

## **CHAPITRE 1 : 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 en dépend.
- 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 :** cours meth. anal. M1

- Extraction liquide-liquide
- Extraction en phase solide

### **La dérivatisation.**

## **I. Hydrolyse des conjugués**

- Les métabolites  $\beta$ -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.)

Ce 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  $\beta$ -glucuronidase d'Escherichia coli
- Plus longue, plus couteuse, 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

FB/ Domaine SNV : Biologie, Agronomie, Science Alimentaire, Ecologie

[www.facebook.com/ DomaineSNV](https://www.facebook.com/DomaineSNV)

## CHAPITRE 2 : Les produits dopants (dopage sportif)

### LE DOPAGE, QU'EST-CE QUE C'EST ?

- C'est l'utilisation de substances interdites
- Pour augmenter les capacités physiques ou mentales d'un sportif
- Pour masquer l'emploi de ces substances pendant la compétition sportive
- Pratique interdite
- Porte préjudices (dégâts) au physique et psychique de l'athlète.

### Il existe plusieurs familles de produits dopants :

#### 1) Les stimulants

##### Effets recherchés :

- Augmenter la capacité à se concentrer
- Baisser artificiellement la sensation de fatigue.

##### Effets secondaires négatifs :

- dépendance psychique,
- troubles psychiatriques graves paranoïa, dépression, fatigue, psychoses, agressivité
- Troubles du rythme cardiaque
- Hypertensions artérielles.

#### 2) Les agents anabolisants

##### Effets recherchés : Développement de la masse musculaire.

##### *Les stéroïdes anabolisants :*

*Analogues synthétiques de la testostérone, modifiés chimiquement afin de diminuer les effets androgènes.*

##### Effets néfastes :

- Troubles du comportement, agressivité
- Rupture tendineuse, déchirure musculaire
- Cancer du foie et de la prostate
- Arrêt de la croissance, cardiomyopathie
- Développement de la pilosité, perturbation des cycles menstruels et infertilité (femmes)
- Atrophie des testicules et infertilité (hommes).

#### 3) Les cannabinoïdes

##### Effets recherchés :

- Diminution du stress
- Relâchement des muscles
- Effacement de la douleur.

##### Effets néfastes :

- Baisse de la vigilance, troubles de la mémoire,
- Accoutumance et dépendance,
- Risques respiratoires et problèmes vasculaires graves.

#### 4) Les hormones

L'hormone de croissance (en anglais, hGH)

##### Recherchée par les athlètes qui trichent pour deux raisons principales :

Augmentation de la masse musculaire

Augmentation de l'endurance physique en résistant à la fatigue.

### Effets néfastes :

- Croissance anormale des organes
- Hypertrophie osseuse
- Hypertension et crises et/ou arrêt cardiaques
- Obstruction des vaisseaux due à la viscosité du sang.

### **5) Les glucocorticoïdes**

Effets recherchés : diminution de la fatigue.

### Effets néfastes :

- Fragilisation des tendons, des muscles et des os
- Diminution des défenses immunitaires.

### **6) Les agents manquants : les diurétiques**

#### Effets recherchés :

- perte du poids
- Accélérer ou retarder l'élimination des substances interdites.

#### Effets néfastes :

- Déshydratation et problèmes rénaux
- Troubles du rythme cardiaque
- Hyperglycémie.

### **7) L'autotransfusion**

- Pendant l'entraînement 1 L de sang est prélevé à l'athlète
- Ce sang est conservé selon un protocole rigoureux
- Une semaine avant la compétition, il lui est injecté.

*En fournissant plus de globules rouges, la capacité de transport d'oxygène aux muscles, l'endurance musculaire et les performances de l'athlète sont ainsi augmentés. Les effets peuvent se prolonger pendant 2 semaines.*

#### Les principaux risques :

- Réaction de destruction des globules rouges,
- Réactions allergiques,
- Transmission d'infections bactériennes ou virales,
- Augmentation de la viscosité du sang (problèmes cardiovasculaires).

## **L'analyse des dopants :**

### **I. L'analyse sanguine**

- Certains dopants augmentent le nombre d'hématies dans le sang.
- L'appareil de comptage compare les globules rouges en fonction de leur taille, forme, nature
- On peut donc identifier les globules rouges externes à l'organisme.

### **Dépistage des transfusions d'un donneur :**

- Chaque globule rouge possède un groupe d'antigènes spécifiques
- Après marquage des antigènes avec un colorant fluorescent, le « cytomètre » peut faire la différence entre les cellules qui portent des antigènes différents.

### **II. L'analyse des urines :**

#### 1. Par la spectrométrie

- Pour détecter les anabolisants exogènes
- Les substances dans l'urine sont ionisées
- Ces ions sont accélérés par un champ électrostatique
- Un champ magnétique se crée, provoquant la déviation de la trajectoire des ions

- On fait varier l'intensité du champ magnétique, pour détecter et mesurer les proportions de tous les constituants de l'échantillon
- Un détecteur relié à un ordinateur qui traite les résultats et les compare à une base de données.

2. Par la chromatographie en couche mince CCM :

- Basée sur la différence de solubilité d'une substance dans 2 phases, l'une stationnaire (support) et l'autre mobile (solvant)
- Les substances solubles migrent plus vite et plus haut que les substances moins solubles dans le solvant utilisé
- Le solvant s'élève par capillarité le long du support et entraîne avec lui les différents constituants du mélange analysé.



### CHAPITRE 3 : L'analyse du Δ-9-tétrahydrocannabinol (THC)

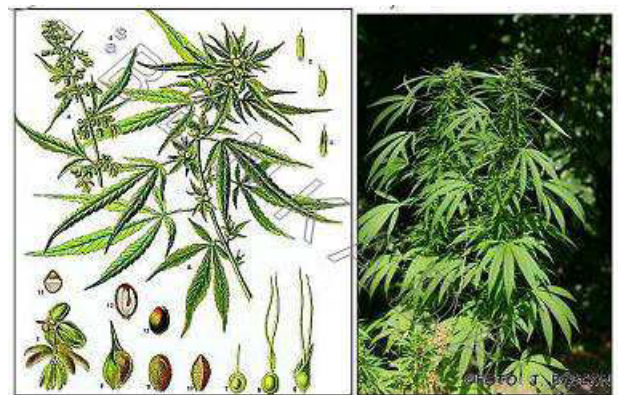
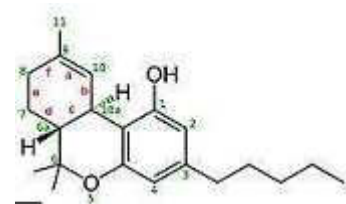
- Le Δ-9-tétrahydrocannabinol (THC) est le cannabinoïde le plus abondant dans la plante de cannabis
- Possède des propriétés **psychoactives** agissant sur le psychisme en modifiant le **rythme cérébral**
- Possède des vertus **anti-inflammatoires** et **anti-métastatiques**

#### Systématique botanique

- o Embranchement : Phanérogames
- o S/embranchement : Angiospermes
- o Classe : Dicotylédones
- o Ordre : Urticales
- o Famille : *Cannabinaceae*
- o Genre : *Cannabis*
- o Espèce : *Cannabis sativa*
- o Sous-espèce : ***Cannabis sativa* ssp. Indica**

- La teneur en THC varie en fonction de la partie de la plante :
  - o 10 % dans les fleurs
  - o 1% dans les feuilles
  - o 0,1% dans les tiges
  - o < 0,03 % dans les racines

- Le cannabis est fumé directement (**marijuana**)
- Ou bien après extraction de la résine (**hachich**)



Aspects morphologiques de *Cannabis sativa*

#### La loi algérienne :

14 Dhou El Kaada 1425 correspondant au 26 décembre 2004

#### JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE N° 83

Loi n° 04-18 du 13 Dhou El Kaada 1425 correspondant au 25 décembre 2004 relative à la prévention et à la répression de l'usage et du trafic illicites de stupéfiants et de substances psychotropes.

#### CHAPITRE III

#### DISPOSITIONS PENALES

Art. 12. — Est punie d'un emprisonnement de deux (2) mois à deux (2) ans et d'une amende de 5.000 DA à 50.000 DA, ou de l'une de ces deux peines, toute personne qui, d'une manière illicite, consomme ou détient à usage de consommation personnelle des stupéfiants ou des substances psychotropes.

### Les effets secondaires du THC

- Euphorie, distorsion de la perception du temps, hallucinations, Vertiges,
- Troubles de la mémoire et de la concentration,
- Troubles du langage et de la coordination motrice,
- Augmentation du rythme cardiaque,
- Trouble de la coagulation des plaquettes sanguines,
- Rougissement de la conjonctive,
- Réduction de la sécrétion de salive,
- Trouble digestif (de la production de suc gastrique),
- Malformation du fœtus : atteinte à la performance intellectuelle du bébé

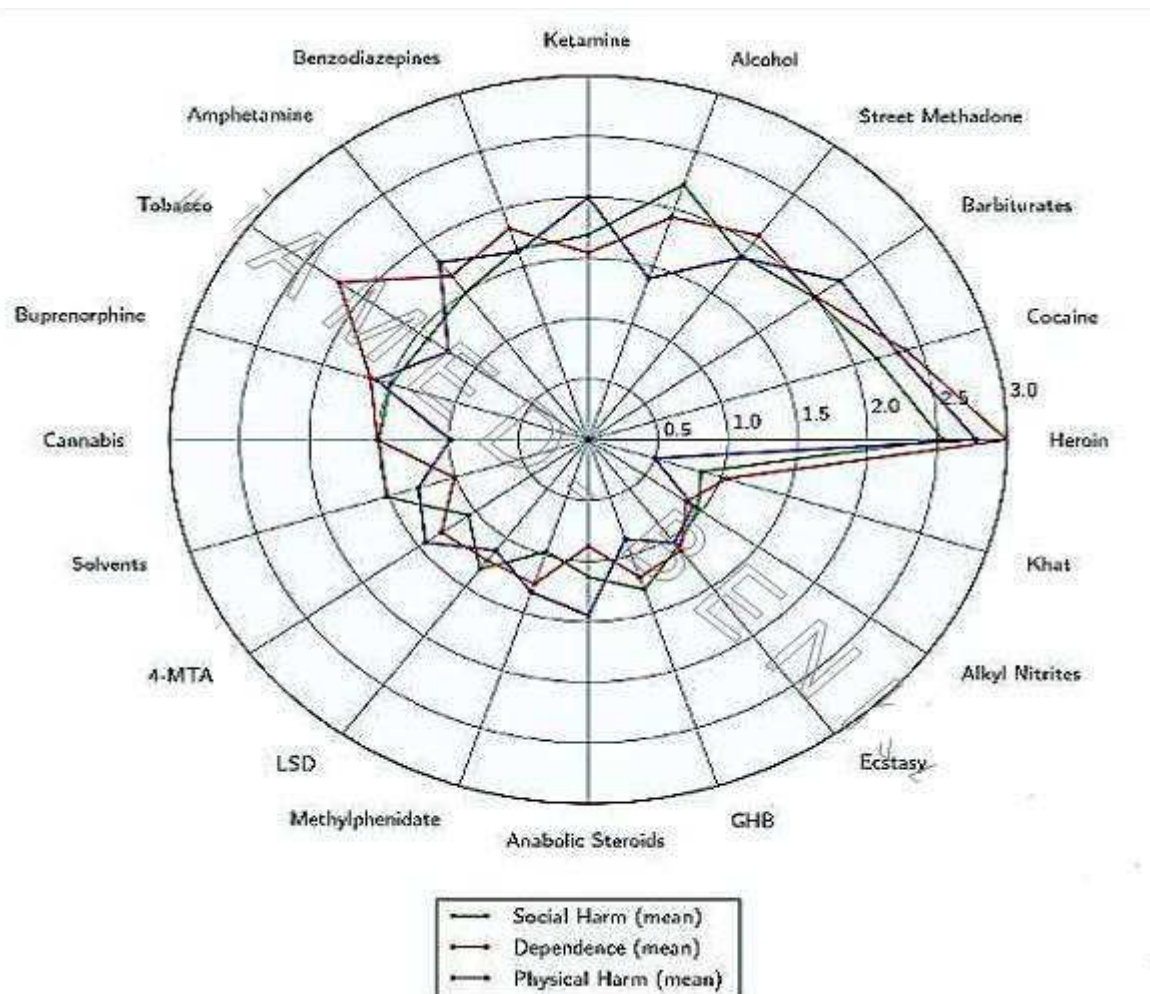
### Propriétés thérapeutiques

Médicalement, le THC possède des propriétés :

- Stimule l'appétit
- Analgésiques
- Relaxant des muscles
- Antiépileptique
- Antibiotique
- Réducteur de la pression oculaire
- Bronchodilatateur

*En Allemagne, Autriche, États-Unis, Canada, Pays-Bas, Suisse les médecins sont autorisés à prescrire du THC.*

### Influences sociales de différentes drogues sur la santé de l'être humain

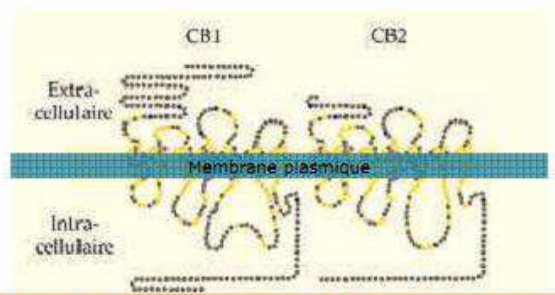


### Sites d'action : les récepteurs cannabinoïdes

Sont nommés CB1 (type I) et CB2 (type II)

Se trouvent sur les membranes des cellules :

- Cérébrales, de la moelle épinière • Cardiaques, • Intestinales, • Pulmonaires, • Des voies urinaires, de l'utérus, des testicules,
- De la rate et des globules blancs



Sites d'action du THC: Récepteurs de nature protéique

### Métabolisme du Δ-9-THC

- Rapidement absorbé par voie orale
- Son 1er passage hépatique retient de 80 à 90 % la dose absorbée
- Par inhalation, la résorption est au contraire très importante
- Le Δ-9-THC est oxydé en 11-hydroxy-Δ-THC (analgésique, AI)
- L'élimination est très lente : le Δ-9-THC peut être retrouvé dans le sang après 5 semaines.

### Intoxications

Tachycardie, troubles de la vision, hypotension, crises de panique et de convulsions

### Dépendance

Ne cause pas de dépendance physique, mais une dépendance psychologique

### Propriétés anti-tumorales

- Selon certaines études, le THC permet de réduire la taille des tumeurs cancéreuses
- Le THC est reconnu par le récepteur CBR de la cellule tumorale
- Il stimule alors la production de céramide dans la cellule tumorale
- La céramide augmente la production de la protéine P8.
- Ce qui déclenche l'apoptose, processus de mort cellulaire programmée

### Dépistage et dosage du Δ-9-tétrahydrocannabinol (THC)

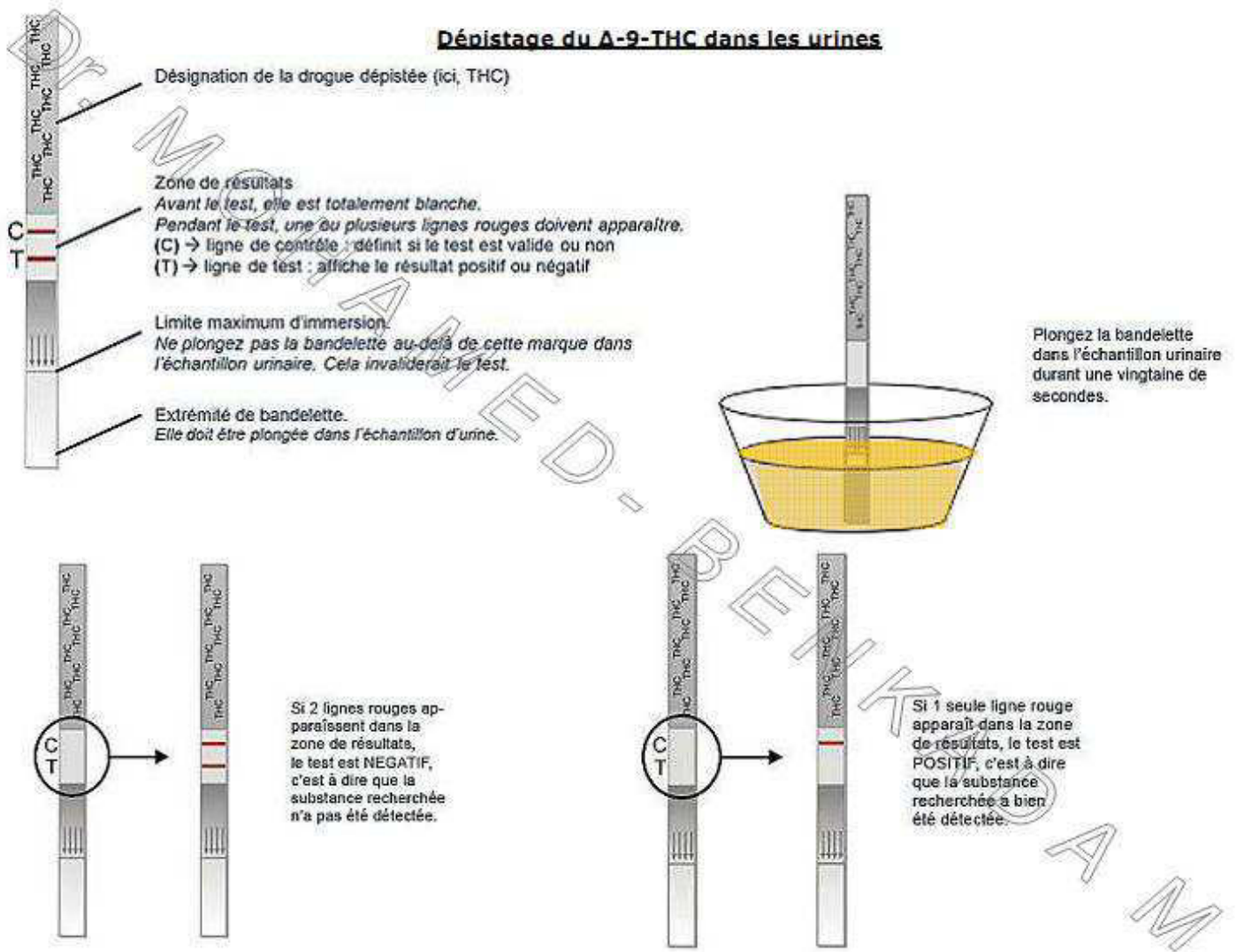
Milieux biologiques de dépistage de cannabis :

	Cannabinoïdes majoritaires	Délai maximum de détection	Domaine d'intérêt	Méthodologies disponibles
Urines	THC-COOH (inactif)	Consommation occasionnelle : 2 à 7 jours Consommation régulière : 7 à 21 jours	Dépistage d'une consommation	Oui Nombreux tests rapides
Salive	THC (actif)	2 à 10 heures	Dépistage d'une consommation récente	Non Pas de tests rapides
Sueur	THC	Très variable	Peu d'intérêt	Non Pas de tests rapides
Cheveux	THC	Infini	Révélation et suivi d'un usage régulier	Oui CPG-SM
Sang	THC 11-OH THC (actif) THC-COOH	2 à 10 heures	Confirmation, identification, dosage	Oui CPG-SM

GC-MS : chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse ; THC : Δ<sup>9</sup>-THC ; (inactif : (dé)pourvu d'effets psychoactifs

#### 1. Dépistage du THC dans les urines :

- Le dosage le plus souvent pratiqué
- Le plus incertain
- Son intérêt est **qualitatif** et non quantitatif
- Le niveau de positivité est établi à 50 ng/ml
- Délai de positivité des consommateurs réguliers : 2 semaines (stockage du THC dans les tissus adipeux)



### Dépistage $\Delta$ -9-THC dans les urines

#### **Le principe :**

- immunochromatographie basée sur une réaction antigène – anticorps
- La bandelette contient des anticorps spécifiques au cannabinoïde (dérivé carboxylique du THC)
- Test positif : l'anticorps présent sur la bandelette se lie au dérivé THC, on observera une absence de coloration dans cette zone.
- Test négatif : une bande rose dans la zone de la bandelette sur laquelle est fixé l'anticorps. Il s'agit donc d'une lecture inverse

#### **2. Dépistage du THC dans le sang**

- Le délai de positivité : 6 à 8 heures seulement
- Identification très spécifique suivie d'un dosage quantitatif : GC-SM\*
- Méthode actuellement la plus fiable

*\*chromatographie en phase gazeuse avec détection par spectrométrie de masse*

#### **3. Dépistage du TC dans les cheveux**

- Le délai de positivité est lié à la longueur du cheveu, correspondant à 1 cm/mois de pousse.
- Ce dosage présente un intérêt médico-légal pour situer la consommation dans le temps, la trace étant permanente.
- On notera que ni le lavage ni les cosmétiques ne font disparaître la présence du THC du cheveu,
- Ils baissent juste sa concentration

## CHAPITRE 4 : La toxicologie clinique

### **Le screening toxicologique aux urgences :**

#### **Définition :**

- Décrire les méthodes d'analyse toxicologique qualitative et quantitative
- Exposer les principaux pièges interprétatifs pour l'urgentiste
- Préciser la place de l'analyse toxicologique dans la prise en charge d'une intoxication aiguë

#### **Points essentiels**

- L'approche clinique d'identification d'un toxique :
- L'anamnèse\*
- L'examen clinique
- L'électrocardiogramme
- Une biologie minimale
- La méthode qui détecte toutes les toxines ensemble n'existe pas
- Le dialogue entre le clinicien et le biologiste est essentiel pour décider de la liste minimale d'analyses toxicologiques à effectuer en urgence.

*\*Ensemble des renseignements fournis au médecin par le malade ou par son entourage sur l'histoire d'une maladie ou les circonstances qui l'ont précédée.*

#### **Points essentiels**

- L'analyse biologique l'emporte sur l'analyse toxicologique, car elle permet d'évaluer la sévérité de l'intoxication
- Le dépistage sanguin par immunochimie des benzodiazépines, des antidépresseurs tricycliques, des opiacés n'a pas sa place en urgence
- Le dosage sanguin est indiqué s'il a une incidence sur la prise en charge médicale.
- Les prélèvements à visée conservatoire doivent être systématiques (sérothèque et urothèque).

#### **Intoxications médicamenteuses volontaires ou accidentelles :**

- o Une cause fréquente d'admission dans les services d'urgences
- o L'éventail des molécules en cause est toujours en évolution.
- o Les médicaments les plus fréquemment en cause :
  - Les antidépresseurs tricycliques
  - les barbituriques
  - les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine
  - les benzodiazépines
  - les cardiotropes.

#### **L'approche clinique des patients intoxiqués :**

La prise en charge d'une intoxication aux urgences est surtout symptomatique

#### **Méthodes d'analyses en urgences :**

- De nombreuses techniques existent
- Les possibilités d'identification et de quantification de chaque toxique dépendent des méthodes disponibles dans le laboratoire de toxicologie.

#### **Le clinicien doit connaître :**

- Celles qui lui sont accessibles
- Leurs limites
- Leurs contraintes de temps afin de ne pas les prescrire inutilement.

Il existe deux types d'analyses pour les urgentistes :

- 1. Le dépistage :** obtention de résultats qualitatifs ou semi-quantitatifs
- 2. Le dosage :** résultats quantitatifs

Le « screening » toxicologique associe plusieurs méthodes de dépistage et de dosage.

**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

## CHAPITRE 5 : Les additifs alimentaires

### **Les additifs alimentaires :**

- Produits ajoutés aux denrées alimentaires destinés à l'alimentation humaine et/ou animale.
- Les additifs choisis par les industriels doivent avoir été préalablement autorisés
- Ils doivent figurer dans une « liste positive »
- Tout additif non porté dans cette liste est illicite
- Les organismes qui établissent cette liste sont :
  - L'EFSA (Autorité Européenne de Sécurité des Aliments)
  - FDA (The Food and Drug Administration) aux USA
  - Santé Canada (ministère de la Santé du Canada)
- Le terme « additif » : usage à très faible dose
- L'additif a souvent une formule moléculaire simple

### **Agents de conservation et colorants :**

- Permettent de produire en grande quantité
- De transporter les denrées sur de plus longues distances
- Assurent un aspect appétissant jusqu'au consommateur

### **Principaux groupes d'additifs autorisés :**

- Agents colorants codés E1xx
- Conservateurs alimentaires codés E2xx
- Antioxydants codés E3xx
- Agents de texture codés E4xx
- Les édulcorants
- Exhausteurs de goût et acidifiants, de code 5xx.

### **Rôle des additifs alimentaires :**

- Conservateurs alimentaires
- Colorant
- Exhausteur de goût
- Régulateurs du pH
- Augmenter la productivité des élevages

*Exemple les hormones de croissance et l'introduction d'antibiotiques dans l'alimentation animale.*

### **Les symptômes d'intolérance :**

- Réactions allergiques :
  - Démangeaisons (prurit) de la gorge ou de la peau
  - Hypersécrétion bronchique
  - Eczéma
  - Crise d'asthme
  - Gonflement du visage et des muqueuses respiratoires.
- « Choc anaphylactique », symptôme grave pouls accéléré, chute de tension, coma et risque de mort...!

**Autres effets négatifs des additifs alimentaires :**

- Hyperactivité :
  - Perturbe l'efficacité scolaire de l'enfant
  - S'accompagne de réactions agressives
- Problèmes intestinaux :
  - Provoquer une diminution de l'absorption et un bouleversement de la flore intestinale
  - Irritent le tube digestif et perturbent la digestion.
  - Ralentissement de l'absorption des nutriments au niveau de l'intestin grêle

**Autres effets négatifs des additifs alimentaires :**

- Effet carcinogène :

Les nitrites provoquent la formation de nitrosamines et de nitrosamides cancérigènes.
- Accoutumance :

Les exhausteurs de goût agissent sur les neurones, empêchant le bon fonctionnement des mécanismes inhibiteurs de l'appétit.

Par conséquent, plus on en mange, plus ils donnent faim et donc plus on a envie d'en manger (obésité).

**FB/ Domaine SNV : Biologie, Agronomie, Science Alimentaire, Ecologie**