

# SOMMAIRE

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS .....	5
GLOSSAIRE .....	6
LISTE DES FIGURES .....	7
LISTE DES TABLEAUX .....	7
INTRODUCTION .....	8
<b>Chapitre I. PRESENTATION DE LA STRUCTURE D'ACCEUIL .....</b>	<b>9</b>
I- Présentation générale d'INH.....	10
1- Histoire.....	10
2- Missions.....	10
II- Les différents départements d'INH.....	11
INTRODUCTION GENERALE.....	12
<b>Chapitre II. Partie bibliographique .....</b>	<b>13</b>
I- La paraphénylène-diamine « Takaout » .....	14
1- Définition .....	14
2- Usages de la PPD	
2.1- Usage traditionnel	
2.2- Autres usages .....	14
3- Nature de produit .....	16
II- Aspects toxicologique de la PPD.....	16
1- Toxicocinétique.....	16
2- Toxicité de la PPD.....	18
2.1- Toxicité aiguë .....	18
2.2- Toxicité chronique.....	18
3- Tableau clinique de l'intoxication systémique .....	18
4- Traitement .....	21
III- Intoxication à la paraphénylène-diamine au Maroc.....	23
<b>Chapitre III. MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>24</b>

I-	Recherche de Takaout sur le marché .....	25
II-	Matériel .....	26
	1- Produits et réactifs .....	26
	2- Echantillons biologiques .....	26
III-	Méthodes utilisées dans la toxicologie médico-légale.....	27
	a- Méthode colorimétrique .....	27
	b- Chromatographie sur couche mince .....	28
	c- Chromatographie liquide à haute performance.....	28
	d- Chromatographie sur phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse .....	29
IV-	Essais et résultats.....	30
V-	Discussion.....	36
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	37
	REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE .....	38

## LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

**INH : Institut National d'Hygiène**

**CAPM : Centre Anti-Poison Du Maroc**

**PPD : Paraphénylène-diamine**

**CCM : Chromatographie sur couche mince**

**GC/MS: Gas chromatography-mass spectrometry**

**HPLC: Chromatographie liquide haute performance**

**NAT1 : N-acétyltransférase 1**

**NAT2 : N-acétyltransférase 2**

**IRA : Insuffisance rénale aiguë**

**T : Témoin**

**Ech1 : Echantillon1**

**Ech2 : Echantillon2**

# *GLOSSAIRE*

**La paraphénylène-diamine (PPD) :** est une amine aromatique dérivée de l'aniline, utilisée depuis 1863 par les femmes dans un but cosmétique comme teinture capillaire noire ou adjuvant de henné dans plusieurs pays d'Afrique et de Moyen Orient.

**La toxicologie médico-légale :** définie comme l'examen complémentaire d'un diagnostic après l'autopsie, dans un cadre de recherche des causes de la mort.

**La toxicocinétique :** est une étude descriptive et quantitative du devenir des toxiques dans l'organisme.

**La macroglossie :** c'est le terme médical utilisé pour définir l'hypertrophie de la langue. On parle de macroglossie lorsque la langue est protubérante, paraît trop grande pour la bouche, exige un effort volontaire pour la garder à l'intérieur de la bouche ou cause une déformation de la mâchoire et des dents.

**Une insuffisance rénale aiguë :** est la défaillance brutale (quelques heures à quelques jours) des fonctions rénales qui se traduit par une augmentation rapide de l'urée et de la créatinine sanguine (rétention des déchets azotés). Elle traduit la perte de l'homéostasie hydroélectrolytique et acidobasique et/ou l'accumulation de déchets organiques.

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Organigramme des différents départements d'INH.....	11
Figure 2 : Organigramme présentant le département de toxicologie .....	11
Figure 3 : Tamarix orientalis (Tamarix aphylla).....	15
Figure 4 : Galle de Tamarix orientalis .....	15
Figure 5 : Takaout Roumia .....	15
Figure 6 : Structure chimique de la paraphénylène-diamine .....	16
Figure 7 : Œdème cervico-faciale chez une patiente marocaine après ingestion de la PPD.....	19

Figure 8 : Macroglossie chez une patiente marocaine après ingestion de la PPD .....	19
Figure 9 : Echantillon 1 .....	25
Figure 10 : Echantillon 2 .....	25
Figure 11: Plaque obtenue après essai N°1 .....	32
Figure 12: Echantillons en cours d'extraction .....	33
Figure 13: Echantillons après filtration .....	33
Figure 14: Migration des échantillons sur la plaque CCM .....	34
Figure 15: Plaque de CCM après migration des échantillons (T, Ech1, Ech2) .....	34
Figure 16: plaque de CCM après migration et révélation à l'UV .....	35

<b>LISTE DES TABLEAUX</b>
---------------------------

Tableau 1 : Comparatif des méthodes d'analyses .....	29
--	----

## *Introduction*

Au terme des études à la faculté des sciences et techniques (FST), les étudiants ont à faire face à un milieu professionnel qui, outre les études, exige une certaine connaissance du milieu de travail.

Dans le but de faciliter l'accès de l'étudiant au marché d'emploi, la faculté des sciences et techniques prévoit une formation complémentaire sous forme de stage pratique permettant aux étudiants :

- De mieux appréhender la réalité des entreprises.
- D'enrichir leurs acquis et leurs habilités.
- De mettre en pratique l'enseignement reçu tout au long du cursus universitaire.
- D'acquérir une expérience professionnelle.

J'ai effectué mon stage de fin d'étude à l'Institut National d'Hygiène qui m'a offert une occasion exceptionnelle d'intégration dans le monde professionnel.

Tout au long de mon stage je me suis intéressée à étudier et à rechercher la « paraphénylène-diamine », appelé « Takaout », dans les viscères par la méthode de chromatographie sur couche mince.

## *Chapitre I*

### *Présentation de la structure d'accueil*

## *I. Présentation générale de l'INH*

### **1- Histoire**

L'Institut d'Hygiène du Maroc a été inauguré le 30 décembre 1930 à Rabat par le Professeur Léon BERNARD, Président du Conseil Supérieur d'Hygiène de France, sous la présidence de Mr Lucien SAINT, Résident Général de la République Française au Maroc dans le but de prendre en charge les problèmes d'hygiène et d'épidémiologie des maladies transmissibles du Maroc et de diffuser les notions élémentaires de l'hygiène et de la prophylaxie pour protéger la santé de la population.

### **2- Missions**

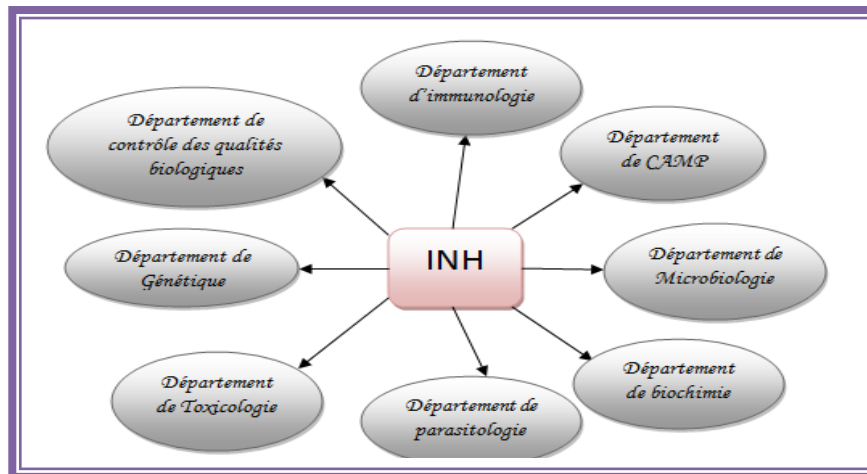
L'Institut National d'Hygiène sous tutelle du Ministère de la santé et la Direction de l'Epidémiologie et de la lutte contre les maladies, remplit plusieurs fonctions qui sont :

- Apporter un appui technique dans le domaine de la biologie pour l'évaluation des activités et de l'impact des programmes sanitaires.
- Assurer la standardisation des méthodes de travail des protocoles et des produits.

- Assurer le contrôle de la qualité des laboratoires cliniques hospitaliers et ambulatoires, des laboratoires d'épidémiologie et d'hygiène du milieu et des laboratoires spécialisés.
- Participer à la formation et le recyclage dans le domaine de la biologie, des agents de la santé publique de toutes les catégories.
- Apporter l'expertise scientifique et technique dans le domaine de la biologie humaine.
- Développer la recherche opérationnelle et appliquée en biologie.
- Participer au système national de surveillance épidémiologique.
- Assurer l'expertise médico-légale biologique à la demande des tribunaux du Royaume.
- Etudier et suivre les problèmes relatifs au thermalisme en collaboration avec la division de l'hygiène du milieu.
- Représenter le Ministère de la santé publique dans toutes les commissions interministérielles en matière de biologie

## *II. Les différents départements d'INH*

Les différents départements de l'Institut National d'Hygiène sont présentés dans cet organigramme :

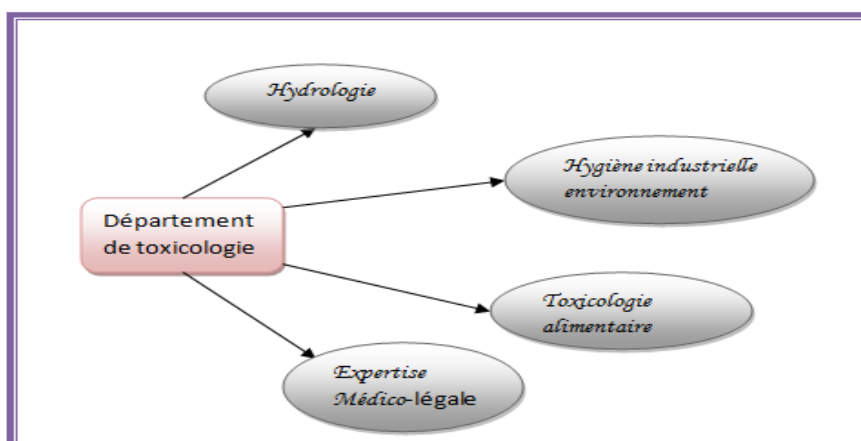


**Figure 1 :** Organigramme de différents départements de l'INH

J'ai effectué mon stage au sein du département de toxicologie et plus précisément dans l'unité médico-légale.

Ce département comprend quatre unités présentées dans cet organigramme :





**Figure 2 :** Organigramme présentant le département de toxicologie

## *Introduction générale*

Le marché marocain s'est approprié depuis 1970, un produit minéral à base de paraphénylène-diamine qui a détrôné la Takaout commune beldia non seulement pour ses qualités tinctoriales remarquables, mais aussi pour sa grande disponibilité à petit prix et ses qualités de produit d'importation ce qui lui a valu l'appellation par extension de Takaout Roumia.

L'intoxication à la PPD est devenue un véritable problème de santé au Maroc puisqu'elle est responsable d'une mortalité importante chez des sujets jeunes.

Le but de mon travail est d'identifier, de rechercher la PPD dans les viscères par chromatographie sur couche mince.

Dans un premier temps, on s'est intéressé à présenter la paraphénylène-diamine, son utilisation et sa gravité de toxicité.

Dans un second temps, on exposera les méthodes employées pour identifier la PPD.

Enfin, on présentera les essais réalisés et les résultats obtenus.

## ***Chapitre II***

### ***Partie bibliographique***

## *I- La paraphénylène-diamine « Takaout »*

### **1- Définition**

La paraphénylène-diamine (PPD) est une amine aromatique dérivée de l'aniline utilisée depuis la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle dans un but cosmétique pour ses propriétés tinctoriales. Elle est aussi mise à profit en milieu industriel comme colorant (caoutchouc, fourrures, photographie, tannerie, coiffure...). En cas d'absorption par voie orale, la toxicité systémique est considérable. C'est ainsi que depuis plusieurs années, l'usage de ce produit a été détourné de son usage habituel dans un but d'autolyse. L'intoxication au PPD est peu connue en Occident mais très répandue dans les pays d'Afrique, d'Asie ou du Moyen-Orient où cette substance est très utilisée comme adjuvant du henné pour teindre les mains, les pieds ou les cheveux. Elle est également utilisée à tort, dans un but abortif. Au Maroc, l'utilisation de ce produit dans un but suicidaire est très fréquente. La PPD y est disponible en vente libre, sous une forme cristallisée appelée "Takaout Roumia(8). Le premier cas d'intoxication systémique par la PPD a été décrit en 1978. Ce toxique devient mortel à partir de 7 grammes avec des variations inter individuelles, certains cas de décès ayant été décrits avec des doses inférieures à 2 grammes(6).

### **2- Usages de la PPD**

#### **2.1- Usage traditionnel**

Dans la tradition orientale, les femmes utilisent un produit nommé "Takaout Beldia" ("galle de tamaris traditionnelle") pour renforcer la teinte et donner éclat à leur chevelure. C'est un produit végétal non toxique issu de la galle de Tamarix orientalis. Cette galle est une excroissance produite sur l'arbre par un papillon : *Amblypalpis olivierella*. Le Tamarix est un

arbuste à feuillage caduque et aux racines profondes, d'origine saharo-indienne, présent le long des fleuves du Maroc. Les galls de Tamarix se forment sur les branches de l'arbre à la base des feuilles (*fig. 3, 4*). La région qui produit le meilleur Takaout végétal est le Tafilalet (Sud-Est du Maroc).

En cosmétologie traditionnelle, elle est grillée, pulvérisée puis triturée dans de l'eau ou de l'huile d'olive pour être incorporer dans la préparation des fards noirs, des tatouages et des teintures capillaires, seule ou associée au Henné. Suite aux nombreuses sécheresses et à la demande croissante, cette substance est devenue plus rare, "Takaout Beldia" a été alors remplacée par "Takaout Roumia" appelée aussi "roche" en raison de son aspect minéral (*fig 5*). Il s'agit d'un produit à base de PPD ayant des caractéristiques cosmétiques semblables qui reste beaucoup moins coûteux. La connaissance de la toxicité de "Takaout Roumia" a amené autrefois les individus à l'utiliser pour empoisonner les appâts destinés à tuer les chiens errants. Son emploi à des fins criminelles, en mélange avec du café, aurait été rapporté. Elle est aussi utilisée à tort par les femmes dans un but abortif. La forme la plus répandue est la "roche" que l'on trouve chez les herboristes marocains. La teneur en PPD de produits vendus varie fortement selon les échantillons(8).



**Fig. 3:** Tamarix orientalis (Tamarix Aphylla)(8)

**Fig.4 :** Galles de tamarix orientalis

**Fig. 5 :** Takaout Roumia

## 2.2- Autres Usages

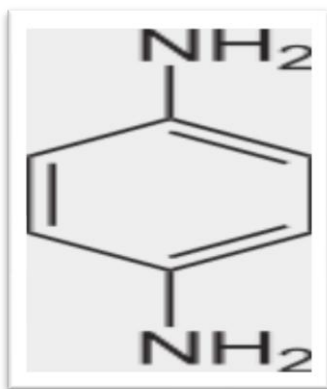
La paraphénylène-diamine (PPD) est utilisé :

- ✓ Essentiellement pour la préparation de certains dérivés et comme agent de fabrication de colorants,
- ✓ Mais également (sous forme pure, de dérivés ou de sels) comme :
  - Antioxydants et antiozonants dans les formulations d'élastomères, matières plastiques et produits pétroliers.
  - Agents de fabrication de fibre polyamides.
  - Agents de développement photographique.
  - Inhibiteur de corrosion.

- Agents de réticulation des résines époxydiques.
- Composants des produits de coloration capillaire ou de coloration des fourrures(3).

### **3- Nature de produit**

La paraphénylène-diamine (PPD) ou para-aminobenzène, de formule chimique  $C_6H_4(NH_2)_2$  de poids moléculaire de 108, est une amine aromatique dérivée de l'aniline. Elle se présente sous forme de cristaux ou de poudre incolore ou jaunâtre elle brunit à la lumière jusqu'au violet voire au noir. La PPD est très soluble dans l'alcool, le chloroforme et l'éther. Elle est moins soluble dans l'eau. La PPD, produit synthétique est connu en industrie sous de nombreux noms : Paramine, Fouramine D, Ursol D, Vulpa D, Furol S(1).



**Figure 6 :** Structure chimique de la paraphénylène-diamine

## *II- Aspects toxicologiques de la PPD :*

### **1- Toxicocinétique**

La paraphénylène-diamine est absorbée par toutes les voies d'administration et largement distribuée dans tout l'organisme. Elle est métabolisée principalement sous forme de dérivés N-acétylés excrétés dans les urines(3).

#### **✓ Absorption**

D'après les études de toxicité, la PPD est absorbée par les voies orale, cutanée et respiratoire.

En cas d'administration par voie orale, l'absorption s'effectue au niveau intestinal. Elle est importante, avec un taux d'absorption pouvant atteindre 90%, et rapide, avec un pic plasmatique à 1,5 heure après l'ingestion.

Par voie cutanée, le passage dans le sang est beaucoup plus limité lorsque la PPD est appliquée sur le cuir chevelu (entre 0,08 et 2,5% de la dose appliquée). Après absorption, le produit est largement distribué dans tout l'organisme, de façon uniforme et proportionnelle au

volume du tissu. La totalité des aspects de son métabolisme n'a pas été établie d'une manière précise actuellement. Néanmoins, l'analogie structurale de la PPD avec l'aniline a conduit certains auteurs à considérer que son métabolisme est commun à celui des amines aromatiques. D'autres travaux indiquent que la PPD subirait une réaction d'oxydation conduisant à la formation d'un composé intermédiaire toxique et très réactif : la benzoquinone diimide(3).

#### ✓ **Distribution**

La substance est distribuée d'une façon assez uniforme dans tout l'organisme(3)

#### ✓ **Métabolisme**

La détoxification repose essentiellement sur la N-acétylation de la molécule, permettant l'élimination urinaire. Les principales enzymes catalysant cette réaction sont les N-acétyltransférases 1 et 2. La NAT2 est surtout hépatique et gastro-intestinale, alors que la NAT1 est retrouvée dans le foie, la vessie, l'épiderme et quelques autres organes.

Des expériences réalisées avec des cytosols extraits de la peau humaine suggèrent en effet que la PPD est acétylée dans la peau par NAT1.

Chez l'homme, les métabolites acétylés sont majoritaires parmi les produits d'élimination urinaire. Lors d'une application cutanée chez des rats (50mg/Kg), la totalité de la substance paraît être métabolisée dans la peau, puisque seule la forme diacétylée est observée dans le plasma, 4 heures après l'exposition. La N-acétyl-PPD et la N,N'-diacétyl-PPD sont les deux métabolites majeurs retrouvés dans les urines(3).

#### ✓ **Elimination**

L'élimination sanguine de la PPD serait biphasique avec une première demi-vie égale à 24 minutes et une seconde égale à 43,5 heures. L'élimination des métabolites est effectuée, par le rein, à 90% et à 10 % dans l'intestin(8).

## **2- Toxicité de la PPD**

## **2.1- Toxicité Aiguë**

La paraphénylènediamine a une forte toxicité par ingestion ou par inhalation. Elle provoque une irritation modérée de la peau et des yeux en cas d'exposition unique. C'est un sensibilisant majeur(3).

Souvent dans un but suicidaire, l'ingestion de la PPD est responsable d'une intoxication grave qui se manifeste par des signes cliniques pathognomoniques et dont les conséquences sont parfois dramatiques. L'ingestion du produit est révélée par un œdème cervico-facial et une macroglossie amenant un syndrome asphyxique mettant en jeu le pronostic vital. Sa toxicité musculaire entraîne une libération massive de la myoglobine ayant pour conséquence une atteinte rénale qui se manifeste par une IRA (insuffisance rénale aiguë) avec nécrose et obstruction tubulaire. Le muscle cardiaque n'est pas épargné, entraînant une myocardite toxique. Malgré le fait que la relation dose-effet ne soit pas encore totalement définie, le seuil de toxicité par ingestion de la PPD chez l'homme est estimé à 3g(8).

## **2.2- Toxicité chronique**

Ce type de toxicité est retrouvé dans le cadre de maladies professionnelles. La valeur limite d'exposition professionnelle de la PPD est de 0,1 mg/m<sup>3</sup>. Les utilisateurs industriels sont exposés à des manifestations d'ordre allergique lors de sa manipulation telles qu'une dermatite allergique, un coryza spasmodique(8).

## ***3- Tableau clinique de l'intoxication systémique***

### **✓ Phase initiale : L'œdème cervico-facial**

Les effets toxiques de l'intoxication aiguë apparaissent en moyenne 2 à 3 heures après l'ingestion. Le tableau clinique débute par une sensation de brûlure bucco-pharyngée, des nausées, des vomissements et des épigastralgies. Puis s'installe un œdème chaud, dur et douloureux de la région oropharyngée jusqu'à la face et le cou, avec une macroglossie, conduisant inéluctablement à un syndrome asphyxique rapidement mortel si une intubation trachéale ou une trachéotomie n'est pas immédiatement entreprise. L'œdème dure quelques heures à quelques jours puis régresse sans laisser de séquelles. Il représente le premier motif d'admission à l'hôpital et le seul signe clinique orientant d'emblée vers l'intoxication par la PPD(8).



**Figure 7:** Œdème cervico-faciale chez une patiente marocaine après ingestion de la paraphénylène-diamine(2)



**Figure8 :** Macroglossie chez une patiente marocaine après ingestion de la PPD(2)

✓ **Phase d'état : la rhabdomyolyse**

❖ **Atteinte du muscle strié squelettique**

La rhabdomyolyse est une nécrose plus ou moins diffuse des muscles striés qui se manifeste cliniquement par des douleurs musculaires pouvant aller jusqu'à l'impotence fonctionnelle. Les myalgies sont aggravées par la palpation, les masses musculaires sont œdémateuses, montrant un durcissement et un gonflement localisé ou généralisé. La biopsie met en évidence ces lésions de nécrose(8).

❖ **Atteinte du myocarde**

Ce n'est qu'en 1996 que la rhabdomyolyse du myocarde par la PPD a été mise en évidence pour la première fois, et beaucoup d'aspects de cette atteinte restent encore obscurs. Il est très



difficile de déterminer avec précision la fréquence de cette complication (souvent sous-estimée) étant donné que l'investigation de la fonction myocardique n'est pas toujours réalisée. Néanmoins une récente étude a révélé que l'atteinte myocardique n'était ni systématique ni dose-dépendante. Toutefois, si la survenue de cette atteinte est rare, son pronostic est très fâcheux. Elle doit être suspectée en présence d'une hypotension artérielle et d'anomalies électrocardiographiques(8).

#### ✓ **Méthémoglobinémie**

L'action méthémoglobinisante de la PPD se définit par l'oxydation du fer ferreux  $Fe^{2+}$  en fer ferrique  $Fe^{3+}$  rendant impossible la fixation de l'oxygène sur l'hémoglobine(8).

#### ✓ **Atteinte rénale**

L'insuffisance rénale est constante dans cette affection, le plus souvent anurique avec émission d'urines noirâtres.

La toxicité de la PPD sur le rein est multifactorielle.

- *par rhabdomyolyse* : la précipitation intra tubulaire de la myoglobine et des déchets cellulaires, secondaire à la rhabdomyolyse, constitue un obstacle mécanique responsable de l'arrêt de la filtration glomérulaire, mais aussi l'ischémie rénale secondaire à la libération de substances vaso-actives et enzymes protéolytiques libérées par les cellules nécrosées (sérotonine et histamine qui sont des activateurs de quinines et auraient une action directe sur le parenchyme rénal).

- *par hypovolémie* : la fuite hydroélectrolytique liée à la lyse des masses musculaires est responsable d'une baisse du débit de filtration glomérulaire(8).

## **4- Traitement**

Les intoxications aiguës sont actuellement la première cause de consultation urgente hospitalière dans les pays développés. La prise en charge d'un intoxiqué aigu est donc un problème fréquent.

Le traitement des intoxications à la PPD, du fait de l'absence d'antidote, est purement symptomatique basé sur :

- le traitement évacuateur ;
- le traitement de l'œdème et de la détresse respiratoire aiguë ;

– le traitement de la rhabdomyolyse et la prévention de ces complications électrolytiques et rénales par l'instauration précoce d'une hyperdiurèse alcaline(1).

### ✓ **Traitement évacuateur**

#### ❖ *Lavage gastrique*

Le lavage gastrique doit être entrepris en urgence, même au-delà de la deuxième heure après l'absorption. Il doit être fait dans des conditions de sécurité parfaite et dans le strict respect des contre-indications. Il doit être abondant jusqu'à éclaircissement du liquide. Le prélèvement initial de liquide de lavage gastrique sera adressé pour analyse toxicologique.

#### ❖ *Charbon actif*

La PPD, comme les dérivés aminés aromatiques, est bien absorbée sur le charbon actif. Ce dernier peut aider à diminuer la charge du toxique et présente l'avantage d'être facile à administrer et d'être sans effets secondaires. Malheureusement à l'heure actuelle ce produit n'est pas disponible dans les hôpitaux marocains(1).

Le charbon activé représente un complément ou une alternative au lavage gastrique, à doses répétées, il rompt le cycle entéro-hépatique de certains toxiques et réaliserait une dialysance gastro-intestinale. Son efficacité mérite d'être évaluée dans l'intoxication à la parahénylène-diamine(1).

### ✓ **Traitement du syndrome asphyxique**

La prise en charge immédiate de la fonction respiratoire est assurée par le dégagement des voies aériennes supérieures. Une intubation endotrachéale (orale ou nasale) est donc nécessaire. Si l'œdème est trop important, le recours à la trachéotomie de sauvetage constitue la seule alternative(1).

### ✓ **Traitement de l'œdème cervico-facial**

La poussée d'œdème dont le mécanisme n'est pas parfaitement élucidé, dure 3 à 5 jours pour disparaître sans laisser de séquelles, son traitement fait appel à des moyens thérapeutiques

différents qui méritent d'être évalués pour prouver leur efficacité. Certains auteurs proposent l'administration parentérale de corticoïdes(1).

### ✓ **Traitement des complications de l'atteinte musculaire**

La prise en charge des rhabdomyolyses qu'elles soient traumatiques ou non traumatiques repose sur les mêmes principes : la lutte contre l'hyperkaliémie, décisive à court terme et la prévention de l'insuffisance rénale aiguë décisive à long terme, et ceci grâce à un remplissage vasculaire précoce et à une hyperdiurèse alcaline.

La réanimation volémique repose sur l'administration précoce et massive de solutés de perfusion, visant à lutter contre l'hypovolémie constante liée à la rhabdomyolyse, et au besoin une alcalinisation des urines. Le remplissage vasculaire, doit être précoce, massif et rapide. Il permet d'augmenter le débit tubulaire et la pression de perfusion rénale favorisant d'une part l'élimination de toutes les substances capables de se précipiter et d'obstruer la lumière tubulaire et d'autre part, la prévention contre le passage à l'organicité de l'insuffisance rénale fonctionnelle secondaire à l'hypovolémie.

L'hyperdiurèse alcaline se base sur l'apport de sérum bicarbonaté à 0,14% qui vise à maintenir un pH urinaire supérieur à 7 pour favoriser l'élimination de la myoglobine qui ne se fait qu'en milieu alcalin. Cette diurèse osmotique alcaline doit être maintenue jusqu'à la disparition de la myoglobinurie (survenant habituellement au 3ème jour). En l'absence de reprise de la diurèse après la restauration d'une volémie efficace et d'un équilibre hydro-électrolytique satisfaisant, il faut avoir recours aux diurétiques(1).

### *III- Intoxication à la paraphénylène-Diamine Au Maroc :*

Dans sa revue de «Toxicologie Maroc» du 4ème trimestre 2011, le CAPM note que parmi les produits les plus incriminés figure en tête la «Paraphénylène-Diamine» (PPD) ou «Takaout Roumia» avec 64,8% des cas. Les marocaines filles célibataires ont recours à ce minéral (utilisé pour la teinture des cheveux en noir) pour se suicider. Une analyse des cas de décès a montré que le toxique responsable était exclusivement la PPD et que la tranche d'âge la plus touchée était l'adulte (63,07%), suivie de l'adolescent (23,84%), de l'enfant (13 cas) et du bébé marcheur (1 cas)(7).

Une étude rétrospective à porter sur les 24 cas admis en réanimation de 2003 a 2010 (A. Derkaoui et al. Intoxication par la paraphénylène-diamine : à propos de 24 cas). Cette étiologie a représenté 28,4% de l'ensemble des intoxications admises. L'âge moyen est de 23,6 ans avec un sex-ratio de 4,7. L'intoxication était le plus souvent volontaire (82,6%). Elle était accidentelle dans 8,4% des cas et pouvait être criminelle (4,3%). Une rhabdomyolyse a été retrouvée dans 15 cas, une atteinte respiratoire dans 14 cas, une atteinte cardiaque dans 7 cas et une insuffisance rénale dans 4 cas ; l'évolution est fatale dans 11 cas(5).

## *Chapitre III*

*Médecine d'urgence*

## *I- Recherche de Takaout sur le marché*

Depuis que l'intoxication par la PPD est devenue fréquente au Maroc à cause de sa disponibilité commerciale, il a été procédé à l'interdiction de son apport et sa vente pure ou en combinaison avec d'autres teintures. C'est pour cela que j'ai trouvé des difficultés pour l'achat de Takaout sur le marché chez les herboristes marocains notamment sur les villes : Rabat, Salé et Fès.

Après une longue recherche, Takaout a été retrouvée sous deux aspects différents (Echantillon1 et échantillon2) chez deux herboristes de la nouvelle ville de Fès.



**Figure 9: Echantillon 1**



**Figure 10: Echantillon 2**

## *II- Matériel*

Le matériel et les équipements nécessaires à la recherche et à l'identification de la PPD dans les viscères sont comme suit :

### *1- Produits et réactifs*

- Gants en double car on manipule avec des produits très dangereux tel que les acides et le sang qui peut contenir des virus.
- Masque
- Hôte

### *1- Echantillons biologiques*

#### **➤ Le sang**

- ❖ les recherches sont pratiquées sur sang total (l'anticoagulant employé est l'héparine).
- ❖ Cet échantillon devra être transporté avec beaucoup de précautions afin d'éviter toute hémolyse susceptible de gêner la recherche toxicologique.
- ❖ Toute médication administrée au sujet intoxiqué devra être mentionnée sur la fiche de demande d'examen toxicologique car elle peut influencer sur les résultats de l'analyse en augmentant le taux de l'aluminium (par exemple les antiacides)

### ➤ **Le liquide gastrique**

- ❖ Cet échantillon inclut tout aussi bien les vomissements que le produit de lavage gastrique ou encore d'aspiration gastrique.
- ❖ Le liquide gastrique est tout à fait indiqué pour la recherche qualitative, car obtenu à grand volume et offrant une plus grande concentration en toxique que le sang, ce qui est due à la présence de l'acide chlorhydrique qui catalyse la libération de la phosphine.

## *III- Méthodes utilisées dans la toxicologie médico-légale*

L'objectif d'une analyse toxicologique est la mise en œuvre de moyens techniques pour isoler, identifier et doser un xénobiotique à partir d'une matrice (le plus souvent biologique...).

La toxicologie médico-légale se présente comme l'examen complémentaire ayant le meilleur rendement diagnostique après une autopsie, et s'intéresse à la recherche des causes de la mortalité d'un sujet.

La pratique de ces analyses médico-légales est basée sur des prélèvements autopsiques bien définis citons :

- Sang cardiaque
- Sang périphérique
- Urines
- Contenu gastrique
- Poumons

Parmi les méthodes analytiques qui existent dans un laboratoire de toxicologie médico-légale :

- La méthode colorimétrique,
- la chromatographie sur couche mince,
- la chromatographie liquide à haute performance et
- la chromatographie sur phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

### ***a- Méthode colorimétrique***

Cette méthode est qualitative (présence/absence) et ce pour le cas de la PPD, et se base sur la formation d'une coloration après l'ajout d'un réactif chimique à l'extrait d'un échantillon biologique (sang, liquide gastrique...). De point de vue quantitatif cette méthode est moins précise et moins sensible.

### ***b- chromatographie sur couche mince***

La chromatographie sur couche mince est une technique courante de caractérisation. Elle peut aussi être utilisée comme technique d'extraction. Elle est basée sur la différence d'affinités (au sens d'interactions intermoléculaires) d'un constituant d'un mélange entre une phase solide (silice le plus souvent, mais aussi alumine ou cellulose) et une phase liquide, un éluant, mélange de solvants organiques.

Le mélange est fixé sur un support appelé phase stationnaire (un gel de silice déposé en couche mince sur une plaque d'aluminium). Il est entraîné par un solvant approprié (phase mobile ou éluant) qui migre par capillarité sur la plaque. Les constituants du mélange se séparent par migration différentielle : chacun d'eux est d'autant plus entraîné par l'éluant qu'il est plus soluble dans celui-ci et moins adsorbé sur la phase stationnaire.

Après migration les taches doivent être révélées ; c'est la détection qui peut se faire soit :

- Pulvérisation d'un réactif caractéristique
- Par immersion dans un bain de permanganate de potassium
- Par pulvérisation de vapeur de diiode
- Par observation à la lumière UV si la plaque de silice comporte un indicateur de fluorescence

### ***c- Chromatographie liquide à haute performance***

L'HPLC est une des méthodes analytiques les plus utilisées. Le principe de base de la séparation est le passage d'un liquide (phase mobile) au travers d'une colonne (support solide = phase stationnaire). L'HPLC existe sous quatre types différents: HPLC en phase inverse, HPLC d'adsorption, HPLC échangeuse d'ions et HPLC d'exclusion.



La polarité de la colonne ainsi que le type de solvant ont un impact sur la séparation des molécules dû à l'environnement chimique de l'ensemble. L'instrumentation de l'HPLC se compose de plusieurs éléments: une pompe, un injecteur, une colonne et un détecteur.

La colonne peut être une colonne en métal ou en Téflon (voire d'autres plastiques) qui est remplie d'une phase (directe ou inverse). Les compagnies qui fabriquent les appareils d'HPLC vendent aussi différents types de colonnes, ce qui facilite la mise en œuvre des méthodes d'analyse.

#### ***d- Chromatographie sur phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse***

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en anglais Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) est une méthode d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse afin d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances. Les applications de la GC/MS comprennent le dosage de médicaments ou de stupéfiants, l'analyse environnementale, la médecine légale et l'identification de toutes substances inconnues même sous forme de traces. La GC-MS est d'ailleurs présentée comme étant le « gold standard » des analyses en médecine légale.

#### **➤ Comparaison des méthodes d'analyse cf. tableau:**

	Sensibilité	Spécificité	Avantage	Inconvénient
Méthode colorimétrique	±	±	Simple et rapide	Peu sensible
CCM	+	+	Simple	Peu sensible
HPLC	++	++	Sans déviation	Purification
GC/MS	++	+++	Spécifique	Déviation

Tableau 1 : Comparatifs des méthodes d'analyses

- ± : Moyen indicateur
- + : Bon indicateur
- ++ : Très bon indicateur
- +++ : Excellent indicateur

## *IV- Essais et résultats*

### ***Préparation des échantillons et extraction de la PPD***

On a pris deux échantillons différents de Takaout et un échantillon témoin, on les a écrasé jusqu'à obtention d'une poudre homogène.

- **Essai N 1** : Utilisation de l'éther comme solvant d'extraction, le méthanol et l'ammoniac comme solvants d'éluion pour CCM.

- **Protocole expérimentale détaillé :**

- En raison de l'absence d'un échantillon biologique réel contenant la PPD, nous avons procédé à une saturation par Takaout lors de l'extraction.
- Dans 3 backsters on met 10g de liquide gastrique.
- On ajoute 5ml de soude 0,5N (Extraction en milieu basique pour catalyser la réaction)
- On ajoute 50 ml de l'éther.
- On ajoute quelques mg des échantillons de Takaout (Témoin (T), Echantillon1 (Ech1), Echantillon2 (Ech2)) et on les met dans différents backster.
- On agite énergétiquement chaque backster et on laisse décanter pendant 24h.
- On filtre le surnagent des solutions obtenues.

- **Pendant ce temps, on a préparé la cuve de CCM selon le protocole suivant :**

- On verse l'éluant : Méthanol 50ml et Ammoniaque 0,75ml
- On ferme la cuve.
- On laisse saturer pendant au moins 15 min (les conditions ambiantes de la pièce)
- On pourra faciliter la saturation en plaçant un papier filtre imbibé d'éluant dans la cuve le long de la paroi.

- **Préparation de la plaque :**

- On trace une ligne de dépôt (~10 mm du bord)
- On dépose à l'aide d'un capillaire les échantillons en gardant une distance d'au moins 7-8 mm entre chaque dépôt. Ne pas faire de dépôts à moins de 5 mm du bord. Le diamètre des dépôts ne doit pas excéder 3 mm. On sèche rapidement.
- On place la plaque dans la cuve en ouvrant et fermant celle-ci le plus rapidement possible.
- On laisse diffuser l'éluant le long de la plaque jusqu'à ~10 mm du haut de la plaque.
- On enlève la plaque de la cuve.

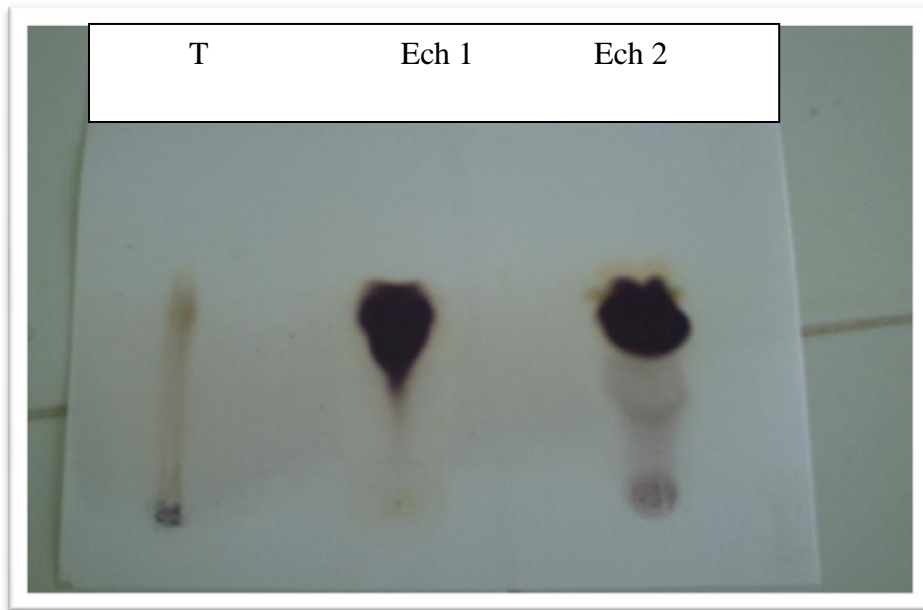
- **La révélation :**

- Après migration la révélation des taches de PPD se fait par pulvérisation à l'aide de l'iodoplatinate de sodum.

Iodoplatinate de sodum :

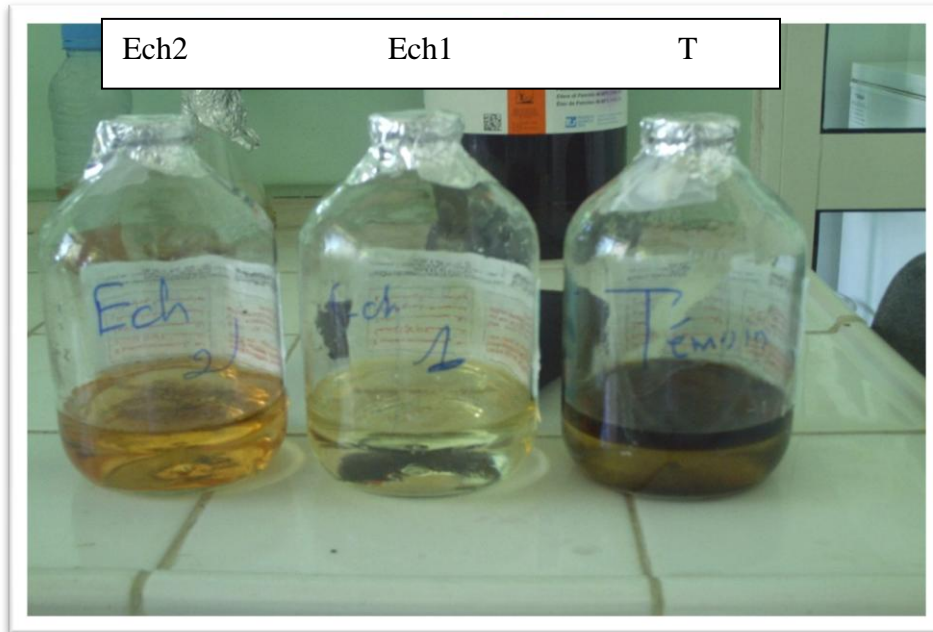
- Acide chloroplatinique à 10%
- Solution de KI à 4%
- H<sub>2</sub>O bidistillé

1 volume d'iodoplatinate dans  
2 volume de HCL (1N)



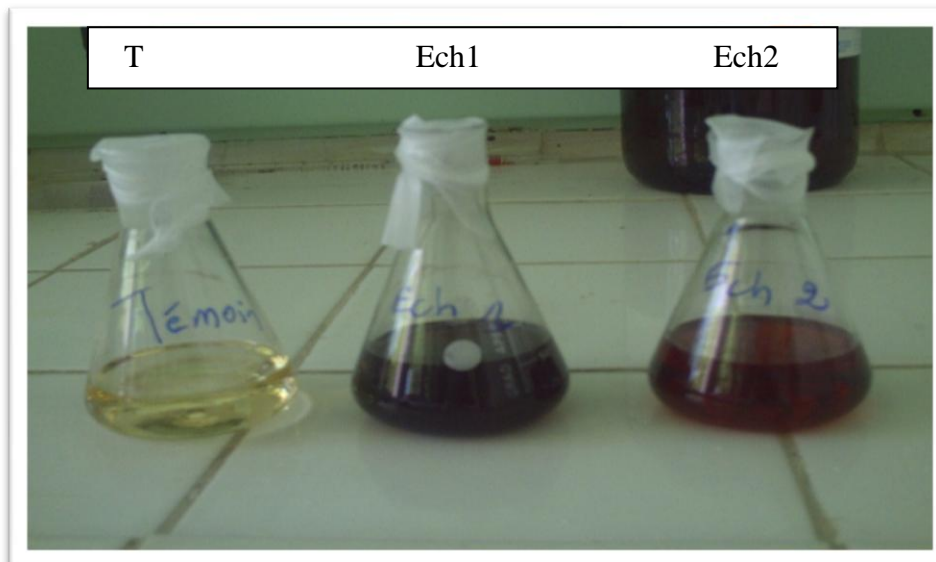
**Figure 11** : plaque obtenue après essai N°1

- ⇒ Le témoin s'agit d'un échantillon de Takaout qui se trouve dans le laboratoire, avec lequel on compare les échantillons extraits.
  - ⇒ Les trois échantillons migrent sur le même niveau de la plaque.
  - ⇒ La coloration des bandes se repose sur la concentration de chaque échantillon en PPD.
- 
- **Essai N°2** : Utilisation de chloroforme comme solvant d'extraction, le méthanol et l'ammoniac comme solvants d'éluion pour CCM.
- 
- On a procédé au même protocole expérimental sauf qu'on a changé le solvant d'éther par le chloroforme.



**Figure 12: Echantillons en cours d'extraction**

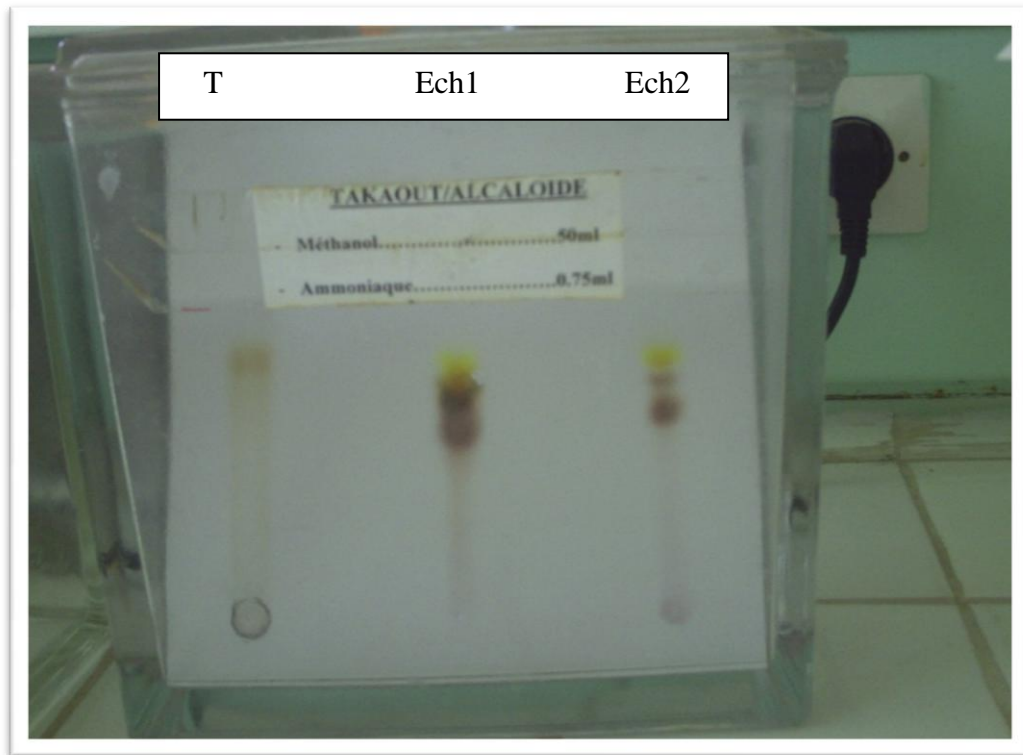
- Après 24h et lors de la filtration on a utilisé une ampoule à décanter pour récupérer le filtrat qui contient la PPD extraite dans le chloroforme.
- Dans la filtration on a utilisé de sulfate de sodium anhydre pour éliminer les traces d'eau qui restent.



**Figure 13: Echantillons après filtration**

- On dépose les échantillons sur la plaque et on place la plaque dans la cuve.

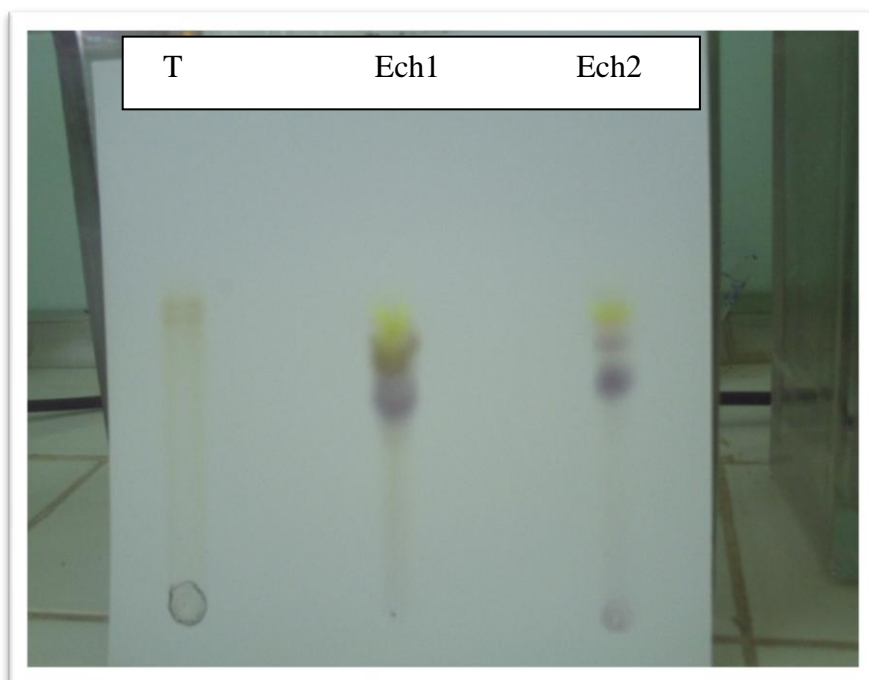




**Figure 14: Migration des échantillons sur la plaque CCM**

- On enlève la plaque, on la sèche et on la pulvérise avec l'iodoplatinate de potassium de la même manière que l'essai N°1.

### **Résultat d'essai N°2**

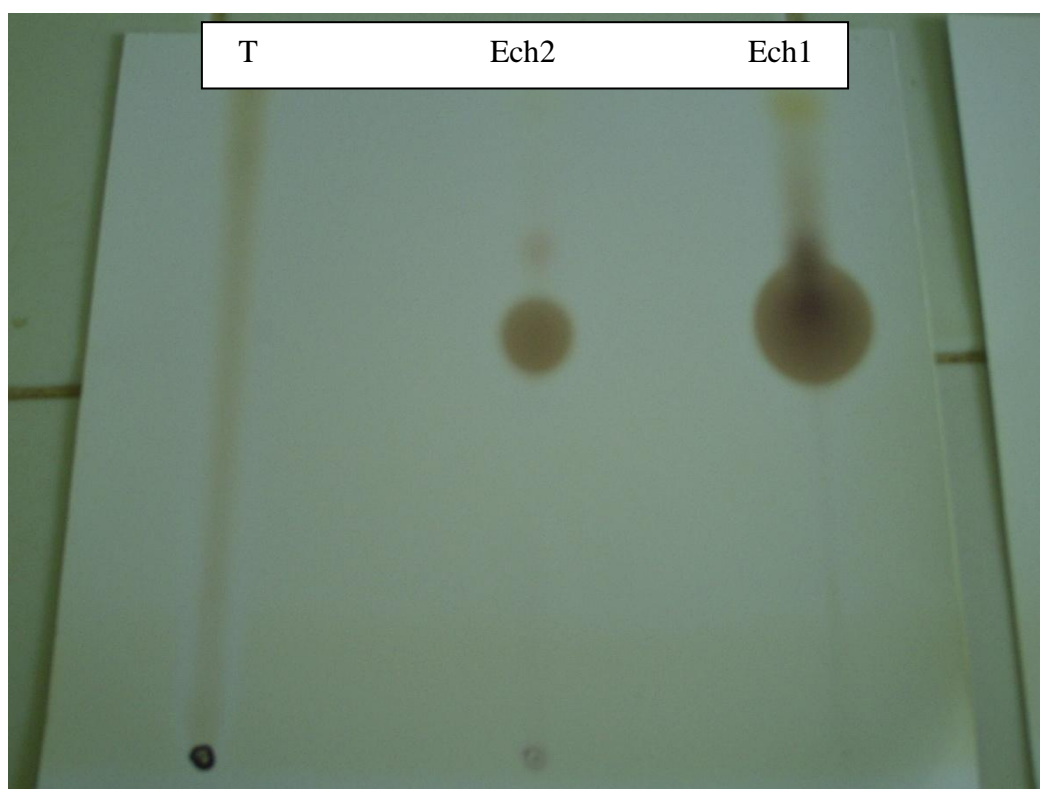


**Figure 15: Plaque CCM après migration des échantillons (T, Ech1, Ech2)**

- **Essai N°3** : Utilisation de chloroforme comme solvant d'extraction et le N-butanol et acide acétique glacial et l'eau comme solvants d'élution.

- En utilisant le même filtrat de l'essai N°2 (Extraction par le chloroforme et la soude 0,5N), on fait le dépôt sur une plaque de gel en silice les 3 échantillons (T, Ech1, Ech2).
- On a changé la phase mobile de la CCM (éluant), au lieu de mettre le méthanol et l'ammoniac, on a mis 16ml de N-butanol, 4ml d'acide acétique glacial et 20ml de l'eau distillé.
- On place la plaque dans la cuve pour la migration.
- Ensuite, on enlève la plaque, on la sèche à l'air libre.
- On fait la révélation de la PPD par UV.

### **Résultat de l'essai N°3**



**Figure 16: Plaque de CCM après migration et révélation à l'UV**

- ⇒ La migration des 3 échantillons se fait dans le même niveau.
- ⇒ Les bandes présente la même coloration brune qui va du clair au foncé selon la concentration en PPD.

Les résultats obtenus après les 3 essais, ont montré :

- Pour l'essai N°1, relatif à l'extraction par l'éther dans des conditions basiques, avec une élution des échantillons dans le méthanol 20% et l'ammoniac. La pulvérisation avec l'iodoplatinate de sodium, La migration est similaire pour le témoin et les 2 échantillons (Ech1 et Ech2), ce qui confirme qu'il s'agit de la PPD au niveau des 3 échantillons. Il y a aussi une différence dans la coloration du clair au foncé qui est en relation avec la concentration de la PPD dans chaque échantillon.
- Pour l'essai N°2 (extraction par le chloroforme), la migration confirme également que les 3 échantillons sont identiques, sauf que par rapport à l'essai N°1 la migration est très remarquable avec des bandes plus claires. Ceci est en relation avec une solubilité plus importante de la PPD dans le chloroforme.
- Pour l'essai N°3 (extraction par le chloroforme et l'élution se fait par le N-butanol, l'acide acétique glacial et l'eau), la migration est similaire aux deux premiers essais même en changeant l'éluant et la révélation avec l'UV. Au cours de ce test, la présence d'eau dans l'éluant a retardé d'une manière notable la migration des échantillons.

A la lumière de ce qui précède et avec une variation des facteurs influençant la migration et l'apparition des bandes de CCM, il en ressort que l'essai N°2 représente la méthode optimale pour la détection de la PPD dans le liquide gastrique.

## *Conclusion et perspectives*

La PPD est une substance utilisée dans l'industrie pour ses propriétés tinctoriales. Au Maroc, les femmes l'utilisent en tant que teinture capillaire et comme adjuvant du henné. En raison de sa forte toxicité, ce produit est détourné de son usage habituel pour être ingéré dans un but d'autolyse ou abortif. L'intoxication à la PPD est une urgence médicale lourde. Son



diagnostic est surtout clinique, se basant sur la constatation d'un syndrome œdémateux intéressant la face et le cou et d'un tableau de rhabdomyolyse.

Le traitement est uniquement symptomatique, son objectif est de réduire l'absorption intestinale du toxique, ainsi que de prendre en charge l'œdème cervico-facial et les répercussions de la rhabdomyolyse.

En ce qui concerne les essais pratiques, réalisés pour l'optimisation de la méthode de détection de la PPD dans les viscères (liquide gastrique), la variation des différents facteurs influençant la migration et l'apparition des bandes de CCM, a permis de conclure que l'essai N°2, relatif à une extraction de la PPD dans le chloroforme et l'élution de CCM dans le méthanol 20% et l'ammoniac suivie d'une pulvérisation par l'iodoplatinate de sodium, représente la méthode la plus avantageuse pour la détection de la PPD dans le liquide gastrique ( de point de vue extraction, migration et révélation).

Les objectifs fixés initialement pour mon stage ont été atteints. Vu le risque de toxicité démontrée de la PPD, l'identification quantitative s'impose pour d'une part comprendre avec précision le niveau de toxicité (Dose-effet), et d'autre part pour mettre en évidence d'autres composés qui pourront avoir le même effet que Takaout.

La méthode GC/MS représente sans doute une piste d'amélioration en la matière.

## *Référence bibliographiques :*

- 1- BENSLAMA A., HACHIMI A., CHARRA B., MOTAOUAKKI S., 2008. L'intoxication à la paraphénylène-diamine au Maroc. Urgence 2008 chapitre 81 : 767-780.
- 2- Derkaoui A., Labib S., Achour S., Sbai H., Harrandou M., Khatouf M., et Kanjaa N., Mars 2011. Intoxication par la paraphénylène-diamine (takaout) au Maroc: à propos de 24 cas, Pan African medical journal 8 (19) : 1-11.

- 3- Bavoux C., Bonnard N., Jargot D., Lafon D., 2006. P-Phénylènediamine. Fiche Toxicologique établie par les services techniques et médicaux de l'INRS (FT : 263).
- 4- Rhalem N., 2011 Intoxication par les produits cosmétiques, Toxicologie Maroc, Publication de centre Anti-poison N°11.
- 5- F. FLESCHE, HANTSON P., MÉGARBANE B., Octobre 2011. Bulletin de société de toxicologie clinique, Infotox, N°37 (1-18).
- 6- Razik H., Benyaich H., Saif Z., Chbani A., Chouki O., Louahlia S., 19 novembre 2001. Service de médecine légale - CHU IBN ROCHD - Casablanca, Maroc.
- 7- Motaouakkil S., Charra B., Hachimi A., Ezzouine H., Guedari H., Nejmi H., Benslama A., 2006 Rhabdomyolyse et intoxication à la paraphénylène-diamine, Rhabdomyolysis and paraphenylene-diamine poisoning. Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation 25 : 708–713.
- 8- Bousliman Y., Eljaoudi R., Ait Elcadi M., Laatiris A., Bouklouze A., Cherrah Y., Novembre 2011. Toxicologie de la paraphénylène diamine. Espérance médicale. Tome 18 (N°183) : 632-636.