'obtenir une très bonne sensibilité, aucune information structurale ne permet en revanche de confirmer l'identité du dérivé. Le même dérivé peut être analysé avec une meilleure sélectivité en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem (GC-MS/MS), ce qui permet d'étudier la fragmentation d'un ion précurseur préalablement sélectionné [33]. Des ions fils (m/z 211 pour $[\text{C}_6\text{F}_5\text{CO}_2]^-$ et m/z 167 pour $[\text{C}_6\text{F}_5]^-$) ont été observés sur les spectres de fragmentation induite par collision (*collision induced dissociation*, CID). Bien que ces ions ne fournissent pas d'information structurale importante, les chromatogrammes obtenus avec une détection en mode *Multiple Reaction Monitoring* (MRM, permettant de suivre des transitions ion précurseur \rightarrow ion fragment spécifiques à un composé d'intérêt) étaient nettement plus « propres » que ceux obtenus en GC-MS. Une LDD théorique de $0,1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ a pu être estimée mais la LDD réelle dans les urines n'a pas pu être déterminée puisque de faibles concentrations de TDG, généralement inférieures à $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, ont été détectées dans des échantillons d'urine non dopées avec le métabolite.

L'utilisation du PFBCl pour la dérivation n'est pas idéale puisqu'elle conduit à une dérivation incomplète : le dérivé obtenu présente un bruit de fond chimique très important et ne peut être sélectivement détecté à l'état de trace qu'en GC-NCI-MS. Par conséquent, à la même époque, Jakubowski *et al.* [31] ont alors proposé une méthode permettant l'analyse du TDG dans les urines sous forme de son dérivé bis(heptafluorobutyryl). Cette procédure comprenait également une étape préalable d'hydrolyse des conjugués glucuronide ou sulfate du TDG avec une enzyme β -glucuronidase, l'hydrolysate étant ensuite évaporé à sec. Le résidu obtenu a ensuite été solubilisé dans de l'acétate d'éthyle et traité avec de l'anhydride heptafluorobutyrique (HFBA). L'anhydride trifluoroacétique (TFA) a également été testé comme agent de dérivation mais les dérivés obtenus étaient moins stables en solution. L'analyse en GC-IE-MS, avec une détection en mode *Single Ion Monitoring* (SIM), du dérivé obtenu avec du HFBA a permis d'obtenir une LDD de $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans les urines de rats. Malgré la faible abondance de l'ion moléculaire du dérivé bis(heptafluorobutyryl) du TDG, et donc une sensibilité plus faible que celle obtenue par Black *et al.* [22], le HFBA est tout de même apparu comme un agent de dérivation de choix pour le TDG. En effet, en plus de conduire à un bruit chimique nettement plus faible que celui observé avec le PFBCl, le dérivé obtenu avec le HFBA génère les ions fragments m/z 300 et m/z 301, apportant des informations structurales importantes. Ces ions, résultant de la perte du groupement $\text{C}_3\text{F}_7\text{CO}_2$, présentent également des abondances relatives élevées (70 et 50%, respectivement). Cette méthode, qui a par la suite été utilisée pour détecter TDG dans les urines de victimes accidentellement exposées à l'ypérite [34], présentent toutefois deux inconvénients majeurs :

la perte potentielle d'analytes lors de l'évaporation à sec de l'urine, mais également les traces résiduelles d'eau pouvant perturber l'étape de dérivation.

Le produit résultant de l'oxydation de TDG, le TDGO, présente deux difficultés principales pour son analyse en GC, la première étant de parvenir à l'isoler de la matrice aqueuse et la seconde étant sa dérivation. En raison de la forte polarisation de la liaison S=O, le TDGO est beaucoup plus polaire ($\log P = -2,48^1$) que le TDG ($\log P = -0,68^1$), ce qui le rend plus difficile à extraire des matrices aqueuses telles que l'urine et à purifier par SPE sur des gels de silice car il y est fortement retenu et son élution requiert l'utilisation de solvants très polaires. A l'inverse, ce composé n'est que très peu retenu sur des supports hydrophobes. De fait, sa concentration autrement que par simple évaporation à sec est très difficile. Une méthode développée par Black et Read [32] a permis d'extraire le TDGO avec un mélange acétate d'éthyle/méthanol (100:7, v/v) après adsorption des urines sur un support de terre de diatomées. Après une étape d'évaporation à sec du solvant pour concentrer les extraits, ces derniers ont été purifiés par SPE sur Florisil® avant d'être dérivés avec PFBCl, comme pour TDG. Il a par ailleurs été observé que le dérivé ainsi formé était le même que celui obtenu avec TDG, autrement dit que la fonction sulfoxyde était réduite lors de la réaction de dérivation. Dans ces conditions, la distinction du TDG et du TDGO autrement que par extraction sélective s'avère donc impossible. En outre, bien que la méthode développée ait permis d'obtenir une LDD théorique similaire à celle obtenue pour le TDG (environ 2 ng.mL^{-1}), de nombreux pics ont été observés sur les chromatogrammes.

La dérivation du TDGO avec différents agents a été étudiée par Black *et al.* [35]. La dérivation de ce métabolite est beaucoup plus compliquée que celle du TDG, à cause de l'oxygène de la fonction sulfoxyde, qui intervient comme un site nucléophile réactionnel supplémentaire. Trois catégories de dérivés peuvent ainsi être obtenues, selon l'agent de dérivation utilisé et les conditions opératoires. Ces dérivés peuvent résulter d'une simple dérivation avec conservation de la fonction sulfoxyde (avec l'heptafluorobutyrylimidazole, HFBI), d'une réduction en un dérivé de TDG correspondant (avec le PFBCl ou le cyanure de triméthylsilyle) ou encore d'un réarrangement de type Pummerer suivi d'une élimination pour former un alcène (avec le HFBA ou l'anhydride trifluoroacétique). Lors de l'analyse de traces, le HFBA et d'autres agents acylants, notamment le HFBI, ont conduit à un bruit chimique bien plus faible que celui obtenu avec le PFBCl, en particulier avec une détection par spectrométrie de masse associée à une ionisation chimique en mode positif (PCI-MS). De plus, le HFBI présente l'avantage de ne pas générer de sous-produits acides et l'excès d'agent de dérivation endommage moins les colonnes GC que le HFBA [14]. Les produits résultant de la réaction du TDGO et du TDG avec le HFBA et le HFBI sont représentés en **Figure 3**. La dérivation du TDGO fait toujours l'objet de

¹ Valeurs de log P obtenues sur chemicalize.com

recherches, afin de déterminer quelle procédure de dérivation est la plus adaptée à l'analyse des métabolites dans les matrices biologiques [35].

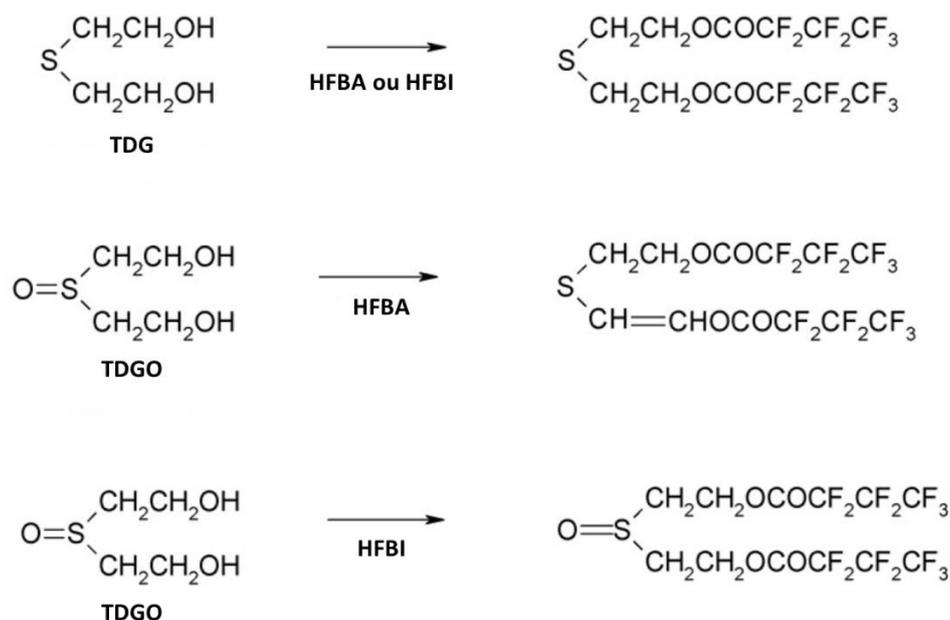


Figure 3. Produits de réaction du TDG et du TDGO avec l'anhydride heptafluorobutyrique (HFBA) ou l'heptafluorobutyrylimidazole (HFBI). Adapté de [14].

Une alternative permettant d'éviter la dérivation du TDGO a été proposée en 1991 [32]. Dans cette méthode, le sulfoxyde est réduit en TDG lors du traitement des urines avec une solution acidifiée de trichlorure de titane (TiCl_3). Les études menées ont révélé que la réduction du TDGO en TDG avec TiCl_3 était quasi-quantitative (conversion supérieure à 98% dans les urines humaines) en moins d'une heure à 75°C ou en 16h à 40°C . A noter que cette étape permet aussi l'analyse de tous les conjugués esters de TDG et TDGO présents dans la matrice. Après un traitement de l'échantillon similaire à celui précédemment décrit pour l'analyse du TDG [22], les composés ont ensuite été analysés en GC-MS sous forme d'un dérivé unique, *i.e.* le dérivé bis(pentafluorobenzoyl) de TDG, avec une LDD atteinte de $2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans les urines. Cette méthode a par la suite été appliquée à l'analyse des urines de deux individus accidentellement exposés à l'ypérite par voie cutanée et des teneurs comprises entre 52 et $80 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ont été détectées pour l'analyse conjointe du TDG et du TDGO [19]. D'autres méthodes d'analyse conjointe du TDG et du TDGO ont également été proposées, avec des LDD équivalentes dans les urines humaines [14,20,32,33]. Boyer *et al.* [20] ont ainsi mis au point une procédure d'analyse de du TDG et du TDGO en GC-PCI-MS/MS. Après ajout de TDG marqué $^{13}\text{C}_4$ dans les urines et incubation avec une enzyme β -glucuronidase pendant 16h à 37°C pour hydrolyser les conjugués esters des métabolites, une solution acide de TiCl_3 a été ajoutée à chaque échantillon et le mélange a été incubé à 75°C pendant 1h. De l'hydroxyde de sodium (NaOH) a été ajouté aux échantillons, qui ont ensuite

été centrifugés. Le surnageant a été purifié par SPE sur une cartouche polymérique Oasis® HLB (copolymère de N-vinylpyrrolidone et de divinylbenzène) et l'éluat obtenu a été évaporé à sec avant d'être solubilisé dans de l'acétonitrile (ACN). Après ajout de HFBA pour l'étape de dérivation du TDG, l'excès d'agent dérivant a été désactivé par ajout d'une solution de pH 10,0. Les échantillons ont ensuite été extraits trois fois avec du dichlorométhane (CH₂Cl₂), évaporés sous flux d'azote et les extraits obtenus ont été repris dans du toluène pour être analysés en GC-MS/MS. La méthode s'est avérée très sensible, avec une LDD de 0,5 ng.mL⁻¹ dans les urines, et a démontré une très bonne répétabilité avec des coefficients de variation (CV) inférieurs à 10%. Bien que la procédure implique un grand nombre d'étapes pour le traitement des échantillons, les auteurs ont démontré que chaque étape était nécessaire pour assurer la fiabilité des résultats.

Plus récemment, en 2007, Riches *et al.* [14] ont proposé une procédure de préparation des échantillons alternative permettant d'analyser simultanément le TDG et son produit d'oxydation, qui a dans un premier temps été réduit en TDG en utilisant TiCl₃. Le TDG a ensuite été extrait des urines par SPE sur support Oasis® HLB. D'autres supports ont été testés pour l'étape de SPE mais une oxydation du TDG en TDGO a pu être observée avec certains supports, notamment les supports à base de charbon actif (jusqu'à 60% dans les cas les plus extrêmes). Aucune oxydation n'a été constatée sur Oasis® HLB et un rendement d'extraction de 52% a été obtenu pour le TDG. Après l'étape de SPE, les extraits ont été évaporés à sec avant d'être solubilisés dans l'ACN, puis le TDG a été converti en son dérivé bis-heptafluorobutyryl avec le HFBI. De l'eau a ensuite été ajoutée afin de désactiver l'agent dérivant, suivi d'une extraction liquide/liquide (LLE) du mélange final avec de l'heptane. Cette étape supplémentaire de purification par LLE a permis d'obtenir des extraits beaucoup plus propres que ceux obtenus avec la méthode précédemment décrite et utilisant une extraction SLE sur terre de diatomées et une dérivation avec le PFBCI [22,32]. L'analyse, effectuée en GC-PCI-MS/MS avec un analyseur de masse de type piège à ions, a permis d'atteindre une LDD de 0,2 ng.mL⁻¹ dans les urines humaines dopées avec le TDG. Cet analyseur permet d'obtenir la haute spécificité et la très bonne sensibilité généralement obtenues en spectrométrie de masse avec un analyseur en tandem, tout en limitant le coût de l'instrumentation. Cette méthode a été utilisée pour analyser des échantillons d'urine de deux individus accidentellement exposés à l'ypérite. Ces échantillons, conservés à -20°C pendant 13 ans et régulièrement soumis à des cycles de congélation/décongélation, ont été analysés à deux occasions et ont montré des concentrations de TDG/TDGO supérieures à celles obtenues trois ans plus tôt avec la méthode initiale [33]. Une hypothèse avancée pour expliquer cette observation est que davantage de TDG/TDGO ont été libérés des macromolécules au cours du stockage des échantillons.

En 2014, Nie *et al.* [21] ont mis au point une nouvelle méthode d'analyse simultanée du TDG et du TDGO dans les urines par GC-NCI-MS, incluant également une étape de réduction avec $TiCl_3$. Après un traitement des échantillons similaire à celui utilisé par Black et Read [22], le produit résultant de la dérivation avec le PFBCI du TDG a été purifié sur une seconde cartouche Florisil® et les éluats obtenus après cette seconde étape de SPE ont ensuite été évaporés à sec avant d'être solubilisés dans du toluène pour pouvoir être injectés en GC. Cette méthode, qui s'est révélée très sensible puisqu'une LDD de $0,1 \text{ ng.mL}^{-1}$ et une limite de quantification (LDQ) de $0,3 \text{ ng.mL}^{-1}$ ont été atteintes dans les urines dopées, a par la suite été appliquée à l'analyse d'échantillons de victimes exposées à l'ypérite [13]. Les deux métabolites ont pu être détectés dans les échantillons d'urine prélevés entre 3 et 7 jours suivant l'exposition, à des concentrations nettement supérieures à la LDQ, probablement dû à l'exposition des victimes à des concentrations d'ypérite très élevées.

Si le **Tableau 1** met principalement en évidence des développements analytiques en GC-MS pour le TDG et le TDGO, quelques études portent sur le suivi du SMO. Ainsi, récemment, Manandhar *et al.* [36] ont proposé une méthode comprenant une étape de traitement des échantillons simplifiée et une analyse directe du SMO dans le plasma par GC-PCI-MS, avec une détection en mode SIM. Cette méthode impliquait l'extraction du SMO du plasma par LLE avec du CH_2Cl_2 , après ajout d'un étalon deutéré. Le mélange résultant a ensuite été centrifugé puis la phase organique a été évaporée et l'extrait repris dans l'ACN pour pouvoir être injecté en GC. Cette méthode présente donc l'avantage d'être simple et très rapide, avec une durée totale d'analyse inférieure à 15 min. Si le SMO a été totalement séparé des autres composés présents dans la matrice biologique, une asymétrie significative a été observée pour le pic chromatographique correspondant, probablement due à des interactions secondaires avec la phase stationnaire.

1.2.2.2. Analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

Si, dans un premier temps, l'analyse quantitative du TDG et du TDGO a principalement été effectuée par GC-MS/MS après une étape de dérivation [14,33,34] car les analyses par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) des composés non dérivés conduisaient à des LDD trop élevées (environ 10 ng.mL^{-1} dans l'eau pure pour le TDGO [37]), de nouvelles méthodes utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), avec des triples quadripôles comme analyseurs en masse, ont récemment été développées pour l'analyse des produits d'hydrolyse de l'ypérite dans les urines [13,38,39], mais aussi dans le plasma [13,15,40]. Li *et al.* [40] ont ainsi développé la première méthode permettant l'analyse individuelle du TDG et du TDGO dans le plasma de rats par LC-MS/MS associée à la dilution isotopique (ID), avec une ionisation par électrospray en mode positif (ESI^+). Cette méthode présente l'avantage de ne comprendre qu'une

étape de centrifugation, suivie de l'élimination des protéines par précipitation en guise de préparation de l'échantillon, et permet en outre l'analyse directe du TDG et du TDGO récupérés dans le surnageant sans dérivation préalable. Des LDQ de 5 et 0,5 ng.mL⁻¹ ont été obtenues dans le plasma pour le TDG et le TDGO, respectivement. Cette méthode a par la suite été utilisée pour l'analyse simultanée de sept métabolites issus de l'hydrolyse et/ou de l'oxydation de l'ypérite, ainsi que de sa réaction avec le glutathion, dans le plasma de rats après une exposition sous-cutanée (dose appliquée : 3,3 mg.kg⁻¹) [15]. Bien que moins sensible que les méthodes GC-MS décrites dans le paragraphe précédent, cette méthode, simple et rapide, a notamment permis de montrer que le TDGO pouvait être utilisé comme potentiel biomarqueur plasmatique d'exposition à l'ypérite dans les premières heures suivant un empoisonnement à l'arme chimique (fenêtre de quantification de 12 heures), tandis que le TDG ne pouvait déjà plus être quantifié 4 heures après l'exposition.

Lee et Lee [38] ont quant à eux mis au point une méthode permettant d'extraire le TDG et les métabolites issus de la réaction de l'ypérite avec le glutathion des urines, en procédant à une SPE sur charbon actif, avant une analyse en LC-ESI⁺-MS/MS. Si l'exactitude et la reproductibilité de cette méthode ont montré que le charbon actif permettait non seulement d'extraire sélectivement les métabolites urinaires de l'ypérite mais également d'éliminer la majorité des interférents sans perte d'analytes lors des étapes de percolation et de lavage, la méthode s'est révélée moins sensible que les méthodes GC-MS développées auparavant pour l'analyse du TDG dans les urines, avec une LDD observée de 5 ng.mL⁻¹ dans les urines dopées. Enfin, très récemment, Liu *et al.* [39] ont développé une méthode LC-ESI⁺-MS/MS permettant l'analyse simultanée de TDG et de métabolites issus de la réaction de l'ypérite avec le glutathion dans les urines. Dans cette méthode, une simple procédure de SPE sur Oasis[®] HLB a été utilisée, après que les urines aient simplement été tamponnées à pH 7,0. Cette étape a permis d'extraire simultanément les quatre métabolites étudiés, avec des rendements d'extraction élevés variant entre 74 et 96%. En plus d'être simple et très efficace, cette étape de SPE ne requiert que 100 µL d'urine et ne dure que 30 min, permettant ainsi de réduire grandement le temps nécessaire au traitement des échantillons. En outre, les éluats obtenus après extraction peuvent être analysés en LC-ESI⁺-MS/MS après évaporation et dilution dans de l'eau acidifiée, sans étape de dérivation. La détection, effectuée en mode MRM, a permis d'atteindre pour le TDG une LDD de 0,25 ng.mL⁻¹ et une LDQ de 0,5 ng.mL⁻¹. Cette méthode, en plus d'être rapide et plutôt sensible, s'est également avérée précise et répétable, avec des CV inférieurs à 11% pour les répétabilités intra- et inter-jour sur des échantillons de contrôle.

Li *et al.* [15] ont pu directement détecter le SMO par analyse LC-ESI⁺-MS/MS d'échantillons de plasma de rats exposés à l'ypérite après précipitation des protéines plasmatiques. En utilisant cette procédure,

Xu *et al.*[13] ont recherché la présence du SMO dans les échantillons d'urine, de plasma et d'exsudat de quatre individus accidentellement exposés à l'ypérite et prélevés entre 3 et 7 jours après l'exposition. Aucune trace de SMO n'a été détectée dans les urines, tandis que de faibles concentrations, comprises entre la LDD ($0,03 \text{ ng.mL}^{-1}$) et la LDQ ($0,05 \text{ ng.mL}^{-1}$), ont été détectées dans les échantillons de plasma. Le SMO a été détecté à des concentrations nettement supérieures à la LDQ dans les exsudats de trois des quatre victimes.

En 2016, Qi *et al.*[41] ont proposé une méthode LC-MS/MS, avec une ionisation par électrospray en mode négatif (ESI⁻), permettant l'analyse simultanée de l'ypérite intacte et de ses produits d'oxydation, le SMO et le SMO₂, dans le sang total, en utilisant une conversion chimique avec l'acide 2-(3,5-bis(mercaptométhyl)phénoxy)acétique (DSH) afin d'obtenir des composés plus stables. En effet, si la méthode précédemment développée a permis d'analyser directement le SMO dans le plasma [15], une détermination directe et précise de l'ypérite intacte avec une telle méthode est impossible, du fait de la très grande réactivité de l'agent chimique. Dans un premier temps, une méthode LC-MS/MS a donc été mise au point, reposant sur la dérivation de l'ypérite avec le thioacétate de potassium (PTA), pour analyser l'agent chimique dans le sang et les tissus adipeux de rats après une exposition cutanée ou intraveineuse [42]. Cette méthode a nécessité un très faible volume d'échantillon ($50 \mu\text{L}$) et comprenait une simple étape de précipitation des protéines sanguines avec l'ACN, suivie d'une centrifugation et d'une dérivation avec le PTA (50°C 30 min) avant injection en LC-MS/MS. Des résultats très satisfaisants ont été obtenus pour l'analyse de l'ypérite (LDD de $0,1 \text{ ng.mL}^{-1}$ dans les tissus adipeux). La détection simultanée dans le sang de l'ypérite, du SMO et du SMO₂ par la méthode de conversion chimique en des dérivés stables a alors été envisagée. Toutefois, l'agent de dérivation utilisé (PTA) n'était pas adapté en raison de sa très faible réactivité vis-à-vis des deux produits d'oxydation. Qi *et al.* [41] ont alors sélectionné un agent de dérivation, le DSH, très réactif vis-à-vis des trois analytes ciblés. Cette méthode, basée sur l'analyse du sang total de rats exposés à l'ypérite de manière cutanée, comprenait un traitement de l'échantillon relativement simple. En effet, après précipitation des protéines sanguines et centrifugation, la dérivation a été réalisée à 80°C pendant 30 min. Le solvant a ensuite été évaporé et le résidu sec a été repris dans un mélange H₂O/ACN pour être analysé en LC-ESI⁻-MS/MS (détection en mode MRM). Grâce à cette méthode, le SMO₂, dont la toxicité est relativement élevée, a été identifié et quantifié *in vivo* pour la première fois, avec une LDQ de $0,2 \text{ ng.mL}^{-1}$ dans le sang total. La méthode s'est aussi révélée sensible pour la détection des dérivés DSH de l'ypérite et du SMO (LDQ de 1 ng.mL^{-1} dans le sang total). En plus d'être sensible, la méthode a également démontré être juste, fidèle et répétable, et elle a permis de déterminer les paramètres toxico-cinétiques des trois analytes étudiés. Ainsi, en traçant l'évolution de la concentration des composés dans le sang en fonction du temps, il est apparu que l'ypérite, le SMO et le SMO₂ apparaissaient très rapidement dans le sang total.

Toutefois, des différences significatives ont pu être observées dans le profil métabolique de l'ypérite et de ses produits d'oxydation. En effet, la concentration de l'ypérite dans le sang total a atteint sa valeur maximale dans les 30 minutes suivant l'exposition des rats à l'arme chimique, avant de diminuer très rapidement et de devenir inférieure à la LDD au bout de 6 heures. En revanche, pour le SMO et le SMO₂, les concentrations maximales ont été atteintes au bout de 3 heures suivant l'exposition cutanée, ce qui suggère que le métabolisme d'oxydation *in vivo* de l'ypérite présente une période de latence. En outre, la concentration très élevée de SMO détectée dans le sang laisse supposer que l'oxydation est une voie métabolique majeure de l'ypérite *in vivo*. Toutefois, bien que cette méthode d'analyse basée sur la conversion chimique de l'ypérite et de ses produits d'oxydation en des dérivés stables fournisse une spécificité chimique totale, elle ne peut pas être appliquée pour analyser des échantillons prélevés plusieurs jours après une exposition supposée à l'ypérite.

Les méthodes développées par Li *et al.*[15] et Qi *et al.*[41] sont les deux seules méthodes reportées dans la littérature pour l'analyse en LC-MS/MS du SMO dans le sang ou le plasma. Ces méthodes nécessitent toutes deux un temps d'analyse supérieur à 1 heure, préparation des échantillons et détection comprises. Cependant, bien que la durée d'analyse soit supérieure à celle de la méthode de Manandhar *et al.* [36], la sensibilité de ces deux méthodes est nettement meilleure que celle obtenue avec la procédure GC-PCI-MS (LDD de 17,4 ng.mL⁻¹ et LDQ de 87 ng.mL⁻¹). Les rendements d'extraction obtenus pour le SMO sont également supérieurs à ceux obtenus par Manandhar *et al.*, qui avaient obtenu des rendements d'extraction de l'ordre de 21% en moyenne [36]. Les faibles rendements obtenus par Manandhar *et al.* peuvent s'expliquer par une extraction incomplète du composé lors de l'étape de LLE qui est très rapide, ou par une perte potentielle de l'analyte lors de l'évaporation à sec.

En conclusion, il apparaît que les méthodes de LC-MS/MS présentent de nombreux avantages comparées aux méthodes de GC-MS/MS pour l'analyse des métabolites de l'ypérite dérivant de son hydrolyse et/ou de son oxydation. En effet, la procédure de traitement des échantillons est grandement facilitée tandis que la sensibilité de la détection est similaire à celle obtenue lors d'une analyse par GC-MS/MS. En outre, les différents métabolites peuvent être ciblés de manière individuelle, ce qui apporte des informations importantes sur leurs quantités respectives dans les matrices biologiques.

I.2.3. Analyse des métabolites issus de la réaction de l'ypérite avec le glutathion

Les principales méthodes décrites dans la littérature pour l'analyse des métabolites résultant de la réaction de l'ypérite avec le glutathion sont détaillées dans les paragraphes suivants et résumées dans le **Tableau 2**.

Tableau 2. Principales méthodes pour l'analyse des métabolites résultant de la réaction de l'ypérite avec le glutathion dans les matrices biologiques.

Métabolite(s)	Matrice biologique	Pré-traitement de l'échantillon	Procédure d'extraction et de purification	Rendement d'extraction	Méthode d'analyse	Colonne analytique et gaz vecteur/phase mobile	Sensibilité	Référence
MSMTESE et SBMSE	Urine (lapin)	Réduction en SBMTE (TiCl ₃ , 75°C, 1h)	SPE (Oasis® HLB)	65-75%	GC-IE-MS/MS (MRM)	DB-17MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) Hélium	LDD : 0,02 ng.mL ⁻¹ LDQ : 0,1 ng.mL ⁻¹ (urine)	[47]
MSMTESE et SBMSE	Urine (rat)	Réduction en SBMTE (TiCl ₃ , 40°C, 16h)	Méthode A : SPE (Bond Elut® C ₈) Méthode B : SLE (terre de diatomées, CH ₂ Cl ₂ /n-hexane (40:60, v/v) ; SPE (Bond Elut® silice vierge)	88% (méthode A) 95% (méthode B)	GC-PCI(NH ₃)-MS (SIM)	BP-10 (25 m x 0,22 mm, 0,25 µm) Hélium	LDD : 2 ng.mL ⁻¹ (urine)	[43]
MSMTESE et SBMSE	Urine (humain)	Réduction en SBMTE (TiCl ₃ , 75°C, 1h)	SPE (C ₈)	51%	GC-PCI(NH ₃)-MS/MS (MRM)	BP-10 (25 m x 0,22 mm, 0,25 µm) Hélium	LDD : 0,1 ng.mL ⁻¹ (urine)	[33]
MSMTESE et SBMSE	Urine (humain)	Réduction en SBMTE (TiCl ₃ , 75°C, 1h) ; neutralisation (NaOH)	SPE (Oasis® HLB) ; LLE (CH ₂ Cl ₂)	46%	ID-GC-PCI(iso-butane)-MS/MS (MRM)	DB-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) Hélium	LDD : 0,25 ng.mL ⁻¹ (urine)	[20]
MSMTESE et SBMSE	Urine (humain)	Réduction en SBMTE (TiCl ₃ , 75°C, 1h) ; neutralisation (NaOH)	SLE (terre de diatomées, CH ₂ Cl ₂ /ACN (60:40, v/v)	18-38%	GC-PCI(iso-butane)-MS/MS (MRM)	DB-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) Hélium	LDD : 0,038 ng.mL ⁻¹ LDQ : 0,126 ng.mL ⁻¹ (urine)	[45]
MSMTESE et SBMSE	Urine (humain)	Réduction en SBMTE (TiCl ₃ , 75°C, 1h) ; neutralisation (KOH)	SPE (Strata® C ₁₈ -E) ; SPE (Strata® silice greffée NH ₂)	83-86%	ID-LC-ESI ⁺ -MS/MS (MRM)	Luna C ₁₈ (150 mm x 2,0 mm, 5 µm) NH ₄ HCO ₂ 2 mM/MeOH (60:40, v/v) (isocratique)	LDD : 0,02 ng.mL ⁻¹ LDQ : 0,08 ng.mL ⁻¹ (urine)	[48]

Métabolite(s) (suite)	Matrice biologique	Pré-traitement de l'échantillon	Procédure d'extraction et de purification	Rendement d'extraction	Méthode d'analyse	Colonne analytique et gaz vecteur/phase mobile	Sensibilité	Référence
MSMTESE et SBMSE	Urine (humain)	Réduction en SBMTE (TiCl ₃ , 80°C, 40 min) ; neutralisation avec H ₂ O et DMSO	SPE (C ₈) ; filtration (polytétra- fluoroéthylène)	n.d.	LC-ESI- MS/MS (MRM)	Kinetex C ₁₈ (50 mm x 2,1 mm, 2,6 µm) NH ₄ HCO ₂ 2,8 mM dans H ₂ O et 0,1% acide acétique dans MeOH (gradient)	LDQ : 0,1 ng.mL ⁻¹ (urine)	[49]
MSMTESE et SBMSE	Urine (humain)	Aucun	SPE (Isolute® ENV+)	88% (MSMTESE) 102% (SBMSE)	LC-ESI- MS/MS (MRM)	Hypercarb (150 mm x 2,1 mm, 5 µm) H ₂ O/MeOH ; NH ₄ HCO ₂ 20 mM (gradient)	LDD : 0,1 ng.mL ⁻¹ (MSMTESE), 0,5 ng.mL ⁻¹ (SBMSE) (urine)	[50]
MSMTESE, SBMSE et SBSNAE	Urine (humain)	Aucun	SPE (charbon actif)	90% (MSMTESE) 81% (SBMSE) 88% (SBSNAE)	LC-ESI- MS/MS (MRM)	Zorbax Eclipse Plus C ₁₈ (100 mm x 2,1 mm, 3 µm) H ₂ O/MeOH ; 0,1% AF (gradient)	LDD : 1 ng.mL ⁻¹ (MSMTESE, SBMSE et SBSNAE) (urine)	[38]
SBSNAE	Urine (rat) Plasma (humain)	Urine : acidification (acide acétique) Plasma : PP (HCl) ; centrifugation	SPE (Strata® C ₁₈ -E)	99% (urine) n.d. (plasma)	LC-ESI- MS/MS (MRM)	Synergi Polar RP (250 mm x 2 mm, 4 µm) H ₂ O/ACN ; AcNH ₄ 20 mM (gradient)	LDD : 0,05 ng.mL ⁻¹ (urine et plasma)	[55]
SBSNAE	Urine (humain)	Acidification (TFA 10%)	SPE (Oasis® HLB) ou SPE (SAX Bond Elut®)	50% (Oasis® HLB) 100% (SAX Bond Elut®)	LC-ESI- MS/MS (MRM)	Hamilton PRP-1 (150 mm x 2,0 mm, 3 µm) H ₂ O/ACN ; 0,05% AF (gradient)	LDQ : 0,5-1 ng.mL ⁻¹ (urine)	[53]
MSMTESE et SBMSE	Urine (humain)	Aucun	SPE (Isolute® ENV+)	107% (MSMTESE) 105% (SBMSE)	ID-LC-ESI- MS/MS (MRM)	Xbridge C ₁₈ (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) H ₂ O/ MeOH (75:25, v/v) ; 0,1% AF (isocratique)	LDD : 4 ng.mL ⁻¹ (MSMTESE et SBMSE) LDQ : 11 ng.mL ⁻¹ (MSMTESE), 10 ng.mL ⁻¹ (SBMSE) (urine)	[51]

Métabolite(s) (suite)	Matrice biologique	Pré-traitement de l'échantillon	Procédure d'extraction et de purification	Rendement d'extraction	Méthode d'analyse	Colonne analytique et gaz vecteur/phase mobile	Sensibilité	Référence
MSMTESE et SBMSE	Urine (humain)	Oxydation en SBMSE (H ₂ O ₂ , T _{amb} , 15 min)	SPE (Strata® X) ; SPE (Isolute® ENV+)	40%	ID-HPLC- ESI ⁺ -MS/MS (MRM)	Kinetex HILIC (50 mm x 2,1 mm, 1,7 µm) NH ₄ HCO ₂ 5 mM dans H ₂ O et 0,1% AF dans ACN (gradient)	LDD: 0,03 ng.mL ⁻¹ (urine)	[52]
MSMTESE, SBMSE et SBSNAE	Urine (humain)	Dilution (AcNH ₄ 1 M)	SPE (Oasis® HLB)	77% (MSMTESE) 96% (SBMSE) 88% (SBSNAE)	UHPLC-ESI ⁺ - MS/MS (MRM)	Zorbax Eclipse Plus C ₁₈ (150 mm x 2,1 mm, 1,8 µm) MeOH/AcNH ₄ 0,2 mM ; 0,1% AF (gradient)	LDD : 0,25 ng.mL ⁻¹ (SBSNAE), 0,01 ng.mL ⁻¹ (MSMTESE et SBMSE) ; LDQ : 0,5 ng.mL ⁻¹ (SBSNAE), 0,05 ng.mL ⁻¹ (MSMTESE et SBMSE) (urine)	[39]
MSMTESE, SBMSE, SBSNAE et SBMTE	Plasma (rat)	PP [ACN-MeOH (4:1, v/v)] ; centrifugation	Aucune	111% (MSMTESE) 92% (SBMSE) 107% (SBSNAE) 97% (SBMTE)	UHPLC-ESI ⁺ - MS/MS (MRM)	Zorbax Eclipse Plus C ₁₈ (150 mm x 2,1 mm, 1,8 µm) MeOH/NH ₄ HCO ₂ 5 mM (gradient)	LDQ : 0,01 ng.mL ⁻¹ (MSMTESE et SBMSE), 1 ng.mL ⁻¹ (SBSNAE), 0,05 ng.mL ⁻¹ (SBMTE) (urine)	[15]

ACN : acétonitrile ; **AcNa** : acétate de sodium ; **AcOEt** : acétate d'éthyle ; **CH₂Cl₂** : dichlorométhane ; **DMSO** : diméthylsulfoxyde ; **ESI^{+/−}** : ionisation par électrospray en mode positif/négatif ; **GC** : chromatographie en phase gazeuse ; **GSH** : glutathion ; **H₂O₂** : peroxyde d'hydrogène ; **HPLC** : chromatographie liquide à haute performance ; **IE** : ionisation électronique ; **ID** : dilution isotopique ; **LC** : chromatographie en phase liquide ; **LDD** : limite de détection ; **LDQ** : limite de quantification ; **MRM** : suivi de réactions multiples ; **MS** : spectrométrie de masse ; **MS/MS** : spectrométrie de masse en tandem ; **MSMTESE** : 1-méthylsulfinyl-2-[2-(méthylthio)éthylsulfonyl]éthane ; **PCI** : ionisation chimique positive ; **PP** : précipitation de protéines ; **rpm** : rotations par minute ; **SBMSE** : 1,1'-sulfonylbis[2-(méthylsulfinyl)éthane] ; **SBMTE** : 1,1'-sulfonylbis[2-(méthylthio)éthane] ; **SBSNAE** : 1,1'-sulfonylbis[2-S-(N-acétylcystéinyl)éthane] ; **SIM** : suivi sélectif d'ions ; **SLE** : extraction liquide/liquide assistée sur support solide ; **SPE** : extraction sur phase solide ; **T_{amb}** : température ambiante ; **TiCl₃** : trichlorure de titane ; **UHPLC** : chromatographie liquide à ultra haute performance.

I.2.3.1. Analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Les métabolites β -lyase MSMTESE et SBMSE présentent de mauvaises propriétés GC qui induisent une traînée importante des pics chromatographiques [38]. Un problème supplémentaire avec ces métabolites repose dans la possible élimination thermique du groupement CH_3SOH pour donner un alcène $-\text{SO}_2\text{CH}=\text{CH}_2$. Ce processus est observé sur les spectres de masse des deux métabolites. De fait, de manière analogue à la conversion du TDGO en TDG, une réduction de ces deux métabolites avec TiCl_3 est indispensable avant leur analyse en GC-MS, de manière à convertir les groupements sulfoxydes en sulfides. Cette réduction augmente la stabilité thermique et permet l'analyse conjointe des deux métabolites sous la forme d'un analyte moins polaire unique, le 1,1'-sulfonylbis[2-(méthylthio)éthane] (SBMTE), après une étape d'extraction par SPE ou SLE. Une LDD élevée de l'ordre de 2 ng.mL^{-1} a été atteinte dans les urines avec les deux méthodes d'extraction [43]. En effet, des problèmes de spécificité ont été observés pour ces métabolites β -lyase lors de l'analyse en GC-MS, ce qui limite fortement les LDD pouvant être obtenues. L'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) a permis de s'affranchir de ces limitations : la meilleure spécificité a permis d'atteindre une LDD de $0,1 \text{ ng.mL}^{-1}$ dans les urines [33]. L'analyse en GC-MS/MS d'échantillons d'urine de deux individus accidentellement exposés à l'ypérite a permis de détecter le SBMTE à des concentrations de 42 à 56 ng.mL^{-1} [44]. Young *et al.* [45] ont par la suite atteint une LDD nettement inférieure dans les urines ($0,038 \text{ ng.mL}^{-1}$), en proposant une nouvelle méthode d'analyse du SBMTE en GC-MS/MS basée sur une quantification par dilution isotopique. Cette méthode, sensible, rapide et sélective, a nécessité une simple étape d'extraction par SLE en solvant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{ACN}$ (3:2, v/v) assistée sur terre de diatomées, après ajout de l'étalon interne $^{13}\text{C}_4$ -SBMTE aux urines et réduction de MSMTESE et SBMSE en SBMTE avec TiCl_3 . Les faibles rendements d'extraction obtenus, variant de 18 à 38% selon la concentration en SBMTE dans les échantillons dopés, ont été considérés comme un compromis acceptable entre l'extraction des composés et leur purification, compte tenu de la grande polarité de ces composés difficiles à extraire des milieux aqueux. De plus, en utilisant $^{13}\text{C}_4$ -SBMTE comme étalon interne, dont le comportement est jugé similaire à celui de l'analyte étudié, l'exactitude de la quantification n'a pas été affectée par ces faibles rendements d'extraction. Cette méthode a par la suite été utilisée pour analyser les urines de deux victimes exposées à l'ypérite [8]. Les métabolites β -lyase ont pu être détectés dans ces échantillons jusqu'à 11 jours après l'exposition à l'arme chimique, à des concentrations variant entre 0,02 et 41 ng.mL^{-1} .

Il est important de noter que, comme pour les produits d'hydrolyse et/ou d'oxydation, l'utilisation de TiCl_3 pour réduire les fonctions sulfoxydes permet de développer des procédures pour l'analyse conjointe des composés résultant de l'hydrolyse et/ou de l'oxydation de l'ypérite et des métabolites

β -lyase dans les urines [46]. Ainsi, Boyer *et al.* [20] ont mis au point une méthode GC-MS/MS permettant l'analyse simultanée des métabolites β -lyase sous forme de SBMTE et des produits d'hydrolyse sous forme de TDG. La sensibilité de cette méthode vis-à-vis du SBMTE était cependant nettement moins bonne que celles obtenue par Black *et al.* [33] ou Young *et al.* [45], puisque la LDD obtenue n'était que de 0,5 ng.mL⁻¹ dans les urines. En outre, l'analyse simultanée du TDG et du SBMTE implique un traitement de l'échantillon long et laborieux puisque des étapes supplémentaires d'hydrolyse enzymatique et de dérivation chimique doivent être réalisées afin de pouvoir détecter le TDG sous ses formes libre et conjuguée en GC-MS/MS.

Très récemment, Lin *et al.* [47] ont atteint une LDD de 0,02 ng.mL⁻¹ pour l'analyse conjointe en GC-MS/MS du MSMTESE et du SBMSE sous forme de SBMTE, dans les urines de lapins exposés de manière cutanée à l'ypérite. Cette méthode très sensible comprenait un traitement de l'échantillon proche de celui mis en œuvre par Boyer *et al.* [20], si ce n'est que le 1,1'-sulfonylbis[2-(éthylthio)éthane] (SBETE), analogue du SBMTE, a été utilisé comme étalon interne à la place du ¹³C-SBMTE et que la procédure d'extraction des adduits ne comprenait qu'une seule étape de SPE. Tout comme dans la méthode décrite par Boyer *et al.* [20], du NaOH a été ajouté aux échantillons d'urine après l'étape de réduction, de manière à neutraliser l'excès de TiCl₃ en formant un précipité blanc qui a été éliminé par centrifugation. Des expériences préliminaires avaient montré que l'extraction directe du SBMTE à partir de la suspension avec le précipité conduisait à de meilleurs rendements de récupération de l'analyte (>90%) mais cela résultait également en un bruit de fond important sur les chromatogrammes. De fait, une étape supplémentaire de purification des échantillons s'est avérée nécessaire et un compromis entre la récupération du SBMTE et sa purification pour atteindre une meilleure sensibilité de détection a dû être fait. La SPE sur Oasis[®] HLB ayant conduit à de meilleurs rendements d'extraction (rendement moyen de 70%) et à des extraits plus propres qu'une procédure de purification par SLE sur terre de diatomées, ce mode d'extraction a été donc utilisé par Lin *et al.* [47] pour l'étape de préparation des échantillons. Il est également important de noter que les rendements d'extraction sont fortement impactés par la quantité de NaOH ajoutée aux échantillons pour neutraliser l'excès de TiCl₃. Les études ont montré que les rendements étaient stables pour un pH de la solution résultante compris entre 7 et 12. Les rendements d'extraction diminuaient si un trop grand volume de NaOH était ajouté aux échantillons. Enfin, l'étude de Lin *et al.* [47] a montré que, en accord avec les résultats observés chez le rat [23], l'élimination des métabolites β -lyase dans les urines était aussi très rapide chez le lapin. Plus de 99% de la quantité total de métabolites β -lyase a ainsi été excrétées dans les urines au cours de la première semaine suivant l'exposition cutanée des lapins à l'ypérite. Cependant, bien que la concentration des métabolites β -lyase a diminué très rapidement dans les premiers jours, la méthode développée était suffisamment sensible pour permettre la

détection des métabolites dans les urines jusqu'à 4 semaines après l'exposition des lapins à l'ypérite. Cette méthode a par la suite été utilisée par Xu *et al.* [13] pour analyser les urines de quatre hommes accidentellement exposés à l'ypérite et le SBMTE a été détecté dans tous les échantillons jusqu'à 7 jours après l'exposition.

I.2.3.2. Analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

Bien que moins courante, l'analyse conjointe du MSMTESE et du SBMSE peut également être réalisée en LC-MS/MS. Ainsi, Daly *et al.* [48] ont proposé une méthode employant deux étapes de SPE pour l'extraction du SBMTE après ajout de $^{13}\text{C}_4$ -SBMTE aux urines comme étalon interne et traitement des échantillons avec TiCl_3 : une première extraction a été réalisée sur une phase de silice greffée C_{18} et la deuxième a été faite sur une phase greffée amine. Les rendements d'extraction obtenus pour le SBMTE variaient entre 83 et 86% et étaient donc nettement supérieurs à ceux obtenus par Young *et al.*, pour qui les rendements d'extraction étaient compris entre 18 et 38% après une simple étape de SLE [45]. Cette méthode, robuste et sélective, s'est également avérée plus sensible que la méthode développée par Young *et al.* [45]. En effet, l'analyse, réalisée par LC-ESI⁺-MS/MS avec une détection en mode MRM, a conduit à une LDD de $0,02 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ et une LDQ de $0,08 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans les urines dopées. En outre, grâce à l'automatisation des étapes de SPE et à la rapidité des analyses effectuées en LC-MS/MS (7,5 min par échantillon), il est possible d'analyser jusqu'à 200 échantillons d'urines en 24h avec cette méthode, ce qui en fait une méthode d'analyse de choix lors d'une potentielle exposition en masse des populations à l'ypérite. Plus récemment, Reddy *et al.* [49] ont optimisé cette méthode, de manière à réduire le temps d'analyse mais également la quantité de consommables en ayant recours à l'utilisation de plaques 96 puits et moins d'étapes manuelles, tout en conservant une sensibilité similaire à celle obtenue par Daly *et al.* [48], avec une LDQ de l'ordre de $0,1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans les urines dopées.

L'analyse conjointe des métabolites β -lyase sous la forme unique de SBMTE ne permet toutefois pas d'avoir une idée des quantités relatives de MSMTESE et de SBMSE dans les urines [43]. Afin de remédier à ce problème, le MSMTESE et le SBMSE peuvent également être analysés individuellement, sans réduction préalable, par LC-MS/MS. De nombreuses méthodes LC-MS/MS, avec des procédures de préparation des échantillons grandement simplifiées par rapport aux méthodes d'analyse conjointe en GC-MS/MS, ont donc été développées. Read et Black [50] ont ainsi proposé une méthode basée sur l'extraction des deux métabolites des urines par SPE sur un support polymérique Isolute[®] ENV+ (copolymère polystyrène hydroxylé/divinylbenzène). Des rendements d'extraction très satisfaisants ont été obtenus pour les deux métabolites (88% pour le MSMTESE et 102% pour le SBMSE). Cependant, une légère oxydation (environ 10%) de MSMTESE en SBMSE a également été observée et attribuée à l'étape d'extraction sur la cartouche Isolute[®] ENV+. L'ajout de dithiothréitol (DDT) lors du

conditionnement de la cartouche a permis de réduire cette oxydation. L'analyse des métabolites par LC-ESI⁺-MS/MS, avec une détection en mode MRM, a conduit à des LDD de 0,1 ng.mL⁻¹ et 0,5 ng.mL⁻¹ dans les urines dopées pour le MSMTESE et le SBMSE, respectivement. Si la sensibilité de cette méthode est similaire à celle obtenue en GC-MS/MS, la procédure de traitement des échantillons est cependant beaucoup plus rapide. Cette méthode a été utilisée pour analyser les urines de deux personnes exposées à l'ypérite. Ces échantillons ont été analysés après avoir été conservés à -20°C pendant 12 ans. Les concentrations mesurées dans les urines, proches de 15 ng.mL⁻¹ pour le MSMTESE et de 30 ng.mL⁻¹ pour le SBMSE, étaient similaires à celles déterminées 9 ans auparavant lors de l'analyse conjointe en GC-MS/MS des deux métabolites sous forme de SBMTE [33,44], ce qui suggère qu'aucune dégradation des métabolites n'a eu lieu lors du stockage des échantillons biologiques. Halme *et al.* [51] ont modifié la méthode décrite ci-dessus, de manière à réduire les temps d'analyse, en appliquant un débit 5 fois plus élevé leur permettant de traiter jusqu'à 200 échantillons par jour, soit une cadence similaire à celle mentionnée par Young *et al.* [45].

Très récemment, Bevan *et al.* [52] ont proposé une méthode d'analyse conjointe des métabolites β -lyase en LC-MS/MS, basée sur leur conversion en SBMSE par oxydation avec le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Cette oxydation en SBMSE est plus rapide et plus simple que la réduction avec TiCl₃, puisque qu'elle requiert simplement une oxydation à température ambiante pendant 15 min. En outre, H₂O₂ n'est pas corrosif à la différence de TiCl₃ et ne nécessite pas de neutralisation du pH avant l'étape de SPE. Le produit d'oxydation (SBMSE) est également plus stable que le produit de réduction (SBMTE), puisqu'il est apparu que le SBMTE et le MSMTESE s'oxydaient tous deux lors de la préparation des échantillons et lors de leur stockage. Dans cette méthode, l'oxydation a été suivie d'une double étape d'extraction SPE : la première sur un support polymérique Strata X (copolymère de N-vinylpyrrolidone et de vinylbenzène), puis une purification de l'éluat sur un support Isolute[®] ENV+. Le taux de récupération du SBMSE pour l'ensemble de la procédure de traitement de l'échantillon était d'approximativement 40%, avec des CV inférieurs à 10%. La majeure partie de la perte d'analyte a eu lieu pendant la première étape de SPE (environ 60% de rendement d'extraction), qui avait pour objectif principal d'éliminer les interférents présents dans la matrice biologique. Malgré les faibles rendements obtenus, cette méthode s'est avérée très sensible puisqu'une LDD de 0,03 ng.mL⁻¹ dans les urines dopées a pu être atteinte. De même, la méthode a été conçue pour être utilisée au format de plaques 96 puits et peut utiliser la SPE automatisée pour une préparation des échantillons rapide et efficace. En outre, avec des temps d'analyse globale de 2 min par échantillon, cette méthode a le potentiel de pouvoir analyser 650 échantillons par jour selon les auteurs, ce qui fait d'elle la méthode la plus rapide ayant été développée jusqu'à présent pour l'analyse des métabolites β -lyase dans les urines.

Qui plus est, Li *et al.* [15] ont montré que le MSMTESE et le SBMSE pouvaient également être utilisés comme biomarqueurs plasmatiques. En effet, après une simple précipitation des protéines et une étape de centrifugation, ces deux analytes ont pu être détectés et quantifiés par LC-MS/MS dans le plasma jusqu'à 48 heures après l'exposition sous-cutanée de rats à l'ypérite. Une LDQ de 0,01 ng.mL⁻¹ a été atteinte pour les deux métabolites dans des échantillons de plasma dopés. Cette méthode a ensuite été mise en application par Xu *et al.* [13] lors de l'analyse des urines, du sang et des exsudats de quatre victimes exposées à l'ypérite. Le MSMTESE et le SBMSE ont tous deux été détectés dans les échantillons biologiques prélevés jusqu'à 7 jours après l'exposition à l'arme chimique. Cette fenêtre de détection était similaire à celle de la détection du SBMTE dans les urines des victimes par GC-MS/MS [13].

Un troisième biomarqueur présent dans les urines et dérivé de la réaction de l'ypérite avec le glutathion est le SBSNAE. Dans un premier temps, Black et Read [44] ont tenté d'analyser ce métabolite en GC-MS. Cependant, du fait de son instabilité thermique, le SBSNAE n'a pas pu être analysé en GC-MS, même après une étape de dérivation. Une méthode de LC-MS/MS, basée sur la dérivation préalable du métabolite en son dérivé ester bis-méthyl avec le diazométhane, a alors été mise au point mais sa sensibilité étant très limitée (LDD de 25 ng.mL⁻¹ dans les urines dopées), elle n'a de fait pas permis de détecter le SBSNAE dans les urines de personnes exposées à l'ypérite. En utilisant la SPE avec un support Oasis[®] HLB pour purifier les échantillons et concentrer l'analyte, suivie d'une analyse LC-ESI⁻MS/MS avec détection en mode MRM, Read et Black [53] ont pu atteindre une LDD dans les urines dopées de 0,5 ng.mL⁻¹ pour le SBSNAE, et ont été les premiers à identifier ce métabolite dans les urines de deux individus accidentellement exposés à l'ypérite. Une procédure alternative avait également été considérée, en procédant par SPE sur support échangeur d'ions de type fort SAX. Des rendements d'extraction bien supérieurs ont été obtenus avec ce support (proche de 100% contre 50% pour le support Oasis[®] HLB) mais un bruit de fond chimique plus important a été observé sur les chromatogrammes. Bien que le SBSNAE soit un métabolite majeur chez le rat [54], les concentrations détectées dans les urines des deux victimes étaient cependant très proches de la LDD et bien inférieures à celles observées pour les métabolites β -lyase SMSTESE et SMBSE. De fait, le SBSNAE est apparu comme un métabolite très minoritaire chez l'Homme après une exposition à l'ypérite. Cependant, il est important de noter qu'une dégradation de l'analyte n'était pas impossible, du fait de la conservation prolongée des échantillons d'urine (10-11 ans avec des cycles congélation/décongélation répétés pour la recherche d'autres métabolites urinaires). Barr *et al.* [8] ont repris la méthode de Read et Black [53] pour analyser les urines de deux individus accidentellement exposés à l'ypérite après la destruction d'une zone de munitions datant de la Première Guerre Mondiale et ont confirmé que le SBSNAE était un métabolite très minoritaire chez l'Homme puisque

ce métabolite n'a été détecté à une concentration de 3,1 ng.mL⁻¹ que chez une des deux victimes dans les deux jours suivant leur empoisonnement.

Rodin *et al.* [55] ont pu atteindre une LDD de 0,05 ng.mL⁻¹ pour le SBSNAE dans les urines dopées en développant une méthode de LC-ESI-MS/MS ciblant le métabolite dans les urines de rats ayant été exposés à l'ypérite par voie intraveineuse. Cette méthode reposait sur une simple étape de SPE sur support C₁₈ (Strata C₁₈-E) pour extraire le SBSNAE des échantillons. Comme la polarité élevée du SBSNAE (log P = -2,51²) et sa présence sous forme ionisée dans les urines (pK_{a1} = 3,14² et pK_{a2} = 3,74²) empêchent le métabolite d'être retenu sur la phase stationnaire, l'étape de SPE est utilisée pour éliminer les composés hydrophobes interférents présents dans la matrice. Ces derniers sont en effet retenus par la phase stationnaire tandis que le SBSNAE se retrouve dans le percolat. L'analyse en LC-ESI-MS/MS des percolats récupérés à l'issue de l'étape de SPE a permis de détecter le métabolite dans les urines de rats jusqu'à 22 jours suivant leur exposition intraveineuse à l'ypérite. Cette méthode n'a toutefois pas été employée pour analyser les urines de personnes exposées, accidentellement ou volontairement, à l'arme chimique.

En 2015, Lee et Lee [38] ont montré qu'il était possible d'extraire simultanément des urines les métabolites issus de la réaction de l'ypérite avec le glutathion et le TDG, par une simple étape de SPE sur charbon actif et ce, sans perte d'analytes lors des étapes de percolation et de lavage. L'analyse en LC-ESI⁺-MS/MS avec une détection en mode MRM, effectuée après cette procédure d'extraction, a permis d'obtenir une LDD de 1 ng.mL⁻¹ pour les deux métabolites β-lyase dans les urines dopées. Avec une ionisation par électrospray en mode négatif, le SBSNAE a également pu être détecté avec la même sensibilité.

Enfin, Liu *et al.* [39] ont pour la première fois développé une méthode de SPE rapide et simple sur Oasis[®] HLB (déjà utilisé pour extraire le SBSNAE des urines acidifiées [53] et le TDG des urines non modifiées [14,20]) pour l'extraction simultanée de quatre métabolites de l'ypérite, issus de son hydrolyse (TDG) ou de sa réaction avec le glutathion (MSMTESE, SBMSE, SBSNAE). Dans leur étude, Liu *et al.* [39] ont tenté de retenir simultanément les quatre métabolites de l'ypérite à partir de 100 µL d'urine préalablement acidifiée à pH 2,0 avec de l'acide formique. Si les résultats ont montré que la rétention simultanée des quatre métabolites était possible et que les rendements d'extraction étaient supérieurs à 80% pour tous les analytes, une légère oxydation de MSMTESE en SBMSE, estimée à environ 5%, a également été observée. Cette oxydation a été réduite à 2% en utilisant un tampon

² Valeurs de log P et de pK_a obtenues avec chemicalize.com

acétate d'ammonium (1 mol.L^{-1}) qui a par la suite été utilisé pour fixer le pH des échantillons d'urine (pH 7,0). L'étape de lavage a également été réalisée avec ce tampon.

Le SBSNAE a également été analysé par LC-ESI⁺-MS/MS, après une simple étape de précipitation des protéines, dans le plasma de rats exposés à l'ypérite. Toutefois, du fait de la LDQ relativement élevée (1 ng.mL^{-1} dans les urines dopées), la fenêtre de temps pour la quantification du métabolite était uniquement de 2 à 8 heures suivant l'injection sous-cutanée de l'ypérite [15]. Cette méthode a également été appliquée pour l'analyse des urines, du sang et des exsudats d'individus exposés à l'ypérite mais le SBSNAE n'a été détecté dans aucun des échantillons prélevés entre 1 et 7 jours après l'empoisonnement, probablement à cause de la fenêtre de détection trop étroite [13].

1.2.4. Limitations de l'utilisation des produits d'hydrolyse/oxydation et des métabolites β -lyase comme biomarqueurs d'exposition à l'ypérite

Les métabolites urinaires et plasmatiques, qu'ils soient issus de l'hydrolyse de l'ypérite ou de sa réaction avec le glutathion, ne sont pas des indicateurs biologiques d'exposition idéaux. En effet, en comparant les concentrations du TDG mesurées dans les urines d'individus exposés et non exposés à l'ypérite, un recouvrement important des concentrations a été observé puisque 24% des échantillons d'urines appartenant à des personnes exposées à l'ypérite présentaient des concentrations inférieures à 25 ng.mL^{-1} , autrement dit dans la gamme de concentrations observées chez les individus non exposés [27,30]. De même, le TDG et le TDGO ont été détectés dans le plasma de rats non exposés à l'ypérite, à des concentrations variant respectivement entre 3 et 10 ng.mL^{-1} et entre 0,2 et $0,8 \text{ ng.mL}^{-1}$ [15]. Ceci suggère que ces métabolites peuvent être issus d'autres sources, qui sont pour le moment encore inconnues, mais qui peuvent être liées à une exposition environnementale ou alimentaire au TDG ou à un composé pouvant être métabolisé en TDG et TDGO. Par conséquent, la présence du TDG et du TDGO dans les urines ou le plasma ne constitue pas une preuve irréfutable d'exposition à l'ypérite mais peut aider à confirmer une potentielle exposition lorsque d'autres métabolites sont également détectés. Contrairement au TDG et au TDGO, aucune trace de SMO n'a été détectée dans le plasma ou les urines de rats et de personnes non exposés à l'ypérite [53]. De la même manière, un des avantages non négligeables des métabolites β -lyase est le fait qu'aucune trace de MSMTESE et de SMBSE n'a été retrouvée dans les échantillons d'urine de contrôle [20,39,43,45,54]. De fait, la présence de ces métabolites dans les urines de victimes peut servir de preuve irréfutable d'une exposition à l'ypérite [8,56]. Enfin, le SBSNAE, à l'instar des métabolites β -lyase MSMTESE et SBMSE, permet de confirmer sans ambiguïté un empoisonnement à l'ypérite, puisque ce métabolite n'a pas été détecté dans les urines de personnes non exposées à l'agent chimique [8].

La stabilité des biomarqueurs (TDG, TDGO, SMO, SBMSE, SBMTE, MSMTESE et SBSNAE) dans le plasma a été étudiée par Li *et al.* [15]. Les résultats ont démontré que tous les analytes restaient stables après trois cycles de congélation/décongélation de -80°C à température ambiante. Cependant, contrairement aux autres métabolites qui sont toujours stables après 35 jours de conservation à -80°C, le TDG et le TDGO ne restent stables que dans les 10 premiers jours de stockage à cette température, puisqu'une oxydation du TDG en TDGO a été observée passé ce délai. Ceci indique donc que, pour obtenir une quantification fiable de ces deux métabolites, les échantillons de plasma doivent être analysés dans les 10 jours suivant leur prélèvement. La stabilité à court terme du SMO dans le plasma a également été étudiée par Manandhar *et al.* [36]. Les résultats ont montré que le métabolite était stable dans le plasma à température ambiante et à 4°C pendant au moins 6 heures. De même, le SMO a été évalué comme stable jusqu'à 24 heures lorsqu'il était conservé à température ambiante après précipitation des protéines.

La stabilité des métabolites dans les urines a également fait l'objet de nombreuses études. Ainsi, Lee et Lee [38] ont montré que le TDG, le SBMSE, le MSMTESE et le SBSNAE étaient stables après trois cycles de congélation/décongélation de -20°C à température ambiante, ainsi qu'après conservation à -20°C pendant deux semaines ou à 4°C pendant 72h. Les éluats obtenus après extraction des échantillons d'urine sur Oasis® HLB se sont également avérés stables lors de leur conservation à 4°C pendant 72h. Cependant, comme dans le cas du plasma, une oxydation du TDG en TDGO a été constatée par Boyer *et al.*[20] lors de la conservation d'échantillons d'urine à -20°C. La stabilité du SBMTE dans les urines a été étudiée et les résultats ont montré que, dans des échantillons de contrôle conservés à -70°C, le SBMTE restait stable pendant au moins 6 mois [45]. De même, pour tester la dégradation de l'analyte dans les urines, des échantillons contenant différentes concentrations de SBMTE ont été conservés pendant 7 jours à trois températures différentes (-70°C, 4°C et température ambiante). Le SBMTE a démontré être stable pendant au moins une semaine à toutes les concentrations et toutes les températures. Il a par ailleurs été démontré que le SBMTE n'était pas affecté par une stérilisation par chauffage. Lin *et al.* [47] se sont quant à eux intéressés aux effets de cycles de congélation/décongélation, à la conservation des urines à long terme à -70°C et à la conservation des solutions obtenues après l'étape de préparation des échantillons (SPE sur Oasis® HLB). Il est apparu que le SBMTE demeurait stable dans les urines après 10 cycles de congélation/décongélation et après conservation à -70°C pendant 12 mois. Cet analyte restait également stable dans les échantillons traités et stockés à température ambiante pendant 12h.

Toutefois, outre le fait que certains métabolites présentent de potentiels problèmes de stabilité et qu'ils soient présents à l'état de traces dans les échantillons de contrôle, l'inconvénient principal des

tous les métabolites mentionnés précédemment est le fait que près de 90% sont excrétés dans les urines dans les premières 48-72h suivant une exposition à l'agent chimique [46]. Black *et al.* [33] ont ainsi mis en évidence le fait que les métabolites β -lyase sont susceptibles d'être détectés dans les urines sur une période de deux semaines maximum, selon la gravité de l'empoisonnement. De fait, les métabolites urinaires ne constituent que des biomarqueurs de très faible durée de vie. En étudiant les profils d'excrétion urinaire des métabolites après une exposition cutanée de rats à l'ypérite, Black *et al.* [23] ont ainsi déterminé que les demi-vies apparentes d'élimination étaient de 1,6 jours pour les métabolites β -lyase et de 1,9 jours pour les produits d'hydrolyse. En outre, en comparant les profils d'excrétion des deux types de métabolites, il a été observé que les produits d'hydrolyse présentaient un pic d'excrétion plus tôt que les métabolites β -lyase (voir **Figure 4**). Cela résulte sûrement d'une hydrolyse rapide d'une petite proportion de l'ypérite absorbée à travers la peau. Le produit d'hydrolyse TDG, initialement soluble dans l'eau, est alors majoritairement oxydé en TDGO, molécule très polaire rapidement éliminée par les reins.

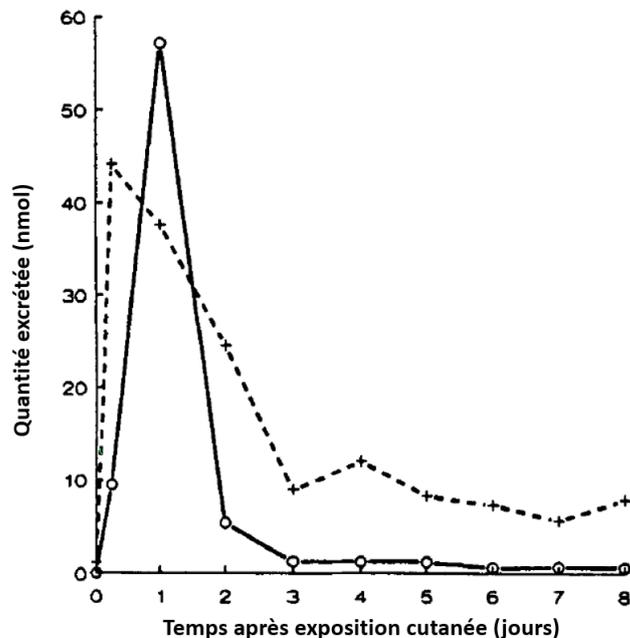


Figure 4. Profils d'excrétion des métabolites β -lyase (trait continu) et des produits d'hydrolyse/oxydation (pointillés) dans les urines de rats après une exposition cutanée à l'ypérite (dose = 2 μ mol/animal). Adapté de [23].

Concernant les métabolites β -lyase, leur excrétion semble présenter un déclin beaucoup plus rapide que les produits d'hydrolyse, suggérant ainsi que l'excrétion prolongée de ces derniers résulte probablement de la libération du TDG à partir d'adduits formés par l'ypérite avec des macromolécules telles que les protéines. En effet, les protéines contiennent de nombreux résidus acides aspartiques et glutamiques, susceptibles de former des conjugués ester du TDG par réaction initiale avec l'ypérite, et pouvant libérer du TDG dans l'organisme plusieurs jours après l'exposition à l'arme chimique lorsqu'ils sont hydrolysés. Pour vérifier cette hypothèse, Noort *et al.* [57] ont incubé de la kératine auparavant

biologiques ne sont généralement disponibles qu'au bout de plusieurs jours voire plusieurs semaines. Bien que la fenêtre de détection du TDG soit élargie grâce à son clivage des protéines, cette méthode est toutefois longue et très chronophage. De fait, d'autres biomarqueurs, tels que les adduits que l'ypérite forme avec les macromolécules biologiques, doivent être utilisés afin de confirmer une exposition à l'agent chimique sur une plus longue période.

I.3. Biomarqueurs de l'ypérite à moyen terme : adduits covalents avec les macromolécules

I.3.1. Réaction de l'ypérite avec les macromolécules biologiques

Alors que ses produits d'hydrolyse et/ou d'oxydation, ainsi que les métabolites résultants de sa réaction avec le glutathion, sont rapidement éliminés dans les urines, l'ypérite se lie de manière covalente avec les sites nucléophiles présents sur les macromolécules biologiques telles que l'ADN ou les protéines pour former des adduits hydroxyéthylthioéthyl (HETE) de plus longue durée de vie [10].

Des sites nucléophiles réactifs existent sur les bases nucléiques (atomes de carbone et d'oxygène) et les groupements phosphates des molécules d'ADN. Bien que présent dans tous les tissus et cellules de l'organisme, l'ADN présente cependant un inconvénient majeur lorsqu'il s'agit de l'analyse des marqueurs d'exposition à un agent alkylant. En effet, des systèmes enzymatiques de réparation éliminent les lésions de l'ADN en séparant la portion alkylée du reste du squelette de l'ADN [62]. Les adduits que l'ypérite forme avec l'ADN ont donc des durées de vie relativement courtes, de l'ordre de quelques dizaines de jours [63] (**Figure 6**).

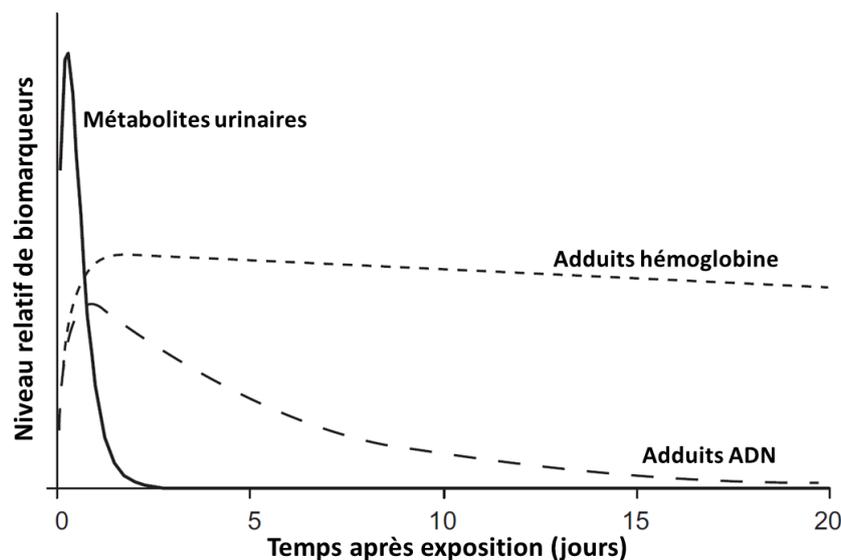


Figure 6. Quantités relatives de biomarqueurs (échelle arbitraire) après une forte exposition à l'ypérite. Adapté de [63].

Concernant les protéines, plusieurs acides aminés contiennent des groupements nucléophiles, comme par exemple la cystéine (SH), la sérine et la tyrosine (OH), la lysine (NH₂) et les acides aspartique et glutamique (CO₂H) [62]. Les adduits covalents avec les protéines s'inscrivent comme potentiels indicateurs biologiques d'exposition de longue durée de vie. Des biomarqueurs particulièrement utiles sont les adduits formés avec l'hémoglobine et l'albumine, deux protéines majoritaires dans le sang. Contrairement à l'ADN alkylé, les adduits d'hémoglobine et d'albumine sont généralement stables et ont pour la plupart des durées de vie chez l'Homme similaires à celles des protéines natives (approximativement 20-25 jours pour l'albumine et 120 jours pour l'hémoglobine) [62,63].

Cette partie ne traitant que des biomarqueurs de l'ypérite à moyen terme, seules les procédures développées pour l'analyse des adduits que l'agent chimique forme avec l'ADN et les protéines telles que l'albumine et la kératine seront détaillées dans les sections suivantes. L'analyse des adduits hémoglobine-ypérite fera l'objet du second chapitre de ce manuscrit, consacré aux biomarqueurs de longue durée de vie de l'ypérite.

1.3.2. Adduits formés avec l'ADN

1.3.2.1. Sites d'alkylation de l'ADN

Les principaux sites d'alkylation de l'ADN par l'ypérite sont les positions N⁷ et O⁶ de la base nucléique guanine, la position N³ de la nucléobase adénine, ainsi que des réticulations inter- et intra-brin au niveau de deux positions N⁷ de la guanine, conduisant à la formation respective des adduits N⁷-[2-[(2-hydroxyéthyl)thio]éthyl]-guanine (N⁷-HETEG), O⁶-[2-[(2-hydroxyéthyl)thio]éthyl]-guanine (O⁶-HETEG), N³-[2-[(2-hydroxyéthyl)thio]éthyl]-adénine (N³-HETEA) et bis[2-(guanine-7-yl)éthyl]sulfide (Bis-G) [16] (**Figure 2**).

L'adduit le plus abondant, représentant près de 61% des adduits d'ADN induits par l'ypérite, est N⁷-HETEG [64] (voir **Figure 7**). Les adduits bis-alkylé Bis-G et mono-alkylé N³-HETEA représentent respectivement 17% et 16% des adduits observés [64]. Enfin, l'adduit O⁶-HETEG est très minoritaire, puisqu'il ne représente que 0,1% des adduits ADN-ypérite formés [64]. Bien que très rarement formé, ce dernier adduit présente toutefois un intérêt biologique indéniable. En effet, les mécanismes de réparation de l'ADN humain ne parviennent pas à éliminer l'ypérite adduite au niveau de la position O⁶ de la guanine, entraînant ainsi une mauvaise réplication de l'ADN. De fait, l'adduit O⁶-HETEG est probablement l'un des principaux responsables de effets mutagènes observés lors d'une exposition à l'ypérite [64]. La **Figure 8** illustre le rôle joué par les adduits ADN-ypérite dans l'apparition de mutations et donc, *in fine*, dans le développement de cancers [65].

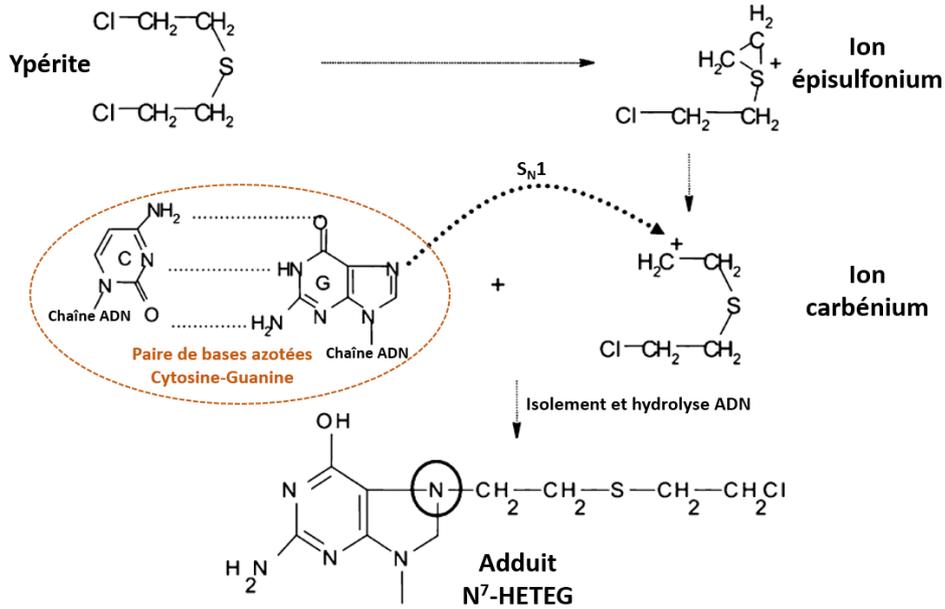


Figure 7. Mécanisme de formation de l'adduit ADN-ypérite N⁷-[2-[(2-hydroxyéthyl)thio]éthyl]-guanine (N⁷-HETEG) par réaction de l'ypérite avec la position N⁷ de la nucléobase guanine de l'ADN. Adapté de [64].

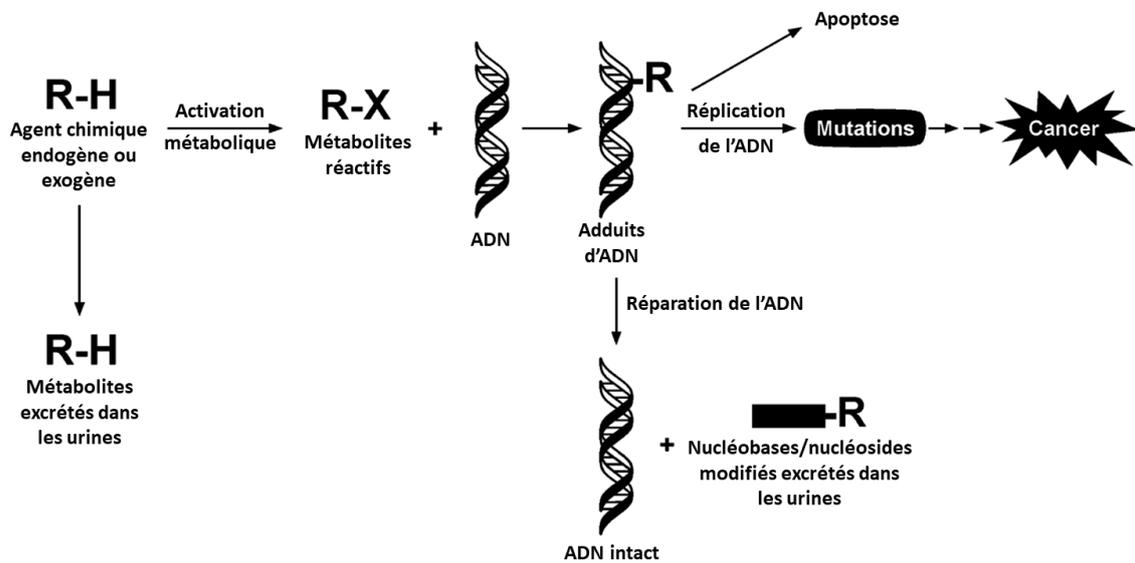


Figure 8. Illustration du rôle joué par les adduits ADN formés lors de l'exposition à un agent chimique dans le développement de cancers. Adapté de [65].

Au cours des dernières années, plusieurs revues recensant les différentes méthodes d'analyse des adduits ADN-ypérite ont été publiées [66–68]. Ces revues précisent également les procédures pouvant être mises en œuvre pour isoler l'ADN des matrices biologiques. Cette section de chapitre présente les principales méthodes développées jusqu'à ce jour décrites plus en détails dans ces revues.

Pour une détection fiable des adduits d'ADN, des méthodes très sensibles sont nécessaires en raison de la très faible quantité d'adduits attendue (de 0,01 à 10 adduits pour 10^8 nucléobases) [66]. La dérivation de l'adduit N⁷-HETEG majoritaire s'étant avérée très difficile [69], l'analyse des adduits ADN-ypérite implique des techniques analytiques autres que la GC-MS, en particulier le marquage radioactif, les procédures immunochimiques et les méthodes d'analyse par LC-MS et LC-MS/MS.

I.3.2.2. Méthodes d'analyse des adduits ADN-ypérite par marquage radioactif et immunochimie

Le marquage au phosphore 32 (³²P) est une méthode très sensible introduite en 1982 [70] et employée pour détecter différents types de lésions de l'ADN [71,72]. Cette méthode consiste à remplacer l'atome de phosphore ³¹P du groupement phosphate α d'un nucléotide par son isotope radioactif ³²P (**Figure 9**). Comme reporté par Phillips et Arlt [71] et Klaene *et al.* [72], cette méthode peut permettre de détecter jusqu'à un adduit pour 10^{10} bases nucléiques non modifiées et ce, en utilisant seulement 1 à 10 µg d'ADN. Ainsi, en considérant une quantité moyenne de 6 pg d'ADN génomique par cellule humaine diploïde [73], ces quantités représentent approximativement entre 167 000 et 1 670 000 cellules. Pour ce qui est des adduits ADN-ypérite, Niu *et al.* [74] ont mis au point une méthode permettant de détecter l'adduit majoritaire N⁷-HETEG dans les fibroblastes humains et ont montré qu'il était possible de détecter un adduit pour 10^6 bases non modifiées, lors de l'exposition des cellules à une concentration de 2,3 µmol.L⁻¹ d'ypérite. Yu *et al.* [75] ont pour leur part développé une méthode 10 fois plus sensible, permettant de détecter un adduit N⁷-HETEG pour 10^7 bases nucléiques. Bien que les méthodes de marquage isotopique soient très sensibles, l'utilisation d'éléments radioactifs tels que ³²P demeure toutefois l'un des inconvénients majeurs de ces méthodes. En outre, le marquage radioactif ne permet pas d'obtenir une spécificité chimique totale puisque que toutes les informations structurales reposent sur la disponibilité des étalons, qui sont aussi indispensables pour procéder aux analyses quantitatives. Qui plus est, même dans les conditions idéales, cette méthode n'est pas considérée comme tout à fait exacte, puisque le marquage peut être incomplet et de faux positifs peuvent être obtenus [65].

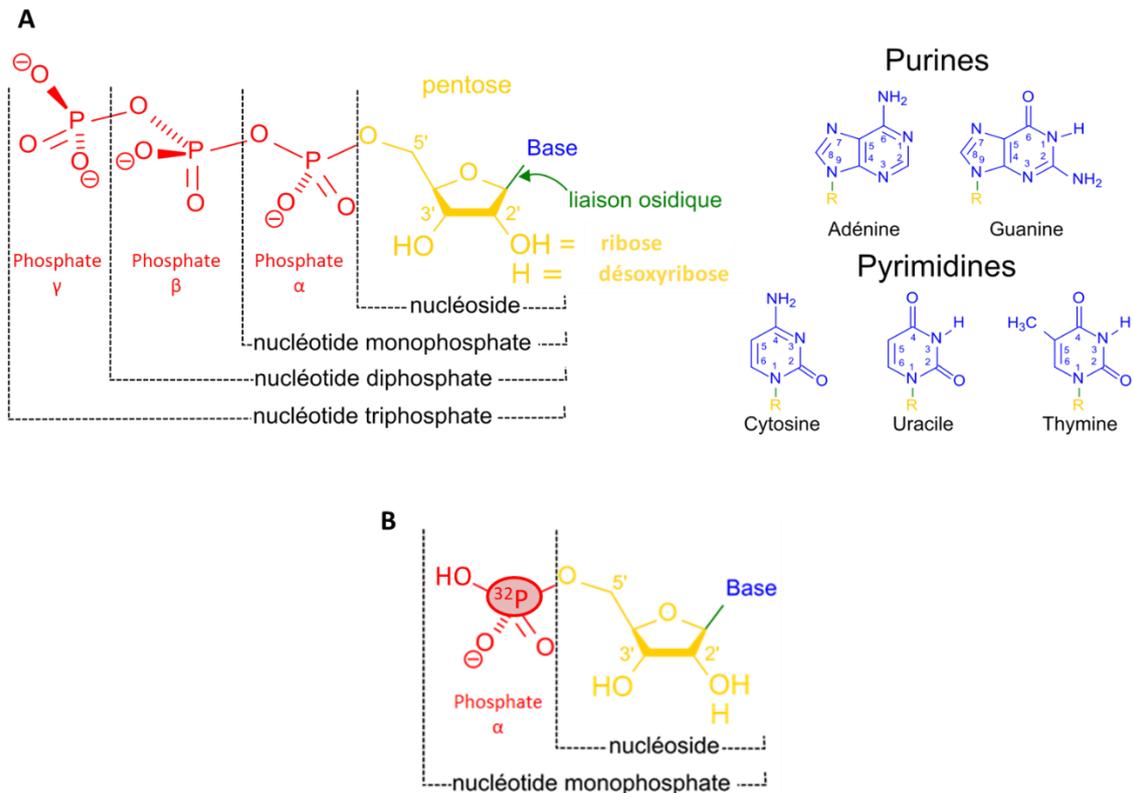


Figure 9. Représentation schématique de la structure des nucléotides, constitués d'une nucléobase, d'un pentose et de phosphates (A), et marquage au phosphore 32 (^{32}P) pour l'analyse des adduits ADN (B). Adapté de [76].

Des méthodes immunochimiques ont également été développées pour détecter les adduits ADN-ypérite. Van der Schans *et al.* [77] ont ainsi mis au point des tests ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) utilisant des anticorps monoclonaux ou polyclonaux spécifique à l'adduit N⁷-HETEG, afin de le détecter dans du sang humain exposé *in vitro* à l'ypérite. Les auteurs ont reporté une LDD d'environ un adduit N⁷-HETEG pour 5x10⁶ bases canoniques, après traitement des échantillons sanguins avec une dose d'ypérite de 2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Le test ELISA avec les anticorps monoclonaux a par la suite été utilisé afin de réaliser une analyse immunochimique des échantillons de sang prélevés 22 et 26 jours après exposition à l'ypérite de deux individus lors du conflit Iran-Irak [59]. Les concentrations de l'adduit N⁷-HETEG mesurées dans les lymphocytes et les granulocytes des deux victimes correspondaient à celles observées dans le sang traité *in vitro* avec des taux d'ypérite de 0,015-0,43 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. En utilisant un test immunochimique de type dot blot, Kehe *et al.* [78] ont pu constater qu'une importante quantité d'adduits était formée lors de l'incubation de cellules de peau humaine (kératinocytes) avec de l'ypérite à des concentrations supérieures à 0,3 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Un test commercial, reposant sur l'utilisation du même anticorps que celui utilisé par Kehe *et al.* [78], est également disponible. La concentration minimale d'ypérite pouvant être détectée par ce test sur bandelettes, commercialisé par Securetec, est de 0,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Même si ce test, très simple à mettre en œuvre,

constitue une méthode préliminaire pour prouver une exposition à l'ypérite, il ne fournit cependant pas une totale spécificité chimique, puisque qu'une réactivité croisée avec les moutardes azotées, dérivant de l'ypérite par le remplacement de l'atome de soufre par un groupement azoté isostère, a été observée [79]. De fait, bien que les méthodes immunochimiques soient très sensibles, leur utilisation reste toutefois limitée puisqu'une quantification absolue des adduits et une spécificité chimique totale sont impossibles à obtenir. En outre, le coût élevé des anticorps constitue également un inconvénient majeur des méthodes de détection immunochimique.

I.3.2.3. Méthodes d'analyse des adduits ADN-ypérite par chromatographie en phase liquide

De nombreuses méthodes de LC-MS et de LC-MS/MS ont été proposées pour analyser les adduits d'ADN induits par exposition à l'ypérite [69,80,81], comme illustré par le contenu du **Tableau 3**.

Tableau 3. Principales méthodes d'analyse par chromatographie liquide des adduits résultants de l'alkylation de l'ADN par l'ypérite dans les matrices biologiques.

Adduit(s) ADN	Matrice biologique	Pré- traitement de l'échantillon	Procédure d'isolement de l'ADN	Hydrolyse de l'ADN	Rendement d'extraction	Méthode d'analyse	Colonne analytique et phase mobile	Sensibilité	Référence
N³-HETE A, N⁷-HETE G et O⁶- HETE G	Sang total (humain)	Lyse des érythrocytes ; isolement des GB par centrifugation	Lyse avec SDS ; digestion des protéines (protéinase K, 37°C, 16h) ; LLE (phénol) ; ajout AcNa/EDTA pH 5.5 ; précipitation ADN avec EtOH absolu glacial (-20°C) ; digestion ARN avec RNase A et RNase T1 (37°C, 2h) ; précipitation avec alcool	Incubation avec déoxyribo- nucléase I et nucléase P1 (37°C, 16h) ; incubation avec protéinase K (37°C, 2h)	n.d.	HPLC - détection radio- chimique	Lichosorb C ₁₈ (250 mm x 5 mm) H ₂ O et MeOH (70:30, v/v) (isocratique)	n.d. (étude qualitative)	[80]
N³-HETE A et N⁷- HETE G	Sang total (humain)	Lyse des érythrocytes ; isolement des GB par centrifugation	Dissolution des GB dans tampon Tris-HCl pH 8,0 avec NaEDTA 50 mM et 1% SDS ; digestion protéinase K (50°C, 2h) ; PP (AcNH ₄) ; précipitation ADN avec EtOH froid	n.d.	n.d.	HPLC- détecteurs fluoro- métrique et radio- chimique	Spherisorb C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) 10 mM C ₇ H ₁₇ NO ₂ dans H ₂ O/ACN (95:5, v/v) (isocratique) ou C ₁₈ (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) 10 mM KH ₂ PO ₄ dans H ₂ O/ACN (90:10, v/v) (isocratique)	LDD (N ⁷ - HETE G) : 1 adduit pour 3x10 ⁵ bases canoniques (sang)	[69]
N⁷-HETE G	Rate et foie (rat)	Centrifugation avec PBS froid	Utilisation du mini kit commercial QIAamp (QIAGEN GmbH)	Hydrolyse acide	n.d.	HPLC-UV LC-ESI ⁺ -MS (SIM)	C ₁₈ 25 mM NH ₄ HCO ₃ dans H ₂ O/MeOH (80:20, v/v) (isocratique)	n.d.	[81]
N⁷-HETE G	Urine (humain)	SPE (Si C ₈)	Non nécessaire (adduit déjà présent sous forme libre dans la matrice)		n.d.	HPLC-ESI ⁺ - MS/MS (MRM)	SB-C ₈ (150 mm x 4,6 mm, 1,8 µm) H ₂ O/MeOH ; 0,1% AF (gradient)	LDQ : 10 ng.mL ⁻¹ (urine)	[86]

Adduit(s) ADN (suite)	Matrice biologique	Pré-traitement de l'échantillon	Procédure d'isolement de l'ADN	Hydrolyse de l'ADN	Rendement d'extraction	Méthode d'analyse	Colonne analytique et phase mobile	Sensibilité	Référence
N⁷-HETEG	Sang total (humain)	Centrifugation avec PBS ; solubilisation dans tampon de lyse (Tris-HCl pH 7,5, sucrose, MgCl ₂ et Triton X-100)	Ajout de tampon (Tris- HCl pH 8,3, KCl, MgCl ₂ , NP-40, Tween 20) ; élimination RNA avec RNase (37°C, 1h) ; digestion avec protéinase K (55°C, 3h) ; précipitation ADN avec EtOH froid	Hydrolyse acide (H ₃ PO ₄ pH 3,5, 100°C, 1h)	112%	HPLC-ESI ⁺ - MS/MS (MRM)	Zorbax SB C ₁₈ (30 mm x 2,1 mm, 3,5 µm) H ₂ O et MeOH (gradient)	LDD : 0,33 ng.mL ⁻¹ LDQ : 0,94 ng.mL ⁻¹ (sang)	[82]
Bis-G, N³- HETEA, N⁷-HETEG et O⁶- HETEG	Urine (lapin)	SPE (Si C ₁₈)	Non nécessaire (adduits déjà présents sous forme libre dans la matrice)		93% (Bis-G) 94% (N ³ - HETEA) 104% (N ⁷ - HETEG) 110% (O ⁶ - HETEG)	UHPLC-ESI ⁺ - MS/MS (MRM)	Acquity UPLC BEH C ₁₈ (50 mm x 2,1 mm, 1,7 µm) H ₂ O et MeOH (gradient)	LDD : 0,005 ng.mL ⁻¹ (Bis- G), 0,002 ng.mL ⁻¹ (N ³ - HETEA, N ⁷ -HETEG et O ⁶ - HETEG) LDQ : 0,01 ng.mL ⁻¹ (Bis- G), 0,005 ng.mL ⁻¹ (N ³ - HETEA, N ⁷ -HETEG et O ⁶ - HETEG) (urine)	[16]
Bis-G, N³- HETEA et N⁷-HETEG	Adipocytes (humain et rat)	Lyse des tissus par agitation ; lyse des cellules	Hydrolyse enzymatique (protéinase K, 55°C, 1h) ; dénaturation protéines (isoamyl/ chloroforme/ phénol, 1:24:25, v/v/v) ; ajout EtOH glacial et incubation -20°C 1 nuit	Hydrolyse acide (AF, 110°C, 30 min)	100% (Bis-G) 95% (N ³ - HETEA) 93% (N ⁷ - HETEG)			LDD : 0,02 ng.mL ⁻¹ (Bis-G), 0,05 ng.mL ⁻¹ (N ³ -HETEA), 0,01 ng.mL ⁻¹ (N ⁷ -HETEG) LDQ : 0,05 ng.mL ⁻¹ (Bis- G), 0,1 ng.mL ⁻¹ (N ³ - HETEA), 0,02 ng.mL ⁻¹ (N ⁷ - HETEG) (adipocytes)	[83]

Adruit(s) ADN (suite)	Matrice biologique	Pré-traitement de l'échantillon	Procédure d'isolement de l'ADN	Hydrolyse de l'ADN	Rendement d'extraction	Méthode d'analyse	Colonne analytique et phase mobile	Sensibilité	Référence
Bis-G, N³-HETEA, N⁷-HETEG et O⁶-HETEG	Peau (rat)	Centrifugation avec PBS froid ; traitement enzymatique (disperse, une nuit) ; solubilisation dans tampon de lyse (Tris-HCl pH 7,5, sucrose, MgCl ₂ et Triton X-100)	Ajout de tampon (Tris-HCl pH 8,3, KCl, MgCl ₂ , NP-40, Tween 20) ; élimination RNA avec RNase (37°C, 1h) ; digestion avec protéinase K (55°C, 3h) ; précipitation ADN avec EtOH froid	Hydrolyse thermique (70°C, 1h)	111% (Bis-G) 105% (N ³ -HETEA) 108% (N ⁷ -HETEG) 88% (O ⁶ -HETEG)	ID-UHPLC-ESI ⁺ -MS/MS (MRM)	Acquity UPLC BEH C ₁₈ (50 mm x 2,1 mm, 1,7 µm) H ₂ O et MeOH (gradient)	LDD : 0,005 ng.mL ⁻¹ (Bis-G), 0,009 ng.mL ⁻¹ (N ³ -HETEA), 0,001 ng.mL ⁻¹ (N ⁷ -HETEG), 0,0002 ng.mL ⁻¹ (O ⁶ -HETEG) LDQ : 0,016 ng.mL ⁻¹ (Bis-G), 0,026 ng.mL ⁻¹ (N ³ -HETEA), 0,003 ng.mL ⁻¹ (N ⁷ -HETEG), 0,0007 ng.mL ⁻¹ (O ⁶ -HETEG) (on-column)	[84]
Bis-G, N³-HETEA, N⁷-HETEG et O⁶-HETEG	Organes internes (rat)	Centrifugation avec PBS froid ; solubilisation dans tampon de lyse (Tris-HCl pH 7,5, sucrose, MgCl ₂ et Triton X-100)		Hydrolyse acide (30% AF, 110°C, 30 min)	n.d.			LDD : 0,02 ng.mL ⁻¹ (Bis-G), 0,05 ng.mL ⁻¹ (N ³ -HETEA), 0,01 ng.mL ⁻¹ (N ⁷ -HETEG et O ⁶ -HETEG) LDQ : 0,05 ng.mL ⁻¹ (Bis-G), 0,01 ng.mL ⁻¹ (N ³ -HETEA), 0,02 ng.mL ⁻¹ (N ⁷ -HETEG et O ⁶ -HETEG) (on-column)	[85]

AcNa : acétate de sodium ; **AcNH₄** : acétate d'ammonium ; **ADN** : acide désoxyribonucléique ; **AF** : acide formique ; **ARN** : acide ribonucléique ; **C₇H₁₇NO₂** : formate de triéthylammonium ; **EDTA** : acide éthylènediaminetétraacétique ; **ESI⁺** : ionisation par électrospray en mode positif ; **EtOH** : éthanol ; **GB** : globules blancs ; **H₃PO₄** : acide phosphorique ; **HPLC** : chromatographie liquide à haute performance ; **KH₂PO₄** : phosphate de potassium monobasique ; **LC** : chromatographie en phase liquide ; **LDD** : limite de détection ; **LDQ** : limite de quantification ; **LLE** : extraction liquide/liquide ; **MRM** : suivi de réactions multiples ; **MS** : spectrométrie de masse ; **MS/MS** : spectrométrie de masse en tandem ; **n.d.** : non déterminé ; **NH₄HCO₃** : bicarbonate d'ammonium ; **PBS** : tampon phosphate salin ; **PP** : précipitation de protéines ; **SDS** : dodécylsulfate de sodium ; **SIM** : suivi sélectif d'ions ; **SPE** : extraction sur phase solide ; **T_{amb}** : température ambiante ; **UHPLC** : chromatographie liquide à ultra haute performance.

Puisque les nucléobases, modifiées ou non, sont des composés légèrement polaires, la chromatographie liquide de partage à polarité de phases inverse (RPLC) avec des colonnes C₁₈ et des gradients de type H₂O/ACN est majoritairement utilisée pour leur analyse. Habituellement, les bases nucléiques sont éluées en début de gradient et sont suivies des nucléobases modifiées qui sont plus hydrophobes [66]. Les méthodes utilisant la chromatographie en phase liquide sont sensibles et fournissent une certaine spécificité chimique si des étalons appropriés sont disponibles. En revanche, elles ne fournissent pas d'information structurale complète et nécessitent souvent l'utilisation de composés radioactifs. Ludlum *et al.* [69] ont par exemple développé une méthode d'analyse de l'ADN traité avec de l'ypérite marquée ¹⁴C par chromatographie liquide couplée à un détecteur radiométrique et fluorométrique, en ciblant les adduits N⁷-HETEG et N³-HETEA. En associant la mesure des signaux de fluorescence avec l'intensité de la radioactivité co-éluée, cette méthode a permis de quantifier les adduits présents dans les échantillons analysés. Ainsi, une LDD d'environ un adduit N⁷-HETEG pour 3 x 10⁵ bases azotées non modifiées a été atteinte. Cette méthode a en outre été utilisée pour analyser l'ADN extrait des globules blancs présents dans le sang humain exposé à l'ypérite. A la même époque, Fidler *et al.* [80] ont mis au point une méthode d'analyse par chromatographie liquide utilisant de l'ypérite radioactive marquée ³⁵S et pouvant détecter de manière qualitative trois adduits ADN-ypérite (N⁷-HETEG, N³-HETEA et Bis-G) sous forme de pics radioactifs, après une digestion enzymatique et une dépurination thermique de l'ADN, pour rompre la liaison entre les purines et les sucres auxquels elles sont rattachées. Enfin, Rao *et al.* [81] ont proposé une méthode LC avec une détection UV ainsi qu'une méthode LC-MS, permettant de détecter l'adduit majoritaire N⁷-HETEG dans les tissus de rates et de foies de rats exposés *in vivo* à l'ypérite et ce, jusqu'à 7 jours après l'exposition. Cet adduit a également été détecté après incubation *in vitro* de l'ADN de thymus de veau avec l'ypérite.

Récemment, des méthodes LC-MS/MS avec une ionisation par électrospray en mode positif, du fait de la simplicité de protonation des nucléobases, ont permis de dépasser les limitations rencontrées avec les méthodes mentionnées précédemment. En effet, en plus d'être très sensibles, ces méthodes fournissent également une spécificité chimique totale basée sur les temps de rétention caractéristiques des analytes, la fragmentation des composés et la mesure des rapports *m/z*. De plus, en utilisant des étalons appropriés tels que des isotopes non radioactifs introduits dans l'échantillon de manière à prendre en compte les variabilités pouvant survenir lors de la préparation des échantillons ou lors de la détection par spectrométrie de masse, une quantification absolue des adduits ADN-ypérite peut être réalisée. A l'heure actuelle, les approches par dilution isotopique associée à la LC-MS/MS sont idéales pour l'analyse d'une large gamme d'adduits d'ADN [65]. Yuxia *et al.* [82] ont ainsi proposé une méthode pour détecter l'adduit majoritaire, N⁷-HETEG, dans le sang total. Cette méthode a permis d'atteindre une LDD de 0,330 ng.mL⁻¹ et une LDQ de 0,940 ng.mL⁻¹ (correspondant

respectivement à environ 1 et 2,8 adduits pour 10^5 nucléobases) et les auteurs ont démontré que l'adduit étudié demeurait stable dans les échantillons de plasma sanguin après 30 jours de conservation à -20°C mais que les cycles de congélation/décongélation devaient être évités. En effet, la quantité de N⁷-HETEG a commencé à diminuer à partir du cinquième cycle réalisé, ce qui était dû à la dégradation de l'ADN.

Zhang *et al.* [16] ont pour la première fois développé une méthode permettant l'analyse simultanée des quatre principaux adduits ADN-ypérite dans les urines de lapins par ID-LC-MS/MS, après ajout des étalons internes deutérés et purification des échantillons par SPE sur cartouche C₁₈ (rendements d'extraction compris entre 93 et 110%). Des LDD variant entre 0,002 et 0,005 ng.mL⁻¹ et des LDQ de 0,005-0,010 ng.mL⁻¹ (correspondant à 1 adduit pour 7×10^6 ou 1,4 adduit pour 10^5 bases azotées, respectivement) ont été atteintes et il a été montré que les quatre adduits étaient détectables jusqu'à un mois après l'exposition cutanée des lapins à l'ypérite. Cette méthode a par la suite été utilisée par Xu *et al.* [13] pour analyser les urines et le sang de quatre individus accidentellement exposés à l'ypérite et les auteurs ont confirmé que les adduits pouvaient être détectés dans les urines des patients jusqu'à 30 jours après l'exposition. Wang *et al.* [83] ont ensuite appliqué cette procédure à l'analyse des adduits N⁷-HETEG, N³-HETEA et Bis-G dans les cellules adipeuses après exposition *in vivo* ou *in vitro* à l'ypérite. Cette étude a permis de démontrer que les cellules avec un environnement adipeux riche influençaient la formation et la réparation des adduits ADN-ypérite. En effet, il est apparu que les adduits avaient un comportement persistant dans les tissus adipeux, avec une proportion très élevée de l'adduit Bis-G, qui était plus importante que celle de N⁷-HETEG.

De manière similaire, Yue *et al.* [84] ont quant à eux mis au point une méthode LC-MS/MS pour analyser simultanément les quatre adduits ADN-ypérite dans des échantillons de peau de rats exposés de manière cutanée à l'ypérite. Cette méthode s'est avérée répétable et sensible, avec des CV inter- et intra-jour inférieurs à 10% et des LDD comprises entre 0,0002 et 0,001 ng.mL⁻¹, correspondant respectivement à 1 adduit pour $1,75 \times 10^8$ et 1 adduit pour $3,5 \times 10^7$ nucléobases. En 2015, Yue *et al.* [85] ont modifié cette méthode, notamment le gradient d'élution, ce qui a permis d'améliorer la séparation des composés, mais également d'obtenir des pics gaussiens plus symétriques. Toutefois, méthode modifiée s'est avérée beaucoup moins sensible que la méthode initiale [84], avec des LDD comprises entre 0,01 et 0,05 ng.mL⁻¹, soit 1 adduit pour 3×10^5 nucléobases et 1 adduit pour 7×10^5 bases azotées. Cette perte de sensibilité peut être expliquée par la procédure d'hydrolyse acide de l'ADN qui a été utilisée à la place de l'hydrolyse thermique employée dans la méthode initiale [84]. Enfin, en utilisant une méthode LC-MS/MS moins sensible, Orlova *et al.* [86] ont récemment été capables de détecter l'adduit N⁷-HETEG dans des échantillons d'urine dopés, avec une LDD calculée de 3 ng.mL⁻¹ (1 adduit

pour 10⁵ bases azotées) après une procédure de traitement des échantillons par SPE sur un support de silice greffée C₈.

I.3.2.4. Procédures de préparation des échantillons biologiques pour l'analyse des adduits ADN-ypérite

I.3.2.4.1. Extraction de l'ADN des matrices biologiques

Selon le type d'échantillon et d'analyte étudié, de 1 à 200 µg d'ADN sont requis pour une analyse LC-MS/MS des modifications de l'ADN, *i.e.* des adduits ADN [66]. Les échantillons adaptés à une analyse des adduits ADN-ypérite, outre les urines, sont les prélèvements sanguins, les cellules et les tissus biologiques. Dans les échantillons d'urine, des nucléobases, nucléosides et nucléotides non modifiés sont présents (**Figure 9A**), de même que les adduits d'ADN-ypérite libres. Ces derniers sont directement détachés du squelette de l'ADN par les processus de réparation enzymatique, libérés dans le système circulatoire et éliminés de l'organisme par l'intermédiaire des urines. Lors de l'analyse des urines, une purification des échantillons par une étape de SPE est nécessaire, de manière à éliminer les sels et les composés très polaires présents dans la matrice et pouvant interférer avec la détection par spectrométrie de masse. Après cette étape de purification, les échantillons peuvent directement être analysés en LC-MS/MS. Les différentes étapes impliquées dans la procédure de préparation des échantillons pour l'analyse LC-MS/MS des adduits ADN-ypérite sont résumées sur la **Figure 10**.

Concernant les échantillons sanguins ou dérivés de tissus biologiques tels que la peau ou les cellules, les adduits formés avec l'ypérite sont liés de manière covalente au squelette de l'ADN. De fait, l'ADN doit être préalablement extrait de la matrice, ce qui nécessite une procédure de traitement des échantillons plus longue et complexe que celle mise en place pour les urines. Le choix de la méthode d'extraction peut être très compliqué puisque la technique utilisée peut avoir des répercussions directes sur les résultats obtenus, notamment en ce qui concerne la quantité et la qualité de l'ADN extrait, mais également sur la simplicité de réalisation des étapes ultérieures. Les étapes d'extraction de l'ADN incluent l'hémolyse rapide des cellules, l'élimination des débris cellulaires par centrifugation, la dégradation des protéines par digestion avec des protéinases, et l'extraction de l'ADN de la solution avec du phénol et du chloroforme ou de l'alcool isoamylique [67,77]. L'ADN est ensuite précipité, le plus souvent avec de l'éthanol, centrifugé et, après élimination du surnageant, il est solubilisé dans une solution tampon. La qualité de l'ADN extrait est estimée en mesurant l'absorbance de la solution d'ADN aux maxima d'absorption dans les spectres des protéines et des acides nucléiques, *i.e.* à 280 nm et 260 nm, respectivement. Dans le cas d'échantillons d'ADN purs, le rapport des absorbances à 260/280 nm doit être supérieur à 1,8 [67].

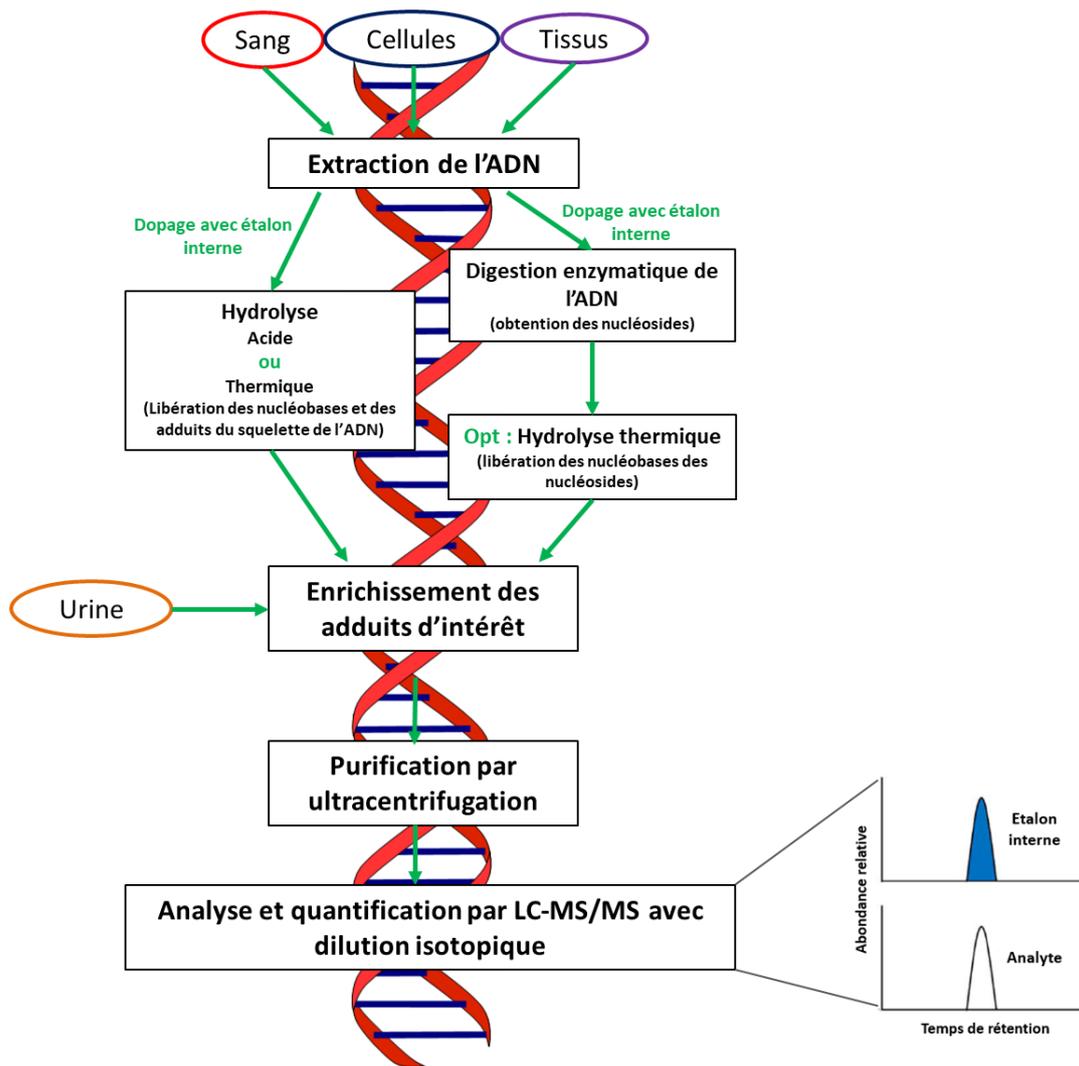


Figure 10. Représentation schématique des différentes étapes impliquées dans la procédure de préparation des échantillons biologiques pour l'analyse des adduits ADN-ypérite par LC-MS/MS avec dilution isotopique. Adapté de [66].

Lors du traitement du sang total, les globules blancs doivent être isolés du reste de la matrice biologique par centrifugation avant de procéder à l'extraction de l'ADN. En effet, les érythrocytes étant des cellules procaryotes, l'ADN ne peut être obtenu qu'à partir des lymphocytes présents dans le sang. Les protocoles décrits dans la littérature pour l'extraction de l'ADN sont souvent longs et peuvent varier en termes d'équipements ou de produits chimiques utilisés pour l'hémolyse des cellules et l'extraction sélective de l'ADN [87,88]. Initialement, la procédure d'hémolyse était réalisée en deux étapes, la première conduisant à la lyse des érythrocytes à l'aide de détergents tels que le dodécylsulfate de sodium (SDS) et le Triton® X-100. Ensuite, une seconde étape consiste en la lyse des globules blancs de manière à libérer le noyau cellulaire, l'ADN génomique et l'ARN (**Figure 11**). Les ARN contaminants sont ensuite éliminés par traitement avec une enzyme ribonucléase, habituellement la RNase, l'ADN et les protéines demeurant dans le surnageant. L'étape suivante consiste à éliminer les

protéines en utilisant des sels concentrés, ce qui conduit à la précipitation des protéines présentes dans l'hémolyat des cellules (*salting out*). L'ADN reste quant à lui dans le surnageant, qui est récupéré. Plus récemment, une approche de lyse en une seule étape a été développée, en utilisant un mélange de détergents capables de lyser les érythrocytes et les globules blancs. Cette étape de lyse libère le noyau et les mitochondries des globules blancs, qui sont récupérés par centrifugation, laissant l'ARN dans le surnageant (**Figure 11**).

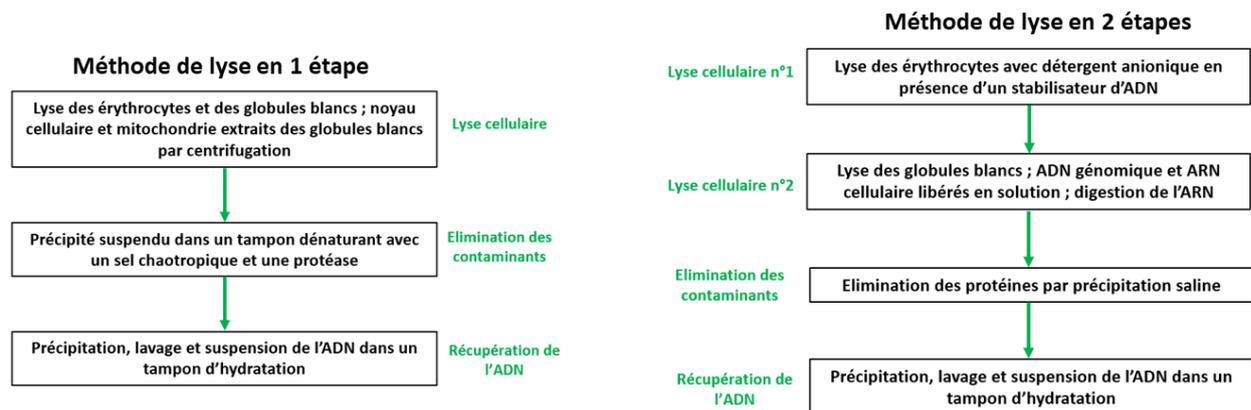


Figure 11. Présentation des deux méthodes de précipitation chimique utilisées pour extraire l'ADN génomique du sang total.

Tout comme dans l'approche en deux étapes, l'étape suivante consiste à éliminer les protéines interférentes. Dans ce cas, le noyau et les mitochondries des globules blancs sont traités avec un tampon de dénaturation, qui contient un sel chaotropique et une protéase. Cela permet de simultanément dénaturer et d'hydrolyser les protéines par digestion enzymatique, laissant ensuite les protéines digérées et l'ADN génomique en solution. Dans les deux méthodes (lyse cellulaire en une ou deux étapes), l'ADN est récupéré par précipitation avec un alcool, le plus souvent de l'éthanol ou de l'alcool isopropylique. Avec cette technique, l'ADN est facilement séparé des autres biomolécules et des composés organiques, notamment les macromolécules telles que les lipides et les glucides, pouvant interférer lors des étapes ultérieures. Ensuite, l'ADN est solubilisé dans un tampon Tris ou Tris-EDTA et les solutions résultantes demeurent stables pendant plusieurs années lorsqu'elles sont conservées entre -20°C et 4°C. Il est toutefois à noter que l'approche de lyse en une étape présente plusieurs avantages : (i) cela élimine les possibles pertes d'échantillons qui peuvent survenir lors d'une procédure en deux étapes, permettant ainsi de récupérer plus d'ADN ; (ii) aucun changement de tube de centrifugation n'étant nécessaire, le risque de contamination de l'échantillon est fortement réduit ; (iii) la lyse en une étape est également moins chronophage puisqu'elle comprend moins d'étapes et surtout, elle ne comprend pas d'étape d'incubation pendant une nuit ou d'étape de lavage ; (iv) enfin, la lyse en une seule étape est aussi plus économique car elle ne requiert pas d'enzyme supplémentaire,

comme la RNase, or de matériel additionnel. En se basant sur cette procédure, Yuxia *et al.* [82] ont mis au point une méthode permettant d'extraire l'ADN du sang total, avec des quantités extraites de l'ordre de 22 ± 8 µg d'ADN par mL de sang.

Pour ce qui est de l'extraction de l'ADN à partir de la peau, la procédure a été plus compliquée. En effet, il a été nécessaire de séparer l'épiderme des couches inférieures de la peau. Après un traitement avec une enzyme dispase pendant une nuit pour cliver le collagène de la peau, la procédure décrite pour les globules blancs a ensuite été appliquée pour isoler l'ADN [84].

Une méthode alternative intéressante consisterait, après la lyse des cellules du sang total à l'aide de SDS ou d'un autre détergeant similaire, à extraire l'ADN en le piégeant sur des billes magnétiques recouvertes d'une matrice de silice permettant de former des liaisons avec les acides nucléiques. Par la suite, l'ADN serait élué des billes en utilisant un tampon de faible force ionique. Si plusieurs études ont indiqué que cette méthode était la plus rapide pour extraire l'ADN du sang total, avec un temps requis inférieur à 30 min [87,88], cette vitesse a une répercussion sur la pureté et la quantité d'ADN extrait (réduction du rendement d'extraction de l'ADN jusqu'à 20%) et cette méthode n'a pas été testée pour extraire l'ADN adduit par l'ypérite. Enfin, s'il existe des kits commerciaux pour extraire rapidement l'ADN de faibles volumes d'échantillons biologiques (300 µL de sang ou 10-20 mm² d'épiderme) [67], ces kits ne sont pas toujours adaptés à une analyse ultérieure des adduits ADN-ypérite puisque les quantités d'ADN extraites sont parfois insuffisantes pour une analyse en LC-MS/MS. De fait, les procédures employées pour extraire l'ADN des matrices biologiques en vue d'analyser les adduits ADN-ypérite sont souvent laborieuses et peuvent être très chronophages.

La molécule d'ADN contenue dans un chromosome de taille moyenne contient environ 150×10^6 paires de bases azotées et sa longueur est de 4 cm. Les molécules de cette taille sont très sensibles aux actions mécaniques qui ont lieu en solution lors de l'extraction et subissent souvent une fragmentation. L'ADN obtenu à l'issue de l'étape d'extraction est donc sous forme de brins de taille bien plus petite que les séquences initiales. Toutefois, cela reste quand même des macromolécules constituées de plusieurs milliers de nucléotides. L'analyse en LC-MS/MS de telles molécules n'est pas aisée et il est préférable de les fractionner davantage par hydrolyse, après introduction d'étalons internes dans les échantillons.

1.3.2.4.2. Hydrolyse de l'ADN extrait des matrices biologiques

Après ajout des étalons internes aux échantillons, de manière à prendre en compte les pertes d'analytes pouvant survenir lors de la procédure de préparation des échantillons, ainsi que les problèmes d'ionisation lors de la détection par spectrométrie de masse, l'ADN extrait des matrices biologiques est hydrolysé de manière à libérer les adduits ADN-ypérite. Certains de ces adduits, *e.g.* N⁷-HETG et

N³-HETEA, sont thermiquement labiles et peuvent être séparés du squelette de l'ADN en chauffant (hydrolyse thermique) [65]. De manière alternative, les adduits formés au niveau des nucléobases adénines et guanines présentes dans l'ADN, tout comme les acides nucléiques non modifiés, peuvent être détachés du squelette par une hydrolyse acide douce, en chauffant légèrement l'ADN en présence d'acide formique ou phosphorique [67]. Toutefois, il est important de noter que certains adduits peuvent ne pas être stables dans certaines conditions d'hydrolyse. Par exemple, l'instabilité thermique ou en milieu acide de l'adduit O⁶-HETEG est beaucoup plus grande que celle des adduits N⁷-HETEG et N³-HETEA dans les conditions typiques de chauffage ou d'acidification mises en place après une procédure d'hydrolyse enzymatique [84]. De fait, afin de libérer complètement O⁶-HETEG du squelette de l'ADN tout en assurant la stabilité de cet adduit, les conditions d'hydrolyse doivent être adaptées. Une hydrolyse thermique relativement douce à pH neutre (70°C, 1h) semble être adaptée puisque cela permet de préserver une partie de l'adduit O⁶-HETEG, contrairement à une hydrolyse acide à pH 2,0 (70°C, 1h) ou une hydrolyse thermique plus classique (100°C, 1h). Enfin, l'ADN peut également être digéré par des enzymes nucléases et phosphatases, ce qui permet d'obtenir des nucléosides libres. Cependant, l'hydrolyse enzymatique de l'ADN chimiquement modifié peut ne pas être complète du fait de la présence des adduits, qui peuvent bloquer les enzymes nucléases et les empêcher de digérer l'ADN dans sa totalité [89]. Les nucléosides libérés lors de la digestion enzymatique peuvent par la suite être hydrolysés en nucléobases au cours d'une étape d'hydrolyse thermique [66].

Chaque méthode d'hydrolyse présente certains avantages et inconvénients. Ainsi, l'hydrolyse enzymatique est plus sélective puisque seules certaines liaisons entre des nucléosides particuliers sont rompues, et constitue la méthode d'hydrolyse la plus douce, mais c'est également la méthode la plus longue comparée aux hydrolyses acide ou thermique. Une augmentation du degré d'hydrolyse peut être observée lors de l'utilisation d'un mélange d'enzymes déoxyribonucléases ayant différentes spécificités vis-à-vis des substrats mais cela résulte également en une augmentation du coût de la procédure [67]. L'hydrolyse acide est quant à elle plus efficace que l'hydrolyse enzymatique mais la possibilité de décomposition des adduits ADN-ypérite est à prendre en considération. Contrairement à l'hydrolyse thermique en condition de pH neutre qui libère sélectivement les purines adduites au niveau des positions N³ et N⁷, les hydrolyses acide et enzymatique génèrent toutes deux un mélange complexe contenant un large excès de nucléobases non modifiées et les adduits d'intérêt peuvent nécessiter des étapes de purification additionnelles avant l'analyse en LC-MS/MS.

1.3.2.4.3. Purification des adduits ADN-ypérite extraits des matrices biologiques

A l'issue de l'étape d'hydrolyse, un enrichissement des adduits libérés peut être envisagé, afin d'éliminer les nucléosides non modifiés, les protéines, l'ARN, les sels inorganiques et les composés

polaires pouvant être présents dans l'échantillon. En effet, les sels et les composés très polaires peuvent grandement affecter la sensibilité de l'ionisation des adduits par électrospray, en générant des suppressions d'ions même lorsqu'ils sont présents en faible quantité dans les échantillons [90]. D'autres contaminants peuvent simplement générer un bruit de fond plus important, ce qui résulte également en une perte de sensibilité.

Le squelette de l'ADN partiellement dépuriné après hydrolyse acide ou thermique de l'ADN peut être éliminé de la matrice par une étape de filtration par ultracentrifugation. Cette procédure est également utile pour éliminer les enzymes et les protéines à la suite de l'hydrolyse enzymatique de l'ADN [65]. Des dispositifs jetables d'ultracentrifugation peuvent être utilisés afin d'obtenir une filtration rapide et efficace. Les adduits ADN-ypérite peuvent également être extraits des urines en utilisant une étape de SPE sur une phase hydrophobe C₁₈ [16].

1.3.2.5. Limitations des adduits ADN-ypérite comme biomarqueurs d'exposition

Bien que les adduits ADN-ypérite donnent des informations importantes sur les effets à long terme d'une exposition à l'ypérite sur la santé, autrement dit sur la formation de cancers et autres pathologies, la quantité d'adduits ADN-ypérite dans l'organisme est bien plus faible que celle des adduits protéines-ypérite. En effet, une grande proportion de l'ypérite a déjà réagi avec les composants cytoplasmiques des cellules avant d'atteindre leur noyau. En outre, les adduits formés lors de l'alkylation des protéines par l'ypérite sont très abondants dans le sang, puisque l'ypérite est directement absorbée dans le système circulatoire après contact de l'arme chimique avec la peau ou les poumons. De fait, jusqu'à présent, les adduits avec les protéines restent les principaux biomarqueurs d'exposition à l'ypérite étudiés. La section suivante est donc consacrée aux méthodes d'analyse des adduits que l'ypérite forme avec les protéines, en particulier avec l'albumine mais aussi avec la kératine. En effet, ces deux protéines ont des durées de vie respectives de l'ordre d'une vingtaine et d'une quarantaine de jours chez l'Homme, ce qui fait des adduits qu'elles forment avec l'ypérite des biomarqueurs à moyen terme. En revanche, les adduits formés avec l'hémoglobine ont des durées de vie plus longues, pouvant aller jusqu'à 120 jours, et sont donc des biomarqueurs à long terme. Ce chapitre présentant uniquement les biomarqueurs de l'ypérite à court et moyen termes, l'analyse des adduits hémoglobine-ypérite sera détaillée dans le chapitre 2 de ce manuscrit, afin d'éviter des redondances puisque les adduits formés avec l'hémoglobine sont au cœur de cette étude.

1.3.3. Adduits formés avec l'albumine et la kératine

Les protéines alkylées présentent de nombreux avantages, à commencer par le fait que les adduits de protéines, absents dans les échantillons biologiques de personnes n'ayant pas été en contact avec

l'ypérite, demeurent plus longtemps dans l'organisme que les adduits ADN-ypérite. Qui plus est, dans le sang, l'ypérite se lie environ 1000 fois plus aux protéines qu'à l'ADN, et notamment à l'albumine [91]. De nombreuses méthodes ont été développées au cours des dernières décennies pour analyser les adduits formés lors de l'alkylation des protéines par l'ypérite et détecter leur présence dans les échantillons biologiques d'individus exposés à l'agent chimique, notamment dans les échantillons sanguins. Cette partie se focalise ainsi sur la présentation des principales procédures mises en œuvre pour l'analyse des adduits que l'ypérite forme avec les protéines ayant une durée de vie de quelques dizaines de jours, en particulier l'albumine et la kératine. Ces méthodes d'analyse sont résumées dans le **Tableau 4**.

Tableau 4. Principales méthodes d'analyse par chromatographie liquide des adduits albumine-ypérite dans les échantillons biologiques.

Adduit albumine -HD	Matrice biologique	Procédure d'extraction de l'albumine	Procédure d'isolement et de purification de l'adduit	Rendement d'extraction ou de récupération	Méthode d'analyse	Colonne analytique et phase mobile	Sensibilité	Référence
HETE-CPF	Sang total (humain)	Centrifugation ; ajout de NaCl 0,5 M au surnageant (T_{amb} , 1 nuit) ; ajout d'un mélange acide/alcool au surnageant (37°C, 30 min) ; ajout de AcNa 0,2 M au surnageant ; lavage avec acétone ; centrifugation ; lavage avec éther diéthylique	Digestion enzymatique (pronase, 37°C, 2.5h) ; ultracentrifugation (10 kDa) ; SPE (Sep-Pack C ₁₈)	87%	μ LC-ESI ⁺ -MS/MS (MRM)	Lichrosorb RP18 (350 mm x 0,32 mm) H ₂ O /ACN ; 0,2% AF (gradient)	LDD : 1,6 ng.mL ⁻¹ (HD dans sang)	[95]
HETE-CPF	Sang total (humain)	Centrifugation ; purification de l'albumine par chromatographie d'affinité (HiTrap® Blue Sepharose High Performance) ; élimination des sels (colonne PD-10)	Digestion enzymatique (pronase, 37°C, 2h) ; ultracentrifugation (10 kDa)	n.d.		LC-ESI ⁺ -MS/MS (MRM)	Luna C ₁₈ (150 mm x 1 mm, 5 μ m) H ₂ O/ACN ; 1% AF (gradient)	LDQ : 0,7 ng.mL ⁻¹ (HD dans sang)
HETE-CPF	Sang total (humain)			n.d.	LDD : 8 ng.mL ⁻¹ (HD dans sang)		[97]	
HETE-CPY	Sang total (rat)			n.d.	PepMap C ₁₈ (50 mm x 1,0 mm, 3 μ m) H ₂ O/ACN ; 0,2% AF (gradient)	n.d.	[98]	
HETE-CPF	Sang total (humain)	Centrifugation plasma ; filtration (0,45 μ m) ; extraction albumine avec disques commerciaux Pierce Blue Albumin SwellGel®	Précipitation (acétone) ; digestion enzymatique (pronase, 37°C, 90 min) ; ultracentrifugation (10 kDa) ; SPE (C ₁₈ -E)	n.d.	LC-ESI ⁺ -MS/MS (MRM)	Kinetex® XB-C ₁₈ (100 mm x 2,1 mm, 2,6 μ m) H ₂ O/ACN ; 0,2% AF (gradient)	LDD : 0,79 ng.mL ⁻¹ (HD dans sang)	[99]

Adduit albumine -HD (suite)	Matrice biologique	Procédure d'extraction de l'albumine	Procédure d'isolement et de purification de l'adduit	Rendement d'extraction ou de récupération	Méthode d'analyse	Colonne analytique et phase mobile	Sensibilité	Référence
HETE-CPF	Plasma (humain)	Purification de l'albumine par chromatographie d'affinité (cartouche Cibacron blue Sepharose artisanale) ; ultracentrifugation (10 kDa)	Digestion enzymatique (protéinase K, 50°C, 4h) ; ultracentrifugation (10 kDa)	96%	UHPLC-ESI ⁻ -MS/MS (MRM)	Zorbax Eclipse Plus C ₁₈ (50 mm x 2,1 mm, 1,8 µm) H ₂ O/ACN ; 0,2% AF (gradient)	LDD : 0,532 ng.mL ⁻¹ (HD dans plasma)	[100]
HETE-CPF	Plasma (humain)	PP (acétone) ; centrifugation	Digestion enzymatique (protéinase K, 50°C, 90 min, pH 7,8) ; SPE (Oasis® HLB)	n.d.	UHPLC-ESI ⁻ -MS/MS (MRM)	Kinetex® C ₁₈ (50 mm x 2,1 mm, 1,3 µm) H ₂ O/ACN ; 0,2% AF (gradient)	LDD : 1,74 ng.mL ⁻¹ (HD dans plasma)	[101]
HETE-CPF	Plasma (humain)			62%		Acquity UPLC BEH C ₁₈ (100 mm x 2,1 mm, 1,7 µm) H ₂ O/ACN ; 0,1% AF (gradient)	LDD : 1 ng.mL ⁻¹ (HD dans plasma)	[102]
HETE-CP	Plasma (humain)	Non nécessaire	Dilution du plasma avec NH ₄ HCO ₃ ; digestion enzymatique (pronase, 37°C, 4h) ; ultracentrifugation (10 kDa)	n.d.	µLC-ESI ⁺ -HRMS/MS (MRM)	Atlantis T3 (50 mm x 1,0 mm, 5 µm) H ₂ O/ACN ; 0,05% AF (gradient)	LDD : 1,56 ng.mL ⁻¹ (HD dans plasma)	[105]
HETE-CP	Plasma (humain)	Chromatographie d'affinité (ProteoExtract) ; ultracentrifugation (10 kDa)	Digestion enzymatique (pronase, 37°C, 2h) ; ultracentrifugation (10 kDa)	n.d.	LC-ESI ⁺ -MS/MS (MRM) ou µLC-ESI ⁺ -MS/MS (MRM)	Atlantis T3 (150 mm x 2,1 mm, 3 µm) H ₂ O/ACN ; 0,1% AF (gradient) ou Atlantis T3 (150 mm x 1,0 mm, 3 µm) H ₂ O/ACN ; 0,05% AF (gradient)	LDD : 8-16 ng.mL ⁻¹ (HD dans plasma)	[104]

Adduit albumine -HD (suite)	Matrice biologique	Procédure d'extraction de l'albumine	Procédure d'isolement et de purification de l'adduit	Rendement d'extraction ou de récupération	Méthode d'analyse	Colonne analytique et phase mobile	Sensibilité	Référence
AE-(HETE)-VSKL	Sang total (humain)	Centrifugation ; purification de l'albumine par chromatographie d'affinité (HiTrap® Blue Sepharose High Performance)	Digestion enzymatique (5 min, PorosZyme® -pepsine immobilisée -30 mm x 2,1 mm) en ligne avec colonne analytique	n.d.	LC-ESI ⁺ -MS/MS (<i>full scan</i> ions fils)	PepMap C ₁₈ (150 mm x 1,0 mm, 3 µm) H ₂ O/ACN ; 0,2% AF (gradient)	n.d. (Analyse qualitative)	[106]

AcNa : acétate de sodium ; **AE-(HETE)-VSKL** : adduit Ala-Glu-(HETE)-Val-Ser-Lys-Leu ; **AF** : acide formique ; **CGR** : culot de globules rouges ; **ESI⁺** : ionisation par électrospray en mode positif ; **HD** : ypérite ; **HETE** : hydroxyéthylthioéthyl ; **HETE-CP** : adduit HETE-Cys-Pro ; **HETE-CPF** : adduit HETE-CYS-Pro-Phe ; **HPLC** : chromatographie liquide à haute performance ; **LC** : chromatographie en phase liquide ; **LDD** : limite de détection ; **LDQ** : limite de quantification ; **MRM** : suivi de réactions multiples ; **MS/MS** : spectrométrie de masse en tandem ; **NaCl** : chlorure de sodium ; **n.d.** : non déterminé ; **NH₄HCO₃** : bicarbonate d'ammonium ; **PP** : précipitation de protéines ; **SPE** : extraction sur phase solide ; **T_{amb}** : température ambiante ; **UHPLC** : chromatographie liquide à ultra haute performance ; **µLC** : chromatographie en phase liquide miniaturisée.

I.3.3.1. Analyse des adduits formés avec l'albumine plasmatique

L'albumine, protéine majoritaire du plasma, a une concentration moyenne dans le sang variant entre 30 et 45 mg.mL⁻¹ et présente un temps de vie de 20 à 25 jours en moyenne chez l'Homme [92]. Elle est constituée d'une seule chaîne polypeptidique comprenant 585 acides aminés et 17 ponts disulfures, pour un poids moléculaire total d'environ 66,5 kDa [93]. Une étude radiochimique menée après exposition *in vitro* de sang total avec de l'ypérite marquée ¹⁴C a montré que l'alkylation de l'albumine augmentait linéairement avec la concentration en ypérite [57]. Cette étude a également permis de constater que le pourcentage d'ypérite liée de manière covalente à l'albumine était de l'ordre de 20%. Par analyse d'un digestat trypsique d'albumine provenant de sang exposé à de l'ypérite marquée ¹⁴C et isolée par précipitation séquentielle [94] (Figure 12), Noort *et al.* [95] ont découvert que la protéine était alkylée au niveau de l'acide aminé cystéine situé en position 34 sur la protéine (Cys³⁴). L'acide aminé Cys³⁴ est le seul résidu cystéine de la protéine portant un groupement thiol libre et a un pK_a relativement faible à cause de la stabilisation intramoléculaire de l'ion thiolate. Un des peptides résultant de la digestion enzymatique de l'albumine exposée à l'arme chimique par la pronase (mélange de protéases) est le tripeptide adduit (S-[2-[(hydroxyéthyl)thio]éthyl])-Cys-Pro-Phe (HETE-CPF), de séquence peptidique cystéine-proline-phénylalanine, et qui contient le résidu Cys³⁴ alkylé par l'ypérite (Figure 13).

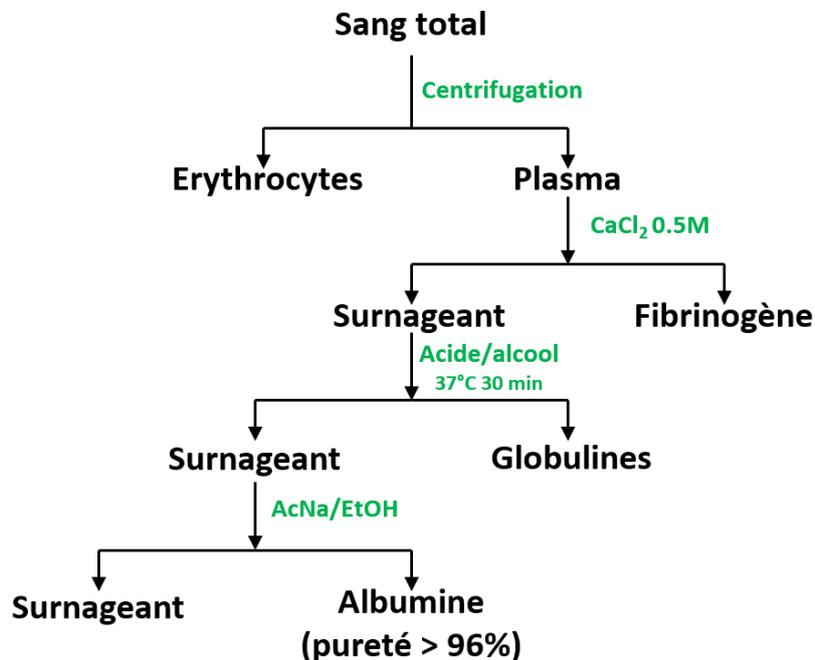


Figure 12. Procédure d'extraction de l'albumine plasmatique à partir du sang total par précipitation séquentielle. Adapté de [94].

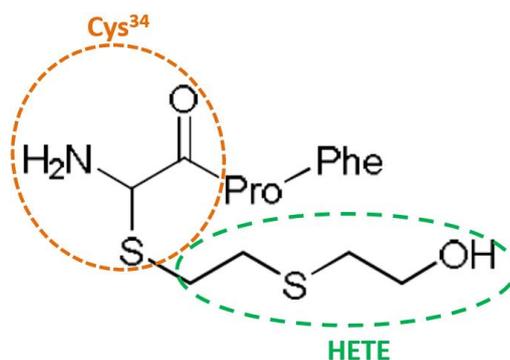


Figure 13. Structure du tripeptide (S-[2-[(hydroxyéthyl)thio]éthyl])-Cys-Pro-Phe (HETE-CPF) obtenu après digestion enzymatique de l'albumine alkylée par l'ypérite au niveau du résidu Cys³⁴. Chez le rat, le résidu phénylalanine (Phe) est remplacé par un résidu tyrosine (Tyr).

L'adduit HETE-CPF résultant de la digestion enzymatique de l'albumine adduite est principalement analysé par RPLC couplée à la spectrométrie de masse en tandem, avec une ionisation ESI⁺ et une détection en mode MRM, après une étape de purification par ultracentrifugation ou par SPE (voir **Tableau 4**) [95–102]. Toutefois, en raison de la complexité des échantillons biologiques, une procédure d'extraction de l'albumine doit être mise en place avant l'étape de digestion enzymatique par la pronase. Après centrifugation des échantillons de sang pour séparer le plasma des érythrocytes, l'albumine est extraite du plasma par précipitation séquentielle [95,101,102] ou par chromatographie d'affinité suivie d'une étape de dessalage [96–99]. Si la procédure initiale de précipitation séquentielle a permis d'atteindre une LDD correspondant à l'exposition *in vitro* du sang à une concentration de 10 nmol.L⁻¹ en ypérite (soit 1,56 ng.mL⁻¹) [95] et a démontré son potentiel lors de l'analyse d'échantillons de sang de 9 victimes du conflit Iran-Irak, prélevés entre 8 et 10 jours après une attaque à l'ypérite et conservés pendant plus de 10 ans à -70°C, l'intervention de la chromatographie d'affinité a permis de simplifier l'étape de préparation des échantillons et de rapidement isoler la protéine du sang total, tout en conservant la bonne sensibilité de la détection (LDD correspondant à une exposition à des teneurs en ypérite comprises entre 0,8 et 8 ng.mL⁻¹) [96–99]. Cette méthode a ainsi permis de détecter le tripeptide alkylé HETE-CPF dans les échantillons de plasma d'un individu ayant été accidentellement exposé à l'ypérite jusqu'à 42 jours après son exposition à l'arme chimique [10]. Noort *et al.* [98] ont utilisé la même méthode pour détecter le tripeptide adduit (S-[2-[(hydroxyéthyl)thio]éthyl])-Cys-Pro-Tyr (HETE-CPY) dans le sang de rats exposés à l'ypérite par voie intraveineuse. L'adduit HETE-CPY a pu être détecté jusqu'à 7 jours après l'exposition à l'arme chimique, ce qui était en parfaite adéquation avec la durée de demi-vie de l'albumine chez le rat. Enfin, Andacht *et al.* [99] ont transféré la méthode initialement décrite par Noort *et al.* [96] au format des microplaques 96-puits, permettant de gagner en robustesse et de traiter un nombre plus important d'échantillons. En outre, le volume de plasma requis a été divisé par un facteur 2,5 (200 µL analysés contre 1 mL [96]) sans perte de sensibilité. Qui

plus est, bien que Young *et al.* [103] aient montré que l'albumine isolée à l'aide d'un kit SwellGel® Blue, utilisé au format 96 puits, ait une pureté inférieure à celle de l'albumine purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne (78% contre 88%), ils ont aussi remarqué que l'utilisation du kit commercial donnait lieu à des signaux d'intensité plus élevée. De fait, l'utilisation de plaques 96-puits pour la préparation des échantillons semble bien adaptée pour la détection du tripeptide issu de l'alkylation de l'albumine par l'ypérite.

Toutes les méthodes développées pour l'analyse de l'adduit HETE-CPF sont cependant limitées par la disponibilité de pronase ayant l'activité requise. En effet, Andacht *et al.* [99] ont examiné des nouveaux lots de pronase de trois fournisseurs différents et n'ont pas été en mesure d'identifier un seul lot générant le même niveau de tripeptide adduit HETE-CPF que les anciens lots de pronase. Comme la pronase est un mélange d'enzymes habituellement utilisé pour digérer intégralement les protéines et obtenir les acides aminés sous forme individuelle, les auteurs ont supposé que les nouveaux lots de pronase commercialement disponibles digéraient plus efficacement l'albumine à proximité du site d'alkylation, résultant ainsi en une totale digestion du tripeptide d'intérêt et donc en une perte de signal pour le biomarqueur. Ainsi, Gandor *et al.* [104] ont constaté lors de leur étude que la digestion de l'albumine alkylée avec des lots récents de pronase générait principalement le dipeptide HETE-CP au lieu du tripeptide précédemment mentionné. John *et al.* [105] ont par la suite optimisé la méthode de Gandor *et al.* [104] en utilisant la μ LC-HRMS-MS pour cibler directement le dipeptide alkylé dans des échantillons de plasma humain. L'utilisation d'un spectromètre de masse hybride quadripôle-temps de vol (Q-TOF) a permis d'obtenir une très haute résolution en masse en mode pseudo MRM, conduisant ainsi à une très bonne sélectivité et une très bonne sensibilité puisqu'une LDD correspondant à une concentration de $9,8 \text{ nmol.L}^{-1}$ ($1,56 \text{ ng.mL}^{-1}$) en ypérite dans le plasma a pu être atteinte et ce, sans étape d'extraction de l'albumine par chromatographie d'affinité, ce qui a permis de simplifier la procédure de préparation des échantillons et de réduire la durée de cette étape.

Il a été suggéré que le fait de choisir une enzyme plus spécifique permettrait d'éviter les problèmes liés à la variabilité de l'activité des nouveaux lots de pronase [99,104]. Cela permettrait également de réduire la quantité d'enzyme nécessaire pour la digestion de l'albumine, diminuant ainsi le nombre de peptides obtenus dans le digestat, ce qui conduirait à moins de suppression d'ions et à une meilleure sensibilité. Toutefois, l'utilisation de la trypsine, enzyme de choix dans le domaine de la protéomique pour identifier et caractériser les protéines, n'est pas adaptée pour l'analyse des adduits formés lors de l'alkylation de l'albumine par l'ypérite. En effet, comme l'ont noté Noort *et al.* dans leur étude initiale [95], le signal du peptide alkylé issu de la digestion trypsique de l'albumine s'est avéré beaucoup moins sensible que celui obtenu par le peptide issu de la digestion de la protéine avec la pronase, et

des interférences ont également été observées au voisinage du pic chromatographique du peptide. La perte de sensibilité était très probablement due à la taille du peptide résultant de la digestion de la protéine par la trypsine : la trypsine génère en effet un peptide constitué de 21 acides aminés, comprenant le site d'adduction, ce qui produit plusieurs espèces multichargées lors de l'ionisation par électrospray et diminue d'autant l'intensité du signal. Afin de réaliser une analyse quantitative de qualité, il est nécessaire de choisir une enzyme qui donne lieu à de plus petits peptides, puisque cela permet d'obtenir une distribution de charges plus étroite et donc une amélioration de la sensibilité. Par conséquent, Andacht *et al.* [99] ont suggéré que l'utilisation de la chymotrypsine pourrait être intéressant, puisque cette enzyme génère un hexapeptide comprenant le site d'alkylation lors de la digestion de l'albumine exposée à l'ypérite. Toutefois, aucune étude utilisant la chymotrypsine pour l'analyse d'adduits albumine-ypérite n'a été publiée pour le moment.

Liu *et al.* [100] ont modifié la méthode de Noort *et al.* [96] en isolant l'albumine du plasma par chromatographie d'affinité et en la digérant avec la protéinase K afin d'obtenir le tripeptide d'intérêt HETE-CPF. Le biomarqueur a pu être analysé directement par chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UHPLC-MS/MS), après une étape d'ultracentrifugation. Les modifications apportées ont permis de réduire le volume de plasma requis (100 μL) et de simplifier la procédure de préparation des échantillons. En plus d'être simple, cette méthode a également démontré être robuste, fiable, répétable et sensible, avec une LDD de 0,532 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ inférieure à celle obtenue par Andacht *et al.* [99]. Pantazides *et al.* [101] ont également utilisé la protéinase K pour digérer l'albumine, après précipitation totale des protéines contenues dans les échantillons de sang avec de l'acétone, en transférant la méthode précédente au format microplaques et en obtenant une LDD de 1,74 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, confirmant ainsi l'intérêt de ces dernières pour l'analyse des adduits albumine-ypérite. Braun *et al.* [102] ont récemment optimisé la méthode proposée par Pantazides *et al.* [101] et ont comparé différents lots de protéinase K provenant de trois fournisseurs différents. Ils ont remarqué que la source et les méthodes utilisées pour isoler l'enzyme, qui diffèrent selon les fournisseurs, avaient un impact important sur la digestion de l'albumine. En effet, selon la protéinase K utilisée pour digérer la protéine, le taux de récupération du tripeptide biomarqueur HETE-CPF variait entre 30 et 62%.

Carol-Visser *et al.* [106] ont proposé une méthode alternative pour démontrer une exposition à l'ypérite par détection des peptides alkylés. Afin d'identifier les peptides les plus abondants, les auteurs ont procédé à la digestion en solution par la pepsine de l'albumine extraite d'échantillons de sang exposés à de hautes doses d'ypérite. Plusieurs peptides contenant le résidu Cys³⁴ alkylé ont été identifiés, correspondant au tripeptide adduit HETE-CPF classiquement analysé après digestion de

l'albumine par la pronase. Toutefois, Carol-Visser *et al.* [106] ont constaté que les peptides modifiés au niveau de la Cys³⁴ n'étaient pas les peptides adduits les plus abondants. Ils ont en effet observé un certain nombre de peptides pour lesquels le fragment HETE était attaché à un résidu acide glutamique. Parmi ces peptides, le peptide de séquence Ala-Glu-(HETE)-Val-Ser-Lys-Leu (AE-(HETE)-VSKL) s'est avéré être le plus abondant après la digestion de l'albumine par la pepsine. Des analyses ultérieures, effectuées par digestion enzymatique de l'albumine par la pepsine immobilisée sur support solide à base de polystyrène hydrophile, ont confirmé les résultats qualitatifs obtenus avec la digestion en solution. Cette digestion sur cartouche de pepsine commerciale a été couplée en ligne avec l'analyse en LC-MS/MS. Ce montage présente de nombreux avantages, notamment des temps de digestion courts (temps de résidence de l'albumine sur la cartouche de pepsine : 5 min) et une limitation des manipulations des échantillons, ce qui permet de traiter plus d'échantillons en un temps donné. Bien que l'étude menée par Carol-Visser *et al.* [106] n'ait été que qualitative, il a été estimé qu'une exposition *in vitro* à l'ypérite à des concentrations de quelques $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (soit environ 160 ng.mL^{-1}) pouvait être facilement détectée avec le montage expérimental utilisé lors de l'étude (détection par spectrométrie de masse en tandem avec un analyseur en masse Q-TOF hybride). Pour des concentrations inférieures à $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$, les auteurs ont envisagé que le peptide alkylé majoritaire AE-(HETE)-VSKL pouvait être analysé à l'aide d'un triple quadripôle opérant en mode MRM, ce qui permettrait d'améliorer la sensibilité de la méthode.

Afin de limiter les effets de matrice et de réduire le bruit de fond pouvant être parfois observé sur les chromatogrammes obtenus lors de l'analyse LC-MS/MS des adduits albumine-ypérite, des procédures d'extraction sélectives, permettant de faire la distinction entre les résidus cystéines alkylés et non alkylés des chaînes d'albumine et donc d'enrichir les échantillons avec les adduits d'intérêt, pourraient s'avérer très utiles. Cela engendrait notamment un gain de sensibilité et donc une amélioration des LDD pouvant être atteintes, comme l'ont souligné Funk *et al.* [107], ce qui rendrait possible la détection des adduits sur une plus longue période. Toutefois, la principale limitation à l'utilisation des adduits avec l'albumine comme biomarqueurs d'exposition à l'ypérite est leur caractère rétrospectif plus limité. Ils ne peuvent en effet être utilisés comme preuve d'intoxication que dans les premières semaines suivant une exposition à l'ypérite, du fait de leur élimination plus rapide de l'organisme, par comparaison avec les adduits hémoglobine-ypérite.

1.3.3.2. Alkylation des résidus acide aspartique et acide glutamique

Comme mentionné dans la partie portant sur les métabolites de faible durée de vie de l'ypérite (voir section 1.2.4), les protéines, et notamment l'albumine et l'hémoglobine, possèdent de nombreux résidus acides aspartiques et acides glutamique. Avec un nombre important de fonctions acides

carboxyliques « libres » associées à ces résidus et pouvant réagir avec l'ypérite via des liaisons esters, il pourrait donc être attendu d'observer une quantité élevée d'adduits protéines-ypérite sur ces résidus par comparaison avec les adduits formés au niveau des autres résidus, notamment le résidu ³⁴Cys de l'albumine. Cependant, les liaisons esters sont très sensibles à l'hydrolyse catalytique ayant lieu dans le système circulatoire, ce qui conduit à une diminution rapide de la concentration des esters protéines-HETE [46]. De fait, aucune méthode ciblant directement les adduits formés avec les protéines au niveau des résidus acides aspartiques et glutamiques n'a été développée à ce jour. En revanche, comme décrit dans la première partie de ce rapport, TDG peut être libéré des protéines sanguines estérifiées par l'ypérite au niveau des résidus acides glutamiques et aspartiques lors d'une étape d'hydrolyse acide ou basique, ce qui permet d'élargir la fenêtre de détection de ce métabolite de faible durée de vie. Toutefois, cette fenêtre de détection reste bien inférieure à celle pouvant être observée pour les adduits que l'ypérite forme avec les protéines. Le clivage de TDG des protéines sanguines, très chronophage, est donc peu utilisé pour prouver une exposition à l'ypérite.

I.3.3.3. Adduits formés avec la kératine

Les protéines de la peau sont l'une des premières cibles adduites par l'ypérite lors d'une exposition à l'agent chimique. Une étude a démontré que, lors d'une exposition à l'ypérite marquée ¹⁴C, une importante proportion de la radioactivité était liée à la kératine [108]. Puisque la majeure partie (80%) de la radioactivité liée à la protéine a été éliminée lors d'un traitement alcalin, cela a suggéré que la kératine était adduite au niveau de résidus acide glutamique et/ou aspartique.

Van der Schans *et al.* [108] ont développé une méthode pour détecter les adduits kératine-ypérite dans des échantillons de peau humaine. Brièvement, plusieurs séquences de kératine alkylée par l'ypérite ont été utilisées comme antigènes de manière à produire des anticorps. Des anticorps monoclonaux, présentant une affinité pour la kératine adduite, ont ainsi été obtenus. Contrairement aux procédures immunochimiques mises en œuvre pour l'analyse des adduits ADN-ypérite qui sont chronophages et laborieuses, cette méthode a été présentée comme prometteuse pour le développement potentiel d'un kit simple et rapide, appliqué directement sur la peau, pour la détection de biomarqueurs d'exposition à l'ypérite. Ce projet n'a cependant pas abouti et, le prélèvement d'échantillons de peau étant beaucoup plus invasif et difficile que le prélèvement d'échantillons d'urine ou de sang, les adduits kératine-ypérite sont très rarement utilisés comme biomarqueurs.

I.4. Conclusions

Ce premier chapitre a présenté les principales procédures analytiques mises en œuvre au cours des cinq dernières décennies pour la détection des biomarqueurs de l'ypérite dans les matrices biologiques

telles que les urines et le sang, afin de confirmer une exposition à l'arme chimique à court et moyen termes. Certaines de ces procédures peuvent cibler directement l'agent chimique mais, en raison de sa forte réactivité et de sa faible durée de vie dans les conditions physiologiques, la plupart des méthodes ont été développées pour l'analyse de ses métabolites ou des adduits qu'il forme avec l'ADN ou les protéines. Si des méthodes de marquage au ^{32}P et essais immunochimiques ont été développées à cette fin, l'analyse par chromatographie en phase liquide ou gazeuse, couplée à la spectrométrie de masse, est cependant la méthode la plus utilisée pour la détection des biomarqueurs d'exposition à l'ypérite. Toutefois, la LC a tendance à être davantage utilisée puisque, à la différence de la GC, elle ne nécessite pas d'étape de dérivation de composés avant leur analyse. En outre, si la GC est largement utilisée pour l'analyse des composés résultant de l'hydrolyse et/ou de l'oxydation de l'ypérite et de sa réaction avec le glutathion, présentant tous l'inconvénient majeur d'être rapidement éliminés de l'organisme dans les urines, la LC est fréquemment employée pour l'analyse des biomarqueurs de plus longue durée de vie, à savoir les adduits formés avec l'ADN ou l'albumine. En outre, si la plupart des procédures analytiques développées pour les métabolites urinaires sont plus simples et moins chronophages comparées à celles mises en œuvre pour l'analyse des adduits formés avec les macromolécules de l'organisme, aucune trace d'adduits ADN-ypérite ou albumine-ypérite n'a été détectée dans échantillons biologiques provenant de personnes n'ayant pas été exposées à l'ypérite, contrairement aux métabolites TDG et TDGO.

Au cours des dernières années, le traitement des échantillons a été grandement amélioré et simplifié dans le but de réduire la durée de cette étape généralement très chronophage. Ainsi, il est désormais possible d'analyser des centaines d'échantillons en une seule journée, ce qui peut être très utile en cas d'attaque terroriste avec de nombreuses victimes. En outre, les volumes d'échantillons requis pour les analyses ont été réduits à quelques microlitres et plusieurs méthodes analytiques peuvent détecter les biomarqueurs à des concentrations inférieures à 1 ng.mL^{-1} . L'amélioration de la sensibilité des méthodes rend possible la confirmation d'exposition à de faibles doses d'ypérite. Cependant, la fenêtre de détection des adduits que l'ypérite forme avec l'ADN et l'albumine est trop restreinte pour être en mesure de confirmer un empoisonnement à l'arme chimique lorsque les échantillons ne sont disponibles que plusieurs semaines après une exposition supposée. De fait, d'autres biomarqueurs d'exposition doivent être ciblés afin de confirmer une exposition à l'ypérite après une longue période. Les adduits que l'ypérite forme avec l'hémoglobine peuvent être détectés dans les échantillons sanguins des victimes pendant plusieurs mois, s'inscrivant ainsi comme des biomarqueurs de longue durée de vie. Les principales procédures développées pour leur analyse seront donc présentées en détail dans le second chapitre de ce manuscrit.

CHAPITRE II

ANALYSE DES ADDUITS AVEC L'HEMOGLOBINE DANS
LES ECHANTILLONS SANGUINS POUR LA
CONFIRMATION RETROSPECTIVE A LONG TERME
D'EXPOSITION A L'YPERITE

Chapitre II : Analyse des adduits avec l'hémoglobine dans les échantillons sanguins pour la confirmation rétrospective à long terme d'exposition à l'ypérite

II.1. Etat de l'art sur les méthodes d'analyse des adduits hémoglobine-ypérite

II.1.1. Structure de l'hémoglobine et réaction avec l'ypérite

Une protéine très communément étudiée lors d'une exposition à l'ypérite est l'hémoglobine. Protéine majoritaire dans les globules rouges et responsable de leur couleur, l'hémoglobine est l'une des protéines les plus abondantes dans le sang, avec une concentration moyenne de 150 mg.mL^{-1} chez l'Homme et une durée de vie de 120 jours environ [62]. Le type d'hémoglobine le plus courant chez l'Homme adulte est l'hémoglobine A. Il s'agit d'un tétramère de masse moléculaire moyenne 64 458 Da constitué de quatre chaînes polypeptidiques identiques deux à deux : deux chaînes alpha (globine α) composées de 141 acides aminés ($M = 15\,126 \text{ Da}$) et deux chaînes bêta (globine β) comprenant 146 acides aminés ($M = 15\,867 \text{ Da}$). Cette structure est symbolisée par $\alpha_2\beta_2$. Chacune des quatre sous-unités contient une molécule d'hème, qui constitue le groupement prosthétique de la protéine [109] (voir **Figure 14**). Chaque groupement hème comprend un ion ferreux Fe^{2+} qui peut se lier à une molécule de dioxygène via des interactions électrostatiques, permettant ainsi le transport de l'oxygène dans le sang.

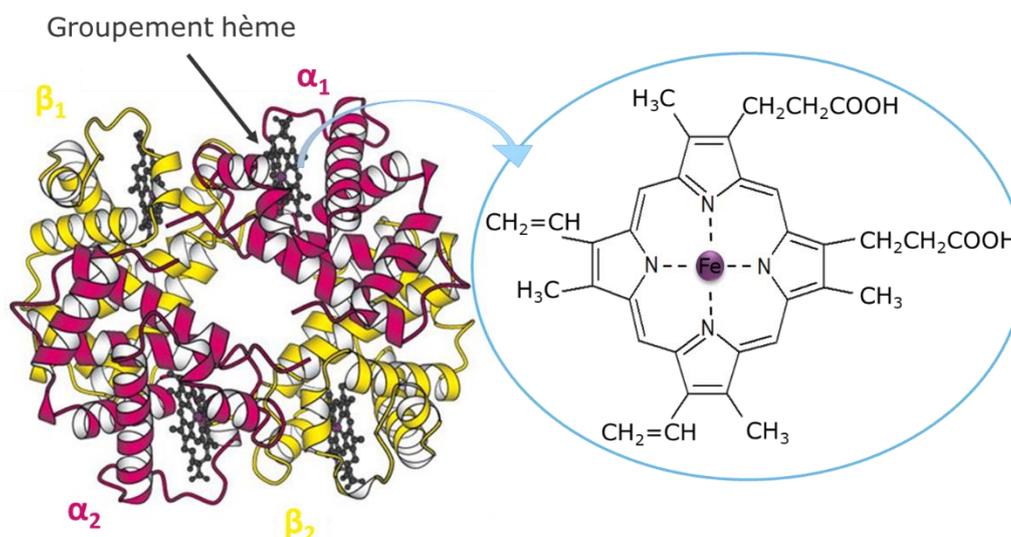


Figure 14. Structure de l'hémoglobine humaine (hémoglobine A). Adapté de [109].

Des études menées sur du sang incubé avec de l'ypérite marquée ^{35}S et ^{13}C ont permis de montrer, après digestion trypsique, que l'alkylation de l'hémoglobine par l'ypérite avait lieu sur les deux résidus valine N-terminaux des chaînes α et β , ainsi que sur six résidus histidines différents et trois résidus acides glutamiques [12,110]. Des résidus cystéine, acide aspartique, lysine et tryptophane alkylés ont également été détectés lors de la digestion non sélective de l'hémoglobine par la Pronase E [110]. Noort *et al.* ont par ailleurs montré qu'il existait une relation quasi linéaire entre le niveau d'exposition à l'ypérite et le degré d'alkylation de l'hémoglobine et que, lors d'une exposition à l'arme chimique, environ 25% de l'ypérite se liait de manière covalente à l'hémoglobine [12,57].

Les principales procédures mises en œuvre pour extraire l'hémoglobine des échantillons de sang, ainsi que les méthodes utilisées pour analyser les adduits hémoglobine-ypérite, sont détaillées dans le **Tableau 5**.

Tableau 5. Principales méthodes d'analyse des adduits hémoglobine-ypérite dans les échantillons de sang total.

Adduit(s) Hb-HD	Matrice biologique	Procédure d'extraction de l'hémoglobine	Procédure d'isolement et de purification de l'adduit	Agent de dérivation	Méthode d'analyse	Colonne analytique et gaz vecteur/phase mobile	Sensibilité	Référence
HETE-Val	Sang total (humain)	Centrifugation ; lavage CGR avec PBS ; hémolyse avec eau pure ; élimination débris cellulaires ; précipitation globine avec HCl 1% dans acétone	Clivage adduit avec dégradation d'Edman (PFPIITC, T _{amb} 1 nuit puis 45°C 2h) ; LLE (éther diéthylique) ; LLE (H ₂ O) ; dérivation ; LLE (tampon phosphate, pH 6,0)	HFBA (45°C, 10 min)	GC-NCI(CH ₄)-MS (SIM)	CP-Sil 5 CB (50 m x 0,32 mm, 0,25 µm) Hélium	LDD : 15,9 ng.mL ⁻¹ (sang)	[111]
HETE-Val	Sang total (humain)		Clivage adduit avec dégradation d'Edman (PFPIITC, 60°C 2h) ; dérivation	HFBI (45°C, 10 min)	TCT-GC- NCI(CH ₄)-MS (SIM)		LDD : 4,77 ng.mL ⁻¹ (sang)	[57]
HETE-Val	Sang total (rat)		Clivage adduit avec dégradation d'Edman (PFPIITC, T _{amb} 1 nuit puis 60°C 2h) ; LLE (toluène) ; LLE (H ₂ O) ; dérivation ; SPE (Florisil®) ; dérivation	HFBI (60°C, 30 min)	GC-NCI(CH ₄)-MS (SIM)	Restek 451548 Rtx-5Sil- MS (30 m x 0,25 mm, 1 µm) Hélium	n.d.	[98]
HETE-Val	Sang total (humain)		Clivage adduit avec dégradation d'Edman (PFPIITC, 60°C 2h) ; LLE (toluène) ; SPE (Florisil®) ; dérivation			CP-Sil 5 CB (50 m x 0,32 mm, 0,25 µm) ou Hewlett-Packard HP-5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) Hélium	LDD : 15,9 ng.mL ⁻¹ (sang)	[17]
HETE-Val	Sang total (humain)		Clivage adduit avec dégradation d'Edman (PFPIITC, 45°C 2h) ; LLE (éther) ; SPE (Florisil®) ; dérivation	HFBI (60°C, 30 min)	GC-NCI(CH ₄)-MS (SIM)	HP-5MS (25 m x 0,2 mm, 0,33 µm) Hélium	LDD : 3,18 ng.mL ⁻¹ (sang)	[121]

Adduit(s) Hb-HD (suite)	Matrice biologique	Procédure d'extraction de l'hémoglobine	Procédure d'isolement et de purification de l'adduit	Agent de dérivation	Méthode d'analyse	Colonne analytique et gaz vecteur/phase mobile	Sensibilité	Référence
HETE-Val et HETE- His	Sang total (humain)	Dilution sang total avec eau pure pour hémolyse des érythrocytes; centrifugation ; PP avec HCl dans iPrOH ; précipitation globine avec AcEt ; filtration ; lavage globine avec AcEt et éther	HETE-Val : clivage adduit avec dégradation d'Edman (PFITC, T _{amb} 1 nuit puis 45°C 2h) ; LLE (éther diéthylique) ; LLE (H ₂ O) ; dérivation OU hydrolyse acide globine (6M HCl, 110°C, 24h) ; filtration (PVDF, 0,45 µm) ; SPE (Bond Elut® C ₁₈) ; dérivation HETE-His : hydrolyse acide globine (6M HCl, 110°C, 24h) ; filtration (PVDF, 0,45 µm) ; SPE (PRS) ; dérivation	HETE-Val : HFBA (40°C, 30 min) ou TBDMSCI (85°C, 1h) HETE-His : Fmoc (T _{amb} , 5 min)	HETE-Val : GC- NCI(CH ₄)-MS (SIM) ou GC- PCI(NH ₃)- MS/MS (MRM) ou GC-IE-MS (SIM) HETE-His : LC- ESI ⁺ -MS/MS (MRM)	HETE-Val : BPX5 (25 m x 0,22 mm, 0,25 µm) ou BP1 (25 m x 0,22 mm) Hélium HETE-His : Hichrom RPB (250 mm x 2,1 mm) H ₂ O/ACN ; 0,1% AF (gradient)	LDD (HETE-Val) : 0,16 ng.mL ⁻¹ (Edman), 10 ng.mL ⁻¹ (hydrolyse acide, GC-PCI-MS/MS), 5-10 ng.mL ⁻¹ (hydrolyse acide, GC-IE-MS) LDD (HETE-His) : 0,7 ng.mL ⁻¹ (sang)	[112]

AcEt : acétate d'éthyle ; **CGR** : culot de globules rouges ; **ESI⁺** : ionisation électrospray en mode positif ; **Fmoc** : chlorure de 9-fluoroénylméthoxycarbonyl ; **GC** : chromatographie en phase gazeuse ; **HD** : ypérite ; **HETE** : hydroxyéthylthioéthyl ; **HETE-His** : adduit hydroxyéthylthioéthyl-histidine ; **HETE-Val** : adduit hydroxyéthylthioéthyl-valine ; **HFBA** : anhydride heptafluorobutyrique ; **HFBI** : heptafluorobutyrylimidazole ; **iPrOH** : isopropanol ; **LC** : chromatographie en phase liquide ; **LDD** : limite de détection ; **LLE** : extraction liquide/liquide ; **MRM** : suivi de réactions multiples ; **MS** : spectrométrie de masse ; **MS/MS** : spectrométrie de masse en tandem ; **NCI** : ionisation chimique en mode négatif ; **PBS** : tampon phosphate salin ; **PCI** : ionisation chimique en mode positif ; **PFITC** : isothiocyanate de pentafluorophényl ; **PP** : précipitation de protéines ; **PRS** : acide propylsulfonique ; **PVDF** : fluorure de polyvinylidène ; **SIM** : suivi sélectif d'ions ; **SPE** : extraction sur phase solide ; **T_{amb}** : température ambiante ; **TBDMSCI** : chlorure de tert-butyl diméthylsilyl ; **TCT** : thermodésorption - piège à froid.

II.1.2. Procédures d'extraction et de purification de l'hémoglobine des échantillons sanguins

II.1.2.1. Hémolyse des érythrocytes

En principe, toutes les procédures employées pour l'analyse des adduits formés avec les protéines lors de l'exposition à une arme chimique telle que l'ypérite comprennent les étapes suivantes : extraction de la protéine, clivage de l'acide aminé ou du peptide adduit de la protéine, isolement de l'adduit détaché et analyse des adduits obtenus après une potentielle étape de dérivation. Dans le cas de l'analyse des adduits hémoglobine-ypérite, il est nécessaire d'extraire au préalable la globine présente dans les érythrocytes. Pour cela, comme en témoignent les données répertoriées dans le **Tableau 5**, ces derniers sont tout d'abord isolés du plasma sanguin par centrifugation, avant d'être lavés avec une solution saline, dans le but d'éliminer toute trace de protéine plasmatique [17,57,92,98,111]. Une étape de lyse des érythrocytes est ensuite indispensable avant de pouvoir extraire et isoler l'hémoglobine adduite ou non. Cette hémolyse est le plus souvent réalisée dans des milieux hypotoniques tels que l'eau pure (méthode actuellement utilisée au sein de la DGA) [17,57,98,111,112], une solution saline ($\text{NaCl } 0,01 \text{ mol.L}^{-1}$) [113] ou un tampon salin à pH physiologique (Tris-HCl 5 mM, pH 7,4)[113]. Dans ces conditions, l'hémolyse prend plusieurs heures (24h à 8°C ou 1h à -80°C), puis les débris cellulaires et les impuretés sont éliminés par centrifugation et filtration.

Les érythrocytes peuvent également être hémolysés par sonication à froid [113]. Andrade *et al.* [113] ont reporté que l'hémolyse réalisée avec les ultrasons permettait de récupérer l'hémoglobine à des concentrations plus élevées que celles obtenues avec les autres méthodes précédemment citées. En outre, la lyse des érythrocytes par sonication a l'avantage d'être très rapide, puisqu'elle ne prend que 5 min. Dans le cadre d'une étude portant sur le développement d'une nouvelle procédure d'extraction de l'hémoglobine à partir d'échantillons sanguins purs, Vanjari *et al.* [114] ont proposé une méthode permettant de réaliser simultanément l'hémolyse des érythrocytes et l'extraction de l'hémoglobine et ce, sans utiliser de tampon de lyse. Cette méthode repose sur l'utilisation de membranes filtrantes en acétate de cellulose, ayant été modifiées par incorporation de chlorure d'ammonium et de bicarbonate de potassium, qui agissent comme des agents de lyse. La taille des pores de ces membranes est telle que l'hémoglobine peut passer à travers les membranes, contrairement aux autres composants cellulaires et aux érythrocytes non hémolysés (voir **Figure 15**). Les auteurs ont reporté des concentrations d'hémoglobine purifiée supérieures à celles obtenues avec les méthodes de lyse classiques. Ils ont ainsi montré que leur méthode permettait d'obtenir des concentrations d'hémoglobine environ 3 fois supérieures à celles obtenue lors d'une hémolyse réalisée avec de l'eau pure. En effet, en plus d'être un agent de lyse, l'eau dilue également les culots globulaires, alors que

l'utilisation d'un tampon de dilution est évitée lors de la lyse effectuée sur les membranes. Toutefois, cette procédure est plus onéreuse et plus chronophage qu'une hémolyse réalisée par sonication.

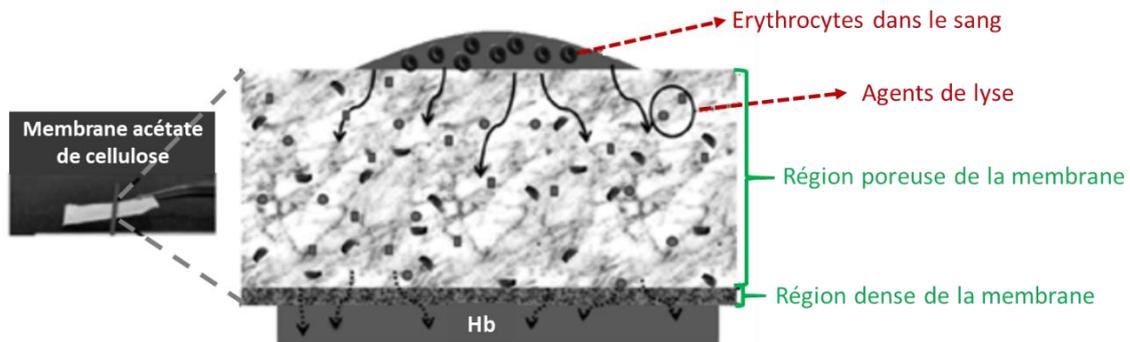


Figure 15. Représentation schématique de la coupe transversale de la membrane d'acétate de cellulose utilisée pour la lyse sans tampon des érythrocytes présents dans le sang. Adapté de [114].

II.1.2.2. Isolement et purification de l'hémoglobine contenue dans les hémolysats

Une fois la lyse des érythrocytes effectuée, la globine est isolée de l'hémolysat et purifiée, généralement par précipitation. La méthode actuellement utilisée par la DGA est une méthode classique impliquant l'acidification de l'hémolysat avec HCl 50 mM dans l'isopropanol, suivie d'une centrifugation à 3 500 g [115]. Cette étape résulte en la précipitation des membranes cellulaires, permettant ainsi leur élimination, mais permet aussi de retirer l'hème de l'hémoglobine [58]. La globine présente dans le surnageant est ensuite précipitée par ajout d'un volume équivalent d'acétate d'éthyle, et le mélange est incubé à 4°C pendant 3,5h. Après centrifugation, le précipité blanc obtenu, correspondant à la globine, est lavé deux fois avec 15 mL d'acétate d'éthyle et une fois avec 15 mL d'hexane, puis le solvant est évaporé sous flux d'azote.

La précipitation de la globine peut aussi être réalisée avec HCl 1% dans l'acétone [116]. La précipitation avec HCl-acétone nécessite cependant que les membranes cellulaires soient auparavant éliminées par centrifugation à 20 000 g. Des méthodes alternatives de purification de l'hémoglobine ont également été proposées, parmi lesquelles une précipitation sélective de la protéine à partir de lysats de sang total par des solvants organiques, tels que les alcools, ou par des cations métalliques, tels que Zn^{2+} , qui forment des complexes avec la protéine lorsque du chlorure de zinc est ajouté dans un excès molaire de 10-15 par rapport à l'hémoglobine [117]. Contrairement aux solvants organiques, la formation de complexes avec les ions métalliques résulte en une précipitation réversible, ce qui rend possible la renaturation de la protéine en utilisant des agents chélatants forts comme l'EDTA. Enfin, plus récemment, Elmer *et al.* [118] ont décrit une méthode permettant de purifier l'hémoglobine en utilisant la chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC). Cette procédure fait également intervenir deux étapes de filtration à flux tangentiel (TFF), d'une part pour éliminer les virus

et les grosses impuretés pouvant être présents dans l'hémolysat avant de le purifier sur IMAC, et d'autre part pour concentrer les échantillons et éliminer les complexes Zn/EDTA. Bien qu'elle permette d'obtenir l'hémoglobine sous forme très pure (pureté proche de 100%), cette méthode présente toutefois l'inconvénient d'être très onéreuse.

II.1.3. Procédures d'isolement et d'analyse des adduits hémoglobine-ypérite

Une fois l'hémoglobine extraite des échantillons de sang et purifiée, les acides aminés alkylés lors de l'exposition à l'ypérite peuvent être isolés du reste de la chaîne peptidique avant d'être analysés.

Les adduits formés avec les valines N-terminales (N-HETE-Val) représentent seulement 1 à 2% de l'alkylation totale induite lors d'une exposition à l'ypérite [62]. Cependant, leur position en bout de chaîne peptidique leur permet de pouvoir être facilement séparés de l'hémoglobine, grâce à une procédure d'Edman modifiée [119] (voir **Figure 16**). Dans cette procédure, décrite initialement par Törnqvist *et al.* [120] pour d'autres agents alkylants, l'hémoglobine préalablement isolée des échantillons de sang total est dissoute dans du formamide, puis incubée à pH neutre avec l'isothiocyanate de pentafluorophényle (PFPICT) ou l'isothiocyanate de phényle (PITC), utilisés comme agents de clivage, pendant une nuit à température ambiante, puis le mélange réactionnel est chauffé à 45°C pendant 2h. La valine N-terminale alkylée ainsi dérivée est extraite dans de l'éther diéthylique. Après évaporation du solvant, le résidu pentafluorophénylthiohydantoïne (PFPTH) obtenu est redissout dans du toluène. Après une étape de dérivation supplémentaire avec HFBA ou HFBI pour améliorer la volatilité et/ou la stabilité de l'analyte, le composé résultant peut être analysé en GC-MS/MS, le plus souvent avec une ionisation réalisée en mode négatif [17,57,98,111,112,121]. Fidler *et al.* [111] ont ainsi pu détecter la valine adduite après exposition *in vitro* de sang humain à des concentrations d'ypérite supérieures à 100 nmol.L⁻¹ (15,9 ng.mL⁻¹). Black *et al.* [112] ont atteint une LDD dix fois plus petite après dérivation de l'adduit avec HFBA, et ont pu détecter cet adduit après incubation *in vitro* du sang à des concentrations inférieures à 10 nmol.L⁻¹ (0,16 ng.mL⁻¹). Il est à noter toutefois que, contrairement à Fidler *et al.* [111], l'hémoglobine isolée par Black *et al.* [112] n'était pas pure et contenait certaines impuretés plasmatiques. En utilisant cette méthode, la valine N-terminale alkylée a pu être détectée dans les échantillons de sang de deux individus prélevés entre 22 et 26 jours après leur exposition à l'ypérite au cours du conflit Iran-Irak [59].

Par la suite, Noort *et al.* [57] ont proposé des modifications afin de simplifier et de raccourcir la procédure de dégradation d'Edman. Ainsi, cette étape a été réalisée par chauffage à 60°C pendant 2h, au lieu d'une incubation à température ambiante pendant une nuit suivie d'un chauffage à 45°C pendant 2h. De plus, le mélange réactionnel a seulement été extrait par LLE avec du toluène, laissant de côté la première étape d'extraction avec l'éther diéthylique. La procédure originale et la procédure

simplifiée appliquées à de l'hémoglobine ayant été isolée à partir d'échantillons de sang exposés à l'ypérite marquée ^{14}C ont conduit à des résultats similaires. De plus, pour diminuer la LDD, Noort *et al.* [57] ont également proposé le piégeage à froid des composés sur tube Tenax (injection TCT, *thermodesorption cold trap*), suivi d'un transfert en GC-MS par thermodésorption, permettant d'injecter de plus grands volumes d'échantillon (50-100 μL) par rapport à une méthode classique d'injection (1-3 μL). Cette technique a ainsi permis de détecter la valine alkylée après incubation *in vitro* du sang humain avec l'ypérite à une concentration de 30 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (4,77 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). L'introduction d'une étape de purification par SPE sur une cartouche Florisil® du dérivé thiohydantoïn a également été étudiée, tout comme une purification sur support C_{18} , afin d'améliorer la sensibilité de la méthode. Une perte d'analyte plus importante a été observée sur le second support (13% de perte environ contre seulement 2% avec la cartouche Florisil®) [57]. En se basant sur ces résultats, Noort *et al.* [17] ont alors mis au point une nouvelle méthode d'analyse de la valine N-terminale alkylée par GC-MS, incluant la procédure d'Edman simplifiée et la purification des analytes par SPE sur support Florisil®. Bien que la purification du mélange brut obtenu après l'étape de dérivation soit très importante d'un point de vue pratique puisque cela empêche l'encrassement rapide du détecteur MS, les auteurs ont indiqué que cette étape n'avait pas permis d'abaisser la LDD de 100 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (15,9 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) initialement mesurée [111]. Cette méthode a toutefois permis de détecter l'adduit N-HETE-Val dans le sang de rats jusqu'à 28 jours après leur exposition intraveineuse à l'ypérite [98]. Lors de cette étude, il a également été noté que la concentration de l'adduit augmentait au cours des 3 premiers jours suivant l'injection de l'ypérite, suggérant ainsi que l'arme chimique sous forme libre intacte était toujours présente dans l'organisme pendant cette période.

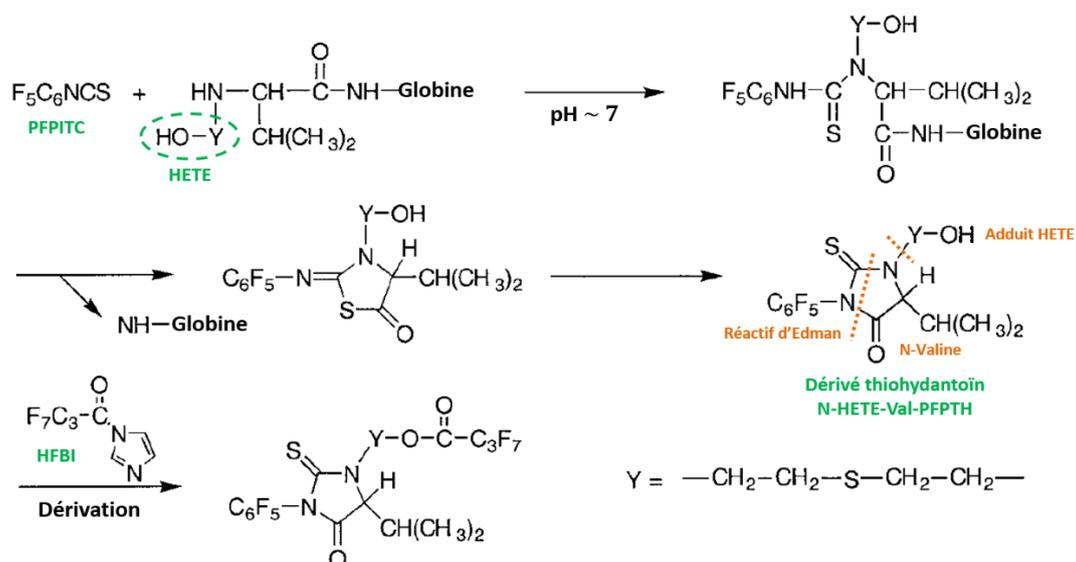


Figure 16. Procédure de dégradation d'Edman modifiée pour le clivage de la valine N-terminale alkylée par l'ypérite à l'aide du réactif d'Edman isothiocyanate de pentafluorophényl (PFPITC), suivie de la dérivation du dérivé thiohydantoïn obtenu (N-HETE-Val-PFPTH) avec l'heptafluorobutyrylimidazole (HFBI) pour une analyse en GC-MS ou GC-MS/MS. Adapté de [119].

Nie *et al.* [121] ont optimisé la procédure de SPE initialement décrite par Noort *et al.* [57] en utilisant des composés de synthèse de manière à déterminer les meilleures conditions pour l'extraction sur support Florisil®. Cette optimisation a permis d'abaisser la LDD précédemment mentionnée puisque les auteurs ont pu détecter une exposition *in vitro* du sang humain à une concentration en ypérite de 20 nmol.L⁻¹ (3,18 ng.mL⁻¹). Xu *et al.* [13] ont par la suite utilisé les conditions optimisées par Nie *et al.* [121] pour analyser les échantillons de sang de quatre personnes ayant été exposées accidentellement à l'ypérite. L'adduit N-HETE-Val a pu être détecté dans le sang d'une des victimes jusqu'à 95 jours après son exposition à l'agent chimique.

La procédure de dégradation d'Edman, actuellement également utilisée au sein de la DGA, présente cependant de nombreux inconvénients. En effet, en plus d'être peu sensible et peu répétable, elle est également très chronophage, avec une étape de traitement des échantillons sanguins durant 2,5 jours. Cette procédure a été revisitée par von Stedingk *et al.* [122], qui, après avoir comparé plusieurs composés isothiocyanate comme agents de dégradation [123], ont développé la méthode FIRE®. Cette nouvelle méthode, illustrée en **Figure 17**, utilise l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) comme réactif d'Edman et permet l'analyse directe des composés thiohydantoïns obtenus en LC-MS/MS, après leur purification par SPE en mode mixte (support polymérique OASIS® max) mais sans étape de dérivation. La procédure FIRE®, qui n'a pas encore été testée avec l'ypérite mais avec l'acrylamide, l'oxyde d'éthylène et la glycidamide [124], pourrait être utilisée pour la détection de la valine N-terminale adduite directement dans les échantillons de sang total, sans extraire au préalable l'hémoglobine, ce qui pourrait simplifier grandement l'étape de préparation de l'échantillon puisque la procédure entière durerait moins de 24 h, analyse en LC-MS/MS comprise [122]. Cependant, dans tous leurs travaux ultérieurs, l'équipe de von Stedingk [125–127] et de celle Hielscher [128] ont toujours travaillé à partir d'hémolysats d'érythrocytes, ce qui pourrait suggérer que les résultats obtenus sont moins satisfaisants lorsque la procédure est réalisée sur le sang total.

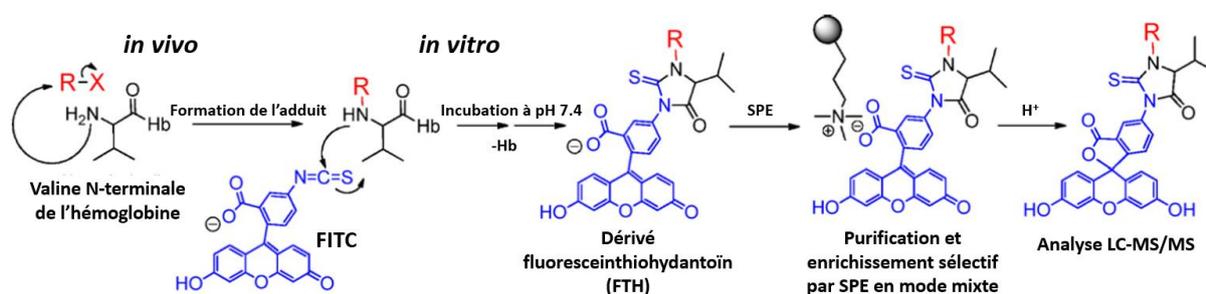


Figure 17. Illustration de la procédure FIRE® utilisée pour l'analyse en LC-MS/MS de la valine N-terminale adduite, après détachement de l'adduit de l'hémoglobine par l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Adapté de [122].

Une méthode alternative pour l'analyse des adduits N-HETE-Val consiste en une hydrolyse acide totale de l'hémoglobine isolée du sang, par traitement avec HCl 6M à 110°C pendant 24 heures, afin d'obtenir les acides aminés [112]. Après purification par SPE sur C₁₈ et évaporation à sec, la valine adduite est dérivée avec le chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyl (TBDMSCl) avant d'être analysée en GC-MS/MS. Cependant, cette méthode alternative, en plus d'être chronophage, s'est révélée 10 fois moins sensible que la dégradation d'Edman. Cette mauvaise sensibilité peut être expliquée par une combinaison de facteurs, incluant notamment une sensibilité inhérente plus faible pour la source d'ionisation (impact électronique), un rendement d'extraction modéré et la présence de composés interférents dans les résidus issus de l'hydrolyse. De fait, après avoir comparé les deux méthodes, Black *et al.* [112] ont utilisé la méthode d'Edman pour l'analyse d'échantillons sanguins provenant d'individus exposés, accidentellement ou non, à l'ypérite. L'adduit HETE-Val a ainsi été détecté à des concentrations comprises entre 0,3 et 0,8 ng.mL⁻¹ dans des échantillons de sang congelés depuis 11 ans et prélevés entre 5 et 10 jours après l'exposition à l'ypérite.

Les adduits N-HETE-His, formés au niveau des positions N1 et N3 des résidus histidine, sont les adduits les plus abondants après exposition de l'hémoglobine à l'ypérite [62]. Ils ne peuvent cependant pas être analysés au moyen d'une dégradation d'Edman, cette méthode étant essentiellement utilisée pour l'analyse des adduits formés au niveau des valines N-terminales et ne pouvant pas être appliquée à d'autres résidus alkylés tels que l'histidine. En effet, la procédure de dégradation d'Edman clive les acides aminés de manière séquentielle, en commençant par le résidu N-terminal. A cause des multiples positions des résidus histidine dans les chaînes de globine, cette procédure serait trop longue à mettre en place. Toutefois, tout comme les adduits N-HETE-Val, les adduits N-HETE-His sont stables lors de l'hydrolyse acide de la protéine. Cependant, leur analyse en GC-MS est compliquée du fait de leur polarité élevée et de la faible stabilité thermique des dérivés volatiles de l'histidine. Une méthode d'analyse en LC-MS/MS après une hydrolyse acide de l'hémoglobine exposée à l'ypérite a été développée par Black *et al.* [112] et Noort *et al.* [129], mais le traitement de l'échantillon était laborieux : hydrolyse à 110°C pendant 24 heures, concentration des analytes sur support échangeur d'ions puis dérivation avec le chlorure de 9-fluoroenylmethoxycarbonyl (Fmoc) après évaporation à sec. En outre, la détection des adduits N-HETE-His avec cette méthode s'est révélée moins sensible que la méthode basée sur la procédure d'Edman et développée pour l'analyse des adduits avec les valines N-terminales. Toutefois, cette méthode a permis de détecter les adduits HETE-His à des concentrations comprises entre 0,7 et 2,5 ng.mL⁻¹ dans les mêmes échantillons sanguins de victimes Iraniennes exposées à l'ypérite que ceux analysés en ciblant les adduits avec les valines N-terminales, qui avaient été détectés à des concentrations variant entre 0,3 et 0,8 ng.mL⁻¹ [112]. Ces résultats ont

donc illustré et confirmé le fait que les adduits avec les résidus histidines sont formés en plus grande quantité que les adduits avec les valines N-terminales lors d'une exposition à l'ypérite.

Puisque l'ypérite ne se lie qu'1,9 fois plus efficacement à l'ADN qu'aux protéines, un dosage immunochimique d'exposition à l'ypérite basé sur les adduits de protéines pourrait être avantageux, aux vues de la quantité 300 fois plus importante de protéines que d'ADN dans le sang. Un bio-essai pour la détection des adduits formés avec l'hémoglobine a ainsi été développé par l'armée Américaine dans les années 1990, à partir d'anticorps monoclonaux spécifiques à certains peptides alkylés [91]. Cependant, en raison d'un manque de spécificité, les résultats n'ont pas été concluants et aucune autre tentative n'a été faite jusqu'à présent.

II.1.4. Conclusions

Si les adduits avec l'hémoglobine présentent des avantages non négligeables à être utilisés comme biomarqueurs d'exposition à l'ypérite, comparés aux adduits ADN-ypérite, aux adduits formés avec l'albumine ou aux biomarqueurs urinaires, leur analyse s'avère compliquée. En effet, les procédures mises en œuvre pour isoler la protéine adduite des échantillons sanguins sont souvent chronophages et, bien que de nouvelles techniques prometteuses pour purifier l'hémoglobine extraite aient été développées (extraction sur membrane ou purification par IMAC), ces dernières sont onéreuses et n'ont jusqu'à présent jamais été appliquée à l'extraction de la protéine adduite par l'ypérite. En outre, la principale méthode utilisée à l'heure actuelle pour l'analyse des adduits hémoglobine-ypérite (dégradation d'Edman modifiée) n'a que très peu été améliorée depuis sa mise au point à la fin des années 1980 et nécessite une longue préparation des échantillons. De plus, elle est peu répétable et peu sensible. Pour gagner en sensibilité, une étape d'enrichissement des chaînes de globine alkylées pourrait être envisagée. La formation des adduits lors de l'exposition des protéines à des agents alkylants peut par exemple conduire à une modification de la charge totale de la protéine. Bergmark *et al.* [130] ont ainsi exploité ces modifications en développant une procédure, basée sur la chromatographie d'échange d'ions, pour purifier les chaînes alkylées et les séparer des chaînes natives. En effet, les chaînes contenant des résidus valine ou histidine alkylés peuvent être séparées des chaînes non modifiées en raison du changement de pK_a des acides aminés adduits. Cette procédure n'a cependant jamais été appliquée pour le traitement de l'hémoglobine alkylée par l'ypérite et des progrès restent donc à faire.

Les techniques d'ionisation par électrospray pour le couplage LC-MS/MS ont permis de simplifier le séquençage des peptides et sont désormais utilisées pour une large gamme d'applications dans le domaine de la protéomique, notamment pour ce qui est de la caractérisation de protéines par analyse des digestats obtenus par hydrolyse enzymatique. Le clivage spécifique des protéines par des

protéases, associé à une séparation en LC et une détection ESI-MS, a également démontré son utilité pour l'analyse d'adduits. Par exemple, la trypsine, protéase la plus fréquemment utilisée, coupe les liaisons peptidiques dont les groupements carbonyles sont issus d'un résidu lysine ou arginine [92]. Afin d'éviter la formation de peptides dont les séquences se recouvrent, l'utilisation d'enzymes ayant une haute spécificité est donc indispensable. La digestion enzymatique associée à une analyse par LC-MS/MS a été utilisée avec succès pour étudier les sites d'alkylation de l'hémoglobine lors d'une exposition à l'ypérite [12,110]. Toutefois, à l'heure actuelle, aucune méthode n'a été décrite en ce qui concerne la détection et la quantification des peptides issus de la digestion enzymatique de l'hémoglobine alkylée comme biomarqueurs d'exposition à l'ypérite. Par conséquent, au cours de cette thèse, une première approche basée sur une étape de digestion enzymatique en solution de l'hémoglobine adduite par l'ypérite a été développée et les résultats de cette étude expérimentale sont présentés dans la seconde partie de ce chapitre.

II.2. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the analysis of tryptic digest of human hemoglobin exposed to sulfur mustard

Cette partie se présente sous la forme d'un article paru début 2021 [131].

Journal of Chromatography B 1163 (2021) 122518



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jchromb



Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the analysis of tryptic digest of human hemoglobin exposed to sulfur mustard



Florine Hallez^a, Audrey Combès^a, Charlotte Desoubries^b, Anne Bossée^b, Valérie Pichon^{a,c,*}

^a Department of Analytical, Bioanalytical Sciences and Miniaturization (LSABM) Chemistry, Biology and Innovation (CBI), ESPCI Paris, PSL University, CNRS, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France

^b DGA, CBRN Defence, Analytical Chemistry Department, 5 rue Lavoisier, 91710 Vert-le-Petit, France

^c Sorbonne Université, Campus PMC, 75005 Paris, France

Abstract

Sulfur mustard is a highly reactive chemical warfare agent that causes severe damages to the victims exposed by alkylating multiple biomolecules such as proteins. Resulting alkylated products can be used as biomarkers of exposure to this chemical agent. A liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was thus developed to detect alkylated peptides after the tryptic digestion of hemoglobin (50 mg.mL⁻¹) incubated with sulfur mustard at different concentrations (0.25, 0.5, 1, 10 and 100 µg.mL⁻¹). Five new alkylation sites were accurately identified on the protein (α -His⁷², α -His⁸⁷, α -His⁸⁹, β -His² and β -Val⁹⁸) and fifteen adducted peptides were detected, among which eight of them resulted from the alkylation of four peptides, each presenting two potential sites of adduction that could be discriminated by the method specificity. Similarly, it was possible to discriminate the three potential adduction sites of the peptide α -T9. Moreover, the method allowed the quantification of all the alkylated peptides with a satisfying repeatability, with RSD ranging from 0.5 to 9.3% for an exposure of hemoglobin to sulfur mustard at 100 µg.mL⁻¹. The analysis of hemoglobin incubated with different concentrations of sulfur mustard levels led to a linear response for all the alkylated peptides with the studied concentrations (0.25, 0.5, 1, 10 and 100 µg.mL⁻¹). A variation of the alkylation rate was also observed between the different peptides studied, with a preferential adduction of sulfur mustard on the histidine residues but also on the N-terminal valine residues of both globin chains and

on the Val⁹⁸ residue of globin β . Furthermore, the presented method proved to be sensitive, with a theoretical possibility to detect alkylated peptides resulting from *in vitro* incubation of hemoglobin in deionized water with sulfur mustard at 2.63 ng.mL⁻¹. After further development, this method could potentially be used for the analysis of blood samples *in vivo* exposed to sulfur mustard.

II.2.1. Introduction

Sulfur mustard, 1,1'-thiobis(2-chloroethane), is a carcinogenic, cytotoxic and potent alkylating compound that is strongly vesicant and causes severe burns to the skin, the eyes and the lungs. Synthesized in pure form in 1886, it was first used as a chemical warfare (CW) agent in 1917 [1] and was also used in the 1980's during the Iran-Iraq conflict [3]. Even though the declared stockpiles have been destroyed in agreement with the Chemical Weapons Convention (CWC), the problems of diagnostic of sulfur mustard poisoning have not lost their significance. Indeed, because of its ease of production, its low volatility, its insidious nature and its lack of antidote, sulfur mustard can be used as a CW agent during military conflicts but also during terrorist attacks [5]. Moreover, there is a high risk of accidental exposure to sulfur mustard since numerous unused munitions from World War I are still present in the environment in Europe [8–10]. Therefore, there is a need for rapid, sensitive and robust analytical methods for the monitoring of exposure to sulfur mustard.

As a bi-functional alkylating agent, sulfur mustard reacts with numerous biological nucleophiles in aqueous media. After administration of the agent into the organism, a highly reactive episulfonium ion (see **Figure 18a**) is quickly formed, which explains why the intact form of sulfur mustard is really difficult to detect *in vivo*. This ion reacts with water, glutathione or the nucleophile sites present on macromolecules such as proteins and DNA. The resulting modified biomolecules have longer life-times than that of intact sulfur mustard and can be used as biomarkers to monitor an exposure to this CW agent in biological fluids such as blood or urine. The biomarkers of sulfur mustard are commonly divided into four categories, depending on the targeted nucleophiles: (1) the metabolites resulting from the hydrolysis and/or the oxidation of sulfur mustard [14]; (2) the metabolites resulting from its reaction with glutathione [8,15]; (3) the adducts formed with DNA [16]; (4) the products resulting from the alkylation of proteins [10,101]. The analysis of the β -lyase metabolites, found in the urine, is one of the easiest way to unequivocally prove a poisoning with sulfur mustard [44,54]. However, 90% of these metabolites are excreted in the urine within the first 48-72h after the poisoning [46], while, in the cases of exposures occurring in hard-to-reach areas, blood and urine samples from casualties are often available only after several days or weeks. Consequently, other biological markers with a longer life-time must be used to prove that the victims have been poisoned with sulfur mustard long after their exposure to the warfare agent. The adducts that sulfur mustard forms with DNA and proteins

appear as ideal biomarkers since they can be detected in biological samples up to several months after an exposure [62,63].

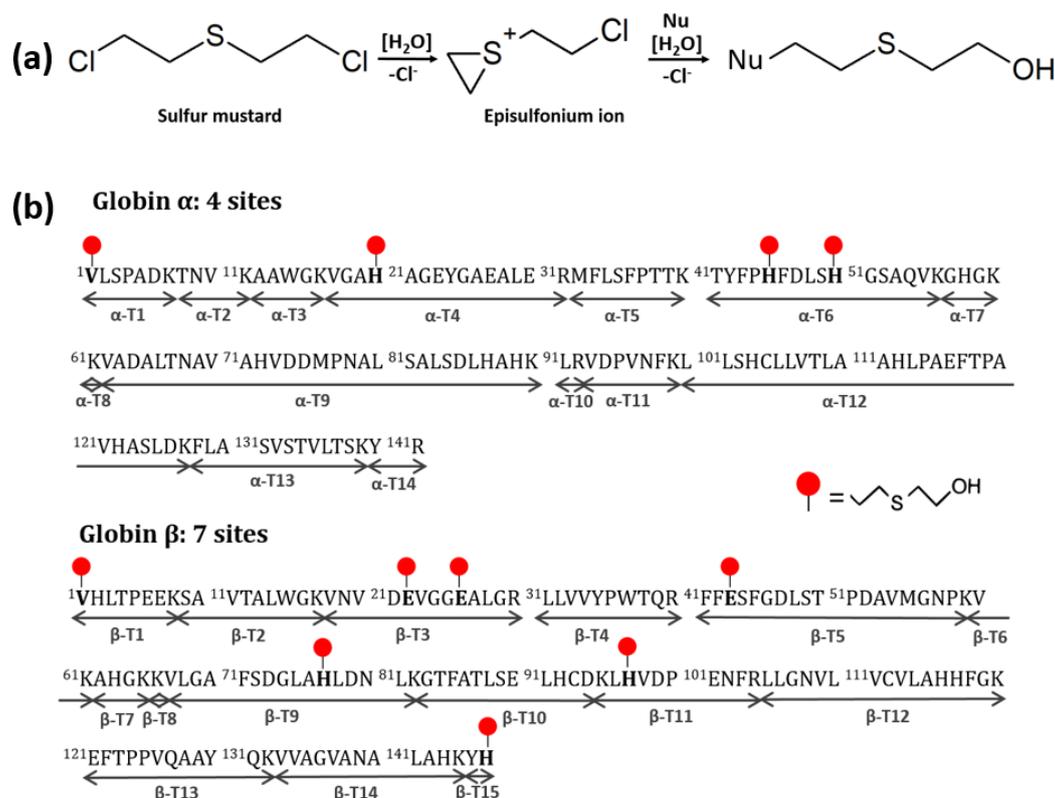


Figure 18. Reaction of sulfur mustard with a biological nucleophile (Nu) after formation of the episulfonium ion (a). Localization of the alkylation sites of human haemoglobin by sulfur mustard (red circles) identified by LC-ESI⁺-MS/MS analysis of tryptic digests [12, 110] (b).

Sulfur mustard reacts covalently with biological macromolecules such as DNA and blood proteins, to form long-lived hydroxyethylthioethyl (HETE) adducts, used as unequivocal markers of exposure. However, enzymatic repair systems remove DNA lesions by cleaving the alkylated portions of the molecule [62], which means that DNA-sulfur mustard adducts have an average lifespan of a few tens of days [63]. Particularly useful biomarkers are the adducts formed with hemoglobin and albumin, two of the main proteins in blood present in the red blood cells (RBCs) and plasma, respectively. Contrary to alkylated DNA, hemoglobin and albumin adducts are generally stable and most of them have the same life-time than that of the native proteins (approximately 120 days for human hemoglobin and 20-25 days for albumin) [62,63]. Hemoglobin also has the advantage of being more abundant in human blood (150 mg.mL⁻¹) than albumin (30-45 mg.mL⁻¹) [62,92]. Therefore, although sulfur mustard adduct with Cyst³⁴ residue of human serum albumin is very commonly used as a biomarker of exposure and many studies are devoted to the development or improvement of procedures for its analysis [10,95,96,99,100], hemoglobin adducts are also one of the main targets when it comes to prove an exposure to sulfur mustard [17,98,121]. Hemoglobin is a heterotetrameric protein with an average

molecular weight (MW) of 64,458 Da and is composed of four polypeptidic chains identical two by two: two alpha chains (globin α) containing 141 amino acids (MW = 15,126 Da) and two beta chains (globin β) containing 146 amino acids (MW = 15,867 Da), whose primary structures are presented on **Figure 18b**.

Even if the adducts formed with the N-terminal valines of both globin chains represents only 1-2% of the total alkylation induced on hemoglobin exposed to sulfur mustard [62], as modified Edman degradation procedure can be used to specifically cleave them, these adducts are the most studied to monitor an exposure to sulfur mustard [119]. Nevertheless, this procedure has not been improved much since its development in the late 1980s [120] and is relatively time-consuming since it requires multiple steps of sample treatment before proceeding to the analysis of the resulting compound by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) or tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). Currently, the sample treatment alone lasts more than one day in the French Defense Procurement Agency laboratories. Moreover, if this method is currently one of the most sensitive for protein adducts measurement, with, for instance, the possibility to detect one adducted N-terminal valine over 10^7 residues in the case of acrylamide adducts [132], it also may lack sensitivity and repeatability when it comes to the analysis of hemoglobin-sulfur mustard adducts and is therefore not optimal.

While the modified Edman degradation procedure focuses only on the analysis of the adducts formed with N-terminal valines, the LC-MS analysis of tryptic digests of hemoglobin extracted from whole blood incubated *in vitro* with ^{35}S - and/or ^{13}C - labeled sulfur mustard showed that the alkylation of the protein occurred on several tryptic peptides [12,110]. Altogether, both studies identified 12 alkylated peptides (α -T1, α -T4, α -T6, α -T9, β -T1, β -T3, β -T5, β -T9, β -T10, β -T11, β -T15 and β -T10-S-S- β -T12). However, after LC-MS/MS analysis of hemoglobin incubated with non-labeled sulfur mustard, only 11 adduction sites were accurately identified, including the two N-terminal valine residues, six histidine residues (three on globin α and two on globin β), and three glutamic acid residues (all on globin β), and all of these sites were localized on mono-alkylated peptides. In addition, Black *et al.* [110] were able to identify two different alkylation sites for α -T6, and found out that the peptide β -T3 also presented two potential sites of adduction (see **Figure 18b** for the localization of the different adduction sites identified). Finally, if it was observed that the peptides α -T9 and β -T10 were adducted by sulfur mustard, the alkylation sites could not be precisely identified for these peptides.

It is important to note that, in these studies, the analyses were carried out on blood spiked with labeled sulfur mustard at concentrations of $1.6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ or $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ thus corresponding to sulfur mustard/hemoglobin molar ratios of 4.6 and 11.6, respectively. Therefore, one of the main objectives

of the present study will be to detect hemoglobin-sulfur mustard adducts formed at a much lower concentration of the alkylating agent, which would be more in line with a possible threshold of exposure to sulfur mustard.

Knowing that the HETE-His adducts are the more abundant adducts after an exposure to sulfur mustard [62], a new approach, targeting all the potential alkylated sites of hemoglobin, is being developed, based on the enzymatic digestion of the protein. The digestion was performed in-solution and the protease used in this study was trypsin, due to the high specificity of its cleavages. Therefore, the peptides resulting from the enzymatic hydrolysis can easily be compared to the theoretical ones, generated with a software such as ExPASy.

The experimental set-up used in this study was evaluated and validated using pure lyophilized hemoglobin. An analysis in full scan mode was first performed to detect all the peptides resulting from the tryptic digestion of hemoglobin. Then, in order to improve the sensitivity, the peptides presenting a potential site of adduction were analyzed in Single Ion Monitoring (SIM) mode with an optimization of the tube lens values for each of these peptides of interest. After performing an analysis in Product Ion mode to identify the main product ions resulting from the fragmentation of these peptides, pure hemoglobin was analyzed in Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode. Finally, after identifying their product ions and optimizing the voltage applied on the tube lens, the MRM mode was used to detect the alkylated peptides present in the tryptic digest of hemoglobin ($50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) incubated with different concentrations of sulfur mustard and five new adduction sites were clearly identified. The sensitivity and repeatability of the presented method were also assayed for the first time.

II.2.2. Material and methods

II.2.2.1. Chemicals

Trypsin from bovine pancreas treated with 6-(1-tosylamido-2-phenyl)ethyl chloromethyl ketone (TPCK), cytochrome C from horse heart, human hemoglobin, Trizma[®] hydrochloride ($(\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3\cdot\text{HCl}$, Tris-HCl), calcium chloride dihydrate ($\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) and formic acid (FA) were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Acetonitrile (ACN) HPLC grade was provided by VWR (Fontenay-sous-bois, France). High purity water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France).

The cytochrome C and hemoglobin solutions used for the LC-MS and LC-MS/MS analysis were prepared in a saline Tris-HCl buffer solution ($50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ at pH 8.0) containing $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ of CaCl_2 . The samples of hemoglobin incubated with sulfur mustard (DGA CBRN Defence, France, purity > 99 %, NMR $^1\text{D} \ ^1\text{H}$) at concentrations of $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $500 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $250 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ were prepared

by the Analytical Chemistry department of DGA CBRN Defence center (French Defense Procurement Agency) by dissolving 50 mg of lyophilized hemoglobin in 900 μL of deionized water, followed by the addition of 100 μL of sulfur mustard at 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ or 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in isopropanol, respectively, and incubation of the mixtures at room temperature during 18 hours. These solutions were diluted by a factor 50 with Tris-HCl buffer before the enzymatic digestion, in order to obtain a concentration of hemoglobin of 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

II.2.2.2. Apparatus and LC-MS or LC-MS/MS analysis

The experimental system was composed of two six-port switching valves. The first valve was connected to the injection loop (5 μL) and to a syringe pump (KDS 100 Infusion Pump, KD Scientific). The second one was connected to a trap column used to desalt the digest and that consisted of a polymeric reversed phase trapping cartridge (Newguard RP-18, 15 mm x 3.2 mm i.d., 7 μm , Perkin Elmer, Villebon-sur-Yvette, France) and to the binary analytical pump (Dionex Ultimate 3000 pump, Thermo Scientific, controlled by Chromeleon 6.8 SR11). This second valve was also connected to the analytical column (Atlantis[®] dC₁₈, 150 mm x 2.1 mm i.d., 3 μm , 100 Å, Waters, Guyancourt, France), which was heated at 35°C. The analytical pump was interfaced with a triple quadrupole mass spectrometer (TSQ Quantum Access Max[®], Thermo Scientific) equipped with a heated electrospray (HESI) ion source (IonMax source, probe HESI-II, Thermo Scientific). The mobile phase consisted in a mixture of deionized water (A) and acetonitrile (B) acidified with 0.1% of formic acid at 200 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. The separation of the peptides obtained after the digestion of cytochrome C was achieved by increasing the amount of acidified acetonitrile from 10% to 90% in 30 min. The elution gradient was then optimized for the separation of the peptides resulting from the tryptic digestion of hemoglobin. The optimal separation was achieved using a gradient composed of 0% B during 5 min, then an increase from 0% to 40% B in 80 min, followed by a plateau at 40% B during 2 min. The peptides thus separated were then detected using mass spectrometry. Ionization was performed in positive mode, using the following values for the source parameters: spray voltage was set at 3000 V, vaporizer temperature at 277°C, capillary temperature at 230°C, and tube lens offset at 67 V. The sheath gas pressure was set at 30 psi and no auxiliary gas was used. A dwell time of 1 s was used for cytochrome C and it was set to 2 s for hemoglobin. For both proteins, a scan width of 0.5 m/z was used.

The entire procedure used for the signal optimization during the analysis of cytochrome C and hemoglobin by mass spectrometry in full scan, SIM, product ion and MRM modes is presented in details in supplementary material (**Annexe 1**).

II.2.2.3. Evaluation of the retention potential of the trap column

In order to evaluate the retention potential of the trap precolumn towards peptides, an in-solution digestion of cytochrome C was performed (see section II.2.2.4. for the experimental conditions). As a first step, 5 μL of the tryptic digest obtained were directly injected on the analytical column and the peptides were separated in reversed phase liquid chromatography and detected in full scan mode (see section II.2.2.2.). The first three minutes of the analytical run were sent to waste so that the salts contained in the digestion buffer would not be sent to the mass detector. The tryptic digest was then analyzed with the same LC-MS conditions but after passing through the trap column. In this case, all the analytical run was sent to the detector since the salts had been removed on the precolumn. The retention potential of the precolumn was evaluated by comparing the peak areas of the identified peptides observed in full scan mode with a direct injection or with the desalting step. The peak areas were obtained using the Extracted Ion Chromatograms (EIC).

II.2.2.4. In-solution and LC-MS/MS analysis of the digest

Cytochrome C and hemoglobin (solutions at $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in pure water) were digested by TPCK treated trypsin in 1 mL of Tris-HCl buffer (pH 8.0) with an enzyme/substrate (E/S) ratio of 1/50 (mol/mol), at 37°C overnight (16 hours) and under gentle agitation at 450 rpm, using a PHMP Grant-Bio thermostated plates stirrer (Dutscher). No prior reduction or alkylation steps were needed since cytochrome C and hemoglobin do not have any disulfide bonds. A fraction of the resulting digest (5 μL) was then loaded on the Newguard RP-18 desalination column with 150 μL of the Tris-HCl buffer at $50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. The percolation of 1 mL of deionized water at $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ through the precolumn led to the removal of the salts. The peptides retained on the trap column were then transferred to the analytical column with a pure water/acetonitrile gradient.

II.2.3. Results and discussion

II.2.3.1. Evaluation of the trapping capacity of the trap column

After tryptic digestion, the removal of the salts present in the digests is necessary in order to improve the detection of the peptides by mass spectrometry. Indeed, this detection is highly sensitive to the presence of salts, which can interfere with the molecules ionization and/or form adducts and therefore lead to a reduction in signal. The salts removal is often carried out by Solid Phase Extraction (SPE) on pipette tip. In the present study, the salts were removed using a trap column, directly connected on line with the analytical column, which reduces the samples handling and makes it possible to automatize this sample treatment step. Furthermore, the trap column used in the present work also has a pre-concentration function, thus making it possible to perform quantitative analysis. In order to

evaluate the efficiency of the retention of peptides on the trap column, cytochrome C (MW = 11,833 Da), whose primary structure is well known and whose tryptic digestion has already been studied in our laboratory [133,134], was digested by trypsin (see section II.2.2.4. for the experimental conditions). The digest (5 μ L) was first directly injected in triplicate on the analytical column. The peptides were then detected in full scan mode and 13 ions, corresponding to 11 peptides, were identified, which represented a sequence coverage of 61%. The same digest was then analyzed in triplicate with similar LC-MS conditions, but after a desalting step on the trap column. No loss of peptide was observed when using the trap column, since all the peptides identified with the direct injection were found after passing through the precolumn. Moreover, the comparison of the peptides peak areas obtained with or without the desalting step demonstrated that there was no loss of peptides during this step thus confirming the efficient trapping of cytochrome C peptides by the trap column that could be further used for the study of hemoglobin digests.

II.2.3.2. Analysis of the tryptic digest of non-alkylated human hemoglobin

On a first step, only peptides having a potential site of adduction identified in the literature [12,110] were targeted when analyzing the tryptic digest of non-alkylated hemoglobin, in order to optimize the mass parameters such as the voltage applied on the tube lens and the collision voltage, the objective being to settle the analytical conditions for the subsequent analysis of adducted hemoglobin for which no standard is available.

II.2.3.2.1. Analysis of the non-alkylated hemoglobin in full scan mode

The tryptic digest of non-alkylated hemoglobin was firstly analyzed in full scan mode, in order to identify, by their retention time and the m/z values of the corresponding ions, the peptides resulting from the enzymatic digestion and theoretically simulated using ExPASy. An example of Base Peak Chromatogram (BPC) obtained in scan mode is presented in **Figure 19a**. The tryptic digestion led to high sequence coverages, with 89.4% and 93.8% for globin α and globin β , respectively, thus highlighting the efficiency of the tryptic digestion step and of the trapping device.

As seen in the **Table S1** (shown in **Annexe 1**), all the peptides presenting an amino acid likely to be adducted and previously identified in the literature with labeled sulfur mustard were detected, with the exception of the peptide β -T10, for which the adduction site had not been identified, and the peptide β -T15 that was too small and highly polar and therefore not retained on the C_{18} stationary phase. Therefore, the following analyses focused only on the 9 peptides with which sulfur mustard can form adducts and that were observed in full scan mode (α -T1, α -T4, α -T6, α -T9, β -T1, β -T3, β -T5, β -T9, and β -T11). The potentially alkylated peptides resulting from the tryptic digestion of hemoglobin were

then analyzed using the Single Ion Monitoring (SIM) mode, in order to determine the optimal tube lens voltage for the transfer of each peptide of interest.

II.2.3.2.2. Analysis of the potentially alkylated peptides in SIM mode

Single Ion Monitoring detection mode is more sensitive than the full scan mode since the duty cycle of a given ion is more important. Before performing the analysis in this mode, the mass parameters were set after successive injections of the tryptic digest of non-alkylated hemoglobin and by changing the value of the tube lens for each injection (see details **Annexe 1**), for the different ions corresponding to the peptides likely to be adducted. However, it must be emphasized that this optimization was not ideal, which results from the fact that no peptide standard was available to carry out this optimization. The “pseudo-optimal” values of the mass parameters retained for subsequent analyses in SIM mode are presented in **Table S1 (Annexe 1)**. It has to be noted that only the most intense state of charge of each peptide was retained for the following analyses. Indeed, the main objective of this optimization step was to identify the most intense state of charge for each peptide of interest, as well as the corresponding voltage values applied on the tube lens. Once these voltages determined, the tryptic digest of non-alkylated hemoglobin was analyzed in SIM mode. The analyses in triplicate were carried out by targeting separately the potentially alkylated peptides of globin α and globin β , hence a total of 6 analyses (3 for globin α and 3 for globin β). The overlay of SIM chromatograms obtained for each globin chain is presented on **Figure 19b**. All the chromatographic peaks were integrated in order to compare their areas with those obtained in full scan analyses. For each peptide, the main state of charge listed in the **Table S1 (Annexe 1)** was used to perform the EIC and the peak areas were determined. As expected, it was observed that the areas obtained with the detection mode SIM were more intense (ranging from 1.3 to 25.6 times) than those resulting from the full scan analyses, except for the peptide α -T9, for which the intensity was reduced by a factor of 29%.

II.2.3.2.3. Study of the fragmentation of the potentially alkylated peptides

II.2.3.2.3.1. Optimization of the fragmentation

Before proceeding to the analysis of the hemoglobin incubated with sulfur mustard in MRM mode, it was essential to identify the relevant MRM transitions, allowing the unambiguous differentiation between the alkylated hemoglobin and the native protein. Therefore, the fragmentation of the peptides from native hemoglobin presenting a potential site of adduction was studied in Product Ion mode, in order to identify the fragments that could potentially contain the hydroxyethylthioethyl (HETE) moiety. The fragmentation being performed in the second quadrupole by Collision Induced Dissociation (CID), several collision voltages (5 V, 10 V, 15 V, 20 V, 25 V, 30 V and 35 V) were applied to

the different peptides that could potentially be alkylated, in order to determine the optimal energy for each transition. For each alkylable peptide, the most intense state of charge identified in SIM mode was used as precursor ion and the detection of the product ions was done using a mass range adapted to each peptide. For each collision voltage tested, the analyses in Product Ion mode, which provides all the product ions resulting from the fragmentation of a given precursor ion, were performed by sequencing the analyses in nine segments, based on the retention times of the peptides obtained during the previous analyses in SIM mode. The optimal MS conditions (tube lens voltages and collision voltage values) used for these analyses are reported on **Table S1 (Annexe 1, 6th and 8th columns, respectively)**, as well as the main product ions identified for each peptide of interest (7th column).

II.2.3.2.3.2. Experimental results of the fragmentations

During the data treatment of the fragmentation spectra obtained for the 9 alkylable peptides studied, it was observed that, in the case of peptides α -T1 and β -T1, none of the fragments included the potentially alkylated N-terminal valine residue, regardless of the collision voltage used. Indeed, it was observed that, for these two peptides as well as for all the peptides studied in Product Ion mode, the fragmentation started on the N-terminal side, thus leading to γ ions, which explains why the N-terminal alkylable valines were not found in any fragment. Similarly, for the peptides α -T4, β -T5 and β -T11, only one fragment contained the potentially alkylated amino acid, while in the case of the peptide α -T9, for which the site of adduction had not been identified, it was therefore not possible to know which fragments would be likely to contain the HETE group when working on adducted hemoglobin. However, it must be emphasized that even the fragments that do not present any site of adduction can be used in order to follow the transitions precursor ion \rightarrow product ions studied in MRM mode. Indeed, the targeted precursor ion being alkylated, all the transitions selected from this precursor ion are characteristic of the alkylation by the sulfur mustard.

For the peptides β -T3 and α -T6, multiple fragments containing the potentially adducted amino acids (glutamic acid and histidine, respectively) were observed. Since these peptides both present two potential sites of alkylation, it could be possible to determine precisely on which amino acid the adduction occurs. Indeed, some of the observed fragments contain both sites, while others only have one. Therefore, by following the potentially mono- and/or bi-alkylated peptides, the exact site of adduction could be identified.

The main fragments obtained for each peptide of interest, reported in the **Table S1 (Annexe 1)**, were used as the product ions for the subsequent analyses in MRM mode.

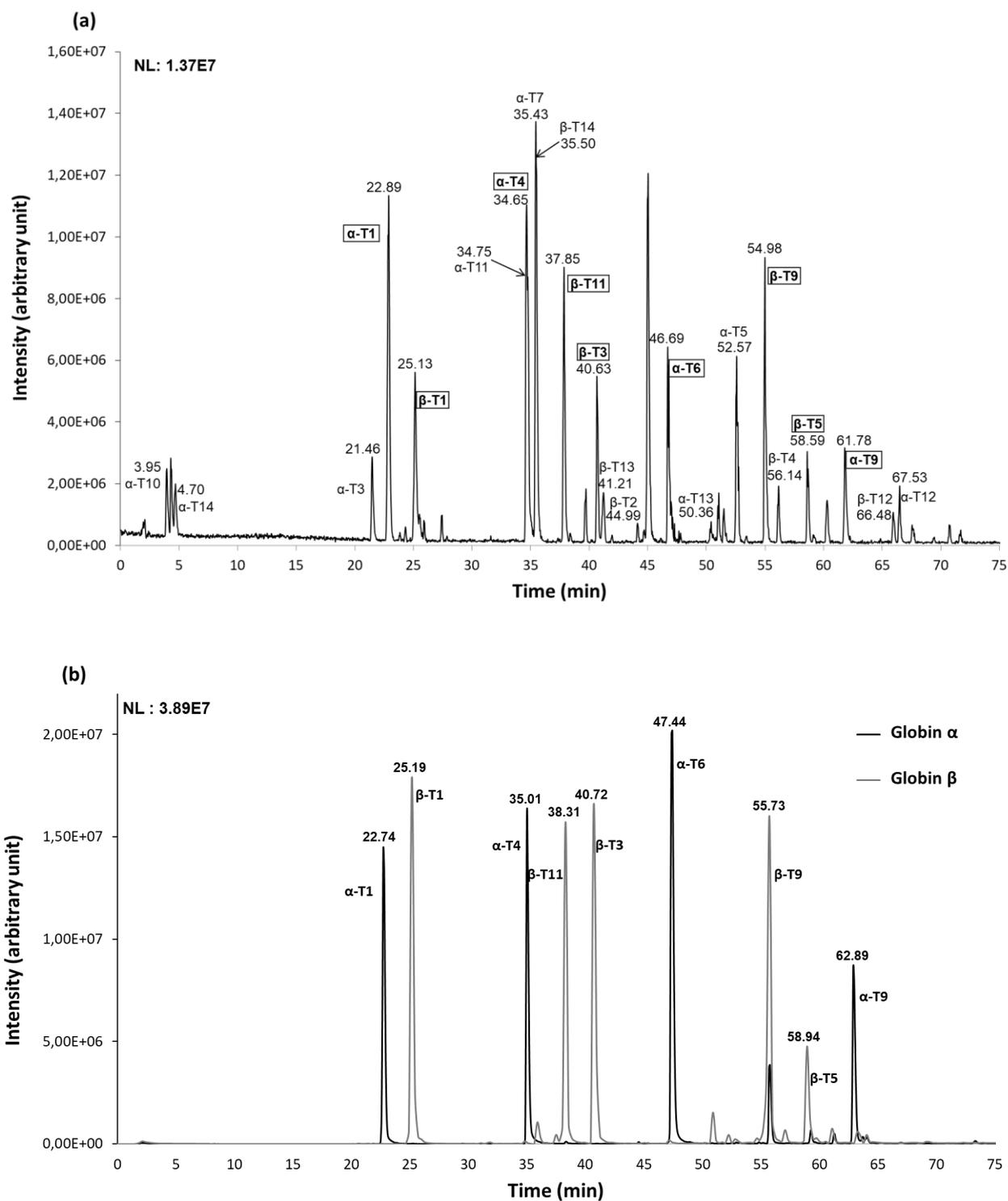


Figure 19. Base Peak Chromatogram (BPC) resulting from the LC-MS analysis of the tryptic digest of non-alkylated hemoglobin (5 μ g injected) in full scan mode (mass range m/z 270-1500), after removal of the buffer salts on the trap column. The peptides presenting a potential site of alkylation are framed (a). Overlay of the chromatograms obtained for the globin α and the globin β chains during the analysis in SIM mode of the tryptic digest of non-alkylated human hemoglobin (5 μ g injected), with the optimal valued of tube lens for each peptide (b).

II.2.3.2.4. Analysis of potentially alkylated peptides in MRM mode

On the basis of the fragment ions obtained in Product Ion mode, the peptides of interest could be analyzed in Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode. As the background noise of the system is reduced in MRM mode, it is more sensitive than the SIM mode. For each peptide presenting a potential site of adduction previously identified, two transitions were followed during the analysis in MRM mode, which was carried out in triplicate. These two transitions were chosen by selecting a very intense product ion and a product ion containing a potential site of adduction or resulting from the loss of an alkylated moiety. The overlay of MRM chromatograms is presented on **Figure 20**. The peak areas (issued from the EIC) are reported on the **Figure 21** and the observed RSD were low, ranging from 0.08 to 6.4%. Once the experimental set-up validated using native hemoglobin, it was applied to the analysis of tryptic digests of hemoglobin previously incubated *in vitro* with sulfur mustard.

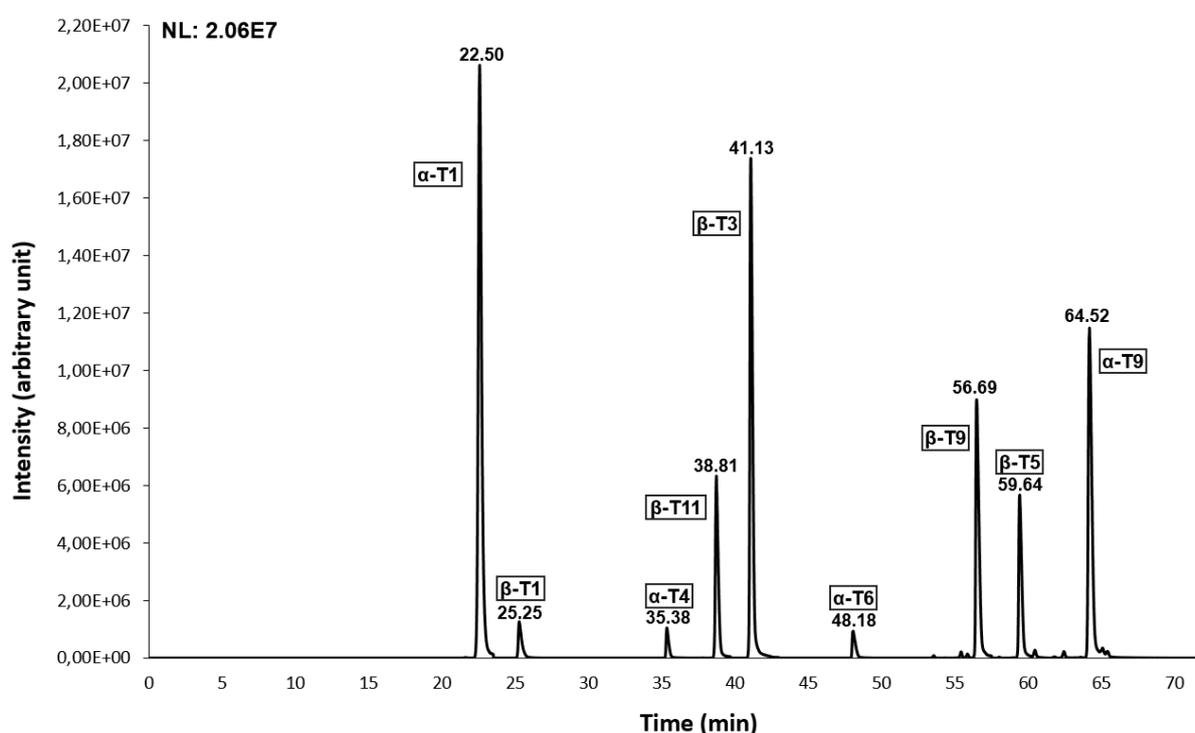


Figure 20. Overlay of the chromatograms obtained during the analysis in MRM mode of the same tryptic digest of non-alkylated human hemoglobin (5 μ g injected), targeting the peptides with a potential site of adduction (transitions reported in Figure 21).

II.2.3.3. Analysis of the tryptic digest of hemoglobin exposed to sulfur mustard

A solution of hemoglobin at 50 mg.mL⁻¹ was incubated with sulfur mustard at a concentration of 100 μ g.mL⁻¹. After the tryptic digestion of this solution in the conditions detailed in section 2.4, the resulting digest was analyzed in order to identify the adducted peptides and their alkylation sites with the same analytical procedure than the one developed for the non-alkylated peptides. Therefore, firstly, the tube lens voltage was optimized for each precursor ion of interest corresponding to an

alkylated peptide previously identified in the literature and for which the corresponding non-alkylated peptide was detected in full scan and SIM modes (α -T1, α -T4, α -T6, α -T9, β -T1, β -T3, β -T5, β -T9 and β -T11) [12,110]. The fragmentation of all these alkylated peptides was then studied in Product Ion mode to localize the HETE moiety on the peptides and determine the optimal collision voltages corresponding to the main product ions. If all the alkylation sites present on the targeted peptides and previously mentioned in the literature were confirmed (α -Val¹, α -His²⁰, α -His⁴⁵, α -His⁵⁰, β -Val¹, β -Glu²², β -Glu²⁶, β -Glu⁴³, β -His⁷⁷ and β -His⁹⁷) based on the product ions observed on the MS fragmentation spectra, the detection of specific product ions on the MS spectra also highlighted for the first time five new adduction sites: α -His⁷², α -His⁸⁷ and α -His⁸⁹, all three localized on the peptide α -T9; β -His² present on the peptide β -T1 and β -Val⁹⁸ present on the peptide β -T11. As example, in the case of the peptide β -T1, the presence of two chromatographic peaks (retention time of 26.98 and 27.59 min respectively) suggested that the peptide could be alkylated on two different residues, each peak corresponding to a mono-alkylated peptide, the adduction occurring only on one of the two potentially adducted residues. Indeed, depending on the adduction site, the interactions between the adducted peptide and the stationary phase can vary, which results in different retention times. The identification of the product ions observed on the fragmentation spectra (see **Figure 22**) corresponding to each peak (**Figure 23**) has demonstrated that (i) the chromatographic peak observed at 27.58 min was unequivocally attributed to an alkylation on the residue β -Val¹. Indeed, the product ion with m/z 176.2 corresponds to the peptide fragment a_1^+ + HETE that can only be observed in the case of an adduction on the residue β -Val¹. (ii) For the peak at 26.98 min, the presence of the product ion m/z 341.0, which corresponds to the peptide fragment b_2^+ + HETE, showed that the second alkylation site on this peptide could easily be identified as being the residue β -His². Similarly, for the alkylated peptide β -T11, two peaks were observed at 40.04 and 40.48 min (see **Figure S1a, Annexe 1**): (i) the product ions m/z 355.4 and m/z 876.6, respectively corresponding to the peptide fragments b_2^+ + HETE and γ_7^+ , were observed only for the first peak (see **Figure S2a, Annexe 1**). Therefore, the peak at 40.04 min could easily be attributed to an alkylation on the residue β -His⁹⁷, which had already been identified as an adduction site in previous studies [12,110]. (ii) However, the second peak observed at 40.48 min was attributed to an alkylation occurring on a new residue that had never been presented as a potential site of adduction. Indeed, the analysis of the fragmentation spectrum (see **Figure S2b, Annexe 1**), and especially the observation of the product ions m/z 112.38, m/z 226.97 and m/z 426.93, respectively corresponding to the non-alkylated peptide fragment a_2^{2+} and the alkylated peptide fragments b_3^{2+} and a_3^+ , unambiguously revealed that the second adduction site of the peptide β -T11 was the residue β -Val⁹⁸, even though this site is located in the interior of the globin β chain and is expected to have a low reactivity.

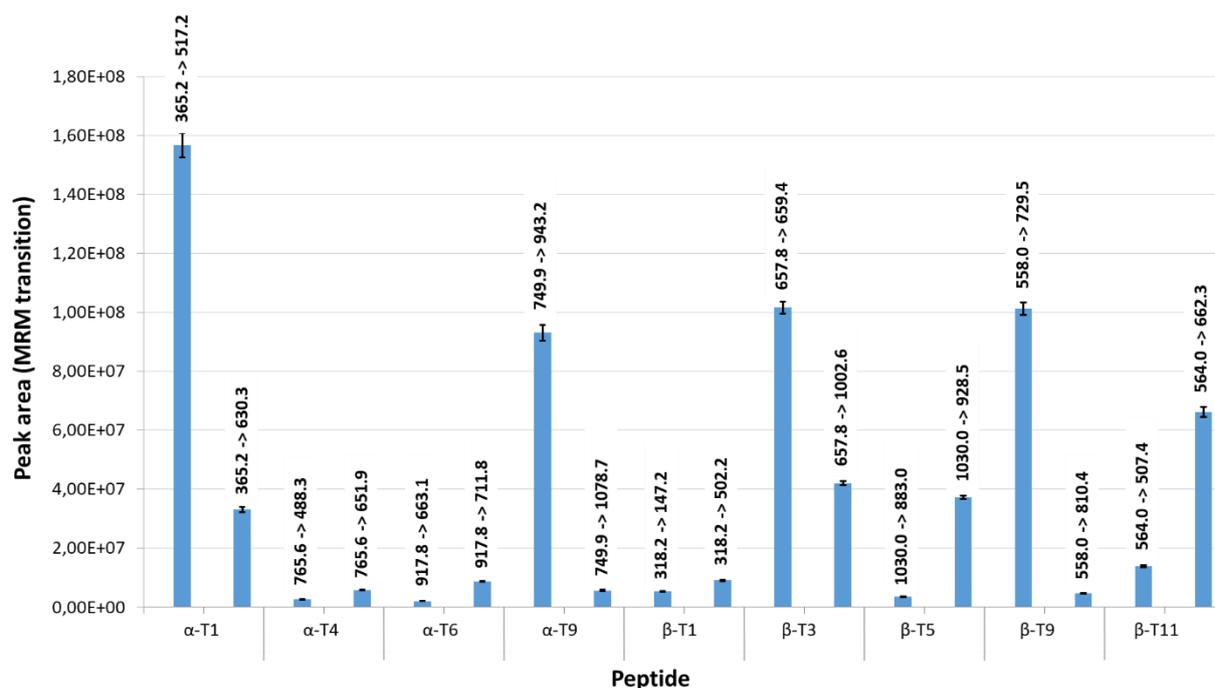


Figure 21. Peak areas (arbitrary unit) obtained during the analysis in MRM mode of the tryptic digest of non-alkylated human hemoglobin, targeting the peptides with a potential site of adduction of globin α and globin β ($n=3$, analysis repeated three times with the same digest). The MRM transitions studied for each peptide are indicated above the histogram bars. The error bars correspond to the standard deviation.

In the case of the peptides β -T3 and α -T6, both of which having two identical alkylation sites previously identified [12,110], two peaks were observed for each peptide: two peaks eluting at 44.96 and 46.64 min for β -T3 (see **Figure S1b, Annexe 1**), and two peaks observed at 49.33 and 50.18 min for α -T6 (see **Figure S1c, Annexe 1**). By a similar approach as that mentioned in the previous paragraph, the adduction sites of these peptides were confirmed based on the fragmentation spectra. Indeed, in the case of the peptide β -T3, depending on the site of alkylation, the fragments y_5 to y_8 are different, thus enabling the identification of the glutamic acid residue carrying the HETE moiety. Therefore, the observation of the non-alkylated fragments y_5^+ and y_7^+ on the fragmentation spectrum of the peak eluted at 44.96 min (see **Figure S2c, Annexe 1**) led to the conclusion that this peak corresponded to the peptide alkylated on β -Glu²². On the other hand, the second peak eluting at 46.64 min was attributed to an alkylation on the residue β -Glu²⁶. Indeed, the alkylated fragments y_7^+ + HETE and y_8^+ + HETE were observed on the fragmentation spectrum (see **Figure S2d, Annexe 1**) of the second peak. In the same way, for the alkylated peptide α -T6, it appeared that the chromatographic peak at 49.33 min corresponded to the adduction on α -His⁴⁵ (see **Figure S2e, Annexe 1**) while the second peak eluting at 50.18 min corresponded to an adduction occurring on the residue α -His⁵⁰ (see **Figure S2f, Annexe 1**).

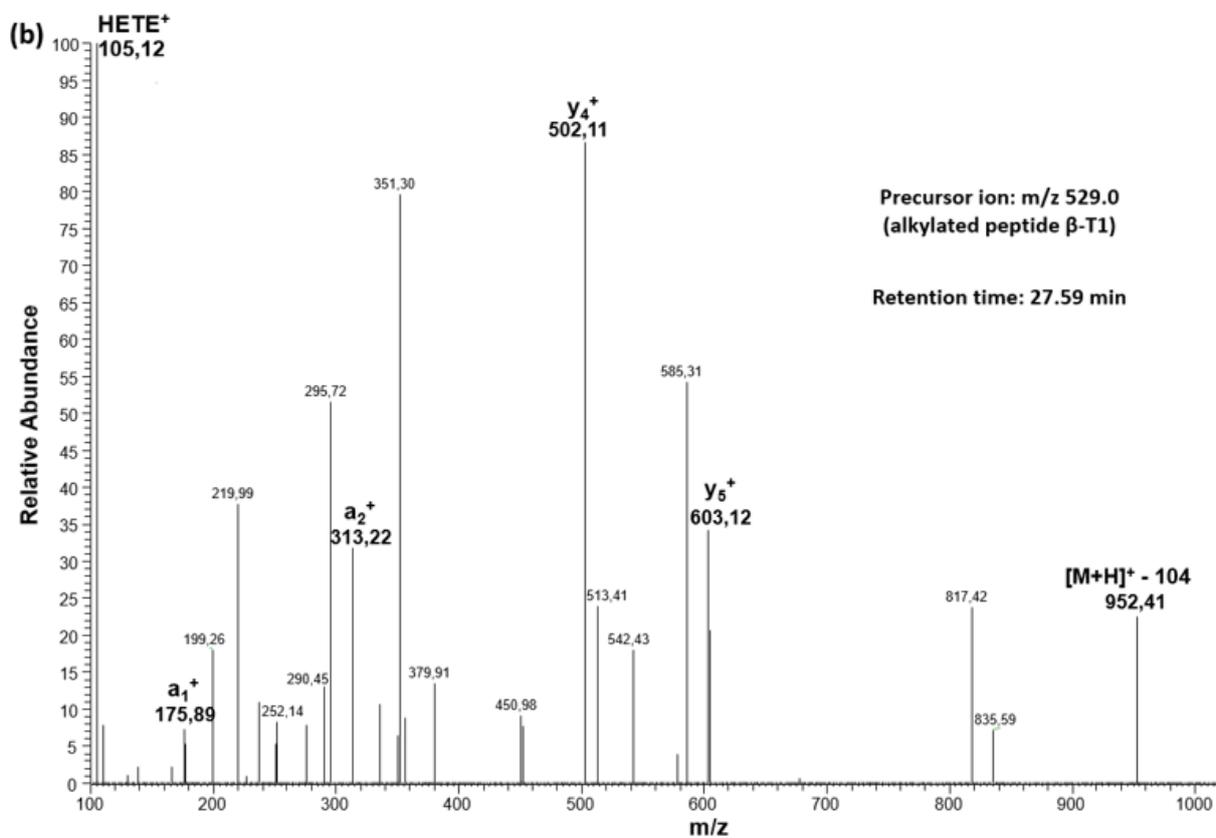
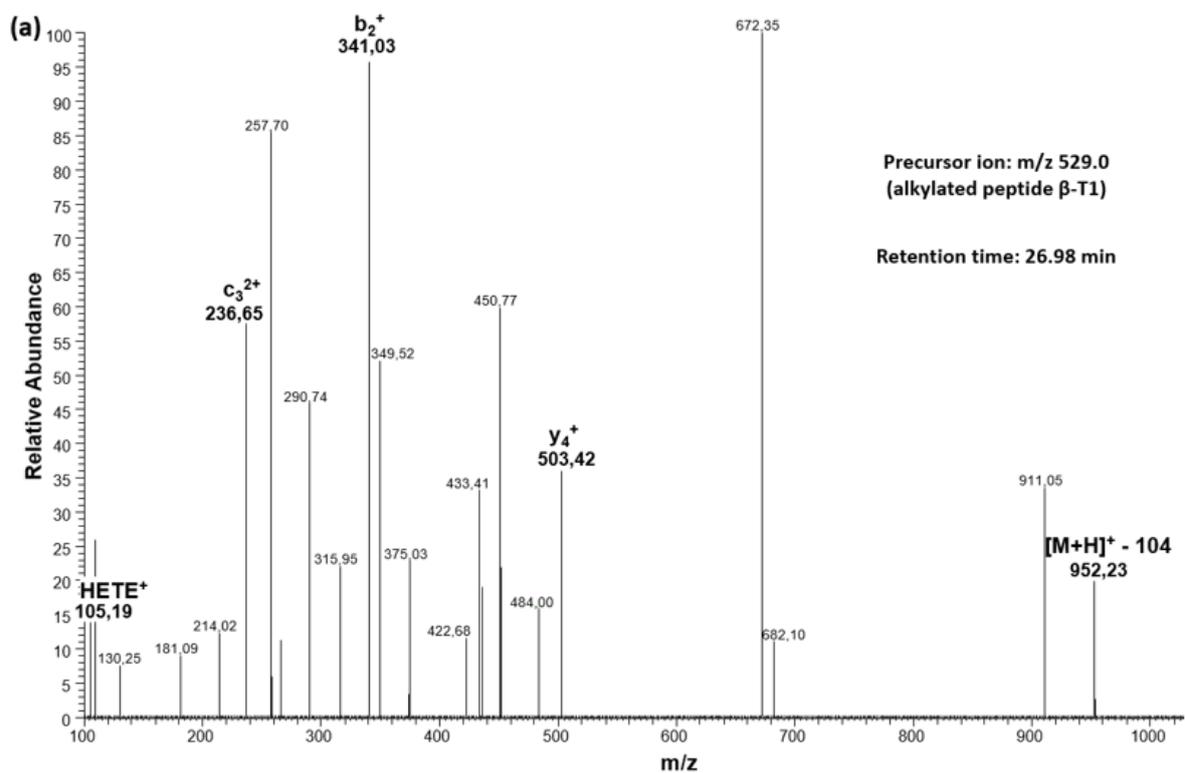


Figure 22. Fragmentation spectra obtained in Product Ion mode (collision voltage 25 V) for the alkylated peptide β -1 (precursor ion m/z 529.0) and corresponding to the adduction of sulfur mustard on the residue β -His² (a) and the residue β -Val¹ (b).

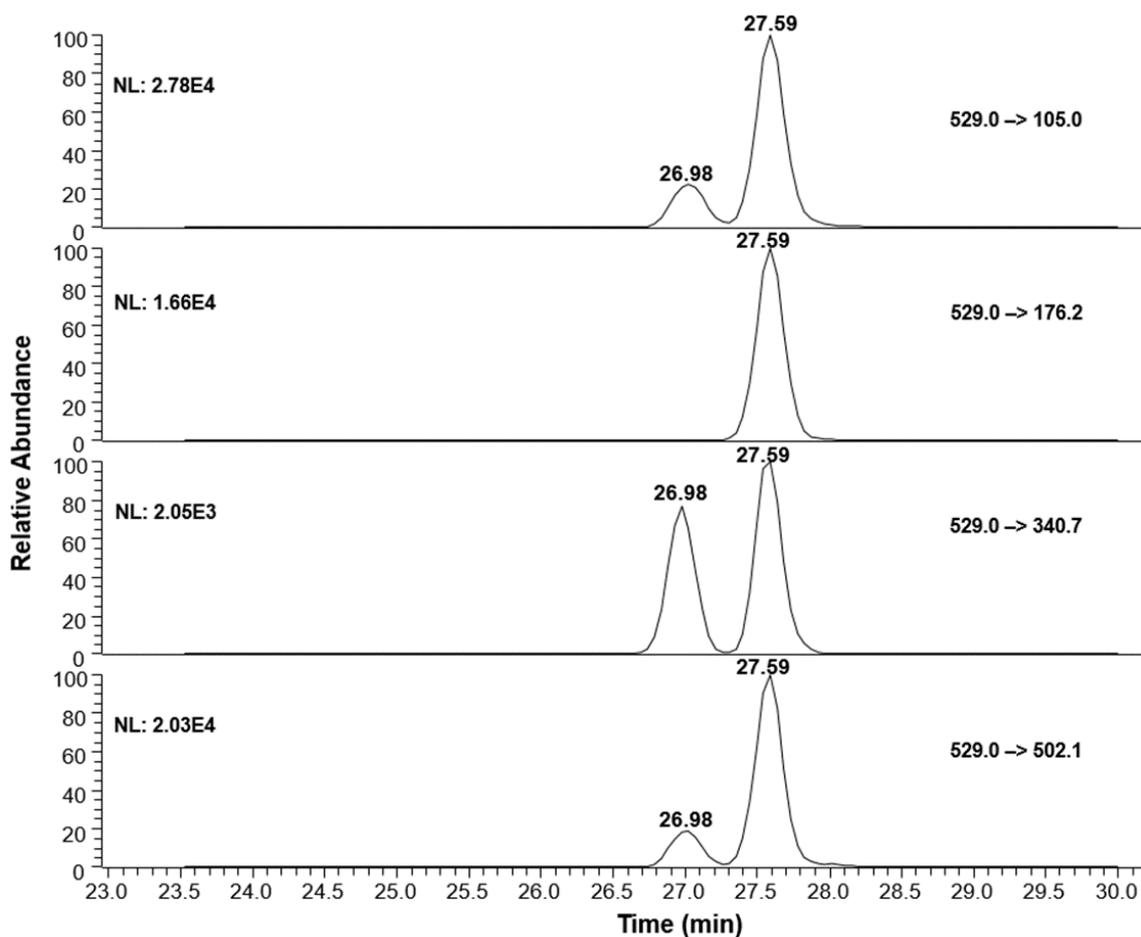


Figure 23. Chromatograms obtained for the MRM transitions of the alkylated peptide β -T1 resulting from the analysis of the tryptic digest of human hemoglobin at $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ incubated with sulfur mustard at $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The peak observed at 26.98 min corresponds to an adduction of sulfur mustard on β -His² and the peak eluting at 27.59 min corresponds to an adduction on β -Val¹.

Regarding the peptide α -T9, three distinct peaks, eluting at 65.00, 65.59 and 66.00 min, were observed on the chromatograms (see **Figure S1d, Annexe 1**): (i) The presence of the product ions m/z 143.2 and m/z 237.5 in the fragmentation spectrum of the first chromatographic peak (see **Figure S2g, Annexe 1**), corresponding respectively to the non-alkylated peptide fragment b_3^{2+} and the alkylated peptide fragment $y_5^{3+} + \text{HETE}$, was characteristic of an adduction of sulfur mustard on the residue α -His⁸⁷; (ii) The product ion m/z 388.0, which corresponds to the alkylated peptide fragment $y_2^+ + \text{HETE}$, was only observed on the fragmentation spectrum corresponding to the second chromatographic peak (see **Figure S2h, Annexe 1**), thus indicating that the adduction occurred on the residue α -His⁸⁹; (iii) Finally, the product ions m/z 726.1 and m/z 530.2, respectively corresponding to the adducted peptide fragment $y_{19}^{3+} + \text{HETE}$ and to non-alkylated peptide fragment z_{15}^{3+} , were detected in the fragmentation spectrum corresponding to the last chromatographic peak (see **Figure S2i, Annexe 1**). Since the other two histidine residues of the peptide α -T9 are alkylated, it was deduced that the last peak corresponded to an adduction of sulfur mustard on the third histidine residue, *i.e.* α -His⁷². Therefore,

even if the peptide α -T9 has already been described as an alkylated peptide, it is the first time that it is shown that this peptide presents multiple adduction sites and that these sites are clearly identified.

After selection of the more pertinent product ions, the adducted peptides were then analyzed in MRM mode. The transitions used for the MRM analyses, carried out in triplicate, are reported in the **Table 6**, as well as the retention times experimentally obtained for the 15 alkylated peptides of interest and the different mass parameters used (4th and 8th columns). Moreover, in the case of the peptides presenting multiple potential sites of adduction (α -T6, α -T9, β -T1, β -T3 and β -T11), only the mono-alkylated peptides, *i.e.* the peptides resulting from the adduction of sulfur mustard on only one of the two or three possible sites, were detected in MRM mode. Indeed, the analyses performed in Product Ion mode targeting the di-alkylated peptides (precursor ion m/z 1021.8 for α -T6 + 2 HETE, m/z 580.8 for β -T1 + 2 HETE, m/z 762.2 for β -T3 + 2 HETE and m/z 667.8 for β -T11 + 2 HETE, all ions doubly charged) or the tri-alkylated peptide (precursor ion m/z 1103.3 for α -T9 + 3 HETE, ion triply charged) did not give rise to any peaks. To confirm this, an analysis in MRM mode was also carried out using the same precursor ions but different transitions that considered the mass modification due to the two or three HETE moieties, but no peak was observed for the targeted peptides. Therefore, for the remainder of the presented study, only the mono-alkylated peptides (α -T6 + HETE, α -T9 + HETE, β -T1 + HETE, β -T3 + HETE and β -T11 + HETE) were studied. The chromatograms obtained in MRM mode for all the peptides presenting several adduction sites are given in **Figure 23** for the peptide β -T1 and in **Figure S1 (Annexe 1)** for α -T6, α -T9, β -T3 and β -T11. As observed on these chromatograms, the specificity of the MRM transitions studied led to distinct peaks, each corresponding to a precise adduction site.

As seen in the **Table 7**, the retention times obtained for all the alkylated peptides are in relative agreement with those of the corresponding non-alkylated ones. Indeed, the HETE moiety, resulting from the reaction of sulfur mustard with the adduction sites, leads to an increase of the hydrophobic character of the alkylated peptides thus favoring their retention in reversed phase, which explains why their retention times are slightly higher than those of the non-alkylated peptides (increase of the retention times from 0.7 to 24.4%). In addition to the accurate retention times, the MRM method also showed a satisfying repeatability of the peak areas for the alkylated peptides, with RSD values ranging from 0.5 to 9.3%, as illustrated on the **Figure 24**, hence highlighting the fact that the present analytical method could possibly be used for semi-quantitative analyses.

Table 6. Mass parameters and transitions used for the analysis in MRM mode of the tryptic digest of human hemoglobin at 50 mg.mL⁻¹ incubated in vitro with sulfur mustard, targeting the alkylated peptides and using the main product ions previously identified in Product Ion mode. The HD adduction sites are indicated in bold in the peptides sequences. For the peptides α -T6, α -T9, β -T1, β -T3 and β -T11, the fragments used to differentiate the different adduction sites are indicated by an asterisk.

Time segment	Alkylated peptide	Precursor ion	Tube lens	Retention time (min)	Product ions	Corresponding peptide fragment	Collision voltage
23.5-30 min	β -T1 VHLTPEEK (1-8) + HETE	m/z 529.0 (2 ⁺)	90 V	26.98 ^a	m/z 105.0	HETE ⁺	25 V
					m/z 340.7	VH (b ₂ ⁺) + HETE	25 V
					m/z 502.1	PEEK (y ₄ ⁺)	25 V
	β -T1 VHLTPEEK (1-8) + HETE	m/z 529.0 (2 ⁺)	90 V	27.59 ^b	m/z 105.0	HETE ⁺	25 V
					m/z 176.2	V (a ₁ ⁺) + HETE*	25 V
					m/z 340.7	VH (b ₂ ⁺) + HETE	25 V
					m/z 502.1	PEEK (y ₄ ⁺)	25 V
	α -T1 VLSPADK (1-7) + HETE	m/z 417.2 (2 ⁺)	95 V	28.00	m/z 105.3	HETE ⁺	15 V
					m/z 430.4	PADK (y ₄ ⁺)	15 V
30-38.2 min	α -T4 VGAHAGEYGAEALER (17-31) + HETE	m/z 817.4 (2 ⁺)	140 V	37.05	m/z 213.9	(HETE)His immonium ⁺	25 V
					m/z 704.0	HAGEYGAEALER (y ₁₂ ²⁺) + HETE	25 V
38.2-42 min	β -T11 LHVDPENFR (96-104) + HETE	m/z 615.8 (2 ⁺)	115 V	40.04 ^c	m/z 105.0	HETE ⁺	25 V
					m/z 355.4	LH (b ₂ ⁺) + HETE*	25 V
					m/z 662.5	PENFR (y ₅ ⁺)	25 V
					m/z 876.6	VDPENFR (y ₇ ⁺)*	25 V
	β -T11 LHVDPENFR (96-104) + HETE	m/z 615.8 (2 ⁺)	115 V	40.48 ^d	m/z 105.0	HETE ⁺	25 V
					m/z 251.1	LH (b ₂ ⁺)*	25 V
42-47.5 min	β -T3 VNVDEVGGEALGR (18-30) + HETE	m/z 710.0 (2 ⁺)	100 V	44.96 ^e	m/z 105.1	HETE ⁺	20 V
					m/z 758.6	VGGEALGR (y ₈ ⁺)*	25 V
	β -T3 VNVDEVGGEALGR (18-30) + HETE	m/z 710.0 (2 ⁺)	100 V	46.64 ^f	m/z 105.1	HETE ⁺	20 V
					m/z 763.3	GGEALGR (y ₇ ⁺) + HETE*	20 V
47.5-52 min	α -T6 TYFPHFDLSHGSAQVK (41-56) + HETE	m/z 646.7 (3 ⁺)	125 V	49.33 ^g	m/z 105.2	HETE ⁺	30 V
					m/z 237.0	TY (a ₂ ⁺)	30 V
					m/z 764.0	PHFDLSHGSAQVK (y ₁₃ ²⁺) + HETE	25 V

Time segment (continued)	Alkylated peptide	Precursor ion	Tube lens	Retention time (min)	Product ions	Corresponding peptide fragment	Collision voltage
47.5-52 min	α -T6 TYFPFDLSHGSAQVK (41-56) + HETE	m/z 646.7 (3 ⁺)	125 V	50.18 ^h	m/z 105.2	HETE ⁺	25 V
					m/z 237.0	TY (a ₂ ⁺)	30 V
					m/z 415.7	HGSAQVK (y ₇ ²⁺) + HETE*	25 V
					m/z 764.0	PHFDLSHGSAQVK (y ₁₃ ²⁺) + HETE	25 V
52-60 min	β -T9 VLGAFSGLAHLNLIK (67-82) + HETE	m/z 592.0 (3 ⁺)	90 V	58.53	m/z 643.6	SDGLAHLNLIK (y ₁₁ ²⁺) + HETE	20 V
					m/z 781.5	GAFSDGLAHLNLIK (y ₁₄ ²⁺) + HETE	15 V
60-63 min	β -T5 FFESFGDLSTPDAVMGNPK (41-59) + HETE	m/z 1082.2 (2 ⁺)	160 V	59.64	m/z 1116.6	STPDAVMGNPK (y ₁₁ ⁺)	20 V
					m/z 1401.6	GDLSTPDAVMGNPK (y ₁₄ ⁺)	30 V
63-99 min	α -T9 VADALNAVAHVDDMPNALSALSDLHAHK (62-90) + HETE	m/z 776.0 (4 ⁺)	125 V	65.00 ⁱ	m/z 105.0	HETE ⁺	25 V
					m/z 355.0	AHK (y ₃ ⁺)*	25 V
					m/z 709.9	LHAHK (y ₅ ⁺) + HETE*	25 V
					m/z 911.7	SDLHAHK (y ₇ ⁺) + HETE*	25 V
					m/z 977.8	DALNAVAHVDDMPNALSALSDLHAHK (y ₂₇ ³⁺) + HETE	20 V
	α -T9 VADALNAVAHVDDMPNALSALSDLHAHK (62-90) + HETE	m/z 776.0 (4 ⁺)	125 V	65.59 ^j	m/z 105.0	HETE ⁺	25 V
					m/z 388.0	HK (y ₂ ⁺) + HETE*	25 V
					m/z 709.9	LHAHK (y ₅ ⁺) + HETE*	25 V
					m/z 911.7	SDLHAHK (y ₇ ⁺) + HETE*	25 V
					m/z 977.8	DALNAVAHVDDMPNALSALSDLHAHK (y ₂₇ ³⁺) + HETE	20 V
	α -T9 VADALNAVAHVDDMPNALSALSDLHAHK (62-90) + HETE	m/z 776.0 (4 ⁺)	125 V	66.00 ^k	m/z 105.0	HETE ⁺	25 V
					m/z 355.0	AHK (y ₃ ⁺)*	25 V
m/z 807.5					SDLHAHK (y ₇ ⁺)*	25 V	
m/z 977.8					DALNAVAHVDDMPNALSALSDLHAHK (y ₂₇ ³⁺) + HETE	20 V	

^a Adduction on β -His²; ^b Adduction on β -Val¹; ^c Adduction on β -His⁹⁷; ^d Adduction on β -Val⁹⁸; ^e Adduction on β -Glu²²; ^f Adduction on β -Glu²⁶; ^g Adduction on α -His⁴⁵; ^h Adduction on α -His⁵⁰; ⁱ Adduction on α -His⁸⁷; ^j Adduction on α -His⁸⁹; ^k Adduction on α -His⁷².

Table 7. Identification and exploitation of the chromatographic peaks obtained during the MRM analysis in triplicate of the tryptic digest of human hemoglobin at 50 mg.mL⁻¹ incubated with sulfur mustard at 250 ng.mL⁻¹. Analysis targeting the alkylated peptides and using the precursor ion -> product ions transitions experimentally identified.

Alkylated peptide	Adduction site	MRM transition	Average S/N ratio (RSD %)	Retention time (min)	Retention time of the corresponding non alkylated peptide (min)	Increase of retention time (%)	Proportion of the peptide alkylated (alkylated peptide/corresponding non-alkylated peptide) (RSD %)	Alkylation rate (alkylated peptide/total of alkylated peptides) (RSD %)
α-T1 + HETE	α-Val ¹	417.2 -> 105.3	13 (9.6)	28.00	22.50	24.4	0.0006% (16.7)	4.26% (23.1)
		417.2 -> 430.4	23 (13.0)					
α-T4 + HETE	α-His ²⁰	817.4 -> 213.9	8 (21.2)	37.05	35.38	4.7	0.00087% (5.3)	0.22% (14.6)
		817.4 -> 704.0	16 (5.9)					
α-T6 + HETE	α-His ⁴⁵	646.7 -> 105.2	33 (5.8)	49.33	48.18	2.4	0.018% (21.0)	4.35% (11.8)
		646.7 -> 237.0	10 (5.0)					
		646.7 -> 764.0	27 (5.7)					
α-T6 + HETE	α-His ⁵⁰	646.7 -> 105.2	31 (13.1)	50.18	48.18	4.1	0.014% (16.5)	3.26% (13.7)
		646.7 -> 237.0	9 (23.5)					
		646.7 -> 415.7	62 (17.3)					
		646.7 -> 764.0	40 (6.3)					
α-T9 + HETE	α-His ⁷²	776.0 -> 105.0	4 (47.1)	66.00	64.52	2.3	0.0026% (13.8)	14.43% (11.4)
		776.0 -> 355.0	52 (5.8)					
		776.0 -> 807.5	83 (14.5)					
		776.0 -> 977.8	84 (31.2)					
α-T9 + HETE	α-His ⁸⁷	776.0 -> 105.0	6 (16.7)	65.00	64.52	0.7	0.0032% (7.3)	11.33% (13.0)
		776.0 -> 355.0	70 (10.8)					
		776.0 -> 709.9	34 (4.41)					
		776.0 -> 911.7	14 (3.70)					
		776.0 -> 977.8	544 (48.2)					
α-T9 + HETE	α-His ⁸⁹	776.0 -> 105.0	6 (8.3)	65.59	64.52	1.5	0.0025% (17.7)	10.18% (11.2)
		776.0 -> 388.0	11 (4.5)					
		776.0 -> 709.9	17 (21.2)					
		776.0 -> 911.7	18 (11.4)					
		776.0 -> 977.8	300 (13.2)					

Alkylated peptide	Adduction site	MRM transition	Average S/N ratio (RSD %)	Retention time (min)	Retention time of the corresponding non alkylated peptide (min)	Increase of retention time (%)	Proportion of the peptide alkylated (alkylated peptide/corresponding non-alkylated peptide) (RSD %)	Alkylation rate (alkylated peptide/total of alkylated peptides) (RSD %)
β -T1 + HETE	β -Val ¹	529.0 -> 105.0	49 (16.3)	27.59	25.25	9.3	0.041% (18.5)	4.00% (8.9)
		529.0 -> 176.2	28 (25.1)					
		529.0 -> 340.7	12 (4.1)					
		529.0 -> 502.1	6 (27.2)					
β -T1 + HETE	β -His ²	529.0 -> 105.0	6 (16.7)	26.98	25.25	6.9	0.009% (22.4)	0.91% (12.8)
		529.0 -> 340.7	13 (7.3)					
		529.0 -> 502.1	8 (47.1)					
β -T3 + HETE	β -Glu ²²	710.0 -> 105.1	39 (16.7)	44.96	41.13	9.3	0.00047% (10.8)	1.59% (12.4)
		710.0 -> 758.6	31 (3.2)					
β -T3 + HETE	β -Glu ²⁶	710.0 -> 105.1	7 (7.1)	46.64	41.13	13.4	0.00051% (5.4)	1.63% (14.5)
		710.0 -> 763.3	347 (1.3)					
β -T5 + HETE	β -Glu ⁴³	1082.2 -> 1116.6	7 (44.2)	63.20	59.64	6.0	0.00019% (15.2)	0.41% (9.5)
		1082.2 -> 1401.6	15 (23.7)					
β -T9 + HETE	β -His ⁷⁷	592.0 -> 643.6	530 (4.3)	58.53	56.69	3.2	0.009% (12.8)	36.03% (8.1)
		592.0 -> 781.5	950 (28.4)					
β -T11 + HETE	β -His ⁹⁷	615.8 -> 105.0	27 (9.9)	40.04	38.81	3.2	0.0032% (6.0)	5.19% (10.8)
		615.8 -> 355.4	70 (1.4)					
		615.8 -> 662.5	103 (24.9)					
		615.8 -> 876.6	28 (47.1)					
β -T11 + HETE	β -Val ⁹⁸	615.8 -> 105.0	4 (47.1)	40.48	38.81	4.3	0.0012% (7.9)	2.21% (9.3)
		615.8 -> 251.1	24 (10.6)					
		615.8 -> 662.5	35 (2.9)					

^a Not detected.

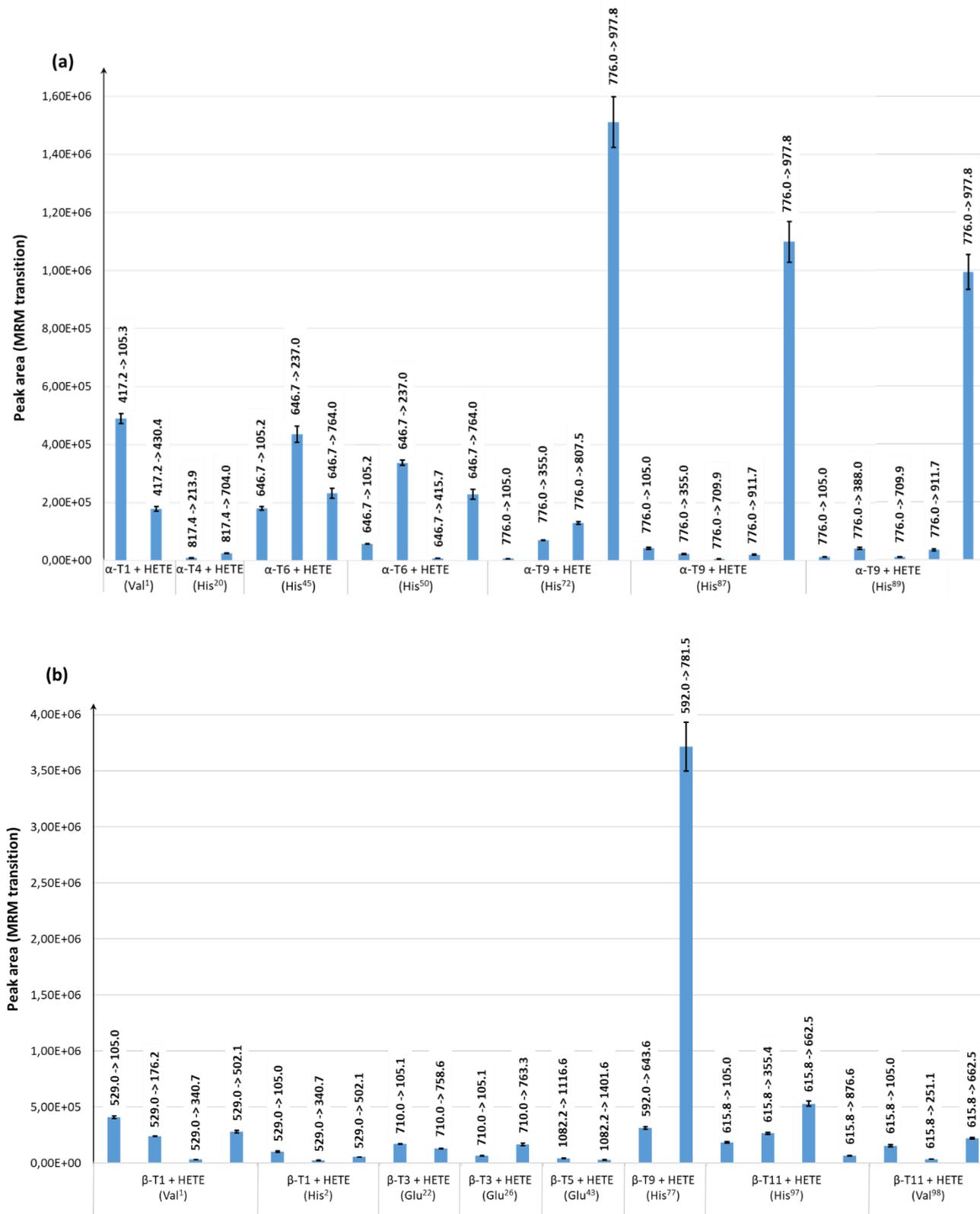


Figure 24. Areas (arbitrary unit) of the chromatographic peaks of globin α (a) and globin β (b) observed during the MRM analysis of the tryptic digest of human hemoglobin at 50 mg.mL⁻¹ incubated with sulfur mustard at 100 μ g.mL⁻⁴, targeting the alkylated peptides (n=3, analysis repeated three times with the same digest). The MRM transitions studied for each peptide are indicated above the histogram bars. The error bars correspond to the standard deviation.

II.2.3.4. Influence of the concentration of sulfur mustard on the alkylation

In order to determine if the alkylation of some peptides depends on the concentration of sulfur mustard, hemoglobin (50 mg.mL⁻¹ in pure water) was incubated with sulfur mustard at concentrations of 250 ng.mL⁻¹, 500 ng.mL⁻¹, 1 µg.mL⁻¹, 10 µg.mL⁻¹ and 100 µg.mL⁻¹. After tryptic digestion, the resulting peptides were analyzed in MRM mode, using the same mass parameters and transitions than those previously optimized. As observed on the curves shown on **Figure S3** and **S4 (Annexe 1)**, a satisfying linearity was obtained on the concentration range studied for all the alkylated peptides targeted, thus confirming previous observations [12,57]. This linearity reflects the fact that, for this concentration range of sulfur mustard, alkylation is carried out in an identical manner independent of the adducted site. Based on the experimental values of the S/N ratios obtained for the alkylated peptides resulting from the incubation of hemoglobin at 50 mg.mL⁻¹ with sulfur mustard at 250 ng.mL⁻¹ (see **Table 7**), it is possible to estimate the potential sensitivity of the analytical method and therefore to determine the minimum theoretical concentration of sulfur mustard with which hemoglobin can be incubated and that can be detected. Experimentally, the highest S/N ratio obtained was 950 for the alkylated peptide β-T9 + HETE (transition 592.0 → 781.5). The second MRM transition for this peptide (592.0 → 643.6), used for confirmation, was less sensitive, with a S/N ratio of 530. Knowing that the hemoglobin sample used for the study was incubated with 250 ng.mL⁻¹ of sulfur mustard, the theoretical limit of quantification (LOQ) for sulfur mustard measured as modified peptides and corresponding to a S/N ratio of 10 was thus estimated to range between 2.63 and 4.72 ng.mL⁻¹. Therefore, this result implies that it could be possible to detect alkylated peptides resulting from the *in vitro* incubation of 50 mg.mL⁻¹ hemoglobin with sulfur mustard down to 2.63 ng.mL⁻¹. Consequently, the MRM method described in this paper appears to be sensitive and allows unambiguous identification of alkylated peptides.

In addition to being sensitive, the presented method also appeared to have a satisfying repeatability, with RSD of the area of the most intense MRM transition ranging from 0.02 to 15.05% for twelve alkylated peptides and from 0.9 to 23.57% for the three last ones (α-T4 + HETE, α-T6 + HETE (adduction on α-His⁴⁵) and β-T1 + HETE (adduction on β-His²)).

Moreover, by hypothesizing that the alkylated and the corresponding non-alkylated peptides have the same ionization potential during ESI process, the proportion of alkylated peptide (calculated by the ratio between the peak area of an alkylated peptide and the peak area of its corresponding non-alkylated peptide) has been determined for each peptide of interest and for the lowest sulfur mustard concentration studied. The results, reported on the penultimate column of the **Table 7**, demonstrated that the method developed in the present paper allows the detection of alkylated peptides even if, for a given peptide, less than 2 chains over one million were alkylated (for alkylated peptide β-T5 for

example). In addition, the alkylation rate (quantity of a given alkylated peptide/total of alkylated peptides), was determined for all the different sulfur mustard concentrations studied (last column of the **Table 7**), and demonstrated that the alkylation rates seem to strongly vary from an alkylation site to another. On one hand, the peptides α -T6, α -T9, β -T9 and β -T11, all alkylated on a histidine residue, show high alkylation rates. Altogether they correspond to almost 85% of the alkylation induced on hemoglobin. On the other hand, the adduction on the N-terminal valine residues (peptides α -T1 and β -T1) represents more than 8% of the total alkylation induced on hemoglobin, which is 4 to 8 times more than what Noort and Black have previously reported [62]. The fact that 85% of the alkylation occurs on histidine residues highlights and confirms the fact that there is a possibility to develop an alternative method to the modified Edman degradation procedure for the analysis of adducts that sulfur mustard forms with hemoglobin. The method described in this paper could therefore appear as a potential alternative procedure that could allow improving measurement of hemoglobin-sulfur mustard adducts.

II.2.4. Conclusion

The LC-MS/MS method developed in this study allowed to detect alkylated peptides resulting from the tryptic digestion of hemoglobin (50 mg.mL^{-1}) after its *in vitro* incubation with sulfur mustard at a concentration level down to 250 ng.mL^{-1} , which corresponded to a sulfur mustard/hemoglobin molar ratio (0.002 mol/mol) up to 5 742 times lower than those used in previous reported studies related to the identification of the sites of adduction. Five new adduction sites were unequivocally identified for the first time (α -His⁷², α -His⁸⁷, α -His⁸⁹, β -His² and β -Val⁹⁸) and this method allowed the identification of 15 hemoglobin-sulfur mustard peptide adducts (α -T1 + HETE, α -T4 + HETE, α -T6 + HETE (adducted on α -His⁴⁵ or α -His⁵⁰), α -T9 + HETE (adducted on α -His⁷², α -His⁸⁷ or α -His⁸⁹), β -T1 + HETE (adducted on β -Val¹ or β -His²), β -T3 + HETE (adducted on Glu²² or Glu²⁶), β -T5 + HETE, β -T9 + HETE and β -T11 + HETE (adducted on β -His⁹⁷ or β -Val⁹⁸). In the case of peptides with several potential alkylation sites (α -T6, α -T9, β -T1, β -T3 and β -T11), it was possible to discriminate between sites for all peptides, based on their retention times and MRM transitions studied. The presented method showed satisfying linearity and repeatability for all the targeted alkylated peptides on the concentration range of sulfur mustard studied. The linear link existing between the amount of sulfur mustard and the adduction of hemoglobin showed that it could be possible to use this method for further semi-quantitative analyses.

Moreover, while previous works were mostly qualitative studies, the present study was more focused on a semi quantitative aspect since it highlighted variations of alkylation rates between the different sites of adduction. Therefore, it was shown that sulfur mustard preferentially alkylated the histidine residues of hemoglobin, thus confirming the results obtained in previous studies, but also the N-

terminal valine residues of both globin chains. In addition to being linear and repeatable, the analytical method described in this paper also proved to be sensitive. Indeed, based on the obtained results, it is theoretically possible to detect alkylated peptides resulting from the incubation of hemoglobin in pure water with sulfur mustard at 2.63 ng.mL^{-1} . This low LOQ is encouraging to consider working with lower sulfur mustard concentrations that would be closer to a real exposure level to sulfur mustard, while developing and optimizing a sample treatment step to extract hemoglobin from the biological matrix in order to analyze blood samples.

Acknowledgments

The authors would like to thank the French Defense Procurement Agency (DGA) for its financial support and for providing alkylated hemoglobin solutions for the study.

CHAPITRE III

DEVELOPPEMENT DE REACTEURS ENZYMATIQUES
IMMOBILISES POUR L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE
L'HEMOGLOBINE ADDUITE PAR L'YPERITE

Chapitre III : Développement de réacteurs enzymatiques immobilisés pour l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine aduite par l'ypérite

III.1. Etat de l'art sur les réacteurs enzymatiques immobilisés

III.1.1. Principe des IMERs

Lors d'études protéomiques, les protéines sont généralement clivées en peptides, plus facilement analysables en LC-MS/MS que les protéines intactes. Dans ce cas, des enzymes hydrolases, et plus particulièrement des protéases (également appelées peptidases ou enzymes protéolytiques) sont utilisées pour digérer les protéines en clivant les liaisons peptidiques. Si cette étape de digestion est généralement réalisée en solution, ce mode de digestion présente toutefois de nombreux inconvénients. En effet, à cause de l'autodigestion (autolyse) de la protéase, le digestat résultant de la digestion en solution est très complexe à analyser puisque les peptides provenant de l'enzyme peuvent interférer lors de l'analyse et de la détection des peptides d'intérêt issus de la digestion des protéines cibles [135]. Afin de limiter l'autodigestion de la protéase, les digestions en solution sont souvent réalisées avec des rapports molaires Enzyme/Substrat (E/S) de l'ordre de 1/100 à 1/50 [136,137]. Par conséquent, la digestion complète des protéines contenues dans un échantillon peut être très chronophage et dure souvent toute une nuit, soit environ 16-18h, bien qu'il existe des digesteurs sous ultrasons permettant de réduire la durée de la digestion. En outre, la dilution de l'échantillon dans le tampon de digestion conduit à des limites de détection élevées. Afin de gagner en sensibilité, l'échantillon peut être concentré sur une pipette ZipTip® (pointe de pipette comprenant un lit de résine chromatographique sans volume mort et permettant de dessaler, concentrer et purifier les échantillons en une seule étape) avant d'être analysé, mais cela ajoute une étape supplémentaire à la procédure de traitement des échantillons [138]. Qui plus est, cette étape de concentration peut conduire à une perte des peptides les plus polaires. De plus, puisque les enzymes utilisées lors d'une digestion en solution ne sont pas réutilisables, le coût à long terme des analyses peut parfois être élevé. Enfin, bien qu'il existe des robots pipetteurs pouvant réaliser des digestions en solution sur plaque de 96 puits, la digestion en solution reste difficilement automatisable et ne peut pas être réalisée en ligne avec l'analyse des peptides résultants par chromatographie. De fait, afin de s'affranchir des limitations liées à la digestion en solution, il est possible de réaliser l'hydrolyse des protéines à l'aide de protéases immobilisées sur un support solide (IMER). Cette immobilisation présente en effet de nombreux avantages, tels que l'absence d'autolyse permettant de travailler avec des rapports E/S plus importants

ce qui conduit à une cinétique de réaction bien plus élevée, mais également la réutilisation des supports et l'automatisation de l'étape de digestion directement en ligne avec l'analyse LC-MS/MS des peptides. Les réacteurs enzymatiques immobilisés (IMER, IMobilized Enzyme Reactor) peuvent également être utilisés dans des secteurs variés tels que l'agroalimentaire ou les industries textiles et pharmaceutiques pour la production d'acrylamide ou encore l'hydrolyse du lactose [139].

Si la première mention d'IMER remonte à 1916 avec l'immobilisation d'invertase, hydrolase catalysant l'hydrolyse du saccharose en fructose et en glucose, par adsorption sur du charbon [140], l'immobilisation sur support solide d'enzymes par liaisons covalentes a été reportée pour la première fois dans les années 1970 dans le cas de procédés industriels tels que la biocatalyse [141]. Pour ce qui est du domaine de la protéomique, la première utilisation d'IMER date de la fin des années 1980 [142]. Dans cette étude, un IMER à base de trypsine immobilisée sur un gel d'agarose conditionné dans un tube Pyrex de 30 cm de longueur et de 1 mm de diamètre interne (d.i.) a été utilisé pour caractériser des protéines pures. Cette première application a par la suite ouvert la voie à de nombreuses autres études en protéomique utilisant des IMERs préparés avec différents supports. En effet, l'immobilisation des enzymes peut être effectuée de manière covalente ou non (par adsorption ou inclusion dans un gel), et les IMERs peuvent ensuite être conditionnés en différents formats : embouts de pipettes, cartouches, disques ou pré-colonnes [143], mais les enzymes peuvent également être immobilisées sur des monolithes synthétisés *in situ* dans des capillaires de très faible diamètre (d.i. < 100 µm) comme récemment réalisé au sein de notre laboratoire [134,144]. De nombreuses revues répertorient l'utilisation des IMERs pour l'analyse de protéines et mettent en avant les avantages de ces derniers, notamment la réduction des temps de digestion de plusieurs heures à quelques minutes, tout en conservant des taux de recouvrement de séquences similaires à ceux obtenus lors de digestion en solution [135,145–150].

III.1.2. Sélection des protéases

Les protéases, enzymes majoritairement utilisées pour le développement d'IMERs, peuvent être divisées en sept catégories, selon le type de mécanisme mis en jeu au cours de la réaction enzymatique [151] et de la nature du site actif de la peptidase. De fait, il est possible de distinguer les protéases à cystéine, à sérine, à acide glutamique, à acide aspartique, à thréonine, ainsi que les métalloprotéases et l'asparagine peptide lyase.

La protéase la plus utilisée dans les études protéomiques pour la digestion enzymatique des protéines est la trypsine. Cette enzyme, de poids moléculaire de 23 kDa, présente une activité optimale dans des tampons salins ayant un pH compris entre 7,5 et 8,5 et clive spécifiquement à l'extrémité C-terminale des résidus lysine et arginine [135]. La trypsine est une protéase à sérine possédant une triade

catalytique, composée d'une sérine, d'une histidine et d'un aspartate, et constituant le site actif de l'enzyme [137]. Lors de la digestion enzymatique, le carbonyle de la liaison peptidique subit une attaque nucléophile du groupement hydroxyle de la sérine, ce qui conduit à la libération du premier peptide. Le second peptide est, quant à lui, libéré suite à l'attaque d'une molécule d'eau sur le même carbone (voir **Figure 25**).

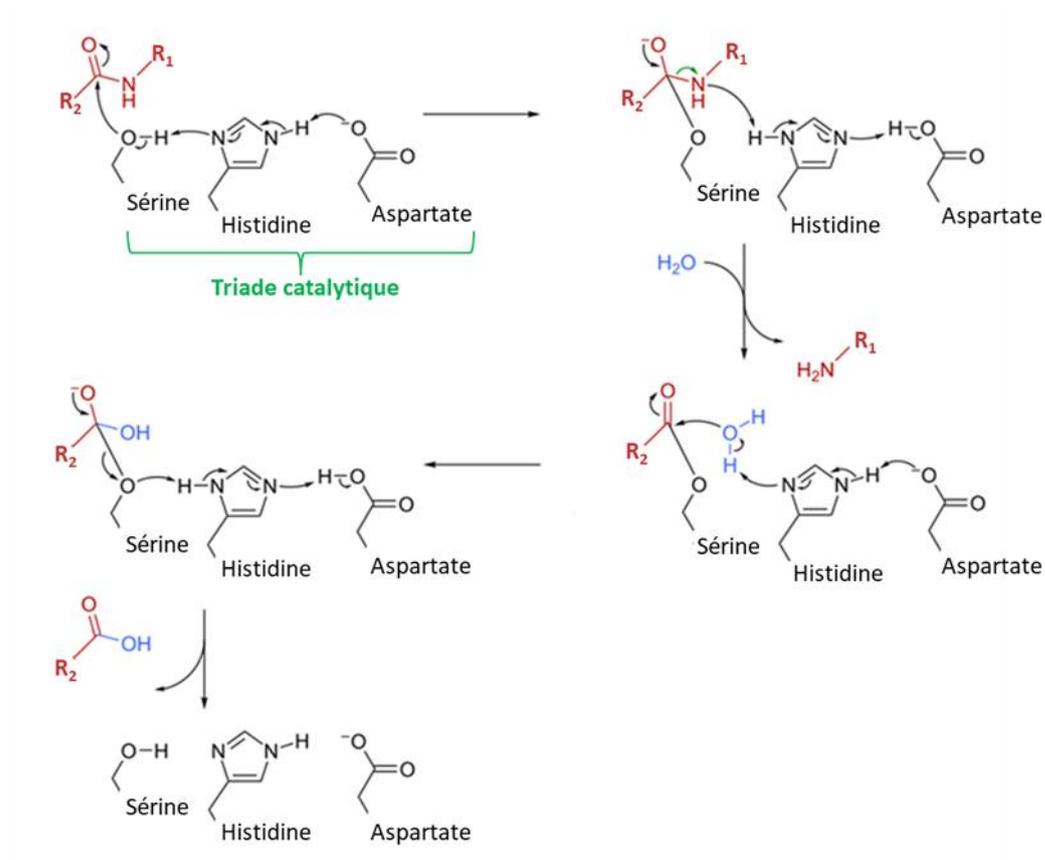


Figure 25. Mécanisme d'action de la trypsine lors de la digestion enzymatique de protéines.

Quelques études mentionnent également l'utilisation de la pepsine, protéase de masse moléculaire 34,5 kDa et présentant une activité optimale pour un pH compris entre 1 et 3, pour la digestion des protéines. Toutefois, son utilisation est peu fréquente en raison de sa plus faible spécificité des sites de clivage [135,136]. De fait, les digestats résultant de la digestion par la pepsine sont très souvent complexes et difficiles à analyser, même à l'aide d'outils informatiques. Bien que moins spécifique que la trypsine, la pepsine coupe préférentiellement des liaisons peptidiques dans lesquelles sont engagés des acides aminés aromatiques, tels que la tyrosine, la phénylalanine ou le tryptophane [152]. En outre, il a été reporté que les ruptures étaient plus spécifiques à pH 1,3 au niveau des résidus leucine et phénylalanine, mais cette spécificité est perdue pour des pH supérieurs à 2 [152].

III.1.3. Sélection du support d'immobilisation

III.1.3.1. Techniques d'immobilisation non covalente

III.1.3.1.1. Immobilisation par adsorption

Lors d'une immobilisation par adsorption, les enzymes sont retenues à la surface d'un support inerte et insoluble grâce à des interactions secondaires, principalement des interactions électrostatiques ou hydrophobes, qui s'établissent entre les groupements fonctionnels de l'enzyme et ceux du support. Dans ce cas, l'enzyme immobilisée garde une certaine mobilité conformationnelle, ce qui lui permet de conserver ses propriétés catalytiques. Toutefois, des variations de pH, de température ou de force ionique peuvent facilement provoquer la désorption des enzymes [153], ce qui explique pourquoi cette technique est peu utilisée, notamment dans le cadre d'une utilisation répétée.

III.1.3.1.2. Immobilisation par encapsulation dans un gel

L'immobilisation par inclusion dans un gel repose sur l'encapsulation de l'enzyme dans les mailles d'un réseau polymérique, tel qu'un polymère inorganique de type sol-gel. Dans ce cas, il n'existe aucune interaction entre le polymère et l'enzyme, qui n'est par conséquent pas dénaturée. Toutefois, si les mailles du réseau sont trop larges, il peut y avoir un risque important de relargage de l'enzyme. En outre, dans la cas d'un polymère présentant une importante réticulation, la cinétique de l'enzyme est fortement ralentie par la diffusion du produit et du substrat. Cette méthode d'immobilisation n'est par conséquent pas adaptée pour des applications en protéomique et est principalement utilisée pour des substrats et des produits ayant un faible poids moléculaire.

III.1.3.2. Supports pour l'immobilisation covalente des protéases

La procédure la plus employée pour immobiliser des protéases est le greffage des enzymes par liaisons covalentes sur un support activé. Bien que les liaisons covalentes puissent limiter la mobilité conformationnelle des protéases, la très grande stabilité de ces liaisons réduit fortement le risque de relargage des enzymes. Une grande variété de supports existe pour l'immobilisation d'enzymes par liaisons covalentes et le choix du support dépend de nombreux critères. En effet, plusieurs caractéristiques doivent être considérées lors de la mise au point d'un IMER, en particulier le mécanisme de réaction mis en jeu pour l'immobilisation des enzymes, mais également la nature du support ainsi que ses propriétés chimiques et mécaniques [154]. La nature du support apparaît comme un facteur déterminant puisqu'elle détermine l'accessibilité des sites actifs de la protéase et donc son activité enzymatique. Par conséquent, une attention particulière doit être portée à la taille des pores, à la perméabilité et à la nature des fonctions chimiques en surface du support, afin d'obtenir un réacteur enzymatique performant. Le support doit aussi être le plus chimiquement inerte possible, de

manière à limiter au maximum le développement d'interactions non spécifiques avec les peptides résultants de la digestion enzymatique pour que ces derniers puissent être récupérés et analysés. De plus, le support doit être résistant et mécaniquement stable, afin de pouvoir être réutilisé à de nombreuses reprises. Par conséquent, le gonflement potentiel du support est également un paramètre clé. Enfin, les conditions de stockage des IMERs, notamment en terme de pH, sont très importantes afin de conserver l'activité des enzymes immobilisées.

Les matériaux utilisés pour l'immobilisation de protéases peuvent être classés en deux principales catégories, les matériaux inorganiques ou organiques [154], qui sont détaillées dans les paragraphes ci-dessous.

III.1.3.2.1. Immobilisation sur matériaux inorganiques

La littérature référence plusieurs matériaux inorganiques, tels que la silice, l'alumine ou la zéolite, pour l'immobilisation d'enzymes [154]. La silice est le support inorganique le plus utilisé pour le développement d'IMERs, en raison de sa stabilité mécanique et de sa grande surface spécifique [155]. Cependant, son utilisation dans le cadre du développement d'IMERs à base de pepsine s'avère très délicate puisque la silice se dégrade dans des conditions basiques ou acides. De fait, l'immobilisation des protéases est majoritairement réalisée sur des supports polymériques organiques.

III.1.3.2.2. Immobilisation sur matériaux organiques

Des supports commerciaux à base de polymères organiques ont été utilisés dans de nombreuses études [136,143]. Ces supports ont l'avantage d'être stables sur une grande gamme de pH et présentent une meilleure stabilité mécanique que les gels. Ces polymères organiques peuvent consister en des particules de polystyrène-divinylbenzène avec une distribution de pores bimodale, signifiant que le polymère présente un réseau de macropores permettant le bon écoulement des fluides dans le matériau, mais également un réseau de micro-/mésopores qui permet d'obtenir une surface spécifique importante afin de maximiser la quantité d'enzymes pouvant être immobilisées sur le support. Ce support fonctionnalisé avec de la trypsine (Poroszyme®, Applied Biosystems) est ainsi disponible commercialement. D'autres supports à base de trypsine immobilisée sur des supports polymériques particuliers similaires sont commercialement disponibles auprès des fournisseurs Perfinity Biosciences (NoRA® Trypsin Column [136] et Perfinity® Trypsin column [156]) et Orcachrom (StyrosZyme®) [157]. Enfin, d'autres supports basés sur l'immobilisation de la trypsine sur des monolithes sont également commercialisés, notamment le support CIM® chez Bio Separations [158,159], qui se présente sous la forme de disques de faibles dimensions et à base de méthacrylate de glycidyle et de diméthacrylate d'éthylène glycol. Peu d'études portant sur l'utilisation d'IMERs de

pepsine pour l'analyse de protéines, seuls quelques supports sous format particulière à base de pepsine sont commercialisés, le principal étant le support PorosZyme® immobilized pepsin cartridge de chez Applied Biosystems [106].

Lors de l'utilisation de ces supports commerciaux, il est recommandé d'utiliser 5% d'acétonitrile ou de méthanol de manière à limiter les interactions non spécifiques entre les peptides hydrophobes et le support [160–162]. Aucune étude n'a cependant porté sur une réelle évaluation de ces interactions non spécifiques et sur l'influence potentielle de l'ajout de solvant organique sur l'identification et la quantification des peptides résultant de l'étape de digestion enzymatique.

En dehors des supports commerciaux mentionnés ci-dessus, de nombreuses études portent sur l'immobilisation d'enzymes sur des supports organiques tels que l'agarose [163,164] dont la Sépharose activée par du bromure de cyanogène (CNBr) [164,165] ou activée N-hydroxysuccinimide [166–168] ou encore le chitosane [169]. Certains de ces supports greffés avec la trypsine ont permis de digérer des protéines comme la myoglobine [166], la BSA [168], le cytochrome C [166,168] ou encore les métalloprotéases matricielles [167]. Toutefois, il doit être souligné que les IMERs à base de chitosane sont très peu utilisés en raison du gonflement du matériau, le rendant inhomogène et chimiquement peu stable [170]. Concernant les gels d'agarose tels que la Sépharose, ils ont l'avantage de ne développer que très peu d'interactions non spécifiques mais ne sont chimiquement stables qu'à des pH compris entre 4 et 9 et ne supportent pas des pressions supérieures à 4 bars [133,171]. Si ces différents matériaux peuvent être utilisés pour la synthèse de réacteurs enzymatiques en laboratoire, il est à noter que des billes d'agarose greffées par la pepsine [172,173] ou la trypsine [142,166] sont également disponibles commercialement.

Si les quantités d'enzymes greffées sur les supports commerciaux sont rarement mentionnées par les fournisseurs et que ces supports peuvent développer des interactions non spécifiques avec les peptides résultant de la digestion enzymatique, la synthèse d'IMER en laboratoire présente de nombreux avantages, notamment le fait de pouvoir choisir le format du réacteur enzymatique tout en contrôlant les taux de greffage. Ainsi, au cours d'une précédente thèse réalisée au LSABM (A. Cingöz, 2006-2009) [174], trois supports ont été étudiés pour l'immobilisation de la trypsine [133]. Ces trois supports à base de silice fonctionnalisée glutaraldéhyde ou de Sépharose activée NHS ou CNBr sont représentés en **Figure 26**.

Chacun des trois IMERs développés avec les supports mentionnés précédemment a été conditionné dans une pré-colonne de dimensions 20 x 2 mm d.i. et a été évalué en digérant une petite molécule, le N α -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide (BApNA), pendant 30 min (voir **Figure 27**).

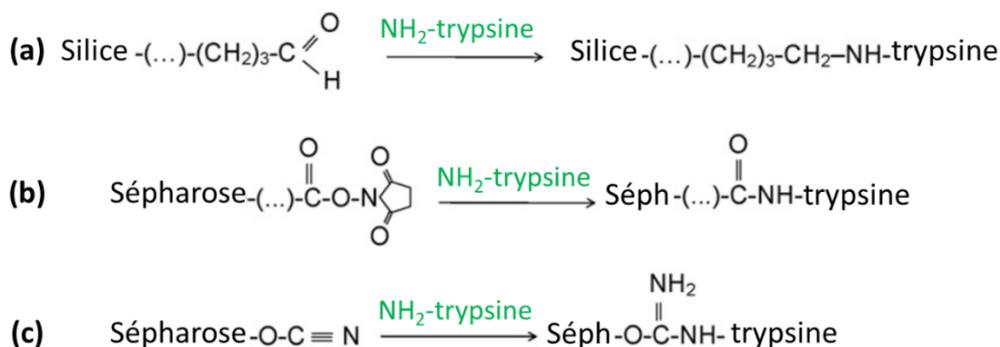


Figure 26. Réactions d'immobilisation de la trypsine sur la silice fonctionnalisée glutaraldéhyde (a), la Sépharose activée NHS (b) ou la Sépharose activée CNBr (c). Adapté de [133].

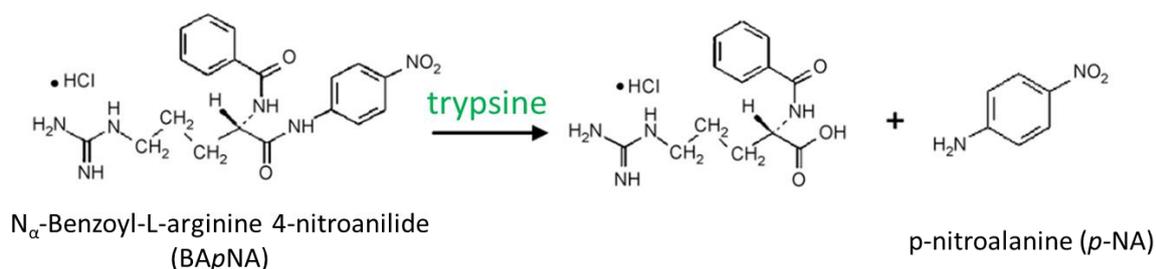


Figure 27. Digestion du BApNA par la trypsine. Adapté de [133].

Après percolation d'eau, le taux de récupération sur chaque IMER a été déterminé par analyse LC-UV, en faisant le rapport de la quantité totale du produit de digestion, la p-nitroaniline (p-NA), et de BApNA résiduel non digéré sur la quantité initiale de BApNA introduite dans l'IMER. Un taux de récupération de 100% a été obtenu pour les trois IMERs, indiquant ainsi l'absence d'interactions non spécifiques entre les matériaux étudiés et les composés. En parallèle, des digestions sur un IMER commercial à base de trypsine (StyrosZyme®, 50 x 2,1 mm d.i.) ont été réalisées dans les mêmes conditions et il est apparu que les taux de récupération sur ce support étaient inférieurs à 100% pour une élution avec de l'eau. L'étude a démontré qu'il était nécessaire d'ajouter 50% d'acétonitrile dans la phase d'élution afin d'obtenir des taux de récupération de 100%. Toutefois, ce pourcentage élevé de solvant organique peut, à terme, dénaturer irrémédiablement les enzymes immobilisées et engendrer une perte de stabilité de l'IMER au cours du temps. Enfin, en comparant les taux de digestion, calculés en faisant le rapport entre la quantité de p-NA récupérée et la quantité initiale de BApNA introduite, obtenus avec les trois IMERs synthétisés en laboratoire et avec l'IMER commercial, il a été démontré que les meilleurs résultats résultaient de la digestion sur le support Sépharose activée CNBr (voir **Figure 28**). Ce support a par conséquent été identifié comme étant le plus adapté pour la synthèse d'IMER.

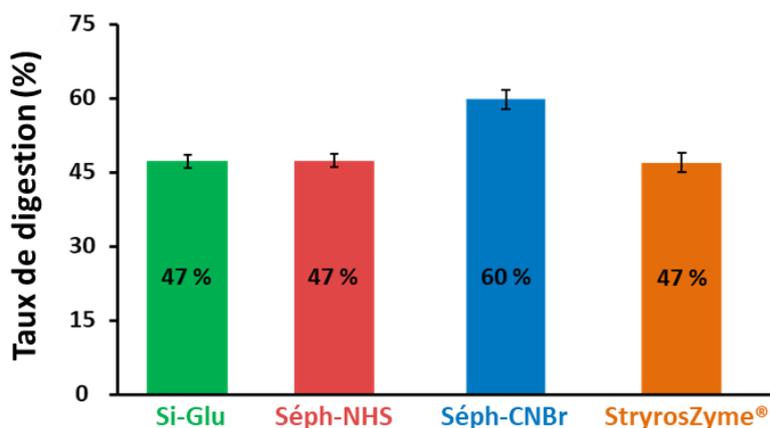


Figure 28. Taux de digestion du BApNA obtenus sur les trois IMERs synthétisés en laboratoire à base de trypsine immobilisée sur de la silice activé glutaraldéhyde (Si-Glu), de la Sépharose fonctionnalisée NHS (Séph-NHS) ou de la Sépharose activée CNBr (Séph-CNBr), et sur un support commercial StryrosZyme® (n=3). Adapté de [133].

III.1.4. Couplage des IMERs avec les techniques analytiques

Les réacteurs enzymatiques peuvent être intégrés dans des montages analytiques avec des techniques séparatives, en ligne ou en différé. L'une des utilisations les plus simples des IMERs consiste à réaliser la digestion de la protéine puis à récupérer le digestat obtenu pour l'analyser par spectrométrie de masse en différé. Cette approche permet notamment de réaliser des étapes supplémentaires de traitement des échantillons, telles qu'un dessalage du digestat avant son analyse. Toutefois, ces étapes ne sont pas automatisables. De fait, quelques travaux témoignent de la possibilité de coupler l'IMER en ligne avec un spectromètre de masse (voir **Figure 29A**) [148,175,176]. Ce montage est très simple à mettre en œuvre mais requiert des conditions de digestion compatibles avec une détection par spectrométrie de masse. De fait, il est nécessaire d'utiliser des tampons de digestion volatils, comme l'acétate d'ammonium [148] ou le bicarbonate d'ammonium [176]. L'ajout d'un faible pourcentage de solvant organique dans le tampon de digestion peut également faciliter l'ionisation des composés dans la source électrospray [175]. Cependant, cet ajout peut dénaturer la protéase immobilisée et son activité enzymatique est alors diminuée. Enfin, le principal inconvénient de ce montage est l'absence de séparation chromatographique préalable, ce qui entraîne un manque de résolution lié à la complexité des mélanges de peptides résultant de la digestion d'une protéine, d'autant plus lorsqu'il s'agit d'un mélange de protéines ou d'un échantillon biologique réel. De fait, dans le cas d'applications impliquant des IMERs, il est généralement préférable de coupler l'étape de digestion avec une séparation par chromatographie liquide avant de procéder à la détection par spectrométrie de masse.

La colonne analytique peut être placée en amont du réacteur enzymatique, de manière à séparer les protéines intactes avant leur digestion (**Figure 29B**) [177]. Cependant, la colonne chromatographique

est généralement couplée en sortie de l'IMER, afin de séparer les peptides obtenus lors de la digestion et ainsi faciliter leur détection par spectrométrie de masse (**Figure 29C**) [106,160,178–181]. Dans le cas d'une digestion réalisée sur un IMER de trypsine, il est nécessaire d'éliminer les sels présents dans le tampon de digestion si une détection par spectrométrie de masse est utilisée, de manière à protéger la source d'ionisation. Les sels peuvent être éliminés en tête de colonne : ils sortent alors dans le volume mort de la colonne, qui est dirigé vers la poubelle, tandis que les peptides sont retenus sur la colonne avant d'être détectés [160,180,181]. L'inconvénient de cette configuration est que le support utilisé pour immobiliser les enzymes doit avoir une forte résistance mécanique afin de supporter les fortes contre-pressions générées par la colonne analytique.

Afin d'améliorer le couplage, une pré-colonne remplie d'une phase stationnaire hydrophobe, appelée colonne de piégeage, peut être introduite entre l'IMER et la colonne analytique [157–159,161,167,169,172,182]. Ce dispositif requiert l'utilisation d'une vanne de commutation, de manière à ce que les sels éliminés ne soient pas dirigés vers la colonne analytique. De leur côté, les peptides issus de la digestion sur l'IMER sont transférés grâce au tampon de digestion vers la colonne de piégeage sur laquelle ils sont retenus, ce qui permet leur pré-concentration en tête de pré-colonne, limitant ainsi les phénomènes d'élargissement de bande. L'élution des peptides du support de piégeage vers la colonne analytique est ensuite assurée par la phase mobile. L'utilisation de ce couplage en ligne offre de nombreux avantages. Tout d'abord, la pré-colonne est généralement de faible dimension et génère peu de contre-pression, permettant ainsi l'immobilisation des enzymes sur des supports peu résistants mécaniquement. En outre, l'IMER n'étant en contact qu'avec le tampon de digestion, il est possible de considérer le transfert des peptides piégés sur la pré-colonne vers la colonne analytique avec une phase mobile hydro-organique, qui n'est jamais en contact avec l'IMER.

Enfin, des montages plus complexes, introduisant des étapes de séparation analytique par chromatographie [183] ou électrophorèse capillaire (EC) [184,185] avant et après l'IMER, ont également été proposés (**Figure 29D**). Ce type de montage a notamment permis d'obtenir des chromatogrammes ou des électrophérogrammes 2D utilisés pour cartographier les modifications post-traductionnelles de protéines.

Les différents montages impliquant des IMERs mentionnés ci-dessus et illustrés sur la **Figure 29** peuvent avoir de nombreuses applications, décrites dans différentes revues bibliographiques [135,136,145–149,186], dont certaines sont présentées dans le paragraphe suivant.

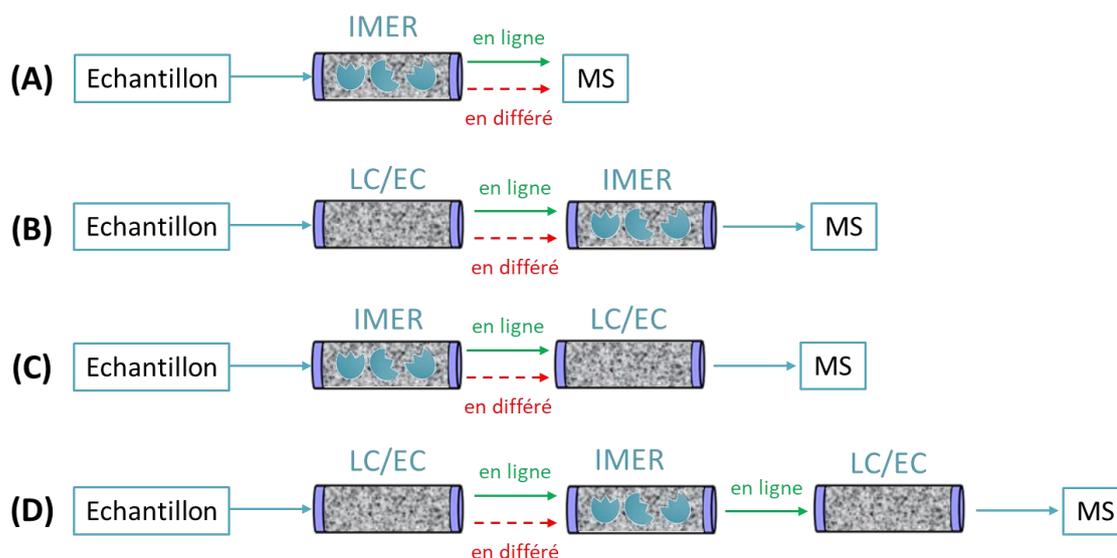


Figure 29. Représentation schématique des configurations de couplage des IMERs avec les systèmes analytiques. EC : électrophorèse capillaire ; IMER : réacteur enzymatique immobilisé ; LC : chromatographie en phase liquide ; MS : spectrométrie de masse. Adapté de [144].

III.1.5. Applications des IMERs

III.1.5.1. Profilage de protéines

Le profilage de protéines, dont l'objectif est d'identifier un grand nombre de protéines afin de constituer des bibliothèques de référence, est l'une des applications « descriptives » des études protéomiques [136]. En raison de la complexité des échantillons analysés, ces études requièrent le couplage de la digestion sur IMER en ligne ou en différé avec une étape de séparation. De nombreuses configurations en ligne ont ainsi été récemment développées et ont permis de caractériser un grand nombre de protéines dans des échantillons biologiques de sérum [136,147].

Un exemple particulièrement intéressant est la plateforme analytique de profilage mise au point par Moore *et al.* [183], couplant une première séparation en RPLC, une digestion enzymatique sur un IMER de trypsine immobilisée sur de la silice BEH (Bridged Ethyl Hybrid) résistante à la pression, et une deuxième séparation en RPLC. Dans ce montage de protéomique multidimensionnelle, l'IMER (30 x 2,1 mm d.i.) a été couplé en ligne à la suite de la première colonne analytique permettant de séparer les protéines présentes dans un lysat de cellules de levure, échantillon très complexe. En sortie d'IMER, des fractions ont été collectées en continu toutes les 10 s et les peptides présents dans ces fractions d'élution ont été analysés en différé sur la seconde colonne chromatographique couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Grâce à ce montage, 507 protéines ont pu être identifiées dans les échantillons complexes étudiés, après une digestion sur IMER d'une durée de 10 s seulement. A

titre de comparaison, seules 490 protéines avaient pu être identifiées dans les mêmes échantillons suite à une digestion enzymatique en solution d'une durée de 15 h.

III.1.5.2. Etude de la glycosylation de protéines

Récemment, une thèse menée au LSABM (S. Perchepied, 2017-2020) a utilisé les IMERs pour une nouvelle application, à savoir la caractérisation de la glycosylation de protéines. En effet, la digestion enzymatique permet non seulement d'identifier les glycanes, mais également d'avoir les informations concernant leur localisation sur la protéine. Dans le cas de cette étude, la complémentarité d'IMERs de trypsine et de pepsine, tous deux développés au format classique dans une pré-colonne de dimension 20 x 2 mm par greffage des protéases sur un support à base de Sépharose, a permis d'identifier les N-glycanes présents sur les 4 sites de glycosylation de l'hormone de grossesse, l'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG), contenue dans deux médicaments [187]. Les IMERs ont par la suite été miniaturisés par greffage des enzymes sur des monolithes synthétisés *in situ* dans des capillaires de 100 µm de diamètre par polymérisation radicalaire de monomères organiques.

III.1.5.3. Identifications d'inhibiteurs enzymatiques

Les IMERS peuvent également être utilisés pour identifier des médicaments présentant une activité d'inhibiteurs enzymatiques, en se liant à une enzyme et en diminuant ainsi son activité [188]. Cette identification est réalisée en percolant sur l'IMER une ou plusieurs molécules, préalablement sélectionnées, en même temps que le substrat de l'enzyme immobilisée. De fait, en comparant simplement les taux de digestion obtenus en présence ou en l'absence du ou des inhibiteurs, il est possible de déterminer si ces derniers ont une influence sur l'activité de l'enzyme.

Récemment, l'immobilisation de BACE-1 recombinante (β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme) a été reportée dans une étude menée sur la recherche d'inhibiteurs pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer [186]. Dans cette étude, la digestion du substrat (M-2420) en présence d'inhibiteurs potentiels a été réalisée en ligne avec une séparation par chromatographie liquide et une détection par fluorescence induite par laser. Près qu'une quarantaine d'inhibiteurs supposés ont été rapidement passés en revue avec cette configuration, présentant un temps total d'analyse de 6,5 min pour les étapes d'inhibition, de séparation et de détection, et un dérivé de la bis-indanone a été identifié comme inhibiteur de référence.

III.1.5.4. Analyse quantitative de protéines

Les IMERs peuvent également être utilisés pour la quantification de protéines. Récemment, cette approche a notamment été mise en œuvre pour l'analyse d'adduits organophosphorés sur la butyrylcholinestérase humaine (HuBuChE) dans des échantillons de plasma, en couplant en ligne un

immunoabsorbant, un IMER de pepsine immobilisée sur de la Sépharose activée CNBr, une pré-colonne et une colonne analytique (**Figure 30**) [189,190], l'immunoabsorbant constitué d'anticorps anti-HuBuChE permettant préalablement d'extraire cette protéine fortement minoritaire des échantillons de plasma.

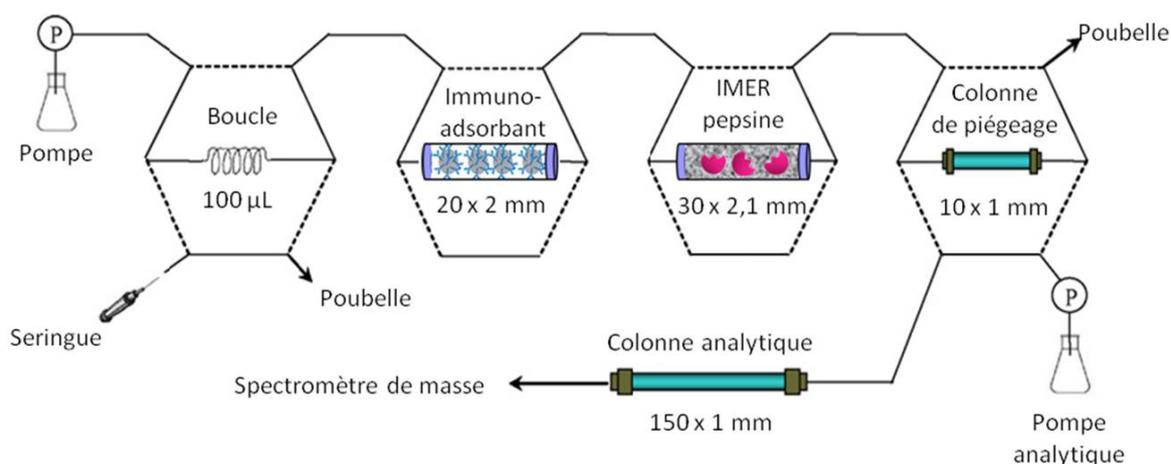


Figure 30. Représentation schématique du montage couplant un immunoabsorbant, un IMER de pepsine, une pré-colonne de piégeage et une colonne analytique pour l'analyse quantitative ciblée de la butyrylcholinestérase humaine. Adapté de [189].

Il est à noter que le couplage en ligne de l'immunoabsorbant et de l'IMER rendait impossible l'utilisation de la trypsine comme enzyme, puisque cette enzyme a un pH de digestion optimal compris entre 7 et 8, tandis que l'élution de l'immunoabsorbant est réalisée avec une solution d'acide formique à pH 2. De fait, le milieu d'élution de l'immunoabsorbant n'était pas compatible avec une digestion sur un IMER de trypsine, mais était parfaitement adapté à une digestion impliquant la pepsine dont l'activité enzymatique est optimale à pH acide. La pré-colonne de piégeage intercalée entre l'IMER et la colonne analytique a permis d'éviter la percolation de solvant organique sur l'IMER lors de la séparation des peptides, mais également l'exposition de l'IMER aux fortes pressions générées par la colonne chromatographique. Ce dispositif a rendu possible l'analyse rapide (1 h), sensible (LDD de 1 fmol) et répétable (CV de 7% pour des analyses en triplicat) de l'adduit ciblé dans les échantillons biologiques complexes. L'analyse quantitative a été possible grâce à la disponibilité d'un étalon du peptide d'intérêt ciblé, synthétisé à façon.

III.1.6. Conclusions

En s'appuyant sur les précédents travaux portant sur d'autres agents chimiques présentés ci-dessus, à savoir le sarin et le soman [189], une approche quantitative inédite, basée sur des étapes de digestion enzymatique sur IMER de trypsine et de piégeage des peptides couplées en ligne avec une analyse par LC-ESI⁺-MS/MS, a été développée au cours de cette thèse pour l'analyse des adduits hémoglobine-

ypérite, en vue de s'affranchir des nombreuses limitations de la digestion en solution. Le développement de cette procédure en ligne, présenté dans la partie suivante sous la forme d'une publication récemment soumise à *Journal Of Chromatography B*, constitue la première utilisation connue d'un IMER de trypsine pour l'analyse des adduits que l'ypérite forme avec l'hémoglobine humaine.

III.2. Development of an immobilized-trypsin reactor coupled to liquid chromatography and tandem mass spectrometry for the analysis of human hemoglobin adducts with sulfur mustard

Abstract

Sulfur mustard reacts with blood proteins, such as hemoglobin, to form stable adducts that can be used as long-lived biomarkers of exposure. These adducts can be analyzed by liquid chromatography coupled to tandem mass-spectrometry (LC-MS/MS) after an enzymatic digestion step. The objective of this study was to develop trypsin-based immobilized enzyme reactors (IMERs) in order to obtain a faster digestion of hemoglobin than the conventional in-solution digestion. A trypsin IMER was synthesized by grafting the enzyme on a CNBr-Sepharose gel and the influence of several parameters on the digestion yields, such as the transfer volume between the injection loop and the IMER, the temperature and the digestion time was studied. The repeatability of the digestion on three laboratory-made IMERs was demonstrated for pure hemoglobin and hemoglobin previously exposed to different concentrations of sulfur mustard (RSD inferior to 13% and 21% respectively) and was better than that obtained for in-solution digestions (RSD inferior to 28% and up to 53% respectively). A preferential adduction of sulfur mustard on the histidine residues of hemoglobin was confirmed, for both in-solution and IMER digestion results. On a quantitative point of view, it appeared that the performances of in-solution and IMER digestions were similar, with the theoretical possibility to detect peptides resulting from the *in vitro* incubation of hemoglobin in pure water with sulfur mustard at $10.8 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. However, digestion on IMER proved to be more repeatable and 32 times faster than in-solution digestion, and a given IMER could be reused at least 60 times.

III.2.1. Introduction

As a strongly alkylating agent, sulfur mustard can react with biological nucleophiles such as proteins to form hydroxyethylthioethyl (HETE) adducts, that can be used as unequivocal biomarkers of exposure after accidental or intentional poisoning to the chemical agent [7–10]. Particularly useful biomarkers are the adducts that sulfur mustard forms with hemoglobin, one of the most abundant proteins found in human blood (average concentration of $140 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) [62], which can be detected up to several months after an exposure to this chemical warfare agent (CWA). Indeed, these long-lived adducts have a life-time similar to that of the native protein, *i.e.* 120 days [63].

As a complement to the modified Edman degradation procedure, mainly used to analyze the adducts that sulfur mustard forms with the N-terminal valine residues of both globin α and globin β chains constituting hemoglobin [17,98,121], a new analytical method was recently developed in our

laboratory [131]. It consists in the analysis by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) of the alkylated peptides resulting from the tryptic digestion of hemoglobin incubated *in vitro* with sulfur mustard. This method allowed the confirmation of 10 adduction sites among the 11 sites previously identified in the literature (α -Val¹, α -His²⁰, α -His⁴⁵, α -His⁵⁰, β -Val¹, β -Glu²², β -Glu²⁶, β -Glu⁴³, β -His⁷⁷ and β -His⁹⁷) [12,110], but also led to the identification of 5 new alkylation sites (α -His⁷², α -His⁸⁷, α -His⁸⁹, β -His² and β -Val⁹⁸). The localization of the different adduction sites is illustrated on the **Figure S1 (Annexe 2)**. Moreover, this method appeared to be repeatable (RSD ranging from 0.5 to 9.3%) and sensitive, with the possibility to detect less than two adducted chains over one million, and a satisfying linearity was observed for all 15 adducted peptides targeted on the sulfur mustard concentration range studied (250 ng.mL⁻¹ – 100 μ g.mL⁻¹). However, this method was applied to the analysis of alkylated peptides resulting from the in-solution digestion of hemoglobin, which is time-consuming. Indeed, due to the auto-digestion of the protease, in-solution digestion must be performed with low Enzyme/Substrate (E/S) ratios, thus leading to long digestion times and the digestions are often carried out overnight (16-18h). Moreover, the enzyme cannot be reused for other digestions which can lead to high costs depending on the protease used. Furthermore, since in-solution digestions are carried out off-line, the automatization of this step is rather complicated. Immobilized enzyme reactors (IMERs) have several advantages compared to in-solution digestion. First of all, due to the immobilization of the protease, the auto-digestion of the enzyme is highly reduced. Therefore, the digestions can be performed with higher E/S ratios, which leads to digestion times shorter than in solution. Finally, the IMERs are reusable, which reduces the cost of the analysis on a long term, and the digestion is easily automated and can be coupled on line with the LC-MS/MS analysis of peptides. The first study related to the use of an IMER for proteins analysis goes back to the late 1980s [142]. In this study, an IMER based on trypsin immobilized on an agarose gel and conditioned in a Pyrex tube was used for the characterization of proteins at low concentrations. Since then, many studies based on IMERs prepared with different grafting supports and conditioned in different formats have been reported in the proteomics filed. Indeed, the solid phase can be conditioned in multiple formats such as cartridges, disks, pre-columns and pipette tips [143]. Recently, using a pepsin IMER conditioned in a 30 x 2.1 mm column,, this approach has already proven its potential and its efficiency to detect adducts formed by organophosphorus nerve agents with human butyrylcholinesterase (HuBuChE) in plasma [189]. Several reviews present the studies carried out with IMERs for proteins analysis and highlight the advantages of the digestion on these supports, especially the reduction of the digestion time from several hours to few minutes while obtaining sequence coverages similar to those resulting from in-solution digestion [135,145–150].

Therefore, to improve the performance of the analysis of hemoglobin adducts and overcome the limitations of in-solution digestion, the development of an IMER for the digestion of adducted hemoglobin was proposed. For this, the selected enzyme for the digestion of hemoglobin was trypsin, due to the high specificity of its cleavages that makes it possible to easily compare the experimentally obtained peptides with the theoretical ones. While commercial IMERs are available, such as the commercial PorosZyme® device composed of trypsin immobilized on a cross-linked co-polymer, previous studies have showed that the results obtained with laboratory-made IMERs were better since the digestion was more efficient [133,171]. Moreover, enzyme grafting yields on commercial devices are often not available while the laboratory-made IMERs present the advantage of being able to control the amount of enzyme immobilized on a chosen support, but also to select the reactor dimensions in order to develop a quality on-line set-up with the analytical column. Finally, using a grafting support such as Sepharose leads to very low non-specific interactions. This study is the first one, to our knowledge, to introduce the use of trypsin-based reactors for the digestion of human hemoglobin exposed to sulfur mustard.

After controlling the repeatability of the grafting of trypsin on Sepharose, some parameters that may affect the digestion of the protein on IMER were studied using non-alkylated hemoglobin. This study allowed settling the temperature, the digestion duration and the volume required to transfer the protein from the injection loop to the trypsin IMER. These digestion conditions were applied to the digestion of hemoglobin on three independently synthesized trypsin IMERs, to evaluate the inter-IMER and intra-IMER digestion repeatability, and the results were compared to those resulting from an in-solution digestion. The on-line digestion on IMER was then applied to the analysis of hemoglobin *in vitro* exposed to different concentrations of sulfur mustard in pure water, and the results were compared with those obtained after off-line in-solution digestion of the same samples. Particularly, the linearity, sensitivity and repeatability of both procedures were compared.

III.2.2. Material and methods

III.2.2.1. Chemicals

Potassium chloride (KCl), potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) and acetonitrile (ACN) were purchased from VWR (Fontenay-sous-bois, France). Sodium chloride (NaCl), sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4), sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3), sodium acetate ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$), sodium azide (NaN_3), calcium chloride dihydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) and Trizma® hydrochloride ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3 \cdot \text{HCl}$, Tris-HCl) were provided by Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France), as well as trypsin from bovine pancreas treated with 6-(1-tosylamido-2-phenyl)ethyl chloromethyl ketone (TPCK),

hydrochloric acid (HCl) and formic acid. A Milli-Q water purification system (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France) was used to obtain high purity deionized water.

The cyanogen bromide-activated Sepharose 4B (CNBr-activated Sepharose) used for the trypsin immobilization and human hemoglobin were purchased from Sigma Aldrich. The BiCinchoninic acid Assay (BCA) protein assay reagents were obtained from Thermo Fisher Scientific (Courtaboeuf, France).

The phosphate buffer saline solution (PBS, pH 7.4) consisted of Na_2HPO_4 and KH_2PO_4 at a concentration of 0.01 mol.L^{-1} and NaCl at 0.15 mol.L^{-1} . The PBS-azide solution was a PBS solution containing 0.1% (w/w) of NaN_3 . For trypsin immobilization, the grafting solution was prepared by dissolving trypsin (8 mg) in 2 mL of a saline sodium hydrogen carbonate buffer (NaHCO_3 0.1 mol.L^{-1} , pH 8.3, NaCl 0.5 mol.L^{-1}). The solutions used to wash the IMER were a Tris buffer (Tris-HCl 0.1 mol.L^{-1} , pH 8.0) and a saline sodium acetate buffer (NaCH_3CO_2 0.1 mol.L^{-1} , pH 4.0, NaCl 0.4 mol.L^{-1}).

III.2.2.2. Apparatus and LC-MS/MS analysis

The experimental system, composed of three six-port switching valves, used for the on-line enzymatic digestion of hemoglobin on the trypsin IMER and the analysis of the resulting peptides is described in **Figure S2 (Annexe 2)**. The first valve was connected to the injection loop (5 μL) and to a syringe pump (KDS 100 Infusion Pump, KD Scientific). The second valve was connected to the IMER precolumn, which was set in an oven (Crococil oven, CIL) at different temperatures ranging from 20°C to 30°C . The last valve was connected to a trap column that consisted of a reversed phase column (Newguard RP-18, 15 mm x 3.2 mm i.d., 7 μm , Perkin Elmer, Villebon-sur-Yvette, France), to the analytical column (Atlantis[®] dC₁₈, 150 mm x 2.1 mm i.d., 3 μm , 100 Å, Waters, Guyancourt, France) and to the binary analytical pump (Dionex Ultimate 3000 pump, Thermo Scientific, controlled by Chromeleon 6.8 SR11). The same set-up was used for the analysis of the peptides resulting from the in-solution digestion of hemoglobin but, in this case, the IMER was replaced by an union without dead volume (Valco[®]). The analytical pump was interfaced with a triple quadrupole mass spectrometer (TSQ Quantum Access Max[®], Thermo Scientific) equipped with an electrospray (ESI) ion source (IonMax source, probe HESI-II, Thermo Scientific).

The mobile phase, having a flow rate of $200 \mu\text{L.min}^{-1}$, was composed of a mixture of deionized water (A) and acetonitrile (B) acidified with 0.1% of formic acid. A gradient composed of 0% B during 5 min followed by an increase from 0% to 40% B in 80 min prior to a plateau at 40% B during 2 min was used for the peptides separation, which were then detected by mass spectrometry in multiple reaction monitoring (MRM) mode. Ionization was performed in positive mode, with the following values for the

source parameters: the vaporizer and capillary temperatures were respectively set at 277°C and 230°C, the skimmer offset was set at 1 V and the spray voltage at 3000 V. The sheath gas pressure was set at 30 psi while no auxiliary gas was used. A scan width of 0.5 m/z and a dwell time of 0.35 s were used for the analysis. The tube lens offset value was adapted to each precursor ion studied. The limits of quantification (LOQ) were estimated for a Signal/Noise (S/N) ratio of 10.

III.2.2.3. Preparation of the trypsin-based IMER

For the immobilization of trypsin on CNBr-activated Sepharose, a grafting solution was prepared by diluting 8 mg of the enzyme in 2 mL of the coupling buffer (sodium carbonate solution, NaHCO_3 0.1 mol.L⁻¹, NaCl 0.5 mol.L⁻¹, pH 8.3). The protocol used for the preparation of the trypsin-based IMER was similar to the one previously developed in our laboratory [133]. Briefly, 40 mg of CNBr-Sepharose were swollen in an Eppendorf® LoBind with 2 mL of HCl solution (10⁻³ mol.L⁻¹) and were then washed with 1.8 mL of sodium carbonate buffer (pH 8.3). After elimination of the supernatant, 1.7 mL of the trypsin solution at 4 mg.mL⁻¹ were added to the Sepharose and the sorbent was incubated at 4°C during 16h before being packed into a 20 x 2.1 mm i.d. precolumn. In order to block the remaining uncoupled sites, 48 mL of a Tris buffer (pH 8.0) were percolated through the precolumn for 2 hours at room temperature with a flow of 0.4 mL.min⁻¹. Then, the non-bounded enzyme was removed. To do so, the grafted gel was alternatively washed four times during 10 min at 0.4 mL.min⁻¹ with a low-pH buffer solution (0.1 mol.L⁻¹ acetate buffer, NaCl 0.4 mol.L⁻¹, pH 4.0) and a high-pH buffer solution (0.1 mol.L⁻¹ carbonate buffer, NaCl 0.5 mol.L⁻¹, pH 8.3). The IMER was then stored at 4°C in a PBS solution containing 0.1% azide. A total of three trypsin IMERs were independently prepared following this protocol.

III.2.2.4. Quantification of trypsin grafter on IMER

The amount of trypsin grafted on Sepharose was evaluated, using a bicinchoninic acid (BCA) assay [191], by measuring the difference between the concentration of the enzyme remaining in the supernatant after the immobilization step and the initial concentration of the enzyme in the coupling solution. The BCA assay is based on the reduction of Cu²⁺ ions into Cu⁺ by the proteins. Cu⁺ ions are then complexed by the bicinchoninic acid chromophore and the solution turns purple. The absorbance measured at 562 nm is directly proportional to the concentration of trypsin present in the supernatant and therefore, to the concentration of enzyme not grafted on the support. A linear calibration curve (seven levels of concentration in triplicate) was plotted by adding 10 µL of standard trypsin at a concentration ranging from 100 µg.L⁻¹ to 4 mg.L⁻¹ in 21 microwells of a 96 microplate. After addition of 100 µL of the working reagent to each well, the microplate was incubated at 37°C during 30 min, with

stirring at 300 rpm. The absorbance in the wells was then measured at 562 nm with a spectrophotometer (SpectraMax M2, Molecular Devices, St Gregoire, France).

III.2.2.5. Digestion procedures

III.2.2.5.1. In-solution digestion

Non-alkylated and alkylated hemoglobin (1 mg.mL⁻¹) were digested by TPCK treated trypsin in 1 mL of Tris-HCl buffer (pH 8.0) with an enzyme/substrate (E/S) ratio of 1/50 (mol/mol). The mixture was incubated at 37°C overnight (16 hours) under gentle agitation at 450 rpm, using a PHMP Grant-Bio Thermoshaker for microplates (Dutscher, Brumath, France). Since hemoglobin does not have any disulfide bond, no reduction or alkylation steps were required prior to the enzymatic digestion. A fraction of the resulting digest (5 µL) was then loaded on the Newguard RP-18 desalting column with 150 µL of the Tris-HCl buffer at 50 µL.min⁻¹, followed by the percolation of 1 mL of deionized water at 100 µL.min⁻¹ through the precolumn to remove the salts. A water/ACN gradient was finally used to transfer in back flush mode the peptides trapped on the desalting column to the analytical column.

III.2.2.5.2. Digestion on IMER

For the digestions on the trypsin IMERs, alkylated or non-alkylated human hemoglobin (1 mg.mL⁻¹) were manually loaded into the 5 µL (5 µg, 77.6 pmol of human hemoglobin) injection loop and were then transferred to the trypsin IMER with the Tris-HCl buffer (pH 8.0) at 50 µL.min⁻¹. After digestion of the protein by *stop flow*, the resulting peptides were transferred to the desalting column with 150 µL of Tris-HCl buffer at 50 µL.min⁻¹. Then, the salts were removed by percolating 1 mL of deionized water at 100 µL.min⁻¹. The peptides were finally transferred from the trap column to the analytical column with the mobile phase by switching the third valve and were further analyzed by LC-MS/MS. The trypsin IMER can be directly reused after a simple washing step (30 min) with the Tris-HCl buffer at pH 8.0.

III.2.2.6. Statistical tests

The one-way ANOVA, Cochran and Student tests with a confidence level of 95% ($\alpha=0.05$) were performed with the online software Statistical Tools for High-Throughput Data Analysis (STHDA).

III.2.3. Results and discussion

III.2.3.1. Preparation of the trypsin IMERs and evaluation of their grafting yields

Three trypsin-based IMERs, namely IMER 1, IMER 2 and IMER 3, were synthesized on different days by immobilizing the enzyme on CNBr activated Sepharose following the procedure described in the material and methods section. This agarose-based sorbent was chosen based on a previous study carried out in our laboratory [133] as it develops very low non-specific interactions and presents a good

chemical stability. Each IMER was obtained with grafting yields that were in good agreement with those previously observed in our laboratory [133,171] since grafting yields of 30%, 27% and 32% were respectively obtained for IMER 1, IMER 2 and IMER 3. Moreover, these results highlight the day-to-day repeatability of the grafting process, with a relative standard deviation (RSD) of 6.9% for the grafting yields.

III.2.3.2. Development of the hemoglobin digestion procedure on IMER

The optimization of the digestion parameters was carried out on IMER 1 by digesting 5 μL of a solution of pure non-alkylated hemoglobin at 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. The peptides resulting from this digestion and presenting a potential adduction site, *i.e.* alkylable peptides, were then analyzed using the LC-MS/MS method developed in our previous study [131] and the analyses were divided into 9 time segments in order to optimize the detection sensitivity. The mass parameters and the studied MRM transitions for the alkylable peptides are reported in the **Table S1 (Annexe 2)**.

III.2.3.2.1. Optimization of the transfer volume

The volume of Tris-HCl buffer required to transfer hemoglobin from the injection loop to the trypsin IMER 1 was optimized by digesting 5 μg of the protein in stop flow during 30 min at 27°C on the IMER 1, using transfer volumes of 30, 40, 50 and 60 μL of a Tris-HCl buffer (pH 8.0). This range of volumes was selected considering the void volumes between the injection loop and the IMER. Indeed, considering the volume of the injection loop (5 μL), the volume of the connection tubes between the loop and the IMER (4.4 μL) and the IMER void volume (44 μL , considering a porosity of 0.7 and total volume of 62.8 μL), the volume used to transfer the hemoglobin from the injection loop to the IMER must be superior to 9.4 μL to ensure the transfer of the protein on the IMER, and must not exceed 53 μL , volume at which the hemoglobin solution leaves the IMER without being digested. For these first experiments, the digestion temperature and time were chosen according to the conditions applied in a previous study for the digestion of HuBuChE on pepsin-based IMER [171].

The digestion was performed in triplicate in the same conditions for each transfer volume and the results obtained are presented in **Figure 31**. As seen on this figure and as expected, a transfer volume of 60 μL results in a decrease of the peaks area, since a part of the hemoglobin solution is not digested on the IMER. Concerning results obtained for smaller volumes of transfer, after using a Cochran test to confirm that there was no significant variance between the transfer volumes, a one-way ANOVA test ($\alpha=0.05$) was performed for the three other transfer volumes tested (30, 40 and 50 μL). The results have demonstrated that there was no significant difference between the peaks areas obtained for all the non-alkylated peptides and, therefore, that there was no significant effect of the transfer volume.

However, a transfer volume of 50 μL led to higher RSD for 61% of the studied MRM transitions. Consequently, this volume was not chosen for latter digestions. The transfer volumes of 30 and 40 μL led to similar areas but the RSD were lower for 55% of the studied MRM transitions for a volume of 40 μL . A satisfying repeatability was observed for this transfer volume since the RSD values were inferior to 10% for 89% of the studied MRM transitions. Therefore, a transfer volume of 40 μL was considered as optimal and was chosen for future digestion of hemoglobin on the trypsin IMER.

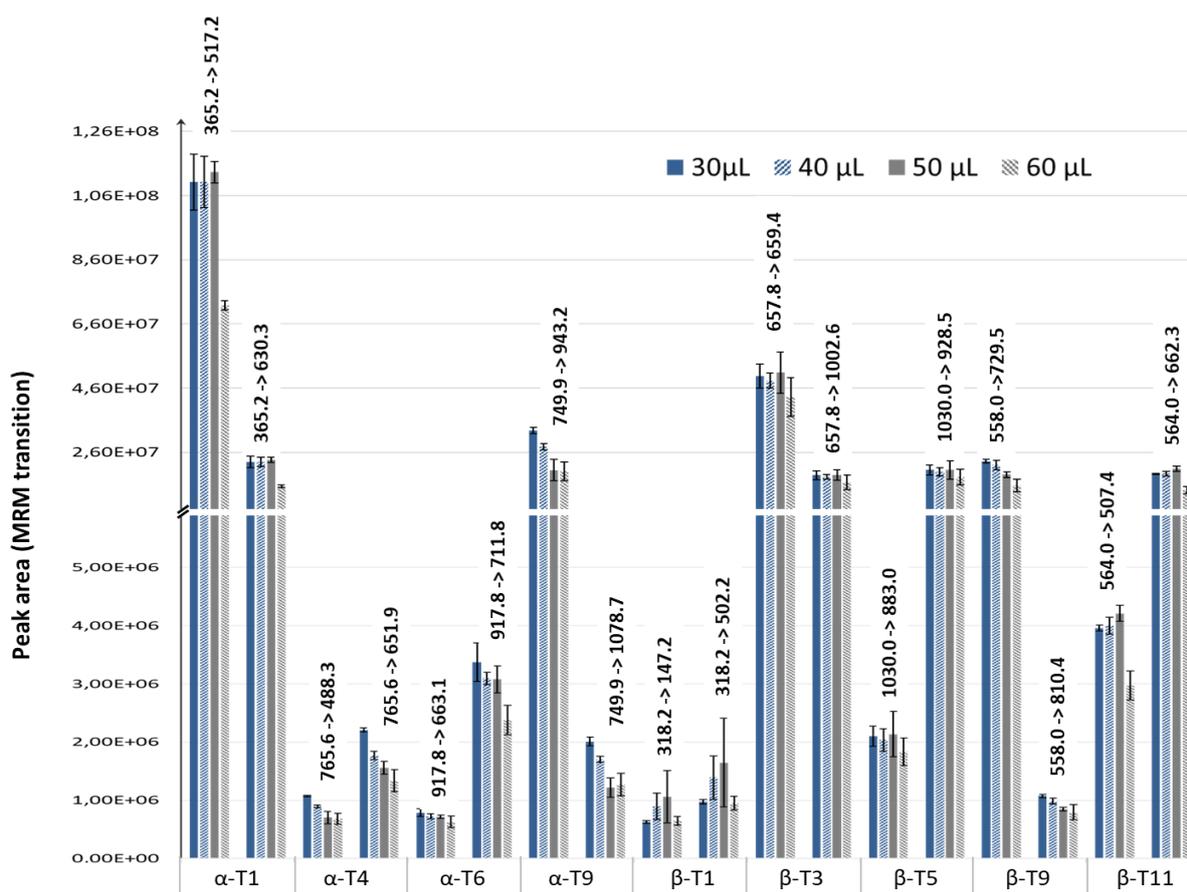


Figure 31. Influence of the transfer volume between the injection loop and IMER 1 on the peak areas of alkylable peptides of digested human hemoglobin (5 μg injected). Digestions achieved in stop flow at 27°C during 30 min (3 independent digestions, $n=3$). The error bars correspond to the standard deviation. The y-axis scale is modified after the scale break.

III.2.3.2.2. Optimization of digestion temperature

Since temperature is a key parameter controlling enzymatic activity, the effect of the digestion temperature on the digestion yields was studied by carrying out digestions of hemoglobin on the IMER 1 at temperatures of 20, 22, 25, 27 and 30°C. It is important to note that, usually, in-solution tryptic digestion is performed at 37°C. However, it was not possible to apply this temperature for the digestion on IMER since it corresponds to the gelling point of CNBr Sepharose, which would lead to high backpressures. Moreover, a degradation of IMERs was observed for temperatures higher than 32°C in a previous study [171]. Therefore, the digestions on the trypsin IMER 1 were only carried out for

temperatures below 30°C. The IMER was placed in an oven heated at the selected temperature and 5 μ L of the non-alkylated hemoglobin solution were transferred from the injection loop to the IMER with 40 μ L of Tris-HCl buffer at pH 8.0 and were then digested for 30 min in stop flow. The digestions were repeated 3 times in the same conditions for each of the 5 temperatures tested and the results are reported on **Figure 32**. After using a Cochran test that showed no significant variance between the digestion temperatures, a one-way ANOVA test was performed to compare the peak areas obtained for each temperature. At a confidence level of 95%, the ANOVA test showed that there was no significant variation of the peak areas with the digestion temperature, for all the studied MRM transitions, and therefore, that there was no significant effect of the temperature. Nevertheless, the digestion performed at 25°C led to more intense areas for 55% of the studied MRM transitions and showed a satisfying repeatability, with RSD values inferior to 10% for 56% of the transitions. Consequently, a temperature of 25°C was thus chosen for further digestions on the trypsin IMERs.

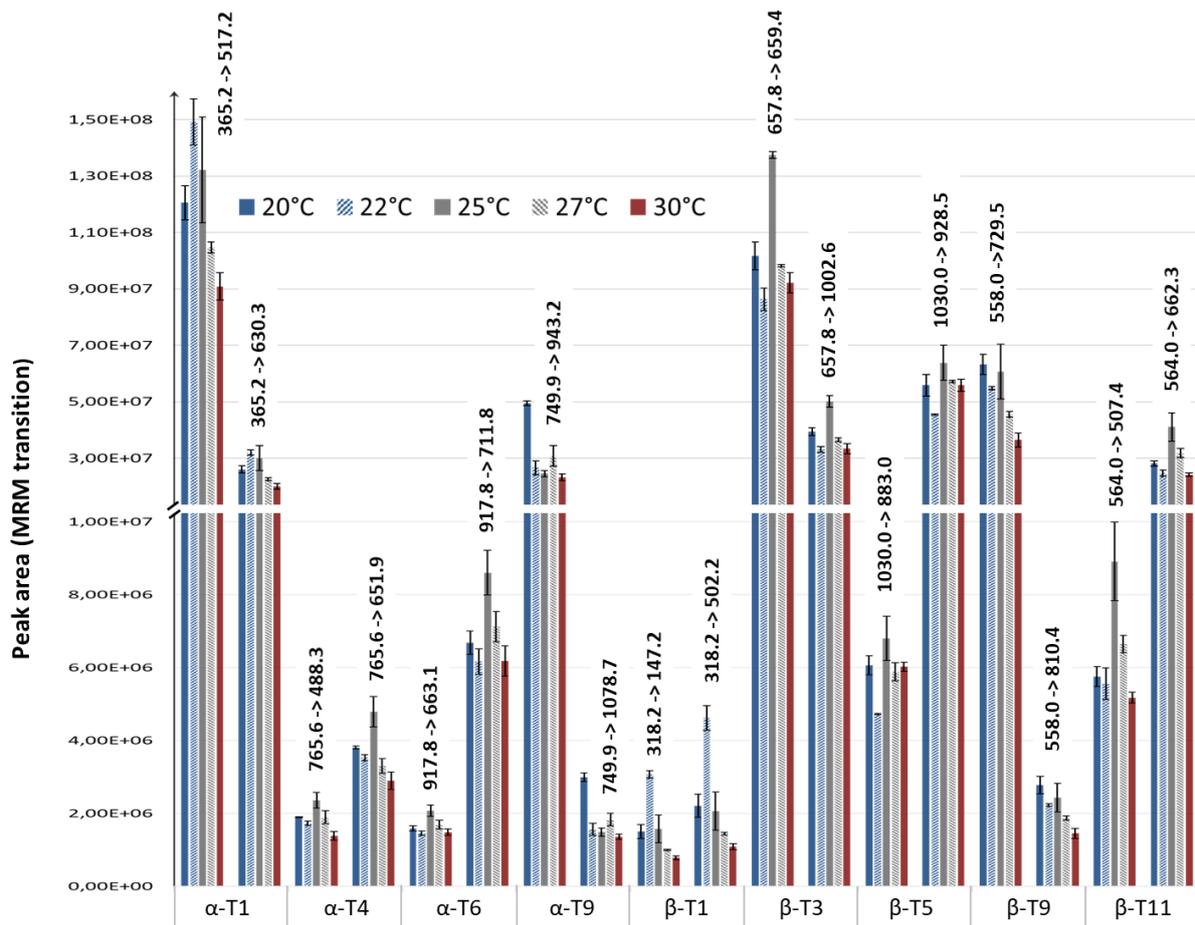


Figure 32. Influence of the temperature on the digestion of human hemoglobin (5 μ g injected) on IMER 1 on the peak areas of the resulting alkylable peptides. Digestions achieved in stop flow during 30 min with a transfer volume of 40 μ L (3 independent digestions, n=3). The error bars correspond to the standard deviation. The y-axis scale is modified after the scale break.

III.2.3.2.3. Optimization of digestion time

In order to improve the digestion efficiency, it was necessary to optimize the stop flow time, *i.e.* the contact time of hemoglobin with the IMER. To do so, 5 μL of a non-alkylated hemoglobin solution were transferred to the trypsin IMER 1 with 40 μL of Tris-HCl buffer at pH 8.0 and were then digested at 25°C during 20, 30, 45 or 60 min. Three independent digestions were carried out on IMER 1 in the same conditions for each digestion duration and the results obtained are reported on **Figure 33**. As seen on this figure, a decrease of the peak areas was observed for the digestion times of 45 and 60 min, which was unexpected. However, as pointed out by Bonichon *et al.* who also observed a decrease of the digestion yields in the case of HuBuChE digestion on a pepsin IMER [171], this result could be explained by the non-specific digestion of hemoglobin by trypsin, thus leading to further cleavage resulting in smaller peptides than those expected.

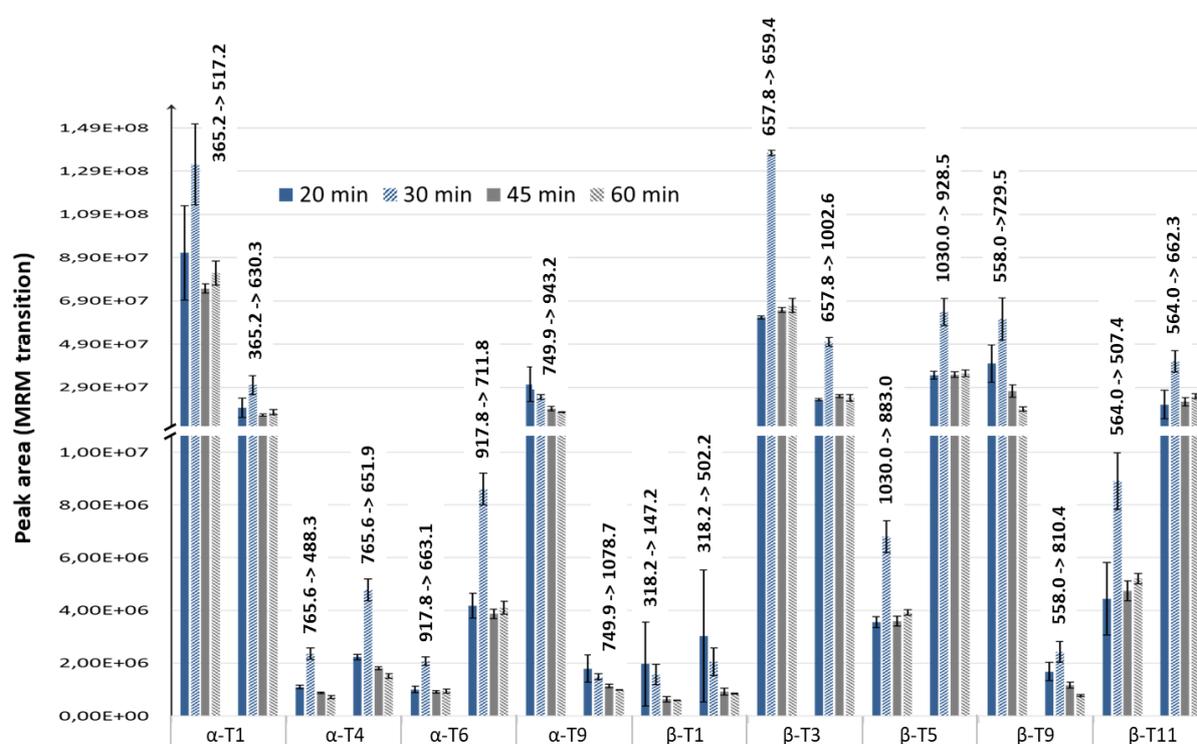


Figure 33. Influence of the digestion time on the peak areas of alkylable peptides resulting from the digestion on IMER 1 of non-alkylated human hemoglobin (5 μg injected). Digestions achieved in stop flow at 25°C with a transfer volume of 40 μL (3 independent digestions, $n=3$). The error bars correspond to the standard deviation. The y-axis scale is modified after the scale break.

After using a Cochran test to ensure that there was no significant variance between the digestion durations, a one way ANOVA test ($\alpha=0.05$) was again performed. This test demonstrated that there was no significant variation of the peak areas for all the MRM transitions studied between the 4 digestion times. However, it appeared that a digestion of 30 min led to more intense areas for 72% of the studied MRM transitions and also showed a satisfying repeatability, since the RSD were below 10%

for 56% of the transitions. In conclusion, the following parameters were defined as the best conditions of digestion of hemoglobin on trypsin IMERs: a transfer volume of 40 μ L between the injection loop and the IMER and a digestion at 25°C in stop flow during 30 min.

III.2.3.2.4. Repeatability of non-alkylated hemoglobin digestion on trypsin IMERs

Once these digestion parameters were set, the repeatability of the IMER digestions was studied by comparing the peptides areas resulting from the digestion of non-alkylated hemoglobin on three independently laboratory-made trypsin IMERs, all prepared in the same conditions described in the material and methods section, but on different days. As previously mentioned, the grafting process proved to be repeatable since grafting yields were similar. Three independent digestions were carried out on each IMER, using the same hemoglobin solution (1 mg of pure lyophilized hemoglobin diluted in 1 mL of Tris-HCl buffer at pH 8.0), and with the previously optimized parameters. As illustrated on **Figure 34**, for which only the most intense MRM transition is represented for each peptide, and in **Table S2 (Annexe 2)** for both transitions, a good repeatability of the digestion on a given IMER was obtained since peak areas of alkylable peptides are associated to intra-IMER RSD values lower than 13% for all the MRM transitions studied and on each of the three trypsin IMERs. After using a Cochran test that showed that there was no significant variance between the IMERs, the one-way ANOVA test ($\alpha=0.05$) also demonstrated that there was no significant difference for the peak areas of the non-alkylated peptides between the three IMERs. Moreover, the inter-IMER RSD values obtained by analyzing the digest resulting from a digestion on each IMER were inferior to 8% for all the MRM transitions studied thus highlighting the fact that hemoglobin digestion was repeatable from one IMER to another. In conclusion, these results illustrated the good repeatability of the trypsin IMERs synthesis procedure and of the hemoglobin digestion procedure on these IMERs coupled on-line with LC-MS/MS.

III.2.3.2.5. Comparison of in-solution and IMER digestions of non-alkylated hemoglobin

The performances of the laboratory-made trypsin IMERs were evaluated using in-solution digestion as reference. To do so, three independent in-solution tryptic digestions of non-alkylated hemoglobin were carried out during 16h at 37°C with a molar E/S ratio of 1/50 as usually applied. Peak areas of the resulting peptides obtained in LC-MS/MS were compared to those previously discussed and obtained after three independent digestions performed on each of the three IMERs, for which the average molar E/S ratio is 1 000. Results are presented on **Figure 34** and **Table S2 (Annexe 2)** in which are listed the ratios between the peak areas obtained with IMERs and those obtained by digestion in solution. As seen in this table, the peak areas are on average two times more intense for the in-solution digestion than for the digestion on the IMERs. However, it appeared that the digestions on a given IMER or on the three IMERs showed a better repeatability than the in-solution digestions, since the RSD observed

on IMERs are always lower than those resulting from the in-solution digestions, for all the studied MRM transitions. Therefore, it was concluded that the tryptic digestion on IMER was more repeatable than the in-solution digestion, in addition to being faster, with a digestion time reduced by a factor 32. Moreover, the digestion on IMER also has the advantage of being performed directly on-line with the LC-MS/MS analysis of the resulting peptides, the overall analytical procedure can be easily automated via valve control. Finally, the good repeatability on a given IMER also testifies to the possibility of reusing them many times, which also reduces the eventual cost of the analysis.

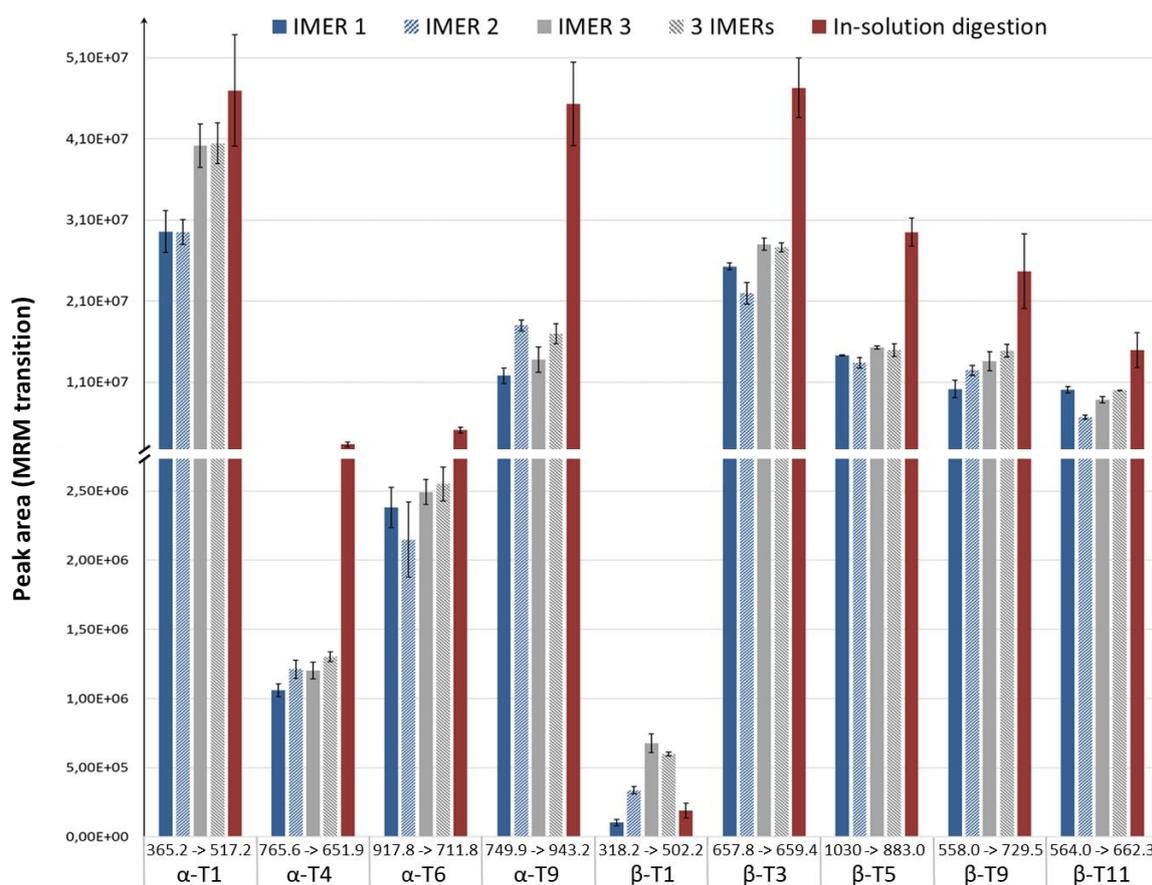


Figure 34. Peak areas obtained after the MRM analysis of the alkylable peptides resulting from the digestion of non-alkylated human hemoglobin (5 μ g) in-solution (at 37°C during 16h) or on the three IMERs (stop flow at 25°C during 30 min, volume transfer of 40 μ L (3 independent digestions carried out in-solution, on a given IMER or one digestion on each IMER, n=3). The error bars correspond to the standard deviation. The y-axis scale is modified after the scale break.

III.2.3.3. Digestion of alkylated hemoglobin on trypsin IMER and comparison with in-solution digestion

The LC-MS/MS analysis of the 15 alkylated peptides identified in our previous study [131] was performed jointly with that of the corresponding non-alkylated peptides, and the mass parameters used are presented in the **Table S3 (Annexe 2)**. To do so, five solutions of hemoglobin at 1 mg.mL⁻¹ exposed to different concentrations of sulfur mustard ranging from 250 ng.mL⁻¹ to 100 μ g.mL⁻¹ were

digested on the three laboratory-made trypsin IMERs, while applying the optimized conditions previously mentioned (transfer volume of 40 μL , digestion in stop flow at 25°C during 30 min). Three independent digestions were carried out on a given IMER or on each of the three IMERs for each sulfur mustard concentration. Blanks were performed between two sulfur mustard concentrations, in order to confirm that there was no trace of alkylated peptides on the IMER, the trap column or the analytical column. An example of MRM chromatogram obtained for the alkylated peptides resulting from the tryptic digestion on IMER 1 of hemoglobin incubated *in vitro* with sulfur mustard at 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ is presented in **Figure S3 (Annexe 2)**.

The evolution of the peak areas of alkylated peptides as a function of the sulfur mustard concentration was studied for the most intense MRM transition of each alkylated peptide. As an example, the results obtained for the adducted peptide $\alpha\text{-T1} + \text{HETE}$ (transition 417.2 \rightarrow 105.3), corresponding to a medium-intensity alkylated peptide, are represented in **Figure 35**. Data obtained for each alkylated peptide are reported in the **Table S4 (Annexe 2)**. As seen on this figure, a satisfying linearity was observed on the concentration range studied for each of the three laboratory-made IMERs, with a good intra-IMER repeatability of the resulting peak area of alkylated peptides for each sulfur mustard concentration (2.6% < RSD < 8.6% for IMER 1, 0.45% < RSD < 12.2% for IMER 2, 1.2% < RSD < 13.4% for IMER 3). A good linearity between the peak areas and the amount of sulfur mustard incubated with hemoglobin for all the alkylated peptides was observed. Moreover, the repeatability have also been observed for all the other alkylated peptides on the three IMERs (see **Table S4, Annexe 2**). Following a Cochran test stating that there was no significant variance between the IMERs, a one way ANOVA test ($\alpha=0.05$) was performed to compare the slopes obtained with the three trypsin IMERs for a given MRM transition. It could be concluded from this test that there was no significant variation between the mean slopes observed for the three IMERs (see 7th column of **Table S4, Annexe 2**) and, therefore, that there was no significant influence of the IMER for the digestion of alkylated hemoglobin. Then, the results obtained for the digestions performed on the trypsin IMERs were compared to those resulting from the in-solution digestion of hemoglobin exposed to sulfur mustard. Three independent in-solution digestions of hemoglobin after its exposure to each of the five sulfur mustard concentrations studied were carried out, and, three IMER digestions were independently carried out on the three laboratory-made IMERs, each digestion occurring on a different IMER, for each sulfur mustard concentration. As seen on the **Figure 35** and in the **Table S4 (Annexe 2)**, the mean slopes observed for all the alkylated peptides after digestion on the three IMERs are inferior to the slopes resulting from the in-solution digestions, which confirms the fact that the peak areas are more intense for in-solution digestions than for IMER digestions, like it was already observed in the case of non-alkylated peptides. However, it also appeared that the repeatability of the digestion on IMERs was again better than that for in-solution

digestions. Indeed, the observed RSD for the mean slopes ranged from 5.7 to 53.3% for in-solution digestions while the inter-IMER RSD ranged from 1.0 to 20.9% for digestions on the three trypsin IMERs.

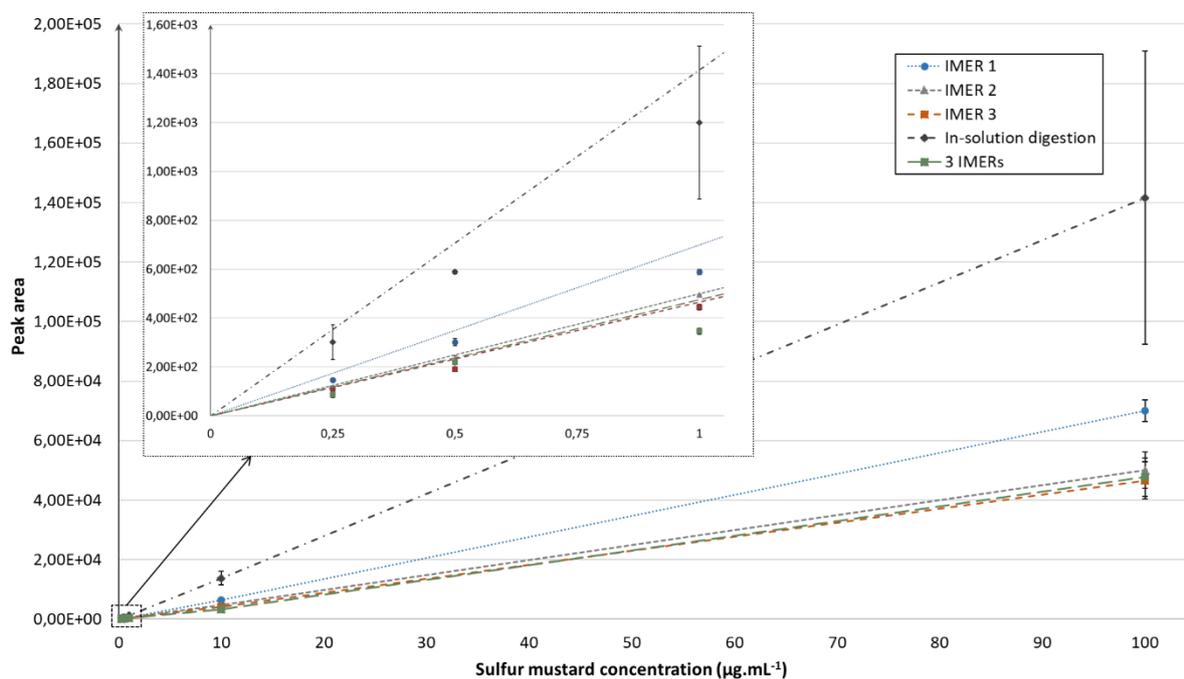


Figure 35. Evolution of the peak area for the MRM transition 417.2 -> 105.3 corresponding to the alkylated peptide α -T1 + HETE resulting from the tryptic digestion in solution or on the three trypsin IMERs of human hemoglobin (5 μ g injected) exposed to various concentrations of sulfur mustard (3 independent digestions carried out in-solution and on each IMER or one digestion on each IMER, n=3).

The S/N ratios obtained for the digestion of hemoglobin exposed to sulfur mustard at 250 ng.mL^{-1} in-solution and on IMER were compared to evaluate the sensitivity of the analytical procedure. For the digestions performed on the three trypsin IMERs, the S/N ratios ranged from 25 (for the MRM transition 1082.2 -> 1116.6 of the alkylated peptide β -T5 + HETE) and 231 (for the MRM transition 592.0 -> 781.5 of the alkylated peptide β -T9 + HETE). Therefore, the LOQ after digestion on IMER was evaluated to range between 10.8 and 100 ng.mL^{-1} . For in-solution digestions, the S/N ratios ranged from 15 (for the MRM transition 817.4 -> 704.0 of the adducted peptide α -T4 + HETE) to 160 (for the MRM transition 776.0 -> 977.8 of the peptide α -T9 + HETE adducted on the residue His⁷²). Thus, the LOQ range was evaluated between 15.6 to 166.7 ng.mL^{-1} for in-solution digestion. Nevertheless, the RSD of the S/N ratios were higher for in-solution digestion (RSD ranging from 5.4 to 80.9%) than for digestion on IMERs (RSD ranging from 0.5 to 31.2%). These higher values can be explained by the important variability of the signal corresponding to the alkylated peptide resulting from the in-solution digestion. Consequently, it can be concluded that the sensitivity was of the same order of magnitude for both in-solution and IMER digestions, with the advantage of using IMER to obtain a method with a higher repeatability.

The evolution of the ratio between the peak area of an alkylated peptide and the peak area of the corresponding non-alkylated peptide, reflecting the alkylated proportion of a given peptide, as a function of the sulfur mustard concentration, was studied for the digestion of adducted hemoglobin in-solution or on the three trypsin IMERs. It appeared that this evolution was linear on the concentration range studied and for all the alkylated peptides targeted. As seen on the **Table 8**, the slopes observed for a given peptide are of the same order of magnitude for both digestion types and a Student test ($\alpha=0.05$) concluded that there was no significant variation of the slopes between the digestion performed on IMERs and in-solution. Experimentally, the lowest slope for the digestion on the three IMERs was observed for the peptide β -T3 + HETE adducted on the residue Glu²⁶ (slope= $7.3364 \cdot 10^{-6} \text{ mL}\cdot\mu\text{g}^{-1}$) meaning that, for a sulfur mustard concentration of $250 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, it is possible to detect 1 adducted chain over 545 227. Regarding the in-solution digestion, the slope obtained for the same peptide (slope= $1.7666 \cdot 10^{-5} \text{ mL}\cdot\mu\text{g}^{-1}$) corresponds to the detection of 1 adducted chain over 226 424. Therefore, these results highlight the fact the enzyme immobilization does not prevent or modify the cut of peptides cluttered by the sulfur mustard adduction and confirm that the digestion on IMER prior to the LC-MS/MS analysis of the resulting peptides seems to be slightly more sensitive than the in-solution digestion of hemoglobin exposed to sulfur mustard. Finally, it must be emphasized that the RSD related to the slopes after digestion on IMERs, ranging from 0.7 to 18.1%, are lower than those resulting from the in-solution digestion, ranging from 2.6 to 29%. Therefore, the fact that the three IMERs lead to similar slopes reaffirms the similarity of these supports resulting from three independent syntheses.

Finally, the alkylation rates, corresponding to the ratio between the peak area of a given alkylated peptide and the sum of the peak areas of all the alkylated peptides, obtained after tryptic digestion on the three IMERs or in-solution were compared (see **Table 8**). Overall, the alkylation rates observed were of the same order of magnitude for both digestion types and a Student test ($\alpha=0.05$) concluded that there was no significant difference between the alkylation rates obtained using an IMER or in solution, even if the RSD of the alkylation rates are lower in the case of the digestion on IMERs. Indeed, they were inferior to 11% while the in-solution digestion led to RSD up to 40%. Nevertheless, it appeared that the main adduction sites of hemoglobin were the same for in-solution and IMER digestions, *i.e.* the histidine residues and the N-terminal valine residues of both globin chains, respectively representing 86.62% and 7.18% of the total alkylation after digestion on IMERs, and 87.60% and 6.26% after in-solution digestion.

Table 8. Comparison of the alkylation rates and the slopes related to the evolution of the (alkylated peptide/corresponding non-alkylated peptide) ratio with the concentration of sulfur mustard obtained after in-solution or IMER digestion of human hemoglobin incubated in vitro with sulfur mustard at five concentration levels (250 ng.mL⁻¹, 500 ng.mL⁻¹, 1 µg.mL⁻¹, 10 µg.mL⁻¹ and 100 µg.mL⁻¹). Three independent digestions were performed on the three trypsin IMERs, i.e. one digestion per IMER (digestion in stop flow at 25°C during 30 min with a transfer volume of 40 µL) or in-solution for each sulfur mustard concentration (n=15).

Alkylated peptide	Adduction site	Most intense MRM transition	Slope of the alkylated peptide/corresponding non-alkylated peptide ratio (mL.µg ⁻¹) (RSD)		Mean alkylation rate (alkylated peptide/total of alkylated peptides) (RSD)	
			IMER digestion (n=3)	In-solution digestion (n=3)	IMER digestion (n=15)	In-solution digestion (n=15)
α-T1 + HETE	α-Val ¹	417.2 -> 105.3	1.7144 10 ⁻⁵ (1.0%)	1.8480 10 ⁻⁵ (10.9%)	3.71% (10.9%)	3.24% (21.4%)
α-T4 + HETE	α-His ²⁰	817.4 -> 704.0	1.3937 10 ⁻⁵ (0.7%)	1.6050 10 ⁻⁵ (3.4%)	0.44% (4.3%)	0.43% (30.9%)
α-T6 + HETE	α-His ⁴⁵	646.7 -> 237.0	2.5776 10 ⁻⁴ (1.6%)	2.1601 10 ⁻⁴ (2.6%)	4.80% (7.5%)	4.94% (18.4%)
α-T6 + HETE	α-His ⁵⁰	646.7 -> 237.0	1.8462 10 ⁻⁴ (6.0%)	1.4960 10 ⁻⁴ (7.5%)	2.47% (8.8%)	2.35% (26.6%)
α-T9 + HETE	α-His ⁷²	776.0 -> 977.8	6.7004 10 ⁻⁵ (10.3%)	6.5343 10 ⁻⁵ (5.5%)	14.45% (9.0%)	15.23% (17.7%)
α-T9 + HETE	α-His ⁸⁷	776.0 -> 977.8	5.1080 10 ⁻⁵ (4.2%)	6.0539 10 ⁻⁵ (17.8%)	13.82% (9.4%)	15.80% (30.1%)
α-T9 + HETE	α-His ⁸⁹	776.0 -> 977.8	5.5730 10 ⁻⁵ (6.7%)	5.7201 10 ⁻⁵ (22.4%)	9.07% (2.9%)	10.36% (14.9%)
β-T1 + HETE	β-Val ¹	529.0 -> 105.0	4.1478 10 ⁻³ (14.7%)	5.1302 10 ⁻³ (9.1%)	3.47% (3.2%)	3.02% (40.7%)
β-T1 + HETE	β-His ²	529.0 -> 105.0	6.8231 10 ⁻⁴ (18.1%)	7.7938 10 ⁻⁴ (13.0%)	0.83% (7.2%)	0.74% (38.5%)
β-T3 + HETE	β-Glu ²²	710.0 -> 105.1	1.0258 10 ⁻⁵ (10.2%)	1.4574 10 ⁻⁵ (29.0%)	2.29% (8.7%)	2.23% (17.7%)
β-T3 + HETE	β-Glu ²⁶	710.0 -> 763.3	7.3364 10 ⁻⁶ (3.1%)	1.7666 10 ⁻⁵ (29.0%)	2.01% (7.8%)	2.37% (21.7%)
β-T5 + HETE	β-Glu ⁴³	1082.2 -> 1116.6	1.1192 10 ⁻⁵ (6.4%)	1.0715 10 ⁻⁵ (20.3%)	0.57% (7.3%)	0.64% (19.1%)
β-T9 + HETE	β-His ⁷⁷	592.0 -> 781.5	3.4331 10 ⁻⁴ (1.0%)	2.8891 10 ⁻⁴ (5.4%)	36.64% (5.8%)	34.56% (10.6%)
β-T11 + HETE	β-His ⁹⁷	615.8 -> 662.5	1.0479 10 ⁻⁴ (8.2%)	8.6826 10 ⁻⁵ (25.6%)	4.10% (9.8%)	3.15% (23.3%)
β-T11 + HETE	β-Val ⁹⁸	615.8 -> 662.5	5.0522 10 ⁻⁵ (14.5%)	3.3709 10 ⁻⁵ (22.7%)	1.33% (5.7%)	0.93% (9.3%)

III.2.4. Conclusion

Before studying the potential of IMER for the fast digestion of hemoglobin adducted by sulfur mustard, the digestion conditions on laboratory-made trypsin IMERs were studied by analyzing alkylable peptides resulting from the digestion of pure hemoglobin. After demonstrating the repeatability of the IMERs grafting process, it was also demonstrated that the digestion of hemoglobin on the IMERs can be achieved in 30 minutes and it was more repeatable than the conventional in-solution digestion achieved in 16 hours. Moreover, the digestion is carried out directly on-line with the LC-MS/MS analysis of the resulting peptides, which could make the automatization of the whole procedure possible. Finally, this study proved that the three IMERs were similar in terms of performances and that it was possible to use a given IMER numerous times. As an example, more than 60 digestions were performed on the IMER 1 without loss of efficiency.

Similarly to the in-solution digestion, a satisfying linearity was observed for all the alkylated peptides resulting from the tryptic digestion on IMER of hemoglobin *in vitro* exposed to sulfur mustard concentrations ranging from 250 ng.mL⁻¹ to 100 µg.mL⁻¹. It was also demonstrated that the sensitivity of the method was similar with the detection of less than 2 alkylated chains over one million and the theoretical possibility to detect alkylated peptides resulting from the incubation of hemoglobin in deionized water with sulfur mustard at 10.8 and 15.6 ng.mL⁻¹ for digestion on IMERs and in-solution, respectively. However, the results obtained after digestion on IMERs were more repeatable than those resulting from the in-solution digestion of the protein. The linear relationship between the concentration of sulfur mustard and the alkylation of hemoglobin implied that this method could be used for semi-quantitative analysis in further studies. Finally, the main adduction sites observed after digestion on IMERs or in-solution were the same, *i.e.* the histidine residues of the protein which represent more than 86% of the total alkylation occurring on hemoglobin. The entire analytical procedure, including the tryptic digestion on IMER, has yet to be applied to biological samples, after development and optimization of a simplified method to extract hemoglobin from blood exposed to sulfur mustard.

Acknowledgments

The authors would like to thank the French Defense Procurement Agency (DGA) for its financial support and for providing alkylated hemoglobin solutions for the study.

CHAPITRE IV

**ANALYSE DES ADDUITS HEMOGLOBINE-YPERITE DANS
LE SANG TOTAL APRES EXTRACTION DE LA PROTEINE
DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES**

Chapitre IV : Analyse des adduits hémoglobine-ypérite dans le sang total après extraction de la protéine des échantillons biologiques

Dans le chapitre précédent, trois IMERs à base de trypsine immobilisée sur un support de Sépharose activée CNBr ont été synthétisés en laboratoire et la répétabilité du processus de greffage a été démontrée, avec des CV de l'ordre de 6%. Le couplage en ligne de l'IMER de trypsine avec l'analyse en LC-MS/MS des peptides résultant de la digestion de l'hémoglobine adduite par l'ypérite a également démontré son potentiel. En effet, tous les peptides alkylés identifiés dans le second chapitre suite à la digestion en solution de la protéine adduite ont été détectés après digestion sur IMER de trypsine, qui s'est révélée plus rapide et plus répétable que la digestion en solution. De même, une linéarité satisfaisante a été observée pour tous les peptides alkylés sur la gamme de concentration en ypérite étudiée (250 ng.mL⁻¹ à 100 µg.mL⁻¹). De fait, les résultats obtenus dans le cas de l'incubation *in vitro* de l'hémoglobine par l'ypérite en milieu pur ont encouragé l'application de la procédure de digestion en ligne à des échantillons de sang humain exposés à l'ypérite, après extraction et isolement de l'hémoglobine adduite des échantillons biologiques.

Comme évoqué dans le second chapitre de ce manuscrit, les procédures habituellement mises en œuvre pour extraire et isoler l'hémoglobine du sang sont souvent longues et laborieuses, nécessitant de nombreuses étapes de traitement des échantillons. En outre, certaines de ces méthodes, telles que la purification de l'hémoglobine par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés, requièrent un matériel spécifique souvent onéreux. De fait, l'un des objectifs de cette thèse a été de développer une nouvelle procédure simplifiée pour l'extraction de l'hémoglobine à partir d'échantillons de sang total, avant digestion de la protéine adduite sur IMER de trypsine. Cette nouvelle procédure est détaillée dans la partie suivante sous la forme d'un article qui sera prochainement soumis.

IV.1. Analysis of long-lived sulfur mustard-hemoglobin adducts in blood samples by off-line red blood cells lysis and on-line coupling of digestion on an immobilized-trypsin reactor with liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Abstract

As a highly alkylating chemical warfare agent, sulfur mustard reacts with blood proteins such as hemoglobin to form long-lived hydroxyethylthioethyl adducts that can be used as biomarkers of exposure. An optimized method was developed for the extraction of hemoglobin from blood samples. This procedure, involving the hemolysis of the red blood cells by freezing at -80°C in two cycles of 1 h, followed by the purification of the lysate by ultrafiltration on 100 and 50 kDa cutoff centrifugal devices, was then applied to the extraction of hemoglobin from blood samples spiked with sulfur mustard at different concentrations (ranging from 0.014 to $28\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). More than 75% of the protein was extracted from the blood samples and the method demonstrated a satisfying repeatability, with a RSD of 12.6%. The extracted hemoglobin was then digested on-line on a laboratory-made trypsin IMER coupled with the analysis by liquid chromatography hyphenated with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) of the resulting alkylated peptides. A linear response was observed for the 13 alkylated peptides targeted for the sulfur mustard concentration range studied, with RSD down to 0.1% for the digestion repeatability. The limit of quantification of the method was estimated to be $0.4\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ as concentration of exposure to sulfur mustard in whole blood. Finally, a variation of the alkylation rates of hemoglobin was observed between the biological matrix and pure sample, since the preferential adduction sites in blood were the residues $\beta\text{-His}^{97}$ and $\beta\text{-Val}^{98}$, both located on the alkylated peptide $\beta\text{-T11}$, while for purified hemoglobin in water, the residue $\beta\text{-His}^{77}$ was the main adduction site. Thus, even though blood samples require an additional sample treatment step compared to pure standards, carrying out the study with whole blood allowed to collect information that are more representative of the phenomena occurring in the organism upon exposure to sulfur mustard.

IV.1.1. Introduction

Sulfur mustard (1,1'-thiobis(2-chloroethane)) is a severe cytotoxic, genotoxic and carcinogenic blistering chemical warfare agent, causing burns to the lungs, the eyes and the skin. Used for the first time during World War I [1], sulfur mustard (also known as HD) also caused multiple casualties during the Iran-Iraq military conflict [3,4]. Though this chemical agent is prohibited by the Organization for the Prohibition of Chemical Weapons (OPCW), there is still a need for fast, sensitive and accurate methods for the retrospective diagnosis of exposure to sulfur mustard. Indeed, due to its high toxicity, strong permeability, low volatility, ease of synthesis and lack of antidote, sulfur mustard represents a

terrorist threat [5] and was used several times since 2015 in chemical terrorist attacks [6]. Moreover, accidental exposures to sulfur mustard were also reported in Europe and in China, due to the presence of old chemical weapons ammunitions in the environment [8–11].

As a strong vesicant and bi-functional alkylating agent, sulfur mustard can react with numerous nucleophiles present in the organism, such as proteins, to form hydroxyethylthioethyl (HETE) adducts, used as unequivocal biomarkers to retrospectively confirm an exposure to this chemical agent. The adducts that sulfur mustard forms with hemoglobin, the most abundant protein found in the red blood cells (RBCs) of human blood, are particular useful long-lived biomarkers. Indeed their life-span is similar to that of the native protein (*c.a.* 120 days) [63] and they can be detected up to several months after an exposure to sulfur mustard. Hemoglobin is a tetrameric protein composed of two chains of globin α and two chains of globin β . In the late 90s, eleven sites of alkylation were identified based on the liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis of the tryptic digest of hemoglobin extracted from blood samples incubated with sulfur mustard, including the two N-terminal valine residues of both globin α and globin β chains that make up the protein (α -Val¹ and β -Val¹), six histidine residues (α -His²⁰, α -His⁴⁵, α -His⁵⁰, β -His⁷⁷, β -His⁹⁷ and β -His¹⁴⁶) and three glutamic acid residues (β -Glu²², β -Glu²⁶ and β -Glu⁴³) [12,110]. More recently, five new potential adduction sites were identified using a new analytical method developed in our laboratory (α -His⁷², α -His⁸⁷, α -His⁸⁹, β -His² and β -Val⁹⁸) on purified hemoglobin standard incubated with sulfur mustard in water [131]. The localization of the different adduction sites identified is presented on the **Figure S1 (Annexe 3)**. This method was developed as a complement to the modified Edman degradation procedure that is mainly used for the analysis of the adducts that sulfur mustard forms with the N-terminal valine residues of hemoglobin. In this time-consuming procedure, a cleavage agent, such as pentafluorophenyl isothiocyanate or phenyl isothiocyanate, is used to isolate the adducted N-terminal valine from the protein chain. This valine adduct is then analyzed by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry (GC-MS/MS), after a potential derivatization step with heptafluorobutyrylimidazole or heptafluorobutyric anhydride [17,111]. The new analytical method developed in our previous study [131] was based on the LC-MS/MS analysis of the alkylated peptides obtained after the tryptic digestion of hemoglobin incubated *in vitro* with sulfur mustard in deionized water. This method was later improved by replacing the off-line in-solution digestion step by a digestion step on an immobilized enzyme reactor (IMER) [192] that presents several advantages compared to the conventional in-solution digestion. First of all, due to the immobilization of large amount of enzyme, the auto-digestion of the protease is greatly reduced and the high enzyme/substrate (E/S) ratio leads to shortened digestion times (32 times shorter compared a digestion in solution). Moreover, the IMER can be reused numerous times with no cross contamination or loss of efficiency, thus reducing the long-term cost of

the digestion and can be easily coupled on-line with the LC-MS/MS thus favoring the automation of the analysis of the resulting peptides [192]. In addition, it was demonstrated that the digestion on IMER was more repeatable than the in-solution digestion, with relative standard deviation (RSD) ranging between 1.0 and 20.9% for digestion on IMER and RSD varying between 5.7 to 53.3% for in-solution digestion [192]. The developed IMER was applied to the digestion of standard hemoglobin in deionized water exposed *in vitro* to sulfur mustard concentrations ranging from 250 ng.mL⁻¹ to 100 µg.mL⁻¹, followed by LC-MS/MS analysis. This method led to a satisfying linearity for all the 15 targeted alkylated peptides, and it was possible to detect less than two adducted chains over one million. However, this sensitivity was estimated in pure media.

Therefore, in this study, the IMER-LC-MS/MS method previously applied to hemoglobin standards was applied to the analysis of hemoglobin extracted from whole blood samples. A particular attention was paid on the optimization of the method used to extract hemoglobin from whole blood, particularly the two crucial steps of (i) red blood cells (RBCs) lysis procedure and (ii) the purification of the extracted hemoglobin by ultrafiltration. Then the whole optimized analytical procedure was applied to blood samples spiked with sulfur mustard at concentrations ranging from 0.014 µg.mL⁻¹ to 28 µg.mL⁻¹.

IV.1.2. Material and methods

IV.1.2.1. Chemicals

Sodium chloride (NaCl), sodium hydrogen phosphate (Na₂HPO₄), sodium acetate (CH₃CO₂Na), sodium hydrogen carbonate (NaHCO₃), sodium azide (NaN₃), Trizma[®] hydrochloride (NH₂C(CH₂OH)₃.HCl, Tris-HCl) and calcium chloride dihydrate (CaCl₂.2H₂O) were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France), as well as hydrochloric acid (HCl), formic acid (FA), trypsin from bovine pancreas treated with 6-(1-tosylamido-2-phenyl)ethyl chloromethyl ketone (TPCK) and the cyanogen bromide-activated Sepharose 4B (CNBr-activated Sepharose) used for the trypsin immobilization. The BiCinchoninic acid Assay (BCA) protein assay reagents were obtained from Thermo Fisher Scientific (Courtaboeuf, France). Potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄), potassium chloride (KCl) and acetonitrile HPLC grade (ACN) were provided by VWR (Fontenay-sous-bois, France) while high purity water was obtained using a Milli-Q water purification system (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France). The phosphate buffer saline solution (PBS, pH 7.4) consisted of 0.01 mol.L⁻¹ Na₂HPO₄ and KH₂PO₄ and 0.15 mol.L⁻¹ NaCl. The PBS-azide solution was a PBS solution containing 0.1% (w/w) of NaN₃. Amicon[®] Ultra-4 mL (100 kDa and 50 kDa) and Centriscart[®] (100 kDa) centrifugal ultrafiltration devices were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Regarding trypsin

immobilization, the grafting solution and washing solutions were prepared as described in our previous study [192].

Non-spiked human blood sample (28 mL, batch 10200088369) from a healthy individual without known exposure to sulfur mustard was provided by the Centre de Transfusion Sanguine des Armées (CTSA, Clamart, France). Sodium citrate/citric acid was used as an anticoagulant. Another human blood sample (batch 1021002035) was obtained from the CTSA and was later spiked with sulfur mustard (DGA CBRN Defence, France, purity > 99% according to the NMR $^1\text{D} \ ^1\text{H}$ analyses) at concentrations of $0.014 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.07 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.14 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $1.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $5.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $28 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. These spiked samples were prepared by the Analytical Chemistry department of DGA CBRN Defence center by adding 20 μL of sulfur mustard at $1.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $14 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $70 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.14 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.56 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ or $2.8 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in isopropanol (iPrOH), respectively, to 2 mL of blood. The mixtures were then incubated overnight (*c.a.* 19 h) at room temperature under horizontal stirring and were then stored at 4°C until further use. In parallel, two samples were used as negative controls using the same batch (1021002035) (i) 2 mL of unmodified whole blood and (ii) 2 mL of blood to which 20 μL of iPrOH were added. Both control samples were stirred at room temperature overnight.

IV.1.2.2. Apparatus and LC-MS/MS analysis

The experimental set-up used for the on-line enzymatic digestion of hemoglobin on the trypsin IMER and the analysis of the resulting peptides by LC-MS/MS, is described in **Figure S2 (Annexe 3)**. It was composed of three six-port switching valves. The first valve was connected to the injection loop (20 μL) and to a syringe pump (KDS 100 Infusion Pump, KD Scientific). The second valve was connected to the trypsin IMER precolumn, which was set in an oven (Crococil oven, CIL) at 25°C . The last valve was connected to a desalting column that consisted of a polymeric reversed phase trapping precolumn (Newguard RP-18, 15 mm x 3.2 mm i.d., 7 μm , Perkin Elmer, Villebon-sur-Yvette, France), to the analytical column (Atlantis[®] dC₁₈, 150 mm x 2.1 mm i.d., 3 μm , 100 Å, Waters, Guyancourt, France) and to the binary analytical pump (Dionex Ultimate 3000 pump, Thermo Scientific, controlled by Chromeleon 6.8 SR11). Detection of the peptides was performed with a triple quadrupole mass spectrometer (TSQ Quantum Access Max[®], Thermo Scientific) equipped with an electrospray (ESI) ion source (IonMax source, probe HESI-II, Thermo Scientific). The mobile phase was composed of a mixture of deionized water (A) and acetonitrile (B) acidified with 0.1% of formic acid, with a flow rate of $200 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. A gradient composed of 100% A during 5 min followed by an increase from 0% to 40% B in 80 min prior to a plateau at 40% B during 2 min was used for the peptides separation. The peptides were then detected by mass spectrometry in multiple reaction monitoring (MRM) mode. Ionization was performed in positive mode with a source voltage of 3,000 V, capillary and vaporizer temperatures

were respectively set at 230°C and 277°C, the sheath gas pressure was set at 30 psi and the skimmer offset was set at 1V. A scan width of 0.5 m/z and a dwell time of 0.35 s were used for the analysis. The mass parameters and the MRM transitions used for each peptide were previously optimized [192] and are detailed in the **Table S1 (Annexe 3)**. The limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) were estimated by calculation for a Signal/Noise (S/N) ratio of 3 and 10, respectively.

IV.1.2.3. Synthesis of the trypsin-based IMER

The trypsin-based IMER was prepared following the protocol described in a previous study [192]. Briefly, CNBr-Sepharose was swollen in an Eppendorf lobind with a HCl solution (10^{-3} mol.L⁻¹) and was then washed with a sodium carbonate buffer (NaHCO₃ 0.1 mol.L⁻¹, NaCl 0.5 mol.L⁻¹, pH 8.3). After elimination of the supernatant, a trypsin solution prepared in the coupling sodium carbonate buffer were added to the Sepharose and the mixture was incubated at 4°C during 16 h before being packed into a 20 x 2.1 mm i.d. precolumn. The remaining uncoupled sites were then blocked using a Tris buffer (Tris-HCl 0.1 mol.L⁻¹, pH 8.0) and the non-bounded enzyme was further removed, by alternatively washing the grafted gel with a low-pH buffer solution (0.1 mol.L⁻¹ acetate buffer, NaCl 0.4 mol.L⁻¹, pH 4.0) and a high-pH buffer solution (0.1 mol.L⁻¹ carbonate buffer, NaCl 0.5 mol.L⁻¹, pH 8.3). The IMER was then stored during several months, when not used, at 4°C in a PBS solution containing 0.1% azide.

As previously described, the amount of trypsin grafted on Sepharose was evaluated by a BiCinchoninic acid (BCA) assay applied to the determination of non-grafted trypsin in the supernatant and in the washing fractions [192]. Trypsin grafting yield was determined by dividing the amount of trypsin remaining in the supernatant and the washing solutions after the immobilization step by the initial amount of trypsin in the coupling solution.

IV.1.2.4. Development of an extraction and purification procedure of hemoglobin from blood samples

The development and optimization of the extraction of hemoglobin from whole blood procedure was performed using non-spiked human blood samples. Several parameters, including the RBCs hemolysis method, number of cycles of hemolysis and the type of 100 kDa cutoff filters used for the purification of the lysate, were studied and compared.

IV.1.2.4.1. Hemolysis methods

Two methods were applied to the hemolysis of the RBCs, in order to determine which method allowed to extract the greatest amount of hemoglobin. To do so, 4 mL of fresh blood were centrifuged at 4,500 rpm (centrifuge Heraeus Labofuge 400R, Thermo Scientific, Courtaboeuf, France) during 10 min at 4°C (protocol inspired by Noort *et al.* [12]). After elimination of the plasma and the blood platelets, the

RBCs were washed three times with an equivalent volume of saline solution (0.9% NaCl, w/v) followed by centrifugation at 2,000 rpm during 10 min and at 4°C, in order to remove the residual plasmatic proteins. Two equivalent volumes (*c.a.* 4 mL) of deionized water were then added to the RBCs and the diluted RBCs fraction was then separated into two equal fractions, each of them submitted to a different hemolysis method. One fraction was frozen at -80°C during 1 h (lysis method currently used at DGA CBRN Defense center and similar to that used by Zhang *et al.* [193]), while the other one was lysed using a sonication probe (Vibra-Cell®, VWR, Fontenay-sous-Bois, France) on ice at 130 W during 1 min, repeated five times, with a 1 min break between two sonication steps to prevent the sample heating and the hemoglobin degradation [113]. An illustrative summary explaining the experimental strategy is presented in **Figure S3A (Annexe 3)**.

The lysates resulting from the two hemolysis methods were centrifuged at 4,500 rpm during 10 min at 4°C in order to eliminate the cell debris and the non-lysed RBCs by sedimentation. Then, the supernatants were transferred to a 100 kDa cutoff Amicon® centrifugal device and were filtered by ultrafiltration at 4,500 rpm during 10 min and at 4°C. The filtrates containing the hemoglobin (MW=64,458 Da) were then filtered by ultrafiltration on a 50 kDa cutoff Amicon® centrifugal device. The hemoglobin trapped on the filters was then recovered and quantified using a BCA assay (see section IV.2.2.4.4). The procedure used to filter and purify the lysates is illustrated on **Figure S3B (Annexe 3)** and described in section IV.2.2.4.2. Each lysis procedure was independently repeated three times (n=3).

IV.1.2.4.2. Purification of hemoglobin with 100 kDa cutoff filters

After selection of the best hemolysis procedure, two types of 100 kDa cutoff filters were studied in order to select the most efficient for the purification of hemoglobin extracted from whole blood: the Ultra-4 mL Amicon® and the Centrisart® centrifugal devices. To study their efficiency, the lysate (resulting from the freezing at -80°C during 1 h of the RBCs isolated from 4 mL of whole blood and washed according to the procedure described in section IV.2.2.4.1.) was divided into two equal fractions and each fraction was centrifuged at 6,400 rpm during 3 min using a HF-120 Tomy capsule (Tomy Tech, Palo Alto, USA). The supernatants were then filtered in the same conditions (4,500 rpm during 10 min at 4°C), either on an Amicon® filter or on Centrisart® filter, both of them having a 100 kDa cutoff (see **Figure S4A, Annexe 3**). The filtrates were then collected and filtered again by centrifugation at 4,500 rpm during 10 min and at 4°C on a 50 kDa cutoff Amicon® centrifugal filter (see **Figure S4B, Annexe 3**). The hemoglobin trapped on the filters was then recovered and quantified using a BCA assay (see section IV.2.2.4.4). Each filtration method was independently repeated three times (n=3), in order to compare the quantity of hemoglobin recovered with both 100 kDa cutoff devices.

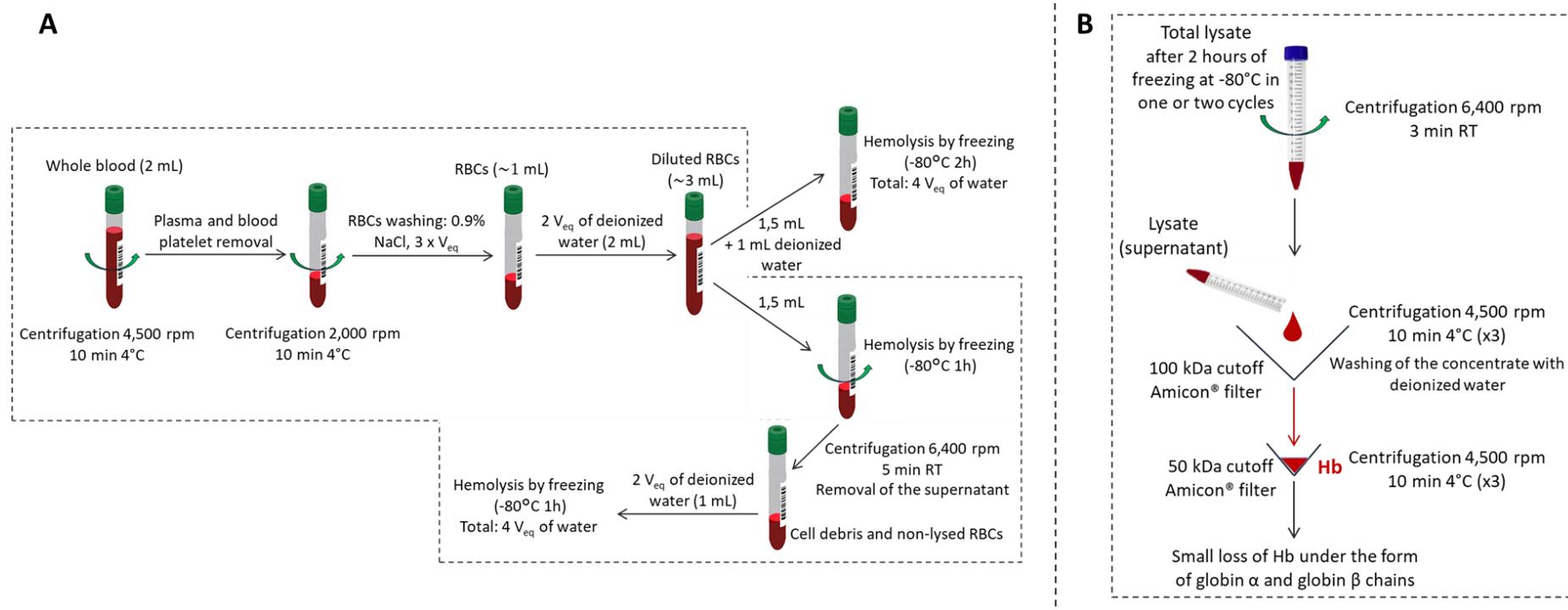


Figure 36. Schematic representation of the isolation of RBCs from whole blood and their hemolysis by freezing at -80°C during 2 hours in one or two cycles (A) followed by the lysate filtration and purification of the extracted hemoglobin by ultrafiltration on 100 and 50 kDa cutoff Amicon® filters (B). The steps retained for the treatment of blood samples spiked with sulfur mustard are framed. V_{eq} : equivalent volume, RT: room temperature. See assay 3 in **Table 9** for experimental values of extracted Hb obtained with both hemolysis methods.

IV.1.2.4.3. Hemolysis number of cycles

In order to measure the influence of the number of freezing/thaw cycles on the quantity of hemoglobin recovered, 2 mL of whole blood were treated as previously (description in section IV.2.2.4.1 and IV.2.2.4.2) except that the diluted RBCs were separated into two equal fractions of 1.5 mL and a volume of 1 mL of deionized water (*i.e.* two equivalent volumes with respect to the RBCs initially present in the whole blood sample) was added to the first fraction, which was frozen at -80°C during 2 h (1 cycle). The second fraction was frozen at -80°C during 1 h, as mentioned in the previous sections, and, after thaw at room temperature, the resulting lysate was centrifuged at 6,400 rpm during 5 min. The supernatant was collected and transferred to a 100 kDa cutoff Amicon® filter, while 1 mL of deionized water was added to the non-lysed RBCs that had sedimented after the centrifugation at 6,400 rpm and the mixture was one more time frozen at -80°C during 1 h (2 cycles of 1 hour), (see **Figure 36A**).

After thaw at room temperature, both lysates were centrifuged at 6,400 rpm during 5 min and the supernatants were transferred to 100 kDa cutoff Amicon® centrifugal devices, while the cell debris and the non-lysed RBCs were washed with 0.5 mL of deionized water before being centrifuged at 6,400 rpm at room temperature during 5 min. This washing step was repeated until the supernatant was lightly colored. For the hemolysis performed in one or two cycles, the supernatants recovered after each washing step were gathered and transferred into the 100 kDa cutoff Amicon® filter. After ultrafiltration as described in the section IV.2.2.4.2, the filtrates containing the hemoglobin were transferred into the 50 kDa cutoff Amicon® filter and were filtered as previously mentioned (see **Figure 36B**). The hemoglobin trapped on the filters was then recovered and quantified using a BCA assay (see section IV.2.2.4.4). The hemolysis by freezing at -80°C during 2 h, in one or two cycles, were repeated twice each, in order to evaluate the influence of the number of freezing/thaw cycles on the quantity of hemoglobin extracted from blood samples.

IV.1.2.4.4. Quantification of hemoglobin extracted from blood samples

After dilution by a factor 200, a BiCinchoninic acid (BCA) assay was used to quantify the hemoglobin extracted from non-spiked blood samples and from blood samples exposed *in vitro* to sulfur mustard at concentration levels ranging from 0.014 to 28 µg.mL⁻¹. A linear calibration curve was made using solutions of pure hemoglobin in the Tris-HCl (pH 8.0) buffer at concentrations of 100 µg.mL⁻¹, 250 µg.mL⁻¹, 500 µg.mL⁻¹, 750 µg.mL⁻¹, 1 mg.mL⁻¹, 2 mg.mL⁻¹ and 4 mg.mL⁻¹ and by adding 10 µL of each solution in triplicate to the pits of a 96-well microplate. After addition of the working reagent to each microwell, the microplate was incubated at 37°C during 30 min, with agitation at 300 rpm using a PHMP Grant-Bio thermoshaker (Dutscher, Bernolsheim, France). The absorbance in the pits was then measured at 562 nm with a spectrophotometer (SpectraMax M2, Molecular Devices, St Gregoire,

France). The amount of hemoglobin lost under the form of free chains of globin α (MW=15,126 Da) and globin β (MW=15,867 Da) was also estimated using a BCA assay. The calculation of the percentage of hemoglobin extracted from blood samples was performed considering an average concentration of hemoglobin in human blood of 150 mg.mL⁻¹ (classical range: 120-180 mg.mL⁻¹).

Hemoglobin extracts were diluted in the Tris-HCl buffer (pH 8.0) to obtain a final concentration of hemoglobin of 1 mg.mL⁻¹ for each concentration of sulfur mustard studied, prior to the digestion of the extracted alkylated hemoglobin on the trypsin IMER.

IV.1.2.5. On-line digestion of hemoglobin on IMER

The protocol used for the digestion on the trypsin IMER was described in our previous study [192]. Briefly, 20 μ g of hemoglobin extracted from blood sample spiked with sulfur mustard were loaded into a 20 μ L injection loop and were then transferred to the trypsin IMER with the Tris-HCl buffer (pH 8.0). After digestion of the protein by *stop flow* at 25°C during 30 min, the resulting peptides were transferred to the desalting precolumn and the salts were removed by percolating deionized water (see **Figure S2, Annexe 3**). The peptides were then transferred from the trap column to the analytical column with the mobile phase by switching the third valve and were analyzed by LC-MS/MS. The trypsin IMER can be directly reused after a simple washing step with the Tris-HCl buffer during 30 min between two digestions. In this study, the IMER was used 27 times and no loss of efficiency nor cross contamination were observed.

IV.1.2.6. Statistical test

The Student test with a confidence level of 95% ($\alpha=0.05$) mentioned in this paper was performed with the online software Statistical Tools for High-Throughput Data Analysis (STHDA).

IV.1.3. Results and discussion

IV.1.3.1. Development of an extraction and purification procedure of hemoglobin from blood samples

IV.1.3.1.1. Comparison of two hemolysis methods

The RBCs present in 4 mL of human whole blood were separated from the plasma and blood platelets and were then washed with a saline solution by centrifugation at 2,000 rpm during 10 min at 4°C (see section IV.2.2.4.1 and **Figure S3A, Annexe 3**). Two equivalent volumes of pure water were added to the washed RBCs, than were then separated in two equal fractions and each fraction was submitted to a different hemolysis method: a conventional hemolysis procedure by freezing [193] and a hemolysis performed by sonication, based on a study by Andrade *et al.* [113] who compared several

hemolysis methods. The hemolysis by freezing was carried out by putting the first fraction into a freezer at -80°C during 1 h, while the sonication procedure was carried out on ice with the second fraction at 130 W during one minute, repeated five times, to prevent the degradation of the sample. The lysates resulting from both hemolysis methods were then centrifuged at 4,500 rpm during 10 min at 4°C, before being filtered and purified according to the procedure described in **Figure S3B (Annexe 3)** and detailed in the section IV.2.2.4.1, using 100 and 50 kDa Amicon® cutoff filters. Indeed, since the molecular weight of human hemoglobin is 64,458 Da, the protein passes through the 100 kDa cutoff filter while the big proteins and cell debris present in the RBCs lysate are trapped on the filter. Then, the filtrate containing the hemoglobin is transferred to the 50 kDa cutoff filter, thus allowing to remove the small proteins and salts while hemoglobin is trapped on the membrane and therefore purified. The results obtained during the comparison of the two hemolysis methods are reported in the **Table 9** (assay 1).

Regarding the hemolysis of the RBCs by sonication, a good separation of the phases was observed after centrifugation of the lysate at 4,500 rpm during 10 min at 4°C. Indeed, a red precipitate, corresponding to the non-lysed RBCs and cell debris, was obtained at the bottom of the centrifuge tubes and could easily be eliminated. However, regarding the hemolysis carried out by freezing at -80°C during 1 h, only one phase was obtained after the centrifugation step, thus meaning that the cell debris were smaller than those resulting from the sonication procedure and that more RBCs were lysed. Consequently, the whole lysate was transferred to the 100 kDa cutoff Amicon® filter, while, in the case of the hemolysis performed by sonication, only the supernatant, *i.e.* the lysate, was transferred to the filter after removal of the cell debris and non-lysed RBCs.

Important difficulties were encountered for the filtration on the 100 kDa cutoff Amicon® filter of the whole lysate resulting from the freezing procedure, even after its dilution by addition of 1 mL of deionized water. Indeed, the cell debris present in the lysate have clogged the filter membrane, which made the filtration very laborious and led to an important loss of hemoglobin. On the contrary, the filtration of the lysate obtained after hemolysis by sonication was faster, more efficient and less laborious.

During the second filtration step on the 50 kDa cutoff Amicon® centrifugal devices, a fast and efficient filtration was obtained for both fractions resulting from the two hemolysis methods. As expected, based on the deep red color of the concentrate, it was observed that hemoglobin was trapped on the filter, thus meaning that the protein was under its tetrameric form (MW=64,458 Da) after the hemolysis step, independently of the hemolysis procedure. A slight orange coloration of the filtrate was observed for both hemolysis methods, implying than a small fraction of the hemoglobin was under

the form of free globin α and globin β chains. Based on the average concentration of hemoglobin in human blood, the estimation of the hemoglobin loss performed with a BCA assay revealed that less than 1% of the protein was under the form of free chains in the filtrate.

The amounts of hemoglobin extracted from whole blood, and trapped on the 50 kDa cutoff Amicon® filter, obtained with both hemolysis methods were estimated using a BCA assay and the results are presented in the first two columns of the **Table 9**. Since hemoglobin represents more than 98% of the cytoplasmic content of RBCs, the concentrations evaluated with the BCA assay performed after the filtration steps can be considered as only purified hemoglobin. The hemolysis performed by freezing at -80°C allows to extract more hemoglobin from the same blood sample, with an average amount of 98.8 mg (RSD=2.7%, n=3) of hemoglobin, than the hemolysis carried out by sonication, for which the mean quantity of hemoglobin extracted was only 68.0 mg (RSD=45.2%, n=3). Therefore, knowing that human blood contains on average 150 mg of hemoglobin per mL, the theoretical quantity of hemoglobin present in 2 mL of whole blood would be 300 mg. Even though this is an average value and hemoglobin concentrations can vary from an individual to another, this value is a good way to estimate the potential of a method, especially when comparing two procedures with the same blood sample. Based on this estimation, the percentage of hemoglobin recovered after hemolysis by sonication is 22.7%, while that recovered after the hemolysis by freezing is 32.9%. Moreover, after three repetitions of the hemolysis procedures in the same conditions, it appeared that the hemolysis by freezing was more repeatable than the sonication method, since the relative standard deviations (RSD) for the quantity of hemoglobin extracted were 2.7% and 45.2%, respectively. This result could be explained by the fact that the hemolysis performed by sonication led to the formation of a brown foam that stayed above the lysate after the centrifugation, thus forming a solid deposit impossible to filtrate. Therefore, it was necessary to remove this foam in order to be able to collect the lysate for the ulterior filtration step, but this removal was rather laborious and involved one more time the experimentalist, which can lead to a loss of repeatability. The hemolysis by sonication was therefore abandoned in favor of the freezing approach. Nevertheless, even if the hemolysis by freezing allows to extract larger amounts of hemoglobin than the hemolysis by sonication, it is important to note that only 32.9% of the hemoglobin initially present in the whole blood sample could be recovered following the two filtration steps. Indeed, an important loss of hemoglobin could be observed on the concentrate of the 100 kDa cutoff Amicon® filter for the lysate resulting from the freezing of the RBCs. Therefore, an optimization of this filtration step was necessary in order to reduce the loss of hemoglobin.

Table 9. Quantities of hemoglobin extracted from non-spiked whole blood samples after hemolysis of the RBCs using two different techniques or number of cycles, and further filtration and purification of the resulting lysates with two types of 100 kDa cutoff filters. The amounts of hemoglobin were estimated using a colorimetric BCA assay. RT: room temperature.

Whole blood sample treated		Assay 1 (see Figure S3, Annexe 3)		Assay 2 (See Figure S4, Annexe 3)		Assay 3 (see Figure 39)	
Initial sample volume		4 mL		4 mL		2 mL	
RBCs hemolysis		Sonication (5 x 1 min, 130W)	Freezing at -80°C during 1h	Freezing at -80°C during 1h		Freezing at -80°C during 2h in two cycles of 1h	Freezing at -80°C during 2h in one cycle
Lysate centrifugation		4,500 rpm 4°C 10 min		6,400 rpm RT 3 min		6,400 rpm RT 3 min	
Lysate purification		Ultrafiltration on Amicon® 100kDa (4,500 rpm 4°C 10 min) and 50kDa cutoff filters (4,500 rpm 4°C 10 min)		Ultrafiltration on Amicon®100kDa (4,500 rpm 4°C 10 min, x3) and 50kDa cutoff filters (4,500 rpm 4°C 10 min, x3)	Ultrafiltration on Centrisart® 100kDa (4,500 rpm 4°C 10 min, x6) and Amicon® 50kDa cutoff filters (4,500 rpm 4°C 10 min, x3)	Ultrafiltration on Amicon® 100kDa (4,500 rpm 4°C 10 min, x3) and 50kDa cutoff filters (4,500 rpm 4°C 10 min, x3)	
Quantity of hemoglobin extracted	Replicate 1	58.6 mg	96.2 mg	104.1 mg	20.5 mg	94.9 mg	80.6 mg
	Replicate 2	35.9 mg	102.4 mg	90.3 mg	17.7 mg	101.7 mg	87.0 mg
	Replicate 3	109.5 mg	97.8 mg	95.3 mg	18.5 mg	_b	_b
Mean quantity of Hb extracted (RSD)		68.0 mg (45.2%)	98.8 mg (2.7%)	95.6 mg (5.7%)	18.9 mg (6.2%)	94.9-101.7 mg	80.6-87.0 mg
Mean percentage of Hb extracted		22.7% ^a	32.9% ^a	31.9% ^a	6.3% ^a	63.3-67.8% ^a	53.7-58.0% ^a

^a Considering an average concentration of hemoglobin in human blood of 150 mg.mL⁻¹ (usual range:120 to 180 mg.mL⁻¹) ; ^b Third replicate not performed.

IV.1.3.1.2. Comparison of two 100 kDa cutoff filters for hemoglobin purification

Since the hemolysis by freezing at -80°C during 1 h appeared as the most efficient and most repeatable procedure to lyse the RBCs, this method was applied to the RBCs isolated from 4 mL of whole blood (referred as assay 2) and washed with a saline solution (see **Figure S4A, Annexe 3**). After thaw at room temperature, the resulting lysate was then divided into two fractions and each fraction was centrifuged at 6,400 rpm at room temperature during 3 min (instead of 4,500 rpm during 10 min at 4°C). This increase of the centrifugation speed allowed the elimination of the cell debris. Indeed, unlike the previous tests, a sedimentation of the non-lysed RBCs and the cell debris as a brown precipitate was obtained after this centrifugation step at 6,400 rpm. The supernatants were then collected and transferred either to a 100 kDa cutoff Amicon® filter or to a 100 kDa cutoff Centriscart® filter (see **Figure S4B, Annexe 3**). For both types of centrifugal devices, the centrifugation was carried out similarly (see section IV.2.2.4.2). The Centriscart® filter present a potential interest since the filtration occurs in the opposite direction of the centrifugal force, which could prevent the clogging of the membrane previously observed with the Amicon® filter and, therefore, could lead to a faster filtration of the lysates while reducing the loss of hemoglobin.

In the case of the Amicon® filter, the filtration turned out to be fast and simple and, after three 10 min cycles of filtration with the addition of 1 mL of deionized water each time, only a small loss of hemoglobin was observed on the membrane. Therefore, the removal of the cell debris by increasing the centrifugation speed has considerably simplified the filtration step on the 100 kDa cutoff Amicon® device. On the contrary, the lysate filtration on the 100 kDa cutoff Centriscart® device turned out to be more laborious. First, the maximal volume that can be filtered is 2.5 mL, while up to 4 mL can be filtered with the Amicon® filter, which requires to perform the filtration in several steps and thus takes more time. Moreover, even after more than 1 h of filtration (cumulated duration), it has been observed, based on the deep-red color of the concentrate that hemoglobin could not go through the membrane and remained mainly in the concentrate. Consequently, only a very small proportion of the protein present in the lysate was recovered during the filtration step on the 100 kDa cutoff Centriscart® filter.

The filtrates containing the hemoglobin were then filtered on a 50 kDa cutoff Amicon® centrifugal device. The filtration, performed at 4,500 rpm and at 4°C , was fast and simple whether the first filtration step had been carried out on a 100 kDa Amicon® or Centriscart device. Indeed, a total filtration was achieved in 30 min, *i.e.* three cycles of 10 min centrifugation. In addition, similarly to what was observed during the comparison of the hemolysis methods in section IV.2.3.1.1, a light orange coloration of the filtrates was noted after the filtration on the 50 kDa cutoff filter, thus meaning that a part of the hemoglobin was under the form of free globin α and globin β chains. Nevertheless, a BCA

assay highlighted the fact that this loss of hemoglobin as free chains only represented a small fraction, respectively less than 2% and 1% of the protein extracted from whole blood after filtration on 100 kDa cutoff Amicon® or Centriscart® filters.

The hemoglobin trapped on the 50 kDa cutoff Amicon® filters was collected before being quantified using a BCA assay. As seen in the results presented in the second column of the **Table 9** (assay 2), and confirming the visual observations previously described, an important part of hemoglobin remains on the membrane during the lysate filtration step on the 100 kDa cutoff Centriscart® filter. Only 6.3% of the hemoglobin theoretical quantity was extracted from whole blood. This result was obtained with a good repeatability for the three replicates carried out, with an average hemoglobin quantity of 18.9 mg and a RSD of 6.2%. In comparison, the filtration with the 100 kDa cutoff Amicon® filter allowed the extraction of more hemoglobin, with an average quantity of 95.6 mg, corresponding to 31.9% of the theoretical hemoglobin amount present in the blood sample. Moreover, a satisfying repeatability was observed for the three replicates, with a RSD of 5.7%. Therefore, the 100 kDa cutoff Amicon® filters were kept for the lysates purification procedure. It must also be noted that the results obtained with the 100 kDa cutoff Amicon® filters (assay 2, right column) are similar to those obtained during the comparison of the RBCs hemolysis methods, for a hemolysis by freezing at -80°C during 1 h (assay 1, left column). Thus, it could be concluded that the increase of the centrifugation speed after the hemolysis step eases the filtrations steps without affecting the extraction yields. Nevertheless, since the hemoglobin extraction percentage is relatively low, an optimization of the number of freezing/thaw cycles was carried out, in order to study its influence on the quantity of hemoglobin extracted from whole blood.

IV.1.3.1.3. Influence of the number of hemolysis cycles on the recovered amount of hemoglobin

In order to measure the influence of the number of freezing/thaw cycles on the extracted amount of hemoglobin, 2 mL of whole blood were centrifuged and the isolated RBCs were washed before their dilution with deionized water and their separation in two fractions. The fractions were then frozen at -80°C during 2 h or two cycles of 1 h (see **Figure 36A**). It must be mentioned that because of the lack of biological samples, only 2 mL of blood were used for these experiments, and not 4 mL like in the experiments of previous assays. Moreover, it is important to note that, after the blood centrifugation step, the plasma obtained was slightly red-colored, thus meaning that the RBCs were already partially lysed and that a fraction of the hemoglobin was lost in the plasma due to the degradation of the blood sample.

After thaw at room temperature, the lysates were centrifuged at 6,400 rpm (5 min) and the supernatants were transferred to a 100 kDa cutoff Amicon® centrifugal device (see **Figure 36B**), while

the precipitates were washed several times with deionized water until the supernatant was slightly colored (see **Figure S5, Annexe 3**), to recover a maximum amount of hemoglobin. The supernatants collected after each washing step were gathered and filtered on the 100 kDa Amicon® filter at 4,500 rpm. Like previously mentioned in the section IV.2.3.1.2, the lysates filtration was fast and simple and was complete after three cycles of 10 min (see **Figure 36B**).

The resulting filtrates were then transferred to the 50 kDa cutoff Amicon® centrifugal devices. The losses of hemoglobin as free chains of globin α and globin β in the filtrates were estimated with a BCA assay to be inferior to 3% of the initial quantity of hemoglobin present in the blood samples, for the hemolysis performed in one or two cycles.

As reported in **Table 9** (assay 3), amounts of 94.9 to 101.7 mg of hemoglobin were obtained after the hemolysis performed in two cycles, while 80.6 to 87.0 mg were recovered for the hemolysis in one cycle (see the last column of **Table 9**). These quantities correspond respectively to the extraction of 63.3-67.8% and 53.7-58.0% of the hemoglobin theoretically present in the initial blood samples. Therefore, it appeared that the hemolysis of the RBCs by freezing at -80°C in two cycles of 1 h with two equivalent volumes of deionized water was more efficient than the hemolysis carried in one cycle of 2 h with four equivalent volumes of water and led to the recovery of more important quantity of hemoglobin. The hemolysis in two cycles was thus selected for the rest of this study since it also seemed to be more repeatable, even if only two replicates were carried out due to the lack of biological material. However, the experiments performed on blood samples exposed to sulfur mustard and described in the following section confirmed the results obtained during the development of the extraction procedure with non-spiked blood samples.

IV.1.3.2. Application of the optimized procedure to blood samples exposed to sulfur mustard

The procedure that includes two 1 h cycles of freezing at -80°C (see **Figure 36**) was applied to the extraction of hemoglobin from a new batch of blood sample (1 mL) *in vitro* exposed to different concentration levels of sulfur mustard: $0.014 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0.07 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0.14 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0.7 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $1.4 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $5.6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and $28 \mu\text{g.mL}^{-1}$. For each of these concentrations, the final percentage of iPrOH, solvent used in the spiking solution, in whole blood was set at 1%. As negative controls, the procedure was also applied to the extraction of hemoglobin present in a non-spiked blood sample with or without the addition of 1% of iPrOH, in order to evaluate the potential influence of the solvent on the extraction of the protein.

The results obtained after the quantification of the hemoglobin extracted from these nine blood samples mentioned above are reported in the **Table 10**. Based on these results, it appeared that the

addition of a small percentage of iPrOH in the blood samples did not have any impact on the quantity of hemoglobin extracted, since the result obtained for the non-spiked blood samples containing 1% of iPrOH was similar to that obtained for the non-spiked sample of reference (127.7 and 124.4 mg of hemoglobin extracted, respectively). Moreover, the results have also highlighted the fact that the presence of sulfur mustard in the samples had no influence on the extraction of the native hemoglobin and the hemoglobin-HETE adducts. Indeed, a satisfying repeatability was obtained for all the samples treated, with a RSD of 12.6% (n=9) for a mean quantity of hemoglobin extracted of 114.3 mg. However, it was also noted that, in the case of the blood samples spiked with sulfur mustard at concentrations of 0.07 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 1.4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, the quantities of hemoglobin extracted (82.3 and 96.7 mg, respectively) were inferior to those obtained for the other sulfur mustard concentrations. Since all the samples were treated under strictly similar conditions, one hypothesis that could explain this result would be that these two samples contained less hemoglobin than the other samples prior to the hemolysis. Indeed, as illustrated on the **Figure S6 (Annexe 3)**, after addition of two equivalent volumes of deionized water to the washed RBCs before the first hemolysis cycle, it was observed that red color of the samples spiked with sulfur mustard at 0.07 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 1.4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ was less intense than that of the other samples (as illustrated by sample exposed to sulfur mustard at 0.14 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ taken as model sample (**Figure S6C, Annexe 3**), thus implying that the hemoglobin concentration was lower. A more important loss of hemoglobin in the plasma during the first centrifugation of the blood samples could explain this difference, knowing that all the samples were obtained from the same blood donor. Nevertheless, considering the numerous sample treatment steps applied on the blood samples, a RSD of 12.6% is very acceptable.

The mean quantity of hemoglobin extracted from the spiked blood samples (114.3 mg) corresponded to 75.6 % of the protein theoretically present in the samples. This percentage is superior to that obtained during the development of the extraction procedure with non-spiked blood samples (range 63.3-67.8%). This difference might be explained by the fact that, during the optimization of the method, the blood samples were aged and the RBCs had undergone a hemolysis prior to their treatment, thus leading to a loss of hemoglobin in the plasma and to an under-estimation of the extraction percentage. Nevertheless, the results obtained for the spiked blood samples were satisfying, both in terms of repeatability and quantities of hemoglobin extracted, especially considering that this procedure was developed to bio-monitor and prove an exposure to sulfur mustard, and confirmed the results previously observed with non-spiked blood samples. Finally, the estimation of the hemoglobin loss as free globin α and globin β chains in the filtrate resulting from the filtration step on the 50 kDa cutoff Amicon[®] centrifugal device was in agreement with that observed during the development of the extraction procedure, since only 2.7% of the protein was lost on average for the nine samples treated.

Table 10. Quantities of hemoglobin extracted from whole blood samples (1 mL) exposed to different concentrations of sulfur mustard (HD) and submitted to hemolysis of the RBCs by freezing at -80°C during 1h repeated twice, followed by the filtration and purification of the resulting lysates. The amounts of hemoglobin were estimated using a colorimetric BCA assay.

Samples	Quantity of Hb extracted from whole blood	Percentage of Hb extracted from whole blood ^a	Quantity of Hb lost after filtration with Amicon [®] 50 kDa cutoff filter	Percentage of Hb lost after filtration with Amicon [®] 50 kDa cutoff filter ^a
Unspiked whole blood	124.4 mg	82.9%	4.0 mg	2.7%
Unspiked whole blood + 1% iPrOH	127.7 mg	85.1%	4.3 mg	2.9%
Whole blood + HD 0.014 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	121.4 mg	80.9%	4.3 mg	2.9%
Whole blood + HD 0.07 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	82.3 mg	54.9%	5.0 mg	3.3%
Whole blood + HD 0.14 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	121.5 mg	81.0%	3.8 mg	2.5%
Whole blood + HD 0.7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	112.3 mg	74.9%	3.6 mg	2.4%
Whole blood + HD 1.4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	96.7 mg	64.5%	3.4 mg	2.3%
Whole blood + HD 5.6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	115.9 mg	72.3%	4.9 mg	3.3%
Whole blood + HD 28 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	126.2 mg	84.1%	3.5 mg	2.3%
Mean (RSD, n=9)	114.3 mg (12.6%)	75.6% (12.7%)	4.1 mg (13.2%)	2.7% (13.6%)

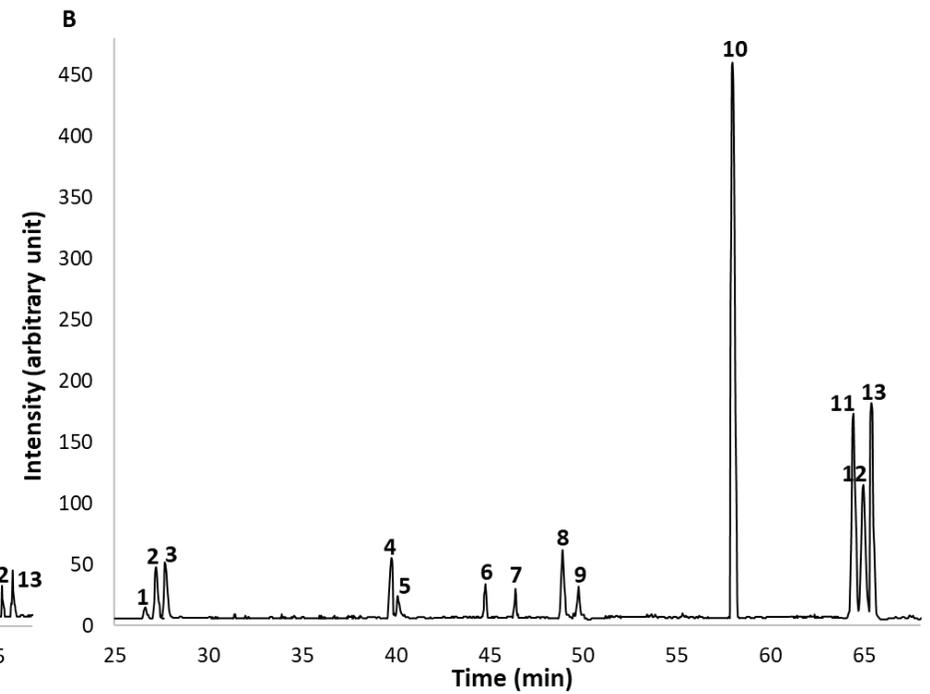
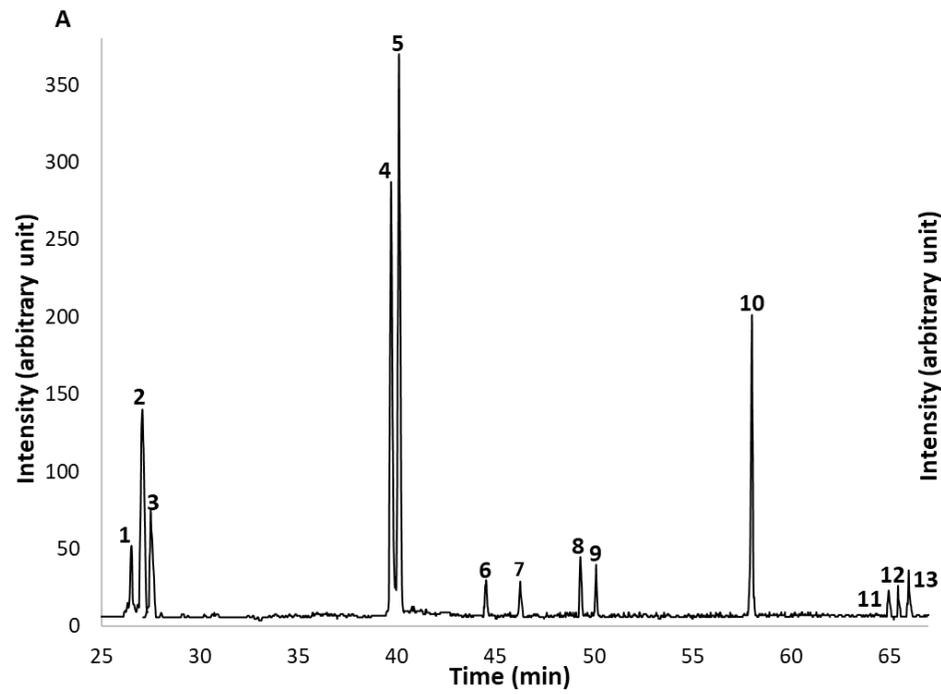
^a Considering an average concentration of hemoglobin in human blood of 150 mg.mL^{-1} (usual range: $120\text{-}180 \text{ mg.mL}^{-1}$)

IV.1.3.3. Digestion on the trypsin IMER of the hemoglobin extracted from spiked blood samples and LC-MS/MS analysis of the resulting alkylated peptides

IV.1.3.3.1. Optimization of the transfer volume between the injection loop and the IMER

In our previous study [192], the volume of the injection loop for sample injection was 5 μL . However, in order to improve the sensitivity of the LC-MS/MS procedure for the analysis of biological samples, the injection loop was replaced by a 20 μL loop. The volume of Tris-HCl solution used to transfer the hemoglobin from the injection loop to the trypsin IMER, which had been optimized in our previous study for an injection loop of 5 μL , was thus optimized for this new set up (**Figure S2, Annexe 3**).

Taking into account the volume of the injection loop (20 μL), the volume of the connection tubes between the loop and the trypsin IMER (4.4 μL) and the IMER volume (44 μL), the transfer volume must range between 24.4 μL , volume from which hemoglobin is totally transferred into the IMER, and 68.4 μL , volume from which the hemoglobin solution exceed the IMER void volume without being digested. The IMER volume (44 μL) was estimated by multiplying the geometrical pre-column volume (62.8 μL) by a theoretical porosity of 0.7. Knowing that the optimal transfer volume determined for a 5 μL injection loop was 40 μL and that it had been demonstrated with an ANOVA test that the transfer volume had no significant effect on the alkylated peptides peak areas [192], only two transfer volumes (40 and 50 μL) were compared for the new 20 μL injection loop, by digesting 20 μg of standard hemoglobin in Tris-HCl buffer (1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), previously exposed to sulfur mustard at 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ in pure water, in *stop flow* during 30 min and at 25°C. For each transfer volume tested, three independent digestions were carried out in the same conditions (n=3). The influence of the transfer volume on the peak areas corresponding to the alkylated peptides is presented on the **Figure S7A** and **Figure S7B (Annexe 3)** for globin α and globin β , respectively. A Student test ($\alpha=0.05$) was performed in order to determine if the transfer volume had a significant effect on the peak areas and the results have demonstrated that there was no significant difference between the two volumes studied. Nevertheless, it appeared that a transfer volume of 50 μL led to more intense peak areas for 65.6% of the MRM transitions studied and that the results obtained were more repeatable than those obtained with a transfer volume of 40 μL for 50% of the MRM transitions. Moreover, the RSD were inferior to 10% for more than 69% of the MRM transitions with a transfer volume of 50 μL . Consequently, a transfer volume of 50 μL was considered as optimal for this new set up with an injection loop of 20 μL and was chosen for the digestion on the trypsin IMER of hemoglobin extracted from blood samples exposed to sulfur mustard.



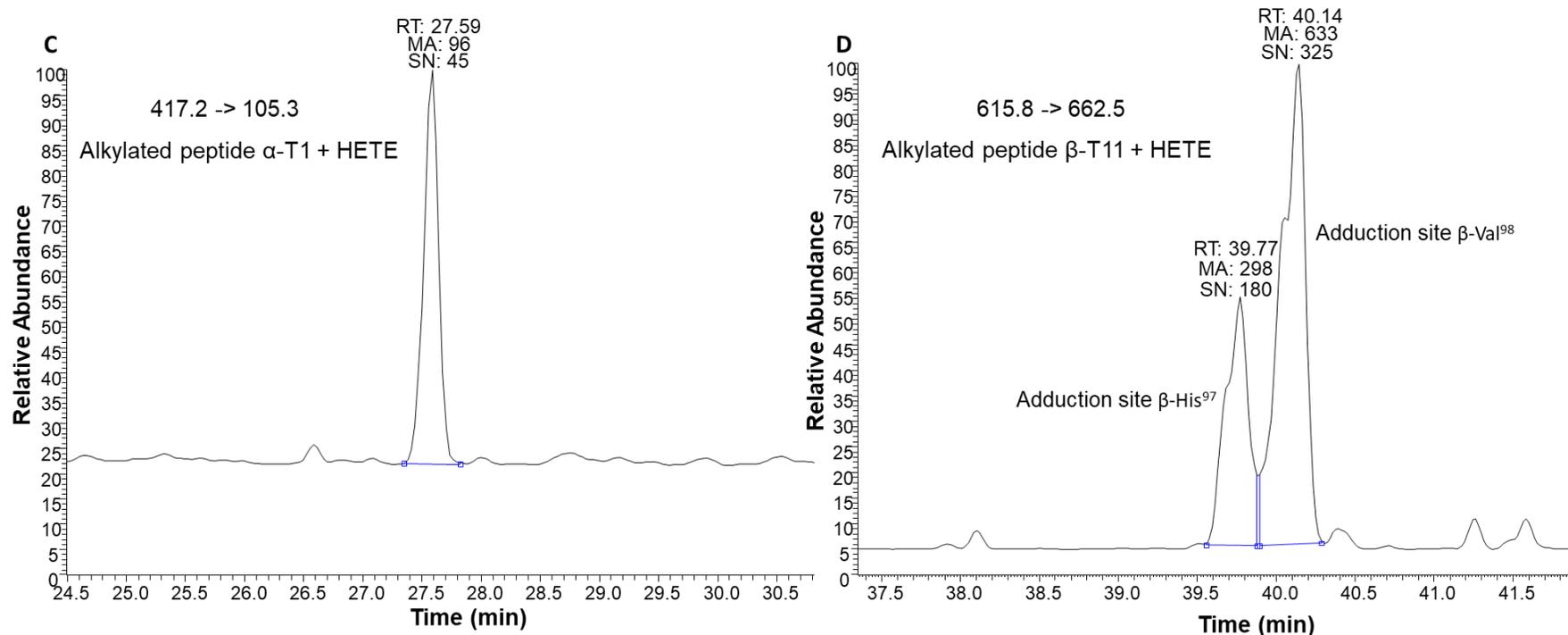


Figure 37. Overlay of MRM chromatograms corresponding to the alkylated peptides resulting from the tryptic digestion on IMER 1 (stop flow during 30 min at 25°C) of hemoglobin extracted from whole blood in vitro exposed to sulfur mustard at 0.7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (A) or of standard hemoglobin in vitro exposed to sulfur mustard at 0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in pure water (B). Peak 1: β -T1 + HETE (adduction site β -His²), peak 2: β -T1 + HETE (adduction site β -Val¹), peak 3: α -T1 + HETE (adduction site α -Val¹), peak 4: β -T11 + HETE (adduction site β -His⁹⁷), peak 5: β -T11 + HETE (adduction site β -Val⁹⁸), peak 6: β -T3 + HETE (adduction site β -Glu²²), peak 7: β -T3 + HETE (adduction site β -Glu²⁶), peak 8: α -T6 + HETE (adduction site α -His⁴⁵), peak 9: α -T6 + HETE (adduction site α -His⁵⁰), peak 10: β -T9 + HETE (adduction site β -His⁷⁷), peak 11: α -T9 + HETE (adduction site α -His⁸⁷), peak 12: α -T9 + HETE (adduction site α -His⁸⁹), peak 13: α -T9 + HETE (adduction site α -His⁷²). MRM chromatograms of the alkylated peptide α -T1 + HETE (adduction site α -Val¹) (C) and the alkylated peptide β -T11 + HETE alkylated on the residue β -His⁹⁷ ($t_R=39.77$ min) or the residue β -Val⁹⁸ ($t_R=40.14$ min) (D) obtained after extraction of hemoglobin from whole blood exposed to 0.014 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of sulfur mustard and its digestion on trypsin IMER during 30 min at 25°C, followed by LC-MS/MS analysis.

IV.1.3.3.2. Digestion on IMER of the hemoglobin extracted from spiked blood samples

Hemoglobin was extracted from whole blood samples exposed to different concentration levels of sulfur mustard ($0.014 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.07 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.14 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.70 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $1.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $5.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $28 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and digested on the laboratory-made trypsin IMER, using the protocol mentioned in the section IV.2.2.5. For hemoglobin extracted once from each of the seven sulfur mustard concentrations studied, three independent digestions were performed in the same conditions and on the same IMER since our previous study [192] proved that the IMERs were reusable. Based on the extracted hemoglobin concentrations estimated with the BCA assay for each blood sample exposed to sulfur mustard, solutions corresponding to $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ of hemoglobin were prepared for each sulfur mustard concentration by diluting the extracted hemoglobin with an adequate volume of Tris-HCl buffer (pH 8.0). $20 \mu\text{L}$ of the prepared solutions, *i.e.* $20 \mu\text{g}$ of hemoglobin, were then digested on the trypsin IMER and the resulting peptides were transferred to the trap column then the analytical column. Only the alkylated peptides were detected by mass spectrometry in MRM mode (see **Table S1, Annexe 3** for mass parameters and transitions). An example of MRM chromatograms obtained for the 13 alkylated peptides resulting from the tryptic digestion of hemoglobin extracted from whole blood exposed to sulfur mustard at $0.7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ is presented in **Figure 37A**. As a comparison, the chromatogram obtained for standard hemoglobin ($50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) *in vitro* exposed to an equivalent concentration of sulfur mustard (*i.e.* $0.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ [192]) in pure water is given in **Figure 37B**. If the MRM chromatograms resulting from the analysis of the biological sample are as clean as the one obtained in pure media, thus indicating that there are no matrix effects that could lead to an increased background noise, it was also observed that the peak intensities greatly varied between the two media, especially for the peptides $\alpha\text{-T9} + \text{HETE}$, $\beta\text{-T1} + \text{HETE}$, $\beta\text{-9} + \text{HETE}$ and $\beta\text{-11} + \text{HETE}$, which suggests that hemoglobin adduction by sulfur mustard depends on the matrix.

The main objective of these analyses was to check if the linear link between the sulfur mustard concentration and the alkylation degree of hemoglobin, previously observed in the case of studies conducted on hemoglobin standards exposed to sulfur mustard in pure water, was also observed in the biological samples as the extraction method from blood is now available. Therefore, the evolution of the peak areas of alkylated peptides (previously identified [131]) as a function of the sulfur mustard concentration was studied and the results obtained are reported in **Table 11** for all the alkylated peptides and illustrated in **Figure 38** for the alkylated peptide $\alpha\text{-T1} + \text{HETE}$, taken as an example. As seen on this figure, a satisfying linearity was observed on the concentration range studied for the two MRM transitions corresponding to this peptide. This linearity was also observed for the whole sulfur mustard concentration range ($0.014\text{-}28 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) studied for all the other alkylated peptides (see **Table 11** for the most intense MRM transition of each peptide and **Table S2 (Annexe 3)** for all the MRM

transitions), thus confirming the results obtained for purified hemoglobin in pure water [192]. Moreover, it is important to note that the RSD observed for the peak areas corresponding to the most intense MRM transitions were inferior to 10% in 58% of the cases and globally ranged from 0.1 to 46.2%, hence highlighting the repeatability of the entire treatment and analytical procedure applied to whole blood samples, including the extraction step of hemoglobin, the digestion on IMER and the LC-MS/MS analysis of the resulting alkylated peptides.

Experimentally, the digestion on the trypsin IMER coupled on-line with the LC-MS/MS analysis allowed the detection of alkylated peptides resulting from the exposure of blood to sulfur mustard at a concentration as low as $0.014 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, which is similar to a previous study carried out by Noort *et al.* who were able to detect the adducts formed with the N-terminal valine residues of hemoglobin by GC-MS after in vitro exposure of blood samples with sulfur mustard at $15.9 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, using a modified Edman degradation procedure [17]. However, it must be noted that the concentration of $0.014 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ was the lowest sulfur mustard exposure dose that was provided by the DGA CBRN Defense and that it could surely be possible to detect the alkylated peptides resulting from the exposure of whole blood to concentrations five to ten times inferior. Examples of extracted ion chromatograms (EIC) corresponding to the most intense MRM transitions of the alkylated peptides $\alpha\text{-T1} + \text{HETE}$ and $\beta\text{-T11} + \text{HETE}$ obtained for a concentration of sulfur mustard of $0.014 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ are presented in **Figure 37C** and **Figure 37D**, respectively. Based on the S/N ratios experimentally obtained for the lowest concentrations of sulfur mustard (0.014 and $0.07 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), it was possible to estimate the sensitivity of the whole treatment and analytical procedure. Thus, the estimation of the theoretical LOD and LOQ, *i.e.* the lowest concentrations of sulfur mustard that could respectively be detected and quantified with the developed analytical procedure, for the most intense MRM transition of each alkylated peptide is reported in the **Table 11**. As seen in this table, depending on the targeted peptides, it would theoretically be possible to detect an exposure of whole blood to a concentration of sulfur mustard inferior to $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, which highlights the great sensitivity of the analytical procedure. Therefore, the alkylated peptide $\beta\text{-T11} + \text{HETE}$ could be used to sensitively detect an exposure to sulfur mustard to concentrations down to $0.1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, while the peptide $\beta\text{-T9} + \text{HETE}$ could be used as confirmation of exposure.

Finally, the alkylation rates, corresponding to the alkylated peptide/sum of alkylated peptides ratio and illustrating the part of the total alkylation induced on hemoglobin upon exposure to sulfur mustard represented by each peptide, was determined after tryptic digestion on IMER of the hemoglobin extracted from blood samples exposed to sulfur mustard. This ratio was calculated for all the alkylated peptides for the seven concentrations of sulfur mustard studied. These ratios, reported in the **Table**

11, demonstrated that the alkylation rates induced on hemoglobin were independent of the sulfur mustard concentration, with RSD ranging from 3.4 to 10.6%. However, when comparing the results obtained for the analysis of biological samples with those obtained in pure water [192], major differences could be observed (see **Table 11**), confirming the differences observed on the chromatograms of both matrices (see **Figure 37A** and **Figure 37B**). Indeed, in blood samples, it seems that most of the sulfur mustard binds with the adduction sites of globin β , since the 7 alkylation sites localized on the globin β chains represent more than 85.9% of the total adduction induced on hemoglobin. The residues β -His⁷⁷, β -His⁹⁷ and β -Val⁹⁸ alone represent more than 72% of the alkylation. Therefore, if, in pure water, the preferential adduction sites were the histidine residues of both globin α and globin β [192], the two adduction sites of the peptide β -T11 are the most alkylated sites in the biological matrix. Thus, the residues β -His⁹⁷ and β -Val⁹⁸ are respectively 5.7 and 22.3 times more alkylated in blood samples than in pure water. These observations indicate that the adduction of sulfur mustard on hemoglobin in whole blood is very different from that occurring in pure water, probably due to a modification of the hemoglobin structure in the biological matrix and thus, to a variability of the access of sulfur mustard to the different adduction sites of the protein. Finally, it appeared that the alkylation on the N-terminal valine residues α -Val¹ and β -Val¹, adduction sites preferentially targeted with the modified Edman degradation procedure, respectively represented 4.16 and 9.60% of the total alkylation of hemoglobin in whole blood, thus highlighting the importance of the newly developed analytical method, targeting several alkylation sites at once, as an alternative to the current procedure.

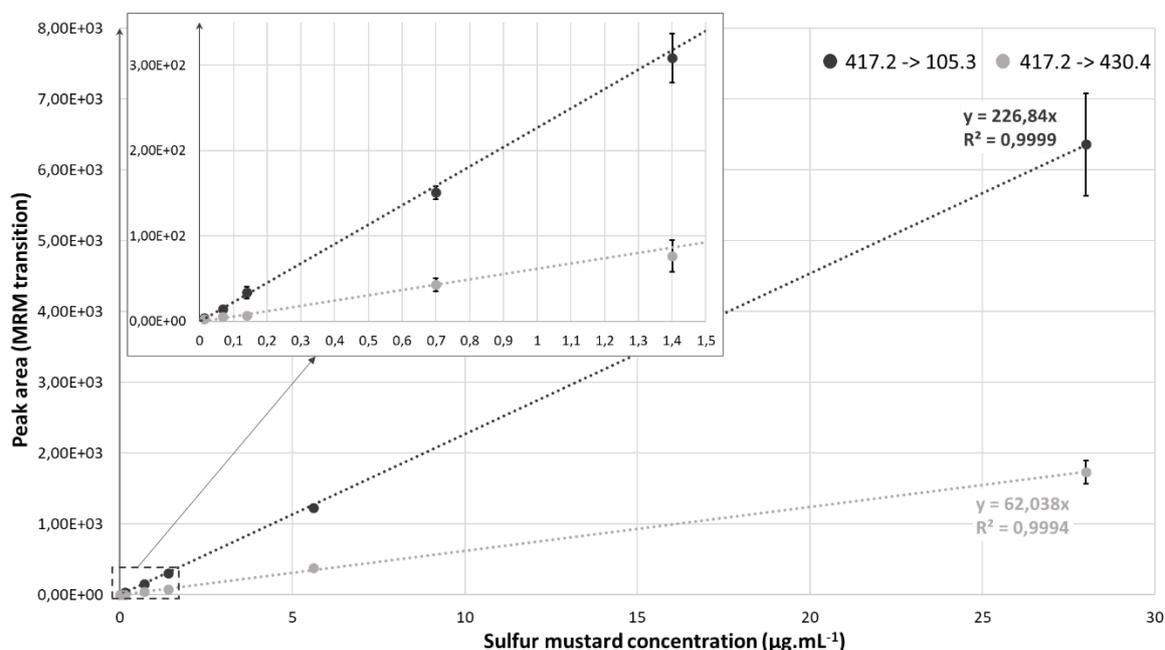


Figure 38. Evolution of the peak area corresponding to the alkylated peptide α -T1 + HETE (adduction site α -Val¹) with the sulfur mustard concentration ($n=3$, 3 independent digestions performed on the IMER for each sulfur mustard concentration).

Table 11. Linear regression equations and coefficient values of the regression curves obtained for the evolution of the peak area corresponding to each alkylated peptide resulting from the tryptic digestion of hemoglobin extracted once from whole blood samples incubated with sulfur mustard vs the sulfur mustard concentration, minimal concentration of *in vitro* exposure to sulfur mustard that can be detected (LOD) or quantified (LOQ) in whole blood samples and comparison of the mean alkylation rates obtained in the biological matrix or in pure water. Blood samples were incubated *in vitro* with seven sulfur mustard concentration levels (0.014 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 0.07 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 0.14 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 0.7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 1.4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 5.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 28 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) while lyophilized human hemoglobin in pure water was incubated *in vitro* at five sulfur mustard concentration levels (0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Three independent digestions were performed on the trypsin IMER (digestion in stop flow at 25°C during 30 min) for each sulfur mustard concentration (n=21 for blood samples and n=15 in pure water).

Alkylated peptide	Adduction site	MRM transition (quantitative ion)	Linear regression equation and coefficient value of the regression curve	Estimated sensitivity in whole blood samples		Mean alkylation rate (alkylated peptide/total of alkylated peptides) (RSD)	
				LOD ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) S/N=3	LOQ ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) S/N=10	Blood sample (n=21)	Pure water (n=15) [192]
α -T1 + HETE	α -Val ¹	417.2 -> 105.3	$y = 226.84x$ $R^2 = 0.9999$	0.9	3.1	4.16% (5.9%)	3.71% (10.9%)
α -T6 + HETE	α -His ⁴⁵	646.7 -> 237.0	$y = 98.108x$ $R^2 = 0.9991$	1.1	3.5	1.80% (8.1%)	4.80% (7.5%)
α -T6 + HETE	α -His ⁵⁰	646.7 -> 237.0	$y = 59.603x$ $R^2 = 0.9993$	1.8	5.8	1.16% (9.5%)	2.47% (8.8%)
α -T9 + HETE	α -His ⁷²	776.0 -> 977.8	$y = 135.30x$ $R^2 = 0.9999$	1.6	5.2	2.70% (7.9%)	14.45% (9.0%)
α -T9 + HETE	α -His ⁸⁷	776.0 -> 977.8	$y = 108.80x$ $R^2 = 0.9999$	1.3	4.4	1.92% (8.6%)	13.82% (9.4%)
α -T9 + HETE	α -His ⁸⁹	776.0 -> 977.8	$y = 133.35x$ $R^2 = 0.9999$	1.9	6.4	2.27% (15.9%)	9.07% (2.9%)
β -T1 + HETE	β -Val ¹	529.0 -> 105.0	$y = 505.11x$ $R^2 = 0.9997$	1.0	3.3	9.60% (3.4%)	3.47% (3.2%)
β -T1 + HETE	β -His ²	529.0 -> 105.0	$y = 108.26x$ $R^2 = 0.9999$	16.2	53.9	2.27% (10.4%)	0.83% (7.2%)
β -T3 + HETE	β -Glu ²²	710.0 -> 758.6	$y = 38.801x$ $R^2 = 0.9946$	3.2	10.8	0.86% (10.6%)	2.29% (8.7%)
β -T3 + HETE	β -Glu ²⁶	710.0 -> 763.3	$y = 41.148x$ $R^2 = 0.9959$	2.8	9.3	0.87% (9.3%)	2.01% (7.8%)
β -T9 + HETE	β -His ⁷⁷	592.0 -> 781.5	$y = 988.45x$ $R^2 = 0.9996$	0.3	1.1	19.33% (7.0%)	36.64% (5.8%)
β -T11 + HETE	β -His ⁹⁷	615.8 -> 662.5	$y = 1223.8x$ $R^2 = 0.9991$	0.2	0.8	23.47% (5.7%)	4.10% (9.8%)
β -T11 + HETE	β -Val ⁹⁸	615.8 -> 662.5	$y = 1579.9x$ $R^2 = 0.9996$	0.1	0.4	29.60% (5.3%)	1.33% (5.7%)

IV.1.4. Conclusion

In this study, a new procedure was developed and optimized for the extraction of hemoglobin from whole blood samples. This procedure includes the hemolysis of the isolated RBCs by two freezing cycles of 1 h at -80°C followed by the purification of the resulting lysate by ultrafiltration on Amicon® 100 kDa and 50 kDa centrifugal devices. This simple method was applied to the extraction of hemoglobin from blood samples spiked with sulfur mustard. In addition to being repeatable (RSD=12.6 %), the optimized procedure allowed to extract more than 75% of the hemoglobin theoretically present in the initial blood samples treated.

After fast digestion on a trypsin IMER of the hemoglobin extracted from blood samples exposed to sulfur mustard at concentrations ranging between 0.014 and 28 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, it was confirmed that a linear link existed between the sulfur mustard concentration and the peak areas of all the alkylated peptides. It implied that this method could be used for semi-quantitative analysis in further studies. A satisfying sensibility was also obtained since, depending on the adduction sites, it could theoretically be possible to detect peptides resulting from the exposure of whole blood samples to a concentration of sulfur mustard down to 1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. The entire analytical method presented in this study (sample treatment + IMER digestion + LC-MS/MS analysis of the peptides) has a duration of 7 hours, which makes it a great alternative to the modified Edman degradation procedure, for which the sample treatment alone lasts more than 1 day in the laboratory of the French Defense Procurement Agency, while presenting a similar sensitivity. Moreover, the sample treatments steps, *i.e.* the RBCs hemolysis and the lysate filtration, can be performed simultaneously for several blood samples, thus reducing the time required for the analysis of multiple samples.

Finally, the results obtained in this study highlighted important differences regarding the preferential adduction sites of sulfur mustard on hemoglobin, between the exposition of purified hemoglobin in pure water and those in blood samples. It was observed that, for biological samples, the main alkylation sites were the residues $\beta\text{-His}^{97}$ and $\beta\text{-Val}^{98}$, representing almost 53% of the total adduction of the protein, against only 5.7% on purified hemoglobin in water. These results showed that the alkylation of hemoglobin by sulfur mustard greatly varies depending on the matrix, hence suggesting interaction differences with the protein, whose structure may vary depending on its environment. The whole developed and optimized procedure has yet to be applied to the analysis of blood samples resulting from the *in vivo* exposure of casualties to sulfur mustard, and collected on various days following the exposure, in order to determine the detection time-frame of the alkylated peptides.

Acknowledgments

The authors would like to thank the French Defense Procurement Agency (DGA) for its financial support and for providing blood samples spiked with sulfur mustard for the study.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif de cette étude était de mettre au point une nouvelle méthode d'analyse des adduits hémoglobine-ypérite s'affranchissant des limitations de la procédure de dégradation d'Edman modifiée usuelle (procédure longue et laborieuse, nécessitant de nombreuses étapes de traitement des échantillons et pouvant manquer de sensibilité et de répétabilité), afin de confirmer une exposition à l'arme chimique. Sachant que l'hémoglobine peut être alkylée par l'ypérite au niveau de nombreux résidus, l'approche envisagée a ciblé tous les sites d'adduction potentiels de la protéine, au moyen d'une digestion enzymatique permettant d'obtenir les peptides alkylés analysés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

Dans un premier temps, la digestion de l'hémoglobine alkylée par l'ypérite a été réalisée en solution de manière conventionnelle et le digestat trypsique résultant a été analysé par LC-MS/MS, après une étape de dessalage et de pré-concentration des peptides sur une colonne de piégeage. Après optimisation des conditions de séparation et de détection des peptides, dix des onze sites d'alkylation précédemment identifiés dans la littérature ont été confirmés (α -Val¹, α -His²⁰, α -His⁴⁵, α -His⁵⁰, β -Val¹, β -Glu²², β -Glu²⁶, β -Glu⁴³, β -His⁷⁷ et β -His⁹⁷) et cinq nouveaux sites d'adduction ont été identifiés (α -His⁷², α -His⁸⁷, α -His⁸⁹, β -His² et β -Val⁹⁸).

La digestion en solution présentant de nombreux inconvénients, notamment des durées très longues, l'autodigestion de la protéase et l'impossibilité de réutiliser les enzymes ou d'automatiser l'étape de digestion, des réacteurs enzymatiques immobilisés (IMER) à base de trypsine ont été développés en vue de la digestion de l'hémoglobine adduite par l'ypérite couplée en ligne avec l'analyse LC-MS/MS des peptides obtenus. Les différents paramètres de digestion sur IMER ont été optimisés, en particulier le volume de transfert de la protéine de la boucle d'injection vers l'IMER, mais également la température de digestion et la durée de présence de l'hémoglobine sur l'IMER. Il a pu être démontré que la synthèse des IMERs était très répétable et que la digestion de l'hémoglobine alkylée sur IMER était plus répétable que la digestion en solution, en plus d'être 32 fois plus rapide. En outre, cette étude a illustré la possibilité de réutiliser un IMER plus de 60 fois sans constater de perte d'efficacité.

Les résultats très satisfaisants obtenus dans le cas de l'analyse de solutions d'étalons d'hémoglobine incubés *in vitro* avec de l'ypérite ont encouragé l'application de la procédure à l'analyse d'échantillons biologiques. Au préalable, une méthode de traitement de l'échantillon simplifiée pour l'extraction de l'hémoglobine des échantillons de sang et sa purification a été développée et optimisée à partir de

sang total non dopé. Ainsi, une procédure d'hémolyse des érythrocytes par congélation à -80°C pendant 1h avec deux volumes équivalents d'eau pure, répétée deux fois, suivie de la double ultrafiltration de l'hémolysat par centrifugation sur filtres Amicon® de tolérance 100 et 50 kDa, s'est avérée répétable et rapide, et a permis d'extraire plus de 70% de la quantité théorique d'hémoglobine présente dans le sang total. Cette procédure a par la suite été appliquée à des échantillons sanguins exposés à différentes concentrations en ypérite. La répétabilité de la procédure d'extraction et de purification a de nouveau été démontrée, avec un coefficient de variation inférieur à 13% pour 9 échantillons traités de manière identique et avec un taux moyen d'hémoglobine extraite supérieur à 75%.

Du sang total exposé à des teneurs en ypérite comprises entre 14 ng.mL^{-1} et $28\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ a été traité afin d'extraire l'hémoglobine adduite, qui a ensuite été digérée sur IMER de trypsine. L'analyse par LC-MS/MS de 13 peptides alkylés résultant de cette digestion enzymatique a confirmé qu'une relation linéaire, déjà observée en milieu pur, existait entre la teneur en ypérite et l'alkylation de l'hémoglobine et ce, sur l'ensemble de la gamme de concentration en ypérite étudiée. En outre, une répétabilité satisfaisante a été obtenue pour tous les peptides adduits. Les résultats obtenus au cours de ces travaux ont également mis en évidence des différences notables concernant les sites d'adduction préférentiels de l'ypérite sur l'hémoglobine, entre l'incubation de l'ypérite avec de l'hémoglobine en milieu pur et celle effectuée avec du sang total. Ainsi, dans le cas d'échantillons biologiques, les sites préférentiels d'adduction de l'ypérite étaient les deux résidus adduits du peptide β -T11, *i.e.* les résidus β -His⁹⁷ et β -Val⁹⁸, qui représentent à eux deux près de 53% de l'alkylation totale de la protéine.

Expérimentalement, il a été possible de détecter les peptides adduits résultant de l'incubation du sang total à une concentration en ypérite de 14 ng.mL^{-1} , soit une concentration de 110 000 à 284 000 fois plus petite que celles utilisées dans les années 1990 pour la première identification des sites d'adduction de l'hémoglobine. En se basant sur les rapports S/B obtenus lors des analyses en milieu biologique, il a été conclu qu'il serait théoriquement possible de quantifier les peptides alkylés résultant de l'exposition du sang total à une teneur en ypérite de $0,4\text{ ng.mL}^{-1}$, démontrant ainsi la grande sensibilité de la procédure analytique développée.

Si la sensibilité de la méthode mise au point au cours de cette thèse est similaire à celle obtenue avec la procédure de dégradation d'Edman modifiée habituellement utilisée pour l'analyse des adduits hémoglobine-ypérite, il est toutefois important de souligner que cette nouvelle procédure est beaucoup plus rapide que la méthode usuelle. En effet, dans le cas de la dégradation d'Edman modifiée, le traitement de l'échantillon dure près de 2,5 jours à lui seul, tandis que la durée totale de la nouvelle procédure, incluant les étapes de traitement des échantillons, la digestion enzymatique sur

IMER et l'analyse LC-MS/MS des peptides alkylés, est inférieure à 7 heures. En outre, il doit être noté que les étapes d'extraction et de purification de l'hémoglobine peuvent être réalisées simultanément pour une dizaine d'échantillons de sang, ce qui réduit encore davantage la durée de la procédure.

Les études présentées dans ce manuscrit se sont essentiellement focalisées sur l'analyse des adduits hémoglobine-ypérite en tant que biomarqueurs d'exposition dans les échantillons sanguins. Toutefois, il doit être précisé qu'un sujet de stage de troisième année d'école d'ingénieur portant sur l'analyse des adduits ADN-ypérite est actuellement en cours, afin de développer une méthode pour la détection de ces adduits dans les urines. Cette méthode, encore au stade de développement mais qui pourrait être utilisée en complément de la procédure mise au point pour les échantillons sanguins afin de confirmer une exposition à l'ypérite à l'aide d'une matrice pouvant être obtenue de manière simple et non invasive, comporte une étape d'extraction sur phase solide (SPE) afin d'isoler les adduits ADN-ypérite des urines, en vue de leur analyse par LC-MS/MS.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Supplementary materials for article 1

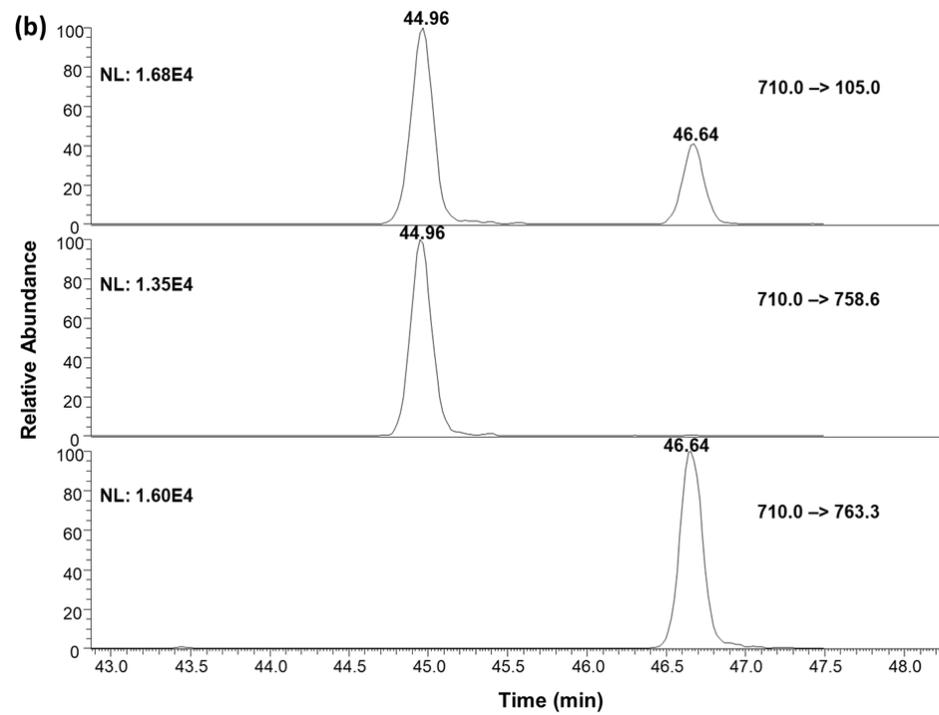
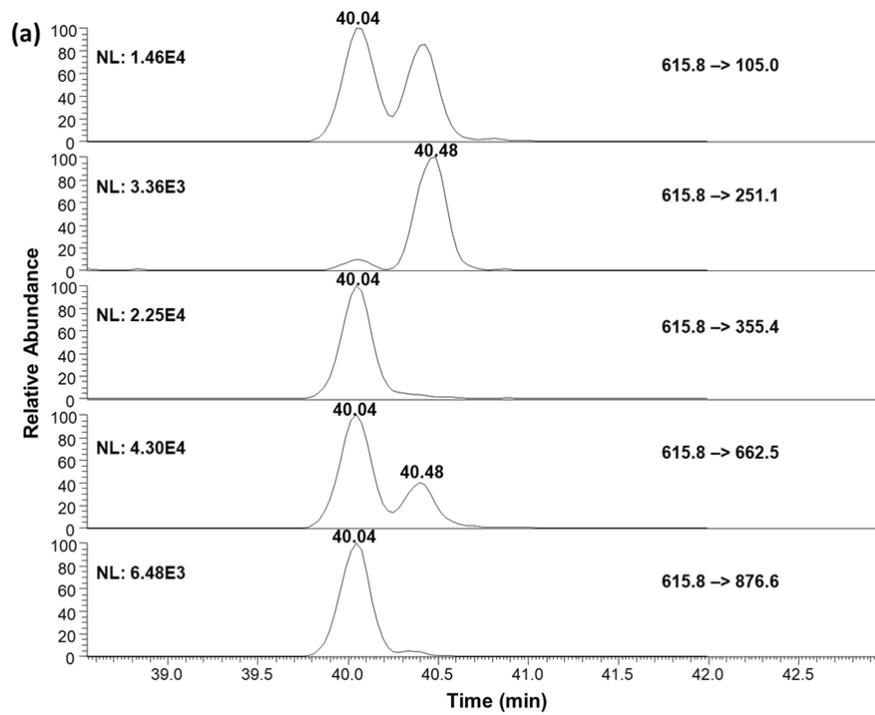
SM.1: *Experimental procedure used for the optimization of the analysis of cytochrome C and human hemoglobin by mass spectrometry in full scan, SIM, product ion and MRM modes.*

For scan experiments, a m/z range [260-1000] was used for the analysis of cytochrome C peptides and a m/z range [270-1500] was used for those of hemoglobin. For the analysis in SIM mode of the peptides with a potential alkylation site, the skimmer offset was set to 1 V and the tension value applied on the tube lens was optimized for each peptide by carrying out successively 11 analyses in SIM mode and by modifying the tension applied on the tube lens (values ranging from 50 to 200 V) for the different ions at each analysis. Regarding the alkylated peptides, the optimization of the ionic transfer for each precursor ion was also carried out in MRM mode by 17 successively modifications of the tension applied on the tube lens (values ranging from 70 to 190 V).

In order to determine the transitions useful for the MRM analysis, several analyses were performed in Product Ion mode, for both alkylated and non-alkylated peptides. To perform these fragmentation studies, the total length of the analysis was segmented according to the retention times of the targeted peptides and different collision voltages, ranging from 5 to 35 V, were tested, while the mass range for the detection of the product ions was adapted to each peptide analyzed. Each analysis performed at a given collision voltage was carried out only once. The most abundant product ions were then used for the MRM analysis, using the optimized collision voltage values, and a scan time of 0.35 s, the other parameters being identical to those used for the full scan experiments. The MRM analyses were performed simultaneously for peptides with a potential site of adduction and for the adducted peptides, and were fractioned into 9 time segments defined based on the retention times observed with a detection in *full scan* or SIM modes (see Table 1 and Table S1), in order to maximize the sensitivity. All the analyses performed in full scan, SIM and MRM modes were carried out in triplicate. The limit of quantification (LOQ) was estimated for a Signal/Noise (S/N) ratio of 10.

Table S1. Mass parameters used for the analysis in MRM mode of the tryptic digest of hemoglobin, targeting the peptides with a potential site of adduction. The potential sites of adduction are indicated in bold in the peptides sequence.

Time segment	Potentially alkylated peptide	Sequence	Precursor ion	Charge	Retention time (min)	Tube lens	Product ions	Collision voltage
0-23.5 min	α -T1	VLSPADK (1-7)	m/z 365.2	2 ⁺	22.50	70 V	m/z 517.2 (y_5^+)	15 V
							m/z 630.3 (y_6^+)	15 V
23.5-30 min	β -T1	VHLTPEEK (1-8)	m/z 318.2	3 ⁺	25.25	60 V	m/z 147.2 (y_1^+)	10 V
							m/z 502.2 (y_4^+)	20 V
30-37 min	α -T4	VGAHAGEYGAEALER (17-31)	m/z 765.6	2 ⁺	35.38	110 V	m/z 488.3 (y_4^+)	20 V
							m/z 651.9 (y_{12}^{2+})	25 V
37-42 min	β -T11	LHVDPENFR (96-104)	m/z 564.0	2 ⁺	38.81	90 V	m/z 507.4 (y_8^{2+})	25 V
							m/z 662.3 (y_5^+)	15 V
	β -T3	VNVDEVGGEALGR (18-30)	m/z 657.8	2 ⁺	41.13	90 V	m/z 659.4 (y_7^+)	20 V
47.5-52 min	α -T6	TYFPHFDLSHGSAQVK (41-56)	m/z 917.8	2 ⁺	48.18	130 V	m/z 1002.6 (y_{10}^+)	25 V
							m/z 663.1 (y_{12}^{2+})	25 V
52-61 min	β -T9	VLGAFSDGLAHLNLIK (67-82)	m/z 558.0	3 ⁺	56.69	70 V	m/z 711.8 (y_{13}^{2+})	30 V
							m/z 729.5 (y_{14}^{2+})	15 V
	β -T5	FFESFGDLSTPDAVMGNPK (41-59)	m/z 1030.0	2 ⁺	59.64	150 V	m/z 810.4 (y_7^+)	15 V
63.8-99 min	α -T9	VADALTNVAHVDDMPNALSALSD LHAHK (62-90)	m/z 749.9	4 ⁺	64.52	130 V	m/z 883.0 (y_{17}^{2+})	25 V
							m/z 928.5 (y_9^+)	25 V
							m/z 943.2 (y_{27}^{3+})	15 V
							m/z 1078.7 (y_{10}^+)	15 V



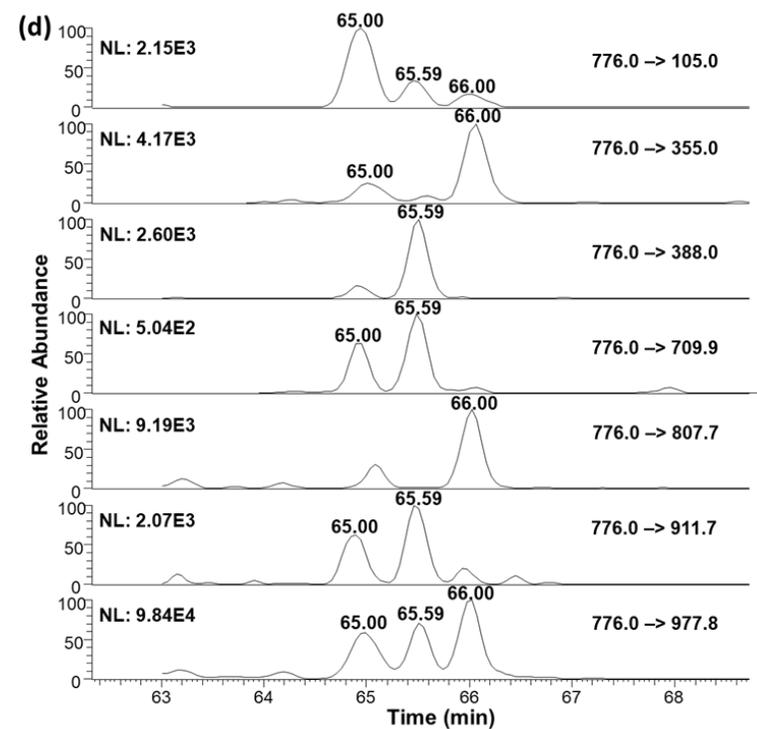
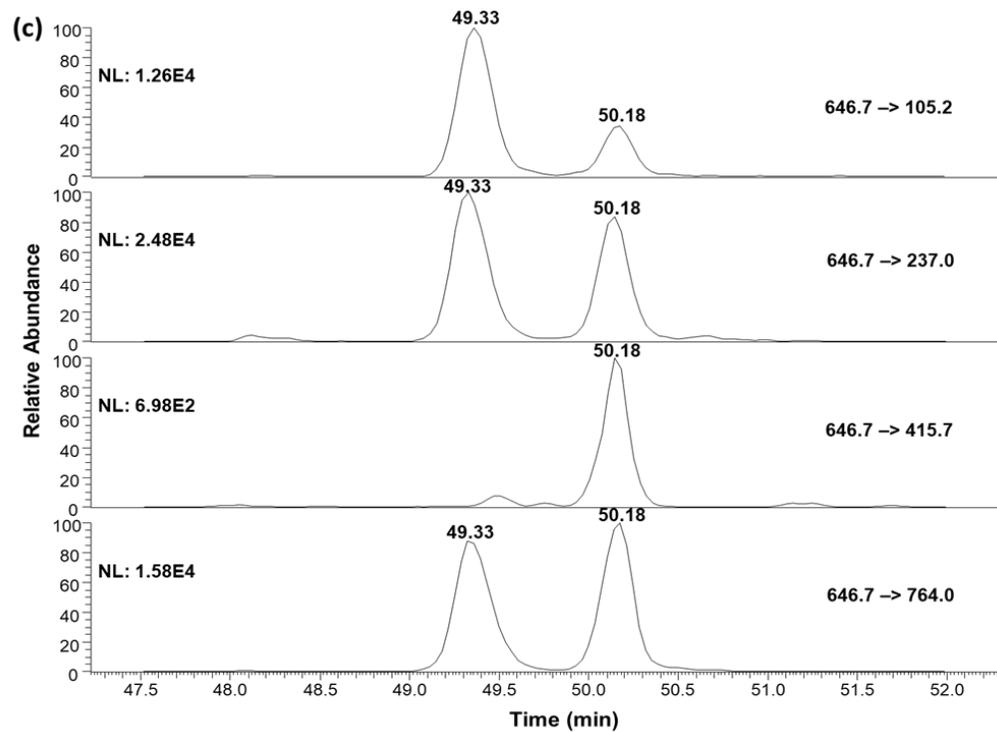
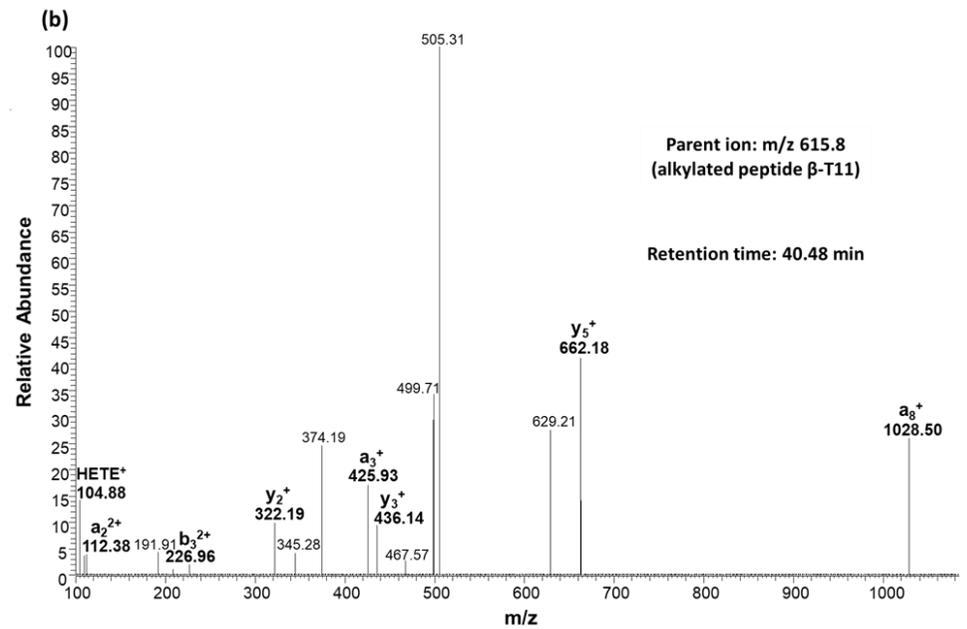
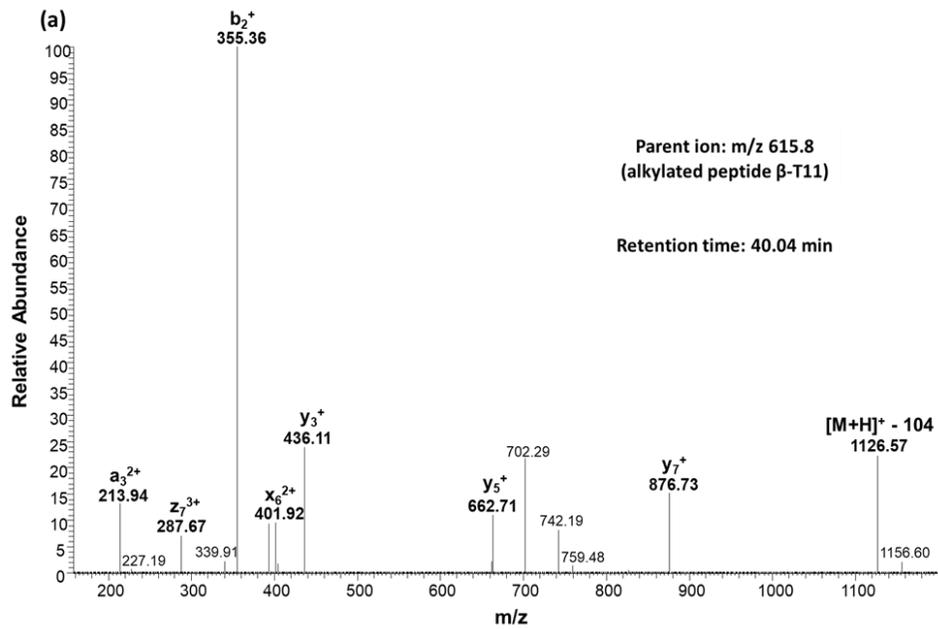
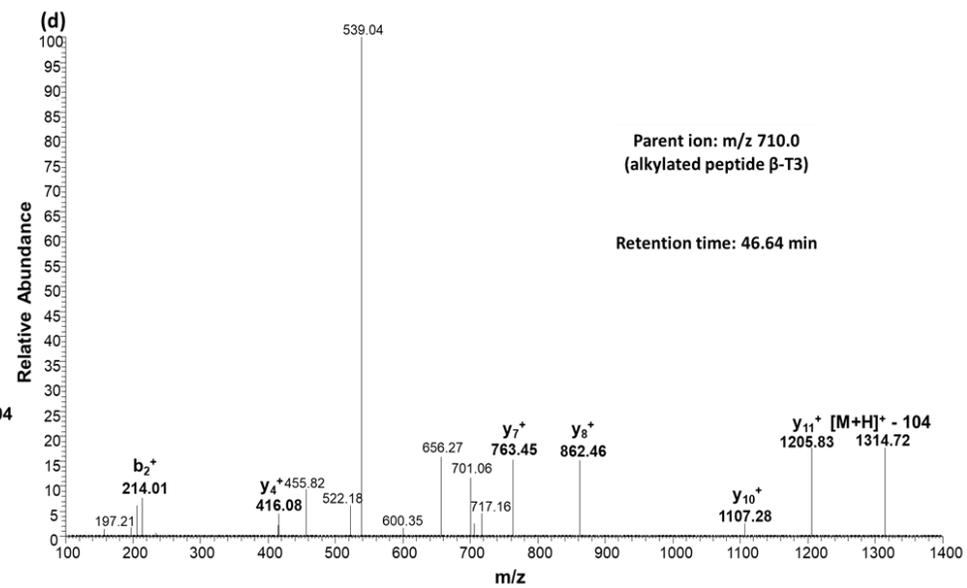
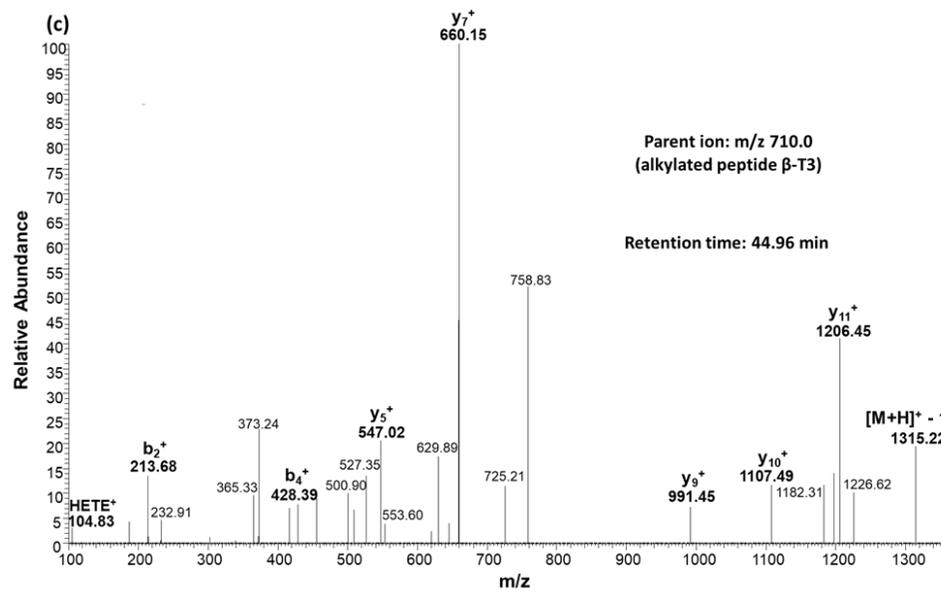
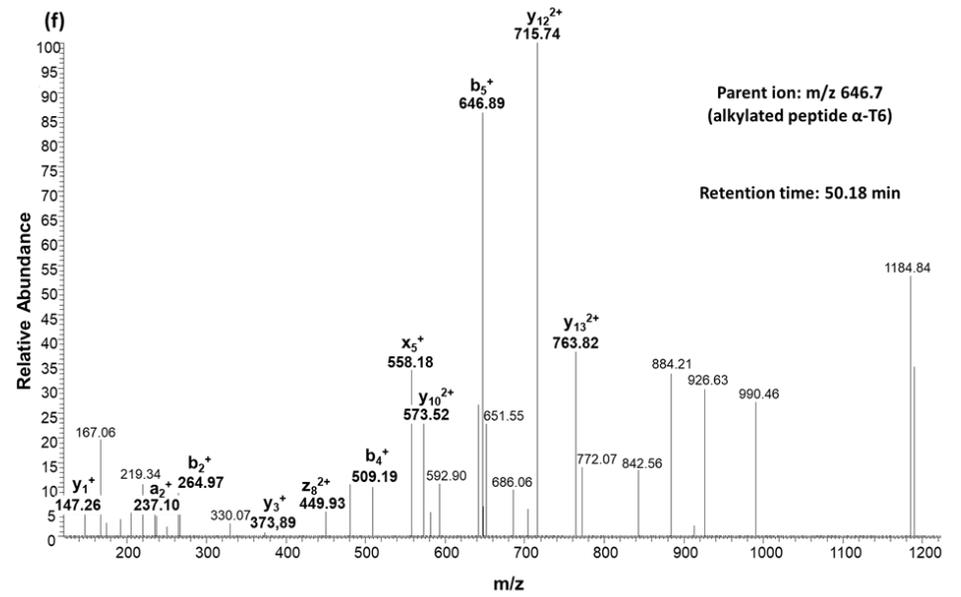
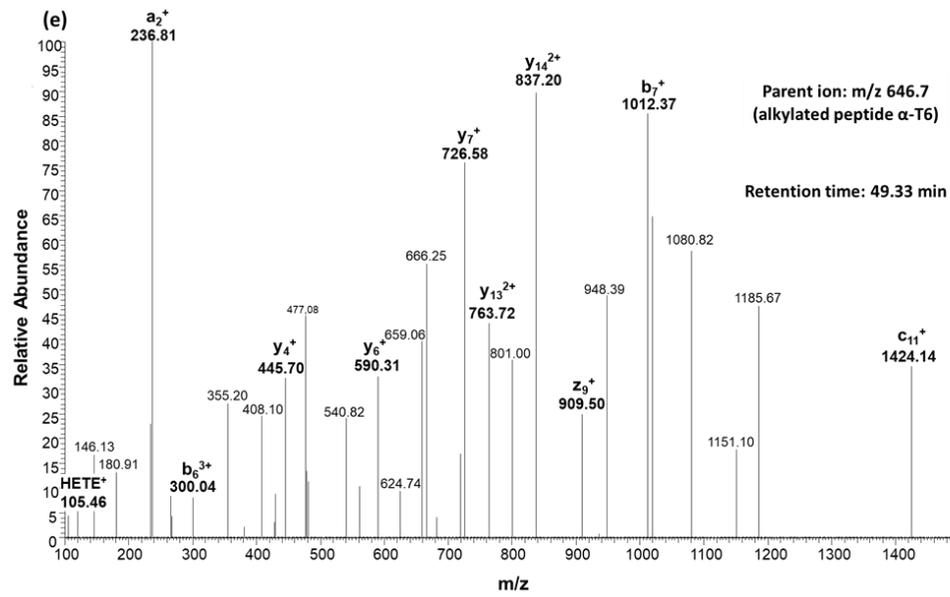


Figure S1. Chromatograms obtained for the MRM transitions of the alkylated peptides β -T11 (a), β -T3 (b), α -T6 (c) and α -T9 (d) resulting from the analysis of the tryptic digest of human hemoglobin at $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ incubated with sulfur mustard at $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.







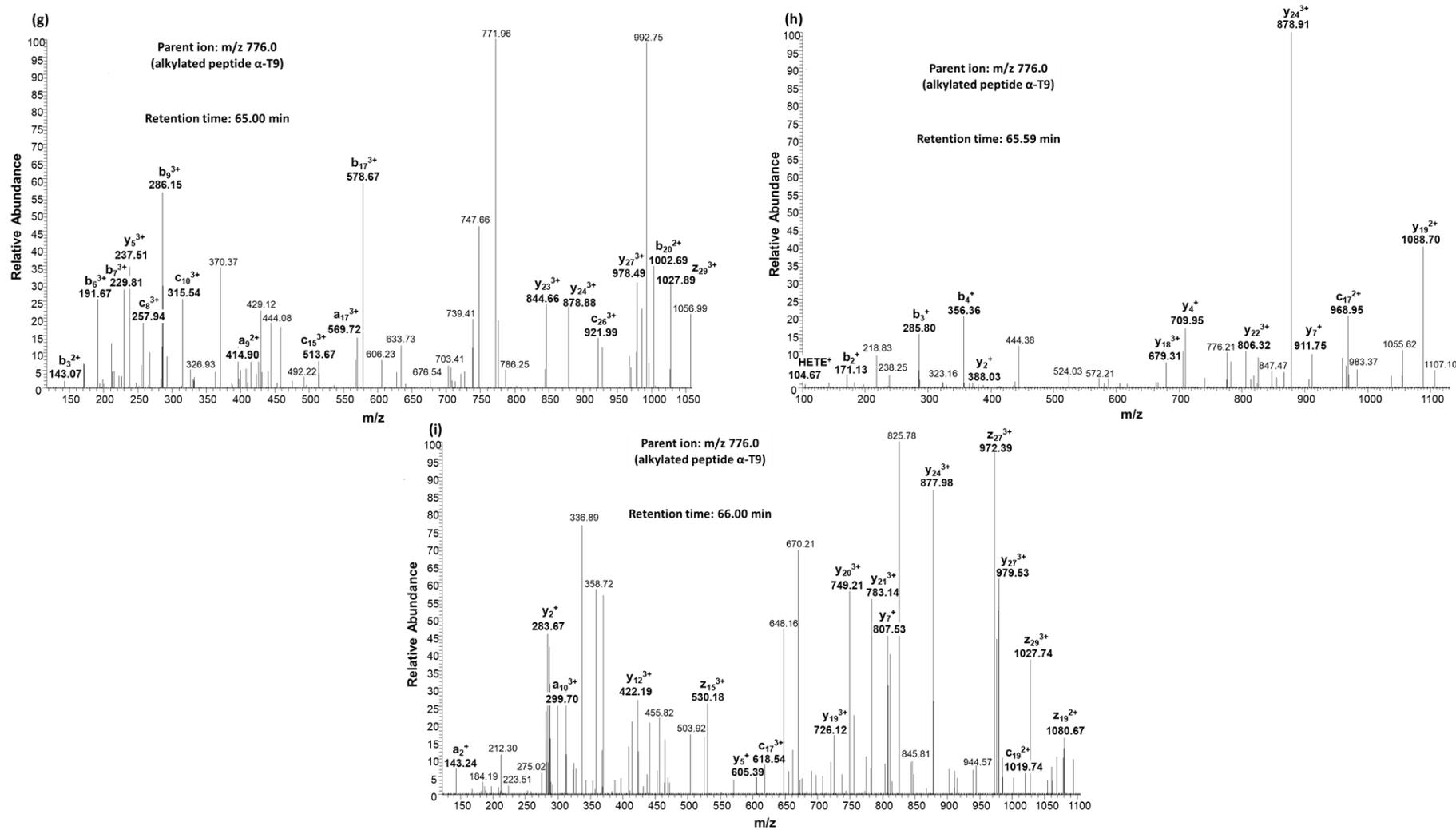


Figure S2. Fragmentation spectra obtained in Product Ion mode (collision voltage 25 V) for the alkylated peptides β -T11 (adduction on β -Val⁹⁷ (a) and on β -His⁹⁸ (b)), β -T3 (adduction on β -Glu²² (c) and on β -Glu²⁶ (d)), α -T6 (adduction on α -His⁴⁵ (e) and on α -His⁵⁰ (f)) and α -T9 (adduction on α -His⁸⁷ (g), on α -His⁸⁹ (h) and on α -His⁷² (i)).

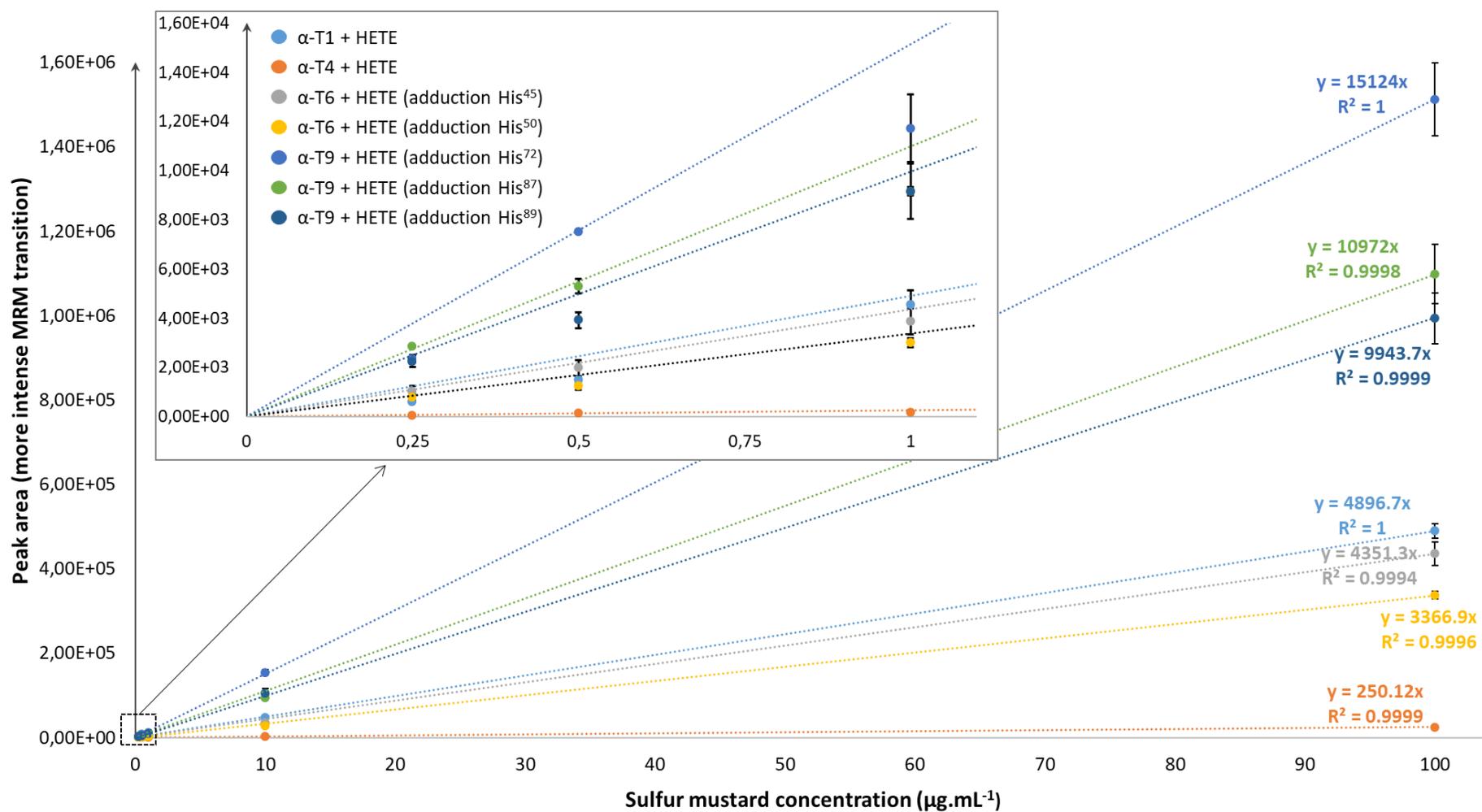


Figure S3. Evolution of the peak area obtained for the alkylated peptides of globin α during the MRM analysis of the tryptic digest of human hemoglobin at 50 mg.mL⁻¹ vs incubation concentration of sulfur mustard (250 ng.mL⁻¹, 500 ng.mL⁻¹, 1 µg.mL⁻¹, 10 µg.mL⁻¹ and 100 µg.mL⁻¹). n=3 (analysis repeated three times for each digest).

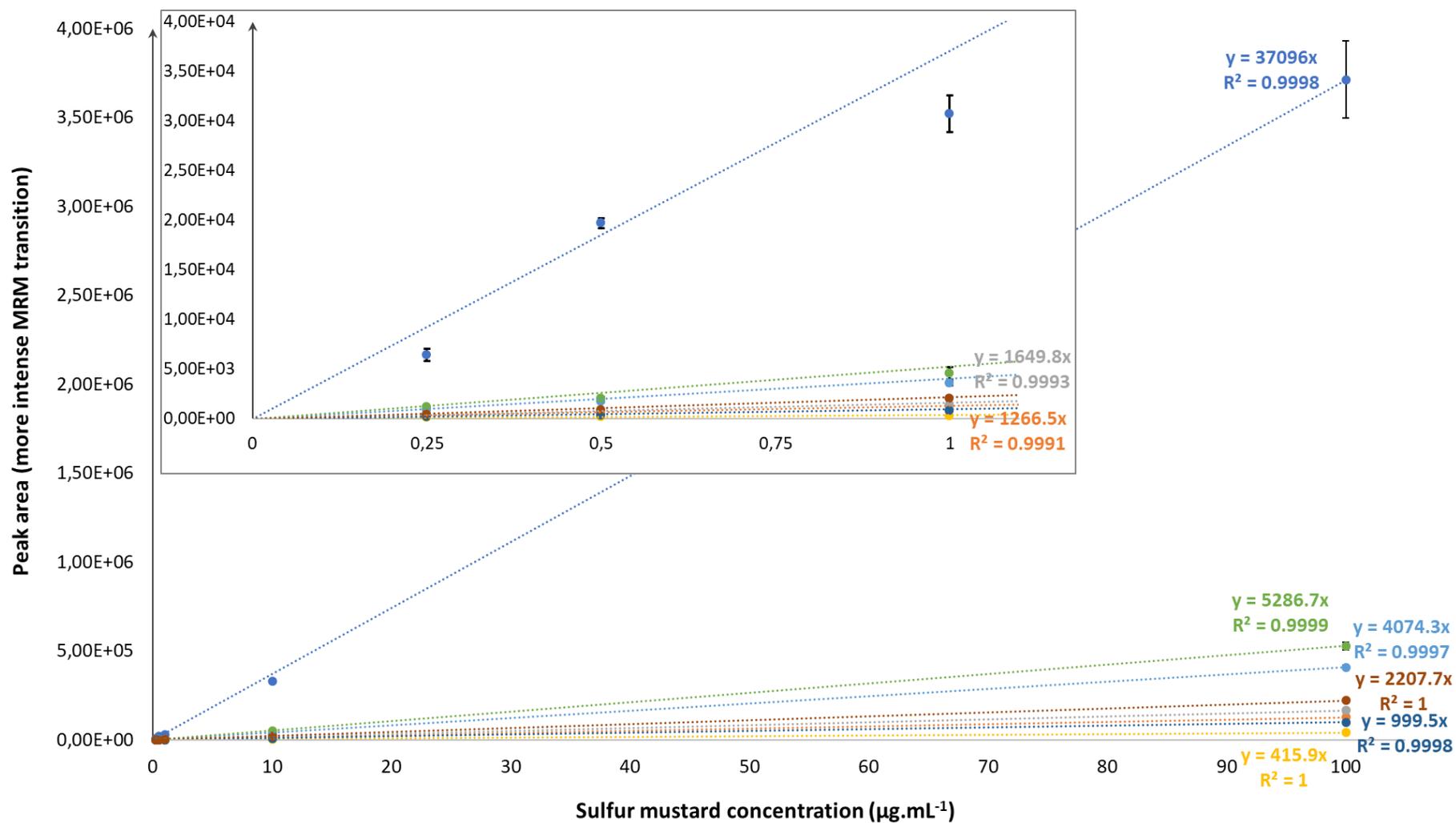


Figure S4. Evolution of the peak area obtained for the alkylated peptides of globin β during the MRM analysis of the tryptic digest of human hemoglobin at 50 mg.mL^{-1} vs incubation concentration of sulfur mustard (250 ng.mL^{-1} , 500 ng.mL^{-1} , $1 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, $10 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ and $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$). $n=3$ (analysis repeated three times for each digest).

ANNEXE 2 : Supplementary materials for article 2

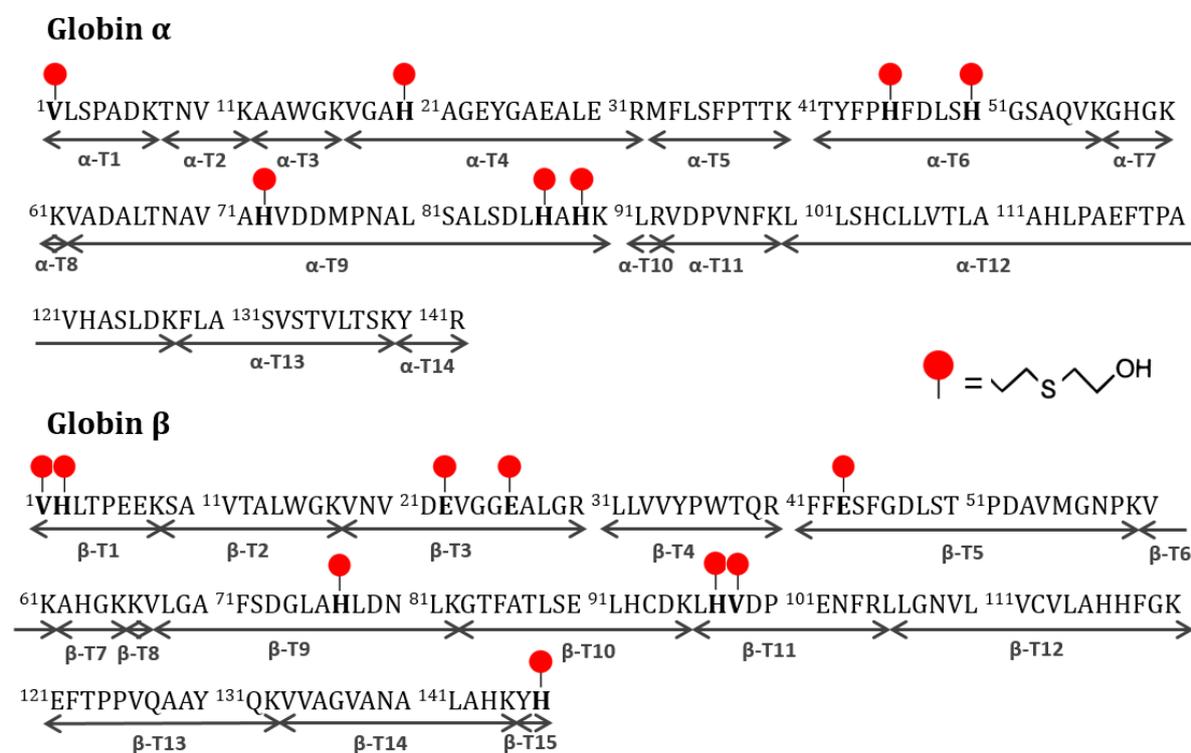


Figure S1. Localization of the alkylation sites (red circles) of human hemoglobin by sulfur mustard (HD) identified LC-ESI⁺-MS/MS analysis of tryptic digests [12, 110, 131].

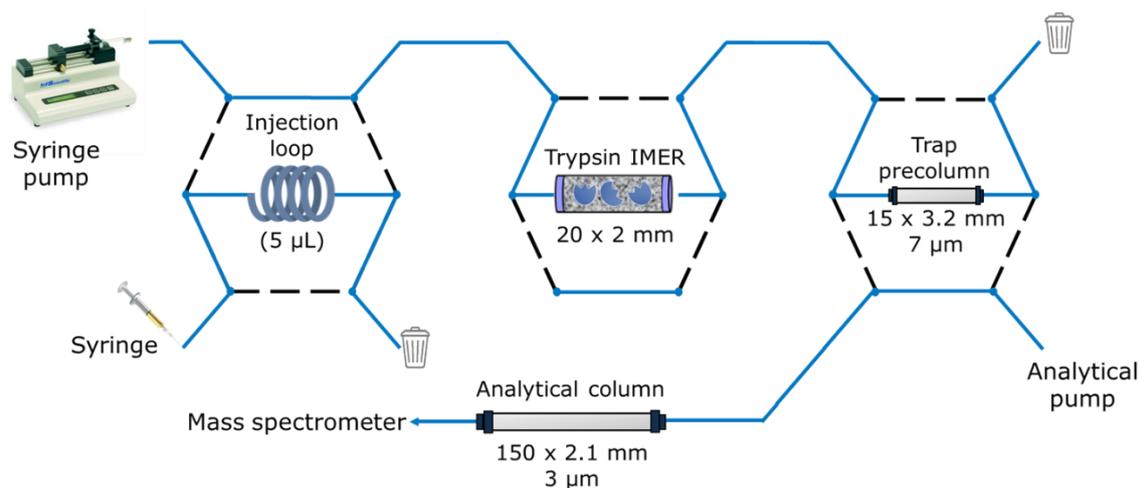


Figure S2. Experimental set-up used for the on-line digestion of hemoglobin on the trypsin IMER and LC-MS/MS analysis of the resulting peptides.

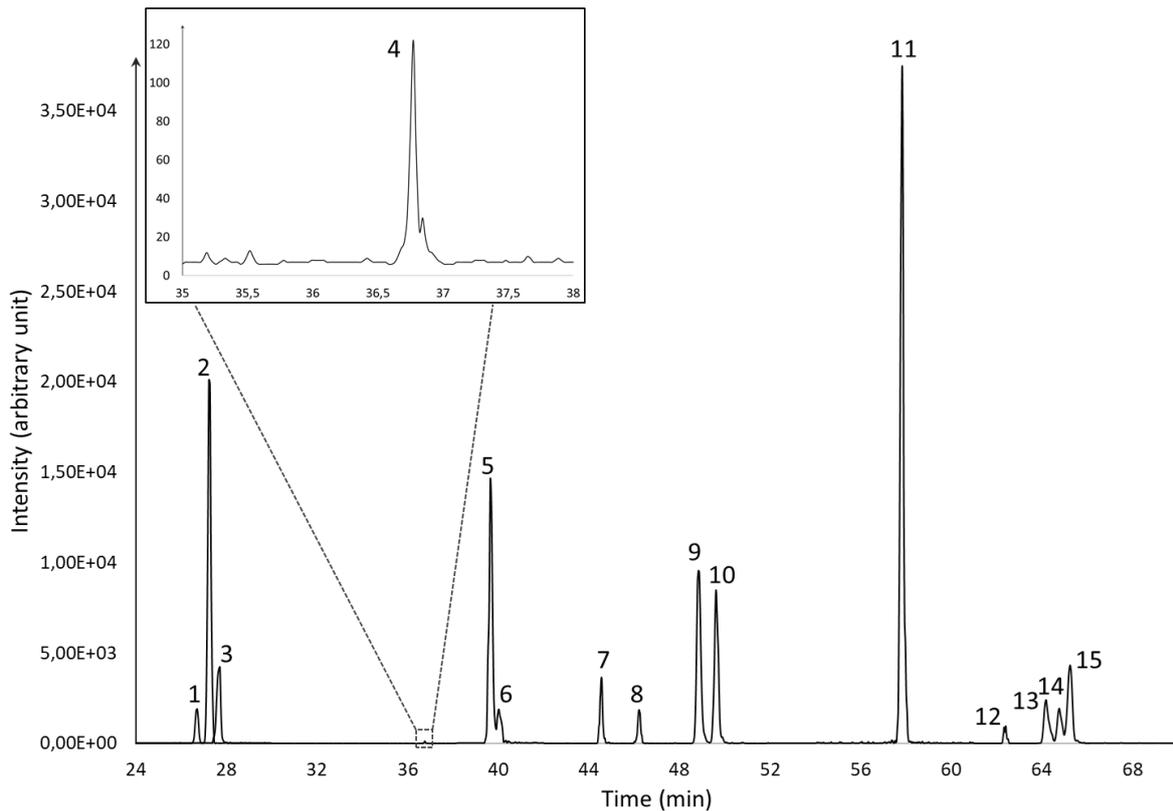


Figure S3. Superposition of MRM chromatograms obtained for the alkylated peptides resulting from the tryptic digestion on IMER 1 (30 min, 25 min with a transfer volume of 40 μL) of hemoglobin incubated *in vitro* with sulfur mustard at 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in pure water. 1: $\alpha\text{-T1} + \text{HETE}$ (adduction site $\alpha\text{-Val}^1$); 2: $\beta\text{-T1} + \text{HETE}$ (adduction site $\beta\text{-His}^2$); 3: $\beta\text{-T1} + \text{HETE}$ (adduction site $\beta\text{-Val}^1$); $\alpha\text{-T4} + \text{HETE}$ (adduction site $\alpha\text{-His}^{20}$); 5: $\beta\text{-T11} + \text{HETE}$ (adduction site $\beta\text{-His}^{97}$); 6: $\beta\text{-T11} + \text{HETE}$ (adduction site $\beta\text{-Val}^{98}$); 7: $\beta\text{-T3} + \text{HETE}$ (adduction site $\beta\text{-Glu}^{22}$); 8: $\beta\text{-T3} + \text{HETE}$ (adduction site $\beta\text{-Glu}^{26}$); 9: $\alpha\text{-T6} + \text{HETE}$ (adduction site $\alpha\text{-His}^{45}$); 10: $\alpha\text{-T6} + \text{HETE}$ (adduction site $\alpha\text{-His}^{50}$); 11: $\beta\text{-T9} + \text{HETE}$ (adduction site $\beta\text{-His}^{77}$); 12: $\beta\text{-T5} + \text{HETE}$ (adduction site $\beta\text{-Glu}^{43}$); 13: $\alpha\text{-T9} + \text{HETE}$ (adduction site $\alpha\text{-His}^{87}$); 14: $\alpha\text{-T9} + \text{HETE}$ (adduction site $\alpha\text{-His}^{89}$); 15: $\alpha\text{-T9} + \text{HETE}$ (adduction site $\alpha\text{-His}^{72}$).

Table S1. Mass parameters used for the analysis in MRM mode of the tryptic digest of hemoglobin, targeting the peptides with a potential site of adduction. The potential sites of adduction are indicated in bold in the peptide sequence.

Time segment	Alkylable peptide	Sequence	Precursor ion	Charge	Tube lens	Product ions	Collision voltage
0-23.5 min	α -T1	VLSPADK (1-7)	<i>m/z</i> 365.2	2 ⁺	70 V	<i>m/z</i> 517.2 (y_5^+) <i>m/z</i> 630.3 (y_6^+)	15 V 15 V
23.5-30 min	β -T1	VHLTPEEK (1-8)	<i>m/z</i> 318.2	3 ⁺	60 V	<i>m/z</i> 147.2 (y_1^+) <i>m/z</i> 502.2 (y_4^+)	10 V 20 V
30-37 min	α -T4	VGAHAGEYGAEALER (17-31)	<i>m/z</i> 765.6	2 ⁺	110 V	<i>m/z</i> 488.3 (y_4^+) <i>m/z</i> 651.9 (y_{12}^{2+})	20 V 25 V
37-39.7 min	β -T11	LHVDPENFR (96-104)	<i>m/z</i> 564.0	2 ⁺	90 V	<i>m/z</i> 507.4 (y_8^{2+}) <i>m/z</i> 662.3 (y_5^+)	25 V 15 V
39.7-43 min	β -T3	VNVDEVGGEALGR (18-30)	<i>m/z</i> 657.8	2 ⁺	90 V	<i>m/z</i> 659.4 (y_7^+) <i>m/z</i> 1002.6 (y_{10}^+)	20 V 25 V
43-50 min	α -T6	TYFPHFDLSHGSAQVK (41-56)	<i>m/z</i> 917.8	2 ⁺	130 V	<i>m/z</i> 663.1 (y_{12}^{2+}) <i>m/z</i> 711.8 (y_{13}^{2+})	25 V 30 V
50-57.5 min	β -T9	VLGAFSDGLAHLNLIK (67-82)	<i>m/z</i> 558.0	3 ⁺	70 V	<i>m/z</i> 729.5 (y_{14}^{2+}) <i>m/z</i> 810.4 (y_7^+)	15 V 15 V
57.5-61 min	β -T5	FFESFGDLSTPDAVMGNPK (41-59)	<i>m/z</i> 1030.0	2 ⁺	150 V	<i>m/z</i> 883.0 (y_{17}^{2+}) <i>m/z</i> 928.5 (y_9^+)	25 V 25 V
61-99 min	α -T9	VADALTNVAH V DDMPNALSALS D LHAH K (62-90)	<i>m/z</i> 749.9	4 ⁺	130 V	<i>m/z</i> 943.2 (y_{27}^{3+}) <i>m/z</i> 1078.7 (y_{10}^+)	15 V 15 V

Table S2. Comparison of the RSD of peak areas obtained in MRM mode for the alkylable peptides resulting from the tryptic digestion of non-alkylated human hemoglobin (5 µg) in solution or on IMERs (3 independent digestions performed in-solution, on a given IMER or one digestion on each IMER, n=3). The potential adduction sites of the peptides are in bold in the sequences. In the last column are indicated the ratios between the mean area obtained for the digestion on the three IMERs and the mean area resulting from three independent in-solution digestions.

Alkylable peptide	MRM transitions	In-solution digestion	RSD _{Area} (n=3)			Digestion on the three IMERs	(Area on IMER/area in solution) ratio (RSD)
			Digestion on IMER 1	Digestion on IMER 2	Digestion on IMER 3		
α-T1	365.2 -> 517.2	14.7%	8.7%	5.1%	6.6%	6.2%	0.86 (20.8%)
VLSPADK (1-7)	365.2 -> 630.3	14.3%	8.6%	4.6%	6.3%	4.7%	0.84 (19.0%)
α-T4	765.6 -> 488.3	8.5%	1.8%	6.0%	5.3%	1.0%	0.39 (9.5%)
VGAHAGEYGAEALER (17-31)	765.6 -> 651.9	8.0%	4.4%	5.5%	5.0%	2.7%	0.39 (10.6%)
α-T6	917.8 -> 663.1	8.9%	7.2%	10.0%	5.0%	3.2%	0.51 (12.2%)
TYFPHFDSLHGS AQVK (41-56)	917.8 -> 711.8	7.3%	6.1%	12.7%	3.6%	4.8%	0.50 (12.1%)
α-T9	749.9 -> 943.2	11.3%	8.0%	3.9%	11.4%	7.3%	0.37 (18.6%)
VADALTNAVAHVDDMPNALSALSDLHAHK (62-90)	749.9 -> 1078.7	12.9%	7.1%	0.6%	9.4%	5.1%	0.36 (18.0%)
β-T1	318.2 -> 147.2	22.1%	8.8%	7.2%	8.7%	1.9%	2.90 (24.0%)
VHLTPEEK (1-8)	318.2 -> 502.2	27.7%	12.3%	7.8%	9.9%	2.5%	3.14 (30.2%)
β-T3	657.8 -> 659.4	7.8%	1.7%	6.1%	2.6%	2.0%	0.58 (9.8%)
VNVDEVGGEALGR (18-30)	657.8 -> 1002.6	8.4%	3.2%	4.7%	3.5%	2.3%	0.58 (10.6%)
β-T5	1030.0 -> 883.0	5.4%	0.1%	7.5%	3.2%	2.8%	0.51 (8.2%)
FFESFGDLSTPDAVMGNPK (41-59)	1030.0 -> 928.5	5.9%	0.3%	4.7%	1.2%	5.2%	0.51 (11.0%)
β-T9	558.0 -> 729.5	18.6%	10.7%	5.0%	8.5%	5.3%	0.60 (23.8%)
VLGAFSDGLAHL DNLK (67-82)	558.0 -> 810.4	17.1%	7.8%	3.2%	7.7%	3.3%	0.60 (20.3%)
β-T11	564.0 -> 507.4	13.7%	5.7%	3.8%	3.0%	0.9%	0.68 (14.5%)
LHVDPENFR (96-104)	564.0 -> 662.3	14.4%	3.8%	3.9%	4.4%	0.5%	0.67 (14.9%)

Table S3. Mass parameters and transitions used for the analysis in MRM mode of the alkylated peptides resulting from the digestion on trypsin IMERs of human hemoglobin (5 µg) incubated in vitro with sulfur mustard, targeting the alkylated peptides. The HD adduction sites are indicated in bold in the peptide sequences.

Time segment	Alkylated peptide	Precursor ion	Tube lens	Product ions	Corresponding peptide fragment	Collision voltage
23.5-30 min	β-T1 VHLTPEEK (1-8) + HETE	<i>m/z</i> 529.0 (2 ⁺)	90 V	<i>m/z</i> 105.0	HETE ⁺	25 V
				<i>m/z</i> 340.7	VH (b ₂ ⁺) + HETE	25 V
				<i>m/z</i> 502.1	PEEK (y ₄ ⁺)	25 V
	β-T1 VHLTPEEK (1-8) + HETE	<i>m/z</i> 529.0 (2 ⁺)	90 V	<i>m/z</i> 105.0	HETE ⁺	25 V
				<i>m/z</i> 176.2	V (a ₁ ⁺) + HETE *	25 V
				<i>m/z</i> 340.7	VH (b ₂ ⁺) + HETE	25 V
α-T1 VLSPADK (1-7) + HETE	<i>m/z</i> 417.2 (2 ⁺)	95 V	<i>m/z</i> 502.1	PEEK (y ₄ ⁺)	25 V	
			<i>m/z</i> 105.3	HETE ⁺	15 V	
30-38.2 min	α-T4 VGAHAGEYGA EALER (17-31) + HETE	<i>m/z</i> 817.4 (2 ⁺)	140 V	<i>m/z</i> 430.4	PADK (y ₄ ⁺)	15 V
				<i>m/z</i> 213.9	(HETE)His immonium ⁺	25 V
38.2-42 min	β-T11 LHVDPENFR (96-104) + HETE	<i>m/z</i> 615.8 (2 ⁺)	115 V	<i>m/z</i> 704.0	HAGEYGA EALER (y ₁₂ ²⁺) + HETE	25 V
				<i>m/z</i> 105.0	HETE ⁺	25 V
				<i>m/z</i> 355.4	LH (b ₂ ⁺) + HETE *	25 V
	β-T11 LHVDPENFR (96-104) + HETE	<i>m/z</i> 615.8 (2 ⁺)	115 V	<i>m/z</i> 662.5	PENFR (y ₅ ⁺)	25 V
				<i>m/z</i> 876.6	VDPENFR (y ₇ ⁺) *	25 V
				<i>m/z</i> 105.0	HETE ⁺	25 V
β-T11 LHVDPENFR (96-104) + HETE	<i>m/z</i> 615.8 (2 ⁺)	115 V	<i>m/z</i> 251.1	LH (b ₂ ⁺) *	25 V	
			<i>m/z</i> 662.5	PENFR (y ₅ ⁺)	25 V	
42-47.5 min	β-T3 VNVDEVGG EALGR (18-30) + HETE	<i>m/z</i> 710.0 (2 ⁺)	100 V	<i>m/z</i> 105.1	HETE ⁺	20 V
				<i>m/z</i> 758.6	VGGEALGR (y ₈ ⁺) *	25 V
	β-T3 VNVDEVGG EALGR (18-30) + HETE	<i>m/z</i> 710.0 (2 ⁺)	100 V	<i>m/z</i> 105.1	HETE ⁺	20 V
47.5-52 min	α-T6 TYFPHFDLSHG SAQVK (41-56) + HETE	<i>m/z</i> 646.7 (3 ⁺)	125 V	<i>m/z</i> 763.3	GGEALGR (y ₇ ⁺) + HETE *	20 V
				<i>m/z</i> 105.2	HETE ⁺	25 V
				<i>m/z</i> 237.0	TY (a ₂ ⁺)	30 V
				<i>m/z</i> 764.0	PHFDLSHG SAQVK (y ₁₃ ²⁺) + HETE	25 V

Time segment (continued)	Alkylated peptide	Precursor ion	Tube lens	Product ions	Corresponding peptide fragment	Collision voltage
47.5-52 min	α -T6 TYFPFDLSHGSAQVK (41-56) + HETE	<i>m/z</i> 646.7 (3 ⁺)	125 V	<i>m/z</i> 105.2	HETE ⁺	25 V
				<i>m/z</i> 237.0	TY (a ₂ ⁺)	30 V
				<i>m/z</i> 415.7	HGSAQVK (y ₇ ²⁺) + HETE *	25 V
				<i>m/z</i> 764.0	PHFDLSHGSAQVK (y ₁₃ ²⁺) + HETE	25 V
52-60 min	β -T9 VLGAFS DGLAHL DNLK (67-82) + HETE	<i>m/z</i> 592.0 (3 ⁺)	90 V	<i>m/z</i> 643.6	SDGLAHL DNLK (y ₁₁ ²⁺) + HETE	20 V
				<i>m/z</i> 781.5	GAFSDGLAHL DNLK (y ₁₄ ²⁺) + HETE	15 V
60-63 min	β -T5 FFESFGDLSTPDAVMGNPK (41-59) + HETE	<i>m/z</i> 1082.2 (2 ⁺)	160 V	<i>m/z</i> 1116.6	STPDAVMGNPK (y ₁₁ ⁺)	20 V
				<i>m/z</i> 1401.6	GDLSTPDAVMGNPK (y ₁₄ ⁺)	30 V
63-99 min	α -T9 VADAL TNAVAHVDDMPNALSALSDLHAHK (62-90) + HETE	<i>m/z</i> 776.0 (4 ⁺)	125 V	<i>m/z</i> 105.0	HETE ⁺	25 V
				<i>m/z</i> 355.0	AHK (y ₃ ⁺)*	25 V
				<i>m/z</i> 709.9	LHAHK (y ₅ ⁺) + HETE *	25 V
				<i>m/z</i> 911.7	SDLHAHK (y ₇ ⁺) + HETE *	25 V
				<i>m/z</i> 977.8	DAL TNAVAHVDDMPNALSALSDLHAHK (y ₂₇ ³⁺) + HETE	20 V
63-99 min	α -T9 VADAL TNAVAHVDDMPNALSALSDLHAHK (62-90) + HETE	<i>m/z</i> 776.0 (4 ⁺)	125 V	<i>m/z</i> 105.0	HETE ⁺	25 V
				<i>m/z</i> 388.0	HK (y ₂ ⁺) + HETE *	25 V
				<i>m/z</i> 709.9	LHAHK (y ₅ ⁺) + HETE *	25 V
				<i>m/z</i> 911.7	SDLHAHK (y ₇ ⁺) + HETE *	25 V
				<i>m/z</i> 977.8	DAL TNAVAHVDDMPNALSALSDLHAHK (y ₂₇ ³⁺) + HETE	20 V
63-99 min	α -T9 VADAL TNAVAHVDDMPNALSALSDLHAHK (62-90) + HETE	<i>m/z</i> 776.0 (4 ⁺)	125 V	<i>m/z</i> 105.0	HETE ⁺	25 V
				<i>m/z</i> 355.0	AHK (y ₃ ⁺)*	25 V
				<i>m/z</i> 807.5	SDLHAHK (y ₇ ⁺)*	25 V
				<i>m/z</i> 977.8	DAL TNAVAHVDDMPNALSALSDLHAHK (y ₂₇ ³⁺) + HETE	20 V

* Fragment allowing the differentiation between the multiple adduction sites of a given peptide.

Table S4. Mean slopes obtained for the evolution of the peak areas of alkylated peptides with the concentration of sulfur mustard after in-solution or IMER digestion of 5 μg of human hemoglobin (3 independent digestions performed in-solution, on a given IMER or on each of the three trypsin IMERs, $n = 3$). The mean slopes obtained for each alkylated peptide on the three IMERs were compared using a one way ANOVA test and the resulting p-values are presented in the table.

Alkylated peptide	Adduction site	MRM transition	Mean slope for IMER 1 (AU.mL. μg^{-1}) (RSD)	Mean slope for IMER 2 (AU.mL. μg^{-1}) (RSD)	Mean slope for IMER 3 (AU.mL. μg^{-1}) (RSD)	p value one way ANOVA test for IMER slope comparison*	Mean slope for digestion on the three IMERs (AU.mL. μg^{-1}) (RSD)	Mean slope for in-solution digestion (AU.mL. μg^{-1}) (RSD)
α -T1 + HETE	α -Val ¹	417.2 -> 105.3	700.0 (8.6%)	500.1 (12.2%)	465.8 (13.4%)	0.56	475.7 (14.0%)	1416.1 (34.3%)
α -T4 + HETE	α -His ²⁰	817.4 -> 704.0	5.7 (6.1%)	12.0 (15.3%)	9.2 (4.2%)	2.47	14.3 (7.9%)	98.2 (22.6%)
α -T6 + HETE	α -His ⁴⁵	646.7 -> 237.0	451.9 (6.1%)	344.7 (19.5%)	316.7 (3.7%)	1.10	529.1 (12.2%)	1407.7 (49.4%)
α -T6 + HETE	α -His ⁵⁰	646.7 -> 237.0	348.4 (5.7%)	304.0 (6.7%)	230.7 (9.2%)	0.82	464.1 (6.7%)	967.0 (53.3%)
α -T9 + HETE	α -His ⁷²	776.0 -> 977.8	857.9 (19.3%)	1106.1 (24.3%)	678.7 (12.3%)	2.89	760.9 (1.0%)	4609.9 (44.3%)
α -T9 + HETE	α -His ⁸⁷	776.0 -> 977.8	567.6 (3.8%)	677.1 (14.3%)	391.4 (24.7%)	2.77	610.8 (3.4%)	3420.7 (41.1%)
α -T9 + HETE	α -His ⁸⁹	776.0 -> 977.8	688.4 (3.7%)	677.4 (0.9%)	453.5 (11.1%)	1.77	661.8 (2.1%)	3248.4 (31.1%)
β -T1 + HETE	β -Val ¹	529.0 -> 105.0	813.6 (10.3%)	541.3 (4.3%)	519.9 (6.9%)	3.04	705.8 (3.4%)	1606.9 (16.9%)
β -T1 + HETE	β -His ²	529.0 -> 105.0	135.2 (2.4%)	83.4 (25.3%)	85.7 (26.0%)	3.40	119.8 (7.3%)	157.0 (5.7%)
β -T3 + HETE	β -Glu ²²	710.0 -> 105.1	241.5 (16.4%)	215.1 (13.7%)	197.4 (13.4%)	1.41	199.3 (4.7%)	917.8 (24.6%)
β -T3 + HETE	β -Glu ²⁶	710.0 -> 763.3	168.3 (14.0%)	153.5 (16.0%)	116.9 (24.3%)	1.64	142.9 (2.8%)	1115.6 (19.6%)
β -T5 + HETE	β -Glu ⁴³	1082.2 -> 1116.6	86.5 (25.5%)	117.7 (17.8%)	113.4 (14.3%)	1.44	117.7 (3.5%)	388.9 (14.8%)
β -T9 + HETE	β -His ⁷⁷	592.0 -> 781.5	4485.9 (13.4%)	3113.5 (29.3%)	2201.9 (14.1%)	4.12	3148.0 (7.6%)	10876.0 (38.6%)
β -T11 + HETE	β -His ⁹⁷	615.8 -> 662.5	847.6 (4.2%)	598.8 (18.0%)	500.8 (12.8%)	4.00	669.3 (3.3%)	1361.4 (33.5%)
β -T11 + HETE	β -Val ⁹⁸	615.8 -> 662.5	209.5 (21.7%)	137.4 (6.0%)	197.2 (22.6%)	3.15	256.2 (20.9%)	462.4 (19.6%)

*reference F value = 5.14 for significant difference of the slopes.

ANNEXE 3 : Supplementary materials for article 3

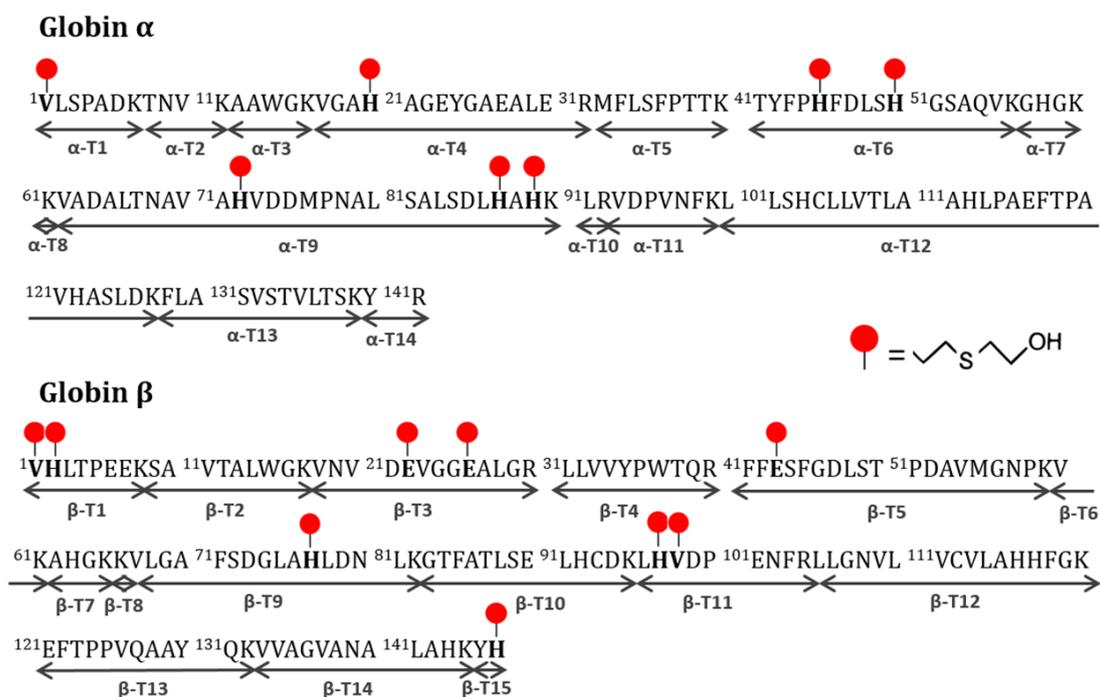


Figure S1. Localization of the alkylation sites (red circles) of human hemoglobin by sulfur mustard (HD) identified LC-ESI⁺-MS/MS analysis of tryptic digests [12, 110, 131].

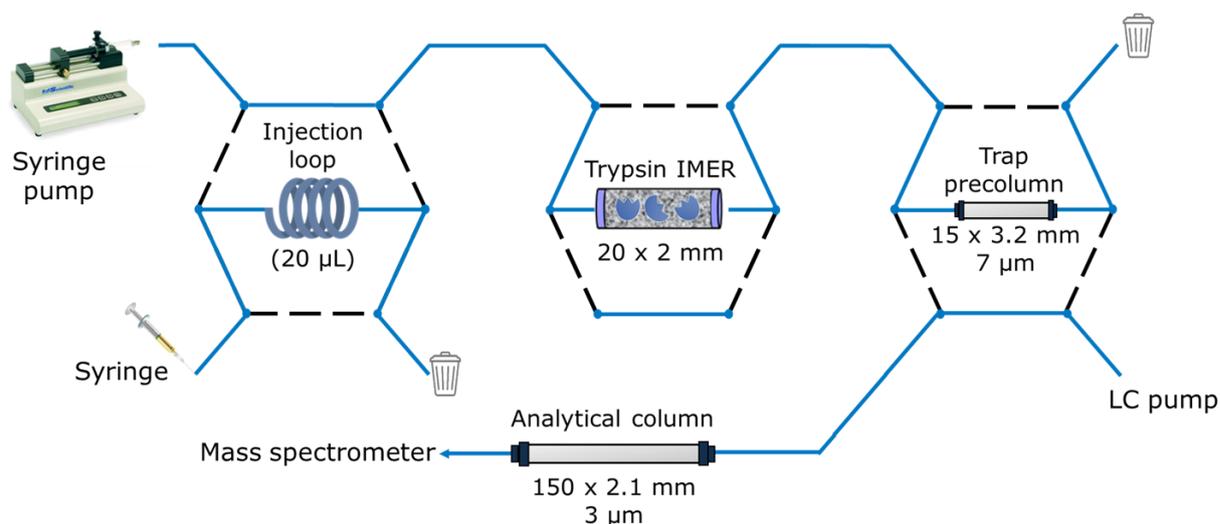


Figure S2. Experimental set-up used for the on-line digestion on the trypsin IMER of alkylated hemoglobin and LC-MS/MS analysis of the resulting peptides.

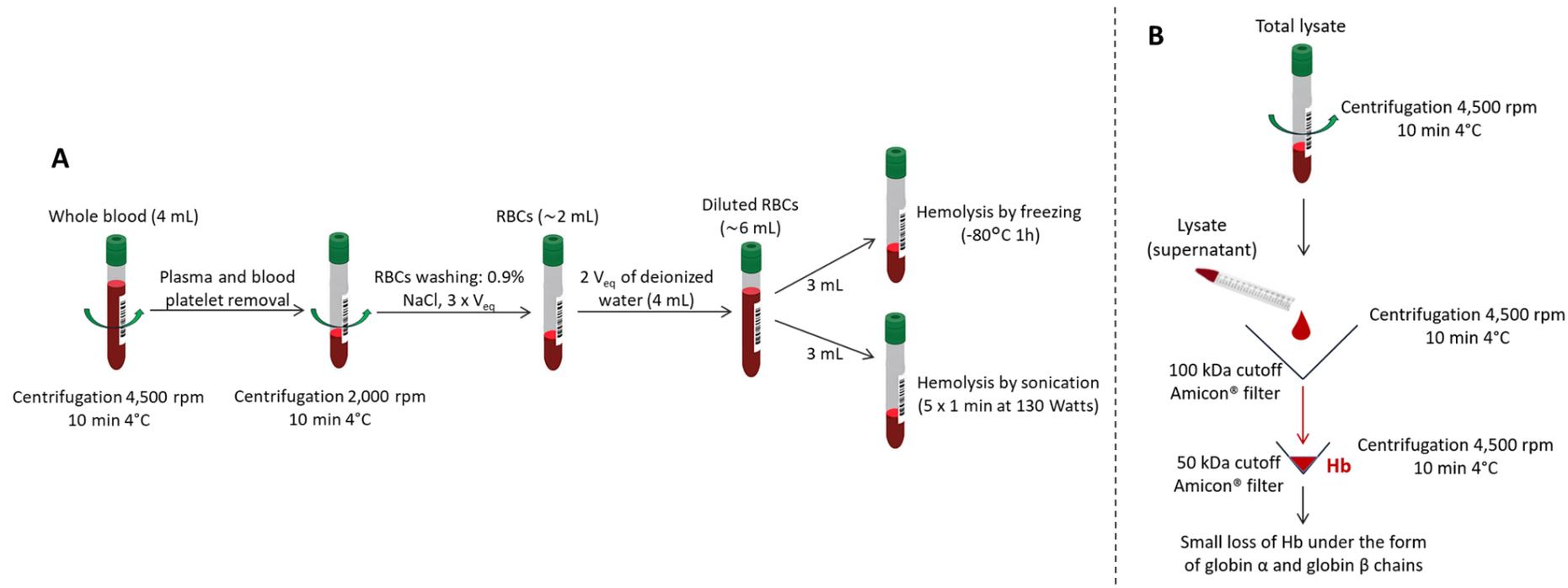


Figure S3. Schematic representation of the isolation of RBCs from whole blood and their hemolysis by freezing at -80°C during 1 hour or by sonication (A) followed by the lysate filtration and purification of the extracted hemoglobin by ultrafiltration on 100 and 50 kDa cutoff Amicon® filters (B). V_{eq} : equivalent volume. See assay 1 in Table 1 for experimental values of extracted Hb obtained with both hemolysis methods.

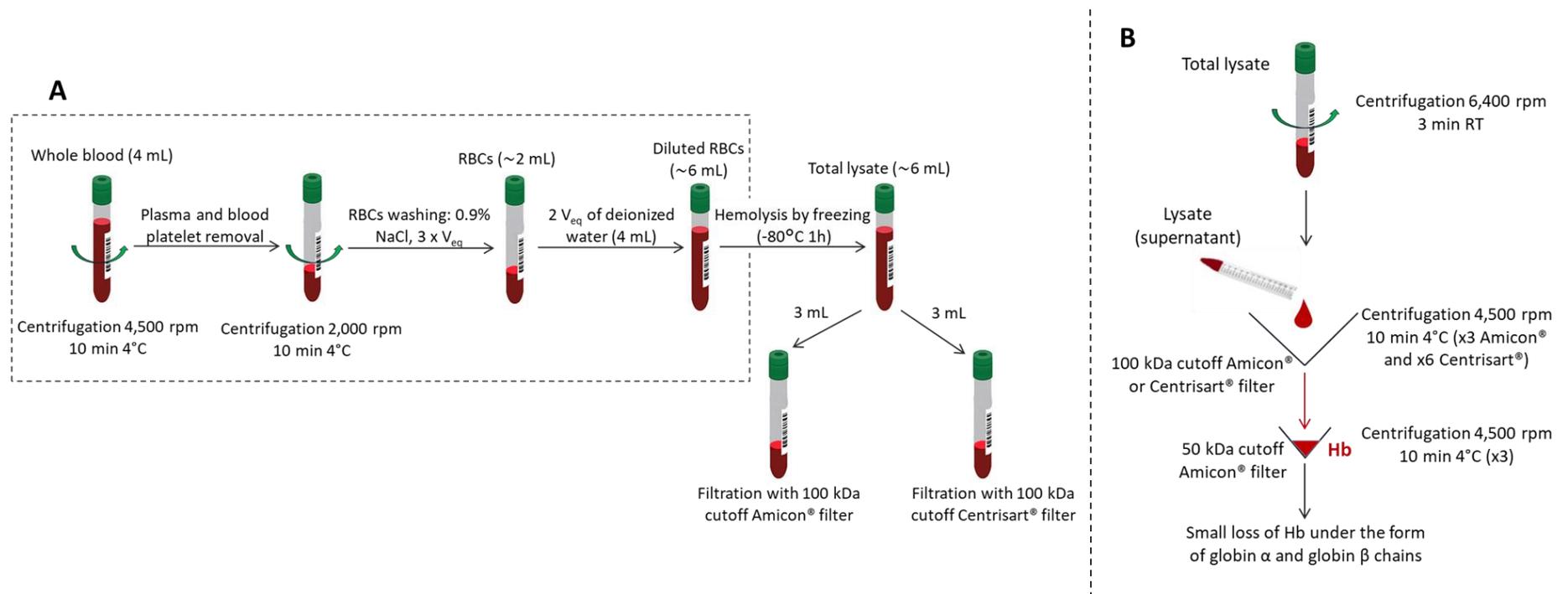


Figure S4. Schematic representation of the isolation of RBCs from whole blood and their hemolysis by freezing at -80°C during 1 hour (A) followed of the lysate filtration and purification of the extracted hemoglobin using 100 kDa cutoff Amicon® or Centriment® filters (B). The steps identical to those previously described for the hemolysis procedure are framed. V_{eq} : equivalent volume, RT: room temperature. See assay 2 in Table 1 for experimental values of extracted Hb obtained with both 100 kDa cutoff filters.

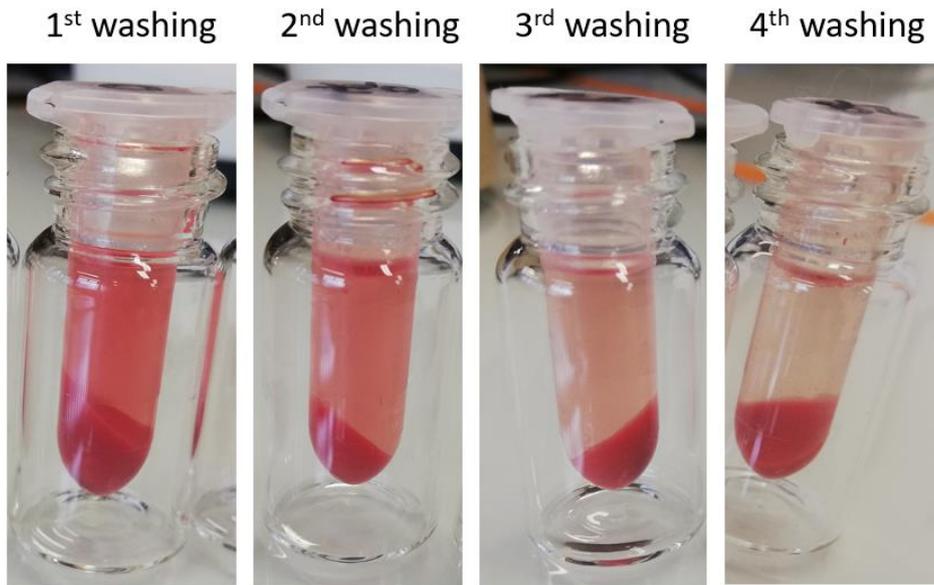


Figure S5. Washing with pure water by centrifugation at 6,400 rpm of the cell debris and the non-lysed RBCs resulting from two cycles of lysis of the RBCs by freezing at -80°C during 1h.

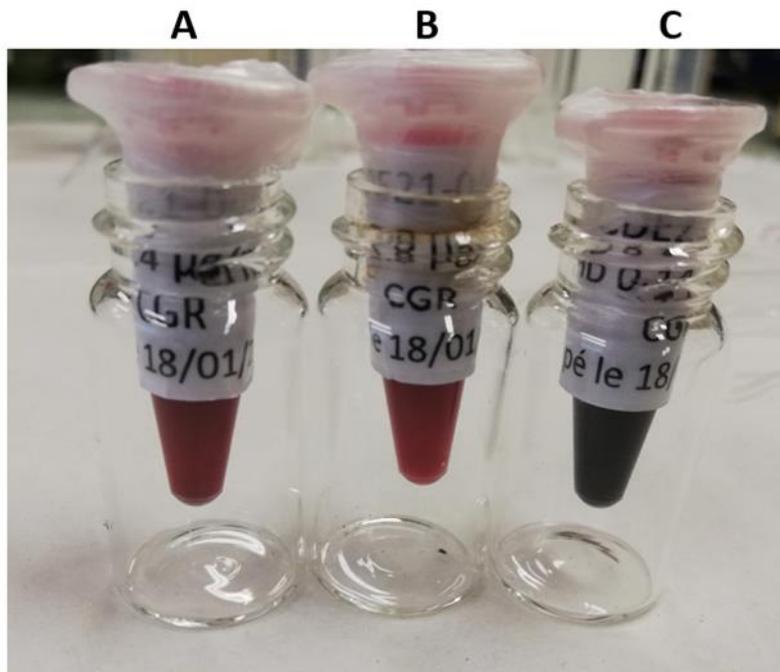
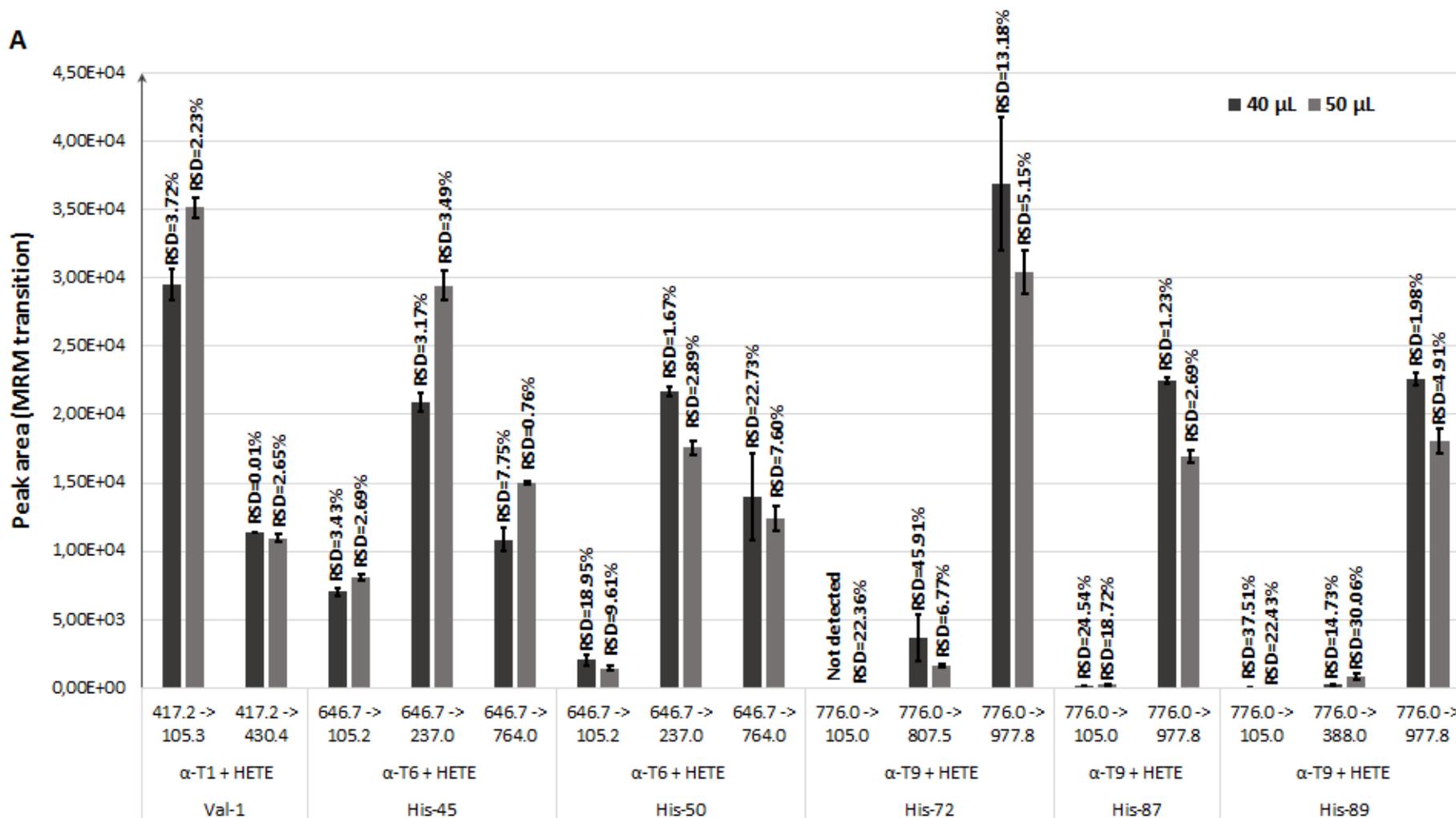


Figure S6. Highlighting of the color difference between the samples of whole blood spiked with sulfur mustard at a concentration of $1.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (A) and $0.07 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (B) and the sample of blood spiked with sulfur mustard at a concentration of $0.14 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (C), after addition of 1 mL of deionized water to the washed RBCs.

A



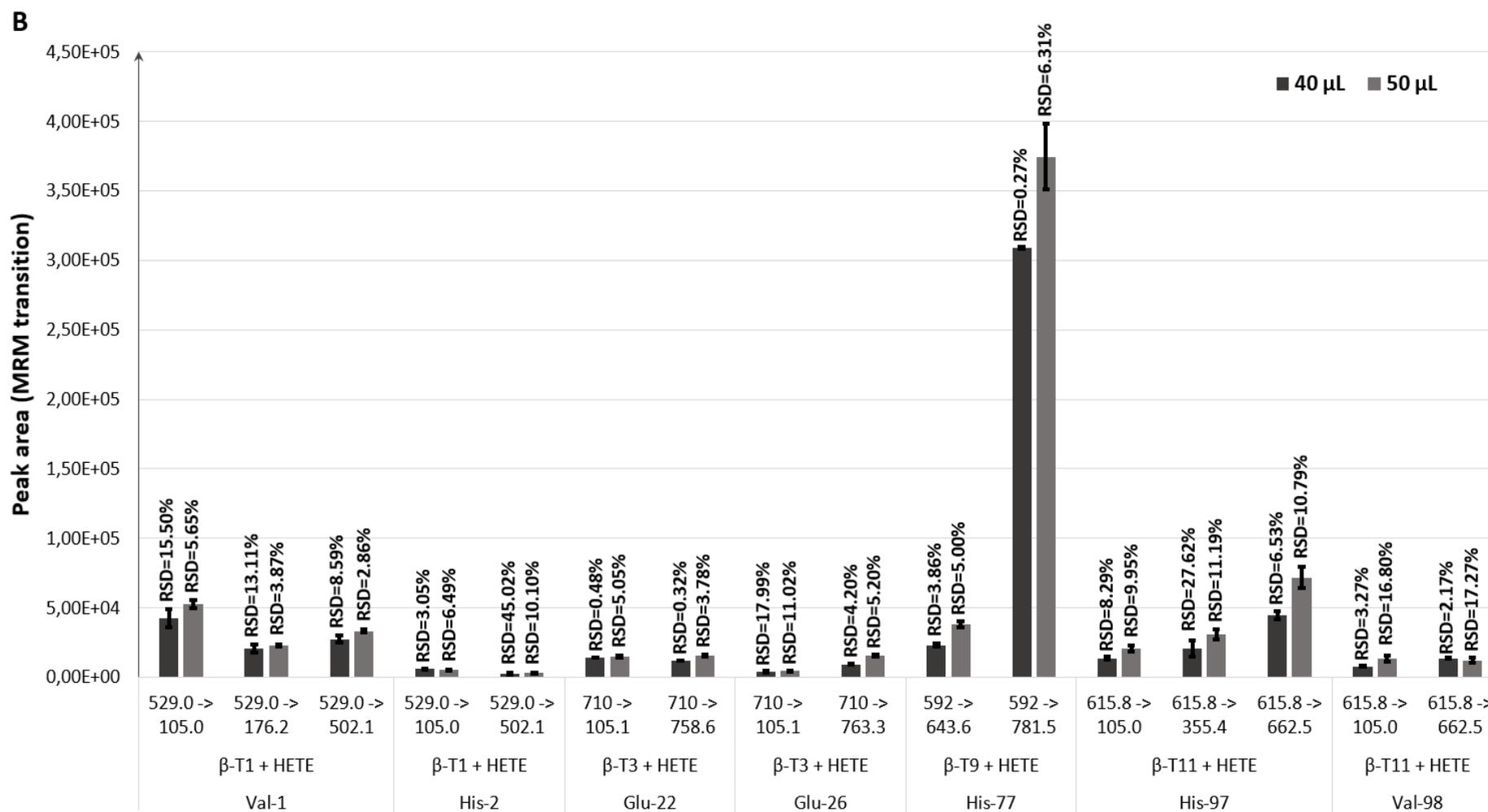


Figure S7. Influence of the transfer volume between the 20µL injection loop and the trypsin IMER on the peak area corresponding to the alkylated peptides of globin α (A) and globin β (B) resulting from the digestion of standard hemoglobin exposed to sulfur mustard at $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. $n=3$ (3 independent digestions performed in stop flow on IMER during 30 min at 25°C for each transfer volume).

Table S1. Mass parameters and transitions used for the analysis in MRM mode of the peptides resulting from the digestion on trypsin IMERs of human hemoglobin (20 µg) extracted from whole blood samples incubated in vitro with sulfur mustard. The HD adduction sites are indicated in bold in the peptide sequences.

Time segment	Peptide	Precursor ion	Tube lens	Product ions	Corresponding peptide fragment	Collision voltage
0-25 min	α -T1 VLSPADK (1-7)	m/z 365.2 (2 ⁺)	70 V	m/z 517.2	SPADK (y_5^+)	15 V
				m/z 630.3	LSPADK (y_6^+)	15 V
24-35 min	α -T1 VLSPADK (1-7) + HETE	m/z 417.2 (2 ⁺)	95 V	m/z 105.3	HETE ⁺	15 V
				m/z 430.4	PADK (y_4^+)	15 V
	β -T1 VHLTPEEK (1-8) + HETE	m/z 529.0 (2 ⁺)	90 V	m/z 105.0	HETE ⁺	25 V
				m/z 176.2	V (a_1^+) + HETE*	25 V
				m/z 502.1	PEEK (y_4^+)	25 V
				m/z 502.1	PEEK (y_4^+)	25 V
35-42 min	β -T11 LHVDPENFR (96-104) + HETE	m/z 615.8 (2 ⁺)	115 V	m/z 105.0	HETE ⁺	25 V
				m/z 355.4	LH (b_2^+) + HETE*	25 V
				m/z 662.5	PENFR (y_5^+)	25 V
	β -T11 LHVDPENFR (96-104) + HETE	m/z 615.8 (2 ⁺)	115 V	m/z 105.0	HETE ⁺	25 V
				m/z 662.5	PENFR (y_5^+)	25 V
				m/z 662.5	PENFR (y_5^+)	25 V
42-47.5 min	β -T3 VNVDEVGGALGR (18-30) + HETE	m/z 710.0 (2 ⁺)	100 V	m/z 105.1	HETE ⁺	20 V
				m/z 758.6	VGGEALGR (y_8^+)*	25 V
	β -T3 VNVDEVGGALGR (18-30) + HETE	m/z 710.0 (2 ⁺)	100 V	m/z 105.1	HETE ⁺	20 V
				m/z 763.3	GGEALGR (y_7^+) + HETE*	20 V
47.5-57 min	α -T6 TYFPHFDLSHGSAQVK (41-56) + HETE	m/z 646.7 (3 ⁺)	125 V	m/z 105.2	HETE ⁺	30 V
				m/z 237.0	TY (a_2^+)	30 V
				m/z 764.0	PHFDLSHGSAQVK (y_{13}^{2+}) + HETE	25 V
	α -T6 TYFPHFDLSHGSAQVK (41-56) + HETE	m/z 646.7 (3 ⁺)	125 V	m/z 105.2	HETE ⁺	30 V
				m/z 237.0	TY (a_2^+)	30 V
				m/z 764.0	PHFDLSHGSAQVK (y_{13}^{2+}) + HETE	25 V
57-62 min	β -T9 VLGAFSGLAHLNLIK (67-82) + HETE	m/z 592.0 (3 ⁺)	90 V	m/z 643.6	SDGLAHLNLIK (y_{11}^{2+}) + HETE	20 V
				m/z 781.5	GAFSDGLAHLNLIK (y_{14}^{2+}) + HETE	15 V

Time segment (continued)	Peptide	Precursor ion	Tube lens	Product ions	Corresponding peptide fragment	Collision voltage
63-99 min	α-T9 VADALTNAVAHVDDMPNALSALSDLHA HK (62-90) + HETE	<i>m/z</i> 776.0 (4 ⁺)	125 V	<i>m/z</i> 105.0	HETE ⁺	25 V
				<i>m/z</i> 807.5	SDLHAHK (y ₇ ⁺)	25 V
				<i>m/z</i> 977.8	DALTNAVAHVDDMPNALSALSDLHAHK (y ₂₇ ³⁺) + HETE	20 V
	α-T9 VADALTNAVAHVDDMPNALSALSDLHA HK (62-90) + HETE	<i>m/z</i> 776.0 (4 ⁺)	125 V	<i>m/z</i> 105.0	HETE ⁺	25 V
				<i>m/z</i> 977.8	DALTNAVAHVDDMPNALSALSDLHAHK (y ₂₇ ³⁺) + HETE	20 V
				<i>m/z</i> 105.0	HETE ⁺	25 V
	α-T9 VADALTNAVAHVDDMPNALSALSDLHA HK (62-90) + HETE	<i>m/z</i> 776.0 (4 ⁺)	125 V	<i>m/z</i> 388.0	HK (y ₂ ⁺) + HETE*	25 V
				<i>m/z</i> 977.8	DALTNAVAHVDDMPNALSALSDLHAHK (y ₂₇ ³⁺) + HETE	20 V

Table S2. Linear regression equations and coefficient values of the regression curves obtained for the evolution of the peak area corresponding to each alkylated peptide resulting from the tryptic digestion of hemoglobin extracted from whole blood samples exposed to sulfur mustard vs the sulfur mustard concentration, and ratios of the MRM transition intensities for each alkylated peptide. Blood samples were incubated in vitro with seven sulfur mustard concentrations (0.014 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 0.07 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 0.14 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 0.7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 1.4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 5.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 28 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Three independent digestions of the blood extract obtained once for each of the seven sulfur mustard concentrations were performed (n=21) on the trypsin IMER (digestion in stop flow at 25°C during 30 min with a transfer volume of 50 μL).

Alkylated peptide	Adduction site	MRM transition	Linear regression equation and coefficient value of the regression curve	MRM transition intensities ratio ^a
α -T1 + HETE	α -Val ¹	417.2 -> 105.3	y = 226.84x R ² = 0.9999	1
		417.2 -> 430.4	y = 62.038x R ² = 0.9994	0.27
α -T6 + HETE	α -His ⁴⁵	646.7 -> 105.2	y = 22.152x R ² = 0.9981	0.23
		646.7 -> 237.0	y = 98.108x R ² = 0.9991	1
		646.7 -> 764.0	y = 42.262x R ² = 0.9984	0.43
		646.7 -> 105.2	y = 5.6286x R ² = 0.9871	0.09
α -T6 + HETE	α -His ⁵⁰	646.7 -> 237.0	y = 59.603x R ² = 0.9993	1
		646.7 -> 764.0	y = 37.363x R ² = 0.9991	0.63
		776.0 -> 105.0	y = 1.7488x R ² = 0.9873	0.01
α -T9 + HETE	α -His ⁷²	776.0 -> 807.5	y = 59.786x R ² = 0.9976	0.44
		776.0 -> 977.8	y = 135.30x R ² = 0.9999	1
		776.0 -> 105.0	y = 2.7844x R ² = 0.9998	0.03
α -T9 + HETE	α -His ⁸⁷	776.0 -> 977.8	y = 108.80x R ² = 0.9999	1
		776.0 -> 105.0	y = 1.7032x R ² = 0.9958	0.01
α -T9 + HETE	α -His ⁸⁹	776.0 -> 388.0	y = 9.9341x R ² = 0.9995	0.07
		776.0 -> 977.8	y = 133.35x R ² = 0.9999	1
		529.0 -> 105.0	y = 505.11x R ² = 0.9997	1
β -T1 + HETE	β -Val ¹	529.0 -> 176.2	y = 268.57x R ² = 0.9992	0.53
		529.0 -> 502.1	y = 346.08x R ² = 0.9988	0.69
β -T1 + HETE	β -His ²	529.0 -> 105.0	y = 108.26x R ² = 0.9999	1
		529.0 -> 502.1	y = 49.780x R ² = 0.9961	0.46
β -T3 + HETE	β -Glu ²²	710.0 -> 105.1	y = 34.756x R ² = 0.9998	0.90
		710.0 -> 758.6	y = 38.801x R ² = 0.9946	1
β -T3 + HETE	β -Glu ²⁶	710.0 -> 105.1	y = 9.3711x R ² = 0.9994	0.23
		710.0 -> 763.3	y = 41.148x R ² = 0.9959	1

Alkylated peptide (continued)	Adduction site	MRM transition	Linear regression equation and coefficient value of the regression curve	MRM transition intensities ratio ^a
β-T9 + HETE	β-His ⁷⁷	592.0 → 643.6	y = 71.085x R ² = 0.9894	0.07
		592.0 → 781.5	y = 988.45x R ² = 0.9996	1
β-T11 + HETE	β-His ⁹⁷	615.8 → 105.0	y = 339.94x R ² = 0.9987	0.28
		615.8 → 355.4	y = 776.57x R ² = 0.9997	0.63
		615.8 → 662.5	y = 1223.8x R ² = 0.9991	1
β-T11 + HETE	β-Val ⁹⁸	615.8 → 105.0	y = 1150.9x R ² = 0.9996	0.73
		615.8 → 662.5	y = 1579.9x R ² = 0.9996	1

^a The ratios were calculated using the quantitative MRM transition, *i.e.* the most intense transition, as the denominator.

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Réaction de l'ypérite avec un nucléophile biologique (Nu) pour former un adduit hydroxyéthylthioéthyl (HETE), après formation de l'ion épisulfonium par substitution nucléophile. 24

Figure 2. Représentation des principaux biomarqueurs de l'ypérite, issus des réactions d'hydrolyse et/ou d'oxydation, de la réaction avec le glutathion et de l'alkylation de l'ADN ou des protéines. **SMO** : sulfoxyde d'ypérite ; **SMO₂** : sulfone d'ypérite ; **TDG** : thiodiglycol ; **TDGO** : sulfoxyde de thiodiglycol ; **SBSNAE** : 1,1'-sulfonylbis[2-S-(N-acétylcystéinyl)éthane] ; **SBMTE** : 1,1'-sulfonylbis[2-(méthylthio)éthane] ; **MSMTESE** : 1-méthylsulfinyl-2-[2-(méthylthio)éthylsulfonyl]éthane ; **SBMSE** : 1,1'-sulfonylbis[2-(méthylsulfinyl)éthane] ; **N⁷-HETEG** : N⁷-[2-[(2-hydroxyéthyl)thio]éthyl]-guanine ; **O⁶-HETEG** : O⁶-[2-[(2-hydroxyéthyl)thio]éthyl]-guanine ; **N³-HETE A** : N³-[2-[(2-hydroxyéthyl)thio]éthyl]-adenine ; **Bis-G** : bis[2-(guanine-7-yl)éthyl]sulfide ; **HETE-Val** : hydroxyéthylthioéthyl valine ; **HETE-His** : hydroxyéthylthioéthyl histidine ; **HETE-Cys** : hydroxyéthylthioéthyl cystéine ; **TiCl₃** : trichlorure de titane ; **Ac** : groupe acétyle (COCH₃). Adapté de [13].
..... 24

Figure 3. Produits de réaction du TDG et du TDGO avec l'anhydride heptafluorobutyrique (HFBA) ou l'heptafluorobutyrylimidazole (HFBI). Adapté de [14]. 35

Figure 4. Profils d'excrétion des métabolites β-lyase (trait continu) et des produits d'hydrolyse/oxydation (pointillés) dans les urines de rats après une exposition cutanée à l'ypérite (dose = 2 μmol/animal). Adapté de [23]. 52

Figure 5. Réactions clé du processus de libération du TDG à partir des adduits protéine-ypérite, incluant la formation in vivo de l'ester protéine-HETE (équation 1), l'incubation in vitro avec une base pour libérer TDG (équation 2) et la dérivation de TDG avec le chlorure de pentafluorobenzoyl (PFBCl) pour l'analyse en GC-MS du métabolite (équation 3). Adapté de [58]. 53

Figure 6. Quantités relatives de biomarqueurs (échelle arbitraire) après une forte exposition à l'ypérite. Adapté de [63]. 54

Figure 7. Mécanisme de formation de l'adduit ADN-ypérite N⁷-[2-[(2-hydroxyéthyl)thio]éthyl]-guanine (N⁷-HETEG) par réaction de l'ypérite avec la position N⁷ de la nucléobase guanine de l'ADN. Adapté de [64]. 56

Figure 8. Illustration du rôle joué par les adduits ADN formés lors de l'exposition à un agent chimique dans le développement de cancers. Adapté de [65]. 56

Figure 9. Représentation schématique de la structure des nucléotides, constitués d'une nucléobase, d'un pentose et de phosphates (A), et marquage au phosphore 32 (³²P) pour l'analyse des adduits ADN (B). Adapté de [76]. 58

Figure 10. Représentation schématique des différentes étapes impliquées dans la procédure de préparation des échantillons biologiques pour l'analyse des adduits ADN-ypérite par LC-MS/MS avec dilution isotopique. Adapté de [66].	66
Figure 11. Présentation des deux méthodes de précipitation chimique utilisées pour extraire l'ADN génomique du sang total.	67
Figure 12. Procédure d'extraction de l'albumine plasmatique à partir du sang total par précipitation séquentielle. Adapté de [94].	75
Figure 13. Structure du tripeptide (S-[2-[(hydroxyéthyl)thio]éthyl])-Cys-Pro-Phe (HETE-CPF) obtenu après digestion enzymatique de l'albumine alkylée par l'ypérite au niveau du résidu Cys ³⁴ . Chez le rat, le résidu phénylalanine (Phe) est remplacé par un résidu tyrosine (Tyr).	76
Figure 14. Structure de l'hémoglobine humaine (hémoglobine A). Adapté de [109].	85
Figure 15. Représentation schématique de la coupe transversale de la membrane d'acétate de cellulose utilisée pour la lyse sans tampon des érythrocytes présents dans le sang. Adapté de [114].	90
Figure 16. Procédure de dégradation d'Edman modifiée pour le clivage de la valine N-terminale alkylée par l'ypérite à l'aide du réactif d'Edman isothiocyanate de pentafluorophényl (PFPICT), suivie de la dérivation du dérivé thiohydantoïn obtenu (N-HETE-Val-PFPTH) avec l'heptafluorobutyrylimidazole (HFBI) pour une analyse en GC-MS ou GC-MS/MS. Adapté de [119].	92
Figure 17. Illustration de la procédure FIRE [®] utilisée pour l'analyse en LC-MS/MS de la valine N-terminale adduite, après détachement de l'adduit de l'hémoglobine par l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Adapté de [122].	93
Figure 18. Reaction of sulfur mustard with a biological nucleophile (Nu) after formation of the episulfonium ion (a). Localization of the alkylation sites of human haemoglobin by sulfur mustard (red circles) identified by LC-ESI ⁺ -MS/MS analysis of tryptic digests [12, 110] (b).	99
Figure 19. Base Peak Chromatogram (BPC) resulting from the LC-MS analysis of the tryptic digest of non-alkylated hemoglobin (5 µg injected) in full scan mode (mass range m/z 270-1500), after removal of the buffer salts on the trap column. The peptides presenting a potential site of alkylation are framed (a). Overlay of the chromatograms obtained for the globin α and the globin β chains during the analysis in SIM mode of the tryptic digest of non-alkylated human hemoglobin (5 µg injected), with the optimal valued of tube lens for each peptide (b).	107
Figure 20. Overlay of the chromatograms obtained during the analysis in MRM mode of the same tryptic digest of non-alkylated human hemoglobin (5 µg injected), targeting the peptides with a potential site of adduction (transitions reported in Figure 21).	108
Figure 21. Peak areas (arbitrary unit) obtained during the analysis in MRM mode of the tryptic digest of non-alkylated human hemoglobin, targeting the peptides with a potential site of adduction of globin α and globin β (n=3, analysis repeated three times with the same digest). The MRM transitions studied for each peptide are indicated above the histogram bars. The error bars correspond to the standard deviation.	110

Figure 22. Fragmentation spectra obtained in Product Ion mode (collision voltage 25 V) for the alkylated peptide β -1 (precursor ion m/z 529.0) and corresponding to the adduction of sulfur mustard on the residue β -His ² (a) and the residue β -Val ¹ (b).....	111
Figure 23. Chromatograms obtained for the MRM transitions of the alkylated peptide β -T1 resulting from the analysis of the tryptic digest of human hemoglobin at 50 mg.mL ⁻¹ incubated with sulfur mustard at 100 μ g.mL ⁻¹ . The peak observed at 26.98 min corresponds to an adduction of sulfur mustard on β -His ² and the peak eluting at 27.59 min corresponds to an adduction on β -Val ¹	112
Figure 24. Areas (arbitrary unit) of the chromatographic peaks of globin α (a) and globin β (b) observed during the MRM analysis of the tryptic digest of human hemoglobin at 50 mg.mL ⁻¹ incubated with sulfur mustard at 100 μ g.mL ⁻¹ , targeting the alkylated peptides (n=3, analysis repeated three times with the same digest). The MRM transitions studied for each peptide are indicated above the histogram bars. The error bars correspond to the standard deviation.....	118
Figure 25. Mécanisme d'action de la trypsine lors de la digestion enzymatique de protéines.....	127
Figure 26. Réactions d'immobilisation de la trypsine sur la silice fonctionnalisée glutaraldéhyde (a), la Sépharose activée NHS (b) ou la Sépharose activée CNBr (c). Adapté de [133].	131
Figure 27. Digestion du BApNA par la trypsine. Adapté de [133].	131
Figure 28. Taux de digestion du BApNA obtenus sur les trois IMERs synthétisés en laboratoire à base de trypsine immobilisée sur de la silice activé glutaraldéhyde (Si-Glu), de la Sépharose fonctionnalisée NHS (Séph-NHS) ou de la Sépharose activée CNBr (Séph-CNBr), et sur un support commercial StyrosZyme® (n=3). Adapté de [133]......	132
Figure 29. Représentation schématique des configurations de couplage des IMERs avec les systèmes analytiques. EC : électrophorèse capillaire ; IMER : réacteur enzymatique immobilisé ; LC : chromatographie en phase liquide ; MS : spectrométrie de masse. Adapté de [144].	134
Figure 30. Représentation schématique du montage couplant un immunoabsorbant, un IMER de pepsine, une pré-colonne de piégeage et une colonne analytique pour l'analyse quantitative ciblée de la butyrylcholinestérase humaine. Adapté de [189]......	136
Figure 31. Influence of the transfer volume between the injection loop and IMER 1 on the peak areas of alkylable peptides of digested human hemoglobin (5 μ g injected). Digestions achieved in stop flow at 27°C during 30 min (3 independent digestions, n=3). The error bars correspond to the standard deviation. The y-axis scale is modified after the scale break.....	145
Figure 32. Influence of the temperature on the digestion of human hemoglobin (5 μ g injected) on IMER 1 on the peak areas of the resulting alkylable peptides. Digestions achieved in stop flow during 30 min with a transfer volume of 40 μ L (3 independent digestions, n=3). The error bars correspond to the standard deviation. The y-axis scale is modified after the scale break.	146
Figure 33. Influence of the digestion time on the peak areas of alkylable peptides resulting from the digestion on IMER 1 of non-alkylated human hemoglobin (5 μ g injected). Digestions achieved in stop flow at 25°C with a transfer volume of 40 μ L (3 independent digestions, n=3). The error bars correspond to the standard deviation. The y-axis scale is modified after the scale break.....	147

Figure 34. Peak areas obtained after the MRM analysis of the alkylable peptides resulting from the digestion of non-alkylated human hemoglobin (5 µg) in-solution (at 37°C during 16h) or on the three IMERs (stop flow at 25°C during 30 min, volume transfer of 40 µL (3 independent digestions carried out in-solution, on a given IMER or one digestion on each IMER, n=3). The error bars correspond to the standard deviation. The y-axis scale is modified after the scale break. 149

Figure 35. Evolution of the peak area for the MRM transition 417.2 -> 105.3 corresponding to the alkylated peptide α-T1 + HETE resulting from the tryptic digestion in solution or on the three trypsin IMERs of human hemoglobin (5 µg injected) exposed to various concentrations of sulfur mustard (3 independent digestions carried out in-solution and on each IMER or one digestion on each IMER, n=3). 151

Figure 36. Schematic representation of the isolation of RBCs from whole blood and their hemolysis by freezing at -80°C during 2 hours in one or two cycles (A) followed by the lysate filtration and purification of the extracted hemoglobin by ultrafiltration on 100 and 50 kDa cutoff Amicon® filters (B). The steps retained for the treatment of blood samples spiked with sulfur mustard are framed. V_{eq}: equivalent volume, RT: room temperature. See assay 3 in **Table 9** for experimental values of extracted Hb obtained with both hemolysis methods. 164

Figure 37. Overlay of MRM chromatograms corresponding to the alkylated peptides resulting from the tryptic digestion on IMER 1 (stop flow during 30 min at 25°C) of hemoglobin extracted from whole blood in vitro exposed to sulfur mustard at 0.7 µg.mL⁻¹ (A) or of standard hemoglobin in vitro exposed to sulfur mustard at 0.25 µg.mL⁻¹ in pure water (B). Peak 1: β-T1 + HETE (adduction site β-His²), peak 2: β-T1 + HETE (adduction site β-Val¹), peak 3: α-T1 + HETE (adduction site α-Val¹), peak 4: β-T11 + HETE (adduction site β-His⁹⁷), peak 5: β-T11 + HETE (adduction site β-Val⁹⁸), peak 6: β-T3 + HETE (adduction site β-Glu²²), peak 7: β-T3 + HETE (adduction site β-Glu²⁶), peak 8: α-T6 + HETE (adduction site α-His⁴⁵), peak 9: α-T6 + HETE (adduction site α-His⁵⁰), peak 10: β-T9 + HETE (adduction site β-His⁷⁷), peak 11: α-T9 + HETE (adduction site α-His⁸⁷), peak 12: α-T9 + HETE (adduction site α-His⁸⁹), peak13 : α-T9 + HETE (adduction site α-His⁷²). MRM chromatograms of the alkylated peptide α-T1 + HETE (adduction site α-Val¹) (C) and the alkylated peptide β-T11 + HETE alkylated on the residue β-His⁹⁷ (t_R=39.77 min) or the residue β-Val⁹⁸ (t_R=40.14 min) (D) obtained after extraction of hemoglobin from whole blood exposed to 0.014 µg.mL⁻¹ of sulfur mustard at and its digestion on trypsin IMER during 30 min at 25°C, followed by LC-MS/MS analysis. 177

Figure 38. Evolution of the peak area corresponding to the alkylated peptide α-T1 + HETE (adduction site α-Val¹) with the sulfur mustard concentration (n=3, 3 independent digestions performed on the IMER for each sulfur mustard concentration). 180

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Principales méthodes pour l'analyse des métabolites résultant de l'hydrolyse et/ou de l'oxydation de l'ypérite dans les matrices biologiques.	28
Tableau 2. Principales méthodes pour l'analyse des métabolites résultant de la réaction de l'ypérite avec le glutathion dans les matrices biologiques.	41
Tableau 3. Principales méthodes d'analyse par chromatographie liquide des adduits résultants de l'alkylation de l'ADN par l'ypérite dans les matrices biologiques.	60
Tableau 4. Principales méthodes d'analyse par chromatographie liquide des adduits albumine-ypérite dans les échantillons biologiques.	72
Tableau 5. Principales méthodes d'analyse des adduits hémoglobine-ypérite dans les échantillons de sang total.	87
Table 6. Mass parameters and transitions used for the analysis in MRM mode of the tryptic digest of human hemoglobin at 50 mg.mL ⁻¹ incubated in vitro with sulfur mustard, targeting the alkylated peptides and using the main product ions previously identified in Product Ion mode. The HD adduction sites are indicated in bold in the peptides sequences. For the peptides α -T6, α -T9, β -T1, β -T3 and β -T11, the fragments used to differentiate the different adduction sites are indicated by an asterix.	114
Table 7. Identification and exploitation of the chromatographic peaks obtained during the MRM analysis in triplicate of the tryptic digest of human hemoglobin at 50 mg.mL ⁻¹ incubated with sulfur mustard at 250 ng.mL ⁻¹ . Analysis targeting the alkylated peptides and using the precursor ion -> product ions transitions experimentally identified.	116
Table 8. Comparison of the alkylation rates and the slopes related to the evolution of the (alkylated peptide/corresponding non-alkylated peptide) ratio with the concentration of sulfur mustard obtained after in-solution or IMER digestion of human hemoglobin incubated in vitro with sulfur mustard at five concentration levels (250 ng.mL ⁻¹ , 500 ng.mL ⁻¹ , 1 μ g.mL ⁻¹ , 10 μ g.mL ⁻¹ and 100 μ g.mL ⁻¹). Three independent digestions were performed on the three trypsin IMERs, i.e. one digestion per IMER (digestion in stop flow at 25°C during 30 min with a transfer volume of 40 μ L) or in-solution for each sulfur mustard concentration (n=15).	153
Table 9. Quantities of hemoglobin extracted from non-spiked whole blood samples after hemolysis of the RBCs using two different techniques or number of cycles, and further filtration and purification of the resulting lysates with two types of 100 kDa cutoff filters. The amounts of hemoglobin were estimated using a colorimetric BCA assay. RT: room temperature.	169
Table 10. Quantities of hemoglobin extracted from whole blood samples (1 mL) exposed to different concentrations of sulfur mustard (HD) and submitted to hemolysis of the RBCs by freezing at -80°C during 1h repeated twice, followed by the filtration and purification of the resulting lysates. The amounts of hemoglobin were estimated using a colorimetric BCA assay.	174
Table 11. Linear regression equations and coefficient values of the regression curves obtained for the evolution of the peak area corresponding to each alkylated peptide resulting from the tryptic digestion of hemoglobin extracted once from whole blood samples incubated with sulfur mustard vs the sulfur mustard	

concentration, minimal concentration of in vitro exposure to sulfur mustard that can be detected (LOD) or quantified (LOQ) in whole blood samples and comparison of the mean alkylation rates obtained in the biological matrix or in pure water. Blood samples were incubated in vitro with seven sulfur mustard concentration levels ($0.014 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.07 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.14 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $1.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $5.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $28 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) while lyophilized human hemoglobin in pure water was incubated in vitro at five sulfur mustard concentration levels ($0.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Three independent digestions were performed on the trypsin IMER (digestion in stop flow at 25°C during 30 min) for each sulfur mustard concentration ($n=21$ for blood samples and $n=15$ in pure water)..... 181

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] G.J. Fitzgerald, Chemical Warfare and Medical Response During World War I, *Am. J. Public Health.* 98 (2008) 611–625. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2007.11930>.
- [2] M. Balali-Mood, M. Hefazi, The pharmacology, toxicology, and medical treatment of sulphur mustard poisoning, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 19 (2005) 297–315. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2005.00325.x>.
- [3] D.D. Haines, S.C. Fox, Acute and Long-Term Impact of Chemical Weapons: Lessons from the Iran-Iraq War, *Forensic Sci. Rev.* 26 (2014) 97–114.
- [4] M. Balali-Mood, M. Hefazi, Comparison of Early and Late Toxic Effects of Sulfur Mustard in Iranian Veterans, *Basic HTMLent Glyphamp Asciiamp Clin. Pharmacol. HTMLent Glyphamp Asciiamp Toxicol.* 99 (2006) 273–282. https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2006.pto_429.x.
- [5] M. Wattana, T. Bey, Mustard Gas or Sulfur Mustard: An Old Chemical Agent as a New Terrorist Threat, *Prehospital Disaster Med.* 24 (2009) 19–29. <https://doi.org/10.1017/S1049023X0000649X>.
- [6] S. Sezigen, R.K. Eyison, E. Kilic, L. Kenar, Evidence of sulfur mustard exposure in victims of chemical terrorism by detection of urinary β -lyase metabolites, *Clin. Toxicol.* 58 (2020) 36–44. <https://doi.org/10.1080/15563650.2019.1614190>.
- [7] S. Sezigen, R.K. Eyison, L. Kenar, Bioanalytical verification of sulfur mustard exposure in a syrian family, *GULHANE Med. J.* 61 (2019) 64. <https://doi.org/10.26657/gulhane.00056>.
- [8] J.R. Barr, C.L. Pierce, J.R. Smith, B.R. Capacio, A.R. Woolfitt, M.I. Solano, J.V. Wooten, S.W. Lemire, J.D. Thomas, D.H. Ash, D.L. Ashley, Analysis of Urinary Metabolites of Sulfur Mustard in Two Individuals after Accidental Exposure, *J. Anal. Toxicol.* 32 (2008) 10–16. <https://doi.org/10.1093/jat/32.1.10>.
- [9] C.M. Ruhl, S.J. Park, O. Danisa, R.F. Morgan, B. Papirmeister, F.R. Sidell, R.F. Edlich, L.S. Anthony, H.N. Himel, A serious skin sulfur mustard burn from an artillery shell, *J. Emerg. Med.* 12 (1994) 159–166.
- [10] J.R. Smith, B.R. Capacio, W.D. Korte, A.R. Woolfitt, J.R. Barr, Analysis for plasma protein biomarkers following an accidental human exposure to sulfur mustard, *J. Anal. Toxicol.* 32 (2008) 17–24. <https://doi.org/10.1093/jat/32.1.17>.
- [11] O. Isono, A. Kituda, M. Fujii, T. Yoshinaka, G. Nakagawa, Y. Suzuki, Long-term neurological and neuropsychological complications of sulfur mustard and Lewisite mixture poisoning in Chinese victims exposed to chemical warfare agents abandoned at the end of WWII, *Toxicol. Lett.* 293 (2018) 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.04.017>.
- [12] D. Noort, E.R. Verheij, A.G. Hulst, L.P. de Jong, H.P. Benschop, Characterization of sulfur mustard induced structural modifications in human hemoglobin by liquid chromatography- tandem mass spectrometry, *Chem. Res. Toxicol.* 9 (1996) 781–787.
- [13] H. Xu, Z. Nie, Y. Zhang, C. Li, L. Yue, W. Yang, J. Chen, Y. Dong, Q. Liu, Y. Lin, B. Wu, J. Feng, H. Li, L. Guo, J. Xie, Four sulfur mustard exposure cases: Overall analysis of four types of biomarkers in clinical samples provides positive implication for early diagnosis and treatment monitoring, *Toxicol. Rep.* 1 (2014) 533–543. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.07.017>.

- [14] J. Riches, R.W. Read, R.M. Black, Analysis of the sulphur mustard metabolites thiodiglycol and thiodiglycol sulphoxide in urine using isotope-dilution gas chromatography–ion trap tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.* 845 (2007) 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.065>.
- [15] C. Li, J. Chen, Q. Liu, J. Xie, H. Li, Simultaneous quantification of seven plasma metabolites of sulfur mustard by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.* 917–918 (2013) 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.12.035>.
- [16] Y. Zhang, L. Yue, Z. Nie, J. Chen, L. Guo, B. Wu, J. Feng, Q. Liu, J. Xie, Simultaneous determination of four sulfur mustard–DNA adducts in rabbit urine after dermal exposure by isotope-dilution liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.* 961 (2014) 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.04.050>.
- [17] D. Noort, A. Fidder, H.P. Benschop, L.P.A. De Jong, J.R. Smith, Procedure for monitoring exposure to sulfur mustard based on modified Edman degradation of globin, *J. Anal. Toxicol.* 28 (2004) 311–315.
- [18] J.R. Smith, B.R. Capacio, Mass Spectrometry Applications for the Identification and Quantitation of Biomarkers Resulting from Human Exposure to Chemical Warfare Agents., in: *Detect. Biol. Agents Prev. Bioterrorism*, Springer, Banoub, J. H., North Atlantic Treaty Organization, Dordrecht, The Netherlands, 2011: pp. 181–199.
- [19] R.M. Black, R.W. Read, Biological fate of sulphur mustard, 1,1'-thiobis(2-chloroethane): identification of β -lyase metabolites and hydrolysis products in human urine, *Xenobiotica.* 25 (1995) 167–173. <https://doi.org/10.3109/00498259509061842>.
- [20] A.E. Boyer, D. Ash, D.B. Barr, C.L. Young, W.J. Driskell, R.D.W. Jr, Quantitation of the Sulfur Mustard Metabolites 1,1'-Sulfonylbis[2-(methylthio)ethane] and Thiodiglycol in Urine Using Isotope-Dilution Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 28 (2004) 327–332.
- [21] Z. Nie, Y. Zhang, J. Chen, Y. Lin, B. Wu, Y. Dong, J. Feng, Q. Liu, J. Xie, Monitoring urinary metabolites resulting from sulfur mustard exposure in rabbits, using highly sensitive isotope-dilution gas chromatography–mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 5203–5212. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7916-3>.
- [22] R.M. Black, R.W. Read, Detection of trace levels of thiodiglycol in blood, plasma and urine using gas chromatography–electron-capture negative-ion chemical ionisation mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 449 (1988) 261–270. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)94385-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)94385-1).
- [23] R.M. Black, J.L. Hambrook, D.J. Howells, R.W. Read, Biological Fate of Sulfur Mustard, 1,1'-Thiobis(2-chloroethane). Urinary Excretion Profiles of Hydrolysis Products and β -Lyase Metabolites of Sulfur Mustard after Cutaneous Application in Rats, *J. Anal. Toxicol.* 16 (1992) 79–84. <https://doi.org/10.1093/jat/16.2.79>.
- [24] C. Davison, Robert.S. Rozman, P.K. Smith, Metabolism of bis-beta-chloroethyl sulfide (sulfur mustard gas), *Biochem. Pharmacol.* 7 (1961) 65–74. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90127-7](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90127-7).
- [25] R.M. Black, K. Brewster, R.J. Clarke, J.L. Hambrook, J.M. Harrison, D.J. Howells, Biological fate of sulphur mustard, 1,1'-thiobis(2-chloroethane): isolation and identification of urinary metabolites following intraperitoneal administration to rat, *Xenobiotica.* 22 (1992) 405–418. <https://doi.org/10.3109/00498259209046652>.
- [26] M. Halme, M. Pesonen, U. Hakala, M. Pasanen, K. Vähäkangas, P. Vanninen, Applying human and pig hepatic *in vitro* experiments for sulfur mustard study: Screening and identification of metabolites by

liquid chromatography/tandem mass spectrometry: Studying the *in vitro* metabolism of sulfur mustard by LC/MS, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 29 (2015) 1279–1287. <https://doi.org/10.1002/rcm.7218>.

- [27] E.R.J. Wils, A.G. Hulst, A.L. de Jong, A. Verweij, H.L. Borer, Analysis of Thiodiglycol in Urine of Victims of an Alleged Attack with Mustard Gas, *J. Anal. Toxicol.* 9 (1985) 254–257. <https://doi.org/10.1093/jat/9.6.254>.
- [28] W. Vycudilik, Detection of mustard gas bis(2-chloroethyl)-sulfide in urine, *Forensic Sci. Int.* 28 (1985) 131–136. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(85\)90070-2](https://doi.org/10.1016/0379-0738(85)90070-2).
- [29] W. Vycudilik, Detection of bis(2-chlorethyl)-sulfide (Yperite) in urine by high resolution gas chromatography-mass spectrometry, *Forensic Sci. Int.* 35 (1987) 67–71. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(87\)90024-7](https://doi.org/10.1016/0379-0738(87)90024-7).
- [30] E.R.J. Wils, A.G. Hulst, J. van Laar, Analysis of Thiodiglycol in Urine of Victims of an Alleged Attack with Mustard Gas, Part II, *J. Anal. Toxicol.* 12 (1988) 15–19. <https://doi.org/10.1093/jat/12.1.15>.
- [31] E.M. Jakubowski, C.L. Woodard, M.M. Mershon, T.W. Dolzine, Quantification of thiodiglycol in urine by electron ionization gas chromatography—mass spectrometry, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 528 (1990) 184–190. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)82374-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)82374-9).
- [32] R.M. Black, R.W. Read, Methods for the analysis of thiodiglycol sulphoxide, a metabolite of sulphur mustard, in urine using gas chromatography —mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 558 (1991) 393–404. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(91\)80006-3](https://doi.org/10.1016/0021-9673(91)80006-3).
- [33] R.M. Black, R.W. Read, Improved methodology for the detection and quantitation of urinary metabolites of sulphur mustard using gas chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 665 (1995) 97–105. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(94\)00522-7](https://doi.org/10.1016/0378-4347(94)00522-7).
- [34] E.M. Jakubowski, F.R. Sidell, R.A. Evans, M.A. Carter, J.R. Keeler, J.D. McMonagle, A. Swift, J.R. Smith, T.W. Dolzine, Quantification of thiodiglycol in human urine after an accidental sulfur mustard exposure, *Toxicol. Methods.* 10 (2000) 143–150. <https://doi.org/10.1080/10517230050083375>.
- [35] R.M. Black, B. Muir, Derivatisation reactions in the chromatographic analysis of chemical warfare agents and their degradation products, *J. Chromatogr. A.* 1000 (2003) 253–281. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00183-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00183-3).
- [36] E. Manandhar, A. Pay, L.A. Veress, B.A. Logue, Rapid analysis of sulfur mustard oxide in plasma using gas chromatography-chemical ionization-mass spectrometry for diagnosis of sulfur mustard exposure, *J. Chromatogr. A.* 1572 (2018) 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.08.035>.
- [37] R.M. Black, R.W. Read, 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.* 759 (1997) 79–92. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00763-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00763-7).
- [38] J.Y. Lee, Y.H. Lee, Solid-Phase Extraction of Sulfur Mustard Metabolites Using an Activated Carbon Fiber Sorbent, *J. Anal. Toxicol.* 40 (2015) 64–71. <https://doi.org/10.1093/jat/bkv112>.
- [39] C.-C. Liu, S.-L. Liu, H.-L. Xi, H.-L. Yu, S.-K. Zhou, G.-L. Huang, L.-H. Liang, J.-Q. Liu, Simultaneous quantification of four metabolites of sulfur mustard in urine samples by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid phase extraction, *J. Chromatogr. A.* 1492 (2017) 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.02.056>.

- [40] C.-Z. Li, J. Chen, Y.-H. Zhong, Y.-X. Zhong, J.-W. Xie, H. Li, Simultaneous Quantification of Thioglycol and Thioglycol Sulfoxide in Rat Plasma by Isotope Dilution-Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, *Chin. J. Anal. Chem.* 40 (2012) 1567–1572.
- [41] M. Qi, B. Xu, J. Wu, Y. Zhang, C. Zong, J. Chen, L. Guo, J. Xie, Simultaneous determination of sulfur mustard and related oxidation products by isotope-dilution LC–MS/MS method coupled with a chemical conversion, *J. Chromatogr. B.* 1028 (2016) 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.06.003>.
- [42] B. Xu, C. Zong, Y. Zhang, T. Zhang, X. Wang, M. Qi, J. Wu, L. Guo, P. Wang, J. Chen, Q. Liu, H. Xu, J. Xie, Z. Zhang, Accumulation of intact sulfur mustard in adipose tissue and toxicokinetics by chemical conversion and isotope-dilution liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Arch. Toxicol.* 91 (2017) 735–747. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1774-z>.
- [43] R.M. Black, R.J. Clarke, R.W. Read, Analysis of 1,1'-sulfonylbis[2-(methylsulfinyl)ethane] and 1-methylsulfinyl-2-[2-(methylthio)ethyl-sulfonyl]ethane, metabolites of sulfur mustard, in urine using gas chromatography-mass spectrometry., *J. Chromatogr. A.* 558 (1991) 405–414. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(91\)80007-4](https://doi.org/10.1016/0021-9673(91)80007-4).
- [44] R.M. Black, R.W. Read, Biological fate of sulfur mustard, 1,1-thiobis(2-chloroethane): identification of β -lyase metabolites and hydrolysis products in human urine., *Xenobiotica.* 25 (1995) 167–173.
- [45] C.L. Young, D. Ash, W.J. Driskell, A.E. Boyer, R.A. Martinez, L.A. Silks, J.R. Barr, A Rapid, Sensitive Method for the Quantitation of Specific Metabolites of Sulfur Mustard in Human Urine Using Isotope-Dilution Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 28 (2004) 339–345. <https://doi.org/10.1093/jat/28.5.339>.
- [46] R.M. Black, D. Noort, Methods for the Retrospective Detection of Exposure to Toxic Scheduled Chemicals. Part A: Analysis of Free Metabolites., in: *Chem. Weapons Conv. Chem. Anal. Sample Collect. Prep. Anal. Methods*, Wiley, Mesilaakso, M., Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ, 2005: pp. 403–431.
- [47] Y. Lin, Y. Dong, J. Chen, C.-Z. Li, Z.-Y. Nie, L. Guo, Q. Liu, J.-W. Xie, Gas chromatographic–tandem mass spectrometric analysis of β -lyase metabolites of sulfur mustard adducts with glutathione in urine and its use in a rabbit cutaneous exposure model, *J. Chromatogr. B.* 945–946 (2014) 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.11.058>.
- [48] J.D. Daly, C.M. O'Hehir, G.M. Frame, A sensitive method for quantitation of β -lyase metabolites of sulfur mustard as 1,1'-sulfonylbis[2-(methylthio)ethane] (SBMTE) in human urine by isotope dilution liquid chromatography–positive ion-electrospray-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.* 850 (2007) 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.11.031>.
- [49] M.K. Reddy, C. Nixon, S.A. Wyatt, T.R. Croley, A robust high-throughput sample preparation and liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the quantitation of β -lyase metabolites of sulfur mustard as 1,1'-sulfonylbis-[2-(methylthio)ethane] in human urine: Quantitation of β -lyase metabolites of sulfur mustard, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27 (2013) 1128–1134. <https://doi.org/10.1002/rcm.6541>.
- [50] R.W. Read, R.M. Black, Analysis of β -lyase Metabolites of Sulfur Mustard in Urine by Electrospray Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 28 (2004) 346–351.
- [51] M. Halme, M. Karjalainen, H. Kiljunen, P. Vanninen, Development and validation of efficient stable isotope dilution LC–HESI–MS/MS method for the verification of β -lyase metabolites in human urine

- after sulfur mustard exposure, *J. Chromatogr. B.* 879 (2011) 908–914. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.02.043>.
- [52] M.J. Bevan, M.T. Wogen, M.D. Lunda, S.A. Saravia, High throughput quantitative analysis of the β -lyase sulfur mustard metabolite, 1,1'-sulfonylbis[2-(methylsulfinyl)ethane] in urine via high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.* 1051 (2017) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.02.030>.
- [53] R.W. Read, R.M. Black, Analysis of the Sulfur Mustard Metabolite 1,1'-Sulfonylbis[2-S-(N-acetylcysteiny)ethane] in Urine by Negative Ion Electrospray Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 28 (2004) 352–356. <https://doi.org/10.1093/jat/28.5.352>.
- [54] R.M. Black, K. Brewster, R.J. Clarke, J.L. Hambrook, J.M. Harrison, D.J. Howells, Biological fate of sulfur mustard, 1,1-thiobis(2-chloroethane): isolation and identification of urinary metabolites following intraperitoneal administration to rat., *Xenobiotica.* 22 (1992) 405–418.
- [55] I.A. Rodin, A.V. Braun, E.I. Savelieva, I.V. Rybalchenko, I.A. Ananieva, O.A. Shpigun, Rapid method for the detection of metabolite of sulfur mustard 1,1'-sulfonylbis[2-S-(N-acetylcysteiny)ethane] in plasma and urine by liquid chromatography-negative electrospray-tandem mass spectrometry, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 34 (2011) 1676–1685. <https://doi.org/10.1080/10826076.2011.578320>.
- [56] R.M. Black, An overview of biological markers of exposure to chemical warfare agents, *J. Anal. Toxicol.* 32 (2008) 2–9.
- [57] D. Noort, A. Fidder, A.G. Hulst, H.P. Benschop, Diagnosis and dosimetry of exposure to sulfur mustard: development of a standard operating procedure for mass spectrometric analysis of haemoglobin adducts: exploratory research on albumin and keratin adducts, *J Appl Toxicol.* (2000) S187–S192.
- [58] B.R. Capacio, J.R. Smith, M.T. DeLion, D.R. Anderson, J.S. Graham, G.E. Platoff, W.D. Korte, Monitoring sulfur mustard exposure by gas chromatography-mass spectrometry analysis of thiodiglycol cleaved from blood proteins, *J. Anal. Toxicol.* 28 (2004) 306–310.
- [59] H.P. Benschop, G.P. Van Der Schans, D. Noort, A. Fidder, R.H. Mars-Groenendijk, L.P.A. De Jong, Verification of Exposure to Sulfur Mustard in Two Casualties of the Iran-Iraq Conflict, *J. Anal. Toxicol.* 21 (1997) 249–251.
- [60] R.J. Lawrence, J.R. Smith, B.L. Boyd, B.R. Capacio, Improvements in the Methodology of Monitoring Sulfur Mustard Exposure by Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of Cleaved and Derivatized Blood Protein Adducts, *J. Anal. Toxicol.* 32 (2008) 31–36. <https://doi.org/10.1093/jat/32.1.31>.
- [61] S.A. Young, B.R. Capacio, Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Verification of Sulfur Mustard Exposure in Humans through the Conversion of Protein Adducts to Free Sulfur Mustard, *Chem. Res. Toxicol.* 33 (2020) 1941–1949. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.0c00134>.
- [62] D. Noort, R.M. Black, Methods for the Retrospective Detection of Exposure to Toxic Scheduled Chemicals. Part B: Mass Spectrometric and Immunochemical Analysis of Covalent Adducts to Proteins and DNA., in: *Chem. Weapons Conv. Chem. Anal. Sample Collect. Prep. Anal. Methods*, Wiley, Mesilaakso, M., Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ, 2005: pp. 433–451.
- [63] H. von Stedingk, S. Osterman-Golkar, M. Törnqvist, Chapter 4. Biomarkers of Exposure: Hemoglobin Adducts, in: L. Knudsen, D.F. Merlo (Eds.), *Issues Toxicol.*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2011: pp. 1–22. <https://doi.org/10.1039/9781849733540-00001>.

- [64] K. Kehe, F. Balszuweit, D. Steinritz, H. Thiermann, Molecular toxicology of sulfur mustard-induced cutaneous inflammation and blistering, *Toxicology*. 263 (2009) 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.01.019>.
- [65] N. Tretyakova, M. Goggin, D. Sangaraju, G. Janis, Quantitation of DNA Adducts by Stable Isotope Dilution Mass Spectrometry, *Chem. Res. Toxicol.* 25 (2012) 2007–2035. <https://doi.org/10.1021/tx3002548>.
- [66] T. Zobel, A. Bürkle, A. Mangerich, Mass spectrometric analysis of sulfur mustard-induced biomolecular adducts: Are DNA adducts suitable biomarkers of exposure?, *Toxicol. Lett.* 293 (2018) 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.12.014>.
- [67] O.I. Orlova, E.I. Savel'eva, G.V. Karakashev, Methods of determination of sulfur yperite–DNA adducts, *J. Anal. Chem.* 72 (2017) 256–263. <https://doi.org/10.1134/S1061934817010099>.
- [68] X. Cheng, C. Liu, Y. Yang, L. Liang, B. Chen, H. Yu, J. Xia, S. Liu, Y. Li, Advances in Sulfur Mustard-induced DNA Adducts: Characterization and Detection, *Toxicol. Lett.* (2021) S0378427421000746. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2021.03.004>.
- [69] D.B. Ludlum, P. Austin-Ritchie, M. Hagopian, T.-Q. Niu, D. Yu, Detection of sulfur mustard-induced DNA modifications, *Chem. Biol. Interact.* 91 (1994) 39–49. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(94\)90005-1](https://doi.org/10.1016/0009-2797(94)90005-1).
- [70] R.C. Gupta, M.V. Reddy, K. Randerath, ³²P-postlabeling analysis of non-radioactive aromatic carcinogen – DNA adducts, *Carcinogenesis*. 3 (1982) 1081–1092. <https://doi.org/10.1093/carcin/3.9.1081>.
- [71] D.H. Phillips, V.M. Arlt, The ³²P-postlabeling assay for DNA adducts, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 2772–2781. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.394>.
- [72] J.J. Klaene, V.K. Sharma, J. Glick, P. Vouros, The analysis of DNA adducts: The transition from ³²P-postlabeling to mass spectrometry, *Cancer Lett.* 334 (2013) 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.08.007>.
- [73] J. Russo, F. Sheriff, R. Lopez de Cicco, T.J. Pogash, T. Nguyen, I.H. Russo, Methodology for studying the compartments of the human breast, in: *Tech. Methodol. Approaches Breast Cancer Res.*, Springer New York, New York, NY, 2014: pp. 75–102.
- [74] T. Niu, Z. Matijasevic, P. Austin-Ritchie, A. Stering, D.B. Ludlum, A ³²P-postlabeling method for the detection of adducts in the DNA of human fibroblasts exposed to sulfur mustard, *Chem. Biol. Interact.* 100 (1996) 77–84. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(96\)03690-3](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(96)03690-3).
- [75] D. Yu, T.Q. Niu, P. Austin-Ritchie, D.B. Ludlum, A ³²P-postlabeling method for detecting unstable N-7-substituted deoxyguanosine adducts in DNA., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91 (1994) 7232–7236. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.15.7232>.
- [76] Base azotée, Base Azotée - Wikipédia. (n.d.). https://fr.wikipedia.org/wiki/Base_azot%C3%A9e (accessed July 5, 2021).
- [77] G.P. van der Schans, A.G. Scheffer, R.H. Mars-Groenendijk, A. Fidler, H.P. Benschop, R.A. Baan, Immunochemical Detection of Adducts of Sulfur Mustard to DNA of Calf Thymus and Human White Blood Cells, *Chem. Res. Toxicol.* 7 (1994) 408–413. <https://doi.org/10.1021/tx00039a019>.
- [78] K. Kehe, V. Schrettl, H. Thiermann, D. Steinritz, Modified immunoslotblot assay to detect hemi and sulfur mustard DNA adducts, *Chem. Biol. Interact.* 206 (2013) 523–528. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.08.001>.

- [79] K. Kehe, H. Müller, F. Balszuweit, D. Steinritz, H. Thiermann, S.M. Klaus, H. Kreppel, New Methods to Detect Sulfur Mustard (SM) and SM-Induced Skin Damage, in: C. Dishovsky, A. Pivovarov (Eds.), Counteraction Chem. Biol. Terror. East Eur. Ctries., Springer Netherlands, Dordrecht, 2009: pp. 127–133. https://doi.org/10.1007/978-90-481-2342-1_17.
- [80] A. Fidder, G.W. Moes, A.G. Scheffer, G.P. van der Schans, R.A. Baan, L.P. de Jong, H.P. Benschop, Synthesis, characterization, and quantitation of the major adducts formed between sulfur mustard and DNA of calf thymus and human blood, *Chem. Res. Toxicol.* 7 (1994) 199–204.
- [81] M.K. Rao, P.S. Bhadury, M. Sharma, R.S. Dangji, A.S. Bhaskar, S.K. Raza, D.K. Jaiswal, A facile methodology for the synthesis and detection of N7-guanine adduct of sulfur mustard as a biomarker, *Can. J. Chem.* 80 (2002) 504–509. <https://doi.org/10.1139/v02-058>.
- [82] W. Yuxia, Y. Lijun, L. Qin, C. Jia, X. Jianwei, A sensitive high performance liquid chromatography–positive electrospray tandem mass spectrometry method for N7-[2-[(2-hydroxyethyl)thio]ethyl]guanine determination, *J. Chromatogr. B.* 879 (2011) 1707–1712. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.03.040>.
- [83] P. Wang, Y. Zhang, J. Chen, L. Guo, B. Xu, L. Wang, H. Xu, J. Xie, Analysis of Different Fates of DNA Adducts in Adipocytes Post-sulfur Mustard Exposure *in Vitro* and *in Vivo* Using a Simultaneous UPLC-MS/MS Quantification Method, *Chem. Res. Toxicol.* 28 (2015) 1224–1233. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00055>.
- [84] L. Yue, Y. Wei, J. Chen, H. Shi, Q. Liu, Y. Zhang, J. He, L. Guo, T. Zhang, J. Xie, S. Peng, Abundance of Four Sulfur Mustard-DNA Adducts *ex Vivo* and *in Vivo* Revealed by Simultaneous Quantification in Stable Isotope Dilution–Ultrahigh Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry, *Chem. Res. Toxicol.* 27 (2014) 490–500. <https://doi.org/10.1021/tx4003403>.
- [85] L. Yue, Y. Zhang, J. Chen, Z. Zhao, Q. Liu, R. Wu, L. Guo, J. He, J. Zhao, J. Xie, S. Peng, Distribution of DNA Adducts and Corresponding Tissue Damage of Sprague–Dawley Rats with Percutaneous Exposure to Sulfur Mustard, *Chem. Res. Toxicol.* 28 (2015) 532–540. <https://doi.org/10.1021/tx5004886>.
- [86] O.I. Orlova, G.V. Karakashev, E.I. Savel'eva, Simultaneous Determination of Sulfur Mustard Adducts with Guanine and Acetylcysteine in Urine by High-Resolution High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry, *J. Anal. Chem.* 75 (2020) 1011–1017. <https://doi.org/10.1134/S1061934820060155>.
- [87] F. M. Carpi, F. Di Pietro, S. Vincenzetti, F. Mignini, V. Napolioni, Human DNA Extraction Methods: Patents and Applications, *Recent Pat. DNA Gene Seq.* 5 (2011) 1–7. <https://doi.org/10.2174/187221511794839264>.
- [88] L. Griffiths, D. Chacon-Cortes, Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives, *J. Biorepository Sci. Appl. Med.* (2014) 1. <https://doi.org/10.2147/BSAM.S46573>.
- [89] S. Park, 3'-Exonuclease resistance of DNA oligodeoxynucleotides containing O6-[4-oxo-4-(3-pyridyl)butyl]guanine, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 1984–1994. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg299>.
- [90] H. Koc, J.A. Swenberg, Applications of mass spectrometry for quantitation of DNA adducts, *J. Chromatogr. B.* 778 (2002) 323–343. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00135-6](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00135-6).
- [91] H.P. Benschop, G.P. Van Der Schans, Verification, Dosimetry, and Biomonitoring of Mustard Gas Exposure via Immunochemical Detection of Mustard Gas Adducts to DNA and Proteins, Prins Maurits Laboratorium Tno Rijswijk (Netherlands), 1993.

- [92] M. Törnqvist, C. Fred, J. Haglund, H. Helleberg, B. Paulsson, P. Rydberg, Protein adducts: quantitative and qualitative aspects of their formation, analysis and applications, *J. Chromatogr. B.* 778 (2002) 279–308. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00172-1](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00172-1).
- [93] B. Meloun, L. Morávek, V. Kostka, Complete amino acid sequence of human serum albumin, *FEBS Lett.* 58 (1975) 134–137. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(75\)80242-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(75)80242-0).
- [94] W.E. Bechtold, J.K. Willis, J.D. Sun, W.C. Griffith, T.V. Reddy, Biological markers of exposure to benzene: 5-phenylcysteine in albumin, *Carcinogenesis.* 13 (1992) 1217–1220. <https://doi.org/10.1093/carcin/13.7.1217>.
- [95] D. Noort, A.G. Hulst, L.P. de Jong, H.P. Benschop, Alkylation of human serum albumin by sulfur mustard in vitro and in vivo: mass spectrometric analysis of a cysteine adduct as a sensitive biomarker of exposure, *Chem. Res. Toxicol.* 12 (1999) 715–721.
- [96] D. Noort, A. Fidder, A.G. Hulst, A.R. Woolfitt, D. Ash, J.R. Barr, Retrospective Detection of Exposure to Sulfur Mustard: Improvements on an Assay for Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis of Albumin/Sulfur Mustard Adducts, *J. Anal. Toxicol.* 28 (2004) 333–338. <https://doi.org/10.1093/jat/28.5.333>.
- [97] T.-H. Yeo, M.-L. Ho, W.-K. Loke, Development of a Liquid Chromatography-Multiple Reaction Monitoring Procedure for Concurrent Verification of Exposure to Different Forms of Mustard Agents, *J. Anal. Toxicol.* 32 (2008) 51–56. <https://doi.org/10.1093/jat/32.1.51>.
- [98] D. Noort, A. Fidder, C. Degenhardt-Langelaan, A.G. Hulst, Retrospective detection of sulfur mustard exposure by mass spectrometric analysis of adducts to albumin and hemoglobin: an in vivo study, *J. Anal. Toxicol.* 32 (2008) 25–30.
- [99] T.M. Andacht, B.G. Pantazides, B.S. Crow, A. Fidder, D. Noort, J.D. Thomas, T.A. Blake, R.C. Johnson, An Enhanced Throughput Method for Quantification of Sulfur Mustard Adducts to Human Serum Albumin Via Isotope Dilution Tandem Mass Spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 38 (2014) 8–15. <https://doi.org/10.1093/jat/bkt088>.
- [100] C. Liu, L. Liang, Y. Xiang, H. Yu, S. Zhou, H. Xi, S. Liu, J. Liu, An improved method for retrospective quantification of sulfur mustard exposure by detection of its albumin adduct using ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 7037–7046. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8842-8>.
- [101] B.G. Pantazides, B.S. Crow, J.W. Garton, J.A. Quiñones-González, T.A. Blake, J.D. Thomas, R.C. Johnson, Simplified Method for Quantifying Sulfur Mustard Adducts to Blood Proteins by Ultrahigh Pressure Liquid Chromatography–Isotope Dilution Tandem Mass Spectrometry, *Chem. Res. Toxicol.* 28 (2015) 256–261. <https://doi.org/10.1021/tx500468h>.
- [102] A.V. Braun, I.V. Rybal'chenko, M.A. Ponsov, Ya.V. Stavitskaya, L.A. Tikhomirov, A.P. Grechukhin, Optimization of a method for the determination of a mustard gas biomarker in human blood plasma by liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry, *J. Anal. Chem.* 72 (2017) 303–308. <https://doi.org/10.1134/S1061934817030030>.
- [103] C.L. Young, A.R. Woolfitt, L.G. McWilliams, H. Moura, A.E. Boyer, J.R. Barr, Survey of albumin purification methods for the analysis of albumin-organic toxicant adducts by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry, *Proteomics.* 5 (2005) 4973–4979. <https://doi.org/10.1002/pmic.200402081>.

- [104] F. Gandor, M. Gawlik, H. Thiermann, H. John, Evidence of Sulfur Mustard Exposure in Human Plasma by LC-ESI-MS-MS Detection of the Albumin-Derived Alkylated HETE-CP Dipeptide and Chromatographic Investigation of Its Cis/Trans Isomerism, *J. Anal. Toxicol.* 39 (2015) 270–279. <https://doi.org/10.1093/jat/bkv010>.
- [105] H. John, M. Siegert, F. Gandor, M. Gawlik, A. Kranawetvogl, K. Karaghiosoff, H. Thiermann, Optimized verification method for detection of an albumin-sulfur mustard adduct at Cys34 using a hybrid quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometer after direct plasma proteolysis, *Toxicol. Lett.* 244 (2016) 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.09.027>.
- [106] J. Carol-Visser, M. van der Schans, A. Fidder, A.G. Hulst, B.L.M. van Baar, H. Irth, D. Noort, Development of an automated on-line pepsin digestion–liquid chromatography–tandem mass spectrometry configuration for the rapid analysis of protein adducts of chemical warfare agents, *J. Chromatogr. B.* 870 (2008) 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.06.008>.
- [107] W.E. Funk, H. Li, A.T. Iavarone, E.R. Williams, J. Riby, S.M. Rappaport, Enrichment of cysteinyl adducts of human serum albumin, *Anal. Biochem.* 400 (2010) 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.01.006>.
- [108] G.P. van der Schans, D. Noort, R.H. Mars-Groenendijk, A. Fidder, L.F. Chau, L.P.A. de Jong, H.P. Benschop, Immunochemical Detection of Sulfur Mustard Adducts with Keratins in the Stratum Corneum of Human Skin, *Chem. Res. Toxicol.* 15 (2002) 21–25. <https://doi.org/10.1021/tx0100136>.
- [109] E.N. Marieb, *Anatomie et physiologie humaines*, 6ème édition, Pearson France, Paris, 2005.
- [110] R.M. Black, J.M. Harrison, R.W. Read, Biological fate of sulphur mustard: in vitro alkylation of human haemoglobin by sulfur mustard., *Xenobiotica.* 27 (1997) 11–32. <https://doi.org/10.1080/004982597240730>.
- [111] A. Fidder, D. Noort, A.L. de Jong, H.C. Trap, L.P. de Jong, H.P. Benschop, Monitoring of in vitro and in vivo exposure to sulfur mustard by GC/MS determination of the N-terminal valine adduct in hemoglobin after a modified Edman degradation, *Chem. Res. Toxicol.* 9 (1996) 788–792.
- [112] R.M. Black, R.J. Clarke, J.M. Harrison, R.W. Read, Biological fate of sulphur mustard: identification of valine and histidine adducts in haemoglobin from casualties of sulphur mustard poisoning, *Xenobiotica.* 27 (1997) 499–512. <https://doi.org/10.1080/004982597240460>.
- [113] C.T. Andrade, L.A.M. Barros, M.C.P. Lima, E.G. Azero, Purification and characterization of human hemoglobin: effect of the hemolysis conditions, *Int. J. Biol. Macromol.* 34 (2004) 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2004.05.003>.
- [114] S.R.K. Vanjari, I. Deepthi, K. Sandeep, B. Amrutur, N. Bhat, S. Srinivasan, Bufferless lysis of erythrocytes for isolation of hemoglobin using modified cellulose acetate membranes, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 17 (2012) 309–315. <https://doi.org/10.1007/s12257-011-0452-5>.
- [115] J. Mowrer, M. Törnqvist, S. Jensen, L. Ehrenberg, Modified Edman degradation applied to hemoglobin for monitoring occupational exposure to alkylating agents, *Toxicol. Environ. Chem.* 11 (1986) 215–231. <https://doi.org/10.1080/02772248609357133>.
- [116] E. Bailey, A.G. Brooks, C.T. Dollery, P.B. Farmer, B.J. Passingham, M.A. Sleightholm, D.W. Yates, Hydroxyethylvaline adduct formation in haemoglobin as a biological monitor of cigarette smoke intake, *Arch. Toxicol.* 62 (1988) 247–253.

- [117] F. Frantzen, K. Grimsrud, D.-E. Heggli, E. Sundrehagen, Selective precipitation of human hemoglobin by organic solvents and metal cations, *Hemoglobin*. 21 (1997) 155–172.
- [118] J. Elmer, D. Harris, A.F. Palmer, Purification of Hemoglobin from Red Blood Cells using Tangential Flow Filtration and Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography, *J. Chromatogr. B*. 879 (2011) 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.11.021>.
- [119] D. Noort, H.P. Benschop, R.M. Black, Biomonitoring of Exposure to Chemical Warfare Agents: A Review, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 184 (2002) 116–126. <https://doi.org/10.1006/taap.2002.9449>.
- [120] M. Törnqvist, J. Mowrer, S. Jensen, L. Ehrenberg, Monitoring of environmental cancer initiators through hemoglobin adducts by a modified Edman degradation method, *Anal. Biochem.* 154 (1986) 255–266.
- [121] Z. Nie, Q. Liu, J. Xie, Improvements in monitoring the N-terminal valine adduct in human globin after exposure to sulfur mustard and synthesis of reference chemicals, *Talanta*. 85 (2011) 1154–1159. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.05.041>.
- [122] H. von Stedingk, P. Rydberg, M. Törnqvist, A new modified Edman procedure for analysis of N-terminal valine adducts in hemoglobin by LC–MS/MS, *J. Chromatogr. B*. 878 (2010) 2483–2490. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.03.034>.
- [123] P. Rydberg, H. von Stedingk, J. Magnér, J. Björklund, LC/MS/MS Analysis of N-Terminal Protein Adducts with Improved Sensitivity: A Comparison of Selected Edman Isothiocyanate Reagents, *Int. J. Anal. Chem.* 2009 (2009) 1–13. <https://doi.org/10.1155/2009/153472>.
- [124] H. von Stedingk, A.C. Vikström, P. Rydberg, M. Pedersen, J.K.S. Nielsen, D. Segerbäck, L.E. Knudsen, M. Törnqvist, Analysis of Hemoglobin Adducts from Acrylamide, Glycidamide, and Ethylene Oxide in Paired Mother/Cord Blood Samples from Denmark, *Chem. Res. Toxicol.* 24 (2011) 1957–1965. <https://doi.org/10.1021/tx200284u>.
- [125] H. Carlsson, H. von Stedingk, U. Nilsson, M. Törnqvist, LC–MS/MS Screening Strategy for Unknown Adducts to N-Terminal Valine in Hemoglobin Applied to Smokers and Nonsmokers, *Chem. Res. Toxicol.* 27 (2014) 2062–2070. <https://doi.org/10.1021/tx5002749>.
- [126] H. Carlsson, M. Törnqvist, Strategy for identifying unknown hemoglobin adducts using adductome LC-MS/MS data: Identification of adducts corresponding to acrylic acid, glyoxal, methylglyoxal, and 1-octen-3-one, *Food Chem. Toxicol.* 92 (2016) 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.03.028>.
- [127] H. Carlsson, H.V. Motwani, S. Osterman Golkar, M. Törnqvist, Characterization of a Hemoglobin Adduct from Ethyl Vinyl Ketone Detected in Human Blood Samples, *Chem. Res. Toxicol.* 28 (2015) 2120–2129. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00287>.
- [128] J. Hielscher, B.H. Monien, K. Abraham, S. Jessel, A. Seidel, A. Lampen, An isotope-dilution UPLC–MS/MS technique for the human biomonitoring of the internal exposure to glycidol via a valine adduct at the N-terminus of hemoglobin, *J. Chromatogr. B*. 1059 (2017) 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.05.022>.
- [129] D. Noort, A.G. Hulst, H.C. Trap, L.P. de Jong, H.P. Benschop, Synthesis and mass spectrometric identification of the major amino acid adducts formed between sulphur mustard and haemoglobin in human blood, *Arch. Toxicol.* 71 (1997) 171–178.
- [130] E. Bergmark, M. Belew, S. Osterman-Golkar, T. Brekke, K. Maartmann-Moe, H.H. Tønnesen, T. Tokii, Separation and Enrichment of Alkylated Globin Chains as a Means of Improving the Sensitivity of

- Hemoglobin Adduct Measurements., *Acta Chem. Scand.* 44 (1990) 630–635. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.44-0630>.
- [131] F. Hallez, A. Combès, C. Desoubries, A. Bossée, V. Pichon, Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the analysis of tryptic digest of human hemoglobin exposed to sulfur mustard, *J. Chromatogr. B.* (2020) 122518. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122518>.
- [132] A.C. Vikström, M. Warholm, B. Paulsson, A. Axmon, E. Wirfält, M. Törnqvist, Hemoglobin adducts as a measure of variations in exposure to acrylamide in food and comparison to questionnaire data, *Food Chem. Toxicol.* 50 (2012) 2531–2539. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.04.004>.
- [133] A. Cingöz, F. Hugon-Chapuis, V. Pichon, Evaluation of various immobilized enzymatic microreactors coupled on-line with liquid chromatography and mass spectrometry detection for quantitative analysis of cytochrome c, *J. Chromatogr. A.* 1209 (2008) 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.08.120>.
- [134] F. Brothier, Développement d'outils bioanalytiques miniaturisés: greffage de biomolécules sur monolithes en capillaire couplés à la nanochromatographie pour l'analyse d'échantillons complexes, PhD Thesis, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, 2014.
- [135] M. Safdar, J. Sproß, J. Jänis, Microscale immobilized enzyme reactors in proteomics: Latest developments, *J. Chromatogr. A.* 1324 (2014) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.11.045>.
- [136] M. Naldi, A. Tramarin, M. Bartolini, Immobilized enzyme-based analytical tools in the -omics era: Recent advances, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 160 (2018) 222–237. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.07.051>.
- [137] L. Hedstrom, Serine Protease Mechanism and Specificity, *Chem. Rev.* 102 (2002) 4501–4524. <https://doi.org/10.1021/cr000033x>.
- [138] N. Jehmlich, C. Golatowski, A. Murr, G. Salazar, V.M. Dhople, E. Hammer, U. Völker, Comparative evaluation of peptide desalting methods for salivary proteome analysis, *Clin. Chim. Acta.* 434 (2014) 16–20. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.04.003>.
- [139] A. Tanaka, T. Tosa, T. Kobayashi, eds., *Industrial application of immobilized biocatalysts*, Dekker, New York, 1993.
- [140] J.M. Nelson, E.G. Griffin, ADSORPTION OF INVERTASE., *J. Am. Chem. Soc.* 38 (1916) 1109–1115. <https://doi.org/10.1021/ja02262a018>.
- [141] S. Gondo, H. Koya, Solubilized collagen fibril as a supporting material for enzyme immobilization, *Biotechnol. Bioeng.* 20 (1978) 2007–2010. <https://doi.org/10.1002/bit.260201213>.
- [142] K.A. Cobb, Milos. Novotny, High-sensitivity peptide mapping by capillary zone electrophoresis and microcolumn liquid chromatography using immobilized trypsin for protein digestion, *Anal. Chem.* 61 (1989) 2226–2231. <https://doi.org/10.1021/ac00195a003>.
- [143] H. Zhou, Z. Ning, F. Wang, D. Seebun, D. Figeys, Proteomic reactors and their applications in biology: Developments and applications of proteomic reactor, *FEBS J.* 278 (2011) 3796–3806. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08292.x>.
- [144] S. Perchepied, Nouveaux outils miniaturisés pour l'analyse de biomolécules dans des fluides biologiques, PhD Thesis, Sorbonne Université, 2020.

- [145] P.L. Urban, D.M. Goodall, N.C. Bruce, Enzymatic microreactors in chemical analysis and kinetic studies, *Biotechnol. Adv.* 24 (2006) 42–57. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.06.001>.
- [146] A.M. Girelli, E. Mattei, Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review, *J. Chromatogr. B.* 819 (2005) 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.01.031>.
- [147] G. Massolini, E. Calleri, Immobilized trypsin systems coupled on-line to separation methods: Recent developments and analytical applications, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 7–21. <https://doi.org/10.1002/jssc.200401941>.
- [148] J. Krenkova, F. Foret, Immobilized microfluidic enzymatic reactors, *ELECTROPHORESIS.* 25 (2004) 3550–3563. <https://doi.org/10.1002/elps.200406096>.
- [149] J. Ma, L. Zhang, Z. Liang, Y. Shan, Y. Zhang, Immobilized enzyme reactors in proteomics, *TrAC Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 691–702. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.12.008>.
- [150] A. Monzo, E. Sperling, A. Guttman, Proteolytic enzyme-immobilization techniques for MS-based protein analysis, *TrAC Trends Anal. Chem.* 28 (2009) 854–864. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.03.002>.
- [151] K. Oda, New families of carboxyl peptidases: serine-carboxyl peptidases and glutamic peptidases, *J. Biochem. (Tokyo)*. 151 (2012) 13–25. <https://doi.org/10.1093/jb/mvr129>.
- [152] B. Keil, Essential Substrate Residues for Action of Endopeptidases, in: *Specif. Proteolysis*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1992: pp. 43–228. https://doi.org/10.1007/978-3-642-48380-6_5.
- [153] S. Koutsopoulos, K. Patzsch, W.T.E. Bosker, W. Norde, Adsorption of Trypsin on Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces, *Langmuir.* 23 (2007) 2000–2006. <https://doi.org/10.1021/la062238s>.
- [154] S. Datta, L.R. Christena, Y.R.S. Rajaram, Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials, *3 Biotech.* 3 (2013) 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>.
- [155] A.C. Pierre, The sol-gel encapsulation of enzymes, *Biocatal. Biotransformation.* 22 (2004) 145–170. <https://doi.org/10.1080/10242420412331283314>.
- [156] T. Šlechtová, M. Gilar, K. Kalíková, S.M. Moore, J.W. Jorgenson, E. Tesařová, Performance comparison of three trypsin columns used in liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1490 (2017) 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.02.024>.
- [157] J.S. Hoos, H. Sudergat, J.-P. Hoelck, M. Stahl, J.S.B. de Vlieger, W.M.A. Niessen, H. Lingeman, H. Irth, Selective quantitative bioanalysis of proteins in biological fluids by on-line immunoaffinity chromatography–protein digestion–liquid chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.* 830 (2006) 262–269. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.11.002>.
- [158] R. Nicoli, S. Rudaz, C. Stella, J.-L. Veuthey, Trypsin immobilization on an ethylenediamine-based monolithic minidisk for rapid on-line peptide mass fingerprinting studies, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 2695–2699. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.046>.
- [159] R. Nicoli, N. Gaud, C. Stella, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, Trypsin immobilization on three monolithic disks for on-line protein digestion, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 398–407. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.12.022>.

- [160] G. Vecchione, B. Casetta, R. Santacroce, M. Margaglione, A comprehensive on-line digestion-liquid chromatography/mass spectrometry/collision-induced dissociation mass spectrometry approach for the characterization of human fibrinogen, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 1383–1390. <https://doi.org/10.1002/rcm.355>.
- [161] J. Samskog, D. Bylund, S.P. Jacobsson, K.E. Markides, Miniaturized on-line proteolysis–capillary liquid chromatography–mass spectrometry for peptide mapping of lactate dehydrogenase, *J. Chromatogr. A.* 998 (2003) 83–91. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00647-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00647-2).
- [162] J. Gobom, E. Nordhoff, R. Ekman, P. Roepstorff, Rapid micro-scale proteolysis of proteins for MALDI-MS peptide mapping using immobilized trypsin, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* 169–170 (1997) 153–163. [https://doi.org/10.1016/S0168-1176\(97\)00216-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1176(97)00216-4).
- [163] J. Pedroche, M. del Mar Yust, C. Mateo, R. Fernández-Lafuente, J. Girón-Calle, M. Alaiz, J. Vioque, J.M. Guisán, F. Millán, Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme–support linkages and thermal stability, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 1160–1166. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.08.023>.
- [164] B.C.C. Pessela, G. Dellamora-Ortiz, L. Betancor, M. Fuentes, J.M. Guisán, R. Fernandez-Lafuente, Modulation of the catalytic properties of multimeric β -galactosidase from *E. coli* by using different immobilization protocols, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 310–315. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.04.015>.
- [165] E. Kurimoto, T. Harada, A. Akiyama, T. Sakai, K. Kato, In Vitro Refolding of Porcine Pepsin Immobilized on Agarose Beads, *J. Biochem. (Tokyo)*. 130 (2001) 295–297. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a002985>.
- [166] J.R. Freije, P.P.M.F.A. Mulder, W. Werkman, L. Rieux, H.A.G. Niederlander, E. Verpoorte, R. Bischoff, Chemically Modified, Immobilized Trypsin Reactor with Improved Digestion Efficiency, *J. Proteome Res.* 4 (2005) 1805–1813. <https://doi.org/10.1021/pr050142y>.
- [167] R. Freije, T. Klein, B. Ooms, H.F. Kauffman, R. Bischoff, An integrated high-performance liquid chromatography–mass spectrometry system for the activity-dependent analysis of matrix metalloproteases, *J. Chromatogr. A.* 1189 (2008) 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.059>.
- [168] J. Vukovic, H. Loftheim, B. Winther, J.L.E. Reubsæet, Improving off-line accelerated tryptic digestion, *J. Chromatogr. A.* 1195 (2008) 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.05.010>.
- [169] H.-J. Hsieh, P.-C. Liu, W.-J. Liao, Immobilization of invertase via carbohydrate moiety on chitosan to enhance its thermal stability, *Biotechnol. Lett.* 22 (2000) 1459–1464. <https://doi.org/10.1023/A:1005602812037>.
- [170] S.J. Kim, S.R. Shin, Y.M. Lee, S.I. Kim, Swelling characterizations of chitosan and polyacrylonitrile semi-interpenetrating polymer network hydrogels, *J. Appl. Polym. Sci.* 87 (2003) 2011–2015. <https://doi.org/10.1002/app.11699>.
- [171] M. Bonichon, A. Combès, C. Desoubries, A. Bossée, V. Pichon, Development of immobilized-pepsin microreactors coupled to nano liquid chromatography and tandem mass spectrometry for the quantitative analysis of human butyrylcholinesterase, *J. Chromatogr. A.* 1461 (2016) 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.07.058>.

- [172] H. Ehring, Hydrogen Exchange/Electrospray Ionization Mass Spectrometry Studies of Structural Features of Proteins and Protein/Protein Interactions, *Anal. Biochem.* 267 (1999) 252–259. <https://doi.org/10.1006/abio.1998.3000>.
- [173] M.T. Cancilla, M.D. Leavell, J. Chow, J.A. Leary, Mass spectrometry and immobilized enzymes for the screening of inhibitor libraries, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 (2000) 12008–12013. <https://doi.org/10.1073/pnas.220403997>.
- [174] A. Cingöz, Analyse d'une protéine ciblée par immunoaffinité et digestion sur micro-réacteur enzymatique couplés en ligne à une analyse par chromatographie liquide et spectrométrie de masse: synthèse, caractérisation et miniaturisation des outils bioanalytiques, PhD Thesis, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, 2009.
- [175] G. Marie, L. Serani, O. Laprévotte, An On-Line Protein Digestion Device for Rapid Peptide Mapping by Electrospray Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 72 (2000) 5423–5430. <https://doi.org/10.1021/ac000421z>.
- [176] C. Zhao, H. Jiang, D.R. Smith, S. Bruckenstein, T.D. Wood, Integration of an on-line protein digestion microreactor to a nanoelectrospray emitter for peptide mapping, *Anal. Biochem.* 359 (2006) 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.09.005>.
- [177] G.W. Slysz, D.C. Schriemer, Blending Protein Separation and Peptide Analysis through Real-Time Proteolytic Digestion, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1572–1579. <https://doi.org/10.1021/ac048698c>.
- [178] L. Geiser, S. Eeltink, F. Svec, J.M.J. Fréchet, In-line system containing porous polymer monoliths for protein digestion with immobilized pepsin, peptide preconcentration and nano-liquid chromatography separation coupled to electrospray ionization mass spectroscopy, *J. Chromatogr. A.* 1188 (2008) 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.02.075>.
- [179] S. Feng, M. Ye, X. Jiang, W. Jin, H. Zou, Coupling the Immobilized Trypsin Microreactor of Monolithic Capillary with μ RPLC-MS/MS for Shotgun Proteome Analysis, *J. Proteome Res.* 5 (2006) 422–428. <https://doi.org/10.1021/pr0502727>.
- [180] S. Canarelli, I. Fisch, R. Freitag, Hyphenation of multi-dimensional chromatography and mass spectrometry for the at-line-analysis of the integrity of recombinant protein drugs, *J. Chromatogr. B.* 775 (2002) 27–35. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00286-6](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00286-6).
- [181] S. Hara, V. Katta, H.S. Lu, Peptide map procedure using immobilized protease cartridges in tandem for disulfide linkage identification of neu differentiation factor epidermal growth factor domain, *J. Chromatogr. A.* 867 (2000) 151–160. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)01110-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)01110-3).
- [182] J. Carol, M.C.J.K. Gorseling, C.F. de Jong, H. Lingeman, C.E. Kientz, B.L.M. van Baar, H. Irth, Determination of denaturated proteins and biotoxins by on-line size-exclusion chromatography–digestion–liquid chromatography–electrospray mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 346 (2005) 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.08.023>.
- [183] S. Moore, S. Hess, J. Jorgenson, Characterization of an immobilized enzyme reactor for on-line protein digestion, *J. Chromatogr. A.* 1476 (2016) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.11.021>.
- [184] R.M. Schoenherr, M. Ye, M. Vannatta, N.J. Dovichi, CE-Microreactor-CE-MS/MS for Protein Analysis, *Anal. Chem.* 79 (2007) 2230–2238. <https://doi.org/10.1021/ac061638h>.

- [185] S. Mou, L. Sun, R. Wojcik, N.J. Dovichi, Coupling immobilized alkaline phosphatase-based automated diagonal capillary electrophoresis to tandem mass spectrometry for phosphopeptide analysis, *Talanta*. 116 (2013) 985–990. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.08.001>.
- [186] A. De Simone, F. Mancini, S. Cosconati, L. Marinelli, V. La Pietra, E. Novellino, V. Andrisano, Human recombinant beta-secretase immobilized enzyme reactor for fast hits' selection and characterization from a virtual screening library, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 73 (2013) 131–134. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.03.006>.
- [187] S. Percepied, N. Eskenazi, C. Giangrande, J. Camperi, T. Fournier, J. Vinh, N. Delaunay, V. Pichon, Development of Immobilized Enzyme Reactors for the characterization of the glycosylation heterogeneity of a protein, *Talanta*. 206 (2020) 120171. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120171>.
- [188] A. De Simone, M. Naldi, M. Bartolini, L. Davani, V. Andrisano, Immobilized Enzyme Reactors: an Overview of Applications in Drug Discovery from 2008 to 2018, *Chromatographia*. 82 (2019) 425–441. <https://doi.org/10.1007/s10337-018-3663-5>.
- [189] M. Bonichon, V. Valbi, A. Combès, C. Desoubries, A. Bossée, V. Pichon, Online coupling of immunoextraction, digestion, and microliquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of sarin and soman-butrylcholinesterase adducts in human plasma, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 1039–1051. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0640-z>.
- [190] M. Bonichon, A. Combès, C. Desoubries, A. Bossée, V. Pichon, Development of immunosorbents coupled on-line to immobilized pepsin reactor and micro liquid chromatography–tandem mass spectrometry for analysis of butrylcholinesterase in human plasma, *J. Chromatogr. A*. 1526 (2017) 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.033>.
- [191] P.K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid', *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76–85.
- [192] F. Hallez, A. Combès, C. Desoubries, A. Bossée, V. Pichon, Development of an immobilized-trypsin reactor coupled to liquid chromatography and tandem mass spectrometry for the analysis of human hemoglobin adducts with sulfur mustard, *J. Chromatogr. B*. (submitted).
- [193] F. Zhang, K.A. Brzak, L.H. Pottenger, M.J. Bartels, Direct quantitation of hydroxyethylvaline in hemoglobin by liquid chromatography/positive electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*. 1248 (2012) 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.019>.

RESUME

L'ypérite est un agent de guerre fortement vésicant pouvant réagir avec les protéines sanguines, notamment l'hémoglobine, pour former des adduits hydroxyéthylthioéthyl (HETE) stables. Ces adduits peuvent être utilisés comme biomarqueurs de longue durée de vie puisqu'ils peuvent être détectés dans l'organisme jusqu'à 120 jours après une exposition à cet agent. Leur analyse est principalement réalisée après une procédure de séquençage de la protéine (dégradation d'Edman modifiée), qui cible uniquement les adduits formés avec les valines N-terminales des chaînes de globines α et β composant l'hémoglobine. Cependant, cette méthode est très chronophage et laborieuse à mettre en œuvre, en plus de manquer de sensibilité et de répétabilité. De plus, le composé obtenu à l'issue du séquençage de l'hémoglobine requiert souvent une étape de dérivation afin de pouvoir être analysé par chromatographie liquide ou gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Par ailleurs, l'alkylation sur les valines N-terminales ne représente que 1 à 2% de l'alkylation totale induite au niveau de l'hémoglobine lors d'une exposition à l'ypérite et l'analyse de digestats tryptiques a démontré que l'alkylation pouvait également se faire au niveau d'autres résidus. Une nouvelle approche analytique a donc été développée au cours de cette thèse pour déterminer rétrospectivement une exposition à l'ypérite. Elle repose sur le développement d'une étape de digestion de la protéine exposée *in vitro* à l'ypérite sur un réacteur enzymatique immobilisé (IMER) à base de trypsine, couplé en ligne avec l'analyse des peptides alkylés résultants par LC-MS/MS, ce qui permet ainsi de limiter les manipulations des échantillons mais également de réduire la durée de l'étape de digestion enzymatique. Cette procédure a permis d'identifier cinq nouveaux sites d'adduction jamais mentionnés auparavant, et s'est avérée répétable et linéaire sur la gamme de concentration étudiée. Après développement et optimisation d'une étape de préparation des échantillons pour extraire l'hémoglobine du sang total et la purifier en amont de la digestion enzymatique, la procédure a été appliquée dans son intégralité à l'analyse d'échantillons sanguins dopés à l'ypérite. La durée totale de la procédure est inférieure à 7h, contre 2,5 jours pour l'étape de préparation des échantillons seule avec la méthode de séquençage usuelle. Des peptides alkylés spécifiques résultant de l'exposition du sang total à une teneur en ypérite de 14 ng.mL^{-1} ont pu être détectés, soulignant ainsi la sensibilité de la méthode analytique développée, et les sites préférentiels d'adduction de l'ypérite sur l'hémoglobine en milieu biologique ont été identifiés.

ABSTRACT

Sulfur mustard is a highly vesicant chemical agent that can react with blood proteins, especially hemoglobin, to form stable hydroxyethylthioethyl (HETE) adducts. These adducts can be used as long-lived biomarkers since they can be detected in the organism up to 120 days after exposure to the agent. Their analysis is mainly carried out by a sequencing procedure of the protein (modified Edman degradation), that only targets the adducts formed with the N-terminal valine residues of both globin α and globin β chains that compose hemoglobin. However, this method is time-consuming and laborious, in addition to lack sensitivity and repeatability. Moreover, alkylation on the N-terminal valine residues only represents 1-2% of the total alkylation induced on hemoglobin, and the analysis of tryptic digests showed that the alkylation could also occur on other residues. A new approach was thus developed in this thesis for the retrospective detection of exposure to sulfur mustard. This approach is based on the development of a digestion step of the protein *in vitro* exposed to sulfur mustard, using a trypsin-based immobilized enzyme reactor (IMER) coupled on-line with the LC-MS/MS analysis of the alkylated peptides, which limits samples handling and reduces the digestion duration. This procedure allowed to identify five new adduction sites that had never been mentioned previously, and proved to be repeatable and linear on the concentration range studied. After development and optimization of a sample treatment step to extract hemoglobin from blood samples and purify the protein before the enzymatic digestion, the procedure was applied to the analysis of blood samples spiked with sulfur mustard. The total duration of the procedure is inferior to 7h, against 2.5 days for the sample treatment alone with the conventional sequencing method. Specific alkylated peptides resulting from the exposure of blood samples to sulfur mustard at 14 ng.mL^{-1} were detected, thus highlighting the sensitivity of the developed analytical procedure, and the main adduction sites of sulfur mustard on hemoglobin in the biological matrix were identified.