



Toxicologie analytique

TD 1:

Les techniques de préparation des échantillons

Objectif de la Toxicologie Analytique

Toxicologie Analytique

Mise en œuvre de moyens techniques
pour
isoler, identifier et doser un *xénobiotique*
à partir d'une matrice (le plus souvent biologique...)

*... ce n'est pas que la **nature** d'un produit
qui détermine sa **toxicité**
mais aussi sa **concentration** !*

❖ Les divers **échantillons biologiques** confiés aux laboratoires de toxicologies sont des matrices très complexes et dans la majorité des cas la détermination actuelle des **Xénobiotique dans ces milieux** ne peut être réalisée directement même avec les technologies les plus sophistiquées.

❖ **Le traitement pré-analytique des échantillons** est très certainement l'étape la plus importante du screening toxicologique et son impact sur la qualité de l'analyse est majeur

L'intérêt de la préparation des échantillons à rendre compatible

l'analyte avec le système (ou procédure) analytique à travers :

- ✿ La solubilisation ou l'homogénéisation de l'échantillon
- ✿ Elimination des résidus insolubles par filtration ou centrifugation
- ✿ Diminution des interférences
- ✿ Rupture des liaisons protéiques
- ✿ Hydrolyse des conjugués
- ✿ Concentration ou dilution de l'analyte (selon la sensibilité de la méthode)

➤ L'analyste toxicologue concentre son énergie à l'amélioration de **la préparation d'échantillon**.

➤ 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 un point essentielle suivant:

• « L'automatisation de **la préparation d'échantillons** ayant pour objectifs d'améliorer le rendement et de diminuer les erreurs manuelles. »

• **Le pré-traitement des échantillons** est donc une étape fondamentale pour ce type d'analyse.

Le mode de traitement dépend étroitement du

- ❑ Milieu disponible et de sa complexité,
- ❑ La nature du xénobiotique suspecté
- ❑ La technique utilisée pour le screening.

Les principales techniques de préparation des échantillons biologiques sont :

1. Les techniques de prétraitement :

- Hydrolyse des conjugués
- Précipitation des protéines

2. Les techniques d'extraction :

3. La dérivatisation

Techniques de prétraitement des échantillons biologiques

- 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)**, **des échantillons sanguins précipités**.

✓ **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, liquide cérebrospinal**) nécessitent avant l'étape d'extraction des étapes de **prétraitement** supplémentaires comme **la précipitation des protéines.**

✓ De plus, 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.

Techniques de prétraitement des échantillons biologiques

Ces techniques regroupent l'ensemble des techniques réalisées avant l'analyse ou avant une technique d'extraction comme l'homogénéisation, la dilution, la centrifugation.

1- Hydrolyse des conjugués

2- Précipitation des protéines

1- Hydrolyse des conjugués

Les protéines comprennent deux groupes principaux :

1 - **Les protéines simples** (ou holoprotéines) ne donnent il l'hydrolyse que des aminoacides; Parmi les protéines simples nous citerons : Les prolamines, Les histonines, Les albumines, les globulines et les scléroprotéines).

2 - **Les protéines conjuguées** (ou hétéroprotéines ou protéides) fournissent des acides aminés et des corps de nature totalement différente dérivant d'une substance appelée "groupement prosthétique".

- **Les phosphoprotéides** chez lesquels le groupement prosthétique est de nature phosphorique; ils se comportent comme des acides et sont insolubles dans l'eau. On les rencontre dans le jaune d'œuf (vitelline) et le lait (caséine).

- **Les nucléoprotéides:** ce sont des constituants des noyaux cellulaires auxquels ils confèrent une réaction acide. Ils résultent de la combinaison de protéines plus ou moins basiques avec des acides nucléiques (ou nucléiniques) qui forment les groupements prosthétiques.

-**Les chromoprotéides:** ces protéides sont colorés et leur groupement prosthétique renferme généralement du fer, du cuivre ou autre métal. Ils constituent notamment les pigments respiratoires (hémoglobine des vertébrés; hémocyanine des mollusques et crustacés).

- **Les glucoprotéides** (ou mucoprotéides): ces corps renferment un glucide ou un dérivé azoté d'un sucre en proportion souvent importante.

1- Hydrolyse des conjugués

- Les métabolites **β -glucuroconjugués** et **sulfoconjugués** des xénobiotiques 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.

1.1 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.

❖ *Hydrolyse alcaline* : n'est utile que pour le clivage des ester conjugués.

L'hydrolyse chimique acide est la plus utilisée et le 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..).

1.2 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** , parfois combinées avec une **arylsulfatase**.

L'incubation peut durer une nuit à 37°C ou 90 minutes à 50°C.

- Bien que plus longue et plus coûteuse, l'hydrolyse enzymatique est préférable à l'hydrolyse chimique car elle permet d'obtenir des extraits plus propres avec un minimum d'interférences et une meilleure stabilité des analytes d'intérêt.

L'intérêt et la nécessité de l'hydrolyse dépend 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 GCMS** : l'hydrolyse des conjugués est nécessaire avant extraction car ces derniers ne peuvent être analysés par GCMS du fait de leur poids moléculaire et leur polarité trop élevés
- **Analyse par HPLC** : ne nécessite pas d'hydrolyse car les conjugués intacts peuvent être analysés par cette technique.
- **Analyse par LCMS** : une hydrolyse, surtout enzymatique, est nécessaire dans presque toutes les procédures de screening dans les urines par LC-MS(/MS)

METABOLISME DES MEDICAMENTS

❖ Le métabolisme d'un médicament correspond à la transformation par une **réaction enzymatique** d'un médicament en un ou plusieurs composés, dits métabolites qui peuvent être actifs **pharmacologiquement**, inactifs **pharmacologiquement** ou parfois **toxiques**.

❖ Le métabolisme est une des phases de l'élimination d'un médicament, les différentes étapes du métabolisme conduisent à la formation de **substances hydrosolubles** plus facilement éliminées par les milieux aqueux que sont **les urines, la bile, la salive ou la sueur.**

❑ De nombreux tissus peuvent réaliser le métabolisme des médicaments : foie, rein, poumon, intestin... **Le principal site de métabolisme des médicaments est le foie** : les hépatocytes sont riches en enzymes impliquées dans le métabolisme.

❑ On distingue 2 grandes phases dans le métabolisme des médicaments :

1. Les réactions de phases I

2. Les réactions de phases II

1.1. Les réactions de phases I

Etape d'oxydation des médicaments qui conduit à la formation de métabolites, qui peuvent soit être éliminés directement s'ils ont atteint un degré d'hydrosolubilité suffisant, soit poursuivre les processus de métabolisation par la phase II.

Les réactions de phase I sont des réactions :

1. Oxydation
2. Hydrolyse

- 1. L'oxydation** : qui impliquent des mono-oxygénases telles que le cytochrome P450. Elles ont essentiellement lieu au niveau des microsomes hépatiques.
- 2. L'hydrolyse** : qui ont lieu au niveau des organes (rein, foie, intestin, poumon..) mais aussi au niveau du plasma.

Les métabolites formés par **les réactions de phase I** ont des groupes fonctionnels: hydroxyles (OH), amines (NH₂) ou carboxyles (COOH) qui peuvent ensuite être conjugués par les réactions de phases II.

1.2. La phase II

- La phase II est une phase de conjugaison qui aboutit à la formation de **substances conjuguées**, hydrosolubles et facilement éliminées par **les urines ou la bile**.
- Les métabolites ou les médicaments, subissent différentes réactions de conjugaison : **glycuro- (ou glucuro ou glucuruno) conjugaison** ; **sulfo-conjugaison** ; pour donner un produit conjugué qui sera éliminé.

R-OH =
Médicament
ou
métabolite



R-O-R' =
Médicament conjugué
ou
métabolite conjugué



Élimination

Groupe transféré R'	Enzymes impliquées	Nom de la réaction
Acide D glucuronique	UDP glucuronyltransférase	Glucuro conjugaison
Sulfate	Sulfotransférase	Sulfo conjugaison
Méthyl	méthyltransférase	alcylation
glutathion	Glutathion transférase	
acétyl	Acétyl transférase	acétylation



Aspect analytique des benzodiazépines

- Les BZD sont les médicaments psychotropes les plus souvent prescrits dans le traitement de l'anxiété et des troubles du sommeil.
- Elles sont efficaces, très bien tolérées et ne présentent que peu d'effets secondaires.
- Cependant, elles peuvent entraîner d'une part une accoutumance et une dépendance et d'autre part un syndrome associant, à des degrés divers, une altération de l'état de conscience à des troubles du comportement et de la mémoire

Indication du dosage

– Aide au diagnostic d'intoxication aiguë (volontaire ou accidentelle) : il existe des techniques rapides de dépistage pour une orientation qualitative et des techniques quantitatives pour préciser la molécule en cause et le niveau de l'intoxication.

Les symptômes cliniques d'intoxication aiguë isolée par une benzodiazépine sont principalement des troubles du comportement avec agitation, agressivité,

Prélèvement

- Urines : recueil d'un échantillon. La recherche de BZD peut être couplée à celle d'autres drogues (amphétamines, cocaïne, opiacés, cannabis...). L'élimination dans les urines dure plusieurs jours (variable selon les molécules).

■ CONSERVATION ET TRANSPORT

Conservation du plasma/sérum décanté et urines plusieurs jours à + 4 °C ; plusieurs mois à – 20 °C.

Transport à + 4 °C.

Mécanisme d'action et propriétés pharmacologiques

Les benzodiazépines se fixent spécifiquement sur le récepteur GABA A (récepteur canal Chlore). Le site de fixation des BZD sur ce récepteur est appelé sous unité α .

Méthodes de dosage

I- Recherche des benzodiazépines par coloration, Après hydrolyse acide à partir d'urines, les benzodiazépines forment avec le réactif de Tréfouël un anneau de coloration violette.

II- Dosage des benzodiazépines Par spectrophotométrie: Les benzodiazépines sont extraites à partir du sang en milieu acide à pH=6 par l'éther. Le dosage consiste à rechercher le maximum d'absorption.

exercice

Les pompiers se présentent au SAU (**S**ervice d'**A**ccueil des **U**rgences) vers 02 h du matin avec une femme âgée de 30 ans présentant une intoxication médicamenteuse volontaire (IMV) à l'IMOVANE à (20 cp) et ROHYPNOL à (15 cp); ces médicaments appartient à la famille des BZD. Elle aurait pris les médicaments vers 21 h la veille. Elle est consciente, somnolente mais stimuable.

- 1. Quel test diagnostique peut-on utiliser ? modalité**
- 2. Donnez la définition des BZD.**
- 3. Quel est le mode d'action des BZD**

2- Précipitation des protéines

Avant d'aborder les différentes méthodes de prétraitement des échantillons, il faut rappeler qu'il est tout de même possible d'analyser

- Directement certains échantillons biologiques liquides
- 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.

❖ **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) nécessitent avant l'étape d'extraction des étapes de prétraitement supplémentaires comme **la précipitation des protéines**.

Les caractéristique des protéines

Les protéines sont chargées:

1. Positivement en milieu fortement acide
2. Négativement en milieu fortement basique.

La précipitation des protéines peut être obtenue par modification de:

1. La force ionique (utilisation d'une solution saline saturée de sulfate d'ammonium),
2. pH (ajout en petite quantité d'une solution d'acides forts : acide perchlorique ou trichloracétique essentiellement, ou ajout d'une solution basique toujours en faible volume : sulfate de zinc/hydroxyde de sodium ou sulfate de zinc/hydroxyde de baryum),
3. La constante diélectrique (ajout d'acétonitrile, méthanol, éthanol ou acétone).

- L'échantillon est centrifugé pour produire un surnageant clair contenant le composé recherché.
- Il est important d'utiliser un solvant dans lequel l'analyte soit hautement soluble, dans le cas contraire il pourrait précipiter avec les protéines.
- Diluer plus de trois fois le plasma (ou le sérum) avec le solvant organique va entraîner une précipitation de 99 % des protéines), mais en contre partie la sensibilité de la méthode va diminuer

L'avantage

- Cette méthode présente de nombreux avantages qui sont sa rapidité, sa simplicité et son utilisation pour l'analyse de molécules très hydrosolubles et donc difficilement extractibles.
- Cette méthode est particulièrement bien adaptée au suivi thérapeutique et à la toxicologie.

Démixtion

❖ La demixtion est basée sur l'élimination des protéines dans l'échantillon, à l'aide d'un solvant organique miscible à l'eau.

La méthode

- ❖ Dans un premier temps on mélange l'échantillon et le solvant (en général il s'agit de l'**acétonitrile**)
- ❖ puis on ajoute un sel en excès (carbonate de sodium, chlorure de potassium, ou chlorure de sodium). L'acétonitrile n'est alors plus miscible à l'eau.
- ❖ Après centrifugation, on retrouve du fond du tube vers le haut le sel en excès, la phase aqueuse saturée de sel, le précipité de protéines et enfin la phase organique contenant l'analyte.

Intérêt

- ❑ Cette méthode est particulièrement adaptée au suivi thérapeutique et à la toxicologie.
- ❑ L'étape de précipitation des protéines correspond souvent à une étape de prétraitement des échantillons avant extraction. En effet, des matrices très chargées en protéines peuvent entraîner des émulsions en ELL et une première étape de précipitation peut se révéler indispensable.