

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira de Bejaïa
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique



Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Pharmacologie Moléculaire

Thème :

**Mise au point d'une méthode d'extraction et d'analyse
des substances stupéfiantes et psychotropes dans le sang
appliquée à la sécurité routière**

Soutenu le : 12 juin 2016 à 11h00

Présenté par:

M^{elle} ABDELFETTAH Naima

M^{elle} BARI Lamia

Composition du jury :

M ^r A. BASLI	MCB (UAMB)	Président
M ^{me} H. DJOUDAD-KADJI	MCB (UAMB)	Promotrice
M ^r Y. BOUMRAH	EXPERT (INCC)	Co-Promoteur
M ^r BOUGUEZZA	MCB (UAMB)	Examinateur

Année Universitaire : 2015/2016

REMERCIEMENTS

Nous rendons grâce à Dieu, miséricordieux de nous avoir soutenu et donné la volonté, la persévérance et l'obstination pour réaliser ce travail. Ce dernier a été réalisé au sein du Laboratoire de toxicologie médico-légale de l'Institut National de Criminalistique et de Criminologie de la Gendarmerie National (INCC-GN). Il a nécessité l'aide et l'implication de nombreuses personnes :

On souhaite exprimer notre profonde gratitude et notre plus vive reconnaissance à Madame BOUANANI Sabrina, experte à l'Institut National de Criminalistique et de Criminologie, pour son soutien technique et moral, si précieux, sa disponibilité et ses qualités scientifiques dont on a pu profiter. On la remercie aussi pour nous avoir accueillis au sein de son équipe, pour la confiance qu'elle nous a témoignée et pour avoir mis à notre disposition des moyens performants pour réaliser notre travail.

On tient à adresser nos remerciements les plus sincères à Monsieur BOUMRAH Yacine pour son aide, ses précieux conseils que nous avons eus.

Il serait inconcevable d'oublier tout l'enseignement que nous ont transmis les professeurs de notre université Abderrahmane mira faculté de science de la nature et de la vie à leur tête M^{me} KADJI pour avoir accepté de consacrer de son temps pour nous encadrées, ainsi que les membres du jury : M^r BASSLI et M^r BOUGUEZZA.

Nos remerciements vont à tous les membres du Laboratoire de Toxicologie tout particulièrement, Monsieur TABET, M^r MELLAL, M^r KESSIR, M^r MERGHIT, M^{elle} BOUZAHIA, M^{elle} Zineb, pour leur soutien et la bonne ambiance partagée.

Un grand et sincère merci à ceux qui ont participé de près ou de loin à l'aboutissement de ce précieux travail.

DEDICACE

Je dédie ce mémoire, comme preuve de respect,

D'amour, de gratitude, et de reconnaissance

À mes chers parents Arezki et Fatima

Qui m'ont appuyé et encouragé à effectuer ce travail de recherche.

À mes sœurs adorées

À mes deux adorables frères

À mon cher fiancé

À tous mes amis et tous ceux qui me sont cher

Et à tous ceux que ma réussite leur tient à cœur. . .

ABDELFETTAH

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail :

À mes très chers parents et mon cher fiancé qui m'ont donné la

Tendresse et le courage pour que je

Réussisse ;

À mes frères, et mes sœurs

À tous mes amis et collègues

SOMMAIRE

Remerciements

Dédicace

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION..... 1

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. GENERALITES SUR LES DROGUES

1.1. Définition	3
1.2. Classification.....	3
1.2.1. Classification juridique.....	3
1.2.1.1. Stupéfiants.....	3
1.2.1.2. Psychotropes.....	3
1.2.2. Classification selon les effets.....	4
1.3. Les drogues en toxicologie médico-légale.....	4
1.3.1. Les drogues et accidentologie.....	4
1.3.2. Processus général de l'analyse des drogues.....	4
1.4. Devenir des drogues dans l'organisme.....	8
1.4.1. Pharmacocinétique.....	8
1.4.2. Pharmacodynamique.....	11

2. METHODES D'ANALYSE

2.1. Les méthodes immunochimiques.....	16
2.2. Les méthodes de confirmation.....	17
2.2.1. Prétraitement de l'échantillon.....	17
2.2.1.1. Principe de l'extraction en Phase Solide (SPE)	17
2.2.1.2. Processus d'extraction (SPE).....	17
2.2.1.3. Le choix de l'adsorbant SPE.....	18
2.2.2. L'analyse instrumentale.....	19
2.2.2.1. La chromatographie en phase liquide.....	19
2.2.2.2. La spectrométrie de masse.....	20

II. MATERIEL ET METHODES

1. OPTIMISATION DES CONDITIONS SPECTROMETRIQUES DES COMPOSES

PURS.....	24
1.1. Réactifs	24
1.2. Equipement de préparation.....	24

SOMMAIRE

1.3. Préparation des solutions.....	25
1.4. Equipement d'analyse.....	26
1.5. Infusion des solutions pures.....	26
2. OPTIMISATION DES CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES DES COMPOSES PURS.....	26
2.1. Réactifs.....	27
2.2. Equipement de préparation.....	27
2.3. Préparation des solutions.....	27
2.4. Equipement d'analyse.....	27
2.5. Analyse chromatographique des substances dans le mélange.....	28
3. OPTIMISATION DES CONDITIONS D'EXTRACTION EN PHASE SOLIDE ...	28
3.1. Réactifs.....	28
3.2. Equipement de préparation.....	28
3.3. Préparation des solutions.....	29
3.4. Extraction.....	31

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. IDENTIFICATION DES TRANSITIONS PAR SPECTROMETRIE DE MASSE DE CHAQUE STANDARD.....	32
2. IDENTIFICATION CHROMATOGRAPHIQUE.....	33
3. EXTRACTION.....	39
CONCLUSION	41
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE.....	42

GLOSSAIRE

ANNEXES

Liste des abréviations

API : Ionisation à pression atmosphérique
CID : Collision Induced Dissociation
CPG : chromatographie en phase gazeuse
CPL : Chromatographie en phase liquide
CPL/MS : Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse
DA : Dopamine
TDA : Transporteur de la dopamine
EC : Energie de collision
EI : Etalon interne
ESI: Electro Spray Ionisation
eV: électronvolt
GABA: Acide gamma-aminobutyrique
H-ESI: Heated Electro Spray Ionisation
HGX : High Cation Exchanger
INCC-GN : Institut National de Criminalistique et de Criminologie de la Gendarmerie National
LC-MS/MS : Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LLE : liquid liquid Extraction
MeOH : Méthanol
MS : Spectrométrie de masse
MS² : Spectrométrie de masse en tandem
m/z : masse / charge
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ONU : Organisation des Nations Unies
PKa : Constante d'acidité
Q : Quadripôle
QqQ ou TQ : Triple Quadripôle
S: Solution
SIM: Selected Ion Monitoring
SNC : Système nerveux central
SPE : Solid Phase Extraction
SRM : Selected Reaction Monitoring
TR : Temps de rétention
TP : Tampon
T_{1/2} : Temps de demi-vie
V : Volume

Liste des figures

Figure 1: Voies métaboliques des opiacés.....	9
Figure 2: Voies métaboliques des benzodiazépines.....	10
Figure 3: Voies métaboliques de la cocaïne.....	11
Figure 4: Mode d'action des opiacés-opioides d'après (Pépin et chéze, 2003).....	12
Figure 5: Mode d'action des amphétamines et ses dérivés d'après (Ghysel, 2004; Sulzer "et al". 2005; Mura et Kintz, 2011).....	13
Figure 6: Mode d'action des amphétamines sur les terminaisons synaptiques dopaminergiques.....	13
Figure 7: Mode d'action de la cocaïne.....	14
Figure 8: Mode d'action des benzodiazépines d'après (Landry "et al". 2008).....	15
Figure 9: Le Test combiné Syva® Rapid® Test 9.....	16
Figure 10: Principe d'extraction en phase solide.....	18
Figure 11: Appareillage de la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.....	19
Figure 12: Schéma d'un spectromètre de masse.....	20
Figure 13: Principe d'ionisation par HESI.....	22
Figure 14: Principe d'un appareil SM/SM à trois quadripoles en série.....	23
Figure 15: Mode d'acquisition SRM	23
Figure 16: S1 des opioïdes.....	25
Figure 17: S1 des benzodiazépines.....	25
Figure 18: S1 des amphétamines	25
Figure 19: S1 de cocaïne.....	25
Figure 20: S1 des opiacés.....	25
Figure 21: Les vials pour passeur automatique.....	25

Liste des figures

Figure 22: Le sang surchargé à 1mg/l.....	30
Figure 23 : Les étalons internes qui titrent pour 100µg/l.....	30
Figure 24: Chromatogramme des purs correspond à la famille des benzodiazépines.....	34
Figure 25: Chromatogramme des purs correspond à la famille des opioïdes.....	35
Figure 26: Chromatogramme des purs correspond à la famille de cocaïne.....	36
Figure 27: Chromatogramme des purs correspond à la famille des opiacés.....	37
Figure 28: Chromatogramme des purs correspond à la famille des amphétamines et ses dérivés.....	38
Figure 29 : Chromatogramme d'extraction de la famille des amphétamines et ses dérivés par la cartouche HCX.....	40

Liste des tableaux

Tableau I: Les Caractéristiques physico-chimiques des drogues étudiées	5
Tableau II: Familles chimiques étudiées, absorption, distribution, métabolisme, et élimination (ADME).....	8
Tableau III : Les solutions filles (S2) pour l'identification chromatographique.....	27
Tableau IV : Gradient d'élution de la phase mobile.....	28
Tableau V : Préparation des mélanges de solutions	29
Tableau VI : Préparation des solutions pour la surcharge.....	29
Tableau VII : Infusion directe des solutions standards dans CL-MS/MS.....	32
Tableau VIII : Rendement d'extraction pour les amphétamines et ses dérivés.	39

INTRODUCTION



INTRODUCTION

Depuis le début de la civilisation, l'homme utilise des substances psychoactives connues sous le nom de drogues à des fins thérapeutiques, initiatiques ou religieux. Les drogues sont généralement des composés chimiques, biochimiques, naturels ou synthétiques, capables d'altérer les activités neuronales de l'homme (Richard et Senon, 1999).

De nos jours, avec l'avènement de la synthèse organique, la diversité, la quantité et la demande de ces molécules ont considérablement augmenté avec l'accroissement progressif du nombre d'accidents sur la route. L'usage de celle-ci devient un thème de préoccupation majeur dans notre société, la situation en matière de sécurité routière est de plus en plus attirante et aggravante atteignent une amplitude alarmante dans notre pays, car la conduite avec facultés affaiblies à cause d'une consommation abusive de drogues illicites ou licites est, chaque année, la cause de blessures et de décès gratuits sur les routes (Mura et Kintz, 2011). Or il est bien connu que le mesurage de ces molécules (stupéfiants et psychotropes) peut provoquer une diminution de la vigilance de l'état de conscience et des capacités de jugement, amplifiant ainsi les risques d'accidents mortels (Vinner *et al.*, 1999).

L'impact de la consommation abusive de ces produits sur les routes, fait l'objet que les chercheurs ont développé une panoplie de méthodes analytiques sophistiquées permettant ainsi le diagnostic de l'état cognitive du conducteur (sous l'influence ou pas) lors d'un accident mortel en s'invokant sur des screening ou criblages toxicologique basés sur des méthodes chromatographiques.

Le dosage des drogues dans les matrices biologiques : sang, urine est souvent accorée par la chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à la spectrométrie de masse (SM) (Lacroix *et al.*, 2008). Cependant avec le développement de la synthèse chimique, leur structure présente une très grande similitude avec leurs métabolites, la faible volatilité et l'instabilité thermique de ses drogues, les rendent moins détectables sur la CPG. Or l'analyse par celle-ci nécessite une étape préalable de dérivation, source potentielle de pollution, d'erreur et d'incertitude. Le volume de l'échantillon intégré dans le système chromatographique est de 2.5ml et le résultat de la mesure peut avoir des temps de rétentions allant jusqu'à 100min, ce qui n'est pas adapté à l'analyse en routine (Janicka *et al.*, 2010).

En revanche, l'analyse par chromatographie en phase liquide (CPL) s'avère bien adaptée aux propriétés physico-chimiques de la majorité des composés actuellement recherchés avec des limites de détection beaucoup plus inférieurs à celles habituellement reconnues. Associée à la spectrométrie de masse (SM), la CPL s'est imposée comme un outil analytique de choix dans ce domaine. Outre la complexité du phénomène d'ionisation, ce couplage présente quelques difficultés analytiques à surmonter. La plus importante provient des spectres de masse qui contiennent, en général uniquement l'ion moléculaire (Maurer, 2005).

Cette difficulté a été dépassée avec le développement de la CPL couplée à la SM en tandem (SM²) qui améliore les méthodes traditionnelles de spectrométrie de masse avec deux

INTRODUCTION

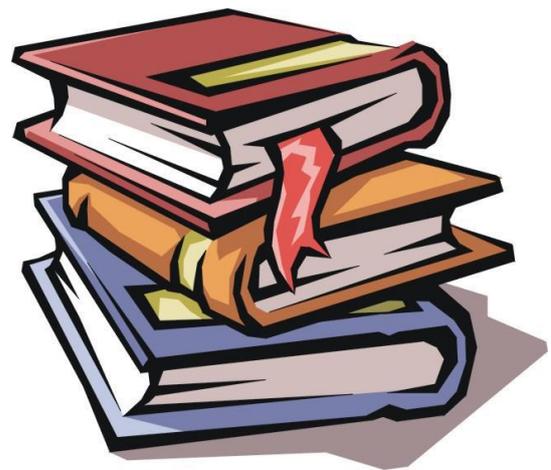
étapes d'analyses de masse (Cleon, 2005). Avant l'analyse, la matrice retenue nécessite une étape de prétraitement (Humbert, 2011).

Plusieurs méthodes sont largement utilisées mais l'extraction en phase solide (SPE) reste la plus adéquate pour l'extraction des drogues dans les matrices biologiques (Humbert, 2010). L'utilisation d'un tel outil scientifique à des fins judiciaires et dans le but de prouver que le conducteur été sous l'influence d'une drogue lors d'un accident sur la route dans les matrices biologiques, constitue une méthode de choix incontournable dans la preuve scientifique.

C'est dans ce but, que ce présent travail est réalisé. L'exploitation des différentes matrices biologiques, reçues au Laboratoire de Médicament du Département de Toxicologie de l'Institut National de Criminalistique et de Criminologie de la Gendarmerie Nationale (INCC-GN), nécessite la mise en place d'une méthode de recherche et de dosage par la Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse en tandem (LC-MS/MS) qui permet l'identification et la quantification, en routine, de plusieurs molécules plus utilisées dans le sang après une étape d'extraction en phase solide.

Ce manuscrit, se subdivise alors en deux parties. Une partie théorique, qui comporte une synthèse bibliographique présentant les drogues de manière générale ainsi que leur devenir dans l'organisme. En second lieu, une présentation des techniques d'extraction ainsi que du couplage entre la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse, est donnée s'intéressant particulièrement au principe de fonctionnement des sources electrospray et des analyseurs à champs quadripolaire. La partie pratique décrit le développement et la mise au point de la méthode étudiée. Elle traite les conditions de séparation en chromatographie liquide ainsi que les conditions d'extraction des drogues de la matrice biologique en l'occurrence le sang.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE



I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. GENERALITES SUR LES DROGUES

1.1. Définition

L'étymologie du terme drogues est imprécise. Pour la plupart des ouvrages modernes, le terme « drogue » provient du terme néerlandais « *droog* » « matière sèche ».

Le dictionnaire des drogues, des toxicomanies et des dépendances définit la drogue comme étant toute substance, licite ou illicite, pharmacologiquement active sur l'organisme. En ce sens, tout médicament est donc une drogue. Au sens usuel, tout substance psychoactive (active sur le système nerveux central, donc sur le comportement, les sensations et /ou la conscience), prêtant à une consommation abusive et pouvant entraîner des manifestations de tolérance et/ou de dépendance psychique et/ou physique. Selon l'origine de la drogue, il sera question de drogue végétale ou de drogue animale. Il recouvre donc deux aspects : la nature des effets biologiques que la drogue induit d'une part et, d'autre part, les rapports que celui qui la consomme entretient avec elle. Il faut qu'un composant chimique donné soit consommé pour qu'il puisse répondre à l'appellation de « drogue » (Richard et Senon, 1999).

1.2. Classification

Les drogues ont fait l'objet de nombreuses démarches de classification. Ces dernières ont été établies en prenant en compte leur statut juridique, et leurs effets sur le système nerveux, ainsi que des classifications secondaires basé sur la famille pharmacologique et le degré de dangerosité (dépendance physique, psychique et accoutumance).

2.1. Classification juridique

L'organisation des nations unies (ONU) a établi plusieurs conventions internationales afin de classer les drogues en deux grandes classes :

2.1.1. Les stupéfiants

Garnier & al. (1997) ; Fabregas & al. (2003) considèrent comme stupéfiant toute substance, naturelle ou synthétique, inscrite sur la liste des stupéfiants «tableaux I, II, III ou IV de la Convention de 1961 de l'ONU ». Cependant, l'OMS (Organisation Mondiale de la santé) décrit un produit stupéfiant comme une substance dont les effets psychoactifs peuvent entrainer des effets de tolérance et de dépendance.

2.1.2. Les psychotropes

Selon Lardy-Fontan et Brieades (2011), Le terme «psychotropes» signifie «qui agit, qui donne une direction» (trope) «à l'esprit ou au comportement» (psycho). Il possède ainsi une définition en droit pour désigner un ensemble de substances classées aux tableaux I, II, III ou IV de la Convention de 1971 de l'ONU. Cette définition diffère de celle couramment utilisée en pharmacologie, qui reconnaît une molécule psychotrope comme une substance qui agit principalement sur l'état du système nerveux central en modifiant certains

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

processus biochimiques et physiologiques cérébraux, sans préjuger de sa capacité à induire des phénomènes de dépendance, ni de son éventuelle toxicité.

2.2. Classification selon les effets

Yves Pélicier (médecin français) et Jean Thuillier (psychiatre et pharmacologue français) (1991) ont repris la classification de Delay et Deniker (1957) et la moderniser selon les effets et la nature du danger qu'ils présentent : (en ligne)

- Les déprimeurs du système nerveux central (benzodiazépines, opiacés, opioïdes)
- Les stimulants (amphétamines et dérivés, cocaïne)
- Les hallucinogènes ou perturbateurs.

Le récapitulatif de la classification juridique et les propriétés physicochimiques des drogues, est présenté dans le tableau I.

3. LES DROGUES EN TOXICOLOGIE MÉDICO-LÉGALE

3.1. Les drogues et accidentologie

En matière d'accidentologie, les drogues illicite se banalisent, et deviennent la cause importante des accidents et des décès commises sur les routes après l'alcool (Mura et Kintz, 2011). Vu leur disponibilités, leurs consommation se présente dans la population de différentes âges, ainsi que dans tous les milieux, ou la raison est liée soit à la pression sociale pour éviter son exclusion d'un groupe, ou la recherche d'un effet spécifique (perte de fatigue, stimulation intellectuelle, le plaisir, etc...), ou enfin appartenir au monde « bronché » (Vinner *et al.*, 1999). Ces substances à potentiel de pharmacodépendance, ont tendance à modifier le comportement et/ou l'humeur du conducteur, et cela peut constituer un danger au volant d'un véhicule, puisque la conduite automobile exige de l'attention, de bon jugement, et bien sur la capacité de coordonner toutes ces fonctions (Anger, 2003).

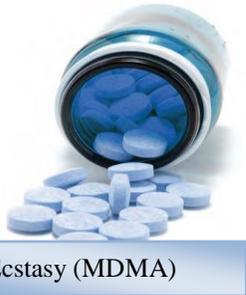
Pour faire face à ce fléau, à côté de la prohibition de l'usage abusive des drogues et l'amélioration de la sécurité routier, l'action des laboratoires de toxicologie médico-légale en s'appuyant sur des moyens technologiques appropriés, la recherche des substances stupéfiantes et/ou psychotropes est pratiquée dans des milieux biologiques.

3.2. Processus général de l'analyse des drogues

Le choix de la méthode d'analyse convenant pour la détermination et la quantification avec suffisamment de précision et l'exactitude des résidus de drogues dans des matrices différentes, telles que les matrices biologiques, est l'importance fondamentale lorsqu'il s'agit de déterminer le rôle que jouent les drogues dans l'altération de l'aptitude à la conduite automobile et ses rapport avec la sécurité routière (Kintz,1998).

Tableau I : Les caractéristiques physico-chimiques des drogues étudiées (Moffat *et al.*, 2004 ; Needham *et al.* , 2000 ; Maquille *et al.*, 2009 ; OICS, 2013 ; OICS, 2014

Classification		Substances	PKa	T1/2	Masse molaire	Nature
Familles						
Stupéfiants	Opiacés	Morphine	8,9 ; 9	2-3h	285,4	<p>Naturelles</p>   <p>opium, graines de pavot</p>
		6-MAM	–	–	327,4	
		Codéine	8,2	2-4h	317,4	
		Hydrocodone	8,3	4h	299,4	
		Dihydrocodéine	8,8	4h	301,4	
	Cocaïne et ses Métabolites	Cocaïne	8,6	0,7-1,5h	303,4	<p>Naturelle</p>  <p>cocaïer (<u>Erythroxylum COCA</u>)</p>
		BEC	2,5-11,2	4,5h	289,3	
		EME	9,3-14,2	–	199	

Psychotropes	Opioides	Méthadone	8,3	13-14h	309,4	<p style="text-align: center;">Synthétiques</p> 
		Buprénorphine	8,5 ; 10	1,2-7,2h	467,6	
		Norbuprénorphine	8,3 ; 9,4	–	413	
		Tramadol	–	6h	263,4	
	Amphétamine et ses dérivés	Amphétamine	10,1	4-8h	135,2	<p style="text-align: center;">Synthétiques</p>   <p style="text-align: center;">Ecstasy (MDMA)</p>
		Méthamphétamine	10,1	9h	149,24	
		MDMA	9	6-7h	193,2	
		MDEA	–	–	207,3	
		MDA	9,7	–	179,2	

					Synthétiques
Benzodiazépine	Diazépan	3,3	20-40h	284,7	
	Bromazépan	2,9 ; 11	8-19h	316,2	
	Oxazépan	1,7 ; 1,6	4-15h	286,7	
	Tétrazépan	–	10-25h	288,8	
	Midazolam	6,1	2h	325,8	
	Zolpidem	6,2	1.7-2.5h	307,39	
					
					

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Suite à un décès causé par un accident sur la route, des prélèvements biologiques obligatoires sont opérés sur le sujet tel que le sang, l'urine, le liquide gastrique et d'autres facultatifs tels que l'humeur vitrée, les phanères et la bile. Suivant d'une analyse qualitative dans le but de déterminer la présence d'un xénobiotique. Celle-ci est généralement appliqué à l'aide des tests de dépistage immuno-chromatographique. Si une substance psychoactive ou un toxique est détectée, un dosage par des techniques chromatographiques couplée à différents détecteurs doit alors être réalisé. Ces analyses quantitatives sont exécutées au moyen de techniques spécifique à la molécule recherchée, La dernière étape et celle de l'interprétation des résultats obtenus.

4. DEVENIR DES DROGES DANS L'ORGANISME

4.1. Pharmacodynamique

C'est le processus par lesquels les drogues pénètrent plusieurs voies de l'organisme humain pour arriver à la circulation sanguine (absorption), atteignent le cerveau (distribution), métabolisées et biotransformées, et enfin excrétées du corps (élimination). Ces voies d'administration correspond à la voie orale qui est la majeur voie de l'ingestion (les amphétamines), suivant de la voie parentérale (cocaïne), mais aussi d'autre voies peuvent être gagnées.

Le taux d'absorption, de métabolisation et l'excrétion des drogues varient selon la nature, la dose et la voie par lesquelles sont consommées, ainsi que le sexe, l'âge, l'état de santé d'une personne et les facteurs génétiques (Kintz, 1998)

Tableau II : Familles chimiques étudiées, absorption, distribution, métabolisme, et élimination (ADME) (Kintz, 1998) (**IV** : intraveineuse, **IM** : intramusculaire).

Familles	Absorption	Distribution	Métabolisme	Elimination
Opiacés	Bien absorbés par voie orale et parentérales (IV, IM)	Tissulaire	Hépatique	Urinaire
Opioides	Bien absorbés par voie orale et Parentérales)	-Tissulaire -Liaison aux protéines plasmatiques	Hépatique	-Digestive -Fécale -Urinaire -Biliaire -sueur
Cocaïne	Absorption rapide par voie sniffée	Tissulaire	Hépatique	-Salivaire -Urinaire

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Amphétamines et dérivés	Absorption rapide par voie orale et rectale	-Tissulaire -Fixation aux protéines plasmatiques (20%)	Hépatique	Urinaire
Benzodiazépines (BZD)	Résorption rapide et complète par voie orale	-Tissulaire -Fixation aux protéines plasmatiques	Hépatique	-Urinaire -Biliaire -lait maternel

Les réactions de métabolisations sont présentées dans les schémas suivants avec une brève explication de mécanisme déroulé :

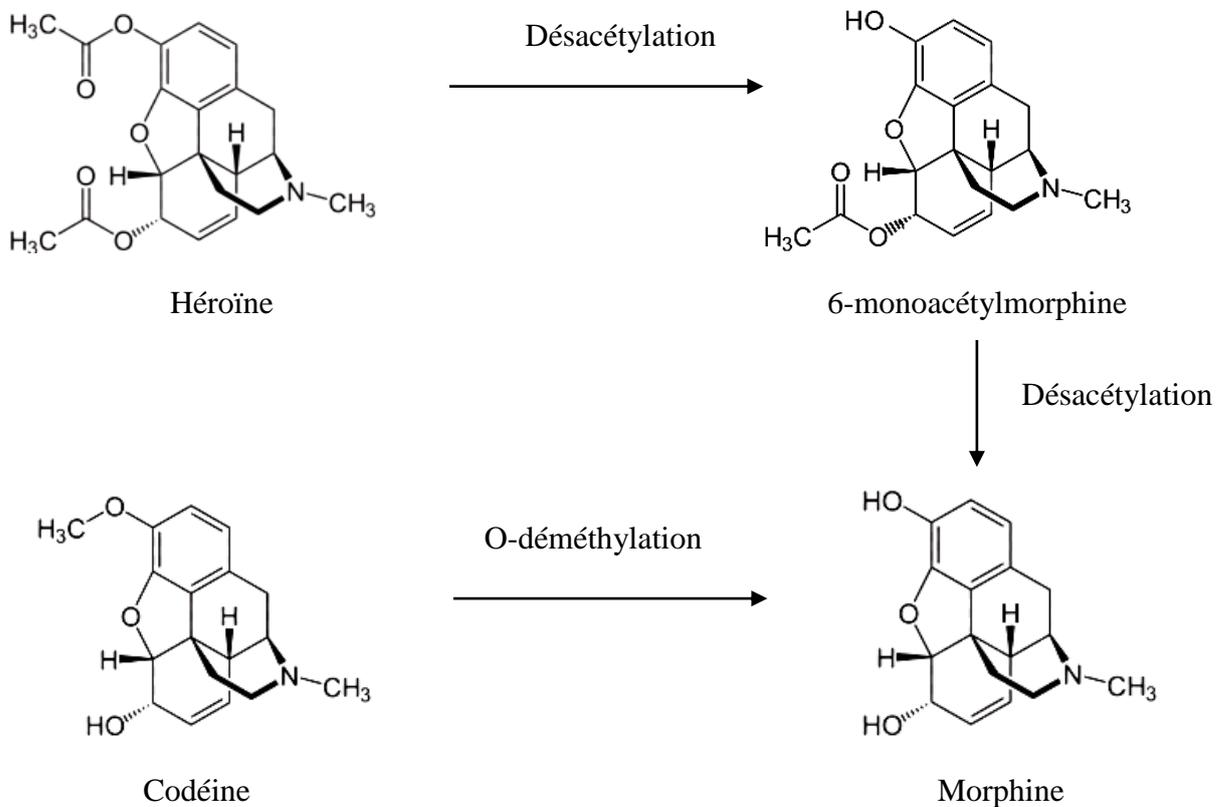


Figure 1 : Voies métaboliques des opiacés (Baselt et Cravey, 2003)

L'héroïne (diacétylmorphine) est rapidement métabolisée dans le sang par une désacétylation en 6-monoacétylmorphine (6-MAM). Celle-ci est ensuite hydrolysée en morphine, mais de manière plus lente, en conséquent la diacétylmorphine n'est donc jamais détectée dans les fluides biologiques. La codéine elle-même est métabolisée au niveau hépatique en morphine par une O-déméthylation (Kintz, 1998).

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

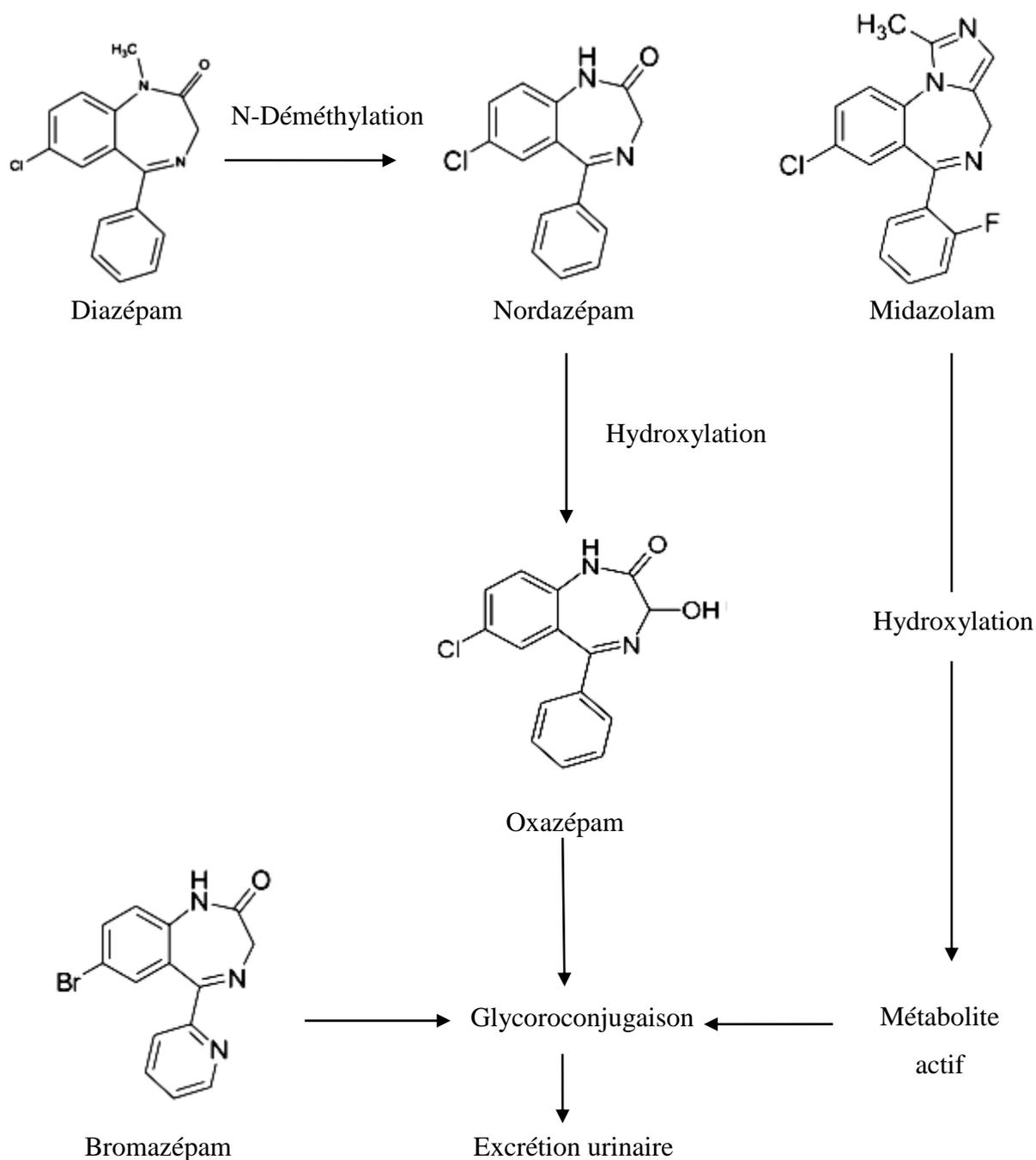


Figure 2 : Voies métaboliques des benzodiazépines (Landry & *al.*, 2008)

Les réactions de biotransformations des benzodiazépines sont principalement des déméthylations et /ou des hydroxylations. Souvent ces réactions donnent naissance à des métabolites actifs, qui subissent à la fin une glucuroconjugaison afin de donner des métabolites inactifs éliminés dans les urines. Certaines de ces BZD n'aboutissant pas à la formation des métabolites, elles sont éliminées directement sous la forme inchangée, exemple : Bromazépam, Oxazépam (Landry *et al.*, 2008).

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

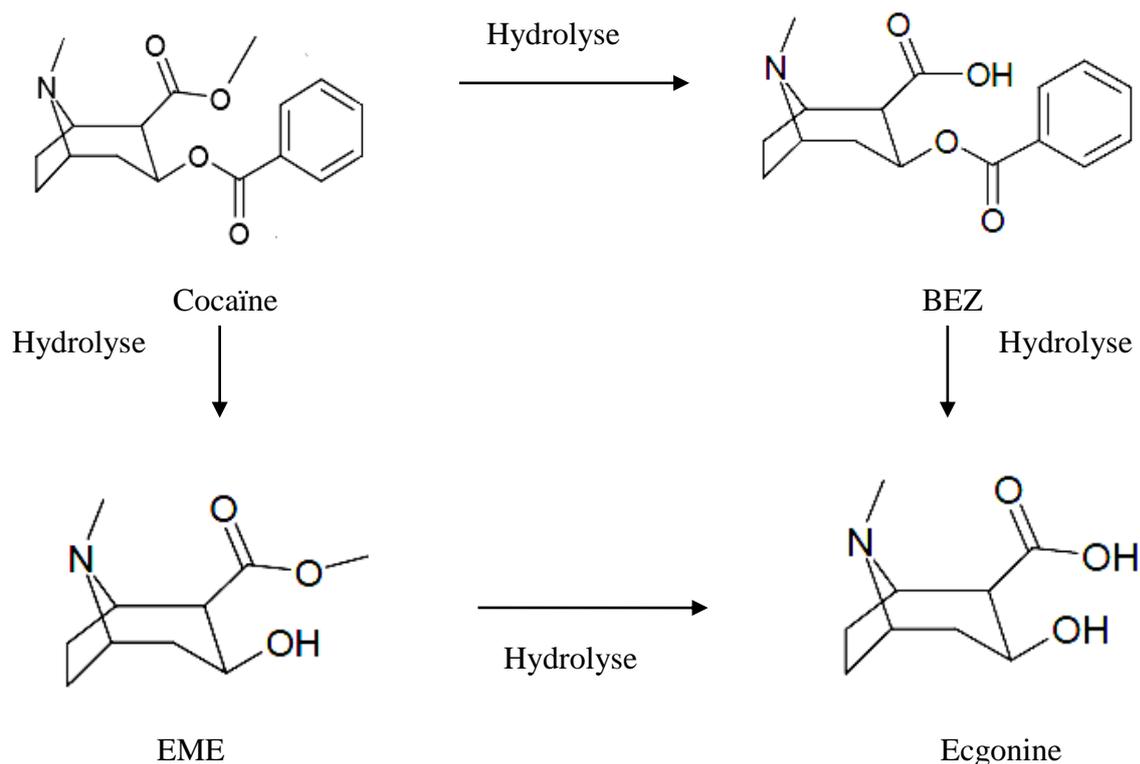


Figure 3 : Voies métaboliques de la cocaïne (Anger *et al.*, 2011)

La cocaïne (COC) ou méthylbenzoylecgonine est un ester d'acide benzoïque et d'un amino-alcool l'ecgonineméthylestar, elle présente une région hydrophobe qui comprend un noyau benzène, et une région hydrophile qui contient une partie amine et une seconde fonction méthylester (partie ecgonine de la molécule).

La (COC) est soumise à une hydrolyse spontanée à pH physiologique ou basique de la fonction méthylester de la partie ecgonine, pour former la benzoylecgonine (BEZ). Un autre mécanisme est considéré comme étant important, dont l'une des voies fait intervenir des carboxylestérases hépatique de type 1 conduisant à la formation de même métabolite inactif (BEZ). L'autre voie consiste à l'hydrolyse enzymatique sur sa seconde fonction ester par les butyrylcholinestérases plasmatiques de type 2, pour être transformé en ecgonineméthylestar (EME). Ces métabolites majeurs (BEZ et l'EME) dont leurs présences permet de déterminer la consommation de de la COC dans le sang, vont ensuite se métaboliser en ecgonine qui apparaît plus tardivement dans les urines (Alvarez *et al.*, 2015).

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

4.2. Pharmacocinétique

Depuis les années 1990 divers travaux expérimentaux ont permis de mieux comprendre les effets neuropharmacologique des drogues sur le cerveau.

Ces données montrent que les psychotropes et les stupéfiants peuvent exercer des effets néfastes sur le conducteur au volant en agissant sur le système nerveux. Les opiacés et les opioïdes entraînent une somnolence, un ralentissement de l'activité cérébrale, diminution des réflexes et de la conscience du danger, à l'inverse la cocaïne et les amphétamines stimulent la vigilance et peuvent rendre le conducteur agressif. Outre les benzodiazépines peuvent provoqués : la somnolence, la baisse de la vigilance, la diminution des réflexes, les vertiges, les étourdissements, les troubles visuels et auditifs (Mura et Kintz, 2011)

Pour mieux appréhender le mécanisme d'action de ces substances, des schémas explicatifs sont dévoilés :

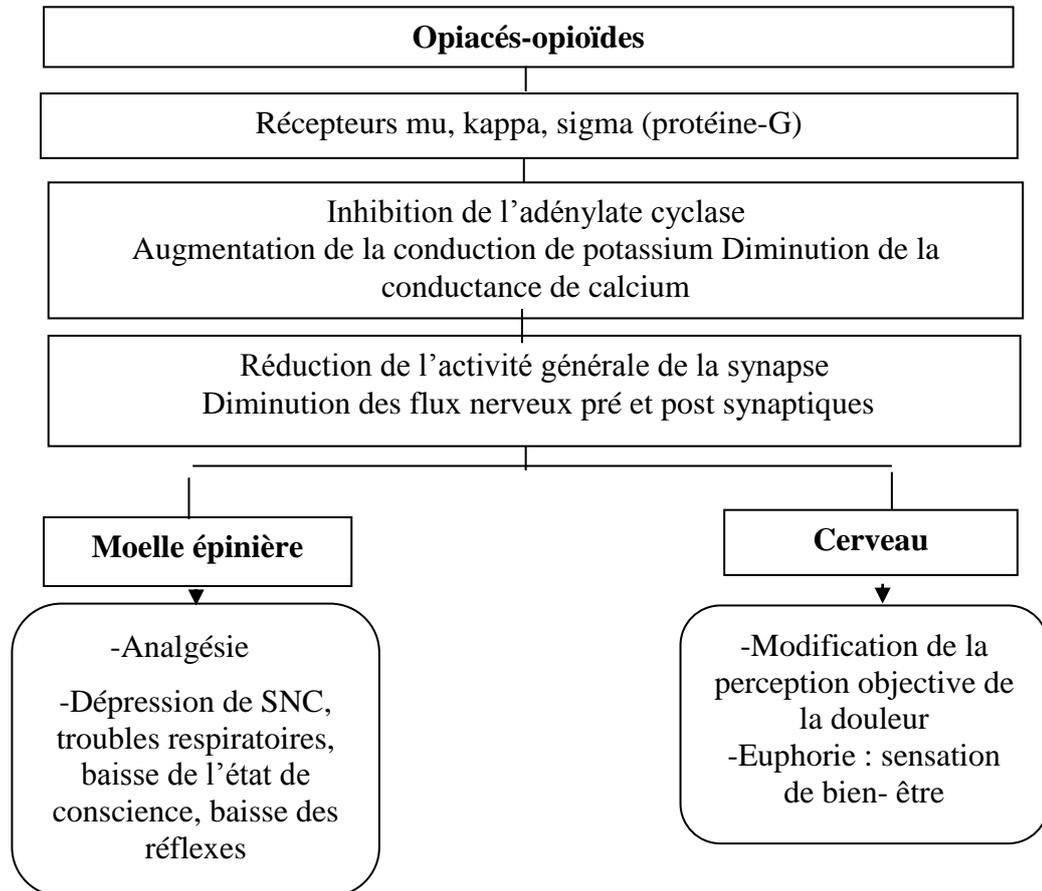


Figure 4 : Mode d'action des opiacés-opioïdes d'après Pépin et Chèze (2003)

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

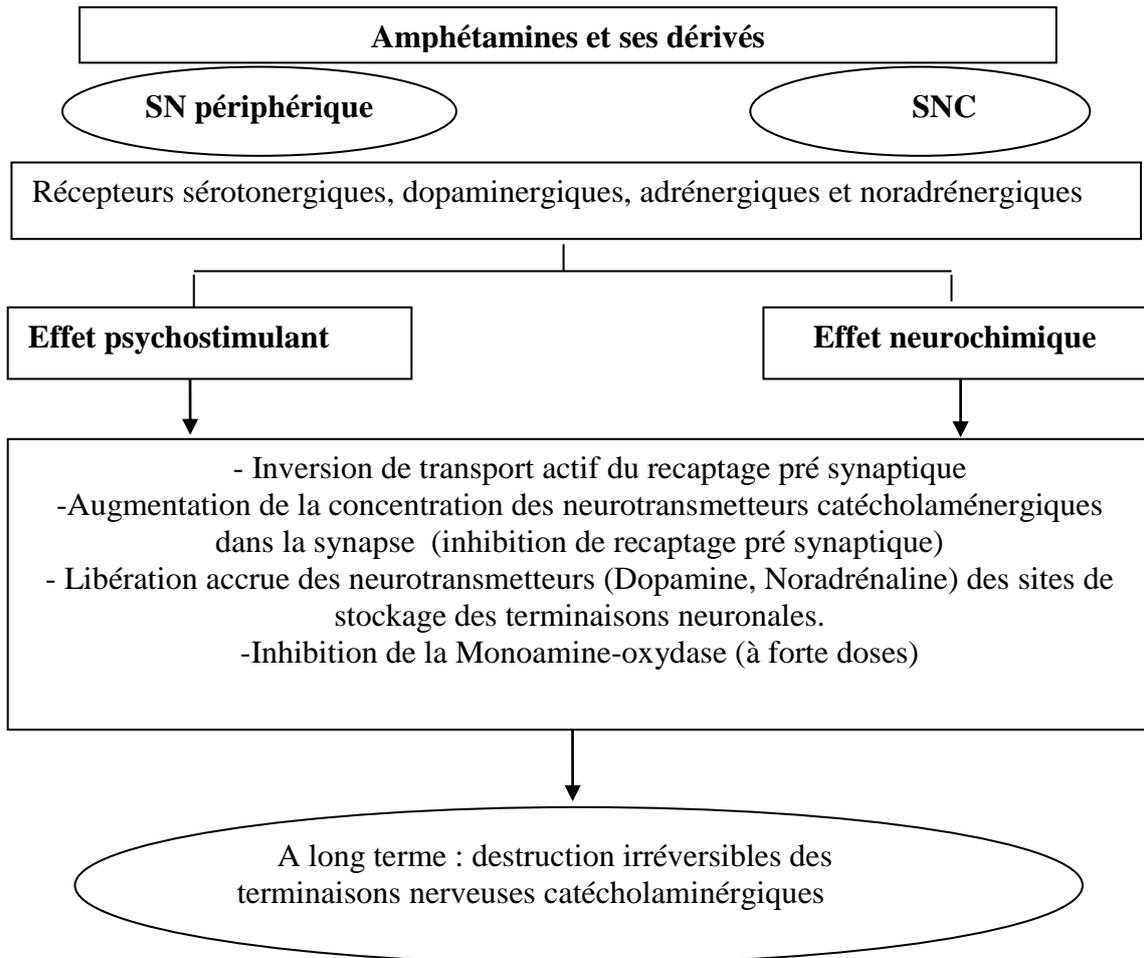


Figure 5 : Mode d'action des amphétamines et dérivés d'après Ghysel (2004) ; Sulzer & al. (2005) ; (Mura et Kintz 2011)

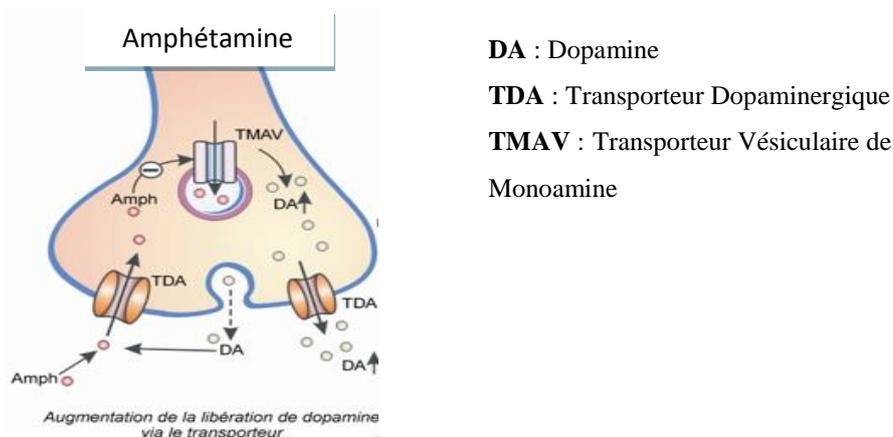
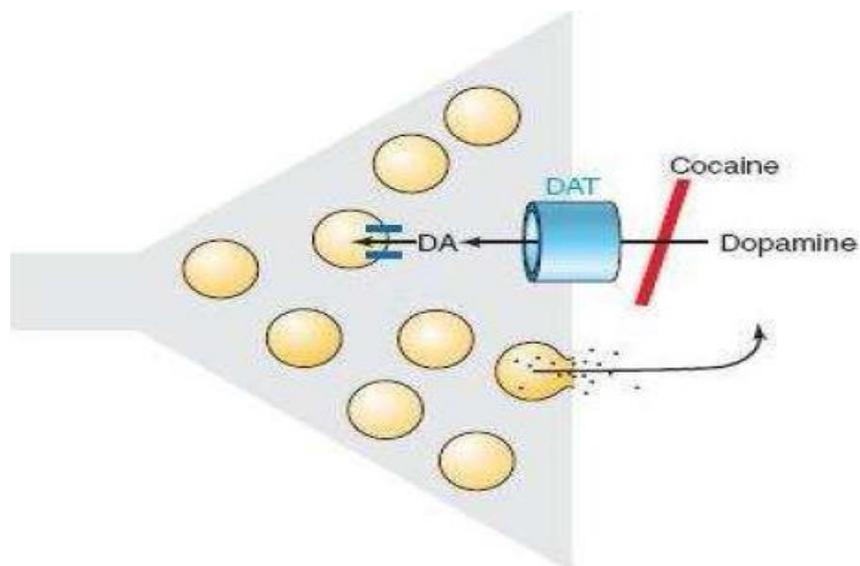


Figure 6 : Mode d'action de l'amphétamine sur les terminaisons synaptiques dopaminergiques (Katzung & al., 2009)

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

La cocaïne a de grandes affinités pour les transporteurs à la dopamine (TDA), à la sérotonine et à la noradrénaline, elle inhibe le recyclage de ces amines dans les neurones prés synaptiques, ce qui augmente la concentration de neurotransmetteurs notamment la dopamine dans la fente synaptique. De plus, elle se fixe modérément sur divers canaux ioniques, comme son action sur les canaux sodiques, au niveau des axones, à l'origine de l'utilisation de la cocaïne comme anesthésique local (Mura et Kintz, 2011).



DA : Dopamine

TDA : Transporteur de dopamine

Figure 7: Mode d'action de la cocaïne (Hyman & *al.*, 2006)

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Les benzodiazépines forment une grande classe pharmacologique, regroupant des substances ayant des effets anxiolytiques, sédatifs, hypnotiques, anticonvulsivants et myorelaxants. Ce sont des agonistes qui augmentent l'affinité du neurotransmetteur GABA (inhibiteur) à son récepteur en provoquant une hyperpolarisation des cellules post-synaptiques en favorisant l'augmentation de la perméabilité membranaire au chlore et donc une diminution de l'excitabilité cellulaire (Landry *et al.*, 2008).

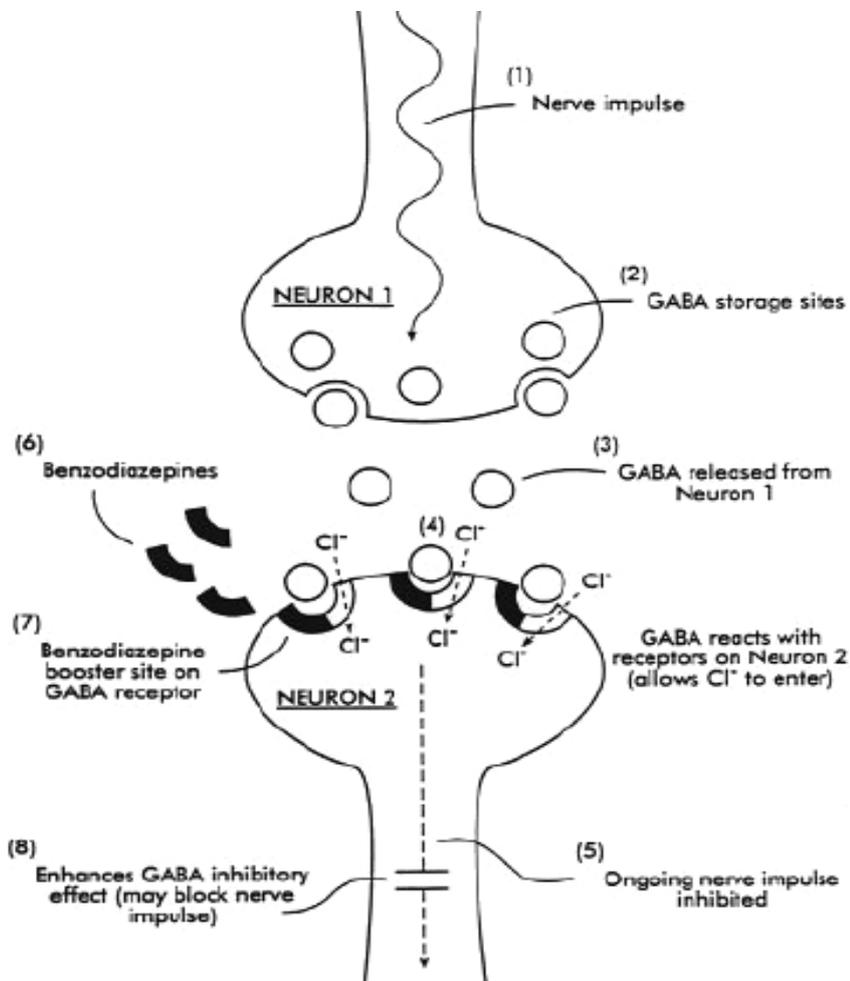


Figure 8: Mode d'action des benzodiazépines d'après Landry & al. (2008)

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

2. METHODES D'ANALYSE

La recherche et le dosage des drogues ou leurs métabolites dans les matrices biologiques sont pas directement réalisables, mise à part quelques rares méthodes immunochimiques qui permettent d'une part de privilégier un prélèvement biologique non traumatisant et simple à réaliser en terme de recueil, et d'autre part de disposer d'une technique facile et rapide à appliquer, transposable aisément et automatisable (Mura et Kintz, 2011).

2.1. Les méthodes immunochimiques

Il s'agit des tests de dépistage urinaire qui accordent la détection qualitative et semi-quantitative de drogues dans l'urine humaine. L'avantage de cela est tangible sans aucun prétraitement de l'échantillon (urine), son principe est donné ci-après (Figure 9) (Siemens, 2008).

Le test combiné (Syva® Rapid Test® 9) à recours, à une technologie de dosage immunochimique (réactions entre les antigènes (Ag) et les anticorps (Ac)) en phase solide, en une étape pour détecter la présence de l'une de ses neuf drogues [méthamphétamine (mAMP), opiacé (OPI), cocaïne(COC), canabinoïde (THC), phéncyclidine (PCP), benzodiazépine (BZO), barbiturique (BAR), antidépresseur tricyclique (TCA), et amphétamine (AMP)] dans l'urine humaine. Il contient deux bandes membranaires sur lesquelles les drogues ou des Ac conjugués à une drogue sont immobilisés à des emplacements précis. La détection de celle-ci repose sur la concurrence, pour la fixation

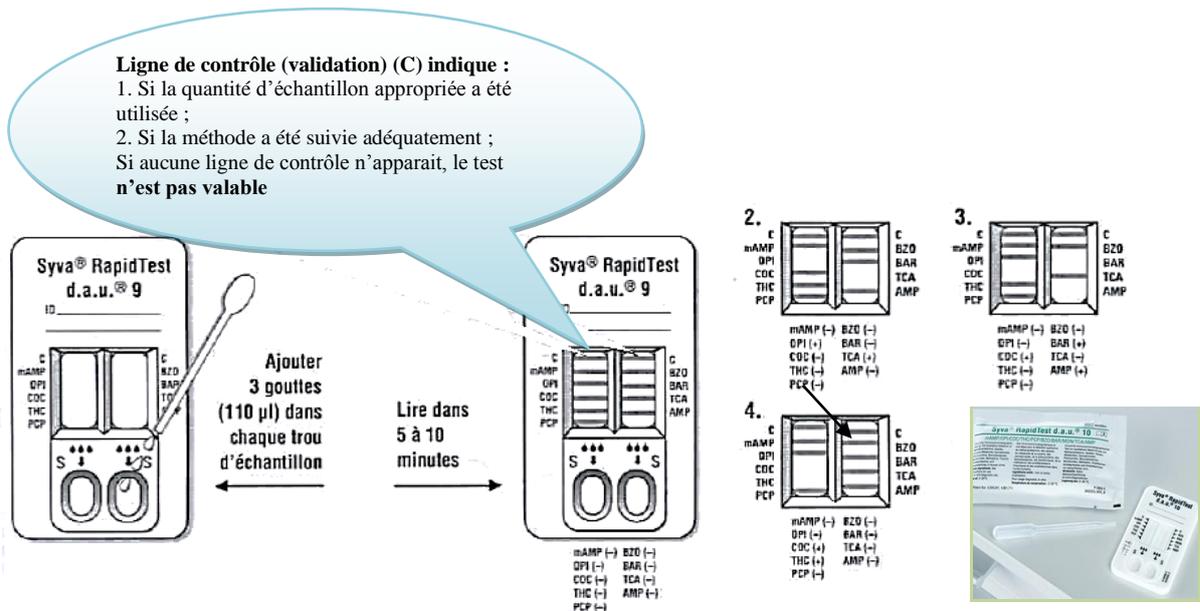


Figure 9: Le test combiné Syva® Rapid Test® 9 (Siemens, 2008)

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

aux Ac, entre les conjugués de drogues et la drogue éventuellement présente dans l'échantillon d'urine. Dans l'analyse, la méthode consiste à l'ajout de l'échantillon d'urine au puits échantillon (S) du dispositif et surveiller l'apparition de ligne de couleur dans la fenêtre des résultats.

Remarque : Les techniques immunochimiques fournissent uniquement des résultats d'analyse préliminaire (semi-quantitative). L'application de méthodes plus spécifique et plus sélective pour la confirmation des résultats analytiques obtenus est obligatoire. La CL/MS-MS est la méthode de confirmation de choix.

2.2. Les méthodes de confirmation

Elles correspondent aux techniques chromatographiques. Celles-ci permettent le dosage qualitatif et quantitatif des substances psychoactives et/ou stupéfiants dans les matrices biologiques avec une très grande sensibilité. En général, ces méthodes de dosages se déroulent en trois étapes (Dénes & al., 2008) :

- ✓ Le prétraitement de l'échantillon pour séparer, pré-concentrer ou parfois dériver le composé recherché ;
- ✓ L'analyse instrumentale ;
- ✓ Le traitement des données et l'interprétation des résultats.

2.2.1. Prétraitement de l'échantillon

Le prétraitement de l'échantillon qui a pour but d'isoler et de concentrer le ou les xénobiotiques dans une matrice tout en extrayant le moins possible des composés endogènes avant l'analyse par des techniques chromatographiques en phase liquide et en phase gazeuse. C'est très certainement l'étape la plus importante du processus analytique. La diversité des échantillons biologiques, confiés aux laboratoires toxicologiques pour l'analyse, sont des matrices complexes (sérum, sang, urines, bile, cheveux, méconium...). De ce constat, on comprend mieux pourquoi une bonne préparation influe directement sur la limite de détection, la répétabilité et la reproductibilité de l'analyse.

Au fil des années, diverses procédures ont été développées dont l'extraction liquide-liquide (LLE) et l'extraction en phase solide (SPE). La LLE est peu onéreuse, cependant elle demande plus de temps de manipulation et l'utilisation de plusieurs solvants, mais la SPE a l'avantage d'être sensible, automatisable et reste la plus adaptée pour l'extraction des drogues dans les matrices biologiques (Humbert, 2010)

2.2.1.1. Principe de l'extraction en phase solide (SPE)

L'extraction en phase solide est basée sur le partage des composés entre une phase liquide ; l'échantillon, et une phase stationnaire solide ; l'adsorbant (Dénes & al., 2008).

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Elle permet à la fois d'extraire de façon beaucoup plus ciblée quelques composés d'intérêt pour des dosages spécifiques ou d'extraire de façon très large un grand nombre de substances dans le cadre de recherche non ciblée de substances pour caractériser une intoxication, une tentative d'autolyse ou la mort (Dénes & al., 2008).

2.2.1.2. Processus d'extraction (SPE)

L'extraction se déroule généralement en quatre étapes (Humbert, 2010) :

- ✓ **Le conditionnement de la phase stationnaire** : Il permet de mouiller l'adsorbant au moyen d'un solvant organique et d'activer les sites de rétention. Un support hydrophobe est conditionné par un solvant organique (ex : méthanol) puis par un solvant dont les caractéristiques ioniques et de pH sont le plus proches possibles du solvant de l'échantillon (ex : eau).
- ✓ **Le dépôt de l'échantillon** : la solution à analyser est percolée à travers la phase solide (rétention des analytes d'intérêt sur la phase stationnaire et le maximum d'interférences est éliminée par simple non rétention).
- ✓ **Le lavage (simple ou multiple) de la cartouche** : par un solvant de faible force éluante (ex : méthanol/eau) qui va permettre d'éliminer et d'éluer que les interférents faiblement retenus. Il est recommandé à la fin de cette étape d'assécher le support pour évaporer les traces de solvant de lavage. C'est l'étape qui améliore l'extraction.
- ✓ **L'éluion** : il est préférable d'utiliser un solvant de la plus faible force éluante possible, capable d'entraîner la totalité des molécules d'intérêt, évitant ainsi d'éluer des interférents fortement retenus. Le choix du solvant est guidé par sa facilité d'évaporation et sa compatibilité avec la technique analytique.

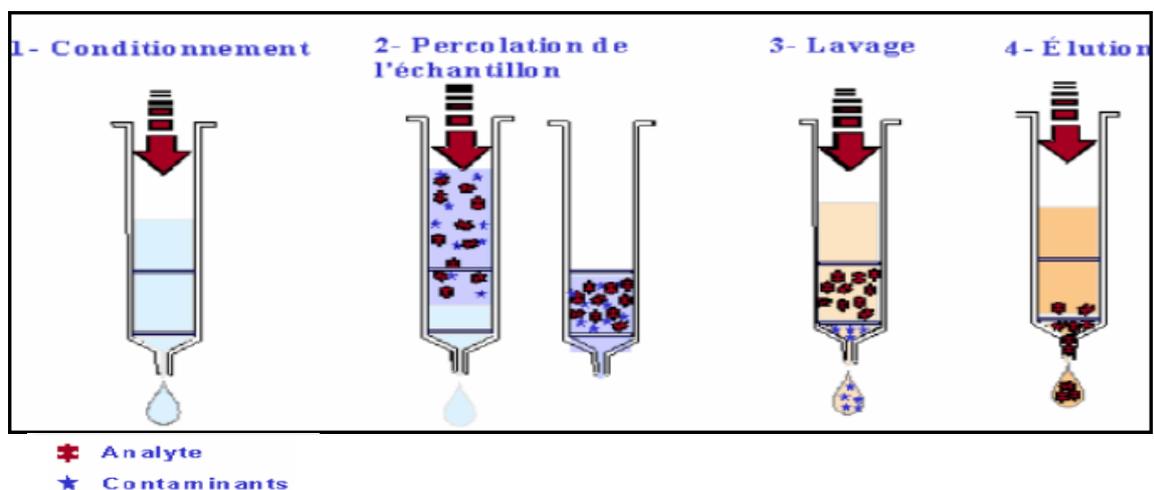


Figure 10 : Principe d'extraction en phase solide (Humbert, 2010)

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

2.2.1.3. Le choix de l'adsorbant (SPE)

Il dépend d'abord de la matrice de l'échantillon. Si la phase est aqueuse, comme le sont les échantillons biologiques, les supports hydrophobes conviendront mieux puisque sur ce type de support la phase mobile est la moins éluante (Dénes & al., 2008).

2.2.2. L'analyse instrumentale

Grace à sa sensibilité et de sa sélectivité, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) est considérée comme « le gold standard » pour la quantification de composés dans des milieux complexes (Leban, 2013).

Les composés de l'échantillon vont dans un premier temps être séparés par chromatographie liquide suivant leur hydrophobicité. Ils arrivent séquentiellement dans la source du spectromètre de masse et vont être ionisés. Dans un deuxième temps, les substances vont être analysées dans le spectromètre de masse. Celui-ci permet de mesurer la masse des différentes ions (MS simple) et de fragmenter ces mêmes (spectre MS-MS) pour accéder à la structure de ces derniers (Thermo Fisher Scientific, 2009).

Les constituants d'un système de chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem sont illustrés dans la figure ci-dessous :



Figure 11 : Appareillage de la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (Photo prise à l'INCC)

1 : Chromatographe en phase liquide, **2** : Passeur automatique, **3** : Injecteur automatique, **4** : Pompe, **5** : Colonne, **6** : Spectromètre de masse, **7** : Enregistreur

2.2.2.1. La chromatographie en phase liquide

Elle est l'un des outils analytiques les plus performants, ce qui lui procure la possibilité d'être utilisée dans des domaines très variés. Elle permet la séparation et l'identification des composés à l'état liquide. Cette méthode présente l'avantage de ne causer aucune détérioration des produits thermolabiles (Kang, 2012).

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Elle utilise une phase mobile constituée d'un solvant unique, ou le plus souvent d'un mélange de solvants plus ou moins complexe, caractérisé par une grande pureté. Cette phase mobile est introduite au niveau de la colonne contenant la phase stationnaire par un système de pompe à débit constant (Cleon & al., 2002).

La séparation est fondée sur la distribution des solutés entre deux phases non miscibles. En effet, alors que la phase mobile tend à entraîner les espèces à séparer dans un mouvement, la phase stationnaire, elle, tend à les retarder. Cette rétention est d'autant plus forte, que les interactions mises en jeu sont plus intenses, nombreuses et plus énergétiques. Il en résulte que les analytes ont, pour la plupart, des vitesses de déplacement différentes et inférieures à celle de la phase mobile, d'où la notion de rétention et la possibilité de séparations. Couplé à un système de détections en continu au niveau du chromatographe, un tel instrument permet d'avoir des résultats, à la fois qualitatifs et quantitatifs (Boumrah, 2011).

2.2.2.2. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui repose sur l'action d'un champ électromagnétique sur une particule chargée afin d'en déterminer le rapport masse/charge (m/z) (Botter et Bouchoux, 2012).

Cette technique permet l'identification de molécules d'intérêt par transformation des molécules en ions. Un spectromètre de masse est composé de différents éléments : la source d'ionisation, l'analyseur, le détecteur et l'enregistreur. La source permet l'ionisation de l'échantillon à analyser et le transfert des ions vers l'analyseur de l'instrument. Ce dernier trie en suite les ions en fonction de leur rapport m/z . Enfin le détecteur collecte les ions à la sortie de l'analyseur en leur associant leur rapport m/z et une intensité. L'enregistreur permet de traiter le signal et de convertir les informations en spectre de masse et/ou en chromatogramme lors d'un couplage avec une technique chromatographique (Botter et Bouchoux, 2012 ; Hoffmann et Stroobant, 1999).

Les principaux composants d'un spectromètre de masse sont illustrés dans la figure ci-dessous (Fillatre, 2011) :

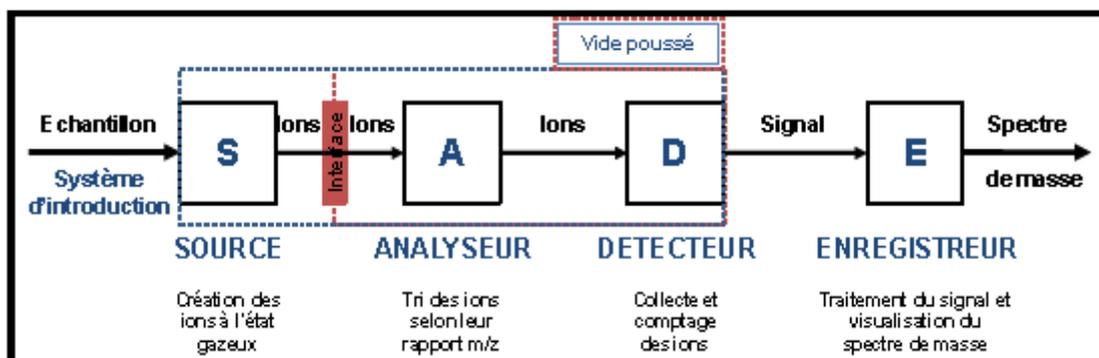


Figure 12 : Schéma d'un spectromètre de masse (Fillatre, 2011)

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Afin de limiter le risque de collisions avec des particules de gaz résiduelles qui entraîneraient des déviations dans la trajectoire de l'ion, le spectromètre de masse fonctionne sous un vide poussé (Sanglier, 2005). Cependant, en fonction de l'appareil, la source d'ionisation peut être sous vide ou à pression atmosphérique API. Ces dernières possèdent alors une interface permettant le passage de la pression atmosphérique à un vide poussé au niveau de l'analyseur.

La source d'ionisation à pression atmosphérique (API)

La source est l'élément du spectromètre qui permet l'évaporation et l'ionisation des analytes contenus dans l'échantillon. Plusieurs méthodes d'ionisation sont disponibles et leur choix d'utilisation dépend des propriétés physico-chimiques des molécules à étudier. Plusieurs sources API existent et parmi eux la source d'ionisation electrospray chauffée H-ESI. Les deux facteurs déterminants pour le choix de la source sont la polarité et la taille moléculaire du composé à analyser (Bouchonnet & al., 1999).

D'une manière générale, l'H-ESI requiert des ions préformés en solution, ce qui la rend ainsi mieux adaptée à l'analyse des composés polaires. On pourrait aussi l'utiliser pour analyser des composés de haut poids moléculaire. Dans le domaine d'analyse des drogues, le choix de l'interface H-ESI reste le plus adaptée (Botter et Bouchoux, 2012).

L'ionisation par electrospray à chaud (H-ESI) transforme les molécules présentes dans la solution en ions en phase gazeuse grâce à l'utilisation combinée de l'ionisation electrospray (ESI) et d'un gaz auxiliaire chauffé. Le mode H-ESI permet d'analyser tout composé polaire qui produit un ion préformé en solution (Kang, 2012).

Les composés basiques (les amines, par exemple) peuvent former une molécule protonée $[M + H]^+$, tandis que les composés acides (les acides sulfoniques, par exemple) peuvent former une molécule déprotonée $[M - H]^-$. En H-ESI, les ions sont produits et introduits dans la source d'ionisation de la façon suivante :

- ✓ L'échantillon pénètre dans l'aiguille ESI sur laquelle une tension élevée est appliquée.
- ✓ L'aiguille H-ESI vaporise l'échantillon en fines gouttelettes chargées électriquement en surface.
- ✓ La densité de la charge électrique à la surface des gouttelettes augmente à mesure que le solvant s'évapore.
- ✓ les gouttelettes se subdivisent en gouttelettes plus petites car la répulsion est supérieure à la tension de surface des gouttelettes.

Ce processus est répété plusieurs fois jusqu' à l'obtention de minuscules gouttelettes.

- ✓ La répulsion éjecte, en phase gazeuse les ions d'échantillon des minuscules gouttelettes hautement chargées.

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

- ✓ Les ions d'échantillons pénètrent alors dans l'analyseur (Thermo scientific, 2008 ; en ligne).

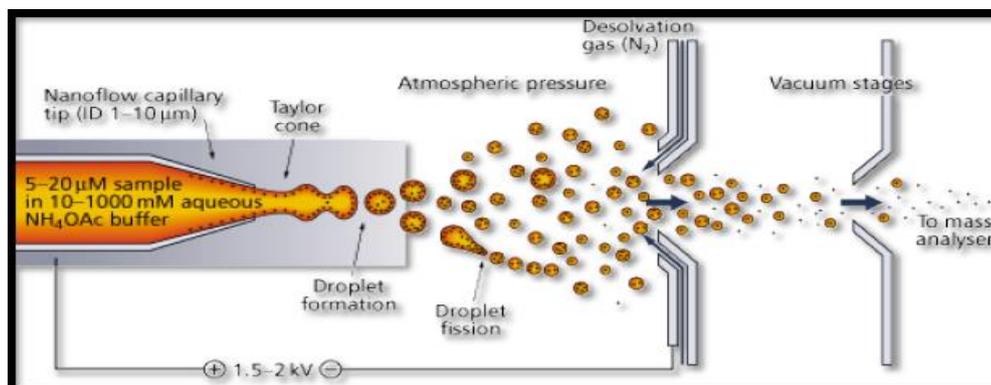


Figure 13 : Principe d'ionisation par HESI (Thermo scientific, 2008)

Les analyseurs

L'analyseur de masse correspond à la partie du spectromètre de masse qui sépare les ions formés dans la source en fonction de leur rapport m/z . Plusieurs types d'analyseurs sont disponibles. Leur mode de fonctionnement repose sur l'utilisation de champs électriques et/ou magnétiques (Bouchonnet & al., 1999).

Parmi les analyseurs basse résolution qui peuvent être couplés aux sources d'ionisation à pression atmosphérique et utilisés dans le domaine de l'analyse de drogues, on trouve l'analyseur quadripolaire.

Un filtre de masse quadripolaire est constitué successivement d'une série de lentilles électroniques permettant la convergence et l'accélération des ions sortant de la source, puis d'un quadripôle formé le plus communément de quatre barres entre lesquelles sont établies des différences de potentiels, l'ensemble débouchant sur un détecteur. L'ion entrant dans le quadripôle est soumis à l'influence d'un champ électrique total (Menet, 2011).

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

La spectrométrie de masse en tandem est née de la volonté d'obtenir des informations structurales sur les molécules ionisées de masses voisines. Les informations structurales apportées par une analyse en masse unique sont donc très limitées. L'idée a été de trouver un moyen d'exciter hors de la source les ions stables afin d'accroître leur énergie interne et, ainsi, de les faire fragmenter (Sleno et Volmer, 2004).

La MS/MS est l'acquisition et l'étude du spectre des produits ou précurseurs électriquement chargés d'un ou plusieurs ions de rapport m/z sélectionnés, ou d'ions précurseurs d'une perte de masse sélectionnée (Maurer, 2005).

Les appareillages « tandem » sont construits de la manière suivante : une première étape consiste à sélectionner un ion stable particulier issu de la source d'ions (appelé «

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

parent » ou « précurseur ») et une seconde qui représente l'analyse des ions issus de sa décomposition (ions « fils » ou « produits »). Dans la phase intermédiaire se situe l'activation de l'ion précurseur qui conduit à son excitation (augmentation de son énergie interne) et à sa fragmentation. Cette technique peut être accomplie par des instruments à faisceaux d'ions comportant plus d'un analyseur, exemple : le triple quadripôle, qui est l'association de trois quadripôles en série. Ce dispositif permet après la sélection d'un ion par le premier quadripôle de le fragmenter dans le deuxième et d'analyser les ions fils apparus dans le troisième (Werner, 2011).

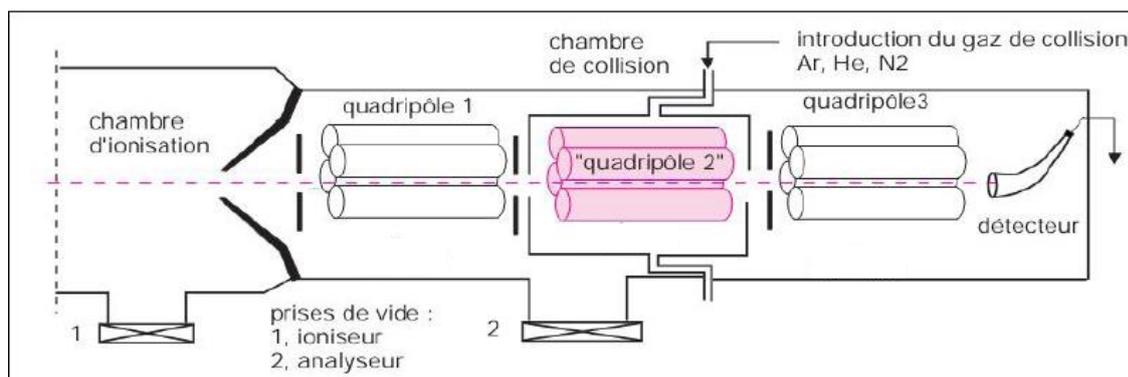
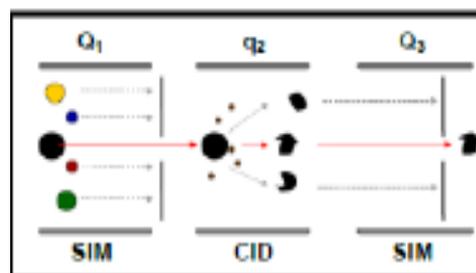


Figure 14 : Principe d'un appareil SM/SM à trois quadripôles en série (Thermo scientific, 2009)

Pour exciter l'ion précurseur, plusieurs méthodes d'activation à faibles et hautes énergies sont disponibles, mais le procédé d'activation MS/MS le plus utilisé en employant un analyseur de type triple quadripôle est ce qu'on appelle la dissociation induite par collision (CID). Ce processus se déroule en deux étapes, la première comprend l'excitation de l'ion précurseur en faisant entrer en collision la molécule d'analyte avec un gaz cible (un gaz lourd « Ar » de même qu'une pression élevée permettant d'augmenter le rendement de fragmentation) qui correspond à une certaine énergie. Cette dernière est l'énergie de collision suivie, d'une deuxième étape qui consiste à la dissociation unimoléculaire de l'ion dont la fragmentation aura lieu si et seulement si l'énergie apportée par la collision est suffisamment élevée pour l'exciter au-delà de son seuil de dissociation. (Werner, 2011)

Le mode balayage de plusieurs ions de fragmentation « SRM, Single Réaction Monitoring ») est obtenu en faisant fonctionner les quadripôles Q1 et Q3 en mode SIM. Il permet de suivre un ion produit spécifique d'une fragmentation particulière de l'ion précurseur (transition), comme il est possible de suivre plusieurs transitions au cours d'une même analyse (Fillatre, 2011).

Figure 15 : Mode d'acquisition « SRM » (Fillatre, 2011)



MATERIEL ET METHODES



II. MATERIEL ET METHODES

Pour la mise au point d'une méthode de recherche et de dosages des produits stupéfiants et des médicaments psychotropes dans le sang comme milieu biologique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), la méthodologie suivantes a été suivie :

A partir des solutions mères des drogues choisis, des solutions diluées ont été préparées pour une optimisation en deux étapes :

La première a pour objectif de fixer les paramètres d'identification spectrométriques,

La seconde quant à elle, permettra de fixer les paramètres chromatographiques les plus propices à une analyse de routine.

1. OPTIMISATION DE L'IDENTIFICATION SPECTROMÉTRIQUE DES COMPOSÉS PURS

1.1. Réactifs

- ✓ Standards des drogues et étalons internes, Lipomed (Mundolsheim, France) ;
- ✓ Méthanol (CH₃OH), Qualité analyse, VWR. Prolabo (Fontenay-Bois, France) ;
- ✓ Acétonitrile (CH₃CN), Qualité HPLC, VWR. Prolabo (Fontenay-Bois, France) ;
- ✓ Formiate d'ammonium (CH₅NO₂), 50mM, Qualité analyse, VWR. Prolabo (Leuven Belgium) ;
- ✓ Acide formique (HCOOH), 0.1%, Qualité analyse, VWR. Prolabo (Fontenay-Bois, France) ;
- ✓ Acide acétique glacial (CH₃COOH), 0.1%, Panreac Quimica (Barcelone, Espagne),
- ✓ Eau ultra pure, qualité HPLC, CARLO ERBA (REAGENTS).

1.2. Equipement de préparation

- ✓ Micropipettes GLASSCO, VWR (1000µL, 500µL, 200µL) ;
- ✓ Agitateur magnétique IKA® RH BASIC KT/C ;
- ✓ Barreau magnétique pour agitation et son extracteur ;
- ✓ Vortex VWR VV3 S40 ;
- ✓ Balance analytique de precision 10mg-200g METTLER TOLEDO AB 204-S/FACT
- ✓ Eprouvette, et Becher de 500ml ;
- ✓ Distributeur de volume ou diluteur automatique FORTUNA® OPTIFIX® 10ml basic ;
- ✓ Pince pour ouvrir et sertir les couvercles des vials ;
- ✓ Mortier en agate avec pilon ;
- ✓ Hotte (KOTTERMANN);
- ✓ Seringues ;
- ✓ Spatule ;
- ✓ Masque et lunette de protection ;
- ✓ Flacons Vials HEAD SPACE, et pour passeur automatique avec des incères.

II. MATERIEL ET METHODES

1.3. Préparation des solutions

Solutions mères à 20mg/L (S₁)

200µl de chaque standard sont introduits dans des vials avec 9.8ml du MeOH pour un volume final de 10ml.



Figure 16 : S1 des opioïdes



Figure 17 : S1 des benzodiazépines



Figure 18 : S1 des amphétamines



Figure 19 : S1 de cocaïne



Figure 20 : S1 des opiacés

Les solutions sont stockées au congélateur
à -20°C.

Solutions pour infusion (pures)

À partir de la solution mère, 1ml de chacune est prélevé à l'aide de seringues et transvasé par la suite dans des vials pour passeur automatique.

Figure 21 : Les vials pour passeur automatique.



II. MATERIEL ET METHODES

Phase mobile B/C (92/8; v/v)

Solution C :

Tampon formiate d'ammonium (50mM) est préparé après acidification de 500ml d'eau désionisée par l'ajout de 500µl d'acide formique, par la suite, dissolution de 3.15g de formiate d'ammonium dans l'eau acidifié.

Solution B :

500ml d'acétonitrile acidifié avec 500µl d'acide acétique.

1.4. Equipement d'analyse

Spectromètre de masse Thermo Scientific TSQ QUANTUM Access muni d'une source d'ionisation électrospray chauffée (HESI) ;

- ✓ Passeur automatique ;
- ✓ Pompe quaternaire model Accela ;
- ✓ Seringue d'infusion en verre 500µL HAMILTON ;
- ✓ Station de pilotage informatique composée d'un ordinateur DELL optiplex, doté d'un logiciel de traitement de données XCalibur 42.

1.5. Infusion des solutions pures

Analyse en mode "Full MS²"

Après avoir choisi la source HESI comme source d'ionisation, chaque solution de 1ml est infusée dans le système spectrométrique avec un volume de 10µL, au travers de l'injecteur automatique permettant l'introduction simultanée de la phase mobile à un débit de 200µL/min.

L'introduction directe des espèces protonées [M+H⁺] + (ion parent) dans le spectromètre de masse permet à travers une observation en "Full MS²" dans l'intervalle de gamme de masse [50-500], tous les fragments fils issus des ions parents après avoir fixé les énergies de collision et la pression du gaz spécifique à chaque transition. Ce mode d'acquisition est caractérisé par un pouvoir d'identification très discriminant ainsi qu'une forte sensibilité.

2. OPTIMISATION DES CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES DES COMPOSÉS PURS

Pour obtenir une séparation optimale de l'ensemble des drogues (mélange de chaque famille), il est indispensable d'optimiser les conditions chromatographiques nécessaires à l'analyse.

II. MATERIEL ET METHODES

2.1. Réactifs

- ✓ Méthanol (CH₃OH), Qualité analyse, VWR. Prolabo (Fontenay-Bois, France) ;
- ✓ Les solutions (S1) ;
- ✓ La phase mobile (B/C) ;
- ✓ Eau ultra pure, qualité HPLC, CARLO ERBA (REAGENTS).

2.2. Equipement de préparation

- ✓ Micropipettes GLASSCO, VWR (1000µL, 500µL, 200µL) ;
- ✓ Vortex VWR VV3 S40;
- ✓ Hotte (KOTTERMANN);
- ✓ Pince pour ouvrir et sertir les couvercles ;
- ✓ Vials pour passeur automatique.

2.3. Préparation des solutions

Solutions filles (S₂) :

Préparer à partir des solutions mères (S₁)

Tableau III : Les solutions filles (S₂) pour l'identification chromatographique

Familles	Dilution A	Concentration	Volume à prélevé	Volume Final
Amphétamines.	1/6	3.33mg/l	200µl	1200µl
Opiacés	1/6	3.33mg/l	200µl	1200µl
Cocaïne	1/5	4mg/l	200µl	1000µl
Opioides	1/5	4mg/l	200µl	1000µl
Benzodiazépines	1/8	2.5mg/l	200µl	1600µl

2.4. Equipement d'analyse

- ✓ Chromatographe en phase liquide Thermo Scientific Accela™ UPLC équipé d'une pompe quaternaire et d'un échantillonneur automatique ;
- ✓ Colonne chromatographique C18 AVP KINETEX «PHENOMENEX®» (150mm, 2,1mm, 2,6µm) ;
- ✓ Spectromètre de masse Thermo Scientific TSQ QUANTUM Access muni d'une source d'ionisation electrospray chauffée (HESI) ;

L'optimisation des conditions de séparation a fait l'objet de plusieurs essais et adaptations au cours de cette étude. Les conditions finales optimisées sont les suivantes :

II. MATERIEL ET METHODES

Tableau IV : Gradient d'élution de la phase mobile.

Temps de rétention (min)	B%	C%
0	8.00	92
6	95.0	5.0
6.1	100.0	0.0
7	100.0	0.0
7	8.0	92.0
9	8.0	92.0
	100.0	0

B : tampon formiate d'ammonium

C : acétonitrile acidifié

- Température : 40°C
- Volume d'injection : 10µL
- Débit de la phase mobile : 200µL/min

2.5. Analyse chromatographique des substances dans le mélange

Une analyse en mode SRM a été appliquée pour l'identification et la confirmation de chaque composé dans le mélange.

3. OPTIMISATION DES CONDITIONS D'EXTRACTION EN PHASE SOLIDE

3.1. Réactifs

- ✓ Méthanol (CH₃OH), Qualité analyse, VWR. Prolabo (Fontenay-Bois, France) ;
- ✓ Acide formique (HCOOH), 10%, 20%, Qualité analyse, VWR. Prolabo (Fontenay-Bois, France);
- ✓ La solution de la phase mobile (B/C) ;
- ✓ Hydroxyde d'ammoniaque (NH₄OH), 30-33%, Segma-aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) ;
- ✓ Sang total vierge d'origine humain, collecté sur tube sec et conservé à -20°C ;
- ✓ Eau extra pure, Qualité HPLC (CARLO ERBA (REAGENTS)).

3.2. Equipement de préparation

- ✓ Manifold (RESPREP™ 12-24) pour SPE équipé d'une pompe à vide ;
- ✓ Cartouches THERMO SCIENTIFIC (HYPER SEP VERIFY-CX 500mg/3ml) ;
- ✓ Centrifugeuse SIGMA 3-16 PK à 4266 tours ;
- ✓ Evaporateur sous flux d'azote LIEBISH LABOR TECHNIK;
- ✓ Bain ultrason FICHER SCIENTIFIC FB 15061 ;
- ✓ La Hotte (KOTTERMANN);
- ✓ Vortex VWR VV3 S40;
- ✓ Micropipettes GLASSCO (1000µL, 500µL, 100µL) ;
- ✓ Tubes à hémolyse en verre 5mL ;
- ✓ Filtre seringue en acétate de cellulose 0,45µm (Ø=25mm) CA W/GMF ;
- ✓ Seringue d'extraction (10ml) ;
- ✓ Fioles jaugé de différents volumes ;

II. MATERIEL ET METHODES

- ✓ Eppendorfs (2ml) ;
- ✓ Vials HEAD SPACE (10ml), 20ml, et pour passeur automatique ;
- ✓ Tubes conique en polypropylène de 15 ml (pour la conservation de la matrice biologique) ;
- ✓ Tubes en verre de 10 ml à fond rond, obturés par bouchon en polypropylène ;
- ✓ Bêchers et éprouvettes de différents volumes ;

3.3. Préparation des solutions

a. A partir des solutions mères ($S_1=20\text{mg/l}$), des solutions filles ont été préparées à 4mg/l sauf dans le cas du mélange cocaïnes d'où la concentration est de 8mg/l .

Tableau V : Préparation des mélanges de solutions

Familles	Concentration mère	Volume à prélevé	Concentration finale	Volume final
Amphétamines	20mg/l	200 μl	4mg/l	1ml
Cocaïne	20mg/l	400 μl	8mg/l	1200 μl
Opiïdes	20mg/l	200 μl	4mg/l	800 μl
Opiacés	20mg/l	200 μl	4mg/l	1ml
BDZ	20mg/l	200 μl	4mg/l	1200 μl

b. Ensuite des dilutions intermédiaires dans l'eau qui titre pour 2mg/l ont été réalisées (dilution à 1/2). Ces dernières sont diluées à 1/2 pour obtenir des solutions titrées à 1mg/l dans le sang (S_3).

Tableau VI : Préparation des solutions pour la surcharge

Familles	Concentration dans l'eau	Volume de l'eau à prélevé	Concentration dans le sang	V. du sang à prélevé	V. final à surchargé
Amphétamines	2mg/l	1ml	1mg/l	2ml	4ml
Cocaïne	2mg/l	1200 μl	1mg/l	2400 μl	4800 μl
Opiïdes	2mg/l	800 μl	1mg/l	1600 μl	3200 μl
Opiacés	2mg/l	1ml	1mg/l	2ml	4ml
Benzodiazépines	2mg/l	1200 μl	1mg/l	2400 μl	4800 μl

II. MATERIEL ET METHODES

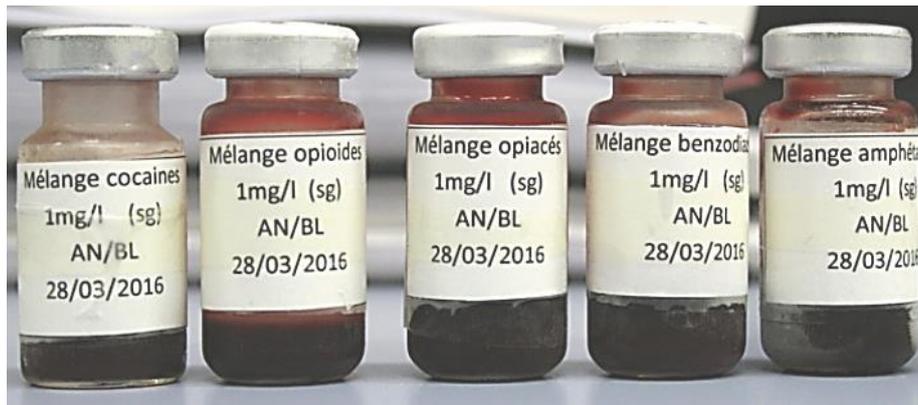


Figure 22 : Le sang surchargé à 1mg/l

c. A la fin, une dernière dilution à 1/10 a été effectuée pour le sang surchargé pour un volume final de 500 μ l, d'où 50 μ l du sang surchargé est ajouté à 450 μ l du sang vierge afin d'acquérir la concentration de 100 μ g/l.

d. Pour les étalons internes, 25 μ l de chaque solution S1 sont dilués dans 4975 μ l du MeOH pour un volume final de 5ml et une concentration de 100 μ g/l.



Figure 23 : Les étalons internes qui titrent pour 100 μ g/l.

e. Préparation des solutions pour l'extraction en phase solide :

- ✓ Solution d'acide formique à 20% (dilution à 1/5) : 2ml d'acide formique mélangé avec 8ml d'eau désionisée.
- ✓ Solution d'acide formique à 10% (dilution à partir de la solution à 20% (1/2)) : 7ml d'eau désionisée mélangé avec 7ml de la solution d'acide formique à 20%.

II. MATERIEL ET METHODES

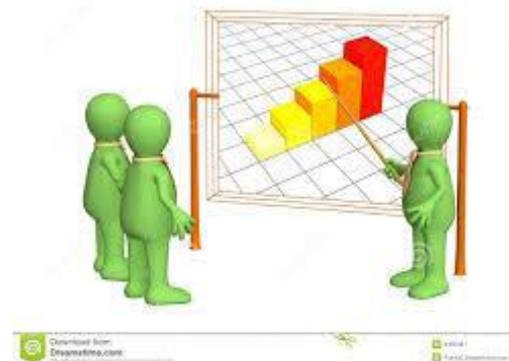
- ✓ Solution méthanol/ammoniaque (92, 8 ; V, V) : 800 μ l d'ammoniac + 9200 μ l méthanol.
- ✓ La phase de reprise (B/C (1 :1, v/v)) : à partir de la phase mobile 10ml de la solution (B) sont vortéxées avec 10ml de la solution (C), pour obtenir un volume de 20ml.

3.4. Extraction

Avant l'extraction, 250 μ l du sang surchargé a été mélangé avec 50 μ l de l'E.I. Ce dernier a été prétraité conformément au protocole suivant :

- ✓ Vortex ;
- ✓ Ajout de 2ml d'eau désionisée ;
- ✓ Vortex ;
- ✓ Ultrason 5min ;
- ✓ Centrifugation 10min à 4266 tour par min ;
- ✓ Activation des sites de rétention des cartouches : 1ml MeOH suivant de 1ml d'eau désionisée ;
- ✓ Le surnagent est récupéré à l'aide d'une seringue ;
- ✓ Le dépôt de surnagent sur les cartouches à travers un filtre en acétate de cellulose ;
- ✓ Renforcer l'élution à l'aide d'une pompe à vide ;
- ✓ Rinçage : avec 1ml d'eau désionisée \longrightarrow utilisation de pompe à vide ;
- ✓ En suite 1ml d'acide formique (10%) \longrightarrow pompe à vide ;
- ✓ En suite 1ml méthanol \longrightarrow pompe à vide (environ 2min) ;
- ✓ Elution : avec 1ml du mélange méthanol/ammoniaque (92/8 ; v/v) ;
- ✓ Neutralisation avec 100 μ l d'acide formique (20%) ;
- ✓ Evaporation sous flux d'azote à 37°C ;
- ✓ Le résidu sec est solubilisé dans 50 μ l de la phase de reprise (mélange phase mobile 1/1 ; v/v) ;
- ✓ 10 μ l sont injectés dans le système chromatographique.

RESULTATS ET DISCUSSIONS



III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. IDENTIFICATION DES TRANSITIONS PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE POUR CHAQUE STANDARD

A partir du moment où les ions parents de polarisation positive [M+ H+] sont introduites dans le système chromatographique avec des gammes de masse allant de [50 à 500] et de pression de gaz à 285 bar, les ions fils issus de la fragmentation en double mass « Full MS² » ainsi que les énergies de collisions associées à chacune d'elles sont élaborées. Le tableau ci-dessous représente les molécules cibles, les ions parents de chacune (M+1), les ions fils (SRM1 et SRM2), ainsi que les énergies de collisions appropriées (EC1 et EC2).

Tableau VII : Infusion directe des standards dans CL-MS/MS

SUBSTANCES	M+1	SRM1	EC1	SRM2	EC2	ECM	TR
Morphine	286.3	201.1	25	165.1	37	30	2.58
6-MAM	328.4	211.1	26	165.1	37	28	3.65
Codéine	300.4	183.1	29	215.1	26	29	3.74
Hydrocodone	300.2	199.1	30	128.15	79	50	3.77
Dihydrocodéine	302.3	115.18	97	128.15	85	90	3.43
6-MAM-D3 EI	331.1	165.1	51	–	–	51	3.88
Méthadone	310.4	105.2	31	265.2	15	23	5.70
Buprénorphine	468.6	396	50	–	–	50	5.87
Norbuprénorphine	414.8	187.02	34	211.03	36	36	4.53
Tramadol	264.4	58.4	16	264.2	9	16	4.29
Methadone-D3 EI	313.4	105.2	30	–	–	30	5.68
Amphétamine	136.3	91.27	17	119.27	8	8	3.73
Métamphétamine	150.3	91.3	19	119.2	10	10	3.78
MDMA	194.2	135.1	21	163.1	12	16	3.80
MDEA	208.3	135.1	21	163.1	13	16	4.02
MDA	180.2	135.1	18	163.1	10	16	3.68
Amphetamine-D5 EI	141.3	93.3	25	–	–	25	3.72
Diazépam	285.5	154.04	26	193.07	31	26	6.64
Bromazépam	316.5	182.06	32	209.04	26	25	5.14
Oxazépam	287	240.78	16	268.59	9	9	5.67
Tétrazépam	289.1	225.10	27	197.10	30	30	7.28
Midazolam	326	290.59	14	248.74	27	28	6.28
Zolpidem	308.1	235	39	263	27	35	5.04
Oxazepam-D5 EI	292.2	246.1	25	–	–	25	5.58
Cocaïne	304	105.2	40	182.1	25	35	4.58
BEC	290.3	105.2	32	198.1	19	30	3.85
EME	200.2	82.3	29	182.2	17	24	1.77
Cocaine-D3 EI	307.1	185.2	25	–	–	25	4.57

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

- ✓ **SRM1** : Le premier ion fils (fragmentation selon m/z)
- ✓ **SRM2** : Le deuxième ion fils (fragmentation selon m/z)
- ✓ **EC1** : Energie de collision 1
- ✓ **EC2** : Energie de collision 2
- ✓ **EI** : Etalon Interne
- ✓ **TR** : Temps de rétention (en min)

La fragmentation en double masse « Full MS² » a permis d'identifier deux ions fils distincts caractérisés par des énergies de collisions propres à chaque ion, permettant de réaliser une identification et une confirmation.

2.IDENTIFICATIONS CHROMATOGRAPHIQUES

Le caractère hydrophobe des molécules analysées et la masse moléculaire qu'elles présentent (entre 100-400 Tableau I), nous a amener pour procéder à la séparation de ses molécules en choisissant une colonne chromatographique de type C18 (150mm, 2,1mm, 2,6µm) adaptée à de faibles quantités d'échantillons et permettant une économie de la phase mobile, vue son exécution dans des délais très raisonnables.

La mise au point d'une séparation en phase inverse, nécessite l'utilisation d'un solvant organique et d'une phase aqueuse comme phase mobile. Suivant les constantes d'acidité PKa (Tableau I) des molécules étudiées et afin d'améliorer la séparation chromatographique, l'ionisation et la sensibilité de la détection, le choix s'est porté sur un mélange tampon formiate/ acétonitrile acidifié.

Le gradient optimisé de manière à séparer régulièrement au cours de l'analyse chromatographique les 23 substances actives est détaillé dans le tableau IV, l'analyse effective dure 5 à 10min maximum. Les temps de rétention des molécules étudiées sont présentés dans le Tableau VII.

Les figures ci-dessous présentent les chromatogrammes des purs obtenus après observation en mode SRM à l'issus d'une fragmentation en double masse.

Après observation et lecture, il est à retenir que les chromatogrammes résultants confirment les résultats de l'optimisation d'identification spectrale, assurant ainsi l'obtention d'une maximale (optimale) sensibilité pour les molécules étudiées lors de la détection, et bien sûr ceci est réalisable qu'après une séparation chromatographique optimale appréciable.

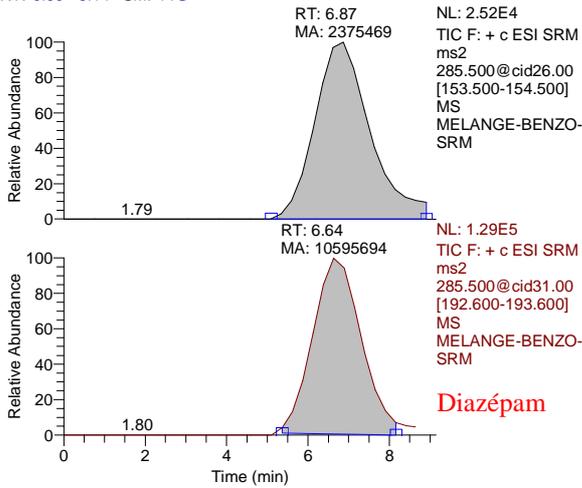
L'analyse chromatographique en mode SRM a permis, d'une part une détection décisive de chaque analyte d'une façon très estimable grâce à un très bon signal de réponse, comme le montre les figures en dessous, d'autre part une séparation chromatographique jugée très marquante grâce à des temps de résolution distincts (aucune interférence), ce qui permet d'éviter les co-élutions des molécules d'intérêts.

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

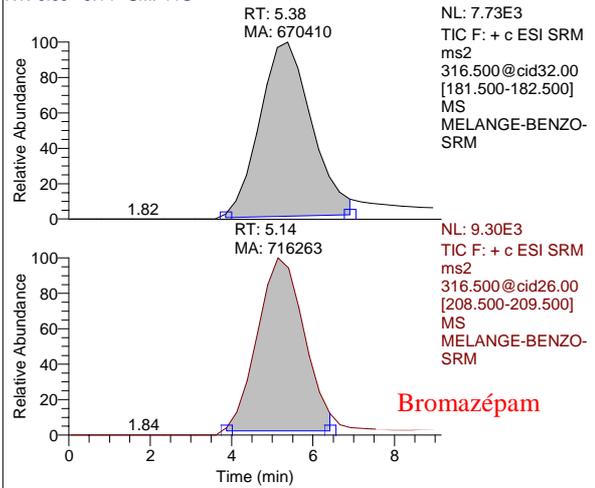
C:\XCalibur...\MELANGE-BENZO-SRM

3/24/2016 2:30:14 AM

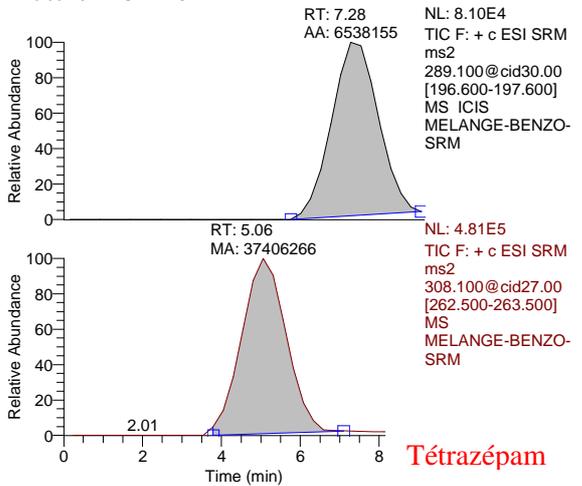
RT: 0.00 - 9.14 SM: 11G



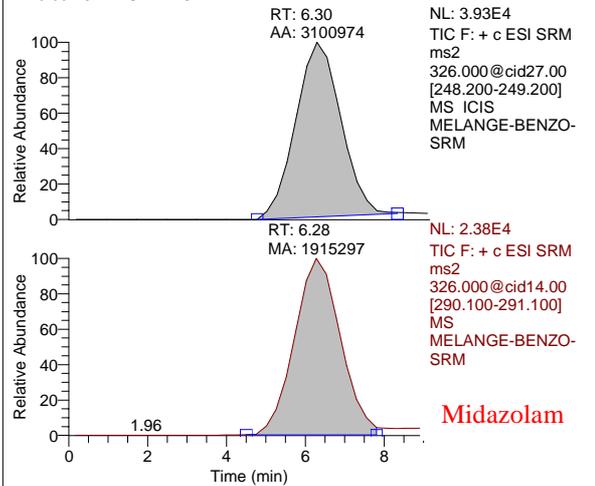
RT: 0.00 - 9.14 SM: 11G



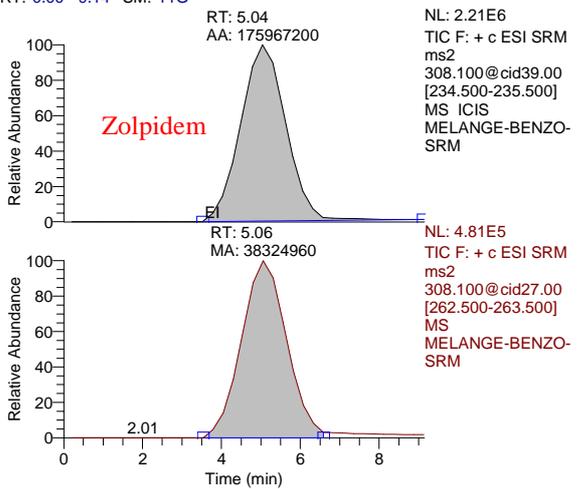
RT: 0.00 - 9.14 SM: 11G



RT: 0.00 - 9.14 SM: 11G



RT: 0.00 - 9.14 SM: 11G



RT: 0.00 - 9.14 SM: 11G

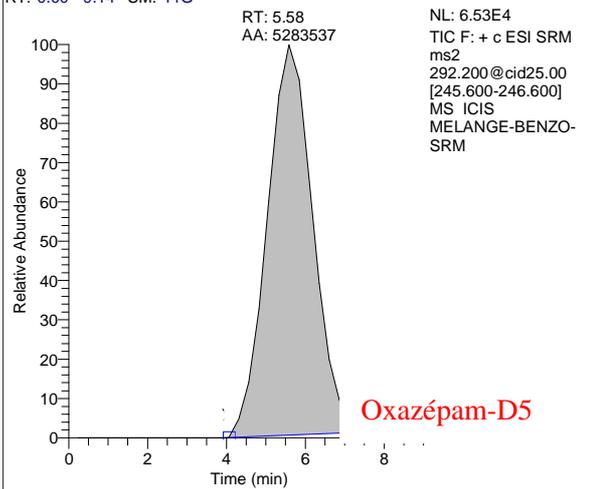


Figure 24 : Chromatogramme des purs de la famille des benzodiazépines en mode SRM

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

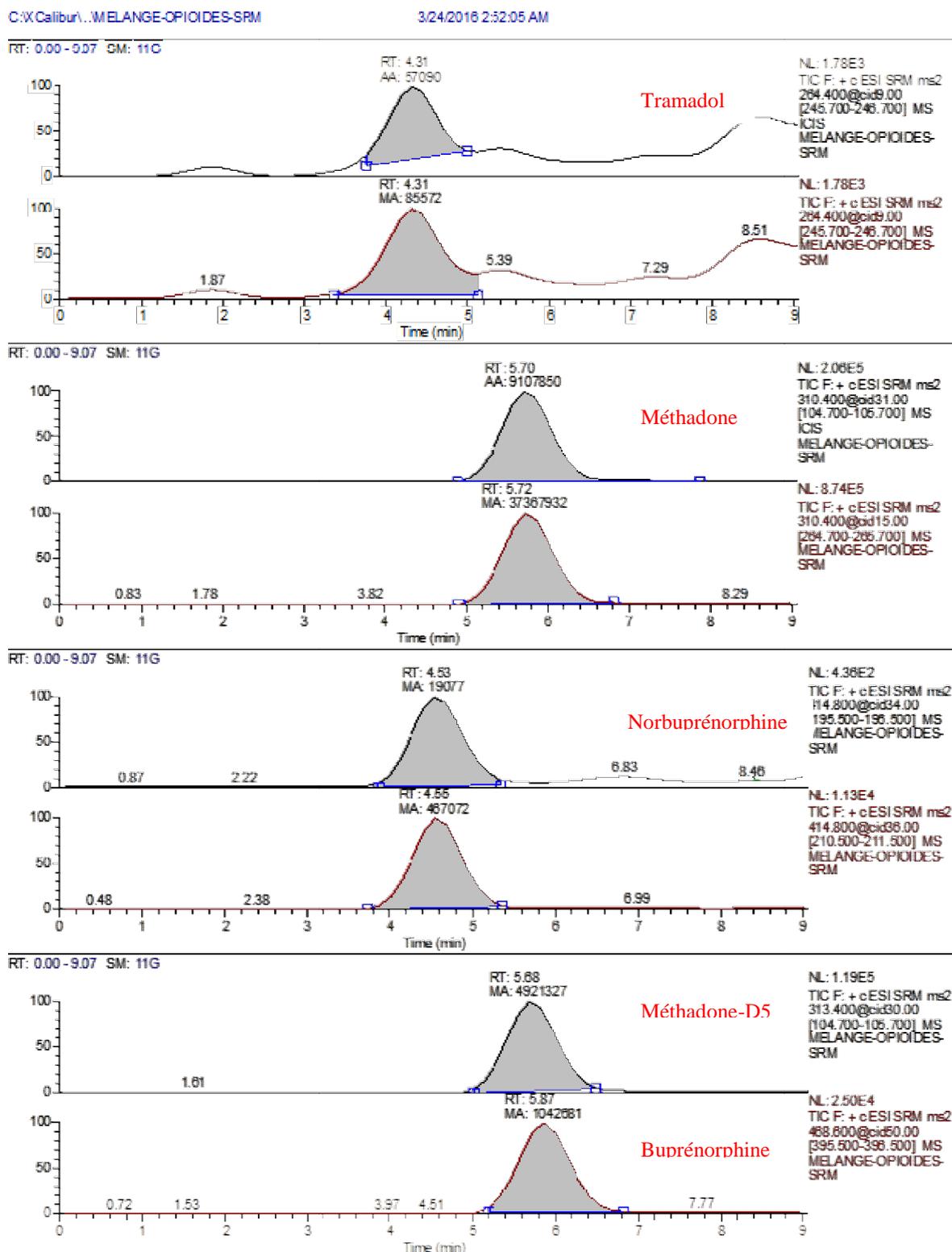


Figure 25 : Chromatogramme des purs de la famille des opioïdes en mode SRM

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

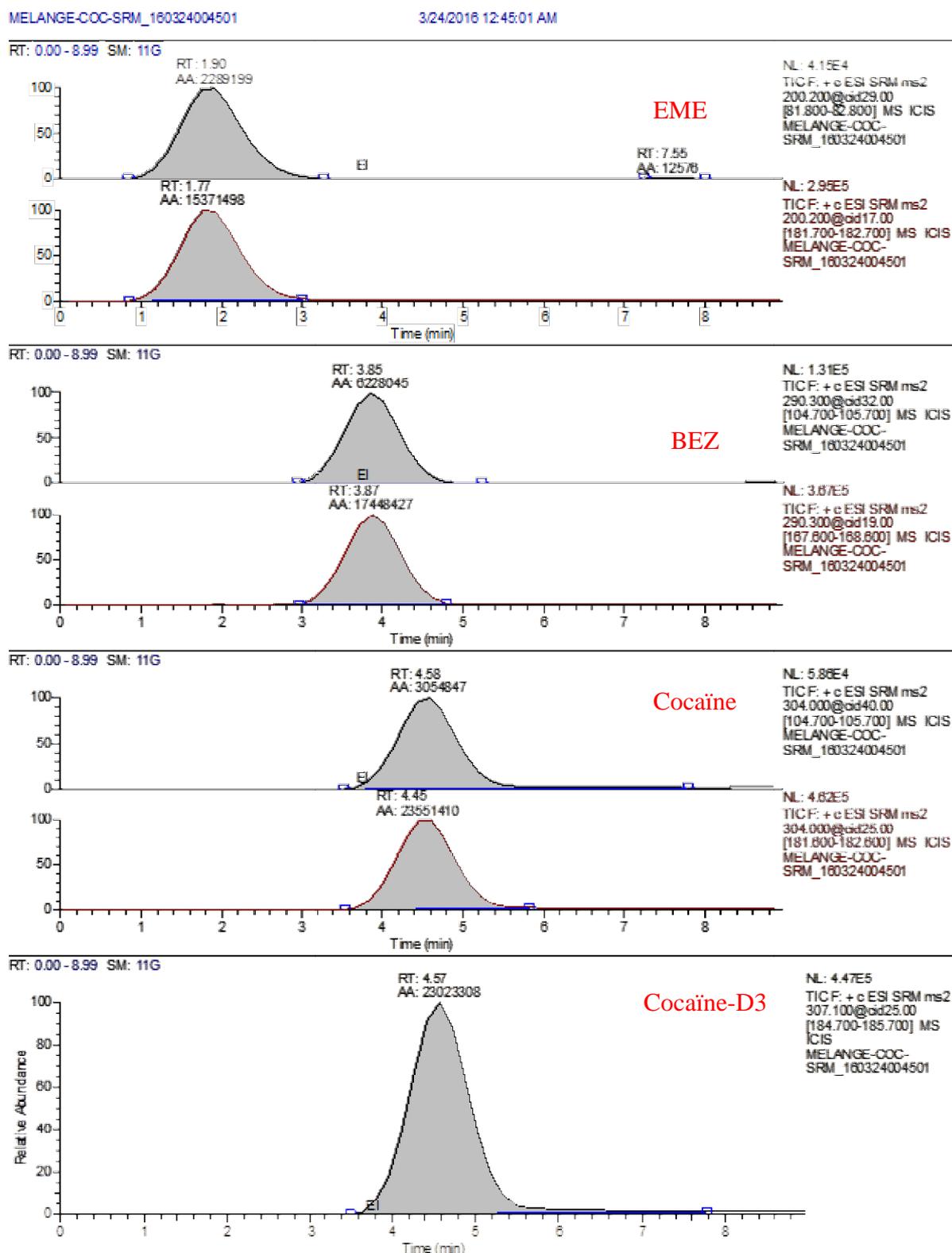


Figure 26 : Chromatogramme des purs de la famille de cocaïne en mode SRM

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

C:\XCalibur\...MELANGE-OP_160316043459

3/16/2016 4:34:59 AM

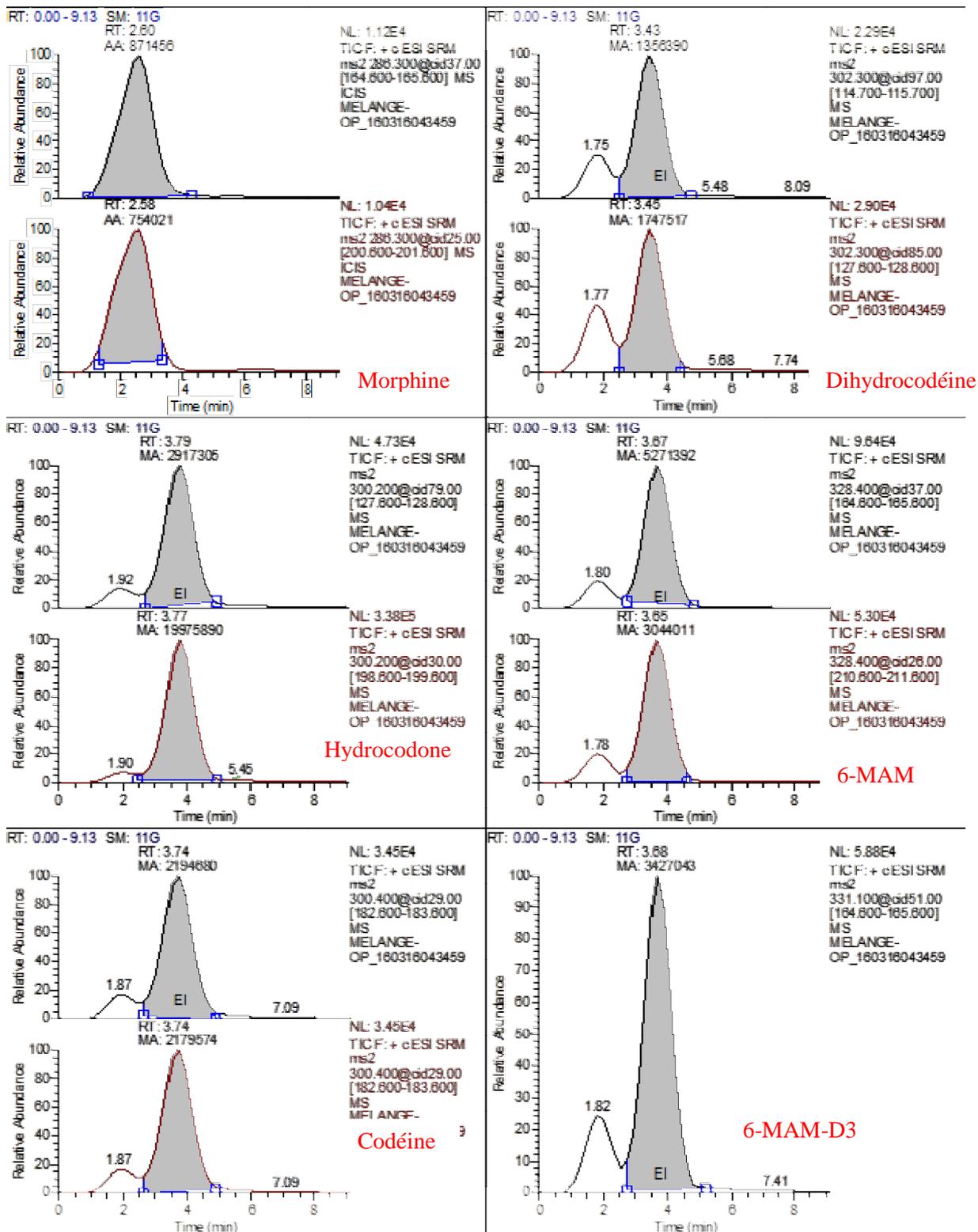


Figure 27 : Chromatogramme des purs de la famille des opiacés en mode SRM

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

C:\XCalibur\MELANGE-AMP_160315054125

3/15/2016 5:41:25 AM

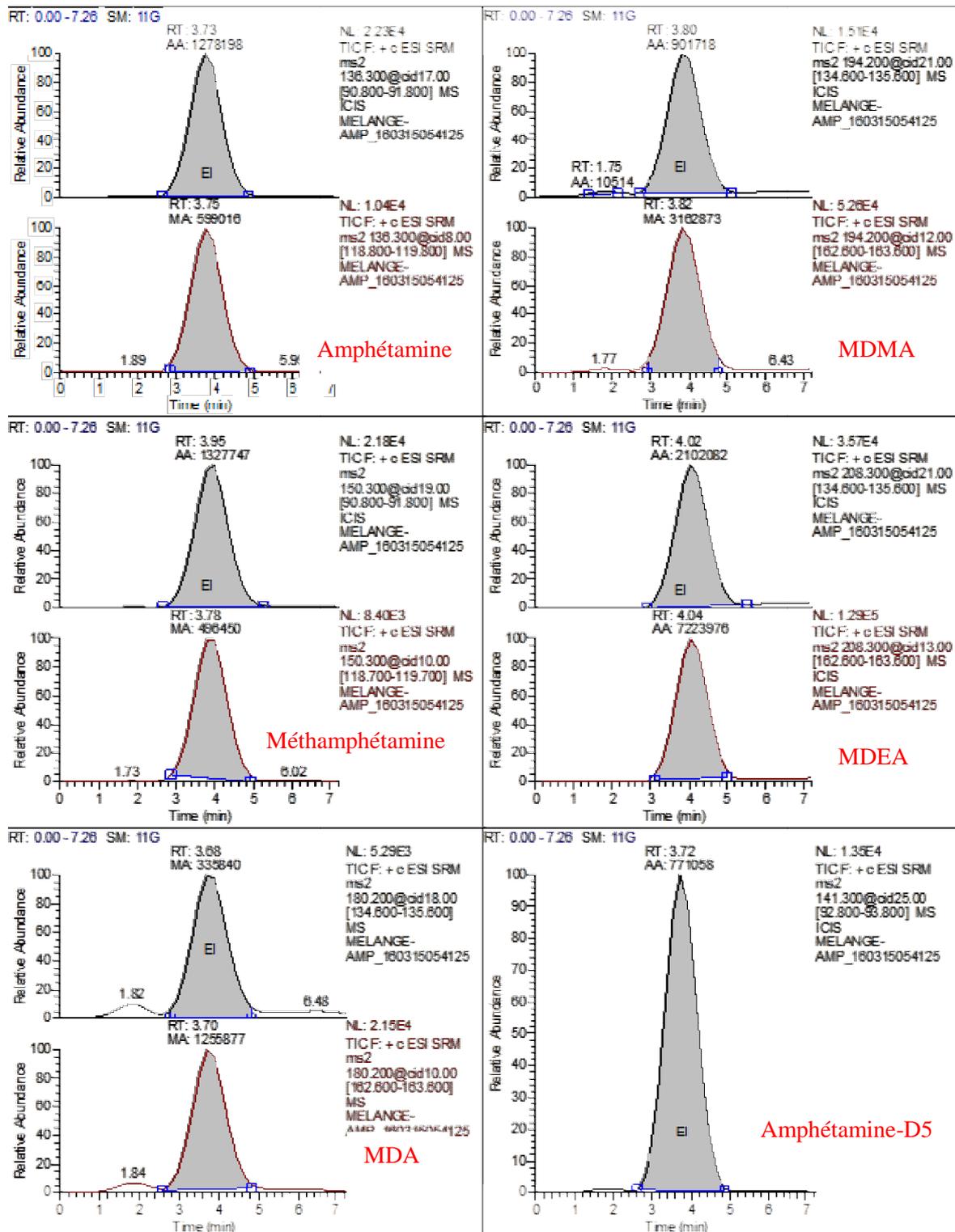


Figure 28 : Chromatogramme des purs de la famille des amphétamines et ses dérivés en mode SRM

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

3. EXTRACTION:

Afin d'apprécier la capacité de la cartouche à extraire des molécules d'intérêts, un calcul de rendement d'extraction est nécessaire. Ce dernier est effectué par le calcul des rapports de surfaces des analytes étudiés après avoir subis le processus d'extraction appliqué à une matrice surchargée (le sang), sur les surfaces de ces mêmes analytes, analysés à l'état pur.

Ce rendement s'exprime en pourcentage et permet d'évaluer l'efficacité de l'extraction appliquée aux substances étudiées.

Un exemple de calcul de rendement d'extraction est illustré dans le tableau VIII.

Tableau VIII: Rendement d'extraction pour les amphétamines et ses dérivés

Substances	Surface des pics		Rendement en %
	Substances pures	Substances surchargées	
Amphétamine	599016	76806	12,82%
Méthamphétamine	496450	31433	6,33%
MDMA	901718	60488	6,71%
MDEA	2102082	141195	6,72%
MDA	335840	132982	39,60%

D'après les résultats des rendements, qui sont calculés par les rapports des aires des pics de la surcharge sur ceux du mélange des substances purs fois cent (*100), la cartouche HCX est la mieux adaptée avec 39,60% pour la MDA.

Sachant que la concentration de surcharge été de 100µg/l, on peut dire que la cartouche HCX permet une extraction à de très faible concentration avec moins d'interférences vu l'intensité des pics des chromatogrammes de la surcharge. En figure 31 il se trouve les chromatogrammes d'extraction des amphétamines et ses dérivés, par la cartouche HCX.

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

AMP-EXTR-HCX-100PPB_160407050229

4/7/2016 5:02:29 AM

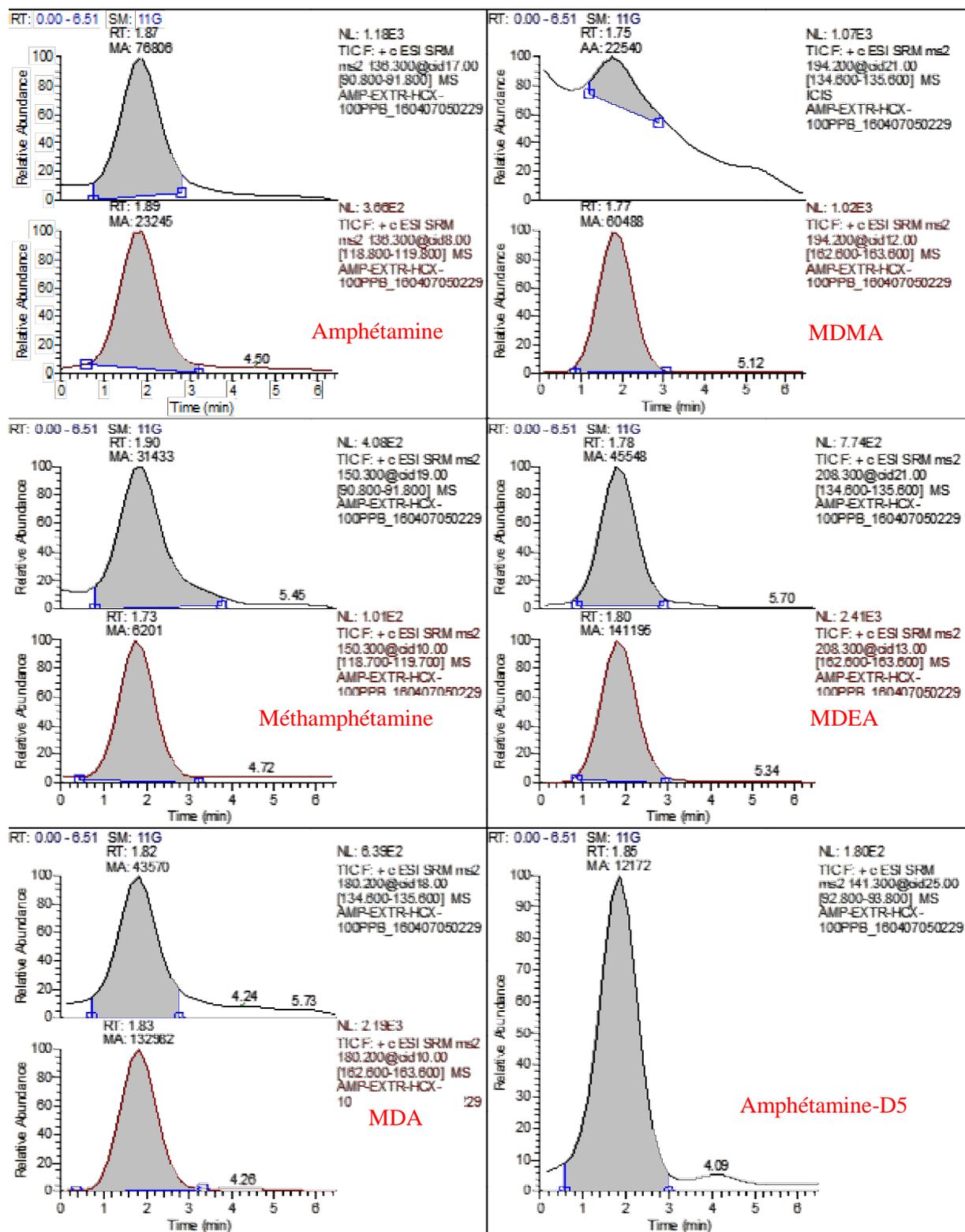


Figure 29: Chromatogramme d'extraction de la famille des amphétamines et ses dérivés par la cartouche HCX

CONCLUSION



CONCLUSION

La conduite sous l'influence des drogues (stupéfiants et psychotropes) est généralement considérée comme un risque potentiel pour la sécurité routière. Tout produit psychoactif augmente le risque pour un conducteur d'avoir un accident sur la route.

L'aboutissement de ce travail a permis de mettre au point une méthode d'analyse par la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC/MS-MS), dans le contexte de recherche et de dosage des substances stupéfiantes et psychotropes dans le sang.

C'est une contribution à l'élaboration d'une méthode unique rapide et précise permettant de rechercher ces substances dans les milieux biologiques (sang), afin de déterminer les causes des accidents automobiles par l'interprétation des résultats.

Le dépistage urinaire ou l'analyse d'urine rapide est un procédé fréquemment utilisé, simple et économique afin de détecter une prise (ou non) de drogues. Les résultats positifs contestés doivent être vérifiés grâce à une analyse de confirmation (LC/MS-MS).

Plusieurs étapes ont été nécessaires pour la réalisation de ce travail. En premier lieu, l'optimisation des paramètres de détection en spectrométrie de masse et des conditions de séparation en chromatographie liquide a été réalisée.

En second lieu, surcharge du sang puis l'extraction des substances de la matrice biologique (sang total) par la cartouche HCX.

Les résultats obtenus avec la méthode optimisée et mise au point durant notre travail, répondent aux objectifs tracés en fonction de la problématique posée, ils sont satisfaisants en termes de sensibilité, de sélectivité et de spécificité, pour que la méthode soit utilisée en routine pour la détermination et la quantification des substances stupéfiantes et psychotropes dans le sang.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Anger, J.P;** (2003). Effets des stupéfiants sur la conduite automobile. *Ann. Toxicol. Anal*, 15(2), P.97-125.
- Anger, J.P; Alvarez, G.C; Pépin, J; Mura, P;** (2011). Cocaïne et crack, in Mura, P ; Kintz, p, editors, *Drogues et accidentalités*. Paris : EDP Sciences, p.183-201.
- Alvarez, J.C; Boyer, J.C; Verstraete, A.G; Pelessier, A.L;** (2015). Conduite automobile et cocaïne : bases bibliographiques pour un consensus de la société française de toxicologie analytique. *Toxicologie Analytique et Clinique*, (27), P.165-183.
- Baselt, R.C; Cravey, R.H;** (2003). Disposition of toxic drugs and chemicals in man, fourth ed., *Chemical Toxicology Institute*; Foster City, CA, p.225.
- Botter, B; Bouchoux, G;** (2012). Spectrométrie de masse principe et appareillage. *Techniques de l'Ingénieur*, (1), p.2645.
- Bouchonnet, S ; Hoppilliard, Y ; Kargar, G.T ;** (1999). Les différents types de spectromètres de masse utilisés pour l'analyse des composés organiques et bio-organiques, *Spectra Analyse*, (207), p.11-25.
- Boumrah, Y;** (2011). Mise au point d'une méthode de séparation pour l'analyse en routine de la résine de cannabis ; Th master : Analyse et contrôle ; ALGER : Université des sciences et de la technologie HOUARI BOUMEDIENE.
- Cleon, S ; Sevrain, S ;** (2002). Le point sur le couplage chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse. *Spectra Analyse*, (31), p.22-30.
- Cleon, P; D'angeli, D;** (2005). Le couplage entre la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse. *Spectra Analyse*, (242), p.13-18.
- Dénes, J. Katona, M ; Hosszu, A ; Czuczy, N ; Takats, Z ;** (2009). Analysis of biological fluids by direct combination of solid phase extraction and desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Anal chem*, (81), p.1669-1675.
- Fabrigas, B; Velea, D;** (2003). Fiche addition : 4-la cocaïne. *Revu soins*, N°63, p.57- 58.
- Fillatre, Y;** (2011). Produits phytosanitaires : Développement d'une méthode d'analyse multi-résidus dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode tandem ; Th doct. : Chimie analytique. ANGERS : université angers, Volume1.
- Garnier, M; Delamare, V;** (1997). Le garnier-delamare, dictionnaire des termes de médecine. 24^{ème} édition. Paris : maloine.
- Ghysel, M.H;** (2004). Amphétamines et dérivés. *EMC-Toxicologie Pathologie*, (1), p.13-20.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Goullé, J.P; Verstraete, A; Boulu, R; Contentin, J; Foucher, J.P; Reas, E; Tillement, J.P; (2008).** Drogues, médicaments et accidentologie. *Annales pharmaceutiques Française*, (66), p.196-205.
- Hoffmann, E.D; Stroobant, V; (1999).** Spectrométrie de masse, cours et exercices corrigés ; Dunod.
- Humbert, L; (2010).** Extraction en phase solide (SPE) : théorie, applications. *Ann Toxicol Anal*, (22), p.61-68.
- Hyman, S.E; Mlenka, R.C; Nestler, E.J; (2006).** Neural Méchanisms of addition the role of reward related learning and memory. *Annu Rev Neurosci*, (29), p.565-598.
- Janika, M; Kot-Wasik, A; Namiesnik, J; (2010).** Analytical procedures for determination of cocaine and its metabolites in biological samples. *Trends in Analytical chemistry*. 29 (3), p.209-224.
- Kang, J.S; (2012).** Principls and Applications of LC-MS/MS for the Quantitative Bioanalysis of Analytes in Various Biological Samples. *Tandem Mass Spectrometry-Applications and Principles*, p. 492.
- Katzung, B; Masters,S; Tevora; (2009).** Clinical pharmacology, 11th edition McGraw-Hill companies.
- Kintz, P ; (1998).** Toxicologie et pharmacologie médicolégale. France : Bialec, S.A.
- Lacroix, C; Saussereau, E; Bodin, G; Goullé, J.P; (2008).** Quantification des opiacés, cocaïniques et amphétamines par chromatographie liquide haut performance/ spectrométrie de masse en tandem après préparation en ligne de l'échantillon. *Ann. Toxicol. Anal*, 20(1), p. 25-38.
- Landry, P; Gervais, M; O'connor, K.P; (2008).** Mise à jour sur les considérations pharmacocinétiques, pharmacodynamiques et les interactions médicamenteuses dans le choix d'une benzodiazépine. *Annales médico.psychologiques*, (166), p.585-594.
- Lardy-Fontan, S; Brieudes, V; (2011).** Les molécules psychotropes : panorama des enjeux environnementaux et analytiques. *Amélioration des connaissances sur les substances émergentes*, p.10/52.
- Leban, M; (2013).** Apport des techniques de chromatographie liquide couplée à la spectroscopie de masse tandem aux dosages des stéroïdes ; *Médecine Nucléaire*, (37), p.8-13.
- Maurer, H; (2005).** Multi-analyte procedures for screening for and quantification of drugs in blood plasma, or serum by liquid chromatography-single stage or tandem mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS) relevant to clinical and forensic toxicology. *Clin Biochem*, 38(4), p.310-318.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Maquille, A; Guillarme, D; Rudaz, S; Veuthey, J.L; (2009).** Ultra-High performance liquid chromatography and its application. *Chromatographia*, (70), P.1373-1380.
- Menet, M; (2011).** Principes de la spectrométrie de masse. *Revue francophone des laboratoires*, (437), P. 43-47.
- Moffat, A.C; Osselton, M.D; Widdop, B; (2004).** Clark's Analysis of Drugs and Poisons, Third edition, vol 2, London.
- Mura, P; Brunet, B; Ghysel, M.H; Gouille, J.P; (2015).** Conduite automobile et amphétamines dans le sang –bases bibliographiques pour un consensus de la santé française de Toxicologie analytique. *Toxicologie Analytique et Clinique*, (27), p.142-152.
- Mura, P; Kintz, P; (2011).** Drogues et accidentalité. Paris: EDP Sciences.
- Needham, S.R; Jeanville, P.M; Brown, P.R, Estape, E.S; (2000).** Modern alkaloids: structure, isolation, synthesis, and biology. *Journal of Chromatography B*, (748), p.77-87.
- Pepin, G; Chèse, M; (2003).** Opiacés et produits de substitution. *EMC biologie clinique, Toxicologie*, p.50-90.
- Richard, D; Senon, J.L; (1999).** Dictionnaire des drogues, des toxicomanies et des dépendances. *Ed Larousse*, p.161.
- Sanglier, S; (2005).** « Cours Spectrométrie de Masse », Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio Organique.
- Siemens, Syva; (2008).** Rapid Test d.a.u. 9 mAMP/OPI/COC/THC/PCP/BZO/BAR/TCA/AMP. *Test immunochromatographique en un étape pour la détection qualitative des neuf drogues dans l'urine humaine* . s.l. : siemens. Fiche Technique de l'INCC.
- Sleno, L; Volmer, D.A; (2004).** Ion activation methods for tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, (39), p.1091-1112.
- Sulzer, D; Sonders, M.S; Poulsen, N.W; Gali, A; (2005).** Mechanisms of neurotransmitter release by Amphetamines, a review. *Prog neurobiol*, (1025), p.47-56.
- Vinner, E; Dehon, B; Ghysel, M.H; Lhermitte, M; (1999).** Les psychostimulants. In : Mura, P ; (1999). Alcool, médicaments, stupéfiants et conduite automobile, paris : *Elsevier*, p.97-125.
- Werner, E; (2011).** Analyse du métabolisme par Chromatographie Liquide Couplée à la Spectrométrie de Masse : Application à la recherche de biomarqueurs indirects d'induction enzymatique. Th doct ; UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Organisations

OICS ; (2013). Liste des stupéfiants placés sous contrôle international. *Convention unique sur les stupéfiants de 1961* (Liste jaune) ,52^e édition, France.

OICS ; (2014). Liste des substances psychotropes placées sous contrôle international, *Convention de 1971 sur les substances psychotropes* (Liste verte) ,25^e édition, France.

Thermo scientific ; (2008). Sonde HESI-II Manuel d'utilisation, 7000597204, Révision B.

Thermo Fisher Scientific ; (2009). Manuel sur le matériel, p. 34.

Sites Internet

Advancing the Chemical Sciences [en ligne] consulté le 05/04/2016 : <URL : <http://www.rsc.org/chemistryworld/Issues/2003/February/together.asp>>, 2003.

GLOSSAIRE

GLOSSAIRE

Amphétamines : Les amphétamines sont des produits stimulants du système nerveux central, utilisées en thérapeutique pour leurs propriétés anorexigènes, vasoconstrictrices, dans le traitement de l'hyperkinésie, ou de manière illicite par des toxicomanes, des sportifs, des étudiants.

Agoniste : Analogue d'un médiateur chimique endogène capable de provoquer une activité intrinsèque après interaction avec son récepteur spécifique.

Antagoniste : Analogue d'un médiateur chimique endogène incapable de provoquer une activité intrinsèque après interaction avec son récepteur spécifique. Il ne possède donc pas d'action propre. Son effet pharmacologique est le résultat d'une opposition à l'action d'un médiateur chimique endogène ou d'un agoniste.

Benzodiazépines (BZD) : Les benzodiazépines sont les médicaments psychotropes les plus souvent prescrits dans le traitement de l'anxiété et des troubles du sommeil, Cependant, elles peuvent entraîner d'une part une accoutumance et une dépendance.

Benzoylécgonine (BEZ) : Métabolite primaire de cocaïne.

Buprénorphine : Opioïde de synthèse prescrit à dose faible dans le traitement de la douleur et, à dose très supérieure, dans le traitement de substitution pour les personnes dépendantes aux opiacés comme l'héroïne.

Cocaïne (COC) : Alcaloïde psychoactif extrait de la coca et pourvu de propriétés psychostimulantes dont l'usage peut donner lieu à dépendance, elle est largement utilisée en médecine comme anesthésique local en ophtalmologie, et de plus en plus par les toxicomanes pour ses propriétés stimulantes.

Cocaïer : Un arbuste tropical dont les feuilles fournissent la cocaïne.

Codéine : Alcaloïde de l'opium (qu'on trouve dans le pavot) de la classe des opiacés qui se distingue de la morphine.

Dépendance (selon l'OMS): Un état, psychique et parfois physique, résultant de l'interaction entre un organisme vivant et un produit, caractérisé par des réponses comportementales ou autres qui comportent toujours une compulsion à prendre le produit de façon régulière ou

GLOSSAIRE

périodique pour ressentir ses effets psychiques et parfois éviter l'inconfort de son absence (sevrage).

Dépendance physique : Certaines drogues telles que l'héroïne conduisent à une autre forme de dépendance dans tout l'organisme qui se manifeste par des troubles importants dès que le sujet est en état de manque : douleurs, crampes, vomissements... etc.

Dépendance psychique (psychodépendance) : Pulsion permanente à consommer une drogue ou un médicament. Si l'individu cesse ces prises il ressent les effets du manque avec une sensation d'angoisse, et de malaise.

Dépresseurs : Les produits dépresseurs sont des substances qui ralentissent l'activité du système nerveux central. De façon générale, ce sont tous les produits qui invitent au repos. La prise de ces produits rend le sujet inactif.

Dépression respiratoire : Insuffisance respiratoire.

Dérivatisation : Une technique qui permet l'analyse de composés qui ne peuvent pas être directement analysés en chromatographie en phase gazeuse (température d'ébullition ou stabilité à la température inadaptée, sélectivité ou seuil de détection trop faibles) par réaction chimique sur le produit à analyser, on ajoutant un groupement fonctionnel adéquat, qui permet son analyse par chromatographie en phase gazeuse.

Dihydrocodéine : Dérivé de la codéine.

Drogues licites : Des substances, dont la consommation et la vente ne sont pas interdites par la loi, mais elles sont soumises à une réglementation stricte dans l'intérêt de la santé publique comme alcool, tabac.

Drogues illicites : Des substances dont la consommation et la vente sont interdites, sauf à des fins médicales scientifiques encadrés par les professionnelles telle que cocaïne.

Ecgoninéméthylester (EME) : Métabolite primaire de cocaïne.

Euphorie : Sensation de bien-être exagérée et anormale.

Hallucinogène : Substance psychoactive dont l'usage est recherché pour sa capacité à induire des hallucinations visuelles, auditives.

GLOSSAIRE

Hydrocodone : Dérivé de la codéine.

Méthadone : Opiacé de synthèse, d'action pharmacologique voisine de celle de la morphine, prescrit dans le cadre de traitements de substitution des héroïnomanies.

Méthylène-dioxy-amphétamine (MDA) : Dérivé de l'amphétamine.

3,4-méthylène-dioxyméthamphétamine (MDMA) : Dérivé de l'amphétamine, appelé aussi l'ecstasy.

Méthylène-dioxyéthylène-amphétamine (MDEA) : Dérivé de l'amphétamine.

Morphine : Alcaloïde psychoactif extrait de l'opium, utilisé en thérapeutique comme analgésique, et dont l'usage abusif donne lieu à une dépendance.

6-Mono-acétylmorphine (6-MAM) : Métabolite primaire de l'héroïne

Neurotransmetteur : Substance chimique appelée aussi neuromédiateur, libérée par les neurones (terminaisons pré synaptiques) responsable de la transmission de l'information au niveau des synapses entre les neurones.

Opiacés : Les opiacés désignent différents produits extraits de l'opium, substances naturelles obtenues à partir d'une plante nommer *papaver somniferum*.

Opioides : Les opioïdes sont des substances synthétiques dérivées de l'opium, ils sont largement utilisés pour traiter les douleurs modérées sévères d'origine cancéreuse ou non cancéreuse.

Opium : Préparation obtenue à partir du latex des capsules du pavot *Papaver somniferum*, riche en alcaloïdes (morphine, codéine, etc.) et longtemps utilisée en médecine où elle représente une véritable panacée.

Pavot : Désignation des diverses variétés d'une plante herbacée de la famille des papavéracées *Papaver somniferum*. Le pavot est cultivé, notamment, pour obtenir de l'opium.

Pharmacodépendance : Etat psychique et quelquefois physique résultant de l'interaction entre un organisme vivant et une substance, se caractérisant par des modifications du comportement et par d'autres réactions qui comprennent toujours une pulsion à prendre le

GLOSSAIRE

produit de façon continue ou périodique afin de retrouver ses effets psychiques et quelquefois d'éviter le malaise de la privation. Cet état peut s'accompagner ou non de tolérance.

Prohibition : Principe d'interdiction générale et absolue de la production, du commerce et de l'usage de certaines substances psychoactives, naturelles ou synthétiques inscrites sur une liste établie par des instances internationales ou parfois nationales.

Répétabilité : Est la fidélité sous des conditions de répétabilité, c'est-à-dire les résultats d'essais obtenus à chaque fois sont identiques dans les mêmes conditions (même méthode, échantillon, opérateur, équipement et pendant un court intervalle de temps).

Reproductibilité : L'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus pour le même échantillon soumis à l'essai dans des laboratoires différents et dans les conditions suivantes : analyste différent, appareil différent.

Stimulants : Des substances qui accélèrent l'activité du système nerveux central. Celle-ci s'intensifie et rend le sujet infatigable. De même, le produit consommé se substitue aux aliments. On peut aussi les appeler des coupe-faim.

Substances psychoactives (SPA) : Des produits naturels ou synthétiques qui agissent principalement sur l'état du système nerveux central en y modifiant certains processus biochimiques et physiologiques cérébraux. En altérant en quelque sorte les fonctions du cerveau, les SPA peuvent induire des modifications de la perception, des sensations, de l'humeur, de la conscience ou d'autres fonctions psychologiques et comportementales.

Substitution : Modalité de traitement d'un sujet pharmacodépendant, reposant sur l'administration d'un médicament (méthadone, buprénorphine chez l'héroïnomanie qui a une activité pharmacologique similaire à celle de la substance psychoactive à l'origine de la dépendance).

Toxicomanie : L'organisation mondiale de la santé (OMS) définit la toxicomanie comme un état d'intoxication périodique nuisible à l'individu ou à la santé, engendré par consommation répétée d'une drogue naturelle ou synthétique, et caractérisé par un invincible désir ou besoin de continuer à consommer la drogue ou de la procurer par tous les moyens.

Tolérance (Accoutumance) : Adaptation à la drogue et à ses effets qui aboutit à l'augmentation des doses.

GLOSSAIRE

Tramadol : Opioïde de synthèse utilisé pour ses propriétés antalgiques, il est indiqué dans le traitement des douleurs modérées ou sévères.

Voie parentérale : Voie d'administration des médicaments impliquant l'effraction de la peau. La voie parentérale comprend essentiellement la voie intramusculaire, la voie sous-cutanée et la voie intraveineuse.

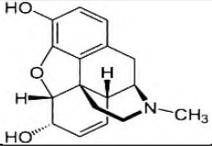
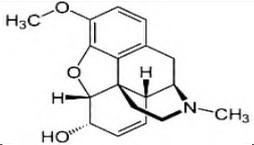
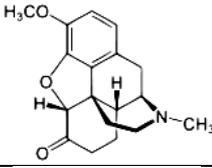
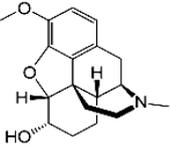
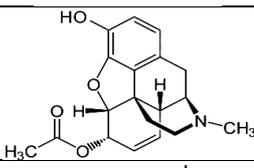
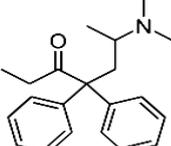
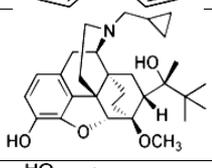
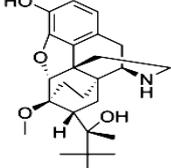
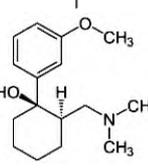
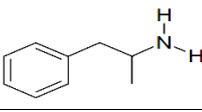
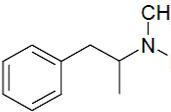
Voie rectale : Voie d'administration des médicaments placés dans le rectum.

Xénobiotique : Toute substance exogène à l'organisme.

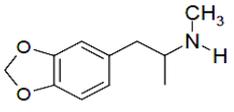
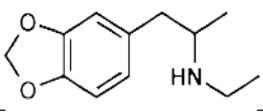
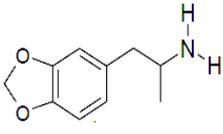
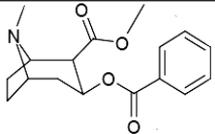
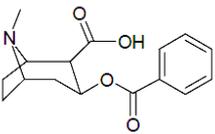
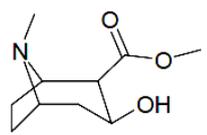
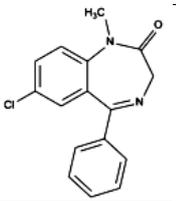
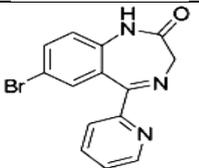
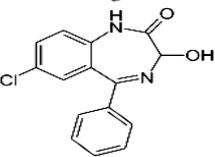
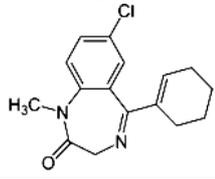
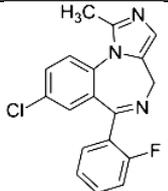
ANNEXES

ANNEXES

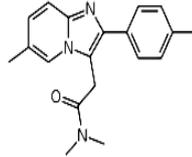
Annexe 1 : Structures chimiques des molécules étudiées

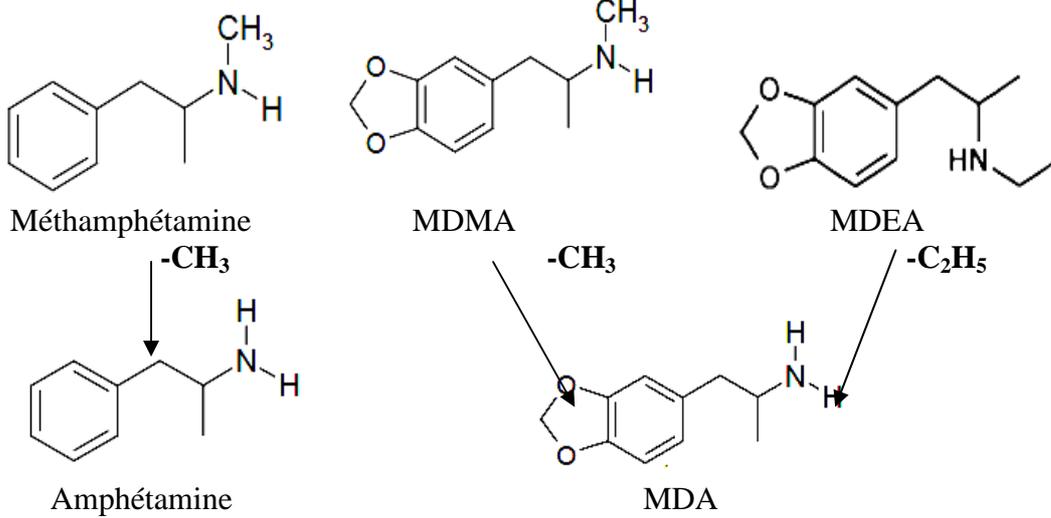
Substances	Structures chimiques
Morphine	 <p>The chemical structure of morphine is a complex pentacyclic alkaloid. It features a morphine nucleus with a hydroxyl group at C3, a methoxy group at C2, and a methyl group on the nitrogen atom at C4.</p>
Codéine	 <p>The chemical structure of codeine is similar to morphine, but it has a methoxy group at C3 instead of a hydroxyl group.</p>
Hydrocodone	 <p>The chemical structure of hydrocodone is a morphine derivative with a ketone group at C6 and a methoxy group at C3.</p>
Dihydrocodéine	 <p>The chemical structure of dihydrocodeine is a morphine derivative with a methoxy group at C3 and a secondary amine at C4.</p>
6-Mono-acétylmorphine	 <p>The chemical structure of 6-monoacetylmorphine is a morphine derivative with a hydroxyl group at C3, a methoxy group at C2, and an acetyl group at C6.</p>
Méthadone	 <p>The chemical structure of methadone is a synthetic opioid consisting of a propylpiperidine ring system with a methyl group on the nitrogen, a phenyl ring at C2, and a 1-ethyl-4-piperidyl group at C3.</p>
Buprénorphine	 <p>The chemical structure of buprenorphine is a partial opioid agonist with a morphine nucleus, a propylpiperidine ring, and a methoxy group at C3.</p>
Norbuprénorphine	 <p>The chemical structure of norbuprenorphine is a partial opioid agonist with a morphine nucleus, a propylpiperidine ring, and a hydroxyl group at C3.</p>
Tramadol	 <p>The chemical structure of tramadol is a synthetic opioid with a piperidine ring, a methoxy group at C2, and a methyl group on the nitrogen atom.</p>
Amphétamine	 <p>The chemical structure of amphetamine is a simple amine with a benzene ring, a methyl group, and a primary amine group.</p>
Méthamphétamine	 <p>The chemical structure of methamphetamine is similar to amphetamine, but it has a methyl group on the nitrogen atom.</p>

ANNEXES

MDMA	
MDEA	
MDA	
Cocaïne	
BEZ	
EME	
Diazépam	
Bromazépam	
Oxazépam	
Tétrazépam	
Midazolam	

ANNEXES

Zolpidem	
----------	---



Annexe 2 : Voies métaboliques de l'amphétamines et ses dérivés (Mura & *al.*, 2015).

ANNEXES

Annexe 3 : Stupéfiants : Les Tableaux (convention de 1961)

Tableau I : Substances avec risque d'abus et effets nocifs comparables à morphine, cocaïne et cannabis.

Tableau II : Risque d'abus moindre, du fait de leur usage médical, comparables à la codéine.

Tableau III : Préparations des substances dans Tableaux I ou II, sans risque d'abus ni d'effets nocifs, et substances non aisément extractibles.

Tableau IV : Substances du tableau I ayant un potentiel d'abus fort et effets nocifs importants sans valeur thérapeutique notable => héroïne, cannabis...

Annexe 4 : Psychotropes : Les Tableaux (convention de 1971)

Tableau I : Potentiel d'abus avec risque grave pour la santé publique et faible valeur thérapeutique : ex. hallucinogènes.

Tableau II : Potentiel d'abus avec risque sérieux pour la santé publique et valeur thérapeutique faible à moyenne : ex. stimulants (amphétamine), analgésiques (phencyclidine).

Tableau III : Potentiel d'abus avec risque sérieux pour la santé publique, mais valeur thérapeutique moyenne à grande : ex. barbituriques.

Tableau IV : Potentiel d'abus avec risque faible pour la santé publique, mais valeur thérapeutique faible à grande : surtout hypnotiques, benzodiazépines et analgésiques Psychotropes.

Résumé : Les drogues font partie intégrante dans notre société. Le méfait de ces molécules sur la route incite, de façon urgente, à mesurer leurs effets et les risques d'accidents qu'elles font encourir, afin d'en assurer la prévention et la prohibition. Le présent travail, propose de mettre au point un protocole dédié à la recherche et au dosage des produits stupéfiants et /ou psychotropes dans les milieux biologiques, dans le cadre de la sécurité routiers suite à des accidents mortels, matériels ou corporels. Le but est de savoir si le comportement de conducteur a pu être altéré par une de ces substances. L'étude s'étend depuis le prétraitement par l'Extraction en Phase Solide (SPE) jusqu'à l'analyse qualitative et quantitative de ces molécules dans le sang par la Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse en tandem (LC-MS/MS). Cette technique permet l'application en routine dans les laboratoires de toxicologie à l'Institut National de Criminologie et de Criminologie, facilitant la recherche d'un très grand nombre de substance psychoactives en une seule analyse avec un temps très étroit.

Mots clés : Stupéfiants, psychotropes, SPE, LC-MS/MS, sécurité routière.

Abstract: Drugs are an integral part of our society. The mischief of these molecules on the road incite, urgently, to measure the effects and risks of accidents that are incurred in order to ensure the prevention and prohibition. This work proposes a protocol for the research and dosage of drugs and / or psychotropic substances in biological samples as part of road safety after fatalities, property or personal. The aim if explore whether the driver behavior could be altered by these substances. The study extends from the pretreatment by Solid Phase Extraction (SPE) to the qualitative and quantitative analysis of these molecules in the whole blood by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC MS / MS). This technique allows for the routine application in toxicology laboratories in the Forensics and National Institute of Criminology, facilitating the search for a large number of psychoactive substances in a single analysis with a very narrow time.

Key words: Narcotics, psychotropic, SPE, LC-MS / MS, road safety.

ملخص

المخدرات هي جزء لا يتجزأ من مجتمعنا. والأذى الذي تحدثه على الطريق، يدعو على وجه السرعة إلى قياس آثار ومخاطر الحوادث التي يتم إحصائها، من أجل ضمان الأمن ومنع الحوادث على الطرق. يقترح هذا العمل وضع بروتوكول للبحث عن تركيز المخدرات أو المؤثرات العقلية في السوائل البيولوجية، وذلك في إطار السلامة المرورية. والهدف من ذلك هو معرفة إمكانية هذه المواد في تغيير سلوك السائق. تمتد هذه الدراسة من المعالجة بواسطة الإستخلاص في المرحلة الصلبة (SPE) ثم التحليل النوعي والكمي لهذه الجزيئات في الدم عن طريق (LC-MS/MS) هذا العمل يسمح التطبيق الروتيني في مختبرات علم السموم في الطب الشرعي بالمعهد الوطني لعلم الإجرام وتسهيل عملية البحث عن عدد كبير من المخدرات في تحليل واحد بطريقة سريعة.

كلمات المفتاح: المخدرات-المؤثرات العقلية، SPE، LC-MS/MS، السلامة المرورية.