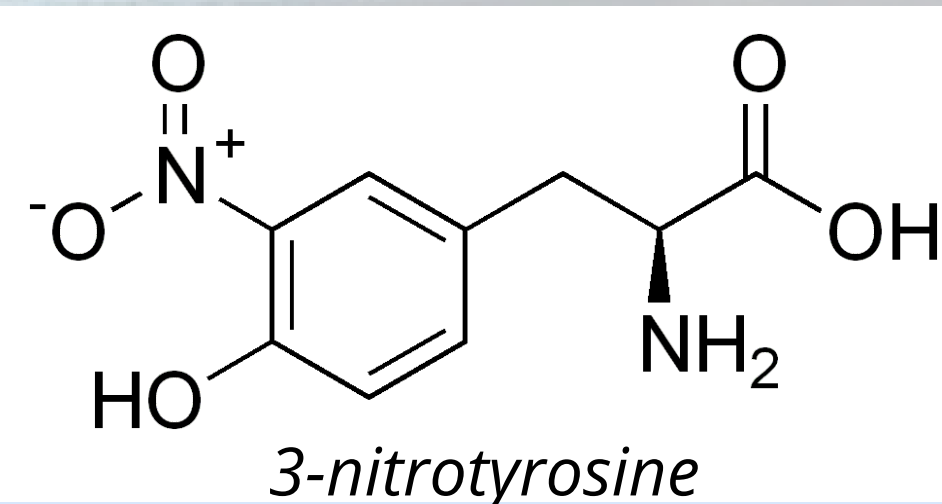


Développement du dosage plasmatique d'un marqueur innovant dans le cadre de l'intoxication au protoxyde d'azote : la 3-nitrotyrosine

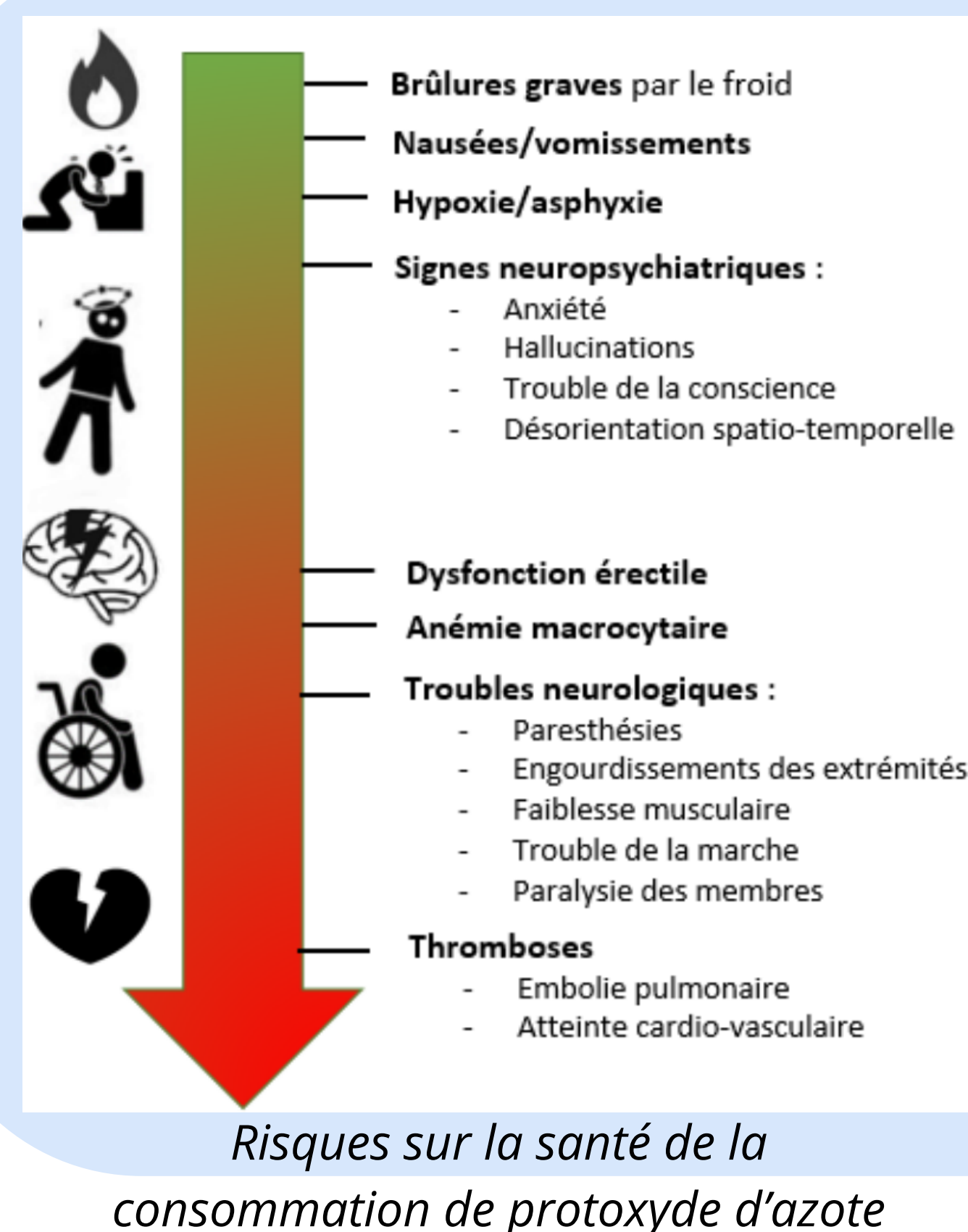
Contextualisation



C. Descamps¹, V. Masso¹, P. Raymond¹, A.F. Dessein¹, F. Zerimech¹, G. Grzych¹

¹ CHU de Lille, Service d'Hormonologie Métabolisme Nutrition Oncologie, 59600 Lille, France

clarence1.descamps@chu-lille.fr



La consommation récréative de protoxyde d'azote (N₂O) est devenue un problème majeur de santé publique. Le nombre d'hospitalisations en lien avec cette intoxication ainsi que le nombre d'accidents de la route ne fait que croître.

Cette consommation provoque de nombreux effets indésirables neurologiques et cardio-vasculaires qui peuvent parfois être grave et irréversibles. Il est donc nécessaire de pouvoir réaliser un diagnostic et un suivi.

Le dosage direct du N₂O est complexe. Les marqueurs métaboliques utilisés, reflet de l'altération de la voie des cobalamines par le N₂O, sont l'homocystéine et l'acide méthylmalonique mais ils ne sont pas spécifiques de cette intoxication.



Modes de consommation du protoxyde d'azote

Objectif :

Optimisation d'une méthode pour évaluer un possible marqueur de l'intoxication au N₂O

Le N₂O étant un puissant oxydant, nous nous intéressons donc aux marqueurs de stress nitrosant, en particulier la 3-nitrotyrosine (3NT). Nous souhaitons développer le dosage plasmatique de la 3NT par LC-MS/MS.

Matériels et méthodes

Optimisation de la séparation chromatographique	Phase mobile avec de l'acide formique (1)	Phase mobile avec de l'acide acétique (2)
Optimisation de la purification des échantillons	Précipitation des protéines à l'acétonitrile (ACN) (3)	Purification par Solide Phase Extraction (SPE) C18 à différents pH (4)



LC-MS/MS : Xevo TQ-XS Waters

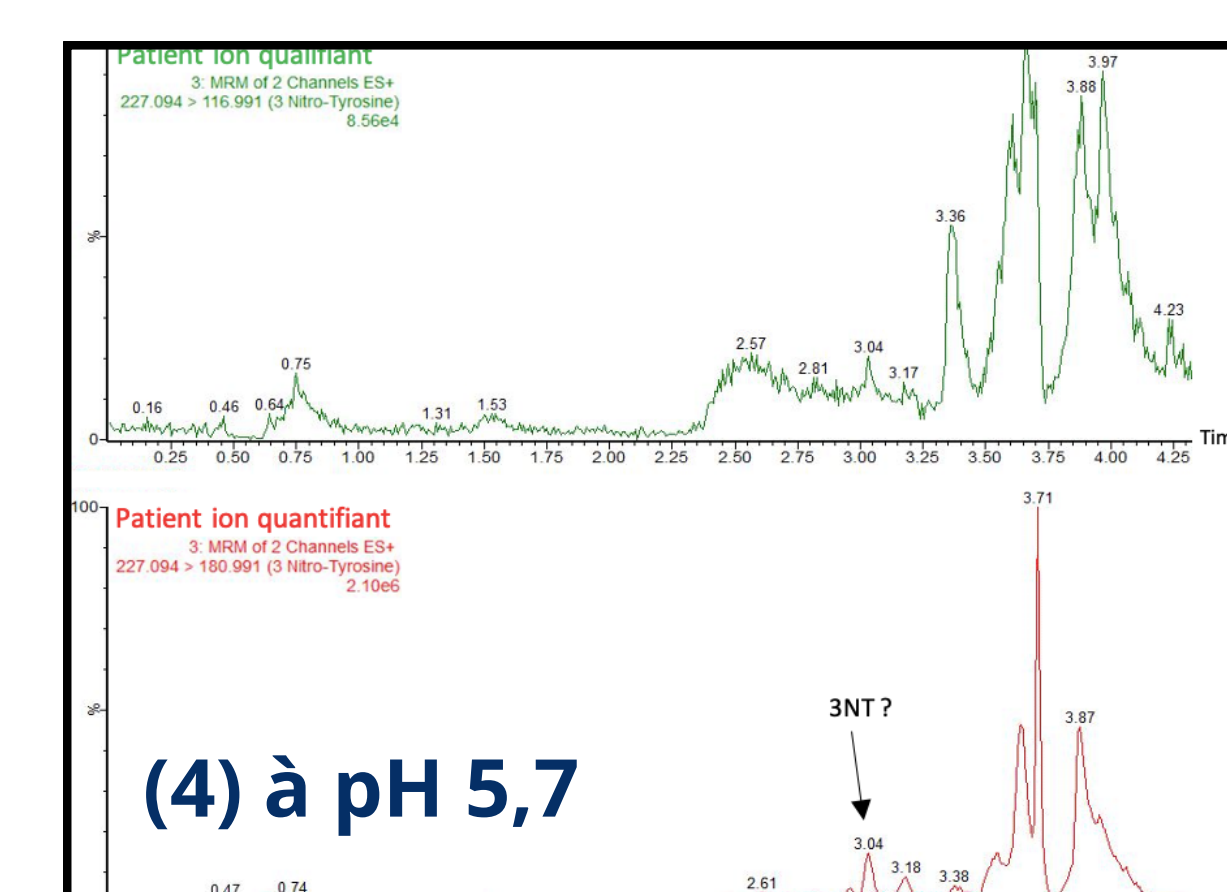
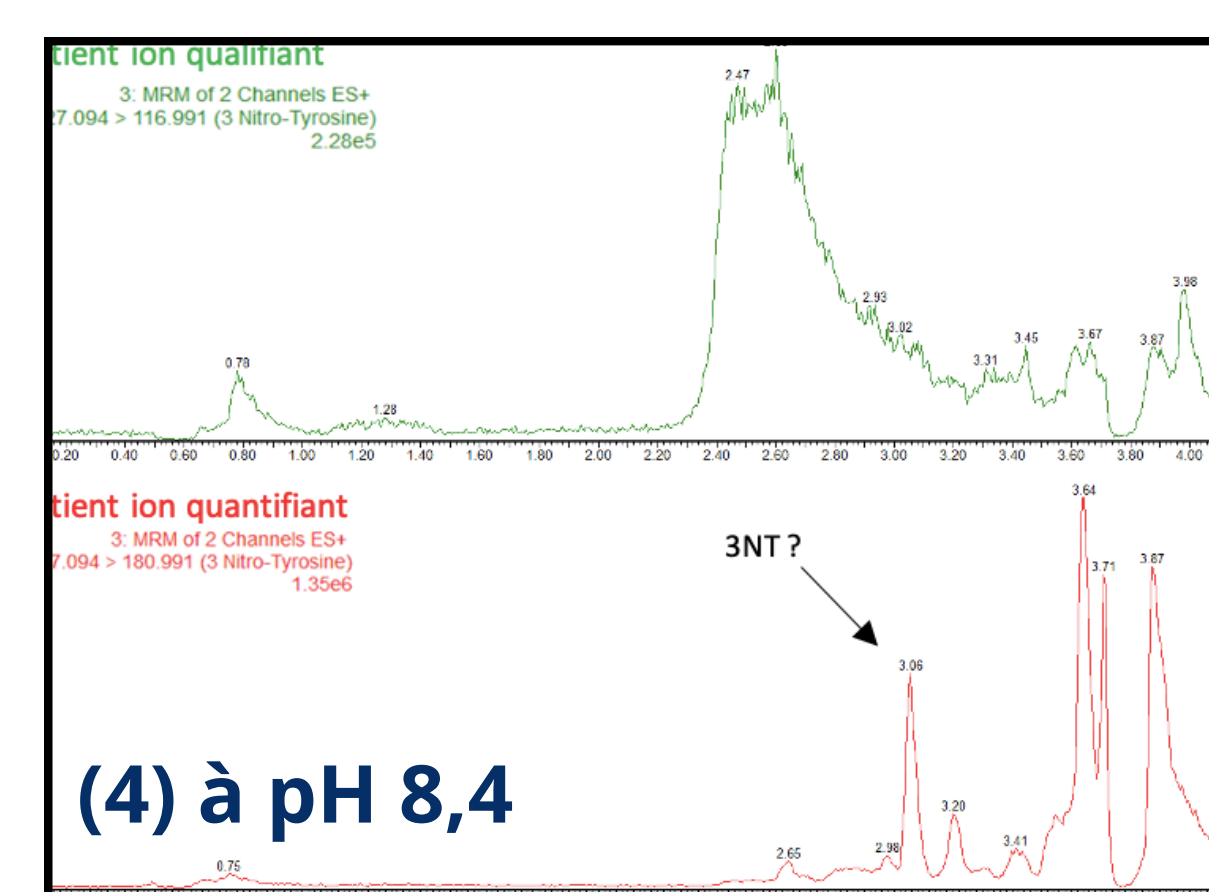
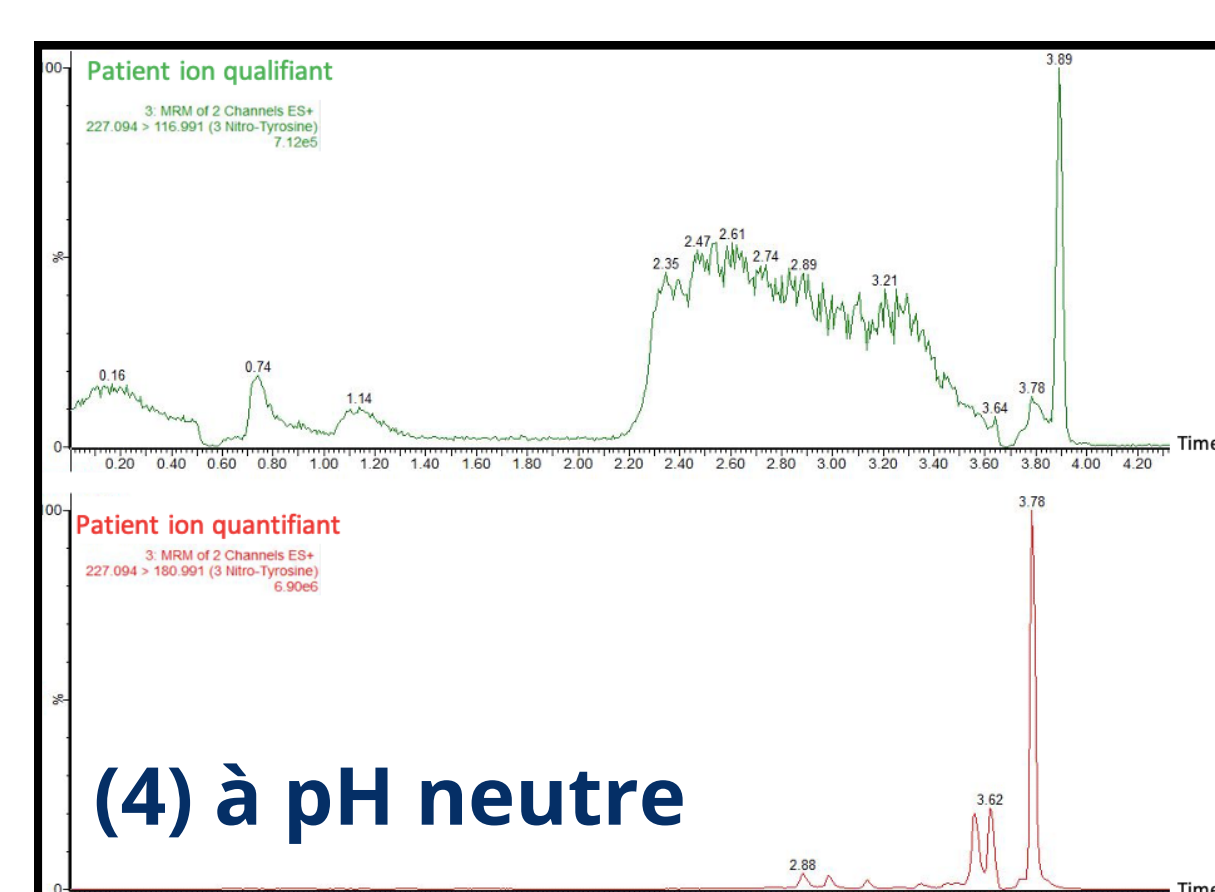
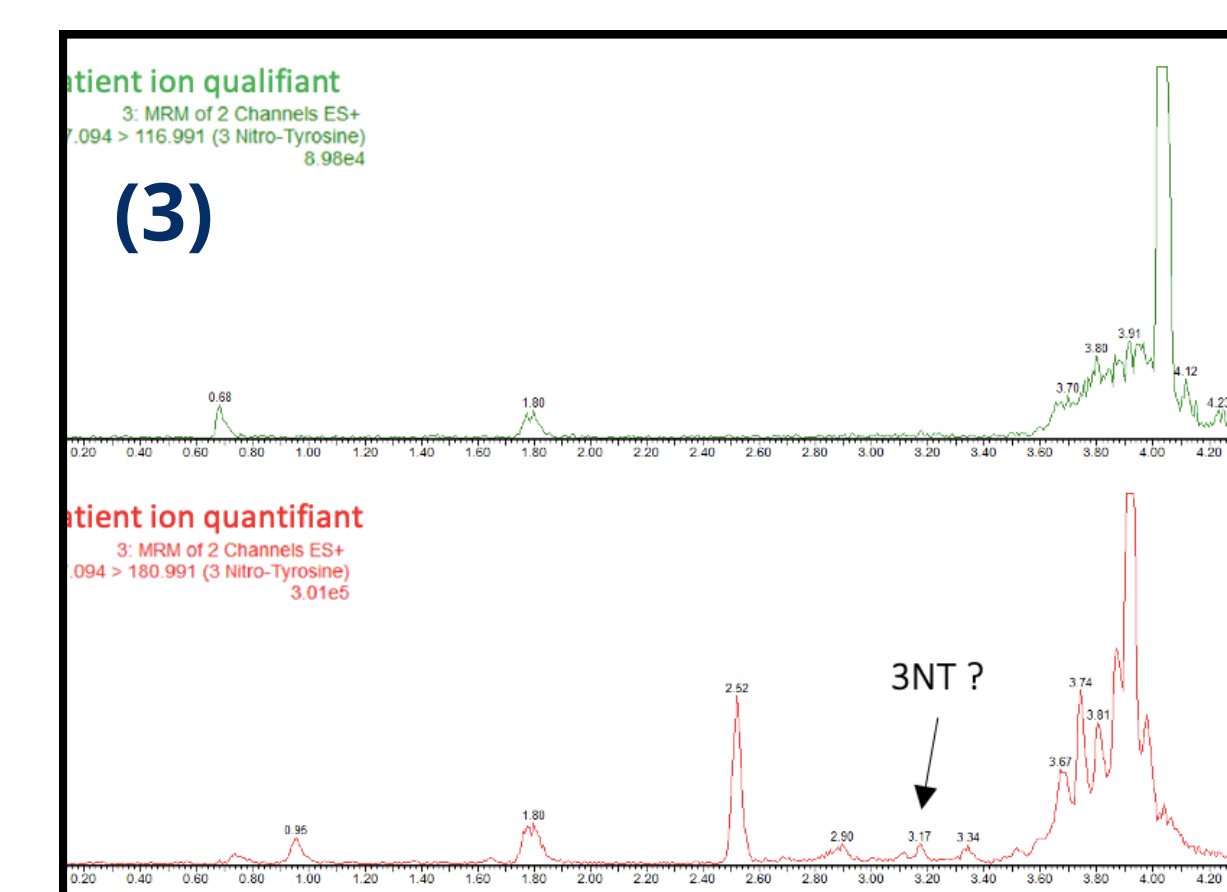
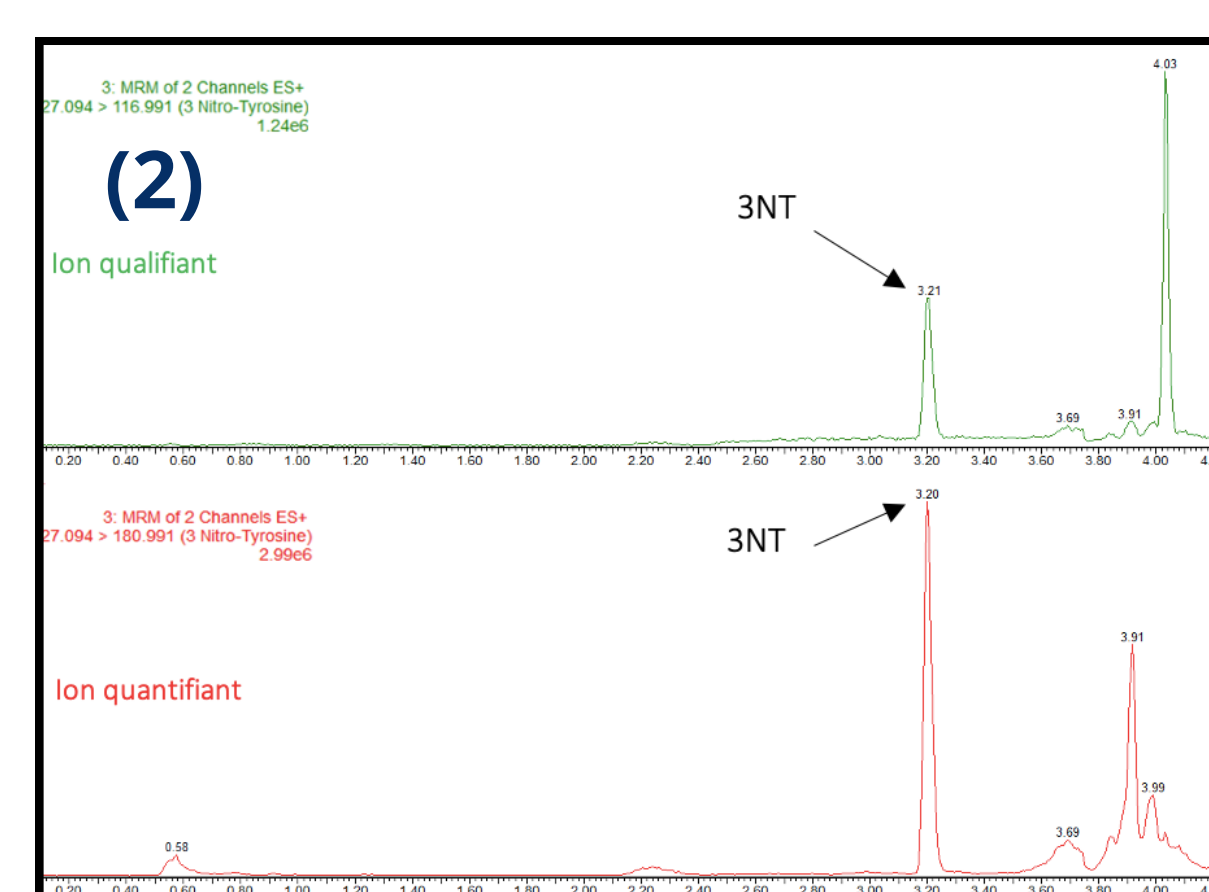
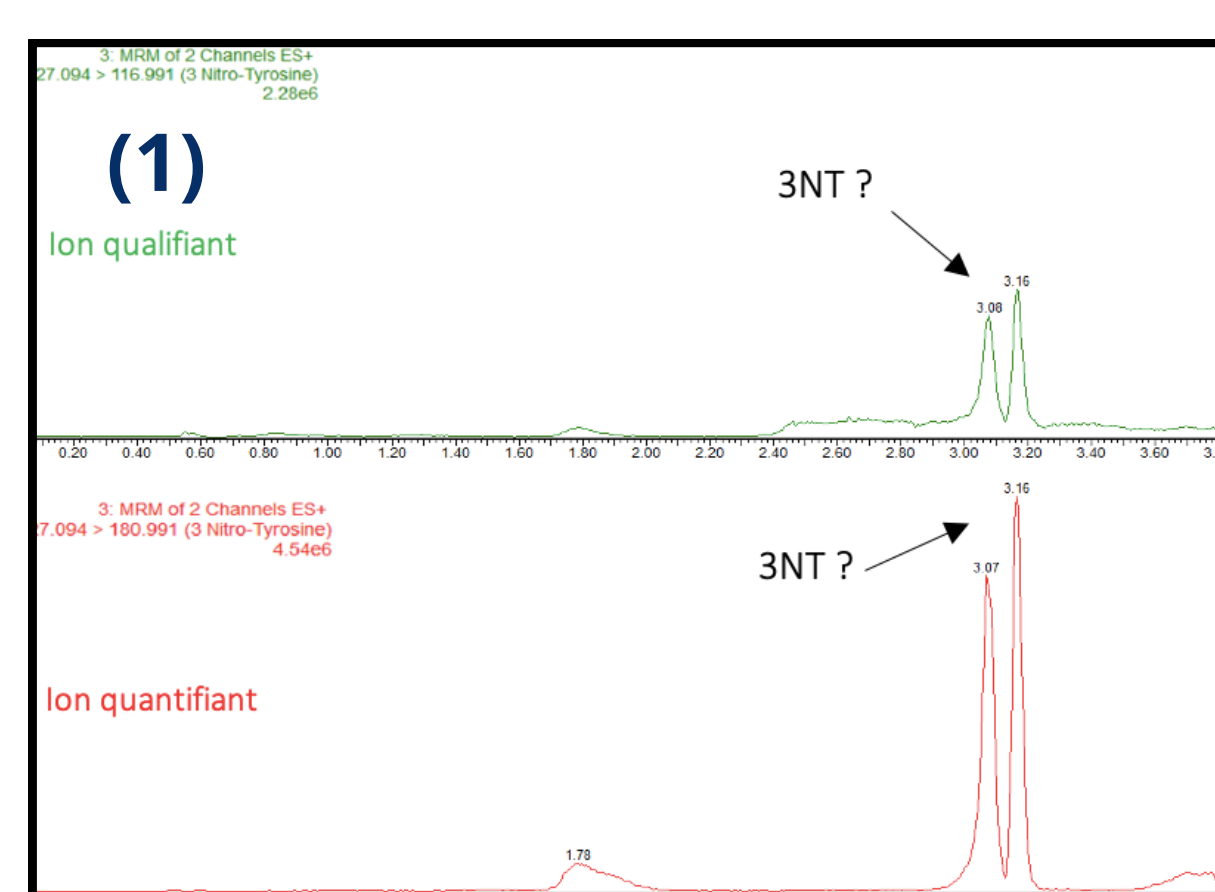
Résultats obtenus

Pour les phases mobiles, l'acide formique (1) n'est pas adapté, il provoque un dédoublement des pics chromatographiques.

L'acide acétique (2) permet d'obtenir de meilleurs résultats.

La simple précipitation des protéines à l'ACN (3) n'est pas suffisante.

La purification par SPE (4) permet un meilleur isolement de la 3NT.



Discussion

La purification par SPE fournit de meilleurs résultats notamment à pH acide et basique mais les dosages manquent encore de sensibilité et de spécificité.

Pour optimiser la méthode, nous envisageons de tester une cartouche SPE mixte C18-échangeuse d'anions, potentiellement plus spécifique de la 3NT.

Pour améliorer la sensibilité il est possible d'augmenter la prise d'échantillon, le volume d'injection sur l'UPLC ou de concentrer davantage l'échantillon après évaporation. Enfin, utiliser une phase stationnaire biphenyle permettrait d'améliorer les conditions chromatographiques.

Conclusion

L'utilisation de la LC-MS/MS permet de développer de nouveaux marqueurs tels que la 3NT.

Cependant, notre méthode est complexe et nécessite une optimisation supplémentaire.

La mise en place du dosage de la 3NT plasmatique nous permettrait de pouvoir mettre à disposition un nouveau marqueur innovant dans les laboratoires de Biologie Médicale pour le diagnostic et le suivi de l'intoxication au N₂O.