

Des analyses chimiques aux conséquences sociétales significatives

Patrick Arpino, ENSCP, Équipe "Synthèse, Électrochimie, Imagerie et Systèmes Analytiques pour le Diagnostic", 11 rue Pierre et Marie Curie, 75231 Paris Cedex 05, France

patrick.arpino@chimie-paristech.fr

https://www.researchgate.net/profile/Patrick_Arpino

1. Introduction

CI1 Je vous remercie pour cette flatteuse présentation. Je vais vous parler de chimie analytique, à ma manière, et je l'espère simplement.

CI2 J'aimerais partir d'un des derniers clichés montrés ici même par Paul Rigny, le 24 novembre dernier, dans lequel il rappelle qu'elle devrait être l'image de la chimie aujourd'hui, et pour mettre en œuvre tous les beaux concepts qu'il a présentés, il faut des instruments performants pour permettre de voir le monde qui nous entoure.

2. Préambule historique

CI3 Il est fréquent de pratiquer la politique de l'autruche, c'est-à-dire de ne pas s'inquiéter de ce qui reste invisible. Voyons un peu ce qu'il en a été dans le passé :

CI4 Tout d'abord, l'évaluation anthropomorphique a longtemps prévalu, à l'origine des premières unités de mesure.

CI5-CL6 Ceci a perduré jusqu'au début du dix-septième siècle, comme l'ont traduit les artistes de l'époque, notamment les peintres flamands montrant les 'Piskijkers', dont voici quelques noms et quelques-unes de leurs œuvres. On n'en est pas encore à observer les urines d'athlètes dopés, et cela viendra bien plus tard, comme nous le verrons à la fin de cet exposé.

CL7 À partir du milieu du 17^{ème} siècle, les progrès des expériences et des connaissances bouleversent profondément la société. Le Flamand Antony von Leeuwenhoek est emblématique de cette période. Il est encore considéré comme l'inventeur du microscope.

CL8 En réalité, un dispositif très simple, procurant un grossissement de l'ordre de 200. Issu d'une famille de drapier, von Leeuwenhoek a probablement adapté un compte-fils servant à examiner la densité et la trame de tissus. Pourquoi se souvient-on encore de cette découverte ?

CI9 Comme aujourd'hui, « Publier ou Périr » était déjà d'actualité. Il adressa 560 lettres aux sociétés savantes, principalement à la « Royal Society », décrivant ce qu'il voyait au moyen de dessins très précis, par exemple les microbes de sa plaque dentaire, ou ses propres spermatozoïdes. C'est sans doute pour cela qu'on se souvient encore de lui.

I10 Le terme de microorganisme a remplacé depuis celui d'animalcules, les « petits animaux » dont parlait Van Leeuwenhoek pour désigner ces nouvelles espèces vivantes désormais visibles. Ce constat analytique **exact** fut détourné et servi d'argument pour étayer une hypothèse **fausse** :

celle de la « génération spontanée ». Une telle erreur d'interprétation est tout aussi fréquente aujourd'hui.

CI11 Son contemporain, le français Louis Joblot, perfectionne l'instrument, et très tôt démarrent les premières peurs occasionnées par ce qui est vu désormais.

CI1 Aujourd'hui, de nouvelles frayeurs font quotidiennement la hune des médias, car désormais on voit les traces infinitésimales des molécules diverses qui nous entourent.

3. La mesure des masses

CI13 Comment en est-on arrivé à voir aujourd'hui ce qui était invisible précédemment ? Reprenons notre parcours le long des progrès pour voir, identifier et doser les molécules qui nous entourent, en mesurant des quantités de plus en plus infimes de matière, longtemps limitées à l'échelle du gramme, puis du milligramme.

CI14 J'espère ne pas avoir besoin de définir les abréviations anglo-saxonnes GC, GC/MS, LC et LC/MS, que beaucoup dans l'assistance doivent connaître.

La limite inférieure de détection des appareils de routine se situe actuellement à des niveaux très bas. À de tels seuils de détection, il devient possible de 'voir' à peu près tout ce que l'on a envie de voir, tant les molécules dites « naturelles » que celles artificielles résultant des activités humaines.

CI15 Les spectromètres de masse de la fin des années 60 étaient de véritables dinosaures comparés à ceux d'aujourd'hui. La miniaturisation des appareils, les progrès informatiques ont amélioré les performances et réduit les coûts. Ici un appareil mythique : le premier GC/MS à analyseur magnétique du Suédois LKB,

I16 Et ici ses concepteurs, le Suédois Ryhage et l'Américain Sweeley, pionniers des applications biomédicales de la GC/MS

CI17 Le premier GC/MS à analyseur quadripolaire de l'américain Finnigan, aujourd'hui ThermoFisher

CI18 L'appareil haute résolution au service central d'analyse du CNRS à Solaize

Ces appareils étaient surtout orientés vers l'analyse structurale en chimie organique, et seulement de manière secondaire vers l'analyse chimique analytique.

CI19 Ici un appareil haute résolution, le MS9, du même type que celui qui fut longtemps en place au sous-sol de l'ICSN à Gif, sous la responsabilité de Pierre Longevialle et de Bupesh Das.

CI20 Au début des années 80, apparurent des appareils moins encombrants, moins onéreux, capables de traiter de grandes séries d'échantillons, et qui pouvaient être mis entre plusieurs mains après un minimum d'apprentissage. On les appela les 'benchtop', expression mal francisée en appareils de paillasse. Ce fut une révolution chimie analytique, comme nous allons le voir par la suite. D'abord pour le couplage GC/MS

CI21 Puis une décennie plus tard, les LC/MS 'benchtop' après que les méthodes d'ionisation à pression atmosphérique, notamment l'électrospray, furent mieux maîtrisées, à défaut d'être totalement comprises

Ces nouvelles machines ont totalement modifié la perception des molécules chimiques environnantes, et certaines de leurs applications ont eu des conséquences sociétales considérables, comme je vais l'illustrer au moyen de trois exemples

4. L'affaire Perrier

CI22 Il y a trois étapes dans cette affaire, d'abord la dangerosité incontestable du benzène, puis la législation américaine et les progrès de l'instrumentation analytique, et enfin l'analyse GC/MS fatale.

CI23 Il est inutile de revenir ici sur les dangers que représente le fait de respirer ou d'ingurgiter du benzène. Sa toxicité est bien établie, même s'il est omniprésent encore aujourd'hui parmi nous.

CI24 En 1974, la législation américaine demande à l'agence de protection de l'environnement (EPA) de déterminer entre autres polluants de l'eau, le benzène, afin d'aboutir à un seuil de zéro, ce qui est une absurdité d'un point de vue de chimie analytique, et un seuil maximum légal de cinq ppb, soit 5 µg/L. Au-delà duquel le public concerné doit être immédiatement alerté par tous les moyens possibles. Sauf qu'à cette époque, les moyens analytiques n'étaient pas encore prêts pour procéder à de telles analyses en grand nombre et à moindre coût.

CI25 Une décennies plus tard, la situation change, et les GC/MS benchtop équipent progressivement tous les laboratoires départementaux de l'EPA chargés du contrôle de la qualité de l'eau.

CI26 Telle la métaphore du météorologiste Lorentz « un bruissement des ailes d'un papillon au Brésil est capable de déclencher une tornade au Texas », c'est un petit événement, en Caroline du Nord, qui va déclencher une tornade en France, plus particulièrement à Vergèze dans le Gard, où se situe l'usine Perrier.

CI27 En décembre 1989, un banal laboratoire départemental de l'EPA, s'équipe d'un nouveau GC/MS, et décide de le tester sur une eau réputée ultra pure, le contenu d'une bouteille de Perrier acquise auprès d'un épiciers local. Et stupeur, la teneur en benzène est environ trois fois le minimum légal autorisé. Il applique la législation de 1974 prévue dans un tel cas, et alerte les autorités. À partir de là, tout dérape.

CI28 Un temps attribué à des filtres mal entretenus, puis à la présence naturelle de benzène dans l'eau, mal éliminée par la suite, Perrier procède à un retrait massif de la distribution au niveau mondial, ce qui n'empêchera pas l'effondrement du cours de l'action en bourse.

CI29 Ce diagramme illustre parfaitement ce que j'appelle une fracture sociétale provoquée par une instrumentation analytique nouvelle. Un brusque décrochage. Des pertes colossales, et de nombreuses années avant de s'en remettre, et encore à quel coût !

CI30 Il faudra attendre une décennie avant que Perrier ne redevienne bénéficiaire, mais en changeant entre-temps de propriétaire, étant acquise à moindre coût par Nestlé, qui procédera ensuite à de vastes plans de restructuration des personnels.

CI31 J'ai été volontairement un peu vite pour vous parler de ce premier exemple, car j'aimerais pour la première fois pour moi vous parler des deux autres exemples qui vont suivre. La publication que j'ai consacrée à l'affaire Perrier est en libre téléchargement sur le site de l'Actualité Chimique.

5. Séoul 1988

CI32 La problématique du dépistage du dopage par des stéroïdes anabolisants démarre exactement à la même période et dans les mêmes conditions que ce que nous venons de voir pour le benzène.

Une législation stricte établie en 1974 par les commissions médicales du CIO et de la FIAA (devenu depuis 1993, International Association of Athletics Federations (IAAF), interdisant l'usage des stéroïdes anabolisants, créant même deux ans plus tard une sous-commission spéciale, mais sans que les moyens techniques existent pour l'appliquer. Il faudra attendre une décennie, là encore grâce à l'introduction des GC/MS benchtop pour qu'elle se mette en œuvre, notamment à partir de 1984 lors des jeux olympiques de Los Angeles.

Le Canada accueille en 1988 la première conférence mondiale permanente sur l'antidopage dans le sport, ce qui ne sera pas sans ironie du sort. C'est aussi l'année où se tient également la 24^e olympiade d'été de l'ère moderne,

CI33 Ce qui nous projette à Séoul

CI34 Deux ans plus tôt, un laboratoire d'analyse a été créé à Séoul et fait partie de la petite dizaine de centres d'analyse agréés par le CIO, il y en a aujourd'hui 34. Il est le laboratoire officiel pour le contrôle des athlètes lors des jeux de 1988.

CI35 Un seul et même fournisseur pour tous les laboratoires officiels, Hewlett-Packard, aujourd'hui Agilent, équipe les laboratoires pour toutes les techniques d'analyse, notamment pour l'analyse GC/MS, par exemple avec cet appareil. Ce n'est pas la représentation de celui de Séoul, mais celle d'un modèle strictement identique.

CI36 Arrivent les 24^e olympiades d'été

CI37 Mais quelques jours avant l'ouverture, la télévision canadienne diffuse une émission qui est toujours présente aujourd'hui encore dans les archives de Radio-Canada. Diffusée le 7 septembre, elle est prémonitrice de ce qui va se produire environ deux semaines plus tard. Elle est consacrée aux capacités du laboratoire officiel des jeux à dépister les éventuels tricheurs.

CI38 La vidéo dure trois minutes, et j'ai éliminé ici le début de l'émission. Après un tube de testostérone, quelques images de deux disciplines olympiques, apparaît pendant un court instant une liste des stéroïdes qui seront contrôlés lors des Jeux. Dans cette image que j'ai extraite pour mieux vous la montrer, en bas de liste, figure un nom, le stanozolol, indiquant clairement que le

laboratoire est capable de le déceler. Rappelons que les premiers de chaque finale sont systématiquement contrôlés. Et pourtant quelques jours plus tard.

CI39 C'est la course où Ben Johnson, triomphe devant son grand rival Carl Lewis, dans un temps stupéfiant 9,78 s. Usain Bolt a fait mieux depuis avec 9 s 58.

CI40 Deux jours plus tard, le scandale éclate. Il sera planétaire. Une recherche aujourd'hui au moyen de Google avec les seuls termes 'Ben Johnson' Séoul 1988 aboutit à plus de 65 000 pages. Certaines jusqu'en 2014, dans une interview du sprinteur par un journaliste du journal Le Monde. Le but de mon exposé n'est pas de paraphraser Wikipédia, mais de considérer cette affaire du strict point de vue de la chimie analytique.

CI41 Et pour cela, il convient de regarder l'article rigoureux, publié dans une revue incontestable. Le manuscrit fut adressé moins d'un an après l'analyse de septembre 1988, sans s'y référer dans aucun paragraphe ou référence bibliographique. Mais ce qui est décrit dans cet article est certainement ce qui fut mis en œuvre pour dépister le dopage de Ben Johnson un an plus tôt.

CI42 Le stanozolol est un dérivé de la testostérone, le groupement carbonyle ayant été transformé en un cycle pyrazole.

CI43 Pour qu'il y ait accusation légale de dopage, il convient de mettre en évidence non seulement la molécule incriminée, mais au moins un de ses métabolites, pour prouver qu'elle a été absorbée et métabolisée par l'athlète, et non introduite fortuitement dans l'urine.

Seul celui-ci fut clairement identifié, d'autres métabolites de phase 1, avec des groupements hydroxyles dans ces deux positions furent par la suite identifiés dans d'autres études.

CI44 Les deux molécules que nous venons de voir ne sont plus présentes dans l'urine, ou aussi dans les matières fécales, sous forme libre, mais sous la forme conjuguée de glucuronides, soit ici, soit là. Ce que la GC/MS ne peut détecter, car ces molécules ne sont pas vaporisables sans dégradation.

CI45 Il est obligatoire de procéder à une hydrolyse enzymatique au moyen d'une glucuronidase, qui redonne les molécules initiales, puis d'en préparer des dérivés volatils

CI46 Tel celui-ci, au moyen de deux réactions complexes consécutives, de silylation et de fluoroacylation, pour le stanozolol.

CI47 Et de la même manière, dans le cas du métabolite. Ces deux transformations rendent les molécules vaporisables et détectables par GC/MS, mais en doublant pratiquement leurs masses moléculaires. Il est ainsi paradoxal que pour détecter des molécules dopantes susceptibles d'accroître la masse musculaire des individus dopés, on soit obligé de doper les molécules dopantes afin d'augmenter leurs masses moléculaires. Le suivi des ions aux masses indiquées fournit tous les éléments pour mettre au point une méthode de dosage quantitative.

CI48 D'où le protocole général standard pour l'analyse des stéroïdes anabolisants dans les urines d'athlètes présumé dopés qui a prévalu pendant de nombreuses années. Si les premières étapes

de ce protocole sont applicables à n'importe quel échantillon d'urine, il n'existe pas de protocole universel de préparation de dérivés volatils. Il existe une multitude de recettes pour bloquer telle ou telle fonction polaire, mais aucune qui marche à tous les coups, avec un haut rendement. Et c'est bien là le problème, surtout lorsque l'on n'a que quelques heures devant soi entre la prise d'échantillons et la transmission du résultat aux instances olympiques. Pour des échantillons anonymes, la seule approche est de tenter une réaction de pertrimethylsilylation, et d'analyser les résultats.

CI49 Malgré cette limite, l'analyse GC/MS de Séoul a provoqué une fracture sociétale identique à celle observée dans le cas du benzène dans le Perrier. Là aussi, il y a un avant et un après, comme le montre ce diagramme. Le nombre total d'échantillons d'urine analysés par le laboratoire accrédité du CIO a continuellement progressé entre 1988 et 1994 pour atteindre environ 95 000 analyses, mais le pourcentage d'échantillons positifs marque une brutale décroissance, avant de reprendre sa progression.

CI50 Le protocole standard mis au point pour l'analyse des stéroïdes anabolisants devait atteindre ses limites à la fin des années 90, pour tout un tas de raisons que je vous énumère ici, illustrant pourquoi les méthodes GC/MS standard ne pouvaient plus déceler les nouvelles molécules dopantes. Ce qui conduit à la troisième histoire que je souhaite vous raconter, montrant comment ces limites purent être en partie surmontées grâce à une nouvelle instrumentation, le couplage LC/MS.

6. Balco et la THG

CI51 En passant tout d'abord par la banlieue de San Francisco, à Burlingame. Là où se trouve le Bay Area Laboratory Cooperative, ou Balco.

CI52 Un établissement - fondé par Victor Conte, un nutritionniste autoproclamé, dépourvu de diplômes universitaires - qui est censé effectuer des analyses de sang ou d'urine, et surtout de fournir des compléments alimentaires, notamment à des sportifs bien connus. Dès 2002, un agent fédéral du fisc, Jeff Novitsky, particulièrement opiniâtre et tenace va s'intéresser de près à un possible trafic de substances dopantes, notamment une, surnommée « the clear », réputée être indécidable par le protocole standard du CIO dont nous venons de parler.

CI53 En 2003, une main anonyme, qui ne le restera pas très longtemps, telle celle d'un lanceur d'alerte, fait parvenir à l'agence antidopage américaine, dans le Colorado, une seringue utilisée, ramassée dans un vestiaire, est supposée avoir contenu « the clear ». Un extrait au méthanol du contenu de la seringue et ensuite transmise à Los Angeles au laboratoire du Pr. Don Catlin, que l'on voit ici poser devant l'instrument, un LC/MS Sciex modèle API 300 dont nous allons parler.

CI54 Là encore, une recherche sur Google avec les termes 'affaire Balco, THG ' conduit à plus de 35 000 pages. Mais comme l'affaire de Séoul, il convient de regarder de près des publications scientifiques sérieuses, dans lequel Don Catlin et ses collaborateurs expliquent comment ils ont identifié la substance *a priori* inconnue et non détectable, contenue dans la seringue, et la méthode mise au point pour l'identifier dans l'urine. Notamment dans Rapid Communications in

Mass Spectrometry, de manière rigoureuse, et dans les pages A d'Analytical Chemistry, ou dans Chemical Engineering News, deux publications de l'American Chemical Society, de manière un peu plus romancée.

CI55 En procédant d'abord par GC/MS, comme à Séoul, mais avec un spectromètre de masse à haute résolution, l'analyse de l'extrait de la seringue après préparation exhaustive de dérivés per triméthyl silylés, conduit à une forêt de plus d'une trentaine de pics, tous non identifiables, à l'exception d'un seul, probablement une impureté du produit majeur. Si substance il y a, elle est bien indétectable par le protocole standard du CIO pour l'analyse des stéroïdes anabolisants.

CI56 Mais curieusement, de très bons résultats sont obtenus en ne faisant rien, en analysant directement la solution, qui montre un pic majeur, un possible ion moléculaire à la masse 312, la haute résolution permettant d'en suggérer une formule élémentaire, et des fragmentations semblables à celles de 2 stéroïdes bien connus en tant qu'anabolisants interdits, la gestrinone et la trenbolone.

CI57 L'ensemble de ces résultats pointe fortement envers un dérivé tetrahydrogéné de la gestrinone, abrégé en THG, ce que confirmera la synthèse du produit, et la caractérisation par RMN, GC, LC et MS. C'est l'encombrement stérique du groupement OH, gêné par le groupement éthyle voisin, et par le fait qu'il s'agit d'un alcool tertiaire, qui rendent très difficile d'en obtenir un dérivé triméthyl silyl, d'où l'échec du protocole standard par GC/MS, et donc d'être indétectable.

CI58 Ne pas préparer des dérivés volatils pour analyser directement la THG par GC/MS n'est possible que si l'on en dispose d'une quantité suffisante. S'agissant d'analyse de traces, la THG est trop polaire pour ne pas être retenue de manière irréversible par la colonne chromatographique. Il faut en faire un dérivé volatil, c'est possible, mais c'est complexe, notamment pour bloquer l'alcool tertiaire.

CI59 - CI60 Mais si l'on dispose d'un appareil pour le couplage LC/MS/MS, tel celui qui fut utilisé, et dont on voit ici une image d'archives du constructeur Sciex en arrière-plan, l'analyse est très simple, la THG se protone facilement par ionisation electrospray, et la dissociation de ce précurseur fournit des transitions suffisamment caractéristiques pour mettre au point une méthode de dosage. Le couplage LC/MS/MS venait ainsi de faire une entrée fracassante dans le domaine du dépistage du dopage, notamment de la THG.

Après avoir identifié le contenu de la seringue, une méthode fut mise au point pour détecter la THG dans des urines blanches, dopés à quantités connues du stéroïde visé, et également dans des urines de babouin, après lui avoir administré par injection intraveineuse et par injection intramusculaire, des solutions de THG.

CI61 Du coup le protocole opératoire se simplifie grandement, il faut procéder comme précédemment afin d'extraire, puis d'hydrolyser, les glucuronides de la THG, mais on peut ensuite analyser directement l'extrait par LC/MS/MS.

CI62 – CI64 Comme pour les deux histoires racontées précédemment, la déflagration fut planétaire. On pouvait dès lors, grâce au couplage LC/MS/MS détecter la THG, et parmi les 550 échantillons d'urines d'athlètes qui avaient été conservés, 20 furent déclarés positifs, notamment celles d'athlètes de renommée mondiale, dont les carrières furent altérées, voire interrompues: voici quelques-unes de ces figures parmi les plus connues. Tous les acteurs de Balco furent condamnés soit à des peines de prison ferme, soit avec sursis, et a de fortes amendes, que ce soient les dirigeants, où les entraîneurs, en particulier ce dernier, qui avait été le lanceur d'alerte ayant expédié la seringue qui a tout déclenché.

Conclusion

Pour conclure cette balade qui, je l'espère, aura été un peu ludique. J'espère vous avoir montré à quel point l'apparition de nouveaux instruments d'analyse chimique, répondant aux qualités que j'énumère ici, peuvent induire des fractures sociétales, avec des conséquences de très grande ampleur.

Je remercie l'assistance d'être venue et de m'avoir écouté.

12 janvier 2017

Chimie analytique et société
Quelques exemples

Patrick Arpino

Centre d'Alembert

12 janvier 2017

CL1

Et l'image de la chimie aujourd'hui.....?

Maîtriser les peurs des citoyens :

APPRENDRE LA DOSE

(alimentation, pollution, pesticides....)

APPRENDRE LA NOTION D'EXPOSITION

APPRENDRE LA NOTION DE SEUIL

APPRENDRE L'INCERTITUDE (SANTE/ENVIRONNEMENT)

Paul Rigny - 24 novembre 2016
Centre D'Alembert

2

CL2

Rappels des progrès en matière de perception

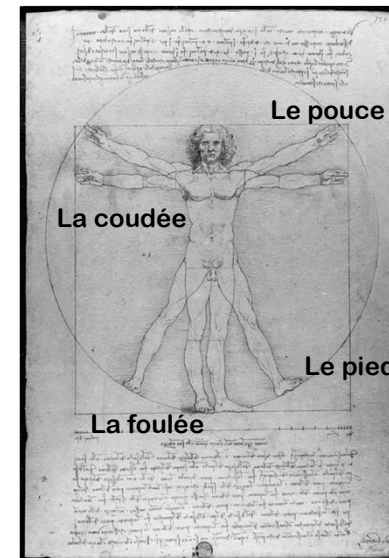


Pas vu ? Pas de craintes !

CL3

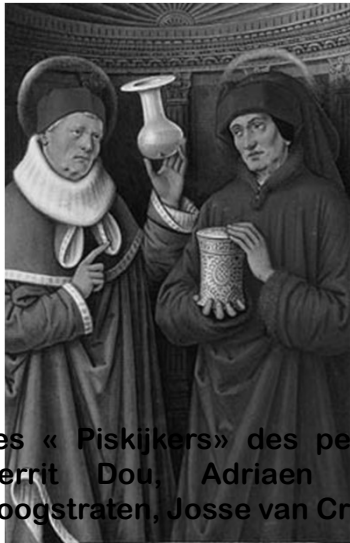


Au début, les cinq sens pour évaluer ce qui entoure



CL4

Au 17^{ème} siècle, on juge encore selon ce qui est vu



Les « Piskijkers » des peintres flamands : Jan Steen, Gerrit Dou, Adriaen van Ostade, Samuel van Hoogstraten, Josse van Craesbeeck,...

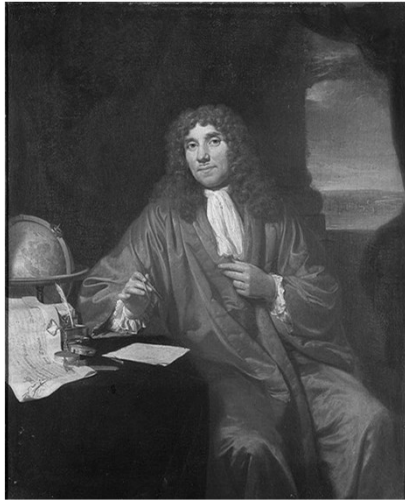
CL5

Au 17^{ème} siècle, on juge encore selon ce qui est vu



CL6

La découverte du microscope crée un choc

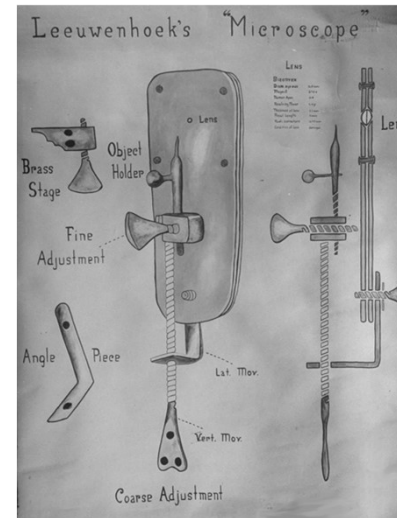


Antony van Leeuwenhoek (1632-1723)



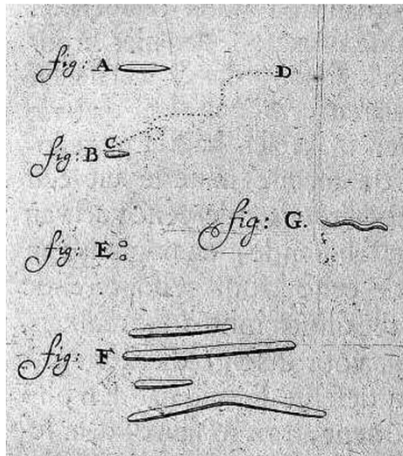
CL7

Un dispositif initialement très simple



CL8

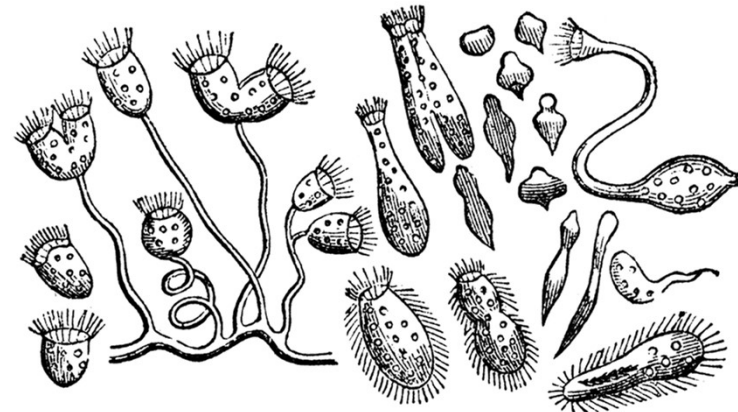
L'infiniment petit devient visible



Delft, 12 novembre 1673

CL9

Le monde des 'animalcules' se dévoile



Contribuant ainsi à une hypothèse erronée:
« La génération spontanée »

CL10

Des peurs ...déjà

A propos des nématodes (anciennement "anguillules") du vinaigre

"Bien des gens qui les avoient vûës dans nos microscopes discontinuèrent de manger de la salade. J'avoient beau leur dire qu'elles étoient cent mille fois plus petites qu'ils ne les voyoient par ces instrumens, que la chaleur de l'estomac les faisoient mourir en un instant, et que, puisqu'ils avoient mangé de la salade sans en avoir ressenti aucune incommodité, ils pouvoient continuer sans danger l'usage d'une chose qui leur faisoit plaisir, la plupart ne pouvoient comprendre que les serpens qui leur avoient paru plus gros que le doigt et plus long que le bras ne fissent quelque mauvaise impression sur les membranes intérieures de l'estomac."

CL11

Et aujourd'hui ?

polybromo-diphenyl éthers

bis-phénol A

mélamine

dioxines

pesticides

solvants

etc.

etc.

etc.

etc.

Car désormais, la chimie analytique permet de les « voir »

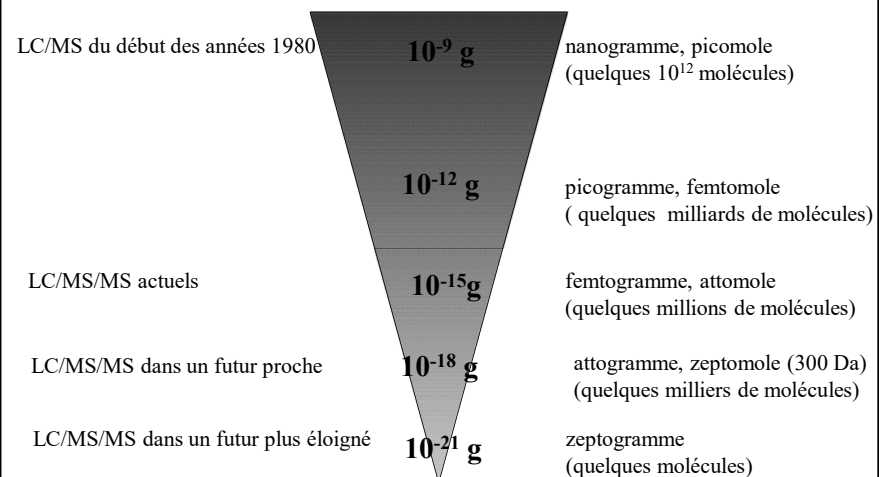
CL12

Amélioration des pesées



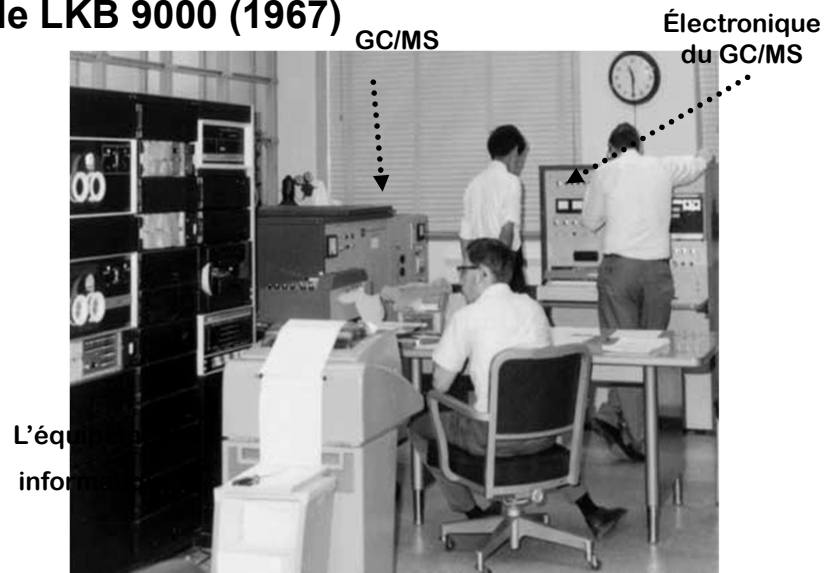
CL13

Des limites de détection toujours plus basses

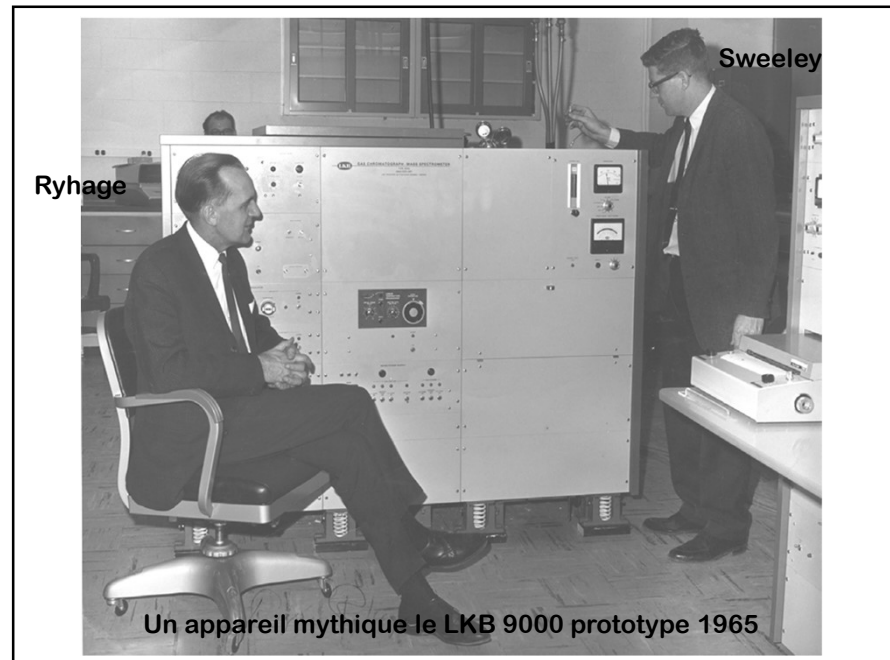


CL14

Le premier GC/MS magnétique commercial le LKB 9000 (1967)

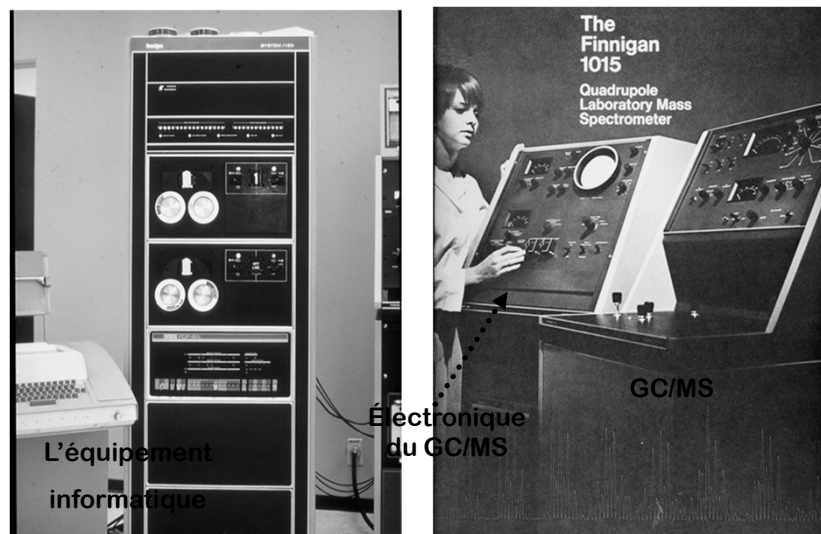


CL15



CL16

Le premier GC/MS quadripolaire commercial ; (1968)



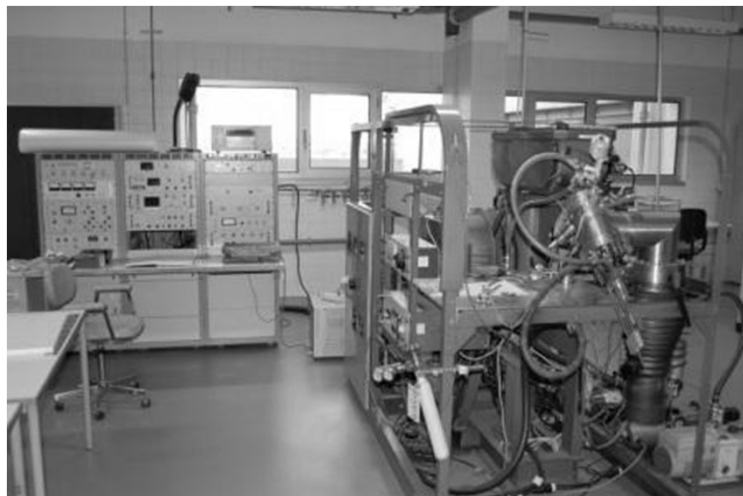
CL17

Le ZAB du CNRS à Solaize



CL18

Un MS9 identique à celui de l'ICSN



CL19

Les GC/MS « benchtop » des années 1980



CL20

Les LC/MS « benchtop » des années 2000...



Waters, Xevo, TQ MS



**Thermo Scientific Orbitrap
Fusion Tribrid LC-MS**

CL21

Tempête dans un verre d'eau...gazeuse

Une crise en trois étapes

- 1. Une substance dangereuse très présente**
- 2. La législation américaine**
- 3. L'analyse qui fait « pschitt... »**

CL22

Une substance notoirement toxique

- Maladies graves professionnelles dès le XIX^{ème} siècle
 - Benzénisme (intoxication par le benzène seul)
 - Benzolisme (par benzène et homologues supérieurs, toluène, xylène...)
- Intoxication aigüe : 65 g/m³ pendant 5 à 10 min
 - Soit 1 litre accidentellement répandu dans une cage d'ascenseur
- A l'origine de cancers et de leucémies
- Classé en 2004 par l'Union Européenne comme substance cancérigène et mutagène

CL23

La législation américaine

- 1974



- Le Congrès Américain vote le 'Safe Drinking Water Act' demandant à l'US Environmental Protection Agency – EPA - de déterminer les niveaux de polluants chimiques dans l'eau ne causant pas de risques à la santé
- L'EPA fixe comme objectif pour le benzène
 - Un seuil recommandé de zéro !
 - Un seuil maximum légal de 5 ppb (5µg/L)
- Il stipule qu'au-delà de la limite de 5 ppb, le public doit en être informé par tout moyen disponible, presse, radio, TV

Sauf que les outils analytiques
n'étaient pas prêts !

CL24

Situation à la fin des années 1980

En 1989, Les GC/MS benchtops sont désormais installés dans les laboratoires d'analyse de l'EPA sur tout le sol américain

La mise en œuvre de la législation de 1974 du “Safe water drinking act” est désormais possibles

L'EPA peut régulièrement contrôler le niveau de benzène dans les eaux de boisson, et avertir le public en cas de dépassement de la limite de 5 µg/L.

CL25



CL26

Le grain de sable

- **Décembre 1989**
 - Le laboratoire du département de protection de l'environnement du Conté de Mecklenburg à Charlotte, Caroline du Nord, responsable du contrôle de la qualité de l'air et de l'eau, s'équipe d'un nouvel appareil GC/MS
- **19 Janvier 1990 : l'analyse qui fait Pschitt**
 - Il le teste sur une bouteille de Perrier achetée chez un épicier local, et détecte des traces de benzène (12.3 à 19.9 µg/L) au-delà du seuil légal de l'EPA, (5 µg/L)
- **Fin Janvier 1990**
 - Les autorités de Caroline du Nord rendent ce résultat public et recommandent d'éviter de consommer du Perrier

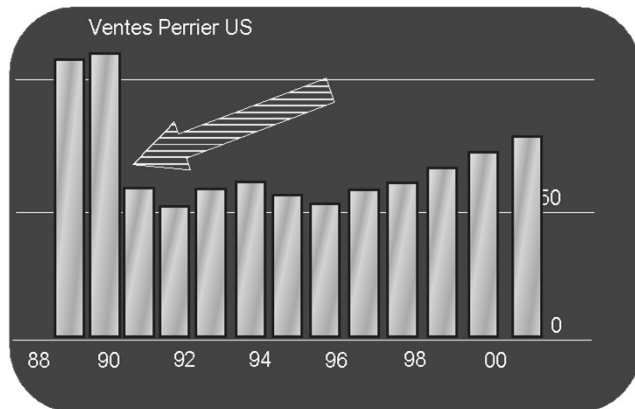
CL27

la crise

- La contamination est d'abord attribuée à des filtres utilisés lors du processus de gazéification des eaux, la source de Vergèze (Gard) n'étant nullement touchée.
- On avance ensuite que ces traces, présentes de façon naturelle dans la source, n'auraient pas été bien éliminées à la suite d'une erreur humaine.
- **14 février** Annonce par M. Leven du retrait dans le monde de la distribution de Perrier, soit 160 millions de bouteilles, et une perte nette de 200 millions de Francs.
- Entre le 9 et le 14 février, l'action chute en bourse de 16,5%.

CL28

- En quelques mois, les ventes mondiales de l'entreprise s'effondrent. Aux États-unis, Perrier perd 70 % de son chiffre d'affaires, au Royaume-Uni, 60 %, au Japon, 50 % ! En un an, le nombre de bouteilles vendues dans le monde tombe de 1,2 milliard à 740 millions.



CL29

Conséquences

- À partir d'avril, la FDA ternira durablement l'image de pureté de Perrier en obtenant le retrait dans toute publicité de l'expression « gazeuse naturelle ».
 - Elle exigera également le retrait d'eau « sans calories », en raison de la présence de traces d'ions Na^+
- Juillet 1990 Démission de M. Gustave Leven
- 1992, Perrier, qui a perdu de sa valeur boursière, est rachetée par Nestlé. De 3000 employés en 1990, elle en compte 1800 en 2000, année où le groupe Perrier redevient bénéficiaire, pour atteindre 1600 en 2004

CL30

Voici 20 ans : Perrier ou l'analyse qui fit « pschitt ! »

Patrick Arpino

Résumé La détection de benzène dans l'eau de Perrier en janvier 1990 allait entraîner une tourmente médiatique et de lourdes conséquences pour le groupe industriel qui la possédait. Beaucoup de lignes ont été écrites à ce sujet, mais sans doute pas encore du point de vue d'un analyste, car ce n'est pas un hasard si l'affaire survient à ce moment particulier, à la fin des années 1980, où les appareils pour le couplage de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse (GC-MS) deviennent des instruments de routine au laboratoire.

Mots-clés Benzène, composés organiques volatils de l'eau (COV), analyse GC-MS, histoire de Perrier.

Abstract Twenty years ago, Perrier or the analysis which did "pschitt" Benzene detection in Perrier water in January 1990 was the start of media turmoil, with heavily damaging consequences for the industrial group that possessed it. The subject is well documented, although rarely from the point of view of an analytical chemist. It is not a surprise that the situation emerged at the end of the 1980s, when cheap and compact benchtop gas chromatographs coupled to mass spectrometers (GC-MS) became routine instrument in the control laboratory.

Keywords Benzene, volatile organic compounds (VOC) in water, combined GC-MS, Perrier history.

Les instruments de la chimie analytique sont le fruit des efforts des chercheurs et des ingénieurs. Le travail de recherche consiste à découvrir de nouvelles propriétés physico-chimiques moléculaires, puis à les utiliser comme moyens de détection, d'identification et de dosage. Les ingénieurs utilisent ces concepts pour produire en série des équipements d'analyse précis, exacts et fiables, pour des coûts d'acquisition et de fonctionnement acceptables par leurs futurs utilisateurs. Comme beaucoup de produits technologiques innovants, ces instruments ont souvent un impact social majeur. Ils mettent parfois en évidence des faits ignorés précédemment, simplifiant parfois ce qui paraissait complexe ou même dans un trop petit nombre de cas, en raison de la complexité et des coûts des moyens à mettre en œuvre. Ainsi, la révélation de la présence de molécules polluantes à l'état de traces, mais aux conséquences à court ou long terme dommageables, est à l'origine de la prise de conscience des questions relatives à notre environnement. Ces instruments peuvent également servir à mettre en place une législation contraignante. Rien ne sert en effet d'édicter des normes si il n'existe pas de moyens pour les mesurer, or le législateur procède parfois à la technologie, par exemple en vertu d'un principe de précaution : on a pu ainsi vouloir imposer pendant une longue période une norme de présence du plomb dans l'eau potable de zéro, ce qui n'a pas de sens en chimie analytique où il faut définir une limite de détection, une limite de quantification et un seuil de toxicité ; mais une norme de zéro sert de précaution, dissimulant l'absence de moyens d'analyse suffisamment précis. Certaines innovations technologiques ont marqué durablement leur époque : la C18 en 1971 – apparue en 1969 ; le Concord, en 1969. De la même manière, la chimie analytique a produit des instruments remarquables, dont les applications ont révolutionné des domaines scientifiques, et avec parfois des retombées marquantes aux yeux du grand public. Ainsi au début des années 1980, de nouveaux spectromètres de masse avec introduction d'échantillons par chromatographie en phase gazeuse (GC-MS) sont apparus. Ils étaient plus compacts et moins onéreux que leurs prédécesseurs, et purent être installés dans de nombreux laboratoires d'analyse. Leur adoption en français par « GC-MS » de petites « pschitt » ou « pschitt » est enseignée dans certaines écoles de commerce comme un exemple de mauvaise gestion d'une situation de crise, ou de celui d'une stratégie agressive dans le cadre de nouvelles commerciales. Elle mériterait également d'être enseignée dans les cours de chimie analytique comme un exemple des retombées sociales que peuvent induire les progrès technologiques de cette discipline.



Photo de l'illustration de Gilles (2000-1998). L'eau qui fait pschitt chromatographie couplée au spectromètre de masse. Photo de Gilles (2000-1998). L'eau qui fait pschitt chromatographie couplée au spectromètre de masse. Photo de Gilles (2000-1998). L'eau qui fait pschitt chromatographie couplée au spectromètre de masse.

l'actualité chimique - mai 2010 - n° 341

CL31

Le dopage par les stéroïdes anabolisants

1974 Les commissions médicales du CIO et de la FIAA interdisent l'usage des stéroïdes anabolisants .

1976 Création d'une sous-commission sur le dopage

Anabolisants mesurés dans l'urine, par titrage radio-immunologique.

Méthodes GC, MS et GC/MS pas suffisamment au point.

1984 Jeux de Los Angeles

GC/MS est la méthode standard agréée par le CIO pour le dépistage du dopage par des stéroïdes.

1988 Canada hôte 1^{ère} Conférence mondiale permanente sur l'antidopage dans le sport.

CL32



CL33

Mise en place du DCC/KIST

1986 Le ‘*Doping Control Center*’ du ‘*Korea Institute of Science & Technology*’ créé pour les 10^{ème} jeux olympiques asiatiques (21/09– 5/10 1986).

Laboratoire officiel du CIO des 24^{ème} jeux olympiques de Séoul (17/09 – 2/10 1988).

Les laboratoires agréés par le CIO se fournissent exclusivement auprès de HP.

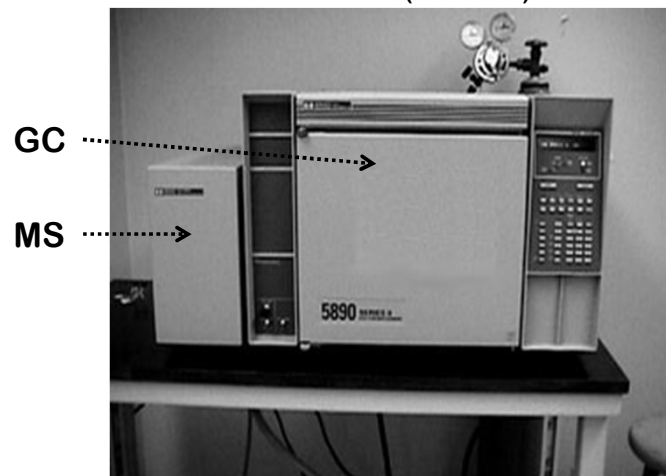
KIST Korea Institute of
Science and Technology



CL34

Appareillage utilisé

HP 5970B (GC/MSD)



CL35

Séoul : 17 septembre - 2 octobre 1988



CL36

Une séquence vidéo prémonitoire

CBC Digital Archives

HOME CATEGORIES ON THIS DAY FOR TEACHERS ABOUT US



CBC Radio-Canada

7 septembre 1988

High tech equipment targets cheaters in Seoul

Medium:
Television
Program:
CBC Television
Broadcast:
Sept. 7, 1988
Guest(s):
Kim Carlisle, Larry
Cetren, Jong-Sai Park
Duration:
3:24

The Story

Three weeks, Seoul, South Korea, will host 8,391 athletes from 159 nations. Some of them will use drugs to cheat. Catching them is the job of Jong-Sai Park, technical director of Seoul's doping control centre. In this clip he explains how high technology will keep the games "safe and competitive." It is these machines that will soon prove Ben Johnson's undoing.



<http://www.cbc.ca/archives/entry/high-tech-equipment-targets-cheaters-in-seoul>

CL37

Une séquence vidéo prémonitoire

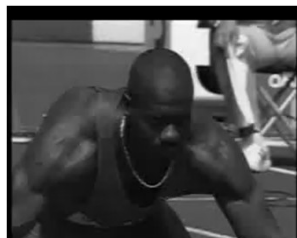


mesterolone
methenolone
methandienone
methyltestosterone
nandrolone
norethandrolone
oxandrolone
oxymesterone
oxymetholone
stanozolol
testosterone



CL38

Séoul 24 Septembre 1988



CL39

Le scandale des 24^{eme} J.O.

24 septembre 1998

Ben Johnson, 26 ans, gagne
l'épreuve du 100 m en 9,78 sec



26 septembre 1998

62h plus tard, convaincu de dopage au stanozolol, perd sa médaille d'or. Son record du monde acquis l'année précédente à Rome est effacé des tablettes. Convaincu à nouveau de dopage au cours des années suivantes, il a été banni à vie des compétitions sportives.

Documentations Web, ouvrages, publications innombrables, parfois contradictoires

CL40

Une source incontestable

J Anal Toxicol. 1990 Mar-Apr;14(2):109-12.

Quantitative determination of stanozolol and its metabolite in urine by gas chromatography/mass spectrometry.

Choo HYP, Kwon OS, Park J.

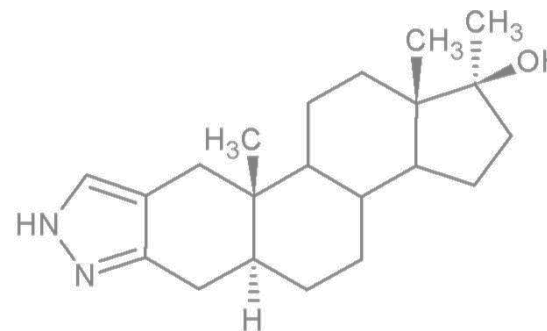
Doping Control Center, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Kangnam-ku, Seoul.

The amount of stanozolol and 3'-hydroxystanozolol in urine was determined after oral administration of stanozolol. A GC/MSD equipped with a capillary column was used for these determinations. The GC/MS was operated in the SIM mode, and m/z 581, 669, and 315 were monitored for stanozolol, 3'-hydroxystanozolol, and calusterone (internal standard), respectively. The detection limit was approximately 1 ng/mL for both steroids. The maximum excretion rate of stanozolol was reached in 8 h and the maximum of 3'-hydroxystanozolol in 19 h. However, only 3% of the administered amount was recovered in urine.

Manuscrit reçu le 20 avril 1989

CL41

Le stanozolol, alias : androstanazole, stanazol, winstrol, ...

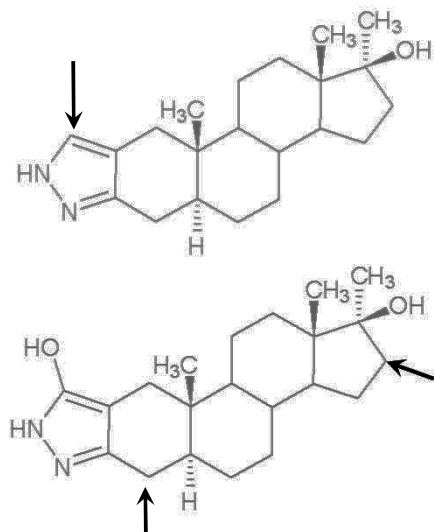


$C_{21}H_{32}N_2O$

Masse monoisotopique : 328,251 Da

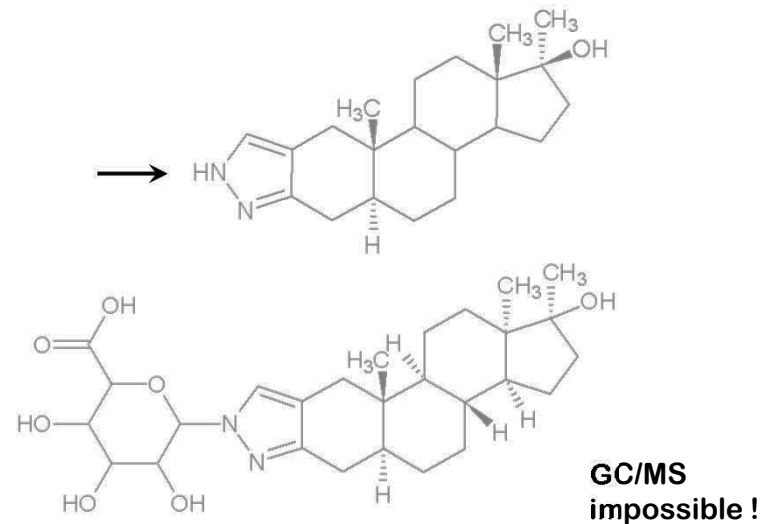
CL42

Au moins un métabolite doit être identifié



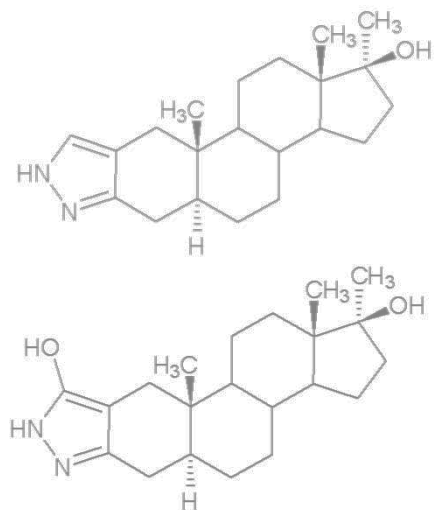
CL43

Mais sous forme conjuguée dans l'urine



CL44

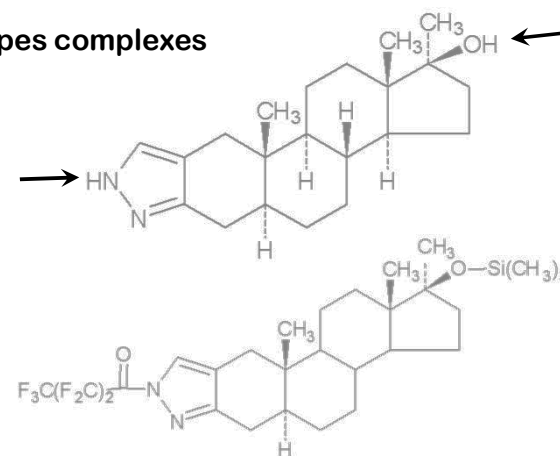
Après hydrolyse enzymatique



CL45

Préparation de dérivés volatils

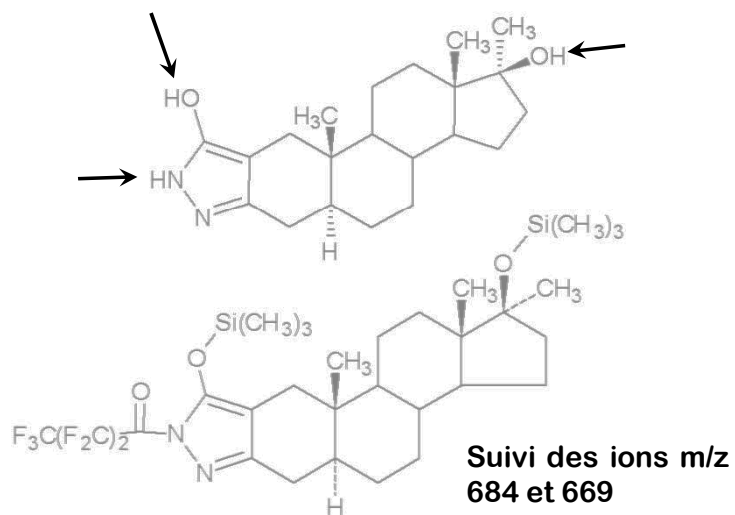
En 2 étapes complexes



Suivi de l'ion m/z 581

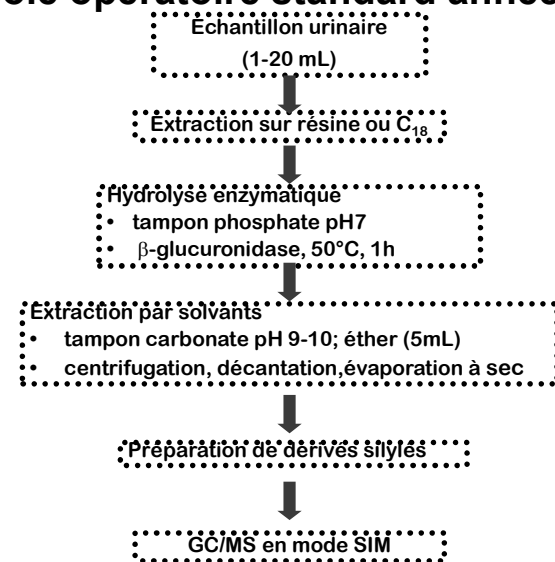
CL46

Préparation de dérivés volatils



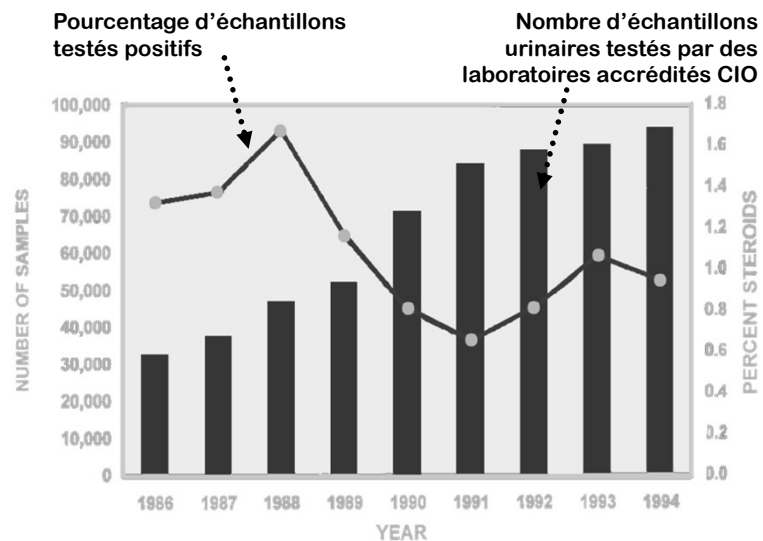
CL47

Protocole opératoire standard années 1990



CL48

L'impact des analyses de Séoul



CL49

Limites des méthodes GC/MS fin années 90

Les produits non décelables car :

- Inconnus, non répertoriés, non interdits
- Connus mais non vaporisables ou trop thermosensibles, même après préparation d'un dérivé stable.
- Cachés par d'autres pics co-élus et de mêmes masses intégrales caractéristiques

Pas de GC/MS possible

Produits masquants ajoutés intentionnellement

Mélanges trop complexes, MS haute résolution nécessaire

Synthèse d'anabolisants spécifiquement conçus dans ce but (*designer drugs*)

CL50



CL51

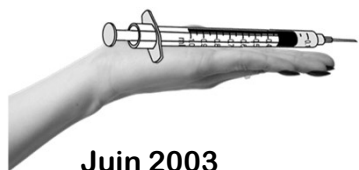
Les rumeurs d'un stéroïde indétectable

Balco

- **Fondé en 1983 par Victor Conte, un « nutritionniste » autoproclamé**
- **Analyse de sang et d'urine**
- **Fournisseur de compléments alimentaires**
- **Nombreux sportifs clients**
- **Leur fournirait « the clear », un anabolisant supposé être indétectable par le CIO**
- **Soupçons d'un enquêteur fédéral opiniâtre, Jeff Novitsky**

CL52

Le déclic



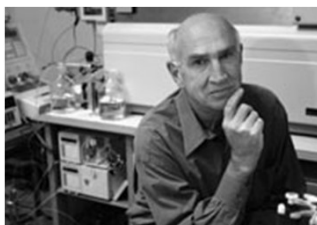
USADA
US Antidoping Agency

MeOH



UCLA
Olympic Analytical Laboratory
Los Angeles

Don Catlin



CL53

Sources documentaires

Tetrahydrogestrinone: discovery, synthesis, and detection in urine

Don H. Catlin*, Michael H. Sekera, Brian D. Ahrens, Borislav Starcevic, Yu-Chen Chang and Caroline K. Hatton

Rapid Commun. Mass Spectrom. 2004; 18: 1245–1249

- C&EN, november 17, 2003, p 66

- Anal Chem, june 1, 2007, p 3963



CL54

Analyses GC/MS (haute résolution)

Extrait seringue

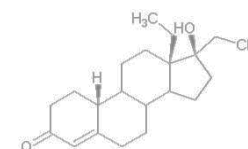
- Dérivatisé selon protocole CIO
 - Forêt de pics GC, inconnus, sauf norbolethone
- Non dérivatisé
 - Un composé majeur, M^+ 312, formule $C_{21}H_{28}O_2$
 - fragmentations semblables gestrinone et trenbolone

CL55

Les pièces du puzzle GC/HRMS

Dans extrait dérivatisé

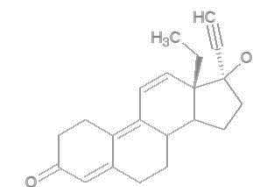
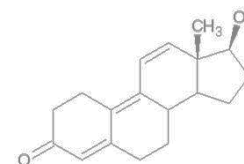
Norbolethone, $M=316$



Dans extrait non dérivatisé

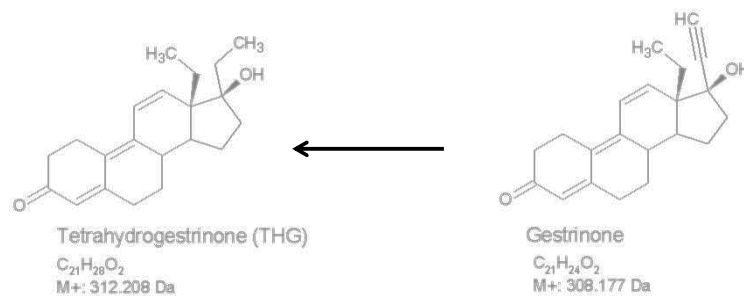
? $C_{21}H_{28}O_2$, $M=312$

Semblable à
trenbolone, $M=270$
gestrinone, $M=316$



CL56

Hypothèse

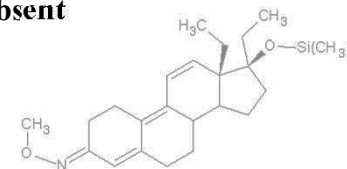


Confirmé par synthèse, RMN, paramètres GC, LC, MS

CL57

Détection du THG dans l'urine

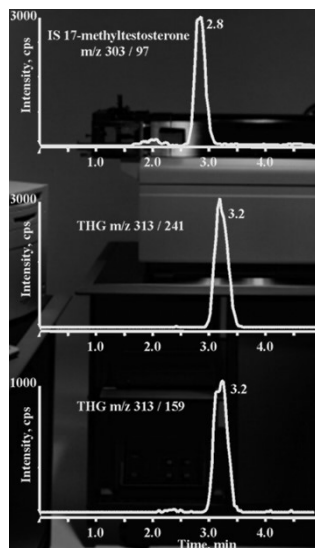
- Par GC/MS ?
 - Possible, mais complexe, après formation d'un dérivé spécifique, M^+ faible ou absent



- Par LC/MS /MS
 - Simple, direct, sensible MRM à partir de MH^+
 313/241; 313/159

CL58

Détection du THG dans l'urine



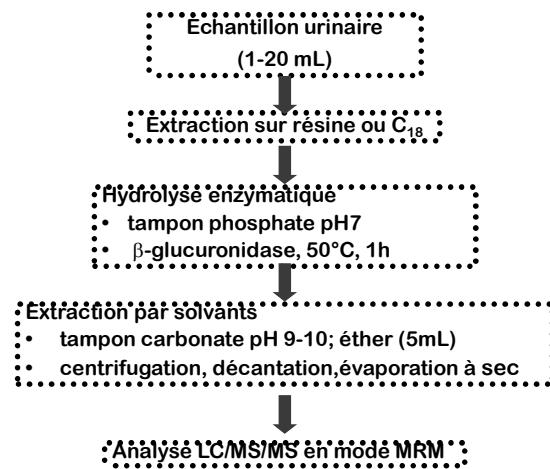
CL59

Détection du THG dans l'urine

- **Confirmation méthode LC/MS/MS**
 - Urines 'blanches' dopées par THG
 - Urine de babouin après injection IV ou IM de THG
 - Mais pas d'études de métabolites à ce stade

CL60

Protocole opératoire simplifié



CL61

Conséquences

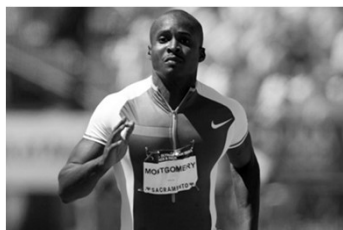
- « The clear » ne l'était plus
- LC/MS/MS projetée sur les devants de la scène
 - Appliqué aux urines conservées de 550 athlètes,
 - 20 positifs
- Affaire aux proportions considérables
 - Nombreux sportifs déçus
 - Principaux acteurs de Balco condamnés

CL62

Athlètes contrôlés positifs THG



Regina Jacobs



Tim Montgomery



Dwain Chambers

CL63

Athlètes contrôlés positifs THG



Kelly White



Kevin Toth



Melissa Price



John McEwen

CL64

Suspectée, puis repentie



Marion Jones
Pas testée positive directement,
fortement suspectée, confessa en 2007
d'avoir utilisé la THG

CL65

Acteurs condamnés pénalement



Victor Conte
Président



James Valente
Vice Président



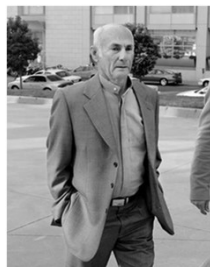
Patrick Arnold
Le chimiste

CL66

Acteurs condamnés pénalement



Greg Anderson
Entraîneur



Remi Korchemny
Entraîneur



Trevor Graham
Entraîneur
Lanceur d'alerte

CL67

Conclusion

- Les instruments de la chimie analytique aux qualités suivantes :
 - Sensible
 - Sélectif
 - Robuste
 - Peu onéreux
 - Procurant une réponse rapide
- Sont susceptibles de provoquer d'importantes fractures sociétales

CL68