

Cours Toxicologie Analytique

La toxicologie analytique a pour objet l'étude des différentes méthodes analytiques (chromatographie en phase gazeuse, chromatographie en phase liquide haute performance, spectrophotométrie d'absorption atomique ...) mises en œuvre pour rechercher les toxiques dans les prélèvements biologiques afin de confirmer une suspicion d'intoxication.

A- Préparation des échantillons biologiques pour l'analyse toxicologique

- Les divers échantillons biologiques des laboratoires de toxicologie sont des matrices très complexes
- La détermination des xénobiotiques dans ces milieux ne peut se faire directement
- Le **traitement pré-analytique** des échantillons est l'étape la plus importante du screening toxicologique, et la qualité du résultat de l'analyse.
- Les échantillons biologiques des laboratoires de toxicologie doivent être rapidement analysés
- Conservation entre 2 à 8°C, jusqu'à l'analyse...

La cause : les composants biologiques et leurs métabolites sont instables à température ambiante et en présence de la lumière

Remarque :

- Si des analyses médico-légales sont à prévoir, les échantillons restant devront être conservés à -20°C jusqu'à la conclusion de l'enquête...
- Du fluorure de sodium à 2 % p/v peut être ajouté pour inhiber les micro-organismes et quelques enzymes de dégradation.

Le but du prétraitement :

- La solubilisation ou l'homogénéisation de l'échantillon
- Élimination des résidus insolubles par filtration ou centrifugation
- Cassage des liaisons protéiques
- Hydrolyse de molécules
- Concentration ou dilution de l'analyte (selon la méthode)
- Stabilisation ou dérivatisation de l'analyte pour améliorer son extraction et/ou sa détection

Chromatographique

Les techniques de prétraitement :

- Hydrolyse des conjugués
- Précipitation des protéines

Les techniques d'extraction :

- Extraction liquide-liquide
- Extraction en phase solide

La dérivatisation.

I. Hydrolyse des conjugués

- Les métabolites β -glucuroconjugués* et sulfoconjugués** des xénobiotiques sont des dérivés très stables
- Leur présence peut gêner l'analyse
- Leur hydrolyse libère les fractions libres de molécules parents ou de molécules liés au métabolisme des * et **
- Le clivage des conjugués concerne surtout les urines et peut être effectué par hydrolyse chimique rapide ou enzymatique douce, mais lente.

*Glucuroconjugaison: réaction chimique formant une nouvelle molécule par fixation sur un substrat d'un acide glucuronique grâce à la glucuronosyltransférase.

**Sulfoconjugaison: fixation d'un ion sulfate sur un substrat par le Coenzyme Phosphoadénylyl phosphosulfate (P.A.P.S.) se font dans le foie humain pour éliminer un produit toxique.

Les nouvelles molécules sont solubles dans l'eau et facilement éliminées par les reins.

II. Hydrolyse chimique

• **Hydrolyse chimique acide** : Obtenue par action d'un acide fort à 100°C, en général de l'HCl 37 % pendant 15 minutes. L'hydrolyse chimique acide est la plus utilisée, elle permet un clivage rapide avec un recouvrement élevé.

• **Hydrolyse alcaline** : N'est utile que pour le clivage des esters conjugués.

Son inconvénient majeur : dégradation des échantillons sensibles aux pH extrême (Benzodiazépines, dérivés opiacés...).

III. Hydrolyse enzymatique

• Mise en contact des urines avec un enzyme dans des conditions connues de pH et de t°.

• Les enzymes les plus utilisées sont la β -glucuronidase d'Escherichia coli

• Plus longue, plus coûteuse, l'hydrolyse enzymatique est préférable à l'hydrolyse chimique

• Elle permet d'obtenir des extraits avec un minimum d'interférences et une meilleure stabilité des analytes.

L'intérêt et la nécessité de l'hydrolyse dépend 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 HPLC** : ne nécessite pas d'hydrolyse. Les conjugués intacts peuvent être analysés par cette technique

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 LCMS** : une hydrolyse, surtout enzymatique, est nécessaire dans presque toutes les procédures de screening dans les urines par LC-MS(/MS)

IV. Précipitation des protéines :

Méthode de traitement d'échantillon (ex. **sang**).

Principe : les protéines étant chargées, on peut les faire précipiter en jouant sur :

• La force ionique : ajout d'une solution saline saturée de sulfate d'ammonium

• pH : ajout de petites quantités de solutions d'acides forts

• La constante diélectrique : ajout d'acétonitrile, de méthanol, d'éthanol ou d'acétone

• Séparation des protéines par centrifugation, on récupère le surnageant. Cette méthode permet d'enlever plus de 98% des protéines dans un plasma humain.

Avantages de la technique :

• Rapidité, • Simplicité, • Utilisation directe pour l'analyse de molécules hydrosolubles

B- Les différents groupes de technique d'analyse toxicologique :

1. Colorimétrie :

Une substance mise en contact avec un réactif produit une réaction colorée

Exemples :

• réaction de Forrest pour les phénothiazines

• réaction de Trinder pour les salicylés

2. Spectrophotométrie UV :

• L'identification du toxique se fait sur la détermination du spectre UV de la molécule

• Peut être réalisée directement sur la toxine ou après son couplage avec un autre composé chimique.

Avantages : méthode rapide, peu coûteuse

Inconvénients : présence d'interférences.

3. Immunologiques :

Réaction antigènes-anticorps spécifiques de la toxine recherchée.

On distingue :

• les méthodes en phase homogène sans étape de séparation

• Les méthodes en phase hétérogène avec une phase de séparation

Avantages : méthodes souvent rapides.

Inconvénients : sensibilité variable, coût élevé

4. Enzymatiques :

- Réaction d'une enzyme spécifique à la toxine recherchée
- Mesure la quantité de produit résultant de la réaction enzymatique après un temps déterminé.

Avantages : peu coûteux, rapide

Inconvénient : peu spécifique.

5. Chromatographies :

- Séparation des molécules en fonction de leurs affinités
- Permet de séparer des toxines en fonction de leurs nature chimiques

CCM :

- Utilisée pour la recherche qualitative ou semi-quantitative des médicaments et des drogues.

Avantages : méthode peu coûteuse.

Inconvénients : peu sensible, quantification peu précise très longue, incompatible avec l'urgence.

En phase gazeuse (CG) Ou liquide haute performance (HPLC) :

- Techniques séparatives, couplées à différentes méthodes de détection
- Puissantes mais coûteuses
- Nécessitent un personnel très spécialisé.

Avantages : identification et quantification de nombreuses substances à très faibles concentrations

Inconvénients : délais long d'obtention des résultats

Les techniques d'analyses des métaux sont très diversifiées : activation neutronique, fluorescence, chromatographic en phase liquide de haute performance ou en phase gazeuse : speciation. On a le plus souvent recours à la spectrométrie d'absorption atomique et la torche à plasma couplée à la spectrométrie de masse.

1) La spectrométrie d'absorption atomique en flamme

est une méthode applicable pour les milieux biologiques au calcium, lithium, zinc, cuivre et fer.

2) La spectrométrie d'absorption en four graphite est sensible et convient à la majorité des éléments. De nombreuses interférences chimiques sont réduites en utilisant une petite plaque en graphite pyrolytique (la plate-forme de l'vov) ou des additifs modificateurs. L'effet Zeeman est efficace pour la correction des absorptions non spécifiques. Le four présente l'avantage d'une faible consommation de l'échantillon (100 à 200 µl), tandis que la flamme consomme généralement plusieurs millilitres par minute. Les techniques par absorption atomique peuvent faire appel à la méthode des hydrures (Se, As, Hg, Sn). Elle permet de sensibiliser la mesure. Un cas particulier est représenté par le Hg qui possède la propriété particulière de dégager une vapeur atomique stable à température ordinaire.

3) La spectrométrie d'émission optique en plasma induit (ICP-OES) est une méthode en plein essor. La méthode multi-élémentaire (dans le sérum, détermination conjointe possible par exemple d'arsenic, cadmium, zinc, plomb) présente un très large domaine de mesures et les éventuelles perturbations spectrales peuvent être minimisées par un monochromateur de haute résolution (spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif)

4) L'ICP-MS permet d'obtenir une limite de détection comparable à la spectrométrie d'absorption atomique tout en mélangeant les possibilités multi-élémentaires.

Les applications biologiques en sont très étendues (près de 90 %) à tous les minéraux de la classification périodique du dosage simple à leur speciation. Il peut avoir une gamme dynamique allant jusqu'à six ordres de grandeur. Il est principalement utilisé dans le domaine de l'analyse des traces et des ultra traces. (5min/échantillon pour la gamme complète des éléments traces).

5) La fluorescence X est également une analyse multiélémentaire simple, rapide et sensible (intérêt pour les dosages tissulaires).

6) L'activation neutronique consiste à irradier le matériel biologique par un flux de neutrons thermiques au moyen d'un réacteur nucléaire. Seuls les laboratoires très spécialisés peuvent donc utiliser ce type de méthode. Les isotopes radioactifs obtenus sont dosés par spectrométrie gamma.

7) Speciation : La chromatographie en phase liquide de haute performance (HPLC) ou en phase gazeuse (CPG) est utilisable en fonction des couplages, pour des dosages multi-élémentaires totaux, pour la spéciation (As, Cd, Cr, Ni, ...) ou encore pour des études de biodisponibilité. Pour le type de détection, on a le plus souvent recours à la spectrométrie de masse, absorption atomique et ICP.

Le choix de la technique est un compromis qui fait appel à nombre de critères à classer en fonction des objectifs du laboratoire (nature de l'élément à doser, nature de l'échantillon, ...).

Toxicologie clinique :

C'est l'analyse toxicologique pour confirmer le niveau d'exposition . Elle s'intéresse aux causes et circonstances, aux doses toxiques, au mécanisme d'action toxique, aux symptômes et aux lésions observées, au diagnostic clinique et différentiel et au traitement des intoxications.

Ainsi le domaine d'application de la toxicologie, autrefois limité à l'étude des empoisonnements volontaires ou accidentels et des intoxications de nature professionnelle, s'est étendu peu à peu, au fur et à mesure que la nature du toxique se précisait, pour une meilleure appréciation de leurs effets.

Actuellement, elle s'applique à l'étude des effets nocifs potentiels des médicaments, des produits phytosanitaires utilisés en agriculture, et de tout produit chimique nouveau. Il y'a hospitalisation lors d'une intoxication aiguë et prise en charge médicale