

LISTE D'ABRÉVIATION :

CAPM	Centre Anti Poison et Pharmacovigilance
CPG/SM	Chromatographie en Phase Gazeuse / Spectromètre de Masse
CPLH /UV	Chromatographie en Phase Liquide à Haute performance/ Ultra- Violet
ECD	Détecteur à capture d'électrons
ELL	Extraction Liquide-Liquide
EPS	Extraction en Phase Solide
FID	Détecteur à ionisation de flamme
HCL	Acide Chloridrique
MSTFA-Toluène	(N- methyl-N-trimethyl silyltrifluoroacetamide)-Toluène
SIM	Single ion Monitoring
STA	Systematic Toxicological Analysis
TMCS	Chlorure de trimethyl silyl
UDP	Uridine diphosphate
UMC	Uppsala Monitoring center

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1 : classification des principaux solvants utilisés pour extraction liquide – liquide	9
Tableau I.2 : avantages et inconvénients de différents modes d'injection	16
Tableau III.1: Résultats d'analyse CPG/SM du chromatogramme de l'échantillon 1 après hydrolyse enzymatique sans tampon d'extraction	33
Tableau III.2 : données de l'analyse quantitative du Diazinone (agent intoxicant) et Prazepam (standard).	35
Tableau III.3: Résultats d'analyse CPG/SM du chromatogramme 3' (hydrolyse enzymatique avec tampon d'extraction)	37
Tableau III.4 : Résultats de l'analyse quantitative par CPG/SM de la Nicotine (agent intoxicant) et Prazepam (standard interne)	39
Tableau III.5 : Résultats d'analyse CPG/SM du chromatogramme d'échantillon 7'' (hydrolyse acide).	41
Tableau III.6 : Résultats de chromatogramme illustrant la surface de phénobarbital.	43
Tableau III.7: Comparaison des résultats d'hydrolyses de trois types d'échantillon par trois méthodes (hydrolyse enzymatique avec et sans tampon d'extraction et hydrolyse acide)	44
Tableau III.8 : Résultats des 7 échantillons étudiés avec hydrolyse enzymatique sans tampon d'extraction	46
Tableau III.9 : Temps de rétention (CPG/SM) et structures chimiques des composés responsables de l'intoxication lors de l'hydrolyse par β-glucuronidase + tampon	47
Tableau III.10: Résultats des 7 échantillons étudiés avec hydrolyse acide.	48

LISTE DES FIGURES

Figure I.1 : Etapes clés de l'analyse toxicologique systématique	5
Figures I.2 : Chromatographe à gaz	14
Figure I.3 : Principe du spectromètre de masse	19
Figure I.4 : Schéma d'un quadripôle	19
Figure II.1: Etapes d'analyse d'urine par hydrolyse enzymatique	26
Figure II.2 : Etapes d'analyse d'urine par hydrolyse acide	27
Figure II.3: Tubes sur paillasse.	28
Figure II.4: Centrifugeuse (PK121R)	28
Figure II.5 : Tube à fond rond contenant la phase organique.	29
Figure II.6 : Schéma d'Hôte de concentration sous jet d'azote	29
Figure II.7 : Schéma d'Appareillage de couplage CPG/SM (appareil du CAPM)	29
Figure III.1 : Chromatogramme de l'échantillon 1 (hydrolyse enzymatique sans tampon d'extraction)	32
Figure III.2 : Spectre de masse du Diazinone	34
Figure III.3 : Mécanisme de Fragmentation du Diazinone par SM	34
Figure III.4 : Chromatogramme illustrant les surfaces des pics.	35
Figure III.5 : Chromatogramme de l'échantillon 3 (hydrolyse enzymatique avec tampon d'extraction).	36
Figure III.6 : Spectre de masse de la nicotine	38
Figure III.7: Mécanisme de fragmentation de la nicotine par SM	38
Figure III.8: Chromatogramme de surface de la nicotine	39

Figure III.9 : Chromatogramme de surface de Prazepam	39
Figure III.10: Chromatogramme de l'échantillon 7'' (avec hydrolyse acide)	40
Figure III.11: spectre de masse de phénobarbital	43
Figure III.12: chromatogramme illustrant la surface de phénobarbital.	44

PRÉSENTATION DU CENTRE ANTI POISON ET DE PHARMACOVIGILANCE DU MAROC

Le Centre Antipoison et de Pharmacovigilance du Maroc (CAPM) a été créé en 1989. C'est un service d'utilité publique sous la tutelle du ministère de la santé, sa fonction principale est de :

- Faire des analyses toxicologiques d'urgence et de suivi thérapeutique.
- Délivrer l'information sur tout produit potentiellement toxique quelque soit son origine (médicament, plante, aliment, produit ménager, produits industriels...);
- Informer sur la conduite à tenir en cas d'intoxication ;

Grâce à un personnel médical et scientifique qualifié et à des banques de données informatisées sur les produits toxiques, les conseils donnés par le CAPM permettent :

- D'éviter l'encombrement des services des urgences ;
- Diminuer le coût et la durée d'hospitalisation en évitant les manœuvres intempestives.

Ce centre comporte plusieurs unités, à savoir le service information toxicologique, le service de pharmacovigilance, le service de toxicovigilance, le laboratoire ; la cellule de communication et d'information et le service assurance qualité.

I. INFORMATION TOXICOLOGIQUE :

Le centre dispose d'un service Téléphonique lancé en 1991 assuré par un médecin pharmacologue et fonctionne 24 heures sur 24 et 7 jours sur 7. C'est une unité médicale spécialisée qui consiste à délivrer l'information en réponse à une demande de renseignement en toxicologie, en pharmacologie ou à une situation d'intoxication. Elle donne des éléments de diagnostic, d'évaluation, de prise en charge thérapeutique et de pronostic (numéro de téléphone des urgences 0537686464 ; numéro économique 0801000180).

II. PHARMACOVIGILANCE :

La pharmacovigilance est une spécialité médicale ayant pour objet la détection, l'évaluation et la prévention des effets indésirables de tout produit de santé survenant dans une population. Le centre national de pharmacovigilance est reconnu en 1992 comme le 34ème membre du

centre collaborateur de l'UMS pour la surveillance des effets indésirables des médicaments (Uppsala Monitoring Centre : UMC).

III. TOXICOVIGILANCE :

La toxicovigilance est une spécialité médicale qui s'occupe de la détection, l'évaluation et la prévention des risques encourus par l'homme suite à un contact direct ou indirect par inhalation ou ingestion d'un agent toxique pouvant générer un effet nuisible.

Le département s'occupe de l'identification, l'évaluation et de la prévention des risques de toxicité existants dans une communauté pour les réduire ou les éliminer et ceci selon l'analyse des déclarations.

IV. LABORATOIRE :

C'est un laboratoire de pharmacologie et de toxicologie. Ses attributions sont l'analyse toxicologique d'urgence (toxicologie médicale) et le dosage des médicaments pour le suivi thérapeutique. Le laboratoire est chargé de développer les analyses toxicologiques médicolégales et la recherche de certaines substances dopantes.

1. Personnel du laboratoire :

Le personnel du laboratoire est composé de fonctionnaires de la fonction publique.

- 2 postes de médecins toxico-pharmacologues
- 1 poste d'assistant médical
- 3 postes d'ingénieur d'état
- 2 postes de technicien de laboratoire

2. Locaux et équipements



Locaux

Le laboratoire est un département du centre anti-poison. Il dispose des locaux (selon le plan du laboratoire) :

- Une salle destinée à l'activité de toxicologie

- Une salle destinée à l'activité de pharmacologie
- Une salle de traitement des échantillons (extraction, purification, caractérisation qualitative)
- Une salle de prélèvement
- Des bureaux
- Un hall d'accueil
- Une salle de Stock située dans le sous-sol du laboratoire.

Equipements

Les équipements essentiels sont les suivants :

- 1 CPG-SM (perkun Elmer Clarus 680)
- 3 HPLC (HPLC Merck Hitachi, HPLC Shimadzu, HPLC Agilent avec barrette de diode)
- 1 CPG (Agilent)
- 1 spectrophotomètre UV/Vis double faisceau (Hitachi).
- 1 spectrophotomètre UV/Vis mono faisceau (Milton Roy).
- 1 spectrophotomètre d'émission de Flamme (Corning).
- 3 balances de précision.
- 1 centrifugeuse de paillasse (ALC PK 121 R).
- 1 pH-mètre.
- 2 étuves (30°C-120°C).
- 2 réfrigérateur (T°: 4 °c).
- 3 congélateurs (T°: -20 °c)
- 1 évaporateur rotatif.
- 2 distillateurs.
- 1 cuve à Ultrasons
- 2 bains-marie
- 2 agitateurs verticaux et 3 vortex
- 1 agitateur transversal
- Fongible et consommable réactifs.
- 10 PC et 2 imprimantes.

3. Prélèvement :

Le laboratoire n'effectue pas de prélèvements.

En toxicologie d'urgence, les prélèvements sont effectués au niveau du service demandeur et sont acheminés au laboratoire par un ambulancier ou par un proche du patient. Ces prélèvements doivent être, qualitativement et quantitativement, conformes aux normes fixées par le laboratoire.

- Si les prélèvements sont non conformes, une fiche de refus est remplie et le service demandeur est contacté aussitôt par le médecin de garde de l'information toxicologique du CAPM.

- En suivi thérapeutique, les prélèvements sont effectués et envoyés par les services demandeurs, les modalités de prélèvements sont décrites pour chaque type de dosage selon des procédures appropriées.

4. Réception des échantillons

A la réception, les échantillons sont identifiés, vérifiés pour la conformité et enregistrés soit dans le registre de toxicologie soit dans le registre de pharmacologie. Chaque prélèvement reçu, reçoit un numéro d'ordre qui est rapporté sur le registre, les flacons contenant les prélèvements, ainsi que sur la fiche résultats à archiver au niveau du laboratoire.

5. Stockage des échantillons :

Après analyse, les prélèvements de la toxicologie d'urgence sont conservés une semaine au réfrigérateur (4° à 8°C) puis ils sont détruits selon la procédure de gestion des déchets du laboratoire.

Les prélèvements de suivi thérapeutique (plasma obtenu après centrifugation du sang) sont conservés au congélateur (ou freezer) à -18°C pendant 3mois et sont détruits après, comme pour les prélèvements de la toxicologie.

6. Sécurité

Le personnel est protégé contre les incendies par la présence d'extincteurs. Pour les risques biologiques, les blouses et les gants sont disponibles. Pour le risque chimique, le personnel du laboratoire est protégé par des hottes.

V. CELLULE DE COMMUNICATION ET D'INFORMATION

Afin de promouvoir ses travaux scientifiques et techniques et de favoriser leur utilisation, le CAPM s'est doté d'une cellule de communication information qui est chargée de :

- Promouvoir les prestations du CAPM et de s'occuper de l'organisation de colloques, conférences, séminaires, congrès...
- Contribuer à la promotion des activités du CAPM. Elle gère les documents et outils d'information du CAPM ;
- Faciliter les contacts internes et externes pour le personnel du centre.

VI. ASSURANCE QUALITE

Il s'agit d'un département visant à installer une démarche qualité pour certifier la conformité du CAPM à un label de qualité internationalement reconnu : la norme ISO 9001 version 2000 pour les départements médicaux et ISO 17025 pour l'accréditation du laboratoire. Elle base son travail sur l'installation de procédures d'analyses, de gestion des ressources matérielles et humaines, de suivi de l'application et d'évaluation des actions pour garantir l'amélioration des prestations, de rendement à coût moindre et de satisfaction du client.

SOMMAIRE

Introduction Générale.....	1
-----------------------------------	----------

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I : Screening toxicologique	3
A : Définition du criblage toxicologique	3
B : Place du screening en toxicologie d'urgence médico-légale.....	3
C : Etapes de screening toxicologique.....	4
1 : Etapes pré-analytique	4
2 : Etapes analytique	4
2.1 : Simple préparation d'échantillons	5
a : Techniques de prétraitement	6
a.1 : Hydrolyse des conjugués.....	6
a.2 : Précipitation des protéines	7
b : Techniques d'extraction	8
b.1 : Extraction liquide-liquide	8
b.2 : Extraction en phase solide	11
c : Dérivation des échantillons	13
2.2 : Méthodes analytiques	13
a : Méthodes séparatives.....	14
a.1 : Chromatographie en phase gazeuse	14
a.2 : Spectroscopie de masse	18
a.3 : Chromatographie en phase gazeuse couplée à.....	20
la spectroscopie de masse	
D : Hydrolyse	21
1 : Hydrolyse des toxicants	21
a : Enzyme β- Glucuronidase	21
2 : Intérêt d'hydrolyse	23

CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

I : Objectifs	24
A : Matériels et méthodes expérimentales	24
1 : Réactifs	24
a : Préparation d'enzyme	24
b : Extraction	25
2 : Instrumentations	25
a : Matériels	25
B : Mode opératoire	26
1 : Hydrolyse enzymatique et acide	27
2 : Extraction	28

CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION

I : Analyse des chromatogrammes par couplage CPG/SM	31
1 : Hydrolyse enzymatique	31
1.1 : Hydrolyse enzymatique + extraction sans tampon	31
a : Analyse qualitative de l'échantillon 1	31
b : Analyse quantitative de l'échantillon 1	35
1.2 : Hydrolyse enzymatique + extraction avec tampon	36
a : Analyse qualitative de l'échantillon 3'	36
b : Analyse quantitative de l'échantillon 3'	39
2 : Hydrolyse acide	40
a : Analyse qualitative de l'échantillon 7'	40
b : Analyse quantitative de l'échantillon 7'	43
II: Comparaison des résultats	44
1 : Comparaison des résultats de trois échantillons hydrolysés par les trois méthodes différentes	44
2 : Comparaison des résultats d'analyse des sept échantillons étudiés	46
Conclusion	50

CONCLUSION GÉNÉRALE	51
<i>Références Bibliographiques</i>	52

ANNEXES

Annexe 1 : Différents chromatogrammes de l'hydrolyse enzymatique (extraction sans... tampon)	55
Annexe 2 : Différents chromatogrammes de l'hydrolyse enzymatique (extraction avec... tampon)	59
Annexe 3: Différents chromatogrammes de l'hydrolyse acide.....	63

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Un service d'urgence est quotidiennement confronté à un grand nombre d'intoxication aiguës : abus d'alcool ou de drogues, surdosage médicamenteux volontaires ou accidentels, exposition à des produits industriels ou ménagers et plus rarement à des toxines naturelles, végétaux ou animales. Le clinicien doit gérer ces situations avec efficacité, tout en tenant compte des contraintes qui lui sont imposées. Sur base d'une anamnèse souvent peu fiable et d'une présentation clinique rarement pathognomonique, surtout si plusieurs substances sont en cause, il est amené à évoquer un diagnostic présomptif. La confirmation ou la réfutation de l'hypothèse toxique requièrent, en principe, la détection et l'identification, et si possible la quantification des toxiques ou de leurs métabolites dans les liquides biologiques ou les tissus [1]. C'est le rôle du laboratoire de toxicologie analytique.

En réalité chacun s'accorde à reconnaître que la mission principale du laboratoire est de fournir rapidement des résultats biologiques [2-3].

Pour identifier les toxiques dans les liquides biologiques, le laboratoire dispose de nombreuses techniques. Le clinicien doit en avoir une connaissance au moins rudimentaires pour comprendre leurs limites et les délais nécessaires à leur réalisation. Des informations techniques plus complètes peuvent être trouvées ailleurs [4-5]. Il n'existe aucune méthode simple, rapide et peu coûteuse qui permette de tout détecter, le choix de l'analyste dépend des priorités définies par le clinicien et des contraintes techniques et économiques en matière de personnel et d'équipement [6].

La démarche analytique consiste à utiliser des techniques qualitatives, mais souvent peu spécifiques, qui fournissent des résultats présomptifs rapides, qui sont secondairement confirmés par des méthodes plus sophistiquées et plus précises.

Pour mieux orienter le travail, le laboratoire réalise un screening qui se base sur une combinaison d'analyses réalisées sur différents liquides biologiques, en particulier l'urine [7].

Afin d'améliorer les résultats obtenus par le screening, le laboratoire de CAPM traite des nouvelles méthodes pour l'étape pré analytique et analytique.

L'objectif de ce travail est l'amélioration d'étape d'hydrolyse en passant d'hydrolyse acide dur à l'hydrolyse enzymatique douce ,pour avoir une détection globale des métabolites qui se trouvent dans l'urine.

Le premier chapitre traite une revue bibliographique sur le screening toxicologique.

Le deuxième chapitre concerne les matériels utilisés pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée au spectromètre de masse.

Le troisième chapitre sera réservé au choix de la méthode adoptée, aux analyses par couplage chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse permettant la détermination qualitative et quantitative des composés responsable de l'intoxication.

Enfin, une discussion des résultats. Cette partie se termine par comparaison et discussion des résultats obtenus.

Chapitre I :
Revue
Bibliographique

I- Screening toxicologique

A- Définition du criblage toxicologique:

Le screening toxicologique peut être défini comme étant une analyse chimique, logique et systématique, à la recherche de substances toxiques dont la présence n'est pas confirmée et dont l'identité n'est pas connue. Il est aussi le point de départ d'une analyse quantitative ciblée [8].

En effet, en toxicologie clinique ou médico-légale, les molécules recherchées peuvent être inconnues et les indices d'orientation absents ou insuffisants. Devant ces cas, l'analyste doit en un premier temps **rechercher** dans les milieux biologiques des molécules et/ou leurs métabolites parmi une gamme très large de xenobiotiques. Il doit par la suite **confirmer** leur présence, les **identifier** et les **quantifier** lorsque leur dosage est possible. L'interprétation des résultats se fera en coopération avec les cliniciens et en tenant compte des résultats des examens cliniques et biologiques. Ces étapes constituent l'approche basique d'une « analyse toxicologique systématique » (Systematic toxicological Analysis ou **STA**) appelé aussi « screening toxicologique général » (General Unknown Screening ou **GUS**) ou encore « criblage toxicologique » [9].

B- Place du screening en toxicologie d'urgence et médico-légale :

En toxicologie d'urgence, l'utilité de la recherche systématique est controversée du fait que la prise en charge d'une intoxication aiguë reste essentiellement symptomatique et que les analyses quantitatives ciblées restent suffisantes dans la plus part des cas.

Les recherches de toxiques sont souvent inutiles et toujours coûteuses, c'est pourquoi plusieurs groupes de travaux multidisciplinaires ont récemment proposé des recommandations sur la prise en charge des patients intoxiqués et la place des analyses systématiques en urgence. Il en conclut que les criblages toxicologiques restent indiqués uniquement lorsque la symptomatologie est discordante avec le toxique suspecté, devant un tableau clinique sévère (coma, troubles neurologiques graves, défaillance cardio-circulatoire) ou si l'évolution clinique et les examens complémentaires sont incompatibles avec l'anamnèse ou le toxidrome initial. Dans ces situations, le screening permettra de confirmer l'intoxication, d'identifier d'autres toxiques que ceux suspectés ou d'exclure la cause toxique [10].

Par ailleurs, une recherche de toxique systématique large est toujours obligatoire dans le cadre médico-légal lorsque l'analyse vise à confirmer ou exclure une hypothèse toxique en cas de mort subite ou non-expliquée ou encore lors d'une recherche de drogues d'abus et certaines substances illicites [9].

C- Etapes de screening toxicologique :

Comme toute investigation toxicologique, le screening évolue en une succession d'étapes pouvant être classées en étapes pré-analytiques, analytiques et post-analytiques.

1- Etapes pré-analytiques :

Ces étapes comprennent essentiellement l'anamnèse et la discussion avec le clinicien et permettent d'avoir des détails sur la clinique, les antécédents du patient, les circonstances de l'intoxication et éventuellement les résultats des examens biologiques. Ces renseignements, lorsqu'ils sont disponibles, sont très importants et permettent de décider des priorités de l'analyse et d'orienter la recherche et le choix des milieux biologiques.

2- Etapes analytiques :

L'analyse toxicologique dans le cadre du STA évolue selon 3 étapes clés aux quelles peut s'ajouter une étape de quantification des substances retrouvées si celle-ci est possible. Ces étapes sont :

- La préparation des échantillons afin de les rendre compatibles avec le système analytique.
- La détection des toxiques en combinant des tests de dépistage relativement non spécifiques (universels) avec des techniques de confirmation très spécifiques et sensibles.
- L'identification des toxiques retrouvés directement ou après comparaison à des substances de référence [9].

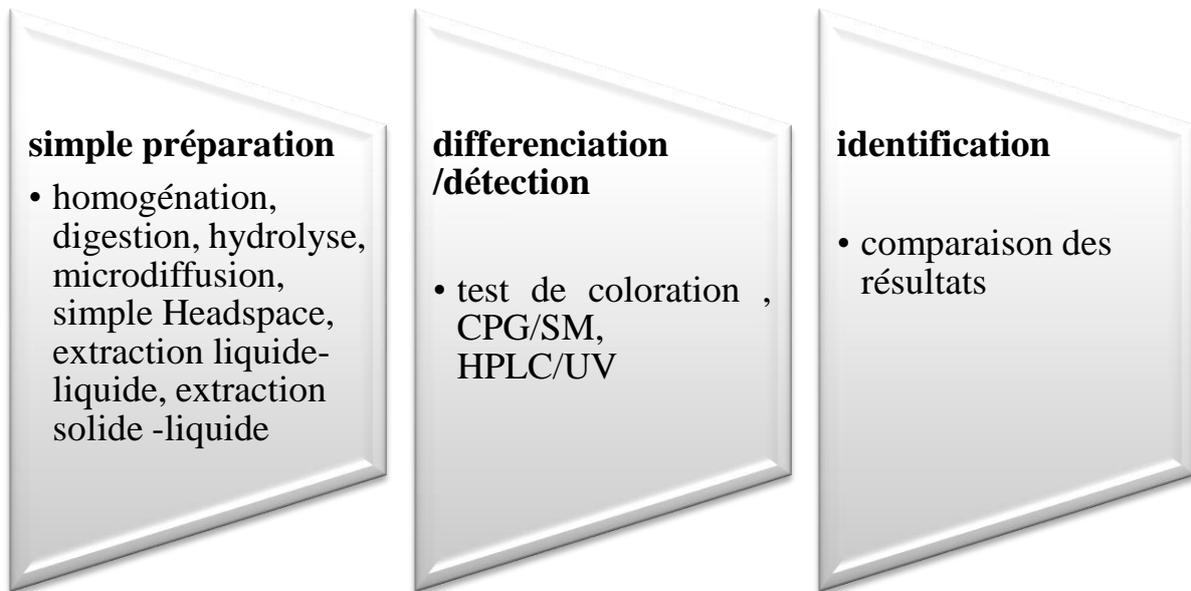


Figure I.1 : Etapes clés de l'analyse toxicologique systématique [11]

2.1- Simple préparation d'échantillons :

À l'heure où les techniques de séparation et de détection viennent de rencontrer l'essor fulgurant de ces dernières années, l'analyste toxicologue concentre son énergie à l'amélioration de la préparation d'échantillons. L'évolution de l'instrumentation permet de réaliser des séparations chromatographiques rapides et efficaces couplées à une détection par spectrométrie de masse performante permettant une analyse spécifique et complexe. Néanmoins, la complexité des échantillons biologiques à traiter concentre l'attention du toxicologue analyste sur les points suivants :

- l'utilisation de faibles quantités de matrices afin de réaliser un maximum d'analyse sur un même échantillon, particulièrement intéressant lorsque les quantités de prélèvements sont réduites ;
- l'amélioration de la sensibilité par l'utilisation de procédures d'extraction plus spécifiques comme les empreintes moléculaires ;
- la diminution des délais de rendu des résultats par l'utilisation par exemple de procédure de préparation d'échantillons « on line » ;
- la simplification des méthodes pouvant passer par l'uniformisation des méthodes de préparation, quelle que soit la matrice ;

- l'automatisation de la préparation d'échantillons ayant pour objectifs d'améliorer le rendement et de diminuer les erreurs manuelles.

Avant d'aborder les différentes méthodes de prétraitement des échantillons, il faut rappeler qu'il est tout de même possible d'analyser soit directement certains échantillons biologiques liquides (urine ou liquide cébrospinal), soit des échantillons sanguins précipités. Les échantillons biologiques liquides sont des matrices qui en général contiennent de faibles concentrations en protéines et une simple dilution dans de l'eau désionisée peut suffire.

Cependant, les préparations d'échantillons nécessitent souvent de passer par des procédures d'extraction. À côté des prétraitements les plus simples (dilution, centrifugation) pour les matrices les moins chargées (urine) avant une étape d'extraction en extraction liquide-liquide (ELL) ou en extraction en phase solide (EPS), les matrices biologiques plus chargées en protéines (sang, humeur vitrée, liquide cébrospinal) nécessitent avant l'étape d'extraction des étapes de prétraitement supplémentaires comme la précipitation des protéines.

De plus, les problèmes d'homogénéisation sur certains échantillons de tissus nécessitent une étape d'homogénéisation supplémentaire à l'aide d'un broyeur mécanique ou de ciseaux, suivie d'une étape de digestion enzymatique (trypsine ou peptidases), étapes souvent nécessaires avant le prétraitement et l'extraction.

Enfin, pour des tissus putréfiés pouvant être obtenus en *post mortem*, l'échantillon peut être prétraité dans un bain à ultrasons et après centrifugation et/ou filtration, le surnageant pourra subir une étape d'extraction [12].

a- Techniques de prétraitement :

Ces techniques regroupent l'ensemble des techniques réalisées avant l'analyse ou avant une technique d'extraction comme l'homogénéisation, la dilution, la centrifugation, l'hydrolyse des conjugués ou la précipitation des protéines. [9]

a.1- Hydrolyse des conjugués

Les métabolites β -glucuroconjugués et sulfoconjugués des xenobiotiques sont des dérivés très stables dont la présence peut gêner l'analyse. Leur hydrolyse rend disponible les fractions libre des molécules parents ou celles issues du métabolisme de phase I pour une meilleure identification.

Le clivage des conjugués concerne surtout les urines et peut être effectué par hydrolyse chimique rapide ou enzymatique douce mais lente.

Hydrolyse chimique

- **Hydrolyse chimique acide** : Obtenue par incubation à 100°C en présence d'un acide fort, en général de l'HCl 37 %, pendant 15 minutes [12].
- **Hydrolyse alcaline** : n'est utile que pour le clivage des ester conjugués [13].

L'hydrolyse chimique acide est la plus utilisée et la mieux adaptée à l'urgence car elle permet un clivage rapide avec un recouvrement élevé. Néanmoins, elle présente comme principal inconvénient le risque de dégradation de l'échantillon et notamment les molécules sensibles aux conditions extrêmes de pH (Benzodiazépines, dérivés opiacés..). De plus la formation de certains artefacts doit être prise en considération [13].

Hydrolyse enzymatique

Elle consiste à laisser en contact les urines avec une enzyme, dans des conditions de pH et de température bien précises. Les enzymes les plus utilisées sont la β -glucuronidase d'E. Coli ou d'Hélis pomatia, parfois combinées avec une arylsulfatase. L'incubation peut durer une nuit à 37°C [12].

a.2- Précipitation des protéines

Méthode conventionnelle de traitement d'échantillon surtout pour le **sang total**. Son principe est très simple : les protéines sont des molécules chargées et leur précipitation peut être obtenue par modifications de :

- La force ionique, par ajout d'une solution saline saturée de sulfate d'ammonium ;
- pH, par ajout en petite quantité de solutions d'acides forts (acide perchlorique ou trichloracétique) ou de solutions basiques (sulfate de zinc/ hydroxyde de sodium)
- La constante diélectrique, par ajout d'acétonitrile, de méthanol, d'éthanol ou d'acétone.

Après centrifugation, le surnageant pourra être directement injecté, ou évaporé s'il s'agit d'un solvant organique pour une meilleure concentration de l'échantillon [12].

Cette méthode permet l'élimination de plus de 98% des protéines dans un plasma humain si on utilise le solvant adéquat [14]. Elle présente de nombreux autres avantages tels que sa rapidité, sa simplicité et son utilisation directe pour l'analyse de molécules très hydrosolubles

et donc difficilement extractibles par les solvants organiques. Elle peut être entièrement automatisée et reste particulièrement bien adaptée à l'analyse en toxicologie.

Cependant, elle n'élimine pas tous les interférents présents dans la matrice et l'utilisation d'acides forts peut endommager la phase stationnaire en HPLC. C'est pourquoi, elle correspond plus à une étape de prétraitement avant l'extraction pour les matrices très chargées en protéines qui peuvent entraîner des émulsions gênantes [12].

b- Techniques d'extraction :

Extraction liquide-liquide (LLE), Extraction en phase solide, Micro-extraction en phase solide

b.1- Extraction liquide-liquide :

Utilisée depuis plus de 50 ans comme technique de purification dans les industries pharmaceutiques, la technique d'extraction liquide-liquide (ELL) [15].est aujourd'hui très utilisée en toxicologie pour le prétraitement des échantillons et reste relativement simple à mettre en œuvre.

▪ Principe :

L'ELL est fondée sur la distribution d'un soluté (S) entre deux solvants (A et B) en fonction de la solubilité de celui-ci dans chacun d'eux. En général, le solvant A représente le solvant aqueux et le B, le solvant organique.

▪ Rendement :

Lorsqu'on réalise une extraction, un des objectifs principal est d'obtenir le rendement d'extraction le meilleur possible. Il est en fonction de la constante de distribution, du volume de solvant d'extraction et du nombre d'opérations effectuées. On sait ainsi :

- que plus le volume de l'échantillon à extraire est important, plus le volume de solvant d'extraction sera nécessairement grand, en pratique courante le volume de solvant organique étant de quatre à cinq fois le volume de la phase aqueuse à extraire ;
- que le rendement d'extraction est meilleur lorsqu'une extraction multiple est réalisée pour un même volume de solvant organique.

▪ **Solvants :**

Le solvant, milieu dans lequel s'effectue la réaction, a la capacité de dissoudre des substances sans les modifier chimiquement. Il se caractérise par : sa miscibilité à l'eau, sa constante

D'acidité (aptitude à créer des liaisons hydrogènes), sa constante diélectrique (dissociabilité du solvant), son moment dipolaire (répartition des charges sur une molécule), sa volatilité. Le résumé la classification des principaux solvants selon leurs propriétés chimiques.

➤ **Miscibilité à l'eau :**

Les matrices biologiques étant majoritairement constituées d'eau, les solvants organiques servant à l'extraction seront nécessairement non miscibles à l'eau (hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle...).

➤ **Constante d'acidité**

En pratique, les solvants utilisés ne sont ni des donneurs, ni des accepteurs de proton et on évite ceux présentant cette caractéristique pour éviter les interactions solutés/solvants.

➤ **Moment dipolaire :**

Il donne un caractère ionisant ou polaire à un solvant. Un solvant polaire (eau, méthanol, acétone...) solubilise des substances polaires alors qu'un solvant apolaire souvent inerte (benzène, tétrachlorure de carbone...) solubilise des substances apolaires. On retiendra l'intérêt de choisir un solvant le plus apolaire possible car plus sélectif dans la limite de la solubilité de l'analyte.

Tableau I.1 : Classification des principaux solvants utilisés pour une extraction liquide-liquide. [12].

Exemples de solvants	Types de solvants	Caractéristiques
Acide formique Acides carboxyliques	Protiques et polaires	Formation de liaisons hydrogène (++) Pouvoir ionisant (++) Moment dipolaire (++)
Acétonitrile Acétone Diméthylsulfoxyde	Aprotiques et dipolaires	Pas de liaisons hydrogène Pouvoir ionisant (++) Miscible à d'eau
Hexane Benzène	Aprotiques et apolaires	Pas de liaisons hydrogène Moment dipolaire faible

Toluène Tétrachlorure de carbone		Non miscibles à l'eau Utilisation en ELL (+++)
Éther Tétrahydrofurane	Aprotiques et peu polaires (solvants intermédiaires)	Pas de liaisons hydrogène Moment dipolaire faible Utilisation en ELL (+++)

➤ **Volatilité**

La *volatilité* reste la qualité indispensable à un solvant pour permettre son évaporation en ELL.

▪ **Facteurs influençant l'extraction**

➤ **Matrice**

Une extraction idéale d'une matrice biologique complexe doit permettre d'extraire uniquement le soluté et de laisser tous les autres constituants d'origine exogène ou endogène dans la matrice. En pratique, le solvant doit être le plus sélectif possible vis-à-vis du soluté.

➤ **Soluté**

Ses caractéristiques physicochimiques et en particulier sa structure chimique influencent le coefficient de partage ; plus important pour les molécules à longues chaînes carbonées et pour un nombre de carbones identique, plus important pour les molécules à chaînes ramifiées. La présence d'hétéroatomes comme les oxygènes ou les azotes diminue ce coefficient alors que la présence d'un halogène favorise le passage dans la phase organique.

▪ **Avantages et inconvénients :**

L'ELL est une technique permettant la concentration des échantillons et la purification, ce qui peut dans certains cas solubiliser les solutés d'intérêt, éliminer les molécules interférentes et permettre par exemple de limiter les effets de matrice avec suppression ou amplification d'ions. Cette méthode présente également l'avantage de pouvoir travailler sur des matrices plus difficiles comme le sang laqué *post mortem*, les viscères ou les cheveux qui ne sont pas toujours compatibles avec l'EPS. Elle présente cependant les inconvénients d'être longue et difficilement automatisable, consommatrice de solvants organiques souvent toxiques, et n'est pas la méthode de choix pour les molécules très polaires qui préféreront les méthodes de précipitation ou d'EPS [12].

b.2- Extraction en phase solide :

L'extraction en phase solide, ou EPS [16], est une bonne alternative à l'ELL, notamment quand les échantillons sont très chargés en protéines et quand l'automatisation est nécessaire. Elle est appliquée avec succès aux échantillons *post mortem* type liquides biologiques ou tissus, avec des dilutions appropriées.

L'EPS est basée sur le partage de composés entre une phase liquide, l'échantillon type sang, plasma ou urine et une phase stationnaire solide, l'absorbant.

Depuis les années soixante-dix, la gamme de phases stationnaires a considérablement augmenté. À côté des premières phases en silice, on a largement investi dans l'ensemble des types de phases stationnaires actuellement utilisées comme phases séparatives en HPLC.

L'extraction de molécules d'une phase aqueuse impose l'utilisation de phases pour lesquelles l'eau est peu éluant : silices greffées par des chaînes hydrocarbonées de type C8 ou C18 par exemple. L'apparition de supports polymériques, d'une étendue de phases de volumes variables, de plaques 96 puits destinées à de grandes séries ont ensuite permis d'élargir la gamme de l'extraction en phase solide. Les conditionnements les plus adaptés à une utilisation en toxicologie sont les cartouches de volume compris entre 1 et 5 ml avec une quantité de phase variable de 30 à 500 mg. L'application des fluides se fera le plus couramment par pression négative utilisant un système de pompe à vide.

On rencontre également des phases stationnaires mixtes, dont le principe est basé sur des interactions hydrophobes et des échanges ioniques permettant d'être plus sélectif dans la préparation d'échantillon.

- ***Principe***

L'extraction se déroule en général en quatre étapes mais peut être précédée d'une étape de dilution ou d'une technique de séparation pour des matrices plus complexes comme le sang total, les cheveux ou les organes.

- ***Conditionnement de la phase stationnaire***

Le mouillage est mené par solvant organique et activation des sites de rétention, siège des interactions moléculaires. Par exemple, un support hydrophobe sera conditionné par un

solvant organique type méthanol puis par un second solvant dont les caractéristiques ioniques sont les plus proches possibles du solvant de l'échantillon, en général l'eau.

- ***Dépôt de l'échantillon :***

Il est réalisé avec une vitesse d'écoulement modérée. Cette étape a pour objectif une rétention relative de la ou des molécules d'intérêt

- ***Lavage***

Réalisé par des solvants de faibles forces éluantes (par exemple mélange méthanol/eau), il élimine les interférents faiblement retenus. Cette étape n'est pas indispensable mais peut au contraire être multipliée pour améliorer la propreté de l'extrait. On recommande une vitesse d'écoulement rapide qui se terminera par une étape de séchage pour éliminer toute trace de solvant.

- ***Élution :***

Le solvant a une force éluante la plus faible possible mais est capable d'entraîner les molécules d'intérêt. Ce solvant sera également choisi pour sa facilité d'évaporation et pour sa compatibilité avec la technique d'analyse utilisée. On préconise un faible volume d'élution et une vitesse d'écoulement lente pour favoriser l'élution des molécules d'intérêt.

- ***Types d'absorbants***

Il existe deux types de phases stationnaires : les polymères et les silices [17].

- **Polymères**

Les polymères (polystyrène-divinylbenzène, polystyrène-divinyl, pyrrolidone, diméthylacryloxymethyl naphthalène divinylbenzène) sont très stables chimiquement, résistent à tous les pH. Ils sont faiblement sélectifs et ont une capacité de charge importante permettant l'extraction d'un grand nombre de molécules et de classes de molécules.

- **Silices**

Les silices, moins stables, sur des gammes de pH allant de 2 à 7,5, ont une capacité de charge moindre et sont beaucoup plus sélectives. Elles sont ainsi très majoritairement utilisées. [18]

c- Dérivation des échantillons

Certaines molécules nécessitent d'être dérivées pour être analysées en chromatographie en phase gazeuse. Cette étape peut intervenir avant ou pendant l'extraction. La triméthylsilylation est la technique de dérivation la plus classique.

Cependant, l'acétylation par de l'anhydride acétique pour les molécules basiques et neutres et la méthylation (diazométhane) pour les molécules acides sont largement décrites dans la littérature [19-20]. Les agents de silylation sont très utilisés car ils réagissent avec de nombreux groupements fonctionnels (hydroxyle, carboxyle, amide, amine). D'excellents résultats sont obtenus avec un mélange MSTFA-toluène (1 : 4 v/v) contenant 5 % de TMCS préparé extemporanément en présence de sulfate de sodium anhydre à 75 °C pendant 30 minutes ou en micro-ondes pendant 1 minute. L'utilisation d'agents de silylation ne nécessite pas d'évaporation des excès de réactifs avant l'injection en chromatographie en phase gazeuse [21].

2.2- Méthodes analytiques :

Les techniques analytiques à la disposition du toxicologue analyste sont en perpétuelles évolutions. De nouveaux appareils apparaissent très régulièrement sur le marché toujours plus performants, plus sensibles, plus rapides. Des avancées importantes sont apparues dans les méthodes séparatives associées à des détections jusque-là impossibles. Des technologies onéreuses jusqu'alors inabordables le deviennent, ouvrant des perspectives nouvelles dans les méthodes de recherche large et d'identification de xenobiotiques dans les matrices biologiques.

Il en est ainsi du développement des techniques séparatives en phase gazeuse ou liquide, des détecteurs de masse notamment pour la détermination de la masse exacte, des interfaces de couplage de la chromatographie en phase liquide avec de nombreux détecteurs de masse. Dans notre pratique quotidienne les spectromètres de masse « simples » sont devenus les standards prépondérants de l'analyse toxicologique sans oublier les techniques immunologiques [12].

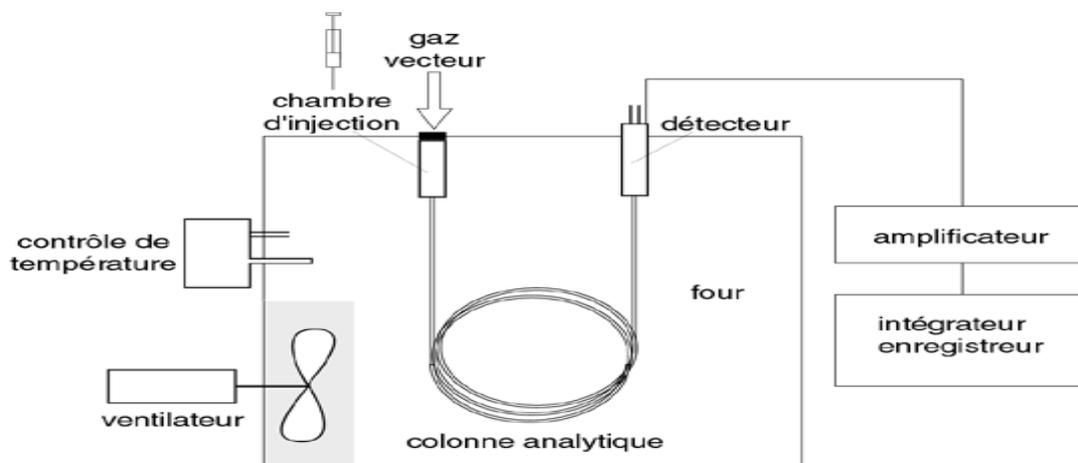
a- Méthodes séparatives :

Les techniques séparatives sont très employées et incontournables pour le toxicologue analyste. La chromatographie en phase liquide (HPLC) ainsi que la chromatographie en phase

gazeuse (CPG) couplées a divers détecteurs ont des rôles prépondérants. Les fournisseurs de matériel chromatographique, pour satisfaire les besoins de certains de leurs clients, ont développé de nouvelles méthodes plus rapides. De nouveaux supports et des nouvelles phases stationnaires sont apparus sur le marché, le « hardware » et ses possibilités ont également beaucoup évolué pour s'adapter à ces changements. L'électrophorèse bien que moins répandue a beaucoup évolué et des couplages aux détecteurs de masse sont proposés depuis quelques années.

a.1- Chromatographie en phase gazeuse :

La chromatographie en phase gazeuse est rapidement devenue l'une des meilleures méthodes analytiques dans le domaine scientifique, autant en recherche que dans le domaine industriel (industrie pharmaceutique, agriculture, environnement, etc.). C'est également le seul type de chromatographie qui utilise un gaz comme phase mobile, ce qui nécessite un appareil spécial, appelé communément le chromatographe à gaz.



Figures I.2 : Chromatographe à gaz [22].

➤ Principe :

Le mélange de composés est introduit à l'aide d'une seringue de façon à ce qu'il entre dans la colonne sous forme vapeur. La phase mobile est un gaz chimiquement inerte, appelé gaz vecteur. Celui-ci entraîne avec lui le mélange de composés à travers la colonne qui contient

une phase stationnaire. Les composés du mélange traversent la colonne à des vitesses différentes. Lorsqu'ils arrivent à la sortie de la colonne, ils sont détectés par un détecteur qui transmet un signal électrique à un enregistreur. Les résultats apparaissent sur le chromatogramme sous forme de pics.

➤ **Appareillages et matériaux :**

Quel que soit le chromatographe à gaz ; on retrouve toujours les principales composantes suivantes :

▪ ***La phase mobile :***

La phase mobile entraînant les composés dans la colonne est un gaz de préférence chimiquement inerte. Les principaux sont l'hélium, l'argon, l'azote et le dioxyde de carbone. Ils sont livrés dans des bonbonnes surmontées d'un régulateur de pression. Ces gaz doivent être de pureté analytique, car les impuretés sont responsables de bruits de fond sur le chromatogramme. Le choix du gaz vecteur dépend principalement du type de détecteur de l'appareil.

▪ ***Chambre d'injection***

La chambre d'injection est un compartiment placé entre la bonbonne du gaz vecteur et le four principal contenant la colonne. L'injection des échantillons se fait à l'aide d'une seringue graduée en microlitres qui est introduite dans la chambre à travers une rondelle en caoutchouc.

La plupart des injecteurs sont aujourd'hui équipés d'un régulateur électronique de débit. Ce dernier ajuste la pression du gaz en fonction de la température, de manière à ce que le débit gazeux dans la colonne soit constant, ce qui améliore considérablement les performances du chromatographe.

Pour les colonnes capillaires il y a trois types d'injection :

• **Injection avec partage**

L'injecteur avec partage « split » est un système produisant une vaporisation rapide de l'échantillon, une partie des vapeurs de cet échantillon va pénétrer dans la colonne tandis que la majeure partie de ces vapeurs va être évacuée à l'extérieur.

- **Injection sans partage « splitless »**

L'atout majeur de cette technique consiste à introduire l'échantillon complet dans la colonne, ce qui permet d'espérer une plus grande sensibilité que celle obtenue pour l'injection avec partage.

- **Injection dans la colonne « on-coloum »**

Grâce à une seringue, on injecte l'échantillon au travers de la vanne d'arrêt rotative dans une zone refroidie de la tête de colonne. Cette technique d'introduction de l'échantillon dans la colonne sans évaporation préalable offre de multiples avantages.

Tableau I.2 : *Avantages et inconvénients de différents modes d'injection.*

Mode d'injection	Avantages	Inconvénients
Injecteur split	<ul style="list-style-type: none"> • Adapté pour tous les types d'échantillons • Bande d'injection étroite 	<ul style="list-style-type: none"> • Reproductibilité liée à la nature de l'échantillon
Injecteur splitless	<ul style="list-style-type: none"> • Adapte pour l'analyse quantitative de traces peu de discrimination 	<ul style="list-style-type: none"> • Choix limité de solvants et de température
Injecteur on-coloum	<ul style="list-style-type: none"> • Adapte pour l'analyse quantitative • Pas de discrimination 	<ul style="list-style-type: none"> • Pollution de la colonne

- ***Four principal***

Le four principal est un compartiment placé entre la chambre d'injection et le détecteur qui contient la colonne chromatographique. Il est muni d'éléments chauffants pouvant contrôler la température du four avec une très grande précision.

- ***Colonnes***

Les colonnes utilisées actuellement dans la CPG sont des colonnes dites « capillaires ». Les constituants d'un mélange sont séparés en fonction de leur polarité, leurs différences de propriétés physicochimiques leur confèrent des vitesses d'élution différentes. Confronté à un mélange mixte, on privilégie souvent le choix d'une colonne peu polaire, les phases stationnaires peu polaires étant généralement plus robustes et thermiquement beaucoup plus stables que leurs homologues polaires.

- ***Détecteurs***

Le détecteur est situé dans un compartiment immédiatement à la sortie de la colonne. Comme la chambre d'injection, la chambre à détection est chauffée à des températures très élevées. Son rôle est de détecter les composés à la sortie de la colonne et de transmettre l'information sous forme d'un signal électrique à l'enregistreur.

Un détecteur est caractérisé principalement par sa sensibilité et sa capacité de donner une réponse proportionnelle à la concentration du composé détecté :

- **Sensibilité**

La sensibilité d'un détecteur est sa capacité de réagir à la réponse d'un composé. Plus un détecteur détecte de petites quantités de substances, plus il est sensible, la plus petite quantité de substance qu'un détecteur peut détecter se nomme le seuil de détection.

- **La linéarité de la réponse**

Un détecteur doit émettre un signal proportionnel à la concentration de substance détectée, et cela sur une gamme de concentration la plus élevée possible. La courbe d'étalonnage d'un composé sert à déterminer une zone de concentration où la réponse est linéaire. Les principaux détecteurs de la CPG sont : le détecteur à capture d'électrons (ECD), le détecteur azote-phosphore et le détecteur à ionisation de flamme (FID).

Ces détecteurs sont spécifiques à des familles bien déterminées. Alors que le spectromètre de masse est un détecteur universel permettant l'analyse d'un mélange de différents composés dans diverses matrices.

a.2- Spectroscopie de masse

➤ Principe

La spectrométrie de masse permet de transformer des molécules dans leur état naturel en ions à l'état gazeux et d'obtenir leur masse moléculaire m en analysant leur rapport de masse/charge, noté m/z , où m est la masse du composé et z sa charge. Cette méthode permet de séparer les différents ions et d'évaluer leur abondance respective.

➤ Appareillage

Un spectromètre de masse est un appareil qui permet de mesurer le rapport masse /charge (m/z) des ions formés à partir de l'échantillon analysé.

Il est constitué des parties suivantes :

- Une source d'ions dans laquelle se produit le passage en phase gazeuse de l'échantillon à analyser, l'ionisation des molécules, mais aussi la décomposition des ions,
- Un analyseur qui permet de trier les ions en fonctions de leur rapport m/z ,
- Un détecteur qui compte les ions en leur associant leur rapport m/z ,
- Un enregistreur pour traitement du signal et la visualisation des spectres,
- Un système de calibration qui permet l'étalonnage entre la grandeur réelle mesurée et le rapport m/z

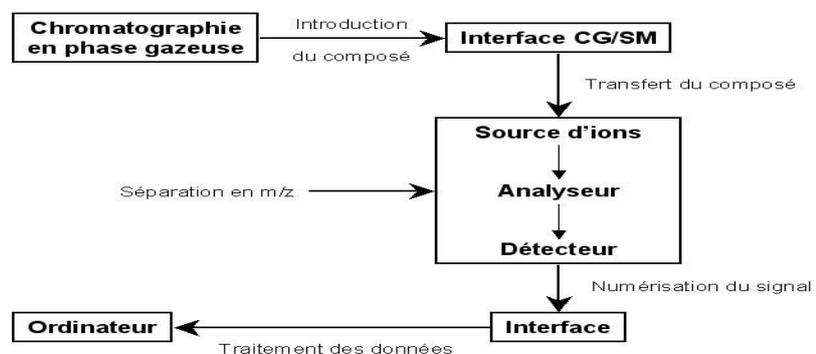


Figure I.3 : Principe du spectromètre de masse [23].

➤ **La source (chambre d'ionisation)**

Dans la spectrométrie de masse, les sources utilisées sont dites à « ionisation électronique » on parle d' « EI » ou « ionisation chimique », de « CI ». Leur usage est réservé à l'analyse des composés gazeux facilement volatilisables (point d'ébullition n'excédant pas 400 °C). La source est maintenue à une température élevée (généralement comprise entre 100 et 250 °C) pour éviter la condensation des analytes

➤ **L'analyseur**

C'est la partie du spectromètre qui permet la séparation des ions. Il est soumis à un champ magnétique B uniforme et constant. Les ions pénétrants dans l'analyseur avec une vitesse v , une masse m et de charge z sont déviés en suivant une trajectoire circulaire de rayon r . Ainsi les ions ayant leur rapport m/z différent auront une trajectoire différente ce qui permet de les séparer.

L'analyseur le plus utilisé dans la spectrométrie de masse est un quadripôle.

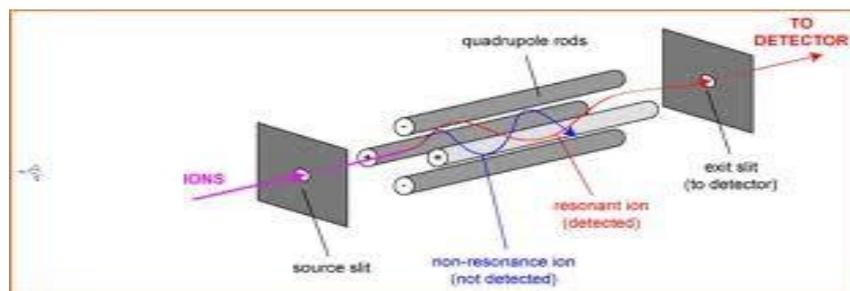


Figure I.4 : Schéma d'un quadripôle [24].

➤ **Analyse spectrale par le logiciel d'acquisition**

L'utilisation du logiciel permet d'acquérir les résultats selon le mode d'analyse choisis. Les principaux modes d'analyses utilisés en spectrométrie de masse sont :

- Analyse en balayage ou « full scan »

Le mode dit « de balayage » ou « full scan » est utilisé lorsque l'on souhaite enregistrer des spectres dit « de source », c'est-à-dire des spectres où sont présents tous les ions produits dans la source à un instant donné.

- Analyses en « SIM »

Le terme « SIM » (« single Ion Monitoring ») est employé par les utilisateurs de quadripôles pour désigner l'opération qui consiste à ne détecter que un (ou quelques) ion (s). En SIM, le spectromètre de masse fonctionne comme un filtre ; il est programmé pour ne détecter que quelques ions caractéristiques des analytes étudiés.

Le gain de sensibilité est spectaculaire car SIM augmente le signal associé à la détection des analytes tout en diminuant le bruit de fond chromatographique.

a.3- Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse

➤ Appareillage

La colonne capillaire sort du chromatographe et entre dans le spectromètre de masse via une « ligne transfert », il s'agit d'un cylindre intensément chauffé (environ 300°C) de manière à éviter que les molécules éluées ne se recondensent pas entre les deux appareils. La figure suivante présente un schéma d'appareil de couplage CPG-SM.

➤ atouts du couplage CPG/SM

L'association d'une méthode de séparation (CPG) avec un détecteur très sensible (SM) a conduit à une technique d'analyse performante pour l'identification des molécules organiques.

Ce couplage possède plusieurs atouts :

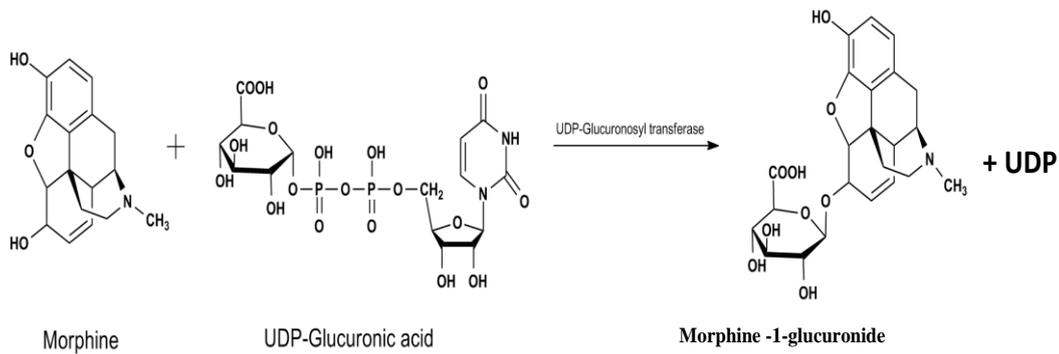
- Une très grande sensibilité
- La réponse est universelle
- Quantification et confirmation des composés recherchés
- Elimination des interférences en mode SIM en spécifiant les ions caractéristiques des molécules recherchées.

D- HYDROLYSE :

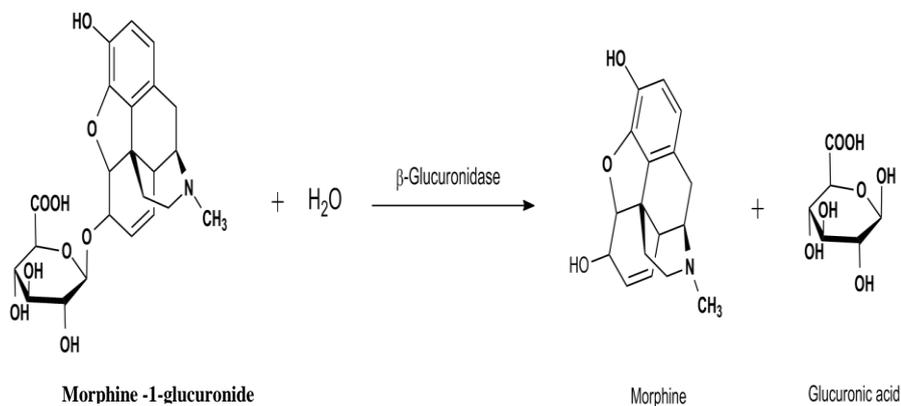
1- hydrolyse des toxicants :

a- enzyme β -glucuronidase :

Les β -glucuronidases sont couramment utilisés pour l'hydrolyse enzymatique des glucuronides d'urine, plasma, et d'autres fluides avant l'analyse par dosage CPG/SM ou HPLC ou d'autres moyens. Typiquement, entre 1 et 20 unités de glucuronidase est utilisée par μ l de plasma, d'urine. La quantité exacte nécessaire dépendra des conditions spécifiques utilisées.



Réaction général de la glucuronidation de la morphine à partir d'acide UDP – glucuronique



Réaction d'hydrolyse de morphine -1- glucuronide par Beta Glucuronidase.

Dans les métabolismes de phase II, les dérivés β -glucuroconjugés et sulfoconjugés sont des dérivés très stables qui nécessitent une procédure d'hydrolyse pour une analyse des molécules parents ou issues du métabolisme de phase I. Celle-ci est le plus fréquemment réalisée dans les urines. L'hydrolyse peut être obtenue par incubation à 100 °C en présence d'un acide ou

d'une base forte. Les procédures standards utilisent de l'HCl à 37 % pendant 15 minutes à 100 °C [25, 26]. Elles présentent l'avantage d'être rapides mais peuvent dégrader l'échantillon et notamment les molécules d'intérêt sensibles aux conditions plus extrêmes de pH (benzodiazépines, cocaïne ou dérivés opiacés).

On préférera l'hydrolyse enzymatique, plus longue mais permettant d'obtenir des extraits plus propres, une meilleure stabilité des analytes d'intérêt et un minimum d'interférences. Les enzymes les plus utilisées sont la β -glucuronidase d'*E. Coli* ou d'*Hélix pomatia*, parfois combinées avec une arylsulfatase dans des conditions de pH et de température précises : pH entre 5,5 et 7,5 pour la première et entre 4,5 et 5,5 pour la seconde avec des températures de 50 °C et de 60 °C, respectivement. La β -glucuronidase-arylsulfatase d'*Hélix pomatia* présente l'avantage d'une action enzymatique simultanée, avec une activité enzymatique pour la β -glucuronidase moindre que pour l'enzyme d'*E. Coli* utilisée seule. On ne retiendra que l'enzyme d'*E. Coli* comparée à la double enzyme permet d'obtenir des extraits plus purs.

Classiquement, on mélange 1 ml d'urine à 1 ou 2 ml de tampon puis on ajoute 1 000 à 20 000 unités de β -glucuronidase pour une incubation d'une nuit à 37 °C ou 90 minutes à 50 °C. Après cette première étape d'hydrolyse, l'échantillon pourra être traité par ELL ou EPS. En général, l'étalon interne utilisé sera un glucuronide qui subira l'étape d'hydrolyse avant l'extraction [21].

2- intérêt d'hydrolyse :

L'intérêt et la nécessité de l'hydrolyse dépendent étroitement des techniques utilisées :

- Réactions colorées : l'hydrolyse acide est nécessaire pour l'identification colorée de certaines molécules telles que le paracétamol et les benzodiazépines.
- Analyse par CPG/SM : l'hydrolyse des conjugués est nécessaire avant extraction car ces derniers ne peuvent être analysés par CPG/SM du fait de leur poids moléculaire et leur polarité trop élevés [27].
- Analyse par HPLC : ne nécessite pas d'hydrolyse car les conjugués intacts peuvent être analysés par cette technique [27].
- Analyse par LC/MS : une hydrolyse, surtout enzymatique, est nécessaire dans presque toutes les procédures de screening dans les urines par LC/MS/MS [13].

Chapitre II :
Matériels et
méthodes

I- Objectif :

Cette analyse a pour but de permettre la comparaison entre l'hydrolyse enzymatique et l'hydrolyse acide dans la détection des intoxications dans l'urine.

A- Matériels et méthodes expérimentales

1- Réactifs

a- Préparation de l'enzyme :

- Solution de phosphate de potassium mono basique à 1M
- Solution de phosphate de potassium di basique à 1M



Solution A :

Dans une fiole jaugée de 50 ml, mettre :

- 6.80 g de phosphate de potassium mono basique
- 50 ml d'eau distillée.

Solution B:

- 8.71g de phosphate de potassium di basique
- 50 ml d'eau distillée.

Tampon:

On prend la **solution A**, on ajuste le pH à 6.8 par le pH mètre tout en ajoutant la **solution B** et on complète avec de l'eau distillée à 1L pour avoir une concentration de 0.5 M.

- Enzyme **β -glucuronidase** :

* β -glucuronidase à partir d'E. Coli

* $\geq 5,000,000$ unité/g de protéine

* pH = 6.8

Solution enzymatique :

On prend 2 ml de la solution tampon et on ajoute 8 μ l de l'enzyme glucuronidase.

b- Extraction

- **Etalon interne : Prazepam** 1mg/ml
- Solution tampon : chlorure d'ammonium pH=9.5
- Solvant d'extraction : dichlorométhane / propan-2-ol / heptane (25 :10 : 25 v/v/v)
- Evaporation douce : sous Azote (N)
- Méthanol.

2- instrumentations :

a- Matériel :

- Bain- marie à 65°C
- Evaporateur à sec (DRIBLOCK) avec rampe d'évaporation à l'azote
- Agitateur rotatif (va et vient)
- Centrifugeuse (PK121R) ; 3500 tr/min.

Chromatographie en Phase Gazeuse :

- ✓ **Type d'appareillage :** Perkin Elmer Clarus 680
- ✓ **Colonne** RESTEK RXI ® 5 ms
- ✓ **Longueur** =30 m \times 0,25mm
- ✓ **Epaisseur**=250 μ m
- ✓ **Programmation de température :** 230°C-280°C
- ✓ **Quantité injectée :** 1 μ l
- ✓ **Débit :** 1 μ l/min
- ✓ **Durée de traitement :** 40 min
- ✓ **Température d'injection :** 230°C
- ✓ **Type d'injection :** split/splitless
- ✓ **Gaz vecteur :** Hélium

✚ Spectrométrie de masse

- ✓ Type d'appareillage : Clarus SQ 8C
- ✓ Mode d'ionisation : Impact Electronique (IE)
- ✓ Energie d'ionisation : 70 eV
- ✓ Température de la source : 250°C.
- ✓ Masse-gamme : 50 – 500 daltons

B- Mode opératoire:

✚ Protocole d'hydrolyse enzymatique :

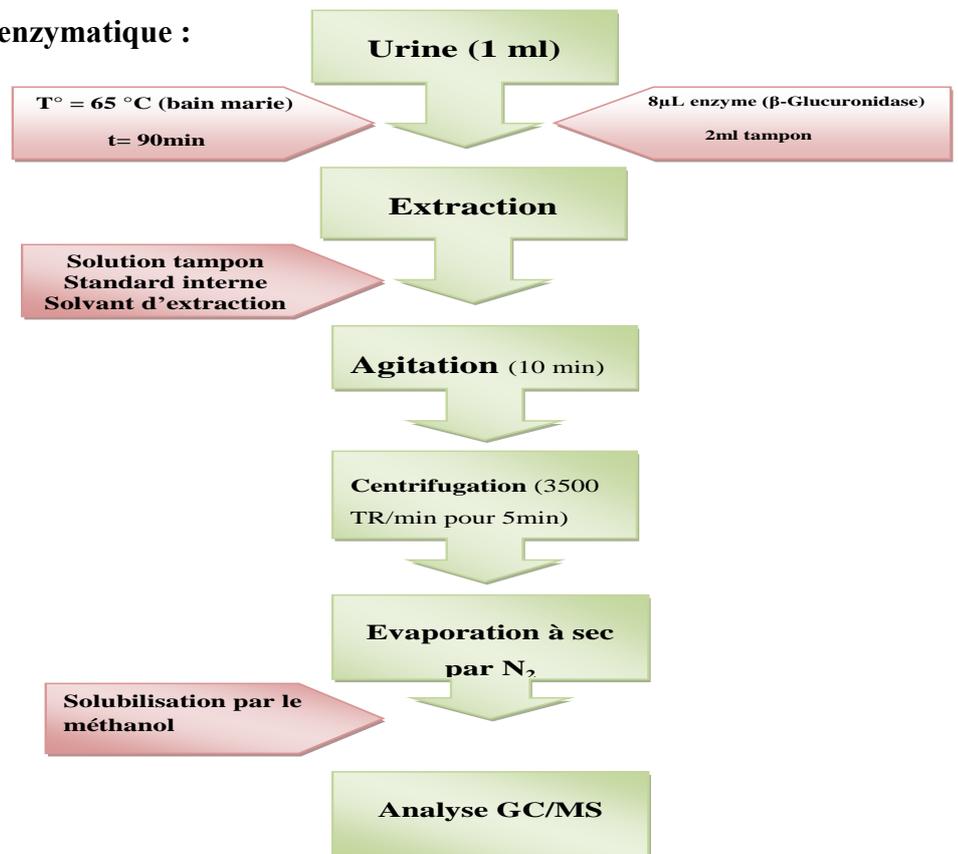


Figure II.1: Etapes d'analyse d'urine par hydrolyse enzymatique

☚ protocole d'hydrolyse acide :

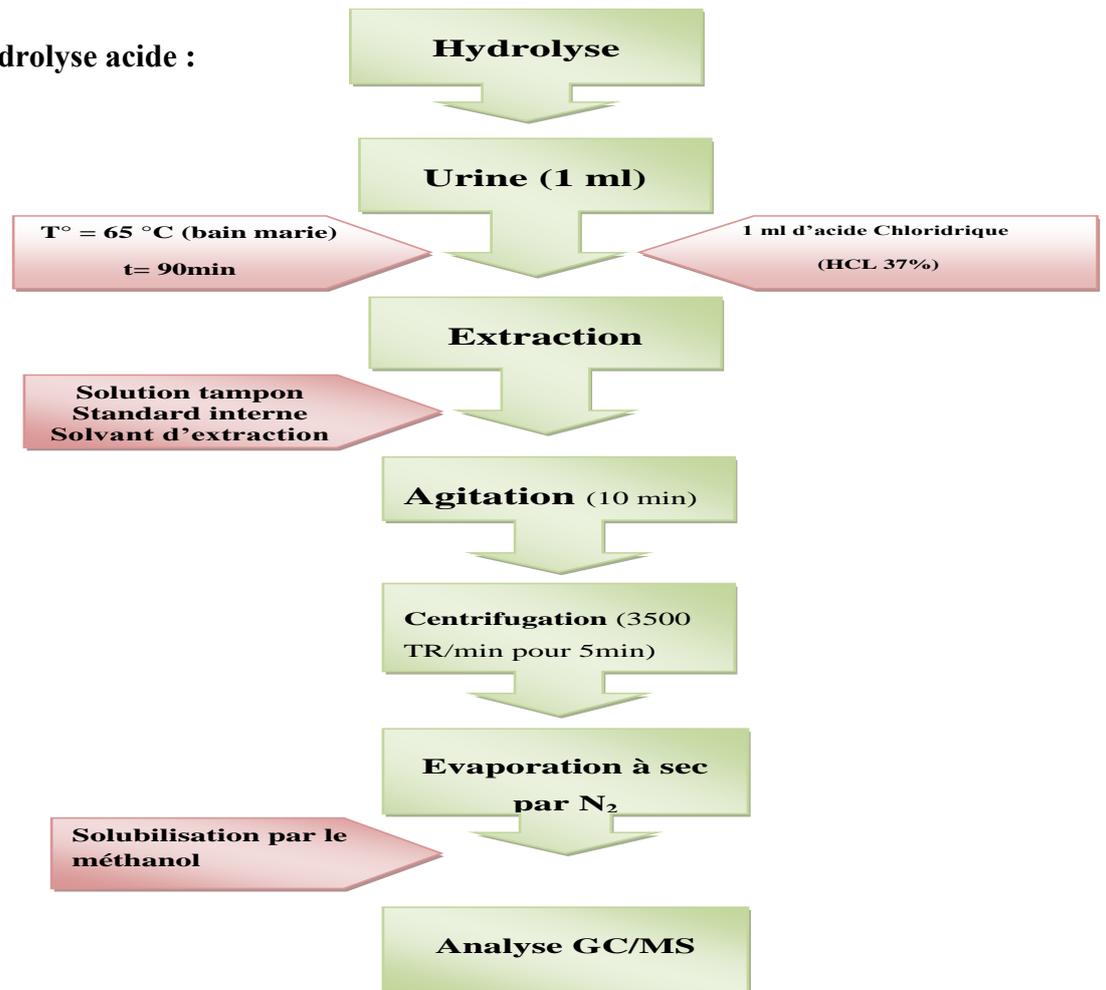


Figure II.2 : Etapes d'analyse d'urine par *hydrolyse acide*.

1- Hydrolyse enzymatique et hydrolyse acide

☚ Hydrolyse enzymatique

- 1 mL d'urine dans un tube à hémolyse
- 2mL de la solution d'enzyme **glucuronidase**
- Chauffage de 65°C pendant 90 min.

☚ Hydrolyse acide:

- 1ml d'urine dans un tube à hémolyse
- 1mL d'acide chloridrique (HCL 37%)
- Chauffage de 65°C durant 90 min.

2- Extraction :

1^{er} CAS:

- 50 μ L d'étalon interne
- 1 ml d'échantillon (hydrolysé par enzyme ou acide)
- 1 ml de tampon
- 5ml de solvant d'extraction



Figure II.3: Tubes sur paillese.

- Agitation 10 min
- Centrifugation 5 min à 3500tr/mn



Figure II.4: Centrifugeuse (PK121R).

- Extraire la phase organique dans un tube à fond rond



Figure II.5 : Tube à fond rond contenant la phase organique.

- Evaporation sous azote



Figure II.6 : schéma d'Hôte de concentration sous jet d'azote.

- Reprendre l'extrait sec par 100 μ L de méthanol et le mettre dans un Vial
- Analyse par CPG/SM

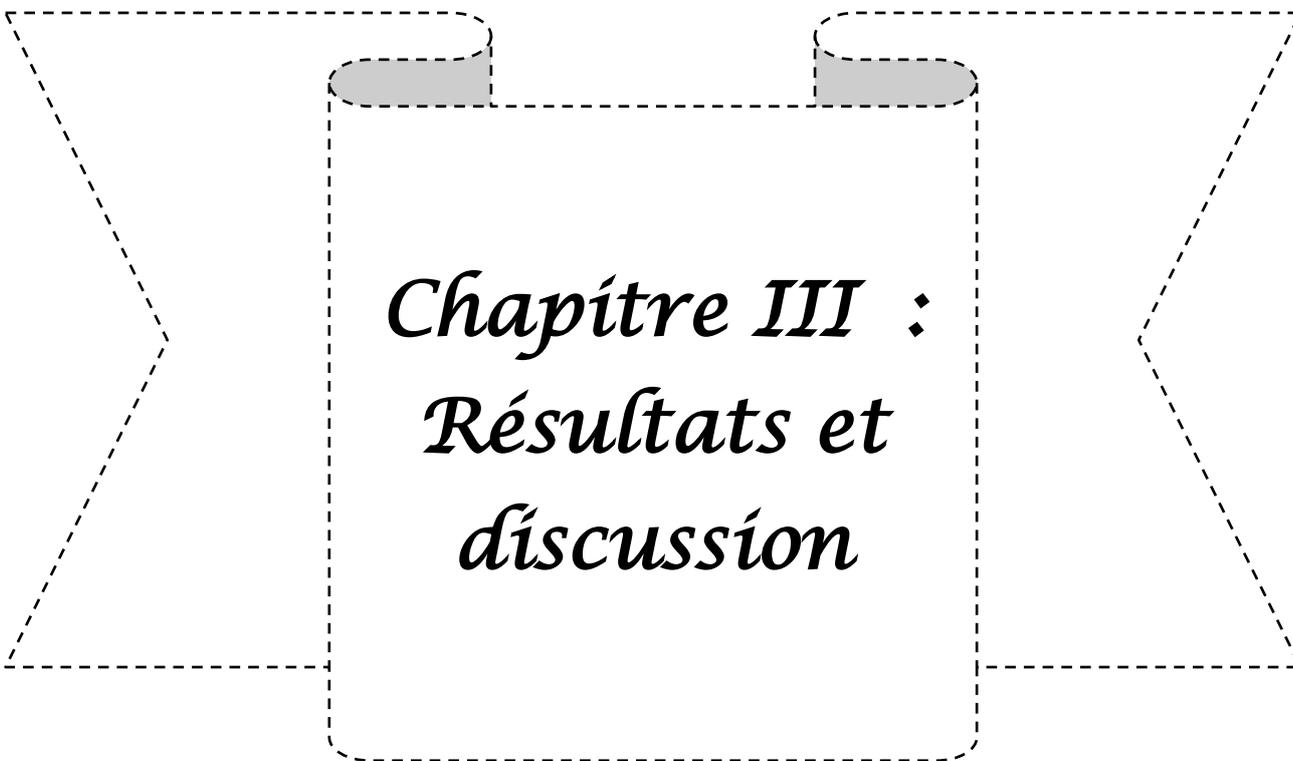


Figure II.7 : schéma d'Appareillage de couplage CPG/SM (appareil du CAPM)

- Les pics sont caractérisés par leurs abondances, leurs temps de rétention ainsi que leurs ions quantitatifs et qualitatifs.

2^{eme} CAS :

Pour le reste d'échantillon hydrolysé par l'enzyme on effectue les mêmes étapes en écartant le tampon d'extraction.



*Chapitre III :
Résultats et
discussion*

Introduction :

Les métabolites des xenobiotiques sont des dérivés très stables dont la présence peut gêner l'analyse. Leur hydrolyse rend disponible les fractions libres des molécules parents ou celles issues du métabolisme pour une meilleure identification.

Le clivage des conjugués concerne surtout les urines et peut être effectué par hydrolyse chimique rapide ou enzymatique douce mais lente.

Dans ce chapitre, nous allons présenter les résultats expérimentaux de sept échantillons d'urines ainsi que leur analyse afin de mettre en évidence la meilleure méthode d'hydrolyse qui sera utilisée par laboratoire de CAPM pendant le screening toxicologique.

I- Analyse des chromatogrammes par couplage CPG/SM

1- Hydrolyse enzymatique :

1.1- Hydrolyse enzymatique + extraction sans tampon :

a- Analyse qualitative de l'échantillon 1 :

Le mélange à analyser a été identifié par CPG/SM tout en gardant les mêmes conditions d'analyses pendant un temps d'analyse de 40 min.

L'identification des différents échantillons a été effectuée en comparant nos résultats à ceux de la littérature et par rapport à la bibliothèque spectrale (ADAMS).

D'après le chromatogramme de l'échantillon **1** (après hydrolyse enzymatique sans tampon d'extraction, figure III.1) l'analyse par CPG/SM a révélé la présence de 23 composés dont les résultats d'identification sont rassemblés dans le tableau **III.1**.

Le composé majoritaire présente un pic au temps de rétention $t_r=9.06\text{min}$ suivi du pic au $t_r=33.97\text{ min}$.

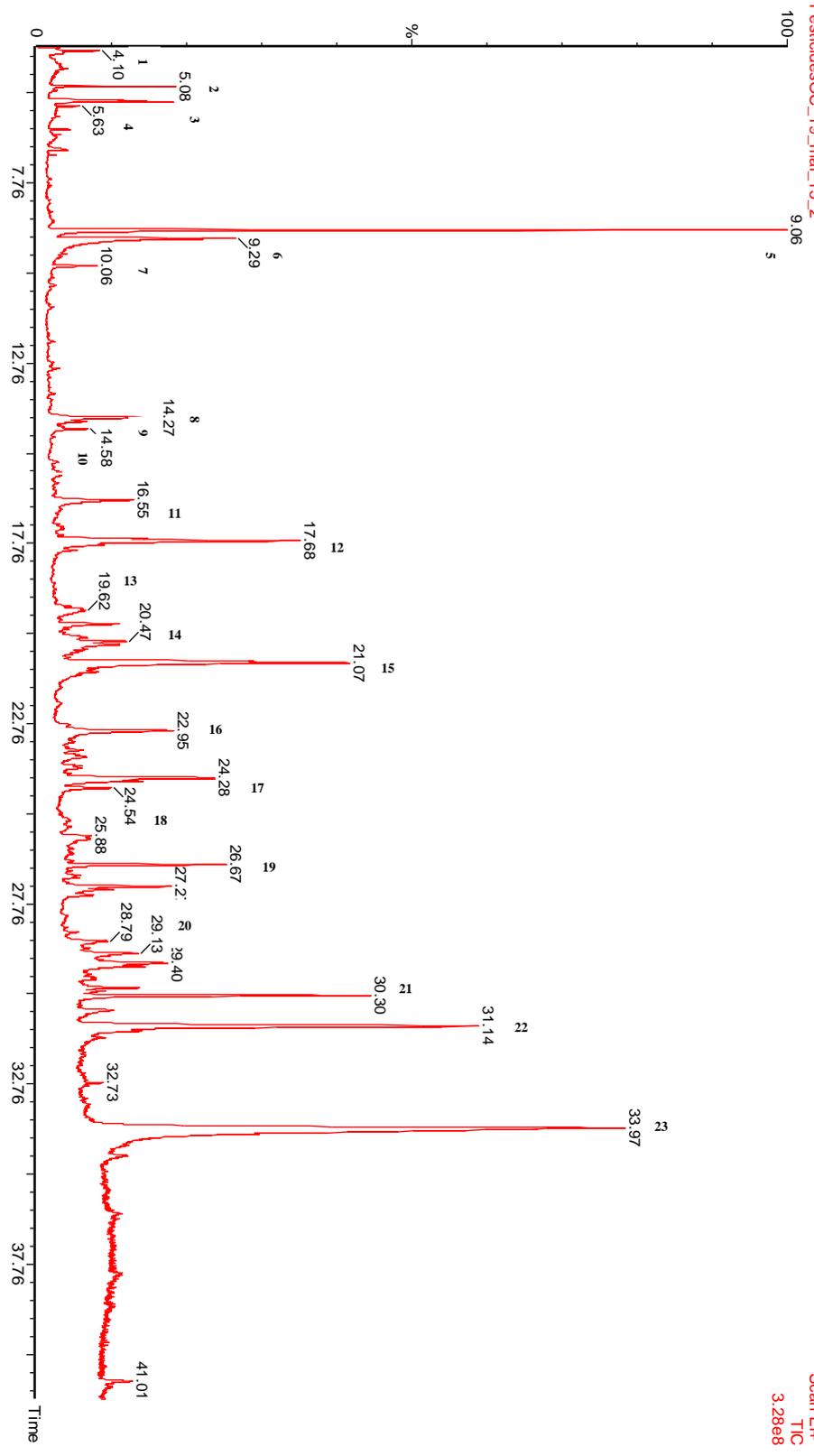


Figure III.1 : Chromatogramme de l'échantillon 1 (hydrolyse enzymatique sans tampon d'extraction)

Tableau III.1: Résultats d'analyse CPG/SM du chromatogramme de l'échantillon 1 après hydrolyse enzymatique sans tampon d'extraction

<i>N° de pics</i>	<i>Temps de rétention (min)</i>	<i>composés identifiés</i>
1	4.10	Silane de methyl
2	5.08	Cyclotetrasiloxane, octamethyl
3	5.51	Benzaldehyde-3-methoxy (trimethyl silyl-O-methyloxime)
4	9.06	β – Eudesmol trimethyl silyl ether
5	9.29	Cyclohexanone-1- methanol
6	10.07	Phenol-2,4- dimethyl ethyl
7	14.27	1-hexadecanol
8	14.38	Ethanol -2(octadecyloxy)
9	14.58	Diazinone
10	16.55	Hexadecanon acide –methyl
11	17.68	Docasene
12	19.62	Octadecadiaoil chloride
13	20.47	Propanoic acid
14	21.07	Docasene
15	22.95	Octadecanoic acid methyl ester
16	24.28	Docasene
17	24.54	Pentatriacontene
18	26.67	Diphenyl methyl silyloxy decane
19	29.13	Prazepam
20	30.30	Decandioic acid
21	31.84	Cholest -3.5- diène
22	33.97	Cholestérol

Après analyse par CPG et d'après le chromatogramme d'échantillon **1** (figure III.1) et les résultats issus du tableau (III.1), nous avons pu déterminer le composé responsable de l'intoxication qui est le **Diazinone** au $t_r=14.58$ min qui reste à confirmer par l'intermédiaire de la spectrométrie de masse et dont le fragmentogramme relatif au composé **Diazinone** est montré sur le spectre de masse en figure III.2. Le pic de base (179.1441) et les pics caractéristiques (304.0655 ; 276.0130 ; 248.0943 ; 153.1404) de ce composé sont expliqués par les différentes fragmentations illustrées sur la figure III.3.

84/15 1ext E

PesticidesOC_19_mai_15_2 2533 (14.572)

, 19-May-2015 + 15:07:03

Scan E1+
9.34e5

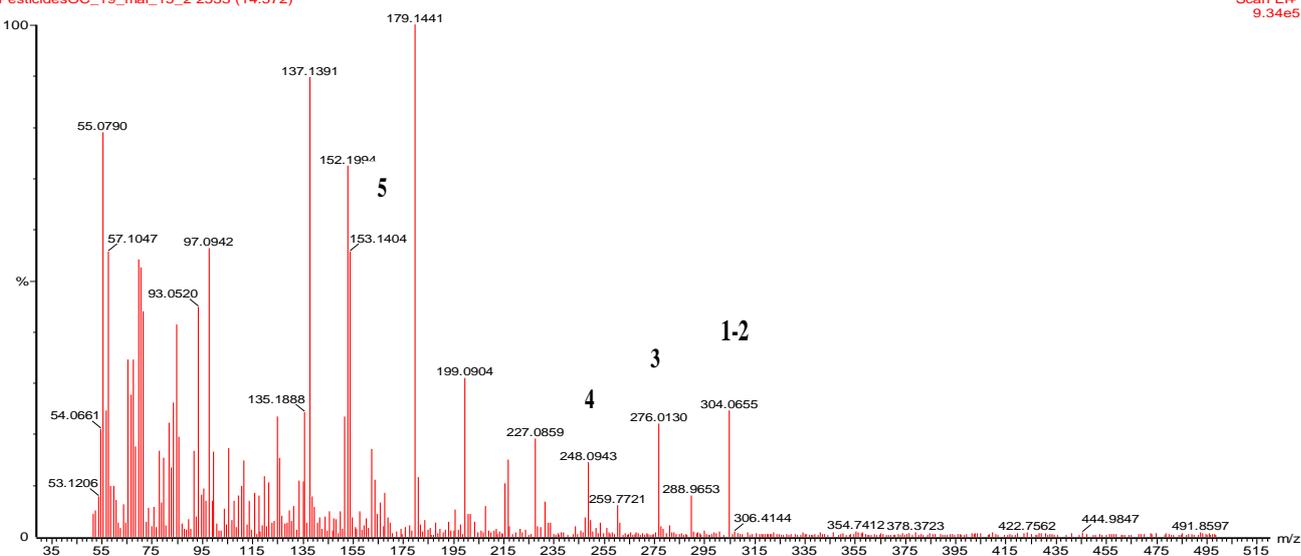


Figure III.2 : Spectre de masse du Diazinone

le mécanisme de fragmentation probable en SM de la **Diazinone** est illustré dans la fig.III.3

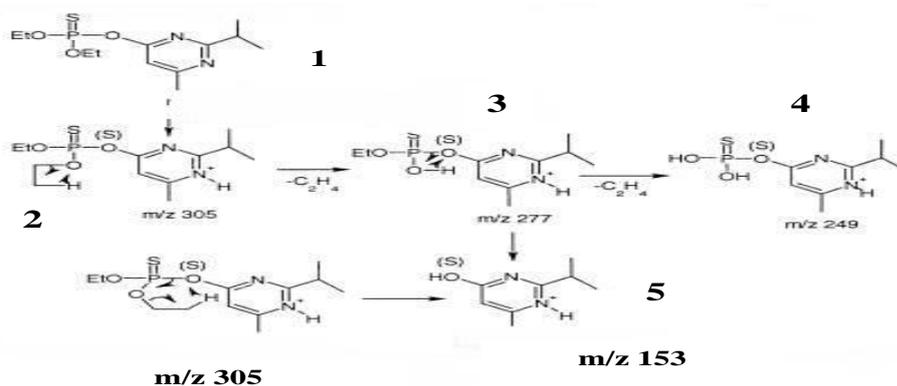


Figure III.3 : Mécanisme de Fragmentation du Diazinone par SM [27]

b- Analyse quantitative de l'échantillon 1:

Pour déterminer la quantité d'intoxicant présente dans l'urine, nous avons procédé par détermination de la surface du pic relatif au « **Diazinone** ».

Les surfaces des différents pics du chromatogramme de l'échantillon **1** sont illustrées par la figure III.4.

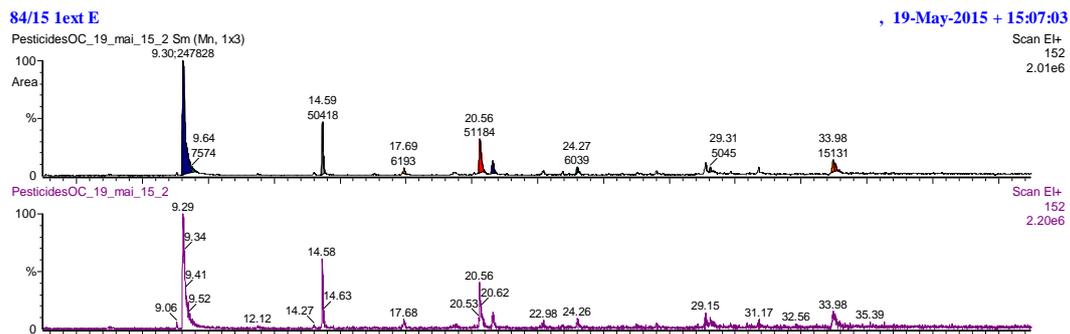


Figure III.4 : Chromatogramme illustrant les surfaces des pics.

Les résultats de l'analyse quantitative de la **Diazinone** sont reportés dans tableau suivant (III.2):

Tableau III.2 : données de l'analyse quantitative du Diazinone (agent intoxicant) et Prazepam (standard interne).

<i>Composé</i>	<i>Tr (min)</i>	<i>Aire de pic</i>	<i>Masse de composé (mg)</i>
Diazinone (agent intoxicant)	14.58	50418	?
Prazepam (standard interne)	29.14	5045	?

1.2- Hydrolyse enzymatique + extraction avec tampon :

a- Analyse qualitative de l'échantillon 3' :

Après analyse par CPG/SM de l'échantillon 3' (hydrolyse enzymatique + extraction avec tampon) dans les mêmes conditions que précédemment ; le chromatogramme obtenu (figure III.5) présente 38 pics les plus abondants sortent au tr=14.26 ; 17.69 ; 30.31 ; 6.42 ; 26.69 ; 21.08 ; 11.46min.

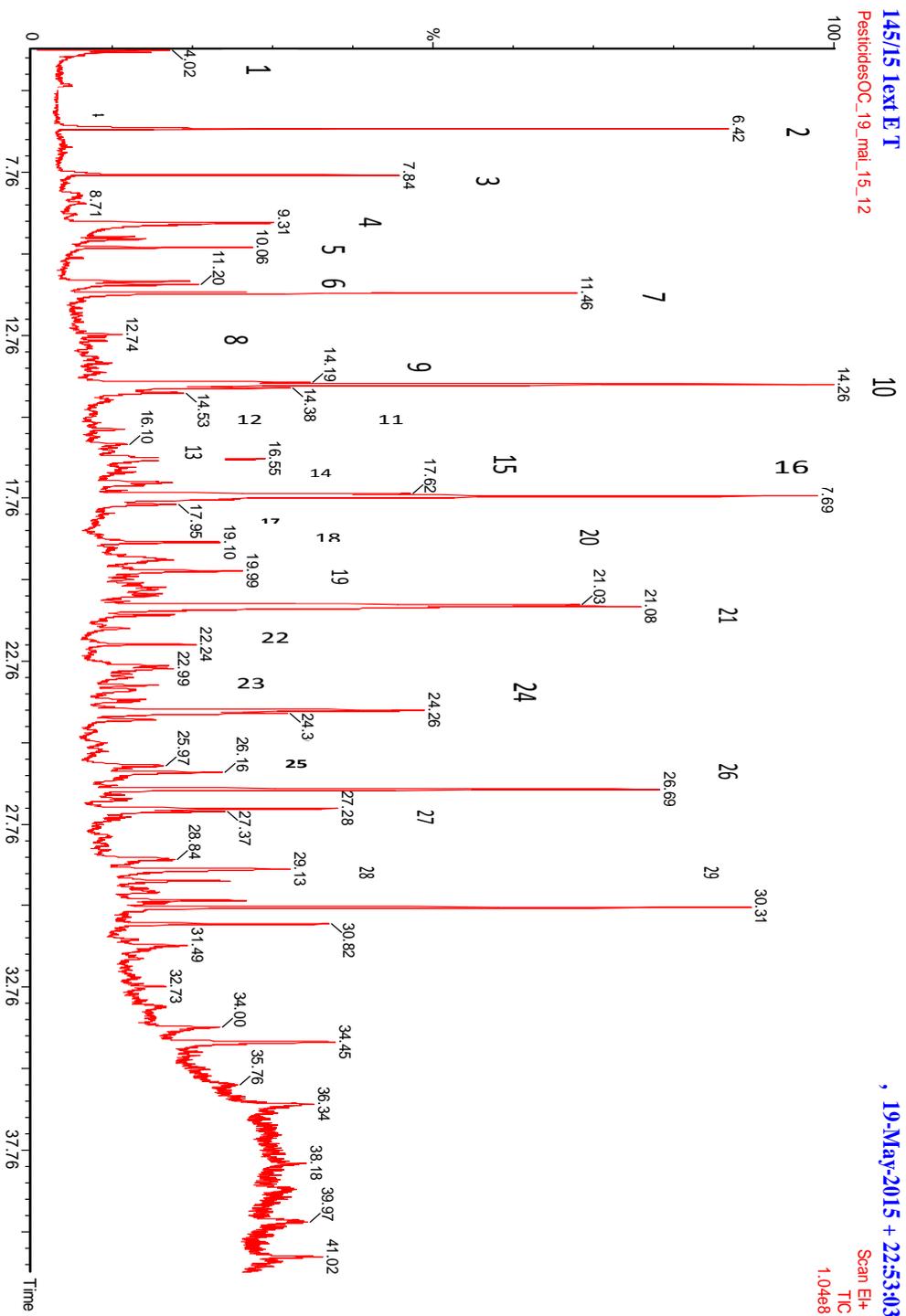


Figure III.5 : Chromatogramme de l'échantillon 3' (hydrolyse enzymatique avec tampon d'extraction).

Les résultats d'analyse du chromatogramme d'échantillon **3'** (hydrolyse enzymatique avec tampon d'extraction, figure III.3) sont regroupés dans le tableau III.3.

Tableau III.3 : Résultats d'analyse CPG/SM du chromatogramme **3'** (hydrolyse enzymatique avec tampon d'extraction)

<i>N° de pics</i>	<i>Temps de rétention (min)</i>	<i>Composés</i>
1	4.02	Ribitole
2	7.84	Cyclo-hexasiloxane-dodecamethyl
3	8.71	Nicotine
4	9.31	Cyclohexanone-1- methanol
5	10.06	Phenol 2,4- dimethyle
6	11.20	Nonadecane
7	11.46	Phenol 4-tetramethyl butyl
8	12.47	Propanoic acid (trimethyl-1,4- dioxane) methyl ester
9	14.19	Tetradecene
10	14.26	1-hexadecanol
11	14.83	Nonadecanone
12	16.10	Ethyle allcholite
13	16.56	Hexadecanoic acid - methyl
14	17.69	Docasene
15	19.10	Pyrolidine 1,5-diméthyle-3,3-diphényle-2- ethylidene
16	19.99	Heptadecannoic acid –méthyl ester
17	21.08	Docasene
18	22.24	Nonedecanoic acid-trimethylsilyl ester
19	24.26	Pentatriacontene
20	25.97	Androst 3- formyloxy
21	26.16	Androstan-3- hydroxy
22	26.69	Diphenyl methylsilyloxydecane
23	27.28	Pentatriacontene
24	29.13	Prazepam
25	30.82	Decandioic acid
26	39.97	Glycerol trimethyl silyl ether

D'après les données du tableau (III.3) relatives au chromatogramme 3' (figure III.5), il s'avère que le composé responsable de l'intoxication est la **nicotine**. Ce dernier est caractérisé par son $t_r=8.71$ min et son spectre de masse illustré sur la figure III.6, dont les pics de base et pics caractéristiques sont : 84.0216 ; 161.1382 ; 133.1039.

145/15 text E T

PesticidesOC_19_mai_15_12_1062 (8.438)

, 19-May-2015 + 22:53:03

Scan EI+
8.77e5

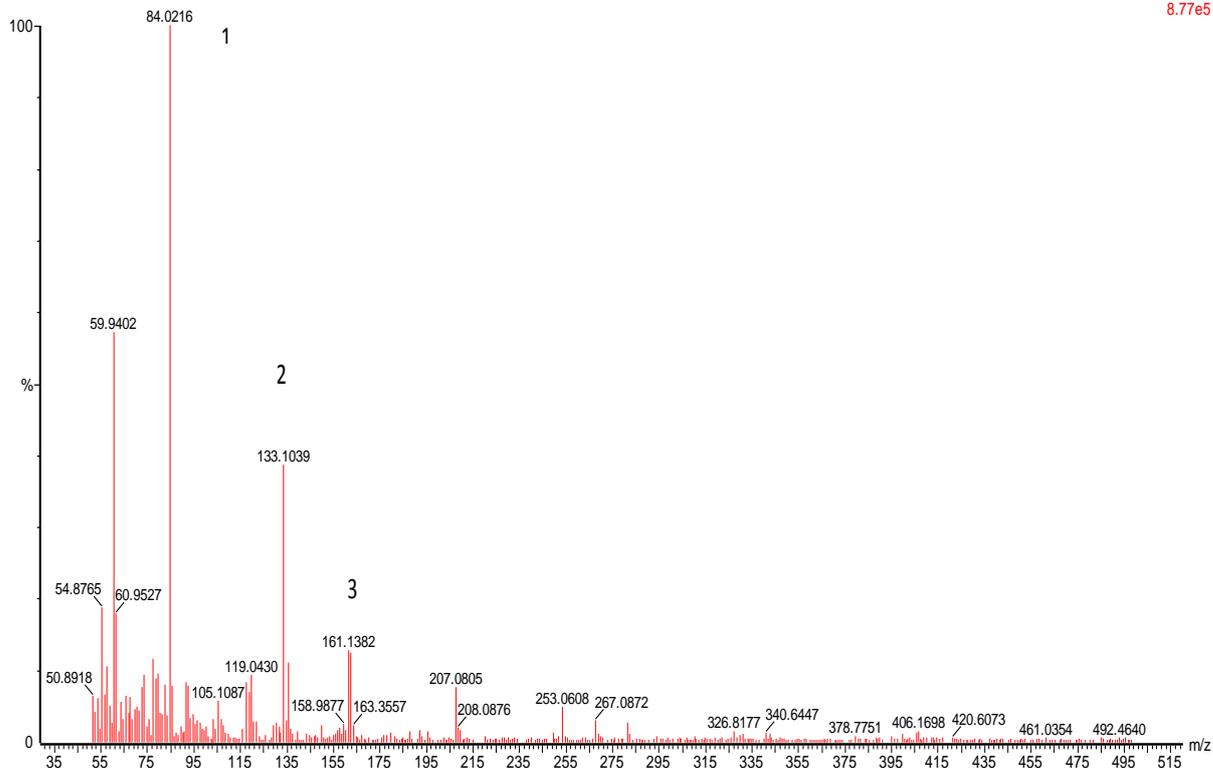


Figure III.6 : Spectre de masse de la nicotine

Le mécanisme de fragmentation probable peut être expliqué par les fragments suivants :

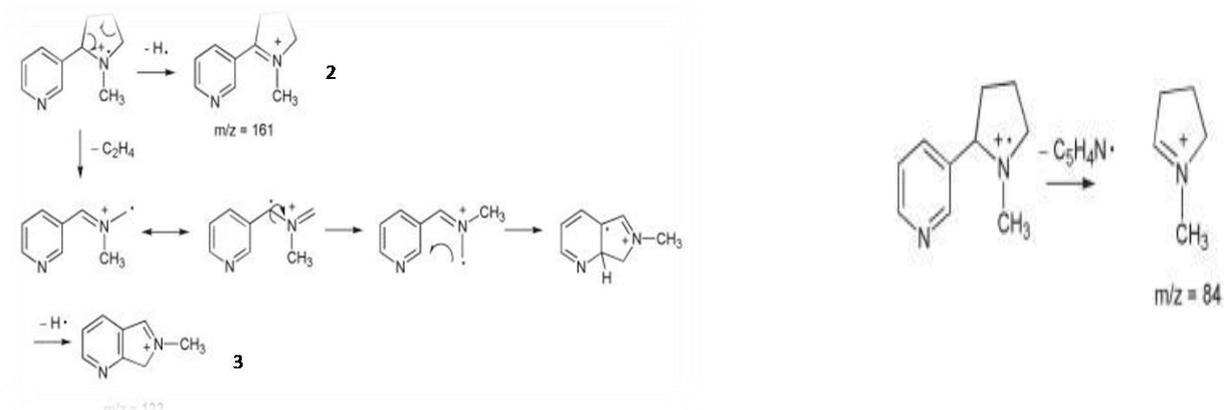


Figure III.7: Mécanisme de fragmentation de la nicotine par SM [28]

b- Analyse quantitative de l'échantillon 3' :

Pour déterminer la quantité du toxicant, nous nous sommes intéressés au calcul de la surface du pic cible « **Nicotine** » $tr=8.71$ min (figure III.8-a) et à celui d'étalon interne « **Prazepam** » au $tr=29.13$ min (figure III.9-b)

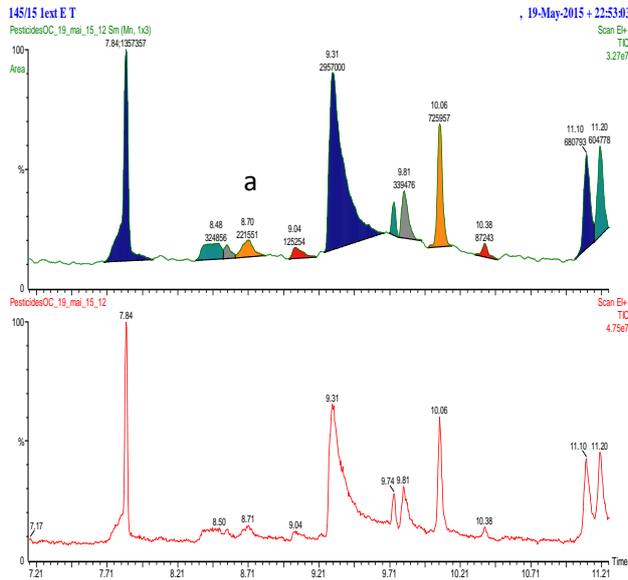


Figure III.8: Chromatogramme de surface de la nicotine

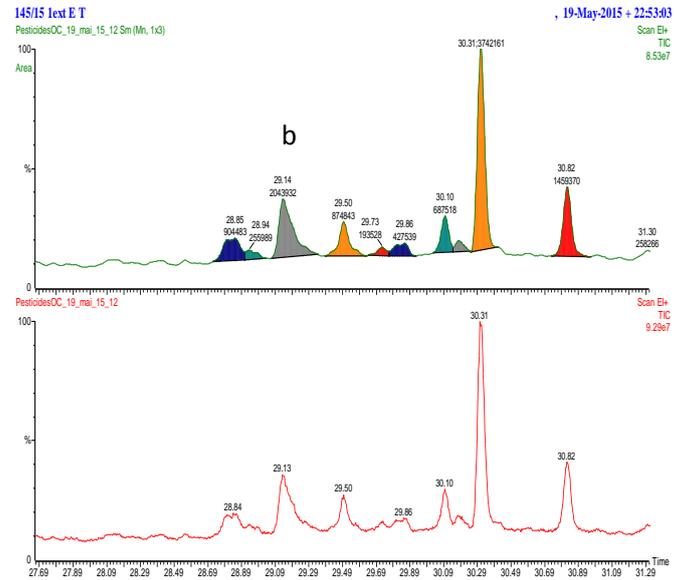


Figure III.9 : Chromatogramme de surface de Prazepam

Les résultats issus de l'analyse quantitative sont reportés dans le tableau III.4.

Tableau III.4 : Résultats de l'analyse quantitative par CPG/SM de la Nicotine (agent intoxicant) et Prazepam (standard interne)

Composé	tr (min)	Aire de pic	Masse de composé (mg)
Nicotine (agent intoxicant)	8.71	221551	?
Prazepam (standard interne)	29.14	2043932	?

2- Hydrolyse acide :

a- Analyse qualitative de l'échantillon 7'' :

Le chromatogramme de l'échantillon 7'' (hydrolyse acide) est illustré en fig.III.10, et présente 25 pics dont celui le plus abondant est au $t_r = 7.44$ min, suivi de celui au $t_r = 7.48$ min, $t_r = 8.49$ min et 17.98 min

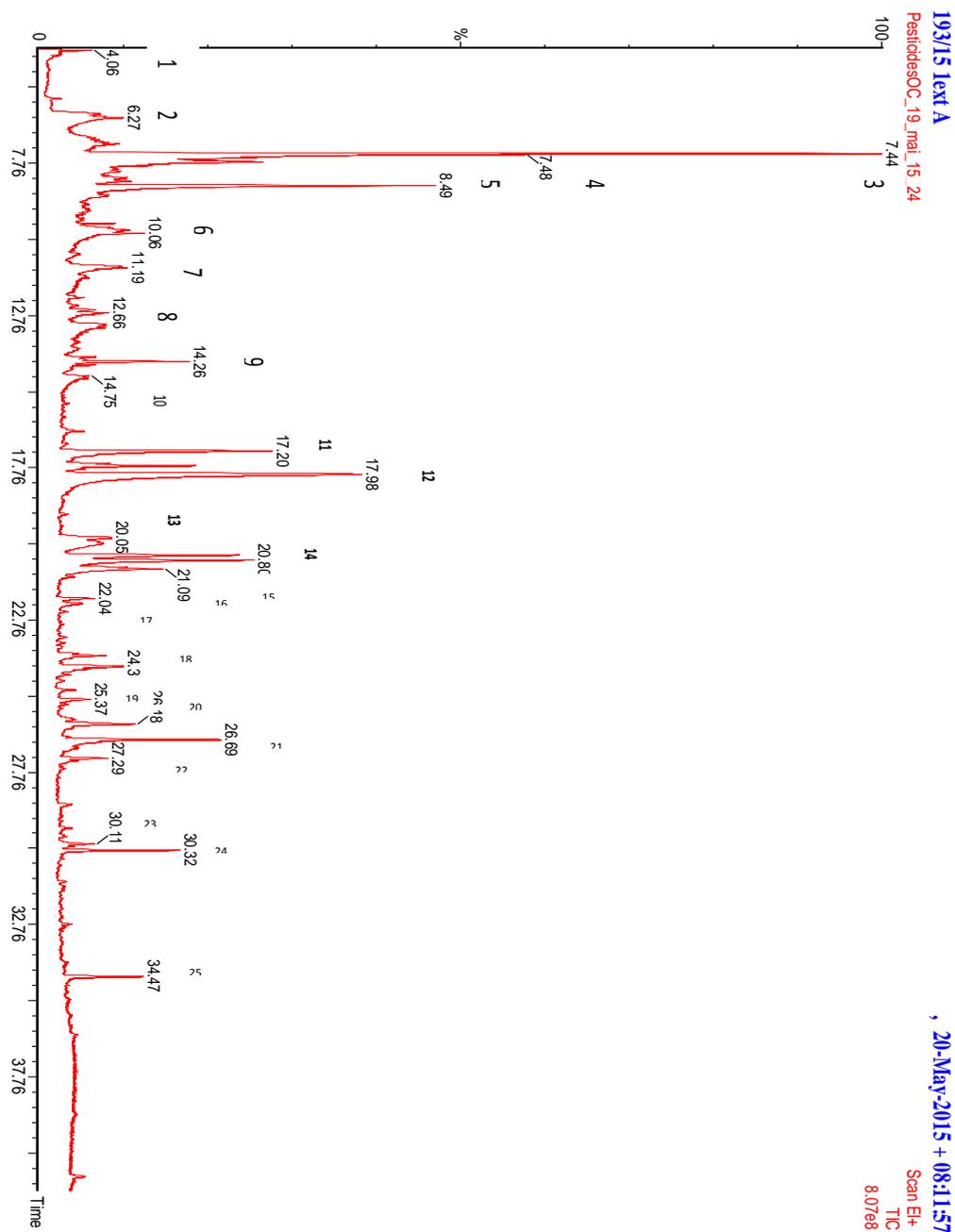


Figure III.10: Chromatogramme de l'échantillon 7'' (avec hydrolyse acide)

Les résultats d'analyse du chromatogramme d'échantillon 7'' avec hydrolyse acide (figure III.3) sont regroupés dans le tableau suivant.

Tableau III.5 : Résultats d'analyse CPG/SM du chromatogramme d'échantillon 7'' (hydrolyse acide).

N° de pic	Temps de rétention (min)	Composés
1	4.06	Ribitole
2	6.27	Cyclo pentasiloxane decamethyl
3	7.44	Cyclo hexasiloxane dodecamethyl
4	7.48	Cyclo hexasiloxane dodecamethyl
5	8.49	Benzene acetique acid α - ethyle
6	10.06	Phenol 2,4- dimethyl ethyl
7	12.66	Propanoic acid (trimethyl - 1,4-dioxane) methyl ester
8	14.27	1- hexadecanol
9	14.75	2-hexanyl benzoate
10	17.20	n-hexadecanoic acid
11	17.98	Phénobarbital
12	20.05	Propanoic acid
13	20.70	Propanoic acid
14	20.80	Propanoic acid
15	21.09	Docasene
16	22.04	Nonedecanoic acid trimethyl silyl ester
17	24.30	Pentatriacontene
18	25.37	Androst 3- formyloxy
19	26.18	Androst 3 hydroxy

20	26.69	Diphenyl methyl silyloxy decane
21	27.29	Pentatriacontene
22	30.11	Pentatriacontene
23	30.32	Decandioic acid ,bis(2-ethylhexyl) ester
24	34.47	Cholestérol

D'après le tableau (III.5) le composé responsable d'intoxication est le **Phénobarbital** détecté au $t_r=17.98\text{min}$ par CPG et identifié aussi par son spectre de masse illustré en fig.III.11, dont le pic de base est à 204.0692 et pics caractéristiques sont : 232 ; 231.9859 ; 233.1270

193/15 text A

PesticidesOC_19_mai_15_24 3346 (17.962)

, 20-May-2015 + 08:11:57

Scan E1+
5.05e7

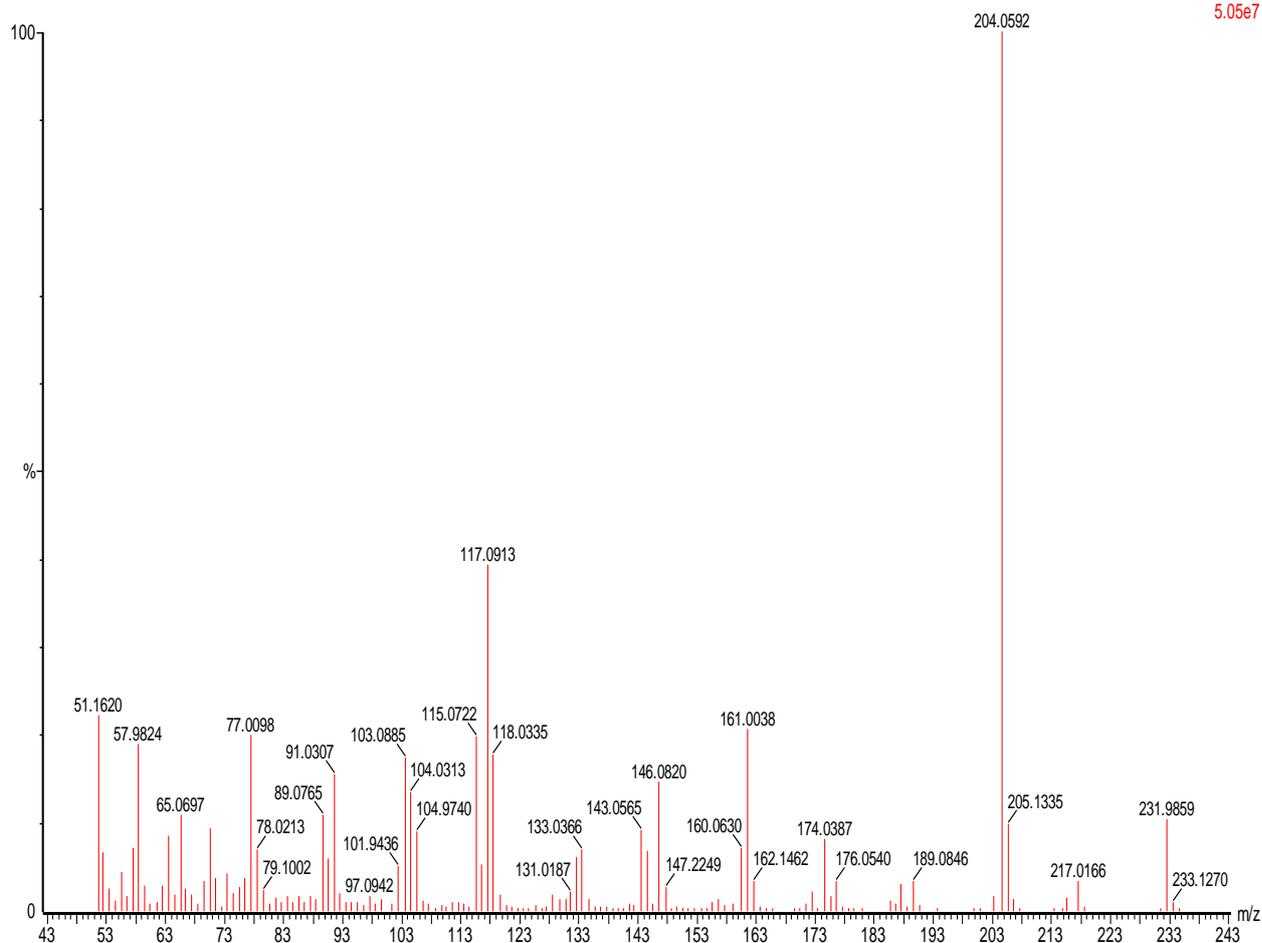


Figure III.11: Spectre de masse de phénobarbital.

b- Analyse quantitative de l'échantillon 7'' :

Pour déterminer la quantité du toxicant, on utilise le chromatogramme illustrant les surfaces des pics (figure III.12) on déterminant les surfaces de la « **Phénobarbital** » et d'étalon interne « **Prazepam** »

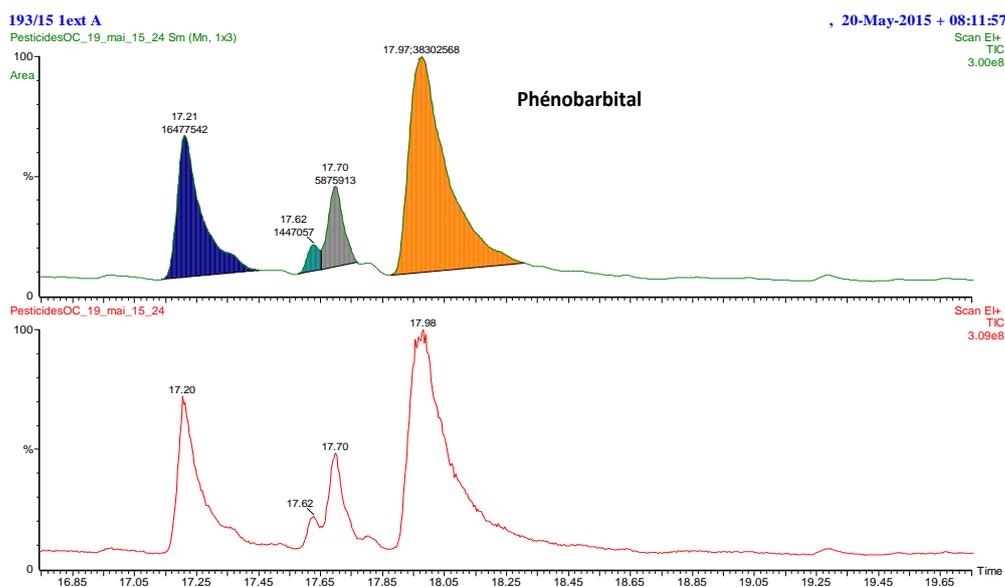


Figure III.12: Une partie du chromatogramme illustrant la surface de pic du phénobarbital au $t_r=17.98\text{min}$

Les résultats du chromatogramme III.12 sont reportés dans le tableau suivant :

Tableau III.6 : Résultats de chromatogramme illustrant la surface de phénobarbital.

Composé	Tr (min)	Aire de pic	Masse de composé (mg)
Phénobarbital	17.98	17.97 ; 3830	?

II- comparaison des résultats

1- Comparaison des résultats de trois échantillons hydrolysés par les trois méthodes différentes

L'ensemble des résultats obtenus pour les trois échantillons est regroupé dans le tableau III.7 suivant.

Tableau III.7 : Comparaison des résultats d'hydrolyses de trois types d'échantillon par trois méthodes (hydrolyse enzymatique avec et sans tampon d'extraction et hydrolyse acide)

Tr (min)	composés	Hydrolyse enzymatique		Hydrolyse acide
		Echantillon 1	Echantillon 3'	Echantillon 7''
4.02 4.06	Ribitol	-	+	+
4.10	Silan de methyl	+	-	-
5.08	Cyclotetrasiloxane octamethyl	+	-	-
6.27 6.42	Cyclo pentasiloxane decamethyl	-	+	+
7.44 7.84	Cyclo hexasiloxane dodecamethyl	-	+	+
8.49	Benzen acetic acid α ethyl	-	-	+
8.71	Nicotine	-	+	-
9.06	β eudesmol trimethyl silyl ether	+	-	-
9.39 9.31	Cyclohexanone 1-methanol	+	+	-
10.06 10.07	Phenol 2,4- dimethyl ethyl	+	+	+
12.47 12.66	Propanoic acid (trimethyl-1,4- dioxane) methyl ester	-	+	+
14.27	1- Hexadecanol	+	+	+

14.58	Diazinone	+	-	-
14.82 14.83	Nonadecanone	-	+	+
16.10	Ethyl allcholate	-	+	-
16.55 16.56	Hexadecanone- acid methyl	+	+	-
17.68 17.69	Docasene	+	+	-
17.98	Phenobarbital	-	-	+
19.10	Pyrolidine 1,5-dimethyl - 3,3- diphenyl -2- ethylidene	-	+	-
19.62	Octadecadecanoyl chloride	+	-	-
19.99	Heptadecanoic acid methyl ester	-	+	-
20.47 20.80	Propanoic acid	+	-	+
21.09 21.08 21.07	Docasene	+	+	+
44.04 22.24	Nonadecanoic acid trimethyl silyl ester	-	+	+
24.26 24.30 24.54	Pentatriacontene	+	+	+
25.37 25.97	Androst 3 formyloxy	-	+	+
26.16 26.18	Androst 3 hydroxy	-	+	+
26.67 26.69	Diphenyl methyl silyloxy decane	+	+	+
29.13	Prazepam	+	+	-

30.32	Decane dioic acid	+	+	+
33.97	Cholesterol	+	+	+
34.47				

(+) présence, (-) absence.

La comparaison entre les résultats d'analyse des 3 échantillons hydrolysés a montré une différence qui se base sur les composés responsables de l'intoxication (le **Diazinone**, la **Nicotine** et le **Phénobarbital**) en plus quelques impuretés qui diffèrent de l'urine d'un patient à l'autre.

2- Comparaison des résultats d'analyse des sept échantillons étudiés:

L'ensemble des résultats d'analyse des 7 échantillons hydrolysés avec les trois méthodes sont rassemblés aux tableaux suivants :

Tableau III.8 : Résultats des 7 échantillons étudiés avec hydrolyse enzymatique sans tampon d'extraction

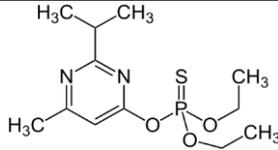
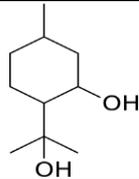
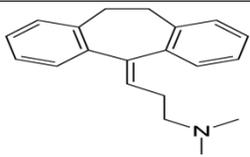
<i>Echantillon analysé</i>	<i>Temps de rétention (min)</i>	<i>Composés</i>	<i>Formule brute</i>	<i>Masse molaire (g/mol)</i>	<i>Structure du composé</i>
1	14.57	Diazinone	$C_{12}H_{21}N_2O_3PS$	304.346	
2	-	-	-	-	-
3	9.28	Trans-p-mentha diol	$C_{10}H_{20}O_2$	172.27	
4	-	-	-	-	-
5	22.04	Amitryptiline	$C_{20}H_{23}N$	277.4033	
6	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-

Tableau III.9 : Temps de rétention (CPG/SM) et structures chimiques des composés responsables de l'intoxication lors de l'hydrolyse par β -glucuronidase + tampon

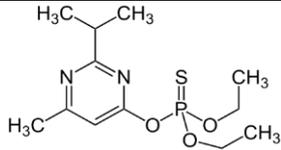
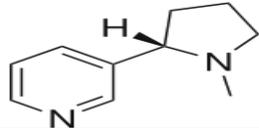
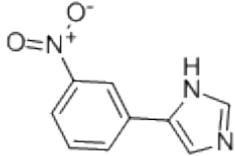
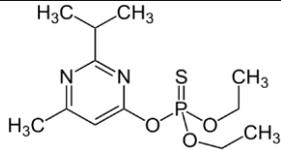
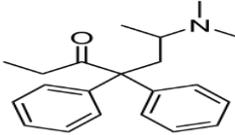
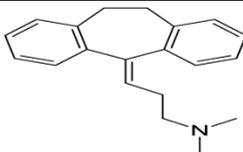
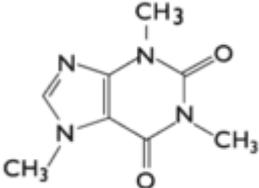
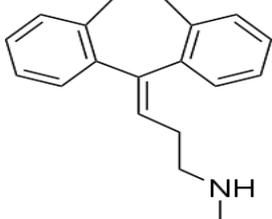
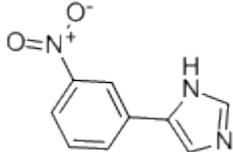
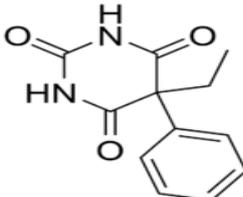
<i>Echantillon analysé</i>	<i>Temps de rétention (min)</i>	<i>composés</i>	<i>Formule brute</i>	<i>Masse molaire (g/mol)</i>	<i>structure du composé</i>
1	14.57	Diazinone	C₁₂H₂₁N₂O₃PS	304,346	
2	-	-	-	-	-
3	8.43	Nicotine	C₁₀H₁₄N₂	162.2316	
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	5.63	Méthyl-nitro phenyl imidazole pyridine	C₉H₇N₃O₂	189	
7	-	-	-	-	-

Tableau III.10: Résultats des 7 échantillons étudiés avec hydrolyse acide.

<i>Echantillon analysé</i>	<i>Temps de rétention (min)</i>	<i>composés</i>	<i>Formule brute</i>	<i>Masse molaire (g/mol)</i>	<i>Schéma de composé</i>
1	14.57	Diazinone	$C_{12}H_{21}N_2O_3PS$	304,346	
2	-	-	-	-	-
3	21.10	Méthadone	$C_{21}H_{27}NO$	309.4452	
4	-	-	-	-	-
5	15.70	Amitriptyline	$C_{20}H_{23}N$	277.4033	
	21.92	Cafféine	$C_8H_{10}N_4O_2$	194.1906	
	22.22	Nortriptyline	$C_{19}H_{21}N$	263.1906	
6	5.63	Méthyl- nitro phenyl imidazole pyridine	$C_9H_7N_3O_2$	189	
7	17.98	Phenobarbital	$C_{12}H_{12}N_2O_3$	232.2353	

Notre étude a porté sur sept échantillons d'urine des différents patients analysés par trois méthodes d'hydrolyse (hydrolyse enzymatique avec et sans tampon d'extraction et hydrolyse acide), et a permis de comparer entre ces méthodes pour déterminer la méthode la plus fiable.

La comparaison a montré que chaque méthode d'hydrolyse a permis de détecter un nombre de composés probablement responsables de l'intoxication.

La méthode qui a permis de détecter plusieurs toxicants est celle d'hydrolyse acide. Elle a déterminé sept composés : **Diazinone, Méthadone, Amitryptiline, Cafféine, Nortriptyline, Méthyl-nitro phenyl imidazole pyridine et Phénobarbital**. Pour s'assurer de la toxicité du composé, on doit déterminer sa quantité dans le corps et comparer les résultats avec les normes.

La méthode d'hydrolyse acide pour ces 7 échantillons n'a pas permis de détecter le pic d'étalon interne « Prazepam » et on ne peut pas déterminer la surface de pic, donc on ne peut pas savoir la quantité du composé pour la comparaison avec les normes.

On peut lier la disparition du pic de Prazepam aux conditions dures d'analyse, l'acide chloridrique à 37%, la température de chauffage (65°C) et la durée de chauffage (90min).

L'hydrolyse enzymatique avec et sans tampon d'extraction a permis de détecter les composés suivants : **Diazinone, Trans p-mentha diol, Amitryptiline, Nicotine, Méthyl nitro phenyl imidazole pyridine**. Pour s'assurer d'intoxication il faut déterminer les surfaces des pics pour le composé et l'étalon interne Prazepam afin de déterminer la quantité de l'intoxicant dans le corps.

L'Hydrolyse enzymatique avec enzyme β -Glucuronidase d'origine E. Coli permet la détection des intoxications de la famille drogues et pesticides.

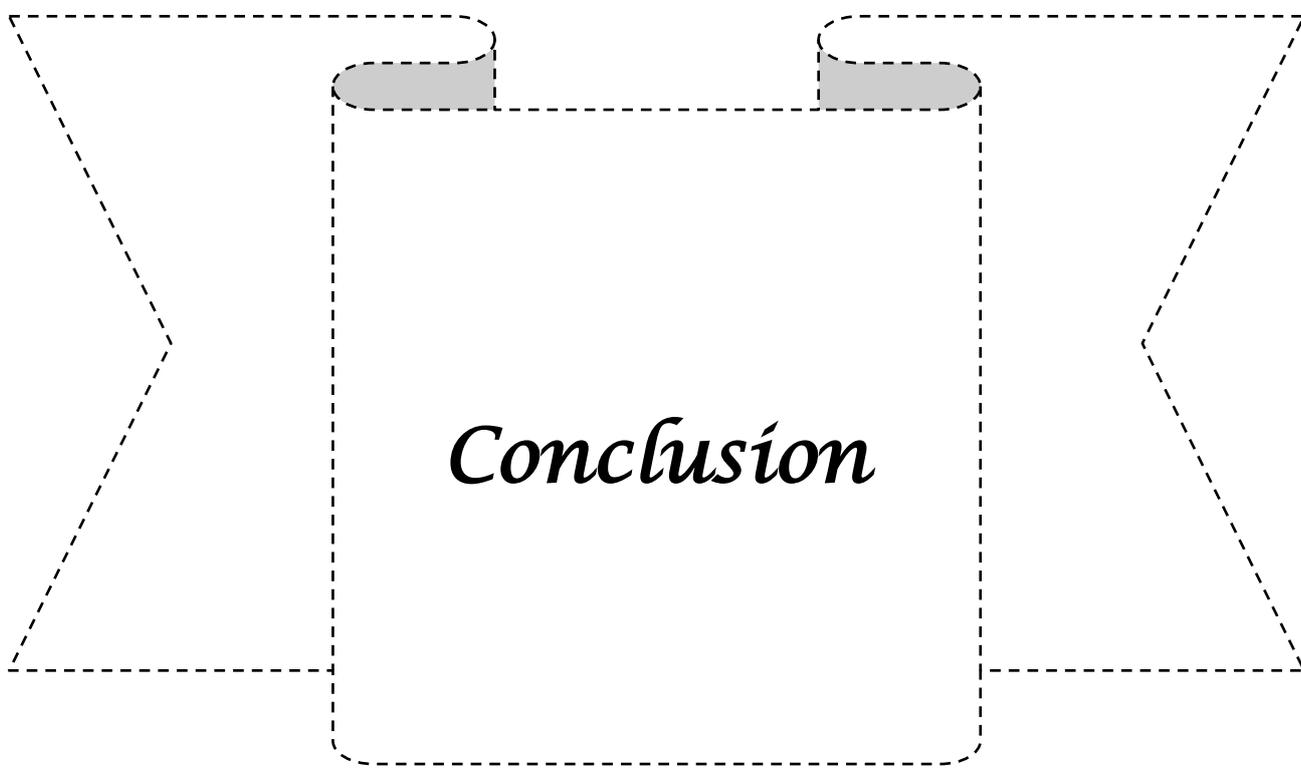
La méthode la plus fiable pour la détection des intoxications selon les résultats obtenus : hydrolyse enzymatique, plus coûteux mais permettant d'obtenir des extraits plus propres et d'éviter la dégradation des molécules (étalon interne Prazepam pour hydrolyse acide).

Conclusion du chapitre :

La comparaison entre les trois méthodes n'a pas permis de mettre en évidence la méthode qui donne des résultats plus fiable, on doit passer à l'analyse quantitative pour qu'on puisse détecter le composé responsable de l'intoxication.

La méthode qu'on peut recommandée est celle d'hydrolyse enzymatique, car elle évite la dégradation des molécules.

Afin d'avoir des résultats fiables on doit aussi choisir le type de l'enzyme β -glucuronidase convenable au type d'intoxication qu'on doit détecter (pesticides, drogues, benzodiazépines...).



Conclusion

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce travail a permis de mettre au point trois différentes méthodes d'hydrolyse pour l'identification d'intoxications dans les matrices biologiques « urine » par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

L'étude a concerné 7 échantillons différents avec des méthodes d'hydrolyse différentes et 2 méthodes d'extraction liquide-liquide avec et sans tampon.

D'après les résultats obtenus, le choix de la méthode convenable est difficile, car chaque méthode a donné un résultat différent ce qui rend leur comparaison difficile.

Afin d'enrichir ce travail, il est recommandé de chercher une méthode permettant la réalisation de l'analyse quantitative en utilisant des standards internes.

L'analyse par couplage CPG/SM a révélé la présence des composés suivants responsables de l'intoxication : **Diazinone, Trans p-mentha diol, Amitryptiline, Nicotine, Méthyl nitro phenyl imidazole pyridine, Méthadone, Cafféine, Nortriptyline, et Phenobarbital.**

RÉFÉRENCES

- **Références bibliographies :**

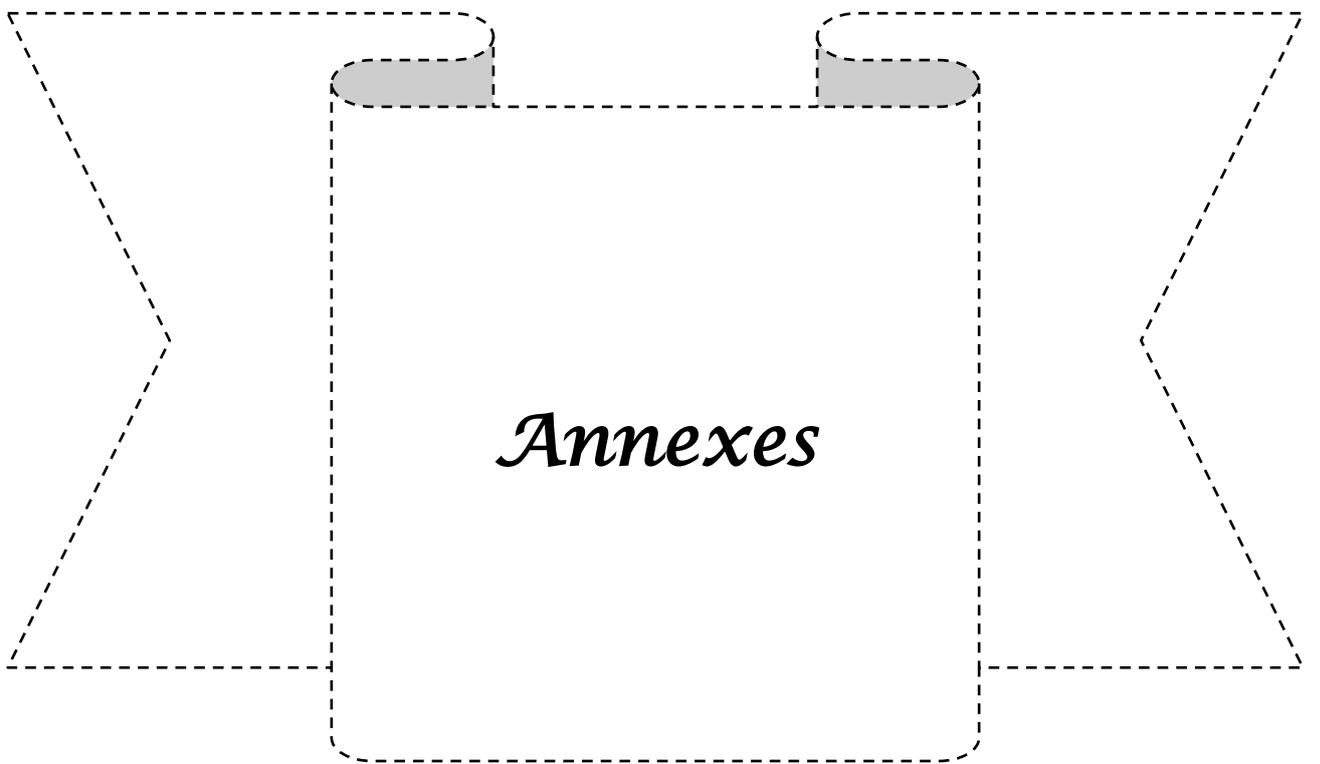
- [1] P.LHEUREUX, K MAES, R. ASKENASI. Du bon usage du laboratoire de toxicologie 1^{re} partie : aspects techniques, REVUE GENERALE, 1996,5 (2), 87-95.
- [2] VOLANS G., WIDOPP g. Laboratory investigations in acute poisoning. *Dr. Med. J.*, 1984, 289, 426-428.
- [3] BAUD F.J. -- Conduite & tenir devant les intoxications aiguës les plus fréquentes. Editions Techniques, *Encycl. Méd. Chir.* (Paris, France), Urgences 24115 A*, 1991,27 p.
- [4] FINKLE g.s. -- Drug-analysis technology: overview and state of the art. *Clin. Chem.*, 1987, 33, 13-17.
- [5] MCBAY A.J. -- Drug analysis technology. Pitfalls and problems of drug testing. *Clin. Chem.*, 1987, 33, 33-40.
- [6] WEISMAN R., HOWLAND M.A. -- The toxicology laboratory. *Top Emerg. Med.*, 1983, 4, 9.
- [7] DEOM A. -- L'intoxication d'origine inconnue : l'apport du laboratoire pour le clinicien. *Ther. Umsch.* 1986, 43, 259-268.
- [8] R. A. de Zeeuw, Recent developments in analytical toxicology: for better or for worse, *Toxicology Letters*, 1998, 102-103: 103-108.
- [9] New Trends in Information Science and Service Science (NISS), 2010 4th International Conference
- [10] Runde, C. E. & Flanagan, T. A. *Becoming a conflict competent leader: how you and your organization can manage conflict effectively.* San Francisco, CA: Jossey-Bass (2007).
- [11] P. Kintz Préface du professeur R. Wennig .*Traité de toxicology médico- judiciaire,* Elsevier Masson, 2012, 117-185.

- [12] H. H. Maurer, Position of chromatic techniques in screening for detection of drugs or poisons in clinical and forensic toxicology and/or doping control, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2004, 42: 11, 1310-1324.
- [13] D. T. Rossi, N. Zhang, Automating solid-phase extraction: current aspects and future prospects, *J. Chromatogr. A*, 2000, 885: 97-113.
- [14] Kintz P. Soumission chimique : Prise en charge toxicologique. Consensus de la Société Française de Toxicologie Analytique. *Ann Toxicol Anal* 2003; 15: 239-42.
- [15] Cirimele V, Etienne S, Villain M, et al. Evaluation of the One-Step ELISA kit for the detection of buprenorphine in urine, blood, and hair specimens. *Forensic Sci Int* 2004; 143: 153-6.
- [16] Brunet B, Papet Y, Mura P. Préparation d'échantillons pour analyses en immunochimie. *Ann Toxicol Anal* 2010 ; 22 : 69-74.
- [17] Wenk M, Droll A, Krähenbühl S. Fast and reliable determination of the antifungal drug voriconazole in plasma using monolithic silica rod liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006; 832: 313-6.
- [18] Wenk M, Haegeli L, Brunner H, Krähenbühl S. Determination of furosemide in plasma and urine using monolithic silica rod liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 2006; 41: 1367-70.
- [19] Viette V, Guillarme D, Mylonas R, et al. A multi-target screening analysis in human plasma using fast liquid chromatography-hybrid tandem mass spectrometry (Part I). *Clin Biochem* 2011; 44: 32-44.
- [20] Remane D, Meyer MR, Wissenbach DK, Maurer HH. Ultra high performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric multi-analyte procedure for target screening and quantification in human blood plasma: validation and application for 31 neuroleptics, 28 benzodiazepines, and Z-drugs. *Anal Bioanal Chem* 2011; 261: 5187-9.
- [21] Pujol M-L, Cirimele V, Tritsc PJ, et al. Evaluation of the IDS One-Step ELISA kits for the detection of illicit drugs in hair. *Forensic Sci Int* 2007; 170: 189-92.
- [25] Wenk M, Droll A, Krähenbühl S. Fast and reliable determination of the antifungal drug voriconazole in plasma using monolithic silica rod liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006; 832: 313-6.

- [26] A. Poletti, Systematic toxicological analysis of drugs and poisons in biosamples by hyphenated chromatographic and spectroscopic techniques, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 1999, 733: 47-63.
- [27] Identification of Photocatalytic Degradation Products of Diazinon in TiO₂ Aqueous Suspensions Using GC/MS/MS and LC/MS with Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry
- [28] D. F. Glenn, W. P. Edwards III, "Synthesis and mass spectrometry of some structurally related nicotinoids" *J. Org. Chem.* 1978, 43, 2860–2870.

• **Références Webographies :**

- [22] <http://www.123bio.net/cours/chromato/gaz.html>
- [23] http://www.doping.chuv.ch/lad_home/lad-prestations-laboratoire/lad-prestations-laboratoire-appareils/lad-prestations-laboratoire-appareils-ms.htm
- [24] <http://cbm.cnrs-orleans.fr/?rubrique94>

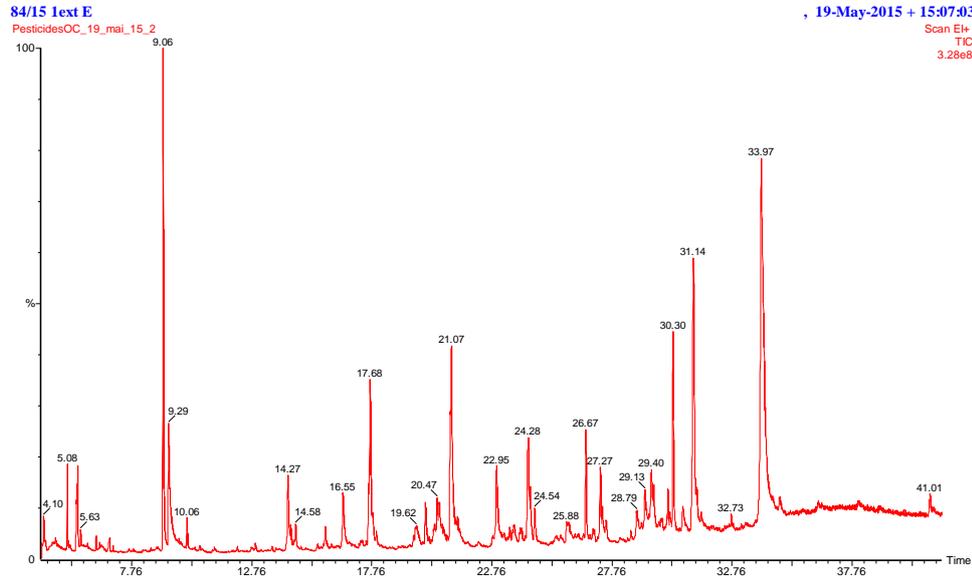


Annexes

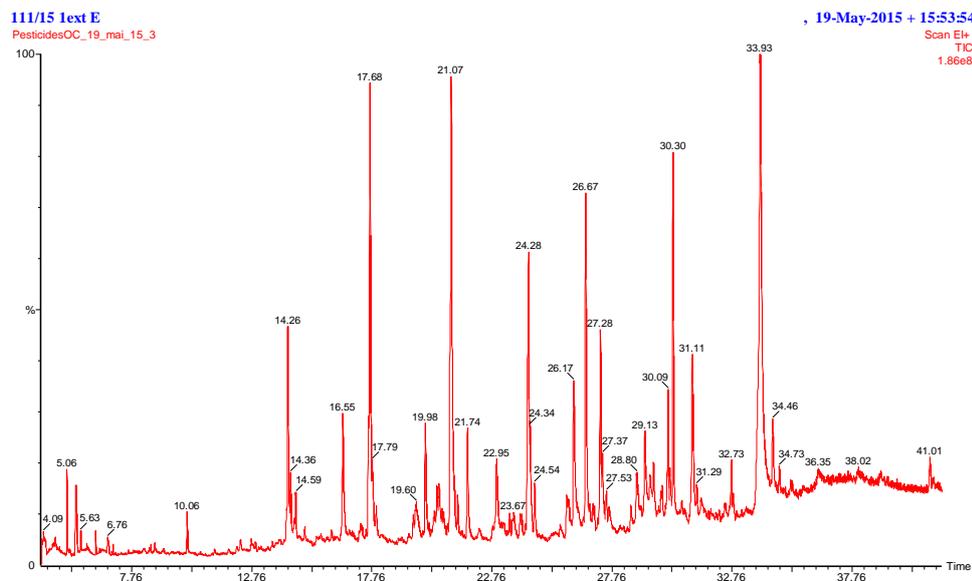
Annexe 1

Annexe 1 : Différents chromatogramme de l'hydrolyse enzymatique (extraction sans tampon)

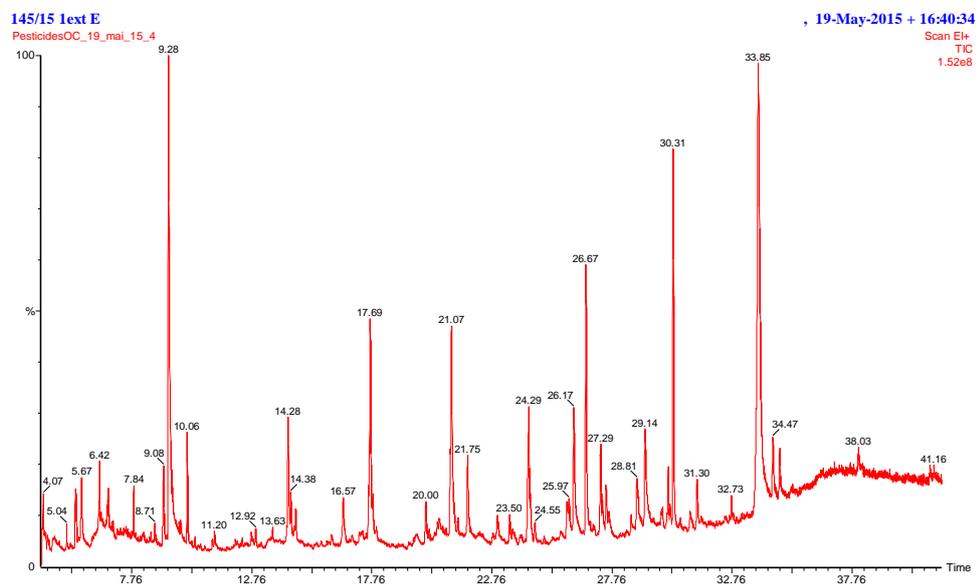
Echantillon 1



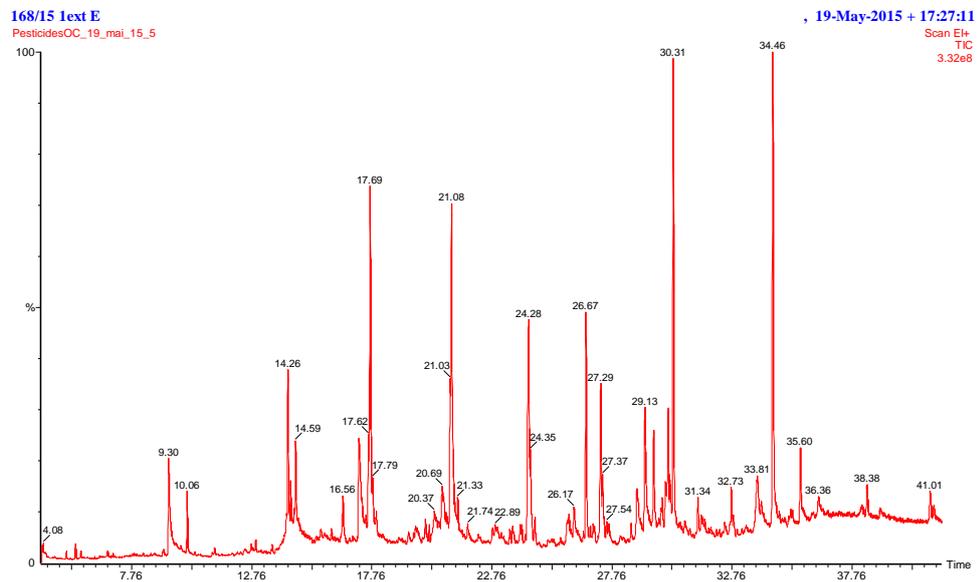
Echantillon 2



Echantillon 3



Echantillon 4



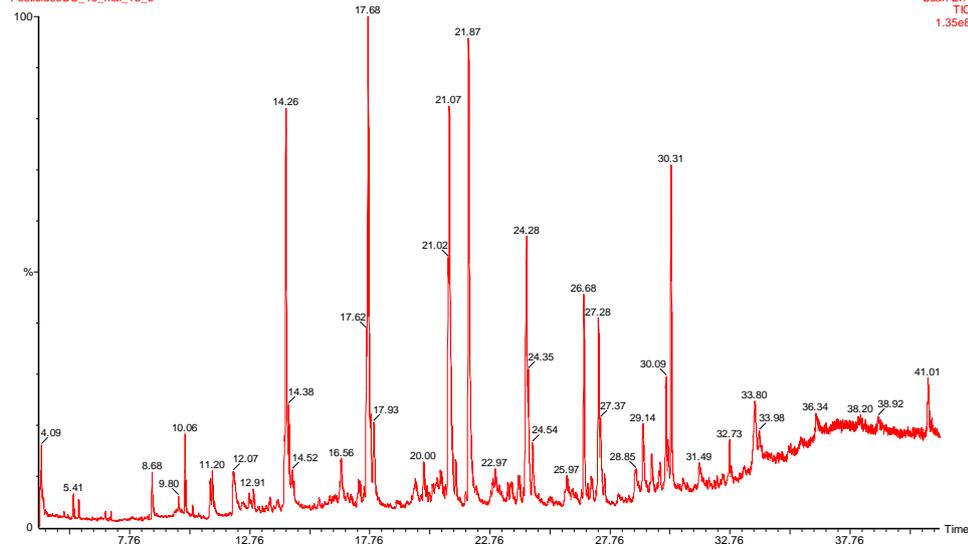
Echantillon 5

181/15 Text E

PesticidesOC_19_mai_15_6

, 19-May-2015 + 18:13:47

Scan E1-
TIC
1.35e8



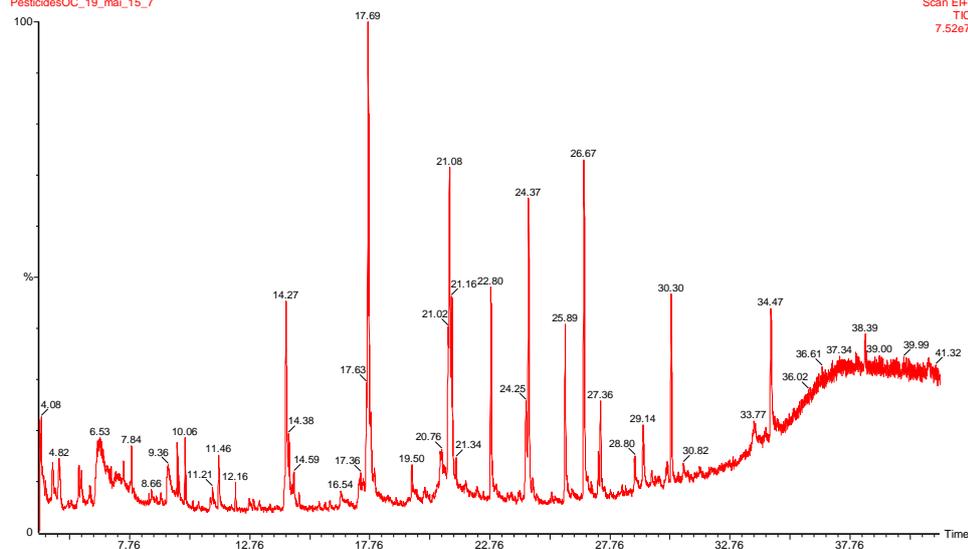
Echantillon 6

183/15 Text E

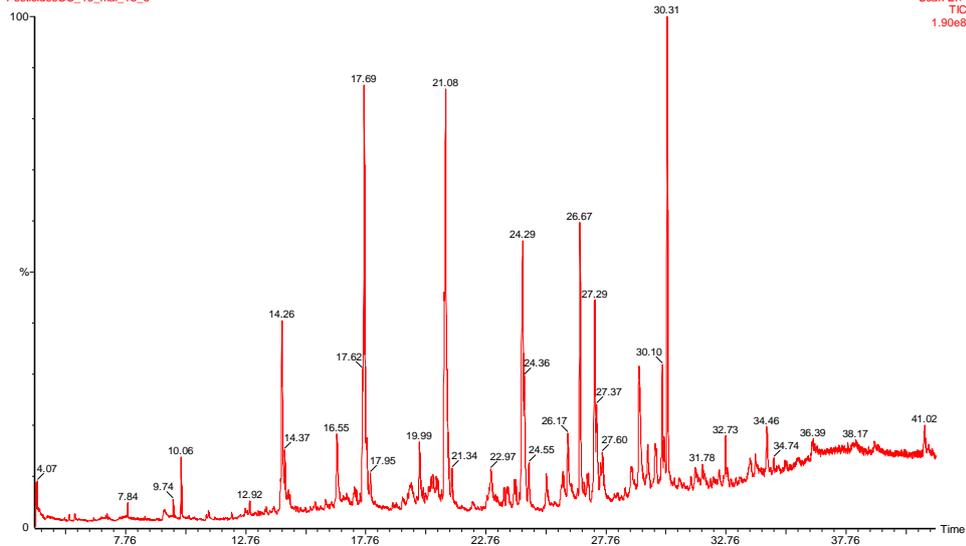
PesticidesOC_19_mai_15_7

, 19-May-2015 + 19:00:21

Scan E1-
TIC
7.52e7



Echantillon 7



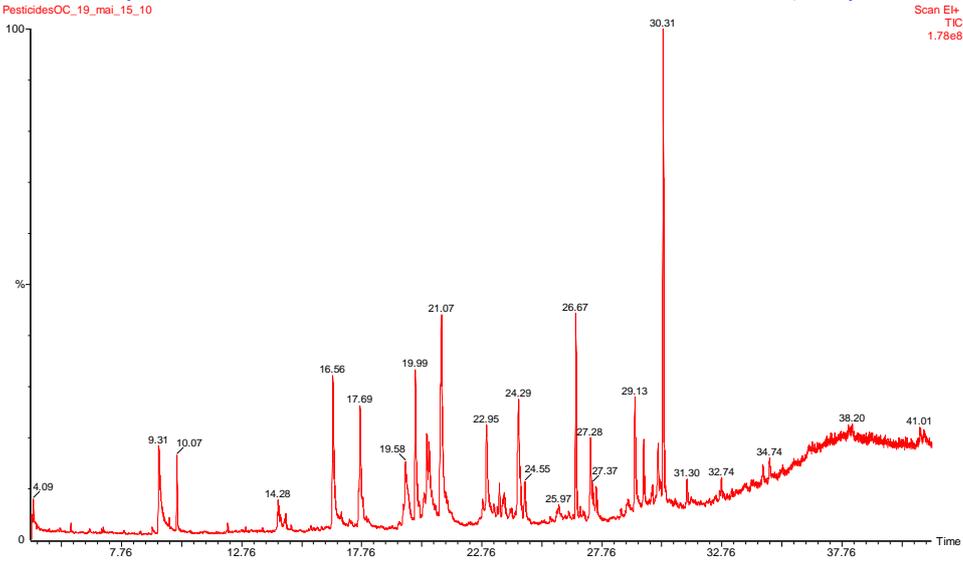
Annexe 2

Annexe 2 : Différents chromatogramme de l'hydrolyse enzymatique (extraction avec tampon)

Echantillon 1'

84/15 Iext E T -enzyme et extraction B
PesticidesOC_19_mai_15_10

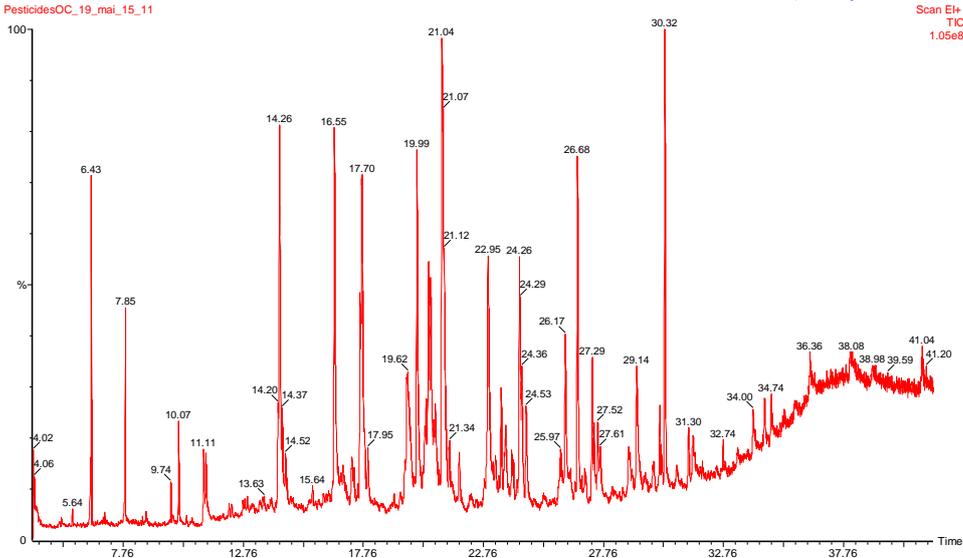
, 19-May-2015 + 21:19:59



Echantillon 2'

111/15 Iext E T
PesticidesOC_19_mai_15_11

, 19-May-2015 + 22:06:31



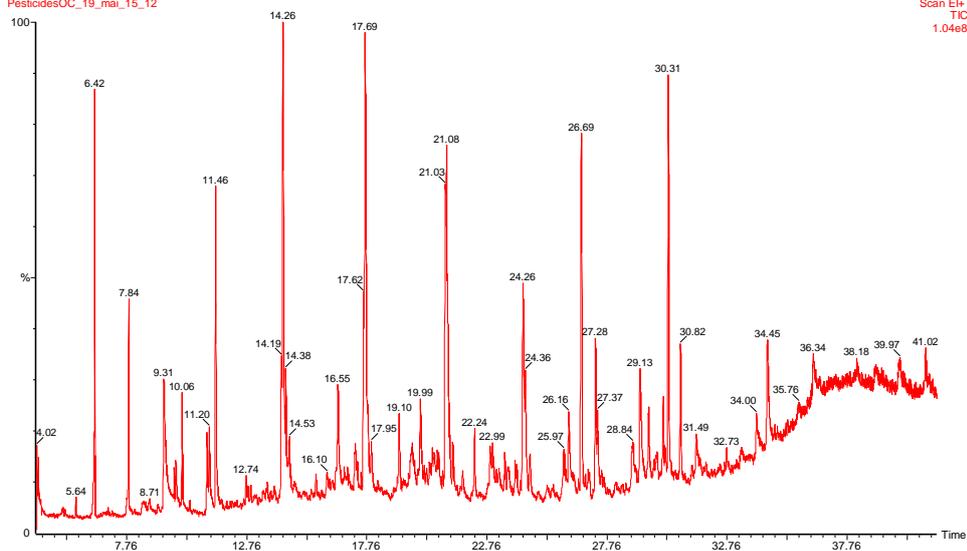
Echantillon 3'

145/15 1ext E T

PesticidesOC_19_mai_15_12

, 19-May-2015 + 22:53:03

Scan E1+
TIC
1.04e8



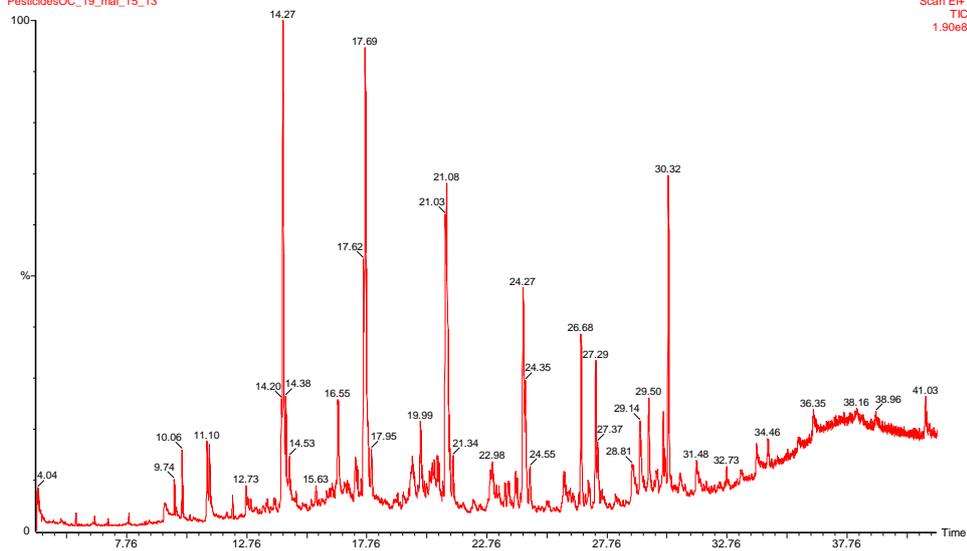
Echantillon 4'

168/15 1ext E T

PesticidesOC_19_mai_15_13

, 19-May-2015 + 23:39:35

Scan E1+
TIC
1.90e8

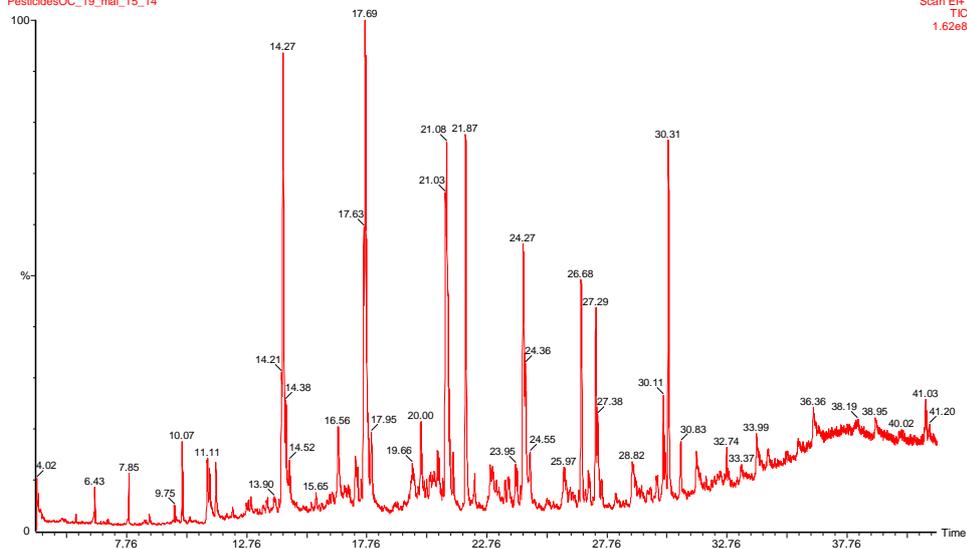


Echantillon 5'

181/15 1ext E T
PesticidesOC_19_mai_15_14

, 20-May-2015 + 00:26:07

Scan E1+
TIC
1.62e8

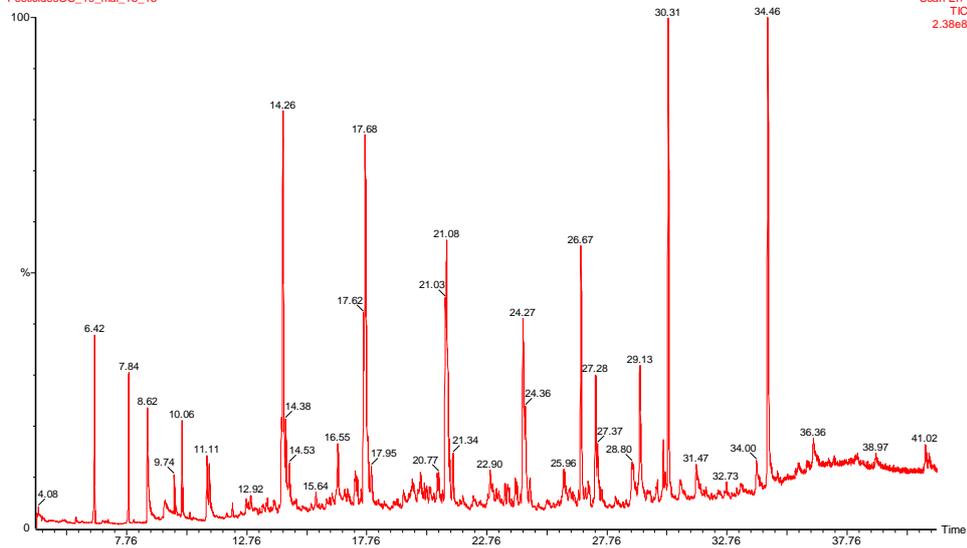


Echantillon 6'

183/15 1ext E T
PesticidesOC_19_mai_15_15

, 20-May-2015 + 01:12:40

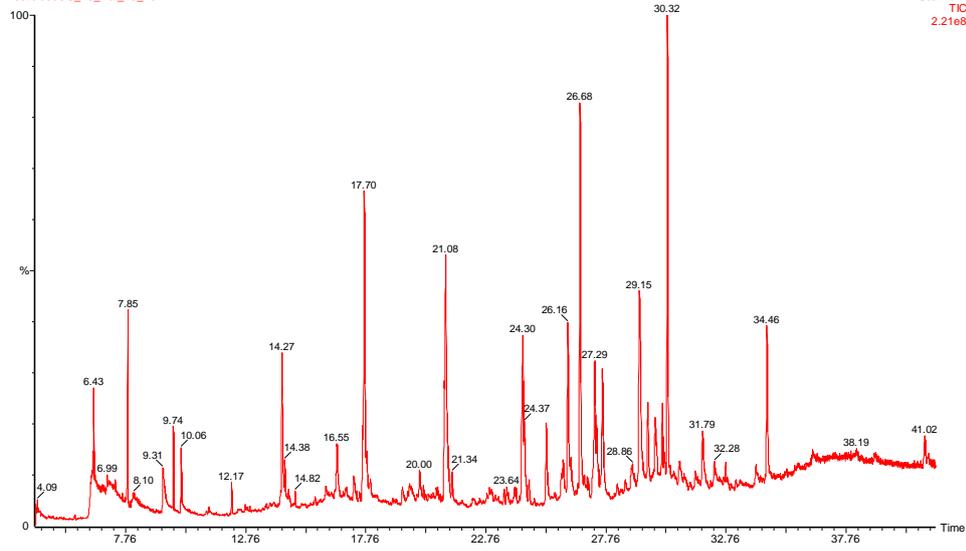
Scan E1+
TIC
2.38e8



Echantillon 7'

193/15 test E T
PesticidesOC_19_mai_15_16

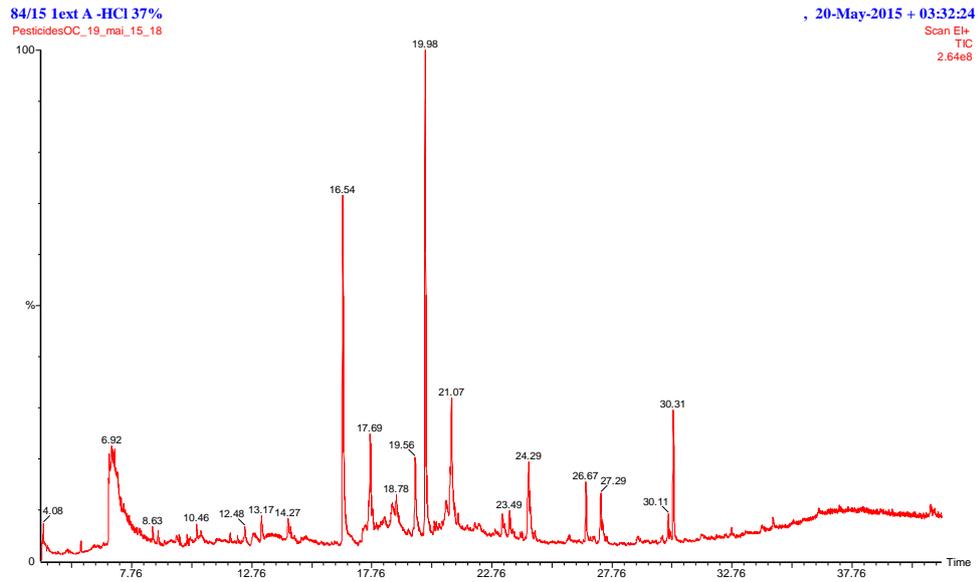
, 20-May-2015 + 01:59:12
Scan EV
TIC
2.21e8



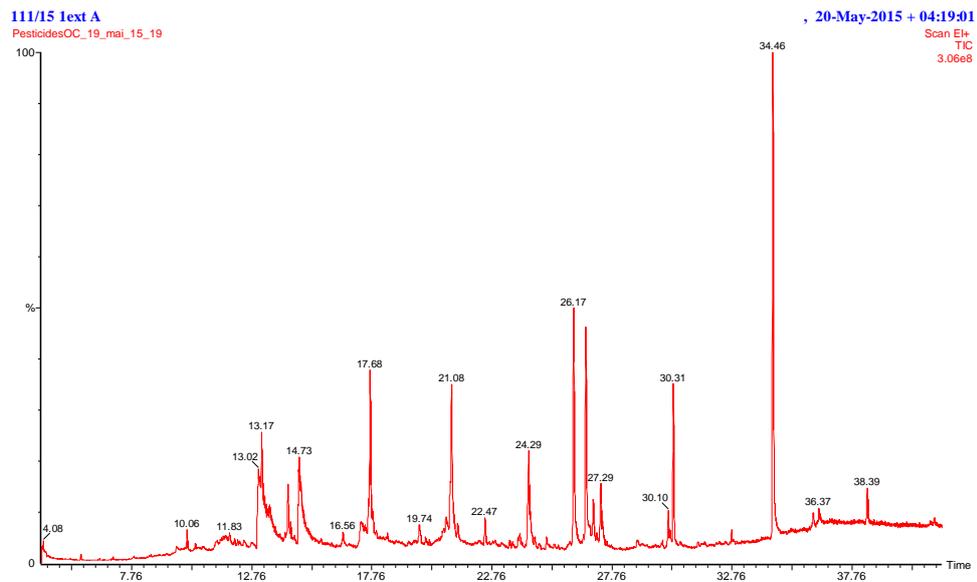
Annexe 3

Annexe 3: Différents chromatogramme de l'hydrolyse acide

Echantillon 1''



Echantillon2''

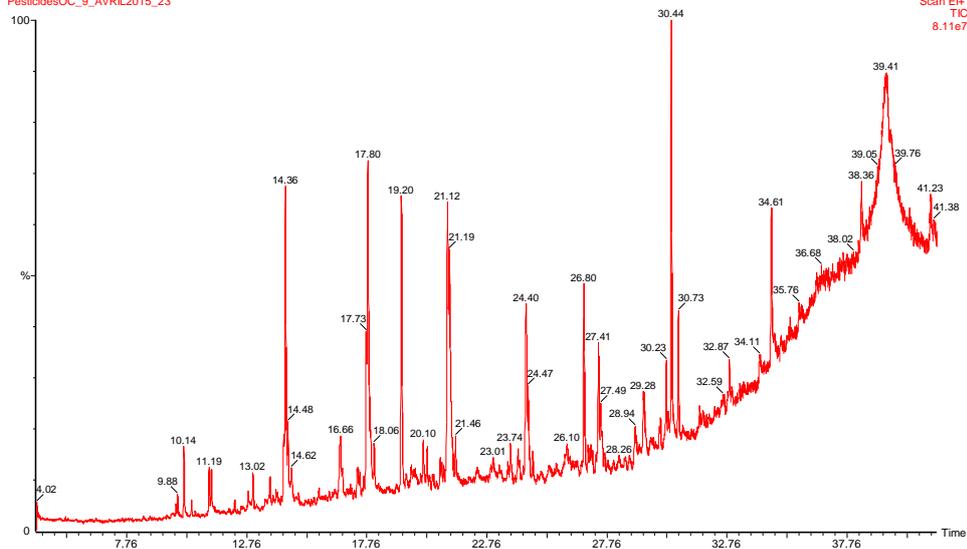


Echantillon 3''

145/15 U IEXTB MAZOUZ ABDENNACER
PesticidesOC_9_AVRIL2015_23

, 10-Apr-2015 + 06:49:23

Scan El-
TIC
8.11e7

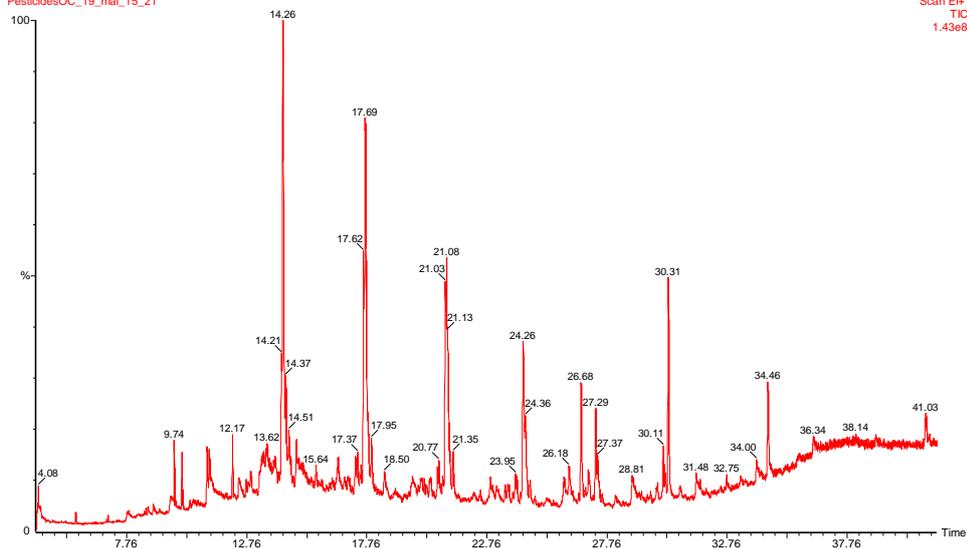


Echantillon 4''

168/15 Iext A
PesticidesOC_19_mai_15_21

, 20-May-2015 + 05:52:12

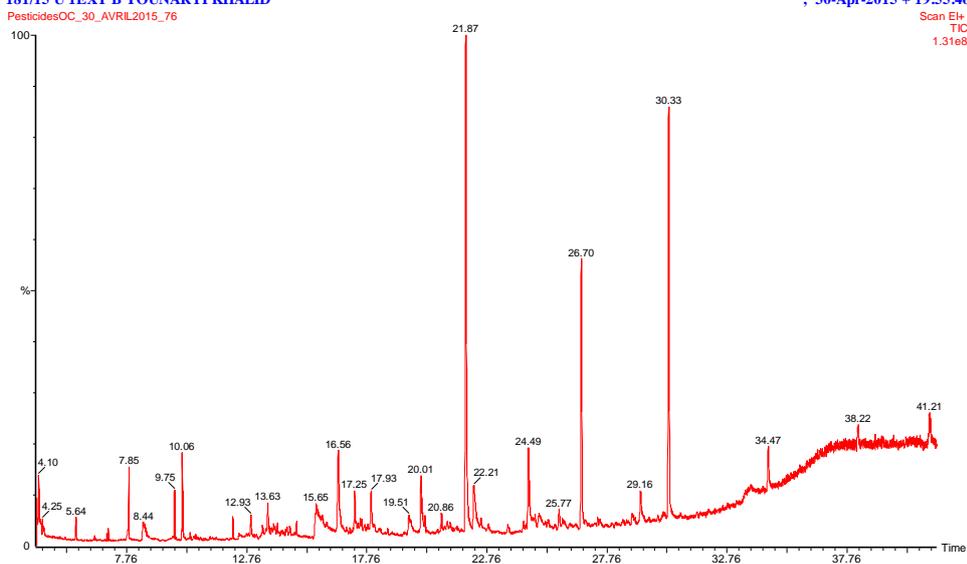
Scan El-
TIC
1.43e8



Echantillon 5''

181/15 U IEXT B TOUNARTI KHALID
PesticidesOC_30_AVRIL2015_76

, 30-Apr-2015 + 19:55:46

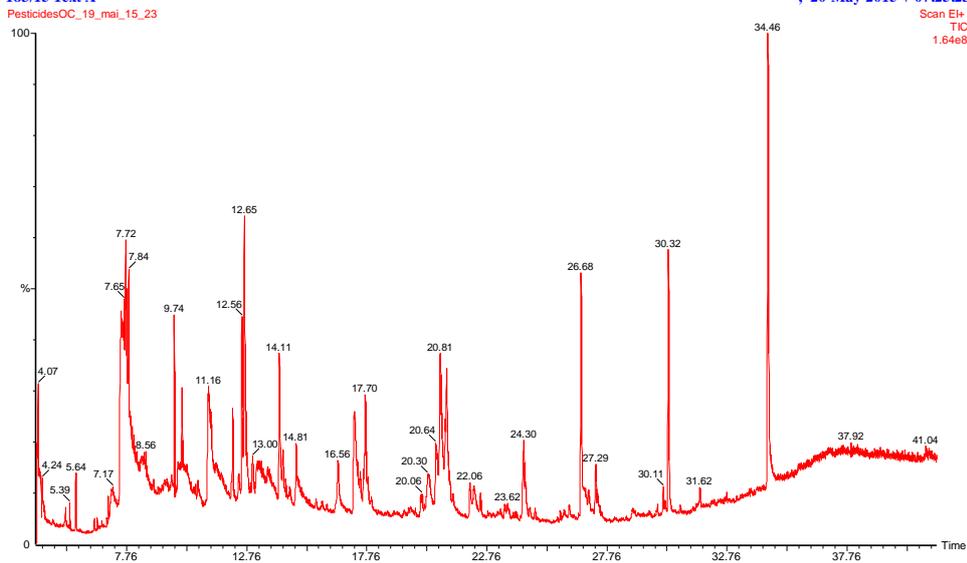


Scan Elr
TIC
1.31e8

Echantillon 6''

183/15 Iext A
PesticidesOC_19_mai_15_23

, 20-May-2015 + 07:25:23



Scan Elr
TIC
1.64e8

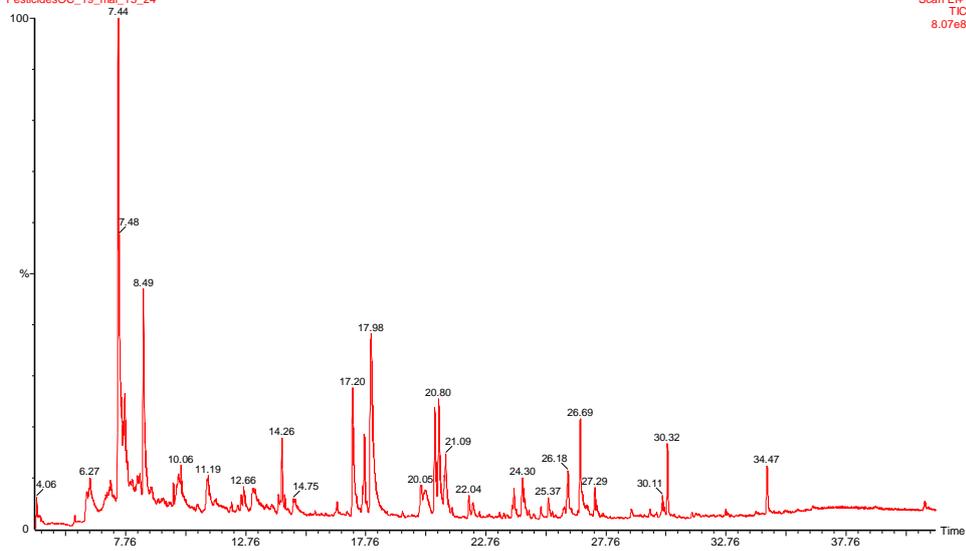
Echantillon 7''

193/15 test A

PesticidesOC_19_mai_15_24

, 20-May-2015 + 08:11:57

Scan E1
TIC
8.07e8



Rapport-gratuit.com 
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES