

Identification d'agents toxiques de guerre et de leurs signatures

Scénarios, moyens et stratégie

Bruno Bellier, Arlette Bégos, Yannick Juillet et Laurent Taysse

Résumé L'évolution de la menace chimique substitue peu à peu au risque d'une conflagration majeure impliquant l'usage d'armes de destruction massive celui, plus insidieux, de la prolifération incontrôlée des savoirs et savoir-faire, ainsi que des matériels et produits chimiques nécessaires à la production d'agents toxiques. Les États doivent donc disposer des moyens d'identification de tels agents, non plus seulement dans un cadre militaire, mais encore pour assurer la protection des populations civiles. Pour cela, seule la réalisation d'analyses poussées dans un cadre procédural strict permet d'obtenir des preuves indubitables de l'emploi d'agents chimiques par un agresseur. Les laboratoires experts, capables de répondre sans délai ni ambiguïté à ce type de sollicitations, sont des plates-formes techniques diversifiées et à la dimension des listes de produits concernés, susceptibles également de mettre en œuvre des processus de vérification créés par la Convention d'Interdiction des Armes Chimiques.

Mots-clés Analyse chimique, bioterrorisme, armes chimiques, environnement, vérification.

Abstract Identification of chemical warfare agents and their environmental signatures: scenarios, means and strategy

The chemical threat progressively evolves from the danger of a global conflict involving weapons of mass destruction to the one, more insidious, of uncontrolled proliferation of know-how and knowledge, materials and chemicals, linked to the production of toxic chemicals. Such a polymorphous threat implies that nations develop a technical capacity for identifying toxic chemicals, not only for military purposes, but for civilian protection. This requires a capacity of performing forensic investigations, strictly controlled from a juridical point of view, so that unambiguous proofs of a chemical aggression may be obtained if necessary. With this aim in view, procedures were established for the verification of the Chemical Weapons Convention. These procedures are supported by a network of expert laboratories, capable of answering rapidly and unambiguously to the analytical challenges of the domain, and combining various analytical techniques allowing to identify a very large pattern of compounds.

Keywords Chemical analysis, bioterrorism, chemical weapons, environment, verification.

Scénarios et agents à identifier

La menace chimique : guerres, attentats et exposition involontaire

La menace représentée par les agents de guerre chimique [1], mais aussi par toutes sortes de produits chimiques à usage agricole ou industriel, est d'une très grande diversité, aussi bien par les formes que peut prendre cette menace que par la variété des produits concernés. On se souviendra ainsi que toutes sortes de composés, y compris les plus improbables, ont été « essayés » sur les champs de bataille d'Ypres ou de Verdun [2]. L'idée d'« armes chimiques » est d'ailleurs aujourd'hui quelque peu surannée, dans la mesure où elle fait appel à l'idée de l'usage de munitions comme vecteurs de la dispersion des toxiques. Or, si la militarisation de ces agents était un aspect déterminant pour la constitution d'un arsenal étatique et pouvait sembler limiter leur utilisation à un nombre restreint de nations, compte tenu d'une complexité technique certaine, l'éventualité de la production « rustique » d'agents toxiques, d'une pureté moyenne et dispersés par des moyens élémentaires apparaît aujourd'hui à considérer avec

attention. La secte Aum Shirinkyo a apporté en 1995 la triste confirmation de la crédibilité de ce scénario en faisant dans le métro de Tokyo plusieurs victimes par l'emploi de toxiques de guerre organophosphorés, tels que le sarin et le VX [3]. Plus récemment, les événements tragiques survenus à Moscou [4] sont un autre exemple d'utilisation possible d'agents chimiques à des fins non militaires.

Ainsi, l'identification d'agents toxiques n'est plus seulement une nécessité pour protéger des unités militaires constituées d'attaques chimiques ou d'une exposition accidentelle à des produits répandus lors de la destruction de sites de production chimique, militaires ou industriels. La protection des populations contre les menaces d'attentats mettant en œuvre des produits chimiques toxiques apparaît aujourd'hui comme une exigence supplémentaire, et l'idée de défense fait aujourd'hui converger la défense au sens le plus usuel du terme (militaire) et la défense civile.

La Convention d'Interdiction des Armes Chimiques [5]

La répulsion que suscitent chez le plus grand nombre les armes chimiques – est considérée comme arme chimique

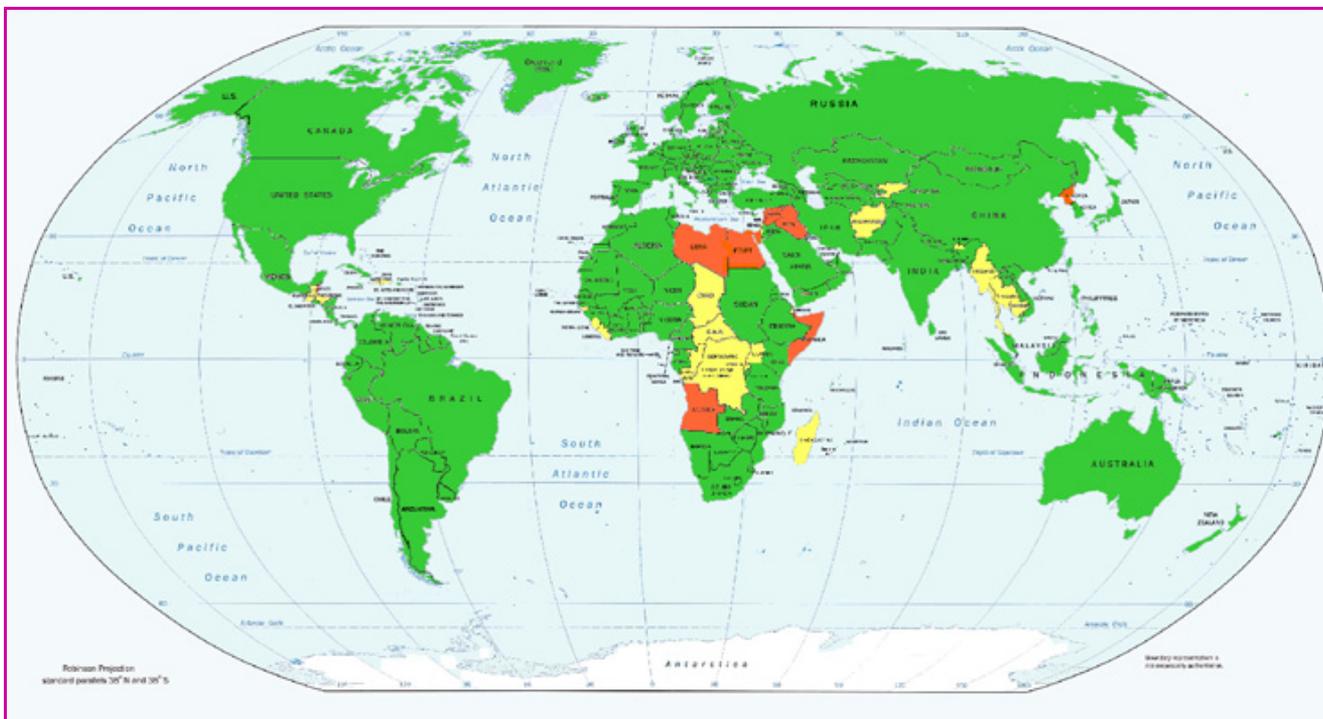


Figure 1 - Pays signataires de la Convention d'Interdiction des Armes Chimiques.

tout produit chimique toxique employé dans l'intention de blesser ou tuer, et/ou tout dispositif ou munition ayant pour but la libération d'un tel produit chimique toxique –, conjuguée à la volonté de désarmement et de désescalade, a conduit à la signature en 1993 de la Convention d'Interdiction des Armes Chimiques (CIAC), entrée en vigueur en 1997, et ratifiée par plus de 150 pays (figure 1). Cette convention régleme très strictement les différents aspects liés aux armes chimiques, que ce soit dans l'esprit ou dans le détail, une liste d'agents soumis à vérification étant annexée à la convention, sous la forme de trois tableaux. L'application de la CIAC est surveillée par l'Organisation d'Interdiction des Armes Chimiques (OIAC)

qui siège à la Haye. Celle-ci a le pouvoir de dépêcher des équipes d'inspecteurs placées sous son égide, afin de contrôler les installations de fabrication – autorisées à produire des quantités limitées d'agents toxiques, à des fins définies précisément –, mais aussi de faire la lumière sur toute accusation de violation de la CIAC.

Les agents de la menace chimique

Les tableaux de la CIAC regroupent les agents identifiés comme toxiques de guerre, et leurs précurseurs, dont les principaux sont présentés dans le *tableau 1*, ainsi que d'autres agents non listés mais apparaissant comme de

Effets biomédicaux des principaux agents chimiques de guerre

Les organophosphorés

L'intoxication par neurotoxiques organophosphorés se traduit par une inhibition des cholinestérases qui aboutit à une intoxication par l'acétylcholine endogène. Le tableau clinique associé [27] :

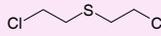
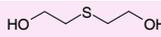
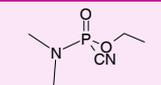
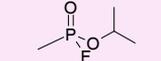
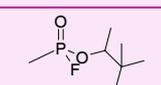
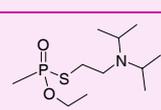
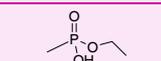
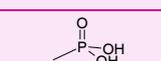
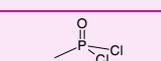
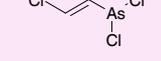
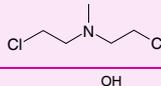
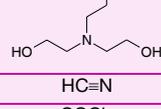
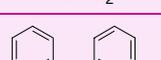
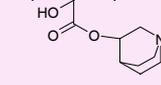
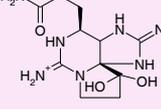
- un syndrome muscarinique : bradycardie, hypotension artérielle, bronchoconstriction intense, myosis, hypersécrétion des glandes salivaires et sudorales ;
- un syndrome nicotinique, souvent tardif : paralysies musculaires, en particulier des muscles respiratoires, et complications cardiaques ;
- un syndrome central caractérisé par une atteinte sensitomotrice distale, prédominante au niveau des membres inférieurs, avec des crampes musculaires, une hypotonie, une diminution des réflexes ostéotendineux pouvant évoluer, dans les cas les plus graves, vers une paralysie flasque.

Le délai d'apparition des symptômes cliniques dépend du mode de contamination (quelques minutes par inhalation à 1-3 heures par la voie cutanée). L'approche thérapeutique consiste à libérer et protéger les voies aériennes, avec rétablissement d'une ventilation efficace. L'utilisation d'un anticholinergique, comme l'atropine, est souvent combinée à un traitement par des benzodiazépines (diazépam) afin de prévenir la toxicité neurologique et les convulsions. L'utilisation concomitante d'une oxime (pralidoxime,

obidoxime, HI-6) permet la réactivation des cholinestérases inhibées par l'organophosphoré.

Les vésicants : ypérite, moutardes à l'azote, lewisite

Les vésicants sont des irritants tissulaires ubiquitaires, au premier rang desquels l'ypérite est le composé le plus redouté. Les mécanismes de cytotoxicité de l'ypérite et de ses analogues sont très complexes : ce sont des alkylants à pouvoir électrophile élevé entraînant la formation de liaisons covalentes lors de réactions de substitutions nucléophiles de nombreux sites biologiques. L'alkylation des acides nucléiques et de nombreuses protéines aboutit à la perturbation des grandes fonctions cellulaires [28]. Les effets toxiques de l'ypérite apparaissent généralement quelques heures après l'exposition (1 à 4 heures), les manifestations sont pluri-organiques et dépendent de la dose reçue. Sont décrites des lésions oculaires (photophobie et larmolement), cutanées (érythème et vésication), des lésions de l'appareil respiratoire (bronchoconstriction, œdème pulmonaire), de l'appareil digestif (nausées, diarrhée, vomissements) et du tissu hématopoïétique (leucopénie). Enfin, c'est un agent aux effets cancérigènes et mutagènes démontrés. Il n'existe actuellement ni antidote, ni prétraitement contre les effets de l'ypérite. Les traitements en vigueur visent essentiellement à atténuer les symptômes de l'intoxication [28].

Tableau I - Quelques agents de la menace et leurs propriétés.								
Nom	Famille	Formule chimique	Tableau de la CIAC	Type d'agent*	Log P [26]	T° _{eb}	MM	
Ypérite (HD)	Organosoufrés		I.A.4	toxique vésicant	2,41*	140 °C / 20 mm	159,08	
Thiodiglycol			II.B.13	précurseur, produit de dégradation	- 0,63	168 °C / 14 mm	122,19	
Tabun (GA)	Organophosphorés		I.A.2	neurotoxique, agent G (alkyl alkylophosphonofluoridates)	0,38	67 °C / 2 mm	162,13	
Sarin (GB)			I.A.1		0,30	151 °C	140,1	
Soman (GD)			I.A.1		1,78	63-65 °C / 8 mm	182,18	
VX			I.A.3	neurotoxique, agent V (S-dialkylaminoéthyl O-alkyl alkylophosphonothiolates)	2,09	80 °C / 0,01 mbar	267,37	
Méthyl-phosphonate d'éthyle			II.B.4	produit de dégradation	- 1,15	120 °C / 0,3 mm	124,08	
Acide méthyl-phosphonique			II.B.4	produit de dégradation	- 2,28	(T° _{fus.}) 104 °C	96,02	
Dichlorure de méthylphosphonyle			II.B.4	précurseur	- 0,13*	69 °C / 19 mm	132,91	
Oxychlorure de phosphore		POCl ₃	III.B.5	précurseur lointain	-	105 °C	153,33	
Lewisite I		Organoarséniés		I.A.5	toxique vésicant	2,56*	196 °C	207,32
HN-2		Moutardes à l'azote		I.A.6	toxique vésicant	0,91	71 °C / 9 mm	156,06
Triéthanolamine			III.B.17	précurseur	- 1,59	277 °C / 150 mm	149,19	
Cyanure d'hydrogène	-	HC≡N	III.A.3	toxiques généraux	-	25-26 °C	41,05	
Phosgène	-	COCl ₂	III.A.1		-	8 °C	98,92	
Benzilate de quinuclidinyle (BZ)	-		II.A.3	incapacitant	3,01*	T° _{fus.} 164 °C	337,42	
Acide benzilique	-		II.B.8	précurseur	2,3	T° _{fus.} 150 °C	228,25	
Saxitoxine	-		I.A.7	toxine	- 2,44*	T° _{fus.}	299,3	
Aflatoxine B ₁	Mycotoxines			toxine	1,23*	T° _{fus.} 268 °C	312,28	
Toxine T-2				toxine	2,27*	T° _{fus.} 151 °C	462,5	
Chlore	Toxiques industriels	Cl ₂		toxique respiratoire	-	- 34 °C	70,91	
Formaldéhyde	Toxiques industriels	HCHO		irritant, cancérigène	-	- 19 °C	30,03	

réelles menaces ; la diversité de ces composés suggère la complexité des moyens d'identification à mettre en œuvre.

Moyens d'analyse et d'identification en laboratoire

Exigences et objectifs

La recherche dans un laboratoire expert d'agents chimiques agressifs est sujette à des exigences sensiblement différentes de celles du terrain. Lors d'un incident présumé mettant en jeu des composés chimiques, la recherche de produits toxiques devra être effectuée le plus rapidement possible, afin d'éclairer en cas de besoin les équipes d'intervention sur les mesures de protection à prendre et sur l'arsenal thérapeutique à déployer. En outre, la recherche de signatures de composés – *produits caractéristiques issus de la dégradation de composés d'intérêt* – sera également très utile, certains produits ayant une stabilité limitée dans le temps. Dans le cas d'inspections, ou de collecte d'échantillons à des fins de renseignement et de contre-prolifération, ce sont même ces signatures qui seront le plus à même d'être identifiées.

Principes directeurs liés à la CIAC

Pour assurer la réelle application par les États signataires de la CIAC, l'OIAC s'est dotée d'instruments de contrôle, dont un réseau de laboratoires experts soumis à une procédure récurrente de désignation. Ces dispositions font autorité dans le domaine de l'analyse experte d'agents chimiques toxiques – *au premier rang desquels les composés des trois tableaux de la CIAC* – et permettent d'assurer un niveau très élevé de fiabilité des laboratoires désignés. La désignation est conditionnée par l'obtention d'une accréditation selon les normes en vigueur (aujourd'hui la norme ISO 17025) et la réussite annuelle à des exercices interlaboratoires organisés sous l'égide de l'OIAC [6].

Particularités liées à l'expertise dans le domaine des agressifs chimiques

Les laboratoires experts dans le domaine sont naturellement soumis à des contraintes particulières, à commencer par une exigence absolue de sécurité, et la nécessité de posséder des banques de données particulières, la portée des banques commerciales usuelles étant limitée quant aux agents dont il est ici question. S'ajoute à cela la nécessité de posséder des standards (étalons, produits de référence) et donc, le plus souvent, les moyens de les synthétiser (les composés du *tableau I* de la CIAC étant naturellement non commerciaux et leur transport soumis à une très stricte législation). Enfin, il n'est pas inutile de s'intéresser à la nature des échantillons, ainsi qu'à la diversité des produits en cause. En effet, la très grande majorité des laboratoires d'analyse sont spécialisés, qui dans un type d'échantillon (air, eau, sol, tissu biologique, aliment...), qui dans un type de composé (polluant atmosphérique, sel minéral, médicament, drogue...) possédant en règle générale des propriétés homogènes. À l'inverse, l'expertise dans le domaine des agressifs chimiques requiert à la fois la capacité à analyser des matrices d'une grande diversité : environnement (atmosphère, eau, sol, végétation), matériel (tenue de protection, filtre, pièce métallique, plastique), voire éventuellement des prélèvements biologiques (sang, urine, tissu), et des composés

aux propriétés physico-chimiques extrêmement variées (*tableau I*). Ajoutons pour conclure l'exigence d'une sensibilité particulièrement élevée, eu égard à la toxicité considérable de certains composés d'intérêt.

Toutefois, certains agents chimiques pourront ne faire l'objet que d'une analyse qualitative. En effet, la seule identification de composés listés par la CIAC (quelle qu'en soit la concentration), mais aussi de composés détournés de leur vocation première, dans un échantillon où leur présence serait de toute évidence non naturelle, sera suffisante pour déclencher une réponse médicale appropriée. Cette identification suffira également, dans le cas de composés interdits, pour engager une action juridique et diplomatique auprès de l'OIAC.

Prélèvement et échantillonnage

Le choix des sites de prélèvement, la nature des matrices, le conditionnement et les conditions de conservation et de transport des échantillons sont autant d'étapes dont l'influence sur le résultat et l'incertitude associée peuvent être critiques. Le choix des sites pourra être guidé par l'utilisation d'appareils de détection, tel l'AP2C [7] qui permettra de sélectionner au mieux des échantillons riches en composés soufrés et/ou phosphorés. Par la suite, le transport vers le lieu de l'analyse sera des plus cruciaux, compte tenu de la stabilité limitée de certains agents dans des milieux environnementaux.

Les groupes de travail de l'OTAN, puis ceux liés à la préparation de la CIAC, ont établi des guides de référence pour l'échantillonnage sur des sites potentiellement contaminés par des agressifs chimiques [8]. On citera cependant ici en guise de mise à jour de ces guides l'émergence de la microextraction en phase solide (SPME) [9] qui apparaît à la fois comme une méthode d'extraction et d'échantillonnage. Cette technique permet d'effectuer directement l'extraction des analytes d'intérêt dans la matrice considérée (eau, air) au moment du prélèvement, pour une analyse immédiate ou pour être conservée jusqu'à son analyse hors-site. Son usage aisé, ainsi que la diversité croissante des matériels commerciaux, ouvrent de larges perspectives pour son emploi.

Organisation de l'analyse en laboratoire

L'analyse dans un laboratoire expert peut être divisée schématiquement en trois phases :

- le **traitement** de la matrice résultant du prélèvement, qui a pour objectif de produire une forme analysable de l'échantillon (ceci sera explicité par la suite) ;
- l'**analyse** proprement dite, qui vise à identifier, et le cas échéant à quantifier les composés extraits ;
- la **validation** des résultats de l'analyse.

Ces trois étapes indispensables ne sont pas strictement consécutives puisque la validation du résultat commence dès l'entrée sur le site d'analyse. En effet, l'enregistrement de l'échantillon, sa codification et son stockage en un lieu sécurisé et dans des conditions de conservation appropriées, sont le point de départ obligatoire d'un contrôle offrant toutes les garanties juridiques. Ensuite, un processus itératif (traitement, analyse préliminaire, traitement complémentaire, analyse, etc.) sera souvent observé, afin de lever des incertitudes pouvant persister après les premières étapes de l'analyse.

Il serait fastidieux de détailler ici les différents cas de figure pouvant se présenter à l'analyste, en fonction

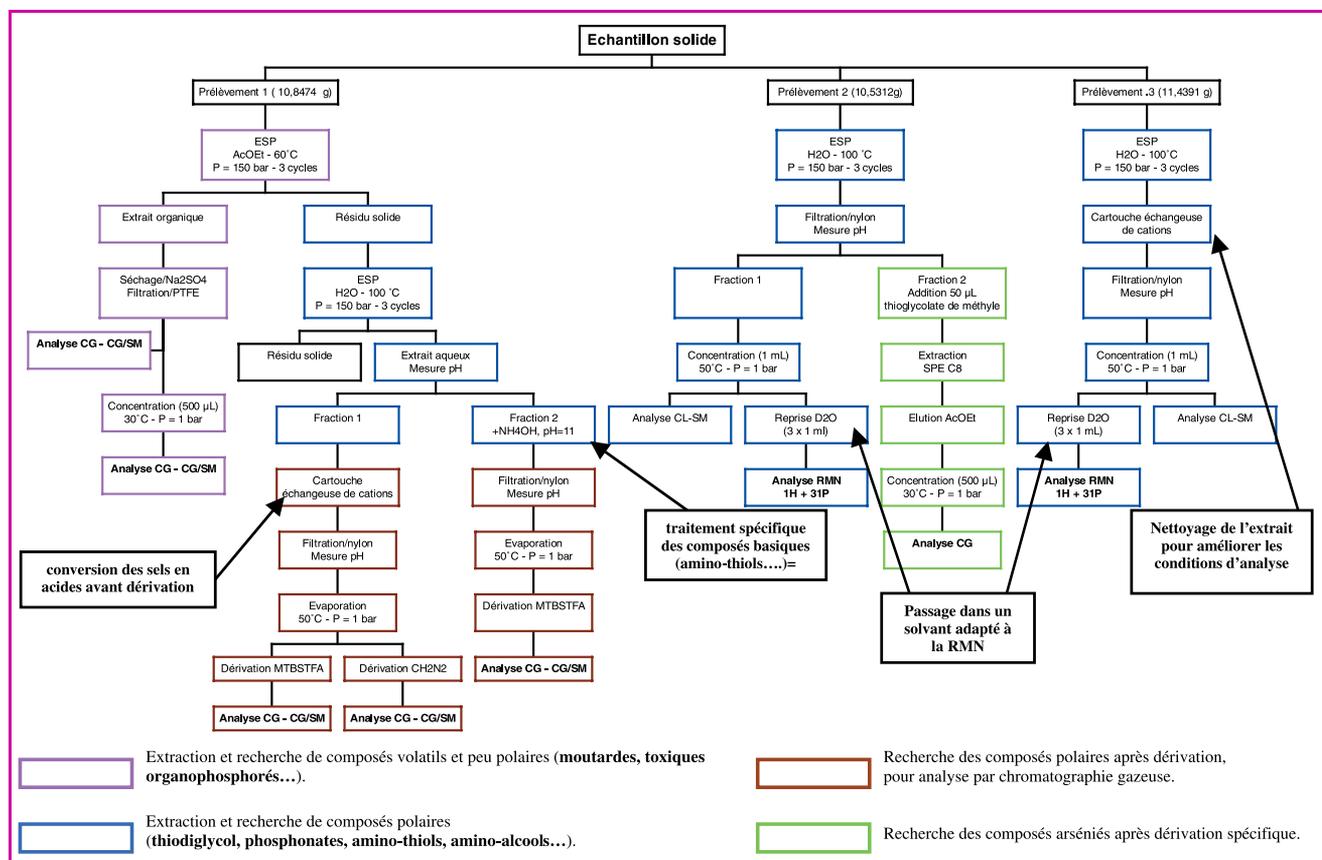


Figure 2 - Un exemple de traitement d'un échantillon de sol pour la recherche de tous les composés de la CIAC et de leurs produits de dégradation.

notamment du type de matrice à analyser. Nous nous bornons donc à décrire sommairement les techniques pouvant être mises en œuvre [10], ainsi que leurs avantages et limites respectives. cela sera illustré par la recherche des produits listés par la recherche des produits de dégradation dans un échantillon de sol (figure 2).

Traitement de l'échantillon

Cette partie de l'analyse regroupe les étapes conduisant de l'échantillon initial à une forme analysable, c'est-à-dire en règle générale une solution aqueuse ou organique contenant les produits d'intérêt éventuellement présents. Les critères déterminant l'efficacité d'un schéma de traitement pour la recherche d'un composé donné sont bien sûr le rendement d'extraction de ce composé, mais aussi la sélectivité de la méthode – *limitation du nombre d'interférents co-extraits* –, le facteur de concentration obtenu – *capital pour atteindre la sensibilité recherchée* –, et l'« innocuité » vis-à-vis du produit – *qui ne doit pas être dégradé au cours de la manipulation*. En revanche, la notion d'analyse de routine, qui justifie la validation *in extenso* d'une méthode, n'existe pas dans un tel domaine. Les scénarios que nous avons ébauchés suggèrent plutôt une grande diversité de matrices, et il apparaît illusoire de valider des méthodes sur chacune d'entre elles, pour toutes les familles de produits concernés.

En dernier lieu, la stratégie de traitement d'échantillon devra être adaptée aux techniques analytiques disponibles au laboratoire. Ainsi, certains laboratoires équipés uniquement de détecteurs couplés à la chromatographie gazeuse devront effectuer des étapes de dérivatation des extraits

aqueux, qui pourront sembler superflues aux possesseurs de spectromètres de résonance magnétique nucléaire (RMN), ou de couplages chromatographie liquide/spectrométrie de masse (CL/SM).

Cas des échantillons liquides

Les échantillons organiques ne requièrent le plus souvent qu'un traitement sommaire : centrifugation, filtration, concentration. Les matrices aqueuses pourront faire l'objet d'une extraction liquide-liquide, visant à faire passer en phase organique les composés peu polaires. L'extraction en phase solide ou la micro-extraction en phase solide sont également des moyens de séparer les composés peu polaires, d'atteindre des facteurs de concentration importants, ou encore de purifier l'extrait de certains interférents. L'analyse des extraits est ensuite identique à celle présentée plus loin.

Cas des prélèvements d'atmosphère

Ces prélèvements se présentent sous la forme de tubes remplis d'un adsorbant – *résine polymère de type Tenax® ou XAD-2, phases à base de carbone graphitisé type Carboxen®, tamis moléculaires Carbosieve®...* – qui retient les composés volatils d'intérêt. Le choix de l'adsorbant est naturellement d'une grande importance pour l'analyse ultérieure. La désorption pourra s'effectuer soit par passage d'un solvant liquide sur le tube, soit par désorption thermique, ces deux possibilités s'accompagnant d'une analyse par chromatographie gazeuse couplée à des détecteurs spécifiques et/ou à la spectrométrie de masse [11]. Une atmosphère particulièrement intéressante est celle en équilibre avec un échantillon solide confiné, l'espace de

tête (*headspace*). L'analyse après préconcentration de cet espace – par piégeage sur un support du type de ceux mentionnés ci-dessus [12] ou sur une aiguille de microextraction en phase solide [13] – est un moyen très sensible pour l'analyse de polluants volatils dans des matrices solides.

Cas des échantillons solides

Outre l'extraction manuelle (éventuellement assistée par ultrasons), des méthodes automatisées telles l'extraction par solvants pressurisés ou par fluide supercritique présentent plusieurs avantages pour le traitement de matrices solides dans un tel contexte. Au nombre de ceux-ci, on citera d'abord la diminution du temps d'analyse, la réduction de la consommation en solvant et la moindre exposition des manipulateurs, ce qui apporte un progrès significatif en matière de sécurité. Le plus souvent, les rendements d'extraction sont comparables à ceux obtenus par des méthodes manuelles [14]. En contrepartie, l'investissement initial important, l'encombrement des appareils et la nécessité de disposer d'échantillons de taille réduite pour entrer dans des cellules d'extraction dont le volume est de l'ordre de 10 cm^3 , sont autant de limites aux applications de ces techniques.

Afin de permettre la recherche d'une aussi grande variété de composés, la succession de plusieurs extractions par des solvants de polarité croissante sera nécessaire (*figure 2*). La modulation des différents paramètres de l'extraction (durée, température...) s'effectuera également dans ce but. Par la suite, les extraits obtenus pourront être concentrés sous pression réduite ou courant d'azote.

Purification des extraits

Afin de réaliser des analyses aussi efficaces et sensibles que possible, il est souhaitable de purifier les extraits des éventuels interférents polluant l'échantillon de départ (hydrocarbures, silicones, acides humiques...). Ceci peut être effectué grâce à une utilisation judicieuse des méthodes douces d'extraction (permettant une extraction sélective de certains interférents [15]), mais aussi par l'application de traitements

supplémentaires aux extraits obtenus. A cet égard, les cartouches d'extraction en phase solide représentent une solution de choix, en permettant de retenir sélectivement soit les interférents, soit les composés d'intérêt qui seront ensuite élués et analysés. Le développement de nouvelles technologies (anticorps immobilisés, polymères à empreinte moléculaire) autorise aujourd'hui l'accès à des phases solides de plus en plus sélectives et dont l'intérêt pour certaines applications très spécifiques n'est pas négligeable [16].

Techniques d'analyse

Le traitement de matrices très riches conduit le plus souvent à des extraits non moins riches, pouvant contenir plusieurs milliers de produits dans des concentrations détectables par des moyens modernes. En conséquence, l'analyse de ces extraits nécessite une filtration des signaux d'intérêt ou une séparation des composés présents, afin d'extraire non plus les produits mais l'information.

Selon la nature de l'extrait, celui-ci fera l'objet d'une séparation par chromatographie en phase liquide (CL) ou gazeuse (CG) (cf. *figure 2*). D'innombrables colonnes étant disponibles sur le marché, la séparation des composés pourra faire l'objet, si nécessaire, d'une attention spéciale en jouant sur différents paramètres chromatographiques (nature de la phase stationnaire...). On mentionnera ici sans s'attarder l'électrophorèse capillaire et la chromatographie ionique dont les applications, pour intéressantes qu'elles puissent être, restent d'une portée trop limitée pour être utilisées en vue de l'identification d'une large gamme de composés inconnus [17].

Quelques exemples de limites de détection sont donnés dans le *tableau II*. Il convient de souligner que la nature de la matrice a une influence majeure sur la limite de détection d'une méthode d'analyse, les appareils ayant bien souvent des performances intrinsèques qui ne sont pas limitantes.

Dérivation chimique avant analyse par CG

L'analyse par CG n'étant appropriée ni à des produits en solution aqueuse, ni à des produits trop polaires, un

Tableau II - Exemples de seuils de détection.

* après 13 heures d'acquisition.

Composé	Matrice	Appareil et technique	Limite de détection
Thiodiglycol	eau	RMN ^1H 500 MHz	$1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
Acide méthylphosphonique	eau	RMN ^1H 500 MHz	$1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
		RMN ^{31}P 360 MHz	$5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ *
Acide éthyl méthylphosphonique	eau	LC-MS (électronébulisation mode positif)	0,5 ng injectés
		LC-MS (électronébulisation mode négatif)	0,5 ng injectés
VX	sol	GC-FPD mode phosphore (après extraction)	$< 1\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dans l'échantillon initial
	solution organique	GC-AED mode carbone	5 ng injectés
		GC-AED mode soufre	5 ng injectés
		GC-AED mode phosphore	5 ng injectés
Soman	solution organique	GC-AED mode azote	10 ng injectés
		GC-AED mode carbone	0,5 ng injectés
Toxine T-2	eau	GC-AED mode phosphore	2 ng injectés
		LC-MS (électronébulisation mode positif)	$< 0,5\ \text{ng}$ injectés
	sol	LC-MS (après extraction)	$0,3\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dans l'échantillon initial

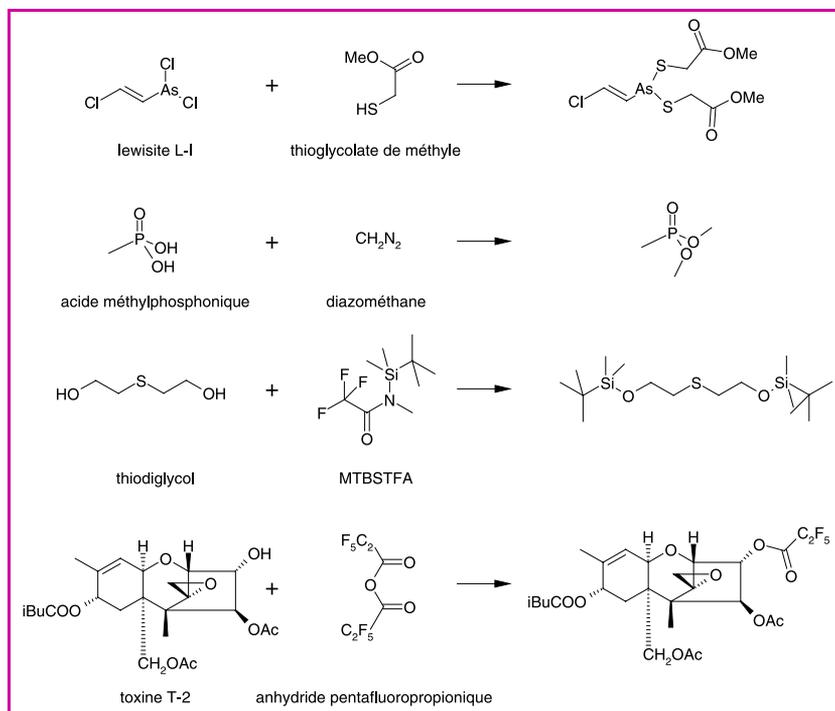


Figure 3 - Quelques réactifs de dérivation et réactions associées.

traitement préalable de dérivation chimique (méthylation, silylation...) pourra s'avérer nécessaire (figure 3) [18].

CG couplée à des détecteurs spécifiques

La CG reste ici la technique dominante, pour les raisons suivantes : elle est la mieux adaptée à l'analyse des toxiques (volatils, dans leur immense majorité) et elle peut être couplée à des détecteurs particulièrement adaptés au domaine. De plus, les composés non volatils, même de poids moléculaire relativement élevé comme certaines toxines, restent adaptés à la CG moyennant une dérivation chimique appropriée. Ainsi, les détecteurs à photométrie de flamme (sélec-

tifs des composés contenant du soufre ou du phosphore), à photométrie de flamme pulsée (soufre, phosphore, arsenic...), ou encore azote-phosphore (NPD, détecteur thermionique) sont-ils des outils de choix, si l'on se souvient en particulier que la très grande majorité des composés listés par la CIAC contiennent du soufre ou du phosphore (tableau I). Nous accorderons ici une mention particulière au détecteur d'émission atomique qui permet de détecter spécifiquement un grand nombre d'éléments, et peut être utilisé pour accéder à la formule brute d'un composé inconnu ; le niveau d'information obtenu en fait un outil particulièrement intéressant pour un criblage rapide et efficace d'échantillons complexes [19] (figure 4). En règle générale, comme dans le cas décrit à la figure 2, ces détecteurs sont utilisés à des fins de criblage spécifique afin d'orienter ensuite l'identification des composés d'intérêt éventuellement présents. Ils constituent également un moyen de choix pour effectuer une quantification quand celle-ci est requise.

Identification de composés séparés par CG

Outre les détecteurs mentionnés plus haut, la CG peut être interfacée à des moyens d'analyse permettant l'identification de composés, par comparaison avec des données de référence ou par analyse structurale complète. Exception à ce principe, la méthode des indices de rétention ne fait appel qu'à des détecteurs atomiques classiques, spécifiques (voir ci-dessus) ou non (détecteur à ionisation de flamme par exemple), et permet de caractériser un produit par sa séparation chromatographique relativement à une série de composés de référence. Si la série la plus employée est celle des *n*-alcanes, d'autres séries permettant l'utilisation avec des détecteurs spécifiques ont été développées, en particulier

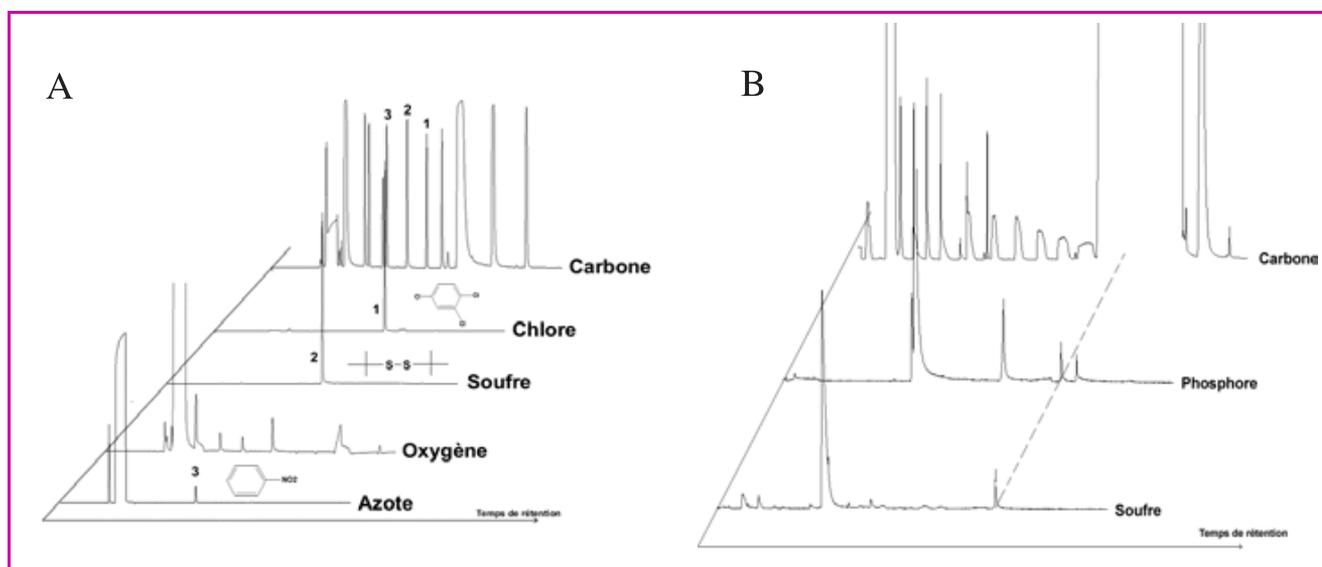


Figure 4 - Intérêt du détecteur d'émission atomique pour l'obtention d'informations sur des composés contenant des hétéroatomes multiples.

A : détection de composés contenant des hétéroéléments dans un mélange de référence.

B : détection d'un composé phosphoré et soufré (masqué par un interférent hydrocarboné) dans un extrait environnemental.

dans le domaine des agents de guerre chimique ; on citera ainsi la série P (diméthylphosphinothioates de *n*-alkyle) et la série M (sulfures de *n*-alkyl bis(trifluorométhyl)phosphines). De nombreux indices de rétention dans ces différentes séries sont disponibles dans la littérature [20].

Toutefois, l'indice de rétention laissant encore la place à une certaine incertitude, il sera nécessaire d'y associer une méthode d'identification structurale. Deux techniques couplées à la CG sont classiquement utilisées : la spectrométrie de masse (SM) et la spectroscopie d'absorption infrarouge à transformée de Fourier (IRTF). Si cette dernière reste d'un usage limité dans le domaine des agressifs chimiques, les possibilités qu'offre la SM d'accéder à la structure d'un composé totalement inconnu en font actuellement la méthode d'identification préférée. La combinaison possible de l'ionisation chimique – *qui permet d'accéder à la masse moléculaire* –, de l'ionisation sous impact électronique – *qui conduit à une fragmentation du composé et donc à un spectre riche en informations, très propice à une recherche automatisée dans des bibliothèques de spectres* – et de la SM en tandem – *SM/SM, qui repose sur la sélection préalable d'ions suivie de leur fragmentation contrôlée et permet l'accès à une information structurale plus fine et/ou à une sensibilité exacerbée* – confère à cette technique une puissance d'identification sans égale, appuyée par la richesse des bibliothèques de spectres accessibles [21].

Chromatographie en phase liquide (CL)

La CL et les détecteurs associés apparaissent aujourd'hui comme le complément naturel et indispensable de la CG (CG-SM en particulier) puisqu'ils sont plus particulièrement appropriés aux composés polaires et donnent accès à l'identification de composés de haute masse. Certes, si le couplage de la CL avec des détecteurs décrits plus haut (FID : détection à ionisation de flamme, FPD : détection à photométrie de flamme) offre des possibilités de criblage sélectif [22], la portée du couplage CL-SM est cependant bien supérieure, malgré une plus faible sensibilité.

Cette méthode permet d'éviter les étapes toujours fastidieuses de dérivation chimique, pour la recherche non seulement des produits de dégradation de composés toxiques dans l'environnement, mais aussi des agents eux-mêmes présents dans des échantillons d'eau [23]. De nombreux composés lourds telles les toxines [24] sont également identifiables par CL-SM, y compris en l'absence de standards de référence, grâce en particulier aux techniques de piégeage d'ions qui permettent d'atteindre des niveaux élevés d'information.

Pour une utilisation optimale de cette technique, il semble nécessaire de disposer de plusieurs sources d'ionisation, l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) étant plus particulièrement appropriée aux faibles masses, tandis que l'ionisation par électro-nébulisation (ESI, *electrospray*) donne accès à des ions multichargés, donc à des très hautes masses (plus la charge *z* est haute, plus la masse détectable *m* s'élève, les détecteurs de masse étant limités non en masse, mais par le rapport *m/z*). Cette dernière méthode d'ionisation conduit notamment à d'excellents résultats avec des molécules peptidiques, et permet à elle seule de reconstituer des séquences.

Les limitations actuelles sont dues en premier lieu à la pauvreté des banques de données spécialisées ; celles-ci sont d'ailleurs difficiles à constituer car la reproductibilité des spectres selon les appareils est limitée. La sensibilité de la CL-SM reste également le plus souvent inférieure à celle de

la CG-SM après dérivation, pour les produits où cette dernière est applicable.

Résonance magnétique nucléaire (RMN) [25]

À la différence des couplages décrits plus haut, cette technique n'est aujourd'hui qu'exceptionnellement associée à une méthode séparative ; cela n'est cependant pas rédhibitoire, même pour des échantillons complexes, car la RMN reposant sur la discrimination des composés contenant un élément particulier (hydrogène, carbone, fluor, phosphore, pour ne citer que les plus courants) par l'environnement chimique dans lequel se situe cet élément.

C'est la technique de choix pour l'analyse d'échantillons liquides, le traitement de l'échantillon pouvant dans ce cas être réduit à sa plus simple expression (filtration).

Si la RMN du phosphore 31 est naturellement la technique la plus directement intéressante ici – *vue sa sélectivité par rapport au bruit de fond environnemental (qui contient normalement très peu de produits phosphorés) et sa capacité de discrimination (classification par familles : phosphates, phosphoramidates, phosphonates, phosphonothiolates...)* – la RMN du proton apporte également son lot d'informations, avec une sensibilité qui peut dans certains cas compenser la perte de sélectivité. À cet égard, citons des enchaînements de type OCH₂CH₂X, SCH₂CH₂X ou NCH₂CH₂X, présents dans de nombreux composés d'intérêt, et qui peuvent facilement être caractérisés par RMN, d'autant que les régions spectrales concernées sont fréquemment peu masquées par des interférents. De surcroît, la puissance de filtration de l'information et d'identification RMN sont encore accrues par les techniques de RMN bidimensionnelle qui peuvent permettre d'isoler un signal d'interférents éventuels, voire de reconstruire totalement la structure d'une molécule.

La limite actuelle aux utilisations de la RMN pour l'analyse de traces reste sa sensibilité relativement faible, de l'ordre du µg.mL⁻¹ pour le proton et le phosphore, avec une taille minimale d'échantillon de l'ordre de 500 µL pour les appareils courants. Cependant, les développements récents (microsondes, cryosondes...) laissent augurer de rapides progrès dans ce domaine.

Validation de l'identification

Les différentes techniques d'analyse que nous venons de passer sommairement en revue permettent donc théoriquement de détecter et identifier les composés d'intérêt éventuellement présents. Cependant, l'identification ne pourra être acceptée qu'après une étape indispensable de vérification, sur la base des informations fournies par les différents moyens. Les critères d'identification actuellement retenus par la communauté internationale impliquée dans les travaux de vérification de la CIAC sont :

- la comparaison avec une référence « authentique » : composé commercial ou synthétisé sur site, et analysé dans les mêmes conditions (méthode la plus souhaitable, mais plus difficile à mettre en œuvre) ;
- la comparaison avec un spectre de bibliothèque (banque de données propres au laboratoire, banque de données académique ou commerciale) ;
- ou l'interprétation des données d'analyse fondée sur la comparaison des données expérimentales obtenues avec un composé structurellement proche (méthode la plus sujette à discussion, mais qui peut être inévitable pour des composés auparavant inconnus ou chimiquement difficiles d'accès).

Dans tous les cas, l'identification d'un composé suivant l'un ou l'autre de ces critères doit être réalisée par deux méthodes complémentaires avant de conclure. Il est de toute façon probable que des analyses dans le cadre de la vérification de la CIAC seront confiées simultanément à au moins deux laboratoires, l'OIAC conservant un reliquat des échantillons en vue d'une possible contre-expertise.

Conclusion

La diversité des scénarios présentés au début de cet article montre combien la combinaison de plusieurs techniques d'analyse existantes est requise pour parvenir à répondre à tous les cas de figure susceptibles de se présenter. Une polyvalence, inhabituelle dans les recherches « classiques », est demandée aux laboratoires visant à atteindre un niveau d'expertise dans le domaine. Les critères d'identification exigés, d'autant plus sévères que le contexte dans lequel peuvent s'opérer de telles analyses est sensible, mettent en exergue l'obligation de disposer :

- de banques de données spécialisées, et préférentiellement de bibliothèques réalisées en interne (les variations observées entre différents types d'appareils pouvant en particulier rendre impossible l'identification par comparaison à une référence) ;
- d'une capacité de synthèse, pour pouvoir compiler les banques recommandées ci-dessus et pour réaliser à la demande la fabrication d'un standard « authentique » ;
- d'opérateurs expérimentés, susceptibles d'exploiter les données à leur disposition pour effectuer une identification, et entraînés à la manipulation d'agents hautement toxiques.

Pour l'analyse proprement dite, le couplage CG-SM reste encore le moyen d'identification le plus répandu, mais l'extension de la menace chimique à des molécules de hautes masses (toxines) rend inévitable la mise en œuvre conjointe de couplages CL-SM. Les laboratoires experts dans le domaine devraient principalement évoluer autour de ces techniques pour l'identification, tout en préservant des outils capables de filtrer certaines informations pertinentes tels que les détecteurs chromatographiques spécifiques ou la RMN mode phosphore.

Enfin, l'évolution actuelle des techniques d'analyse à haut débit doit permettre de rendre plus performantes et réactives les analyses effectuées sur le terrain en continu (pour la surveillance d'une zone, par exemple). En revanche, l'idée de routine ou d'analyse de grandes séries semble peu en adéquation avec les analyses de confirmation telles qu'esquissées ici. Dans ce domaine, l'attente de progrès se porte, non vers une rapidité accrue, mais vers une meilleure sensibilité et la multiplication des solutions utilisables autour d'un même moyen d'analyses, pour obtenir une plus grande adaptabilité à la situation rencontrée.

Remerciements

A tous les personnels de la section analyse chimique, notamment C. Albarêt, P. Augé, A. Bossée, C. Montauban et H. Renault pour la mesure des limites de détection, et plus généralement à tous les lecteurs de cet article.

Notes et références

- [1] Ricaud P., article « arme chimique », *Encyclopedia Universalis* ; Meyer C., *L'arme chimique*, Ellipses, 2002 ; Lepick O., *Les armes chimiques*, Que sais-je, 1998.

- [2] Lepick O., *La Grande Guerre Chimique 1914-1918*, PUF, 1998.
 [3] *Nature*, 1995, 374, p. 392 ; Morita H. *et al.*, *Lancet*, 1995, 346, p. 290 ; Tsuchihashi H., *J. Anal. Toxicol.*, 1998, 22, p. 383.
 [4] Wax P.M. *et al.*, *Ann. Emerg. Med.*, 2003, 41, p. 700.
 [5] Les termes d'« arme chimique » et « produit chimique toxique » sont précisément définis à l'article II de la Convention d'Interdiction des Armes Chimiques. On utilisera dans cet article le vocable « agent de guerre chimique » ou « toxique de guerre » au sens de produit chimique toxique pouvant être employé à des fins militaires.
 [6] On trouvera de plus amples détails dans Meyer V., *Anal. Chem.*, 1998, 70, 21A.
 [7] L'AP2C, appareil portable de contrôle de la contamination, de conception et de fabrication française, est en dotation dans plusieurs armées. Fonctionnant sur le principe de la photométrie de flamme, il permet de détecter spécifiquement des traces de composés phosphorés ou soufrés.
 [8] Rautio M. *et al.*, *Recommended operating procedures for sampling and analysis in the verification of chemical disarmament*, procédures GS-1 à GS-5 et SC-1 à SC-7, Ministère des affaires étrangères de Finlande, 1994 ; AEP-10/Manuel OTAN sur le prélèvement et l'identification des agents de guerre chimique, 3^e éd., Organisation du traité de l'Atlantique Nord (sans classification), 1988.
 [9] Pawliszyn J., *SPME, Theory and Practice*, Wiley-VCH, New York, 1997 ; Lakso H.A., Ng W.F., *Anal. Chem.*, 1997, 69, p. 1866 ; Schneider J.F., Boparai A.S., Reed L.R., *J. Chromatogr. Sci.*, 2001, 39, p. 420.
 [10] Brickhouse M.D. *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2000, 883, p. 185.
 [11] Stuff J.R. *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 1999, 849, p. 529.
 [12] Black R.M. *et al.*, *J. Chromatogr.*, 1993, 637, p. 71.
 [13] Lambropoulou E. *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2001, 922, p. 243.
 [14] Beck N.V., *J. Chromatogr. A*, 2001, 907, p. 221 ; Chaudot X., Tambuté A., Caude M., *J. High Res. Chromatogr.*, 1998, 21, p. 457.
 [15] Chaudot X., Tambuté A., Caude M., *J. Chromatogr. A*, 2000, 866, p. 231.
 [16] Hennion M.C., *J. Chromatogr. A*, 2003, 1000, p. 29.
 [17] Nassar A.F., Lucas S.V., Hoffland L., *Anal. Chem.*, 1999, 71, p. 1285 ; Vermillion W.D., Crenshaw M.D., *J. Chromatogr. A*, 1997, 770, p. 253.
 [18] Black R.M., *J. Chromatogr. A*, 2003, 1000, p. 1.
 [19] Mazurek M. *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2001, 919, p. 133.
 [20] D'Agostino P.A., Provost L.R., *J. Chromatogr.*, 1988, 436, p. 399.
 [21] Kientz C.E., *J. Chromatogr. A*, 1998, 814, p. 1.
 [22] Hooijschuur E.W.J., Kientz C.E., Brinkman U.A.T., *J. Chromatogr. A*, 2001, 928, p. 187.
 [23] D'Agostino P.A., Hancock J.R., Provost L.R., *J. Chromatogr. A*, 1999, 840, p. 289.
 [24] Van Baar B.L., Hulst A.G., Wils E.R., *Anal. Biochem.*, 2002, 301, p. 278.
 [25] Mesilaakso M., Niederhauser A., *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R.A. Myers (éd.), J. Wiley & Sons UK, 2001.
 [26] La plupart des valeurs expérimentales sont extraites de Munro N.B. *et al.*, *Environ. Health Perspect.*, 1999, 107, p. 933 ; les valeurs marquées d'un astérisque sont des estimations obtenues par le logiciel LOGKOW de Syracuse Research Corporation (<http://esc.syrres.com/interkow/kowdemo.html>).
 [27] Rousseau J.-M. *et al.*, *Ann. Fr. Anesth. Réanim*, 2000, 19, p. 588.
 [28] Mérat S. *et al.*, *Ann. Fr. Anesth. Réanim*, 2003, 22, p. 108 ; Papirmeister B. *et al.*, *Medical defense against mustard gas: toxic mechanisms and pharmacological implications*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1991.



B. Bellier

Bruno Bellier (auteur correspondant)*, ingénieur, est chef du Département analyse et évaluation chimique, **Arlette Bégos**, ingénieur, est chef de la Section analyse chimique, **Yannick Juillet**, technicien, est spécialiste de la chromatographie et **Laurent Taysse**, docteur ès sciences, est chef de la Section toxicologie générale et analytique au Centre d'études du Bouchet**.



A. Bégos



Y. Juillet



L. Taysse

* Tél. : 01 69 90 84 21.
 Fax : 01 64 93 52 66.

Courriel : bruno.bellier@dga.defense.gouv.fr
 ** DGA/Centre d'études du Bouchet, 5 rue Lavoisier, BP 3, 91710 Vert-le-Petit.