UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

UNIVERSITE de LIMOGES
Section
Médecine
Pharmacie
SCD

ANNEE UNIVERSITAIRE 2010

SCD UNIV.LIMOGES
D 035 239017 8

THESE N° 3328/1

METHODES DE SCREENING DE XENOBIOTIQUES (MEDICAMENTS ET/OU STUPEFIANTS) DANS LES CHEVEUX : ETAT DE L'ART ET ETUDE PRELIMINAIRE

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

obtenu après soutenance du

MEMOIRE

du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Pharmacie Industrielle et Bio-Médicale

présenté et soutenu publiquement

le 15 octobre 2010 à Limoges

par

Géraldine ROLLAND

Née le 04 mars 1981 à Paris (19ème)

JURY

Mr le Professeur Gérard LACHÂTRE	Président
Mme le Professeur Anne ROUSSIN	Juge
Mme le Docteur Marie-Françoise DREYFUSS	Juge
Mr le Docteur Jean-Michel GAULIER	Directeur de thèse
Mr François-Ludovic SAUVAGE	Membre invité

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

Section Médecine Pharmacie SCD

ANNEE UNIVERSITAIRE 2010 THESE N°

METHODES DE SCREENING DE XENOBIOTIQUES (MEDICAMENTS ET/OU STUPEFIANTS) DANS LES CHEVEUX : ETAT DE L'ART ET ETUDE PRELIMINAIRE

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

obtenu après soutenance du

MEMOIRE

du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Pharmacie Industrielle et Bio-Médicale

présenté et soutenu publiquement

le 15 octobre 2010 à Limoges

par

Géraldine ROLLAND

Née le 04 mars 1981 à Paris (19ème)

JURY

Mr le Professeur Gérard LACHÂTRE	Président
Mme le Professeur Anne ROUSSIN	Juge
Mme le Docteur Marie-Françoise DREYFUSS	Juge
Mr le Docteur Jean-Michel GAULIER	Directeur de thèse
Mr François-Ludovic SAUVAGE	Membre invité

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE	Monsieur **COMBY** Francis, Maître de Conférences
VICE-DOYEN	Monsieur le Professeur **CARDOT** Philippe
VICE-DOYEN	Madame **FAGNERE** Catherine, Maître de Conférences

PROFESSEURS

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE - BIOLOGIE MOLECULAIRE
BOTINEAU Michel	BOTANIQUE ET CRYPTOGAMIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE - CHIMIE THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DREYFUSS Gilles	PARASITOLOGIE-MYCOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	PHYSIQUE - BIOPHYSIQUE
OUDART Nicole	PHARMACOLOGIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE - HYDROLOGIE – ENVIRONNEMENT
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE - VIROLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN GIRY Karine	PHARMACIE GALENIQUE
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, MATHEMATIQUES, INFORMATIQUE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE
COMBY Francis	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DELEBASSEE Sylvie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
DREYFUSS Marie-Françoise	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOGAMIE
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOGAMIE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
LIAGRE Bertrand	SCIENCES BIOLOGIQUES
LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	IMMUNOLOGIE
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE APPLIQUEE A LA THERAPEUTIQUE
ROUSSEAU Annick	BIOMATHEMATIQUES
SIMON Alain	CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE
TROUILLAS Patrick	BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE PHARMACEUTIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE
VIGNOLES Philippe	BIOMATHEMATIQUES

PROFESSEUR CERTIFIE

MARBOUTY Jean-Michel	ANGLAIS

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Gérard LACHÂTRE

Vous nous faites l'honneur de présider ce jury de thèse. Vous nous avez permis de faire nos premiers pas d'interne dans votre Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Limoges. Durant ces semestres passés dans votre service, nous avons pu apprécier votre droiture, votre rigueur de travail, votre énergie exceptionnelle et vous avez su nous faire partager vos connaissances. Vous avez toujours su prendre le temps de nous écouter et trouver les mots justes pour nous guider. Nous vous remercions infiniment pour votre sympathie, votre disponibilité et de la confiance que vous nous avez accordée pour la réalisation de ce mémoire de thèse. Nous garderons un excellent souvenir de notre passage dans votre Laboratoire. Soyez assuré de notre plus profond respect.

A Madame le Professeur Anne ROUSSIN

Vous nous faites l'honneur de participer à ce jury de thèse. Nous vous remercions infiniment pour votre disponibilité, votre collaboration et de l'intérêt que vous portez à la réalisation de ce travail.

A Madame le Docteur Marie-Françoise DREYFUSS

Vous nous faites l'honneur de participer à ce jury de thèse. En tant que Responsable Assurance Qualité dans le Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Limoges, nous avons beaucoup de respect pour votre droiture et votre rigueur de travail. Nous avons pu découvrir grâce à vous un système d'Assurance Qualité performant, indispensable en particulier durant les nombreuses nuits de garde passées dans le service. Nous vous remercions sincèrement pour votre bonne humeur et votre disponibilité.

A Monsieur le Docteur Jean-Michel GAULIER

Jean-Michel, je te remercie infiniment d'avoir accepté de m'encadrer pour la réalisation de ce mémoire de thèse. Durant mes semestres d'internat passés dans le Laboratoire, j'ai pu apprécier ta rigueur, tes compétences et tu as su me faire partager ta passion et tes connaissances pour la Toxicologie. C'est toujours avec un réel plaisir que j'ai eu la chance de travailler à tes côtés et profiter de tes nombreux conseils. Merci sincèrement de ta gentillesse, de ta patiente, de ton énergie et de ta grande disponibilité.

A Monsieur François-Ludovic SAUVAGE

François-Ludovic, je te remercie sincèrement d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Tu as su me faire partager ta passion pour la CL-SM/SM et tes connaissances dans ce domaine ont été pour moi d'une aide très précieuse pour la réalisation de ce mémoire. Merci pour ta gentillesse, ta disponibilité, ta bonne humeur, ta rigueur et tes conseils avisés. Je t'en suis très reconnaissante.

A Mathieu,

Merci de m'avoir soutenue et surtout supportée durant toutes ces années d'études. Ca y est, j'ai enfin terminé ! Merci pour ta patiente et pour tout ce que tu m'apportes au quotidien. J'ai toujours pu compter sur toi.

A mes parents,

Merci de toujours avoir été là pour m'encourager durant ces interminables années d'études. Merci infiniment pour votre amour, votre soutien, votre confiance si précieuse qui m'ont permis d'arriver jusqu'au bout. Vous avez toujours été là lorsque j'en avais besoin.

A ma sœur Stéphanie, à Frédéric et à leur « petit Binic » Marine,

Je regrette beaucoup de ne plus vous voir aussi souvent maintenant que vous avez rejoint « votre Bretagne » ! Merci pour votre amour et votre soutien.

A ma mamie de Pessac,

Merci pour tous ces moments de bonheur passés à tes côtés, pour ton amour et ta gentillesse.

A ma mamie de Lorient partie trop vite. J'aurais tant aimé que tu sois encore à mes côtés et que tu découvres le visage de ta future arrière petite fille.

A mon papy de Lorient que j'aimerais tant voir plus souvent.

A toute ma famille de Bretagne, Limoges, Dreux, Carcassonne, Bordeaux et Montpellier. Merci pour tous ces bons moments passés à vos côtés.

A toute la famille Krol, avec toute mon affection. Merci pour votre accueil si chaleureux.

A tous mes supers co-internes de Limoges :

A Anne-Charlotte avec qui j'ai partagé mes premiers moments à l'internat. Merci pour ta gentillesse, ton énergie débordante et tes encouragements.

A Fabien, JBW, Coco, Nathalie, Séverine, Laure, Caroline, Pierre, Catherine, Audrey. J'ai partagé de merveilleux moments à vos côtés pendant ces 2 années passées à

Limoges. Merci pour ces fous rires, vous avez fait de mes premières années d'internat des instants inoubliables.

A Gaëlle, Hélène (encore félicitations !), Alison (courage), Marie-Lise, Claire-Lise. Merci à vous toutes, j'ai partagé d'excellents moments avec vous et j'espère que ça va continuer !

A Christelle, Flavie, Isabelle et Nico. Vous avez su faire de mes 6 mois passés à Toulouse, un semestre que je n'oublierai pas ! Un grand merci pour votre accueil, votre amitié, votre gentillesse et les merveilleux moments passés à vos côtés.

A mes amies de fac, Anne-So, Manue, Maria, Margaux, Anne-Cécile…

A Nath et FX, Virginie et Romain, Céline et Sébastien. Merci pour votre amitié. A moi d'être la prochaine sur la liste !…

Aux praticiens, ingénieurs, techniciens et secrétaires du Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Limoges. Je vous remercie sincèrement pour votre sympathique accueil et pour m'avoir fait partager vos connaissances. Merci d'avoir fait de mes premières années d'internat d'excellents moments. Vous m'avez beaucoup appris et vous formez une équipe très chaleureuse.

A Monsieur le Professeur Pierre Marquet, pour votre accueil ainsi que pour vos conseils avisés lors de mon stage en pharmacocinétique. Soyez assuré de mon plus profond respect.

A Monsieur le Professeur Louis Merle ainsi qu'à toute la sympathique équipe de Pharmacovigilance. Merci pour votre accueil et votre bonne humeur.

A Monsieur Philippe Vella et à toute l'équipe des essais cliniques de l'Afssaps.

A Monsieur Jacques Roux, Cécile Roché, Luisa, Marina et toute l'équipe « Autres domaines » des Laboratoires GSK.

A Madame le Professeur Brigitte Bellon et à toute l'équipe de la pharmacie Paule de Viguier de l'hôpital Purpan de Toulouse.

A Flavien Languillat et à toute l'équipe du département « Coordination des Unités Thérapeutiques » des Laboratoires Servier (Isabelle, Nathalie, Aurore et Aurore, Stéphanie, Marie-Laure et Pascale).

TABLES DES MATIERES

I. Introduction 14

II. Les techniques et méthodes de screening 16
II.1. Définition et généralités 16
II.2. Screening par chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur ultraviolet à barrette de diodes (CL-UV/BD) 19
II.3. Screening par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) 22
II.4. Screening par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM) 25
II.5. Screening par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM) 29
II.6. Autres techniques 31

III. Intérêt toxicologique des cheveux 33
III.1. Structure des cheveux 33
III.2. Incorporation des xénobiotiques dans les cheveux 38
III.3. Recherche et/ou dosage spécifique de substances ou de familles de substances dans les cheveux 43
III.3.1. Recherche et/ou dosage de stupéfiants dans les cheveux 43
III.3.1.1. Recherche et/ou dosage des opioïdes dans les cheveux 44
III.3.1.2. Recherche et/ou dosage de la cocaïne et de ses dérivés dans les cheveux 46
III.3.1.3. Recherche et/ou dosage des cannabinoïdes dans les cheveux 48
III.3.1.4. Recherche et/ou dosage des amphétamines dans les cheveux 49
III.3.2. Recherche et/ou dosage de l'éthylglucuronide dans les cheveux 52
III.3.3. Recherche et/ou dosage de familles de médicaments dans les cheveux 55
III.3.3.1. Recherche et/ou dosage des benzodiazépines dans les cheveux 55
III.3.3.2. recherche et/ou dosage d'autres médicaments dans les cheveux 56
III.4. Intérêts et limites des analyses capillaires 58

IV. Screening dans les cheveux 61
IV.1. Introduction 61
IV.2. Revue de la littérature 63
IV.3. Discussion 67

V. Etude préliminaire réalisée au Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Limoges 69
V.1. Objectifs 69
V.2. Plan expérimental 70
V.3. Méthodologie 72
V.3.1. Matériels et réactifs 72
V.3.1.1. Solvants et substances pures 72
V.3.1.2. Appareillage 72
V.3.2. Caractéristiques des échantillons capillaires 74
V.3.3. Procédure de décontamination 78
V.3.4. Segmentation, pesée, échantillonnage 79
V.3.5. Hydrolyse des échantillons capillaires 80
V.3.6. Systèmes chromatographiques et conditions analytiques 81
V.3.6.1. Screening par CG-SM 81

V.3.6.1.1. Méthodes d'hydrolyse et d'extraction....81
V.3.6.1.2. Méthode chromatographique....82
V.3.6.1.3. Méthode de recherche....83
V.3.6.2. Screening par CL-UV/BD....83
V.3.6.2.1. Méthodes d'hydrolyse et d'extraction....83
V.3.6.2.2. Méthode chromatographique....84
V.3.6.2.3. Méthode de recherche....85
V.3.6.3. Screening par CL-SM/SM....86
V.3.6.3.1. Méthodes d'hydrolyse et d'extraction....86
V.3.6.3.2. Méthode chromatographique....86
V.3.6.3.3. Méthode de recherche....88
V.4. Résultats....90
V.4.1. Difficultés rencontrées....99
V.5. Discussion....101

VI. Conclusions et perspectives....104

VII. Annexes....105
Annexe I : Fiche de suivi : Prélèvement capillaire....105
Annexe II : Diagramme....106

VIII. Bibliographie....107

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac.....Acide
ACN.....Acétonitrile
CBD.....Cannabidiol
CBN.....Cannabinol
CG (ou GC).....Chromatographie en phase Gazeuse
CID.....Fragmentation Induite par Collision
CL (ou LC).....Chromatographie en phase Liquide
CLHP.....Chromatographie Liquide Haute Performance
conf.....Confirmation
cps.....Counts Per Second
d.i.....Diamètre Interne
DiCl.....Dichlorométhane
EI.....Etalon Interne
EMS.....Enhanced Mass Spectrometry
EPI.....Enhanced Product Ion scan
ES.....Electrospray
ESI.....Ionisation par Electrospray
EtG.....Ethyl-Glucuronide
GHB.....Acide Gamma Hydroxy Butyrique
GTFCh.....Société Allemande de Toxicologie Analytique
GUS.....General Unknown Screening
HCl.....Acide Chlorhydrique
HFBA.....Anhydride HeptaFluoroButyrique
IC.....Ionisation Chimique
ICN (ou NCI).....Ionisation Chimique en mode Négatif
ICPA.....Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique
IDA.....Acquisition Dépendante de l'Information
LDD.....Limite De Détection
LDQ.....Limite De Quantification
LLE.....Extraction Liquide-Liquide
6-MAM.....6-MonoAcétylMorphine

MDA.....3,4-MéthylèneDioxyAmphétamine

MDEA.....3,4-MéthylèneDioxyEthylAmphétamine

MDMA.....3,4-MéthylèneDioxyMethAmphétamine

MeOH.....Méthanol

mg.....milligramme

min.....minute

mL.....millilitre

mM.....millimolaire

mm.....millimètre

MSTFA.....N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacétamide

ng.....nanogramme

OMS.....Organisation Mondiale de la Santé

PFPA.....Acide Penta-Fluoro-Propionique

pg.....Picogramme

quant.....Quantification

RIA.....Radio Immuno Assay

SFTA.....Société Française de Toxicologie Analytique

SM (ou MS).....Spectrométrie de Masse

SM/SM (ou MS/MS).....Spectrométrie de Masse en tandem

SoHT.....Society of Hair Testing

SPE.....Extraction en Phase Solide

SRM.....Single Reaction Monitoring

TFA.....Anhydride TrifluoroAcétique

THC.....Delat9-TetraHydroCannabinol

THC-COOH.....acide 11-nor-Delta9-TétraHydroCannabinol-9-carboxylique

TIC.....Courant Ionique Total

TOF.....Temps de Vol

tr.....tour

µL.....microlitre

US.....UltraSons

UV.....UltraViolet

UV/BD.....Détecteur UltraViolet à Barrette de Diodes

v/v.....Volume sur Volume

I. Introduction

La première application de toxicologie analytique dans les cheveux remonte à près de deux siècles avec le dosage de l'arsenic, mis au point par Marsh. Depuis plusieurs années, de nouvelles méthodes très sensibles et très spécifiques se sont développées et ont ainsi rendu possible l'analyse des substances organiques présentes dans les prélèvements capillaires.
L'analyse des cheveux constitue un complément vis-à-vis des analyses dans d'autres matrices biologiques plus classiquement utilisées, comme le sang ou les urines. Malgré des connaissances encore limitées (notamment en ce qui concerne les mécanismes d'incorporation des xénobiotiques dans les cheveux), les analyses capillaires permettent des investigations rétrospectives. Par cet aspect, les cheveux présentent un intérêt dans de nombreuses situations dès qu'il s'agit de dater la prise (ou l'arrêt de la prise) d'une substance.

Parmi les différentes stratégies d'analyses toxicologiques, la recherche d'un nombre illimité ou non de substances, sans *a priori*, également appelée le « General Unknown Screening » (ou GUS) offre le champ d'investigations le plus large. Potentiellement, son application dans les cheveux trouve sa place en pratique médicale (i.e. pour le suivi de toxicomanes) ou médico-légale (i.e. documentation de l'« histoire thérapeutique » dans les recherches des causes de la mort) [1, 2].

Après un rappel sur les cheveux et les analyses capillaires, nous présenterons les différentes techniques de screening dans les cheveux proposées dans la littérature.

Dans un second temps, nous détaillerons une étude préliminaire réalisée au Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Limoges ayant pour objectif d'explorer la faisabilité d'une recherche large (screening), simple, de premier abord, de xénobiotiques dans des prélèvements capillaires.

Cette expérimentation s'attachera à rechercher le meilleur compromis en terme d'hydrolyse des échantillons capillaires (en milieu acide, en milieu basique, ou dans le méthanol) et en terme de méthodologie analytique (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM), chromatographie en phase liquide haute performance couplée à un détecteur ultraviolet à barrette de diodes (CL-UV/BD), ou chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (CL-SM/SM)).

II. Les techniques et méthodes de screening

II.1. Définition et généralités

La découverte d'un cadavre, une intoxication volontaire ou involontaire, la lutte contre le dopage sont autant de situations au cours desquelles le toxicologue doit avoir à sa disposition des méthodes analytiques performantes lui permettant de rechercher le plus largement possible un grand nombre de composés.

La première étape d'une analyse toxicologique pertinente doit donc être une recherche large de substances, encore appelée « screening ». Cette stratégie analytique est importante car elle est à la base de l'arrêt ou de la poursuite d'autres analyses quantitatives par des méthodes plus spécifiques.

Une méthode de « screening » doit présenter plusieurs qualités :

- elle doit pouvoir être appliquée à différentes matrices biologiques (sang, urine, liquide gastrique, humeur vitrée, cheveux,...).
- elle doit être réalisable à partir d'une faible quantité d'échantillon.
- elle doit permettre également de détecter les métabolites, qui sont souvent les seuls composés retrouvés pour de nombreuses classes de produits, et/ou qui constituent parfois la véritable substance toxique pour l'organisme.
- elle doit être, si possible, standardisée et « automatisée » de façon à être facilement mise en œuvre, avec des résultats facilement interprétables.
- elle doit permettre un rendu rapide des résultats car, la plupart du temps, l'instauration d'une stratégie thérapeutique dépend des résultats, notamment lorsque le patient ne présente pas de symptômes caractéristiques d'une classe de toxiques [3, 4].

Trop souvent dans la littérature, les auteurs (en particulier, les Anglo-Saxons) emploient le terme de « screening » pour désigner la recherche de quelques molécules appartenant à un nombre restreint de classes thérapeutiques (exemple : screening de benzodiazépines) [3].

Ce type de screening, permettant la recherche de substances toxiques en première intention au sein d'une classe thérapeutique, est généralement basé sur des techniques immunologiques adaptées sur des automates multiparamétriques qui présentent plusieurs avantages [5] :

- elles sont automatisables.
- elles peuvent rendre un résultat en quelques minutes.
- elles ne nécessitent, pour la plupart, aucune préparation d'échantillon.

Cependant, les kits actuellement disponibles sont limités à un certain nombre de classes médicamenteuses ou de toxiques. Ils ne permettent, le plus souvent, qu'un résultat du type « positif » ou « négatif » sans identifier précisément le ou les composés mis en cause (exemple : présence de benzodiazépines).
Ce dernier point est un inconvénient majeur car certaines molécules peuvent posséder une toxicité particulière au sein d'une classe médicamenteuse (exemple : dans la classe des antidépresseurs, une intoxication aux antidépresseurs tricycliques est une urgence médicale car ils sont à l'origine de troubles cardiaques graves nécessitant une surveillance clinique étroite).
En outre, deux éléments peuvent compliquer l'interprétation des analyses :

- des résultats faussement positifs, d'une part, conséquences de réactions croisées entre des molécules proches structurellement (exemple : entre dérivés phénothiaziniques et antidépresseurs).
- des résultats faussement négatifs, d'autre part, liés à une mauvaise reconnaissance par l'anticorps, de molécules, antigènes, appartenant à la classe thérapeutique concernée, mais éloignées sur le plan structural (exemple pour les benzodiazépines : le bromazépam n'est pas reconnu par l'anticorps anti-nordazépam, même si le bromazépam et le nordazépam appartiennent à la même classe thérapeutique).

Un autre type de stratégie de « screening » encore appelé « General Unknown Screening » (ou GUS) consiste en la recherche d'un nombre illimité ou non de substances, sans *a priori*.

Pour de tels screenings toxicologiques, de nombreuses techniques séparatives sont utilisées :

- des techniques électrophorétiques.
- des techniques chromatographiques comme la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (ou CG-SM), la chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur ultraviolet à barrette de diodes (ou CL-UV/BD), la chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse (ou CL-SM) ou encore la chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (ou CL-SM/SM).

Cependant, aucune des méthodes basées sur ces techniques ne permet à elle seule de répondre pleinement à l'ensemble des exigences citées plus haut.

II.2. Screening par chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur ultraviolet à barrette de diodes (CL-UV/BD)

Depuis plusieurs années, la CL-UV/BD est largement utilisée car cette technique chromatographique permet d'obtenir, en plus du chromatogramme, des renseignements spectraux afin d'assurer l'identification des composés séparés [6-8]. Cependant, dans la littérature, les publications décrivant les techniques de « General Unknown Screening » par CL-UV/BD sont très peu nombreuses. En effet, très souvent, les auteurs développent des méthodes de screening suivant le caractère acide, basique ou neutre des molécules.

Les milieux biologiques utilisés par les auteurs sont peu variés : urine [4, 6, 9-10], plasma [8, 11], sérum [4, 6] et sang total [7, 9, 11-12]. Au Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Limoges, le screening dans le liquide gastrique ou dans d'autres matrices biologiques telles que des poudres, est également réalisé.

La quantité d'échantillon nécessaire à l'analyse est également très différente selon les auteurs pouvant aller de 3 mL [6] à 0,25 mL [12]. A Limoges, 0,5 mL de prise d'essai est nécessaire.

L'extraction liquide-liquide (ou LLE du terme anglais *Liquid-Liquid Extraction*) est employée par la plupart des auteurs [4, 8-9, 11-13]. Lai C.K. *et al.* ont utilisé une extraction en phase solide (ou SPE, du terme Anglo-Saxon *Solid Phase Extraction*) sur un support de type mixte, c'est-à-dire utilisant deux modes de rétention différents. De meilleurs rendements ont ainsi été observés avec cette procédure SPE contrairement à une extraction liquide-liquide classique (dichlorométhane et dichloroéthane), et ce, pour les composés acides (furosémide, naproxène), les composés amphotères (morphine) et les substances polaires (éphédrine) [6]. Le Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Limoges utilise une extraction liquide-solide sur colonne Extrelut®-1.

Concernant les conditions chromatographiques, le choix des colonnes varie également. La plupart des auteurs utilisent, comme au Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Limoges, une phase greffée et plus particulièrement une phase apolaire C_{18} [11] ou C_8 [4, 8-9]. Lambert W.E. *et al.* proposent une alternative aux silices greffées en utilisant des

matériaux à base d'alumine greffée avec du polybutadiène. Cette phase présente l'avantage de pouvoir supporter des pH allant jusqu'à 12 unités (contre 7,5 pour la silice), permettant ainsi de chromatographier des substances basiques en milieu basique et de diminuer les phénomènes de traînée des pics [14].
Les phases mobiles sont le plus souvent des mélanges d'acétonitrile et de tampon phosphate ou d'acétate d'ammonium comme au Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie CHU de Limoges car ces solvants présentent l'avantage d'être volatils [4, 6, 8-9, 12-13]. On distingue aussi l'emploi de mélanges contenant du méthanol [11], mais également de l'acétonitrile et du tampon de dihydrogénophosphate de potassium [10], ou encore de l'acétonitrile, de l'acide phosphorique et du tampon triethylamine [7].

Les élutions en mode gradient sont très largement rencontrées dans la littérature contrairement aux conditions isocratiques (qui permettent d'obtenir un bruit de fond constant et évitent ainsi de rééquilibrer le système). La plupart du temps, l'analyse est réalisée sur un gradient de 20 à 30 minutes (50 minutes au Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Limoges).

En ce qui concerne l'interprétation des résultats, l'identification se fait selon deux critères :

- le spectre UV-visible.
- le temps de rétention.

Ces données brutes sont ensuite comparées aux données témoins de bibliothèques de spectres de référence, telle que la bibliothèque mise à disposition par la Société WATERS et contenant 970 spectres de référence correspondant à des molécules appartenant à des classes très diverses (psychotropes, stupéfiants, pesticides, antibiotiques, antihistaminiques...). Certains auteurs créent eux-mêmes leur bibliothèque de spectres.

Cette technique chromatographique permet d'obtenir des informations sur la classe pharmaco chimique d'un composé, mais ne permet cependant pas d'identifier des composés pharmaco chimiquement proches qui peuvent confondre leur temps de rétention et leur spectre ultraviolet. La chromatographie liquide permet un gain de temps en terme d'étape pré-analytique. En revanche, sa mise en œuvre demeure complexe et il s'avère très difficile d'utiliser cette technique 24h/24 dans le contexte de l'urgence. Le temps nécessaire à

l'extraction et à l'analyse est assez long, mais surtout, il implique un savoir-faire nécessitant la présence d'un personnel qualifié notamment pour le retraitement des données. De plus, certaines substances n'absorbent que très faiblement, voire pas du tout, dans l'ultraviolet (exemple : le méprobamate est optiquement inactif) réduisant considérablement le champ d'action de cette technique [4, 8, 14].

Cette technique est généralement considérée comme moins performante que la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

II.3. Screening par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM)

A partir des années 1970, la spectrométrie de masse a été couplée à des techniques chromatographiques comme la chromatographie en phase gazeuse permettant ainsi un essor considérable dans l'identification de composés inconnus en raison de sa haute spécificité [15]. Même si cette technique est considérée comme la méthode de référence, elle est cependant théoriquement limitée aux composés volatils et thermostables. Les procédés de dérivation peuvent néanmoins rendre possible la détection de certaines substances non-volatiles et/ou thermolabiles mais nécessitent le plus souvent plusieurs réactions successives allongeant le temps de préparation de l'échantillon et donc de l'analyse [16].
Dans la littérature, les publications décrivent également des méthodes suivant le caractère acide, basique ou neutre des composés et très peu concernent un large échantillon de composés.

Les milieux biologiques analysés sont les mêmes que ceux en CL-UV/BD : plasma, sang total, urine, liquide gastrique [15, 17]. Au Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Limoges, d'autres matrices biologiques sont également analysées comme les organes, les poudres, des liquides inconnus…

Le volume de prise d'essai varie de 0,5 mL à 5 mL selon les auteurs : 2 mL sont nécessaires à Limoges.

Polettini A. *et al.* ont réalisé un pré-traitement de leur échantillon de sang total : 0,7 mL de prise d'essai ont été introduits dans un tube contenant 1,8 mL de tampon phosphate 0,1 M (pH 6) et deux étalons internes (heptabarbital 2 mg/L et nalorphine 1 mg/L). Après avoir été vortexé, le tube a été placé dans un bain à ultrasons pendant 15 minutes puis centrifugé. Pour les échantillons urinaires et plasmatiques, 0,5 à 1 mL de prise d'essai ont été placés dans un tube contenant les mêmes étalons internes et 2 mL de tampon phosphate puis centrifugés pendant 5 minutes à 1000 tours/min. Une extraction en phase solide a ensuite été réalisée sur chaque échantillon prétraité [17].

L'extraction liquide-liquide est également utilisée. Maurer H.H. a réalisé une extraction LLE pour le plasma et le liquide gastrique selon la même procédure : 1 mL de plasma (auquel a été ajouté 0,1 mL d'étalon interne, la trimipramine-D_3 0,01 mg/mL) et 5 mL de liquide gastrique ont été extraits par 5 mL d'un mélange de diethyl ether : ethyl acétate (1 :1 ; v/v) après addition de 5 mL de solution de sulfate de sodium saturée. Ce mélange a ensuite été centrifugé puis la phase organique a été transférée et évaporée à sec. La phase aqueuse a été basifiée avec 0,5 mL d'hydroxyde de sodium 1 M, puis extraite dans un second temps avec 5 mL d'un mélange de solvants, la phase organique a été évaporée à sec et les deux résidus ont ensuite été repris par 50 µL de méthanol.
Pour les prélèvements urinaires, 5 mL de prise d'essai ont été séparés en deux volumes égaux de 2,5 mL chacun. Un des deux tubes a été hydrolysé avec 1 mL d'acide chlorhydrique 37 % pendant 15 minutes avant d'être basifié avec 1,5 mL d'hydroxyde de sodium 10 M, puis mélangé à 2 mL de sulfate d'ammonium 2,3 M afin d'obtenir un pH compris entre 8 et 9. Avant l'extraction, les 2,5 mL d'échantillon urinaire restants ont été introduits dans le tube. L'extraction a été réalisée avec 5 mL d'un mélange de dichlorométhane : isopropanol : acétate d'ethyl (1 : 1 : 3 ; v/v/v). Le tube a été centrifugé puis la phase organique a été évaporée à sec. Une dérivation par acétylation du résidu sec a ensuite été appliquée avec 50 µL d'un mélange d'anhydride acétique : pyridine (3 : 2 ; v/v) pendant 5 minutes. Le produit de dérivation a ensuite été évaporé à sec avant l'addition de 50 µL de méthanol [18].

D'autres types de dérivation peuvent également être retrouvés comme la méthylation, l'éthylation, la tertiarybutyldimethylsilylation, la trimethylsilylation, la trifluoroacétylation,...

Au Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Limoges, la technique de screening par CG-SM est réalisée après extraction liquide-solide sur cartouche Extrelut® par le dichlorométhane, en milieu acide d'une part, et en milieu alcalin d'autre part. L'étalon interne utilisé est la protriptyline.
La colonne est une colonne capillaire PTE 5 (SUPELCO) (30 cm x 0,25 mm x 0,25 µm).
Polettini A. *et al.* et Maurer H.H.ont utilisé une colonne HP-5 (12 m x 200 µm x 0,33 µm).

L'identification des composés est obtenue par comparaison des temps de rétention relatifs lorsqu'ils sont connus et par comparaison des spectres de masse des produits éventuellement trouvés aux données correspondantes mises en mémoire dans la bibliothèque informatisée ou publiée dans la littérature.

Cette technique chromatographique s'avère donc être très utile pour l'identification de composés inconnus même si l'étape de dérivation allonge le temps de préparation des échantillons. Au Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Limoges, elle est régulièrement mise en œuvre en période de garde.

II.4. Screening par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM)

Très peu de méthodes permettant l'identification d'un grand nombre de molécules par CL-SM sont décrites dans la littérature. En effet, la plupart des publications se limitent à quelques composés appartenant à un nombre restreint de classes chimiques. Toutefois, ces travaux permettent d'étudier les différentes conditions de traitements des échantillons, de chromatographie ainsi que d'acquisition des spectres. Le Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Limoges a mis au point une technique de GUS par CL-SM.

Les analyses sont réalisées sur des prélèvements de sang total, de plasma, de sérum ou encore d'urine [3, 19-20].

L'étape d'extraction est importante pour l'analyse en CL-SM de façon à éviter les effets de suppression d'ions [3, 21-22]. L'extraction en phase solide est très largement utilisée [20, 23-26]. En effet, elle présente l'avantage, par rapport à l'extraction liquide-liquide, d'utiliser de plus faibles quantités de solvants et de raccourcir le temps de manipulation. Quelques auteurs utilisent deux extractions liquide-liquide, une pour les composés acides et une pour les substances basiques [27-29]. A Limoges, l'extraction est réalisée sur une phase mixte Oasis MCX® composée d'une phase inverse apolaire et d'une phase échangeuse de cations lui procurant un double mécanisme de rétention. Ce type de colonne a également été utilisé par Lai C.K. *et al.* [6].
Les échantillons sériques sont pré-traités par réalisation d'une déprotéinisation afin de récupérer les composés les plus hydrophiles [19].

Les conditions chromatographiques sont inspirées de celles utilisées par CL-UV/BD. La plupart des auteurs utilisent une phase greffée C_{18} ou C_8 avec des phases mobiles correspondant à des mélanges d'acétonitrile et de formiate ou d'acétate d'ammonium. Au Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Limoges, le choix s'est porté sur une colonne silice greffée XTERRA^{TM} MS C_{18} (3,5 µm x 100 mm x 1 mm d.i) associée à une pré-colonne C_{18} pour la protéger des contaminations éventuelles. L'étalon interne utilisé est la glafénine.

Concernant les conditions d'acquisition des spectres, en 1998, Spratt E. *et al.* ont développé une méthode de « screening » par CL-SM avec une interface de type « Particle Beam » et une ionisation par impact électronique permettant ainsi d'analyser 150 produits regroupés en 3 librairies distinctes. Ce type de source d'ionisation, limité aux composés non polaires, a été cependant supplanté par les sources de type electrospray (ou ES) plus universelles [27-28].

L'electrospray, contrairement à l'impact électronique, est caractérisée par une ionisation « douce » des molécules et par la production d'un faible nombre de fragments; les spectres de masse obtenus fournissant donc une information plus limitée. Elle permet en particulier d'analyser des composés polaires, thermolabiles ou possédant un poids moléculaire élevé. Toutefois, afin de pallier cet inconvénient, il est possible d'utiliser des procédés de fragmentation induite par collision (ou CID du terme anglais *Collision-Induced Dissociation*). Ces techniques consistent à créer une accélération des ions puis à les faire entrer en collision avec des molécules de gaz neutre, soit dans une cellule de collision soit directement dans la source d'ionisation. La première solution nécessite l'utilisation d'un spectromètre de masse à trappe d'ions (du terme anglais *Ion-Trap*) ou de deux spectromètres de masse montés en tandem ce qui suppose alors qu'un nombre limité d'ions parents soient sélectionnés dans le premier quadripôle, puis fragmentés dans la cellule avant d'être analysés dans le second quadripôle. L'identité des molécules doit donc être connue avant leur détection et une optimisation très fine des conditions de fragmentation doit être appliquée [19, 27].
Exploitant cette technique, Weinmann W. *et al.* ont mis au point une librairie de plus de 500 médicaments et drogues illicites. Pour chaque composé, quatre spectres correspondants à quatre énergies de dissociation différentes ont été enregistrés. Les auteurs ont montré que ces spectres pouvaient être utiles pour l'identification de métabolites présentant des fragments communs avec leur molécule mère [30]. Gergov M. *et al.*, avec une source de type TurboIonspray, ont établi une bibliothèque comportant environ 400 spectres [23].

Cependant, ces techniques font appel à la spectrométrie de masse en tandem et nécessitent de connaître au préalable les molécules. Elles ne peuvent donc être considérées comme des techniques de recherche d'un large échantillon de composés au sens du GUS.

L'ionisation electrospray est également à l'origine d'une suppression d'ions correspondant à la réduction de l'ionisation d'un analyte par les composés co-éluants [31-32]. Elle résulte de la présence de composés moins volatils pouvant affecter la quantité d'ions chargés en phase

gazeuse atteignant le détecteur. Les principales substances à l'origine de ce phénomène sont les sels, les composés formant des paires d'ions, les étalons internes deutérés... [3, 32].

Le Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Limoges a développé une technique de GUS par CL-SM, complémentaire aux techniques de CG-SM et CL-UV/BD. Les conditions utilisées ont permis de fournir simultanément des spectres d'ionisation positive et des spectres d'ionisation négative à l'origine d'informations spectrales très riches. Ces conditions ont permis de développer deux bibliothèques, une « positive » comportant plus de 1000 spectres et une « négative » comportant plus de 500 spectres. Afin de répondre aux exigences du milieu hospitalier, le temps nécessaire à l'analyse chromatographique était de 25 minutes ave 5 minutes pour rééquilibrer le système.

Marquet P. a réalisé une étude comparant 30 échantillons de sérum selon trois techniques : CL-SM, CG-SM et CL-UV/BD (Figure1). Selon cet auteur, la CL-SM a permis de détecter 43,6% des composés alors que la CG-SM a permis l'identification de 40% des composés et la CL-UV/BD 58,2%. Environ 20% des xénobiotiques retrouvés ont été uniquement mis en évidence par CL-SM contre 12,7% par CG-SM et 34,5% par CL-UV/BD. Toutefois, ces résultats doivent être interprétés avec prudence en raison des différentes procédures d'extractions utilisées et car le nombre d'échantillons sériques analysés (n = 30) n'est pas représentatif de l'activité d'un laboratoire de toxicologie [27].

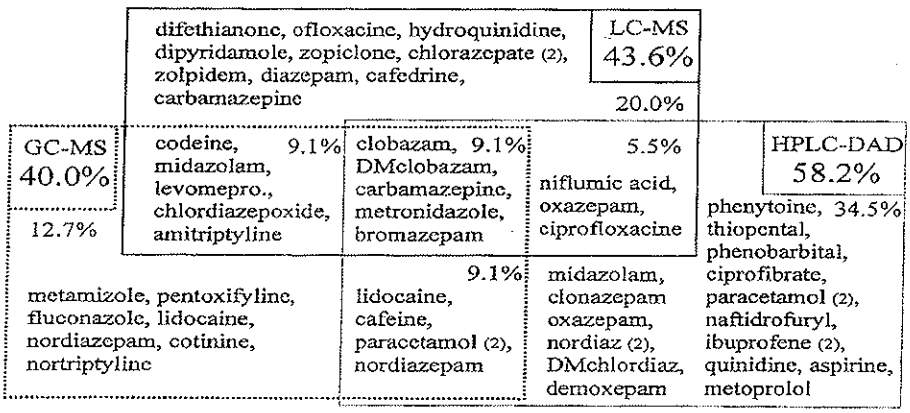


Figure 1 : Comparaison de trois techniques de GUS par CL-SM, CG-SM et CL-UV/BD à partir de 30 échantillons de sérum.

La CL-SM apparaît donc comme une technique complémentaire à la CG-SM et à la CL-UV/BD notamment pour la détection de composés plus polaires [19, 27, 33-34].

II.5. Screening par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM)

A la fin des années 90, le couplage de la spectrométrie de masse en tandem a permis d'ouvrir de nouveaux champs d'applications en matière de GUS. Plusieurs auteurs ont mis au point des techniques de GUS par CL-SM/SM.

Deux types d'extractions sont couramment rencontrés dans la littérature, l'extraction liquide-liquide et l'extraction en phase solide [35-41]. Au Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Limoges, les échantillons à analyser sont soit extraits sur cartouche SPE lorsqu'il s'agit de milieux biologiques, soit dilués dans du méthanol lorsqu'il s'agit de poudres ou de comprimés.

Concernant les conditions chromatographiques, le choix s'est essentiellement porté sur des colonnes C_{18} comme à Limoges [35, 40-41]. Certains auteurs ont utilisé d'autres types de colonnes : Synergi Polar RP [37], ou encore une colonne phenyl TF Hypersil GOLD par Remane D. *et al.* [36].

Les phases mobiles correspondent le plus souvent à des mélanges d'acétonitrile, de formate d'ammonium et d'acide formique [36, 39-40]. Au Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Limoges, la phase mobile est un mélange d'acétonitrile et de tampon formiate. Dans la littérature, des mélanges contenant du méthanol sont également rencontrés [37, 41].
Les élutions en mode gradient sont les plus utilisées.

A Limoges, l'identification des composés est réalisée à l'aide d'un spectromètre de masse en tandem et utilisation d'une trappe à ions linéaire. L'appareil fonctionne en mode IDA (Acquisition Dépendante de l'Information). Deux conditions d'acquisition sont appliquées en alternance avec dans un premier temps, un « survey scan » obtenu en mode EMS (du terme anglais *Enhanced Mass Spectrometry*). Ce mode utilise la trappe en mode MS simple permettant ainsi la détection des pics de faible intensité par soustraction automatique du bruit de fond. Une meilleure spécificité et sélectivité est observée. Dans un second temps, les ions

les plus intenses, qui ont été sélectionnés dans le « survey scan », sont repérés et le spectromètre de masse passe alors en mode EPI (du terme anglais *Enhanced Product Ion*) qui permet de sélectionner ces ions dans le premier quadripôle, de les fragmenter dans la cellule de collision à trois énergies de collision différentes (15 V, 40 V et 65 V) pendant chaque scan. Les fragments obtenus s'accumulent ensuite dans la trappe à ions. L'identification des molécules est ensuite réalisée par comparaison des spectres EPI obtenus avec ceux enregistrés dans une bibliothèque. L'acquisition peut être réalisée successivement en mode positif, puis en mode négatif [42].

Maquille A. *et al.* ont établi une bibliothèque de 28 composés et de leurs métabolites, appartenant à la classe des opioïdes, des cannabinoïdes et des amphétamines, par CL-SM/SM selon le mode SRM (ou Simple Reaction Monitoring) [35].
Liu H.C. *et al.* ont mis au point, en 2010, une bibliothèque de 800 spectres enregistrés en mode d'ionisation positive. Les composés identifiés appartenaient à la classe des opioïdes, des cannabinoïdes, des amphétamines, des benzodiazépines, des neuroleptiques, des antidépresseurs ou encore des pesticides [38].

La CL-SM/SM apparaît donc être la technique la plus performante sur le plan de la spécificité et de la sensibilité. D'autres techniques sont également retrouvées dans la littérature pour la recherche d'un large échantillon de composés.

II.6. Autres techniques

D'autres types de couplage peuvent également être utilisés pour la recherche d'un nombre illimité ou non de substances, sans *a priori*, comme la chromatographie en phase liquide couplée à un détecteur de masse à temps de vol (ou LC/TOFMS du terme anglais *Liquid Chromatographie/Time-Of-Flight Mass Spectrometry*). Plusieurs auteurs ont utilisé cette technique chromatographique pour mettre au point une stratégie de screening.

Decaestecker T. N. *et al.* ont développé en 2000, une procédure de screening dans les urines en utilisant un couplage spectromètre de masse quadripolaire et à temps de vol. Ils ont utilisé une extraction LLE et une ionisation ES en mode positif [43].

Gergov M. *et al.* et Pelander A. *et al.* ont également mis au point des procédures de screening dans les urines à l'aide d'un spectromètre de masse à temps de vol. Ils ont, respectivement, développé une bibliothèque de 637 composés en utilisant une hydrolyse enzymatique et une extraction SPE et de 433 composés avec une hydrolyse SPE. Cette procédure était basée sur la mesure de la masse exacte et des temps de rétention et leur comparaison avec des données de référence [44-45].

Pelander A. *et al.* ont développé en 2008, une technique permettant la recherche, dans les prélèvements capillaires, de composés basiques par LC/TOFMS. A partir d'un échantillon de 150 à 250 mg de cheveux, ces auteurs ont réalisé une hydrolyse alcaline à 100 °C pendant 1 heure avec de l'hydroxyde de sodium 1 M suivie d'une extraction SPE puis, les composés ont été identifiés à l'aide d'un spectromètre de masse à temps de vol. Trente-deux échantillons ont ainsi pu être analysés avec l'identification de plus de 35 composés appartenant à la classe des antidépresseurs, des antipsychotiques, des antiépileptiques, des amphétamines, des opioïdes, des β-bloquants ou encore des benzodiazépines [46].

Les détecteurs de masse à temps de vol offrent l'avantage d'une bonne sensibilité. En effet, tous les ions générés sont conservés pour la détection alors que pour les filtres quadripolaires, un seul ion est conservé à chaque instant.

Enfin, l'électrophorèse capillaire est une autre technique permettant la recherche d'un large échantillon de composés. Boone C.M. *et al.* l'ont utilisé en 2003, dans diverses matrices biologiques et ont constaté qu'elle était, cependant, peu sensible et reproductible [47].

III. Intérêt toxicologique des cheveux

III.1. Structure des cheveux

Bien que le cheveu apparaisse comme un élément relativement simple, il se révèle être une partie très complexe du corps humain et plusieurs aspects de sa biologie restent encore mal connus. Le cheveu n'est pas une fibre homogène, mais une structure cylindrique riche en kératine produite au niveau du follicule pilo-sébacé, invagination de l'épithélium épidermique dans le derme localisé entre 3 et 5 mm sous la surface du cuir chevelu. Chacun de ces follicules représente une unité anatomique constituée de cinq éléments : le bulbe pileux, la racine pilaire, la tige pilaire, la glande sébacée et le muscle horripilateur (Figure 2) [48-51].

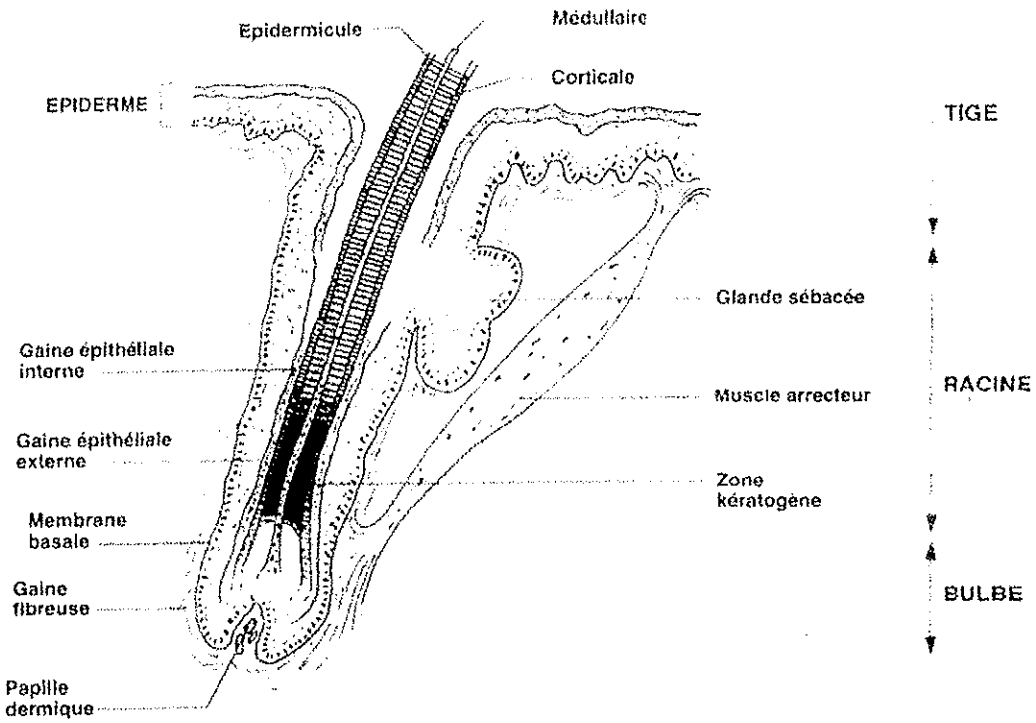


Figure 2 : Représentation schématique de la structure des cheveux.

- Le bulbe pileux forme une partie renflée et implantée dans le cuir chevelu. Il est constitué d'une papille de capillaires et de cellules germinatives qui prolifèrent en donnant continuellement naissance à des cellules épithéliales dont la progression s'effectue vers la surface cutanée.

- La racine pilaire, incluse jusqu'à 4 mm dans le cuir chevelu, est constituée de trois zones concentriques. La première zone, la *medulla* (ou zone médullaire), est la partie centrale creuse contenant des cellules lâches. La deuxième zone, la cuticule, est la couche la plus externe, formant une sorte d'enveloppe protectrice, composée de 5 à 10 couches de cellules ressemblant à des écailles et responsable de la grande résistance physico-chimique et de la brillance des cheveux. Enfin, entre ces deux couches, le cortex (ou zone corticale), est la partie la plus épaisse, pigmentée et riche en kératine, responsable de la rigidité et de la coloration des cheveux.

- La tige pilaire (Figure 3) est la partie visible du cheveu. Elle est formée des trois mêmes couches concentriques décrites précédemment pour la racine pilaire : la *medulla*, le cortex et la cuticule, mais celles-ci sont nettement différentes quant à la nature de leur contenu protéique. En effet, la cuticule et la *medulla* de la tige pilaire ne contiennent pas de kératine alors que le cortex, très riche en kératine, contient également de la mélanine.

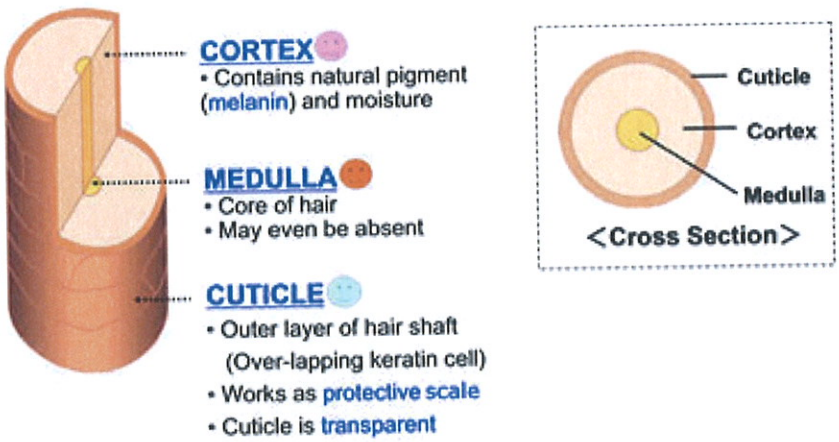


Figure 3 : La tige pilaire.

- La glande sébacée, acineuse, constituée d'une partie sécrétoire et d'un court canal excréteur, contribue à la formation d'un film hydrolipidique de surface appelé le *sebum,* très riche en lipides, et jouant un rôle de lubrifiant.

- Le muscle arrecteur ou horripilateur est disposé en écharpe sous la glande sébacée. Sous l'effet du froid ou de stimuli divers, ses contractions provoquent un redressement du cheveu.

Le follicule pilo-sébacé (Figure 4) est constitué de trois gaines concentriques : la gaine épithéliale interne, la gaine épithéliale externe et la gaine du tissu conjonctif. Le follicule est entouré d'un système capillaire riche qui fournit le matériel métabolique nécessaire pour permettre la croissance du cheveu. Le centre germinatif, organisé autour de la papille du bulbe du cheveu, est constitué de 2 types de cellules matricielles (les kératinocytes et les mélanocytes) particulièrement concentrées vers la membrane basale. Cette association nourrit les différentes couches du cheveu (cuticule, cortex et *medulla*).

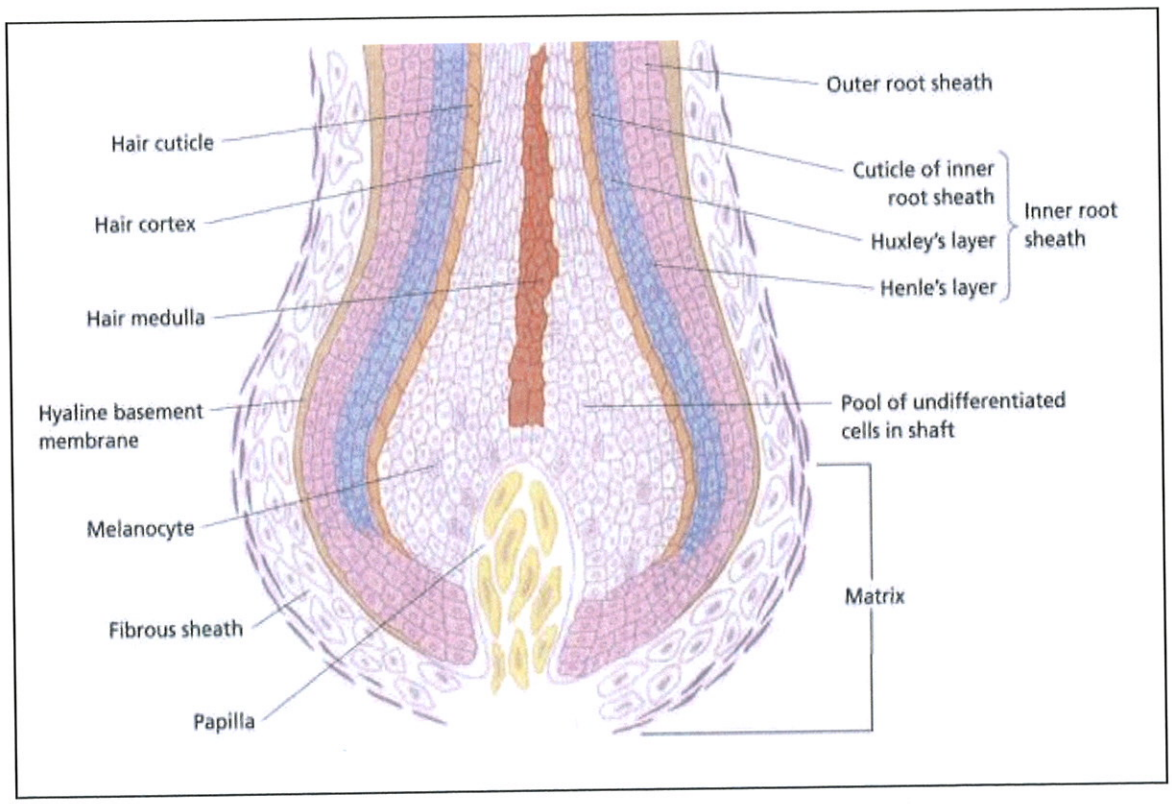


Figure 4 : Représentation schématique de la structure du bulbe pileux.

Les mélanocytes produisent dans les mélanosomes les pigments de mélanine responsables de la couleur des cheveux. Ils possèdent également de longues dendrites pénétrant les kératinocytes voisins où ils vont décharger les vésicules de mélanosomes par un mécanisme d'exocytose (Figure 5).

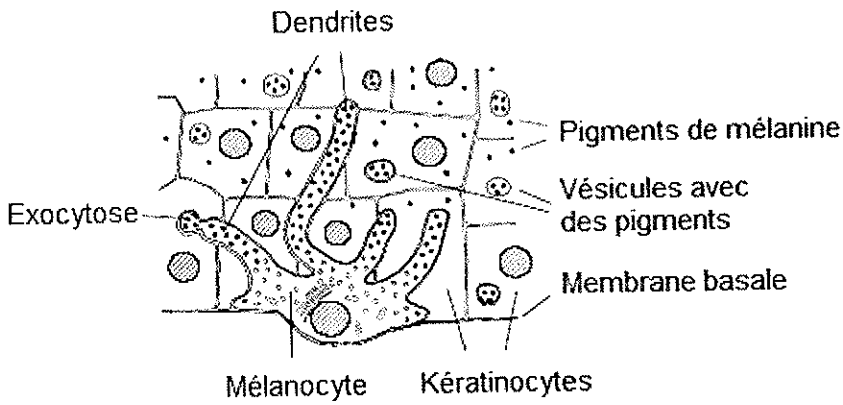


Figure 5 : Exocytose des vésicules de mélanosomes contenant les pigments de mélanine dans les kératinocytes.

Le cheveu possède donc une composition chimique complexe : une majorité de protéines (environ 90 % de kératine), de l'eau (10 à 20 %), des lipides (5 à 10 %) et des minéraux (< 1 %). Un cycle pilaire et une vitesse de croissance pilaire caractérisent le cheveu qui se développe, puis chute de façon individuelle et cyclique (Figure 6). On distingue ainsi trois phases [49] :

- une phase anagène ou phase de croissance active au niveau du cuir chevelu, d'une durée de 4 à 8 ans, pendant laquelle les cellules se différencient et la kératinisation commence.

- une phase catagène ou phase de transition, courte, qui dure environ deux semaines, et qui est caractérisée par l'arrêt de croissance.

- une phase télogène ou phase de repos qui dure environ de 4 à 6 mois, et au cours de laquelle le cheveu mort reste en place et tombe lorsque, par exemple, il est délogé par la repousse d'un nouveau cheveu.

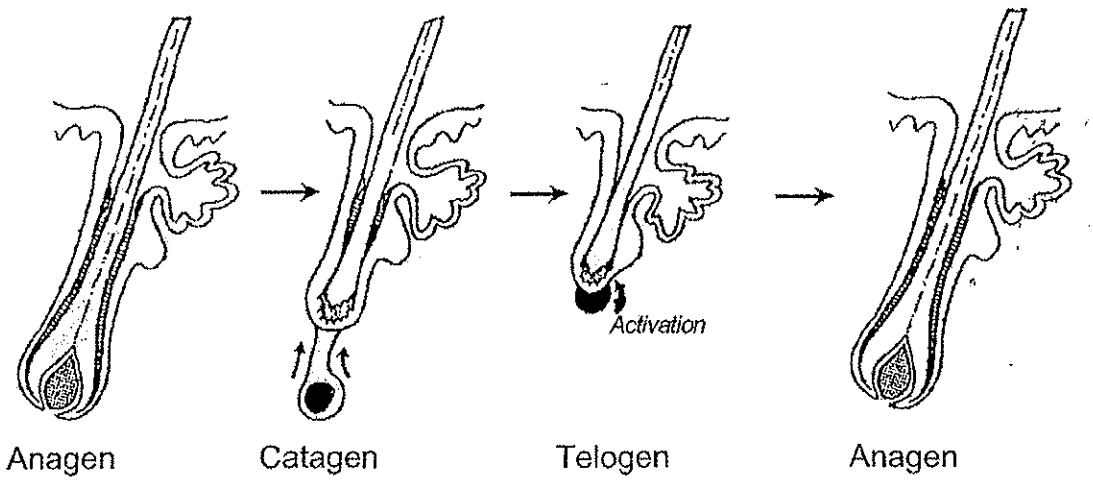


Figure 6 : Les différentes étapes du cycle pilaire.

Chaque cheveu subit ces différentes phases indépendamment des cheveux avoisinants. Au total, chez les sujets ayant des cheveux sains, environ 90 % des cheveux sont en phase anagène, 1 % en phase catagène et 8 à 10 % en phase télogène. La très grande majorité des cheveux sont en phase anagène, et par conséquent incorporent des xénobiotiques.

En général, la vitesse de pousse des cheveux est de 0,6 à 1,4 cm par mois [52]. Par conséquent, la longueur individuelle du cheveu dépend de la durée de chaque étape et de la vitesse de la pousse. Il existe cependant des différences inter-individuelles significatives selon la proportion de cheveux en phase anagène, de cheveux en phase télogène et selon la vitesse de pousse qui dépend de l'origine ethnique, du sexe, de l'âge et de l'état de santé [48, 53].

III.2. Incorporation des xénobiotiques dans les cheveux

Les différents mécanismes d'incorporation des drogues dans les cheveux sont mal décrits et des études demeurent nécessaires pour préciser le rôle et l'importance relative de chaque mécanisme.

Il semble acquis qu'il existe une incorporation des xénobiotiques dans les cheveux à travers les capillaires sanguins vers les cellules en croissance. Cette incorporation s'effectue sur une longueur de 1,2 à 1,5 mm au niveau des cellules matricielles. Cependant, les données expérimentales indiquent une variété de mécanismes d'incorporation : par exemple, par différentes sources externes comme les poussières, la fumée, les mains souillées ou encore via les sécrétions comme la sueur ou le *sebum* (Figure 7). Cette incorporation peut être active ou passive [54].

- L'incorporation active s'effectue par le sang et les sécrétions (*sebum*, sueur) chez la personne ayant consommé le xénobiotique. Présent dans le sang, le xénobiotique passe alors par diffusion vers les cellules en croissance au niveau du bulbe pileux. Grâce à l'étroite connexion entre la tige pilaire et les glandes sudorales et sébacées, la sueur et le *sebum* sont également des véhicules d'incorporation des xénobiotiques dans les cheveux. Les glandes sudoripares, proches mais séparées du cheveu, imprègnent la tige capillaire et peuvent participer à l'incorporation des drogues hydrophiles.

- L'incorporation passive d'un xénobiotique dans les cheveux peut être observée chez un individu n'en ayant pas consommé activement. Il peut s'agir de substances déposées à la surface des cheveux à partir de l'environnement externe (pollution par des substances volatiles, ou par des mains souillées, par exemple). Des xénobiotiques, comme des stupéfiants, peuvent également être retrouvés dans les cheveux du nouveau-né après la naissance, par incorporation « passive » via les substances ingérées par la mère lors de sa grossesse [1].

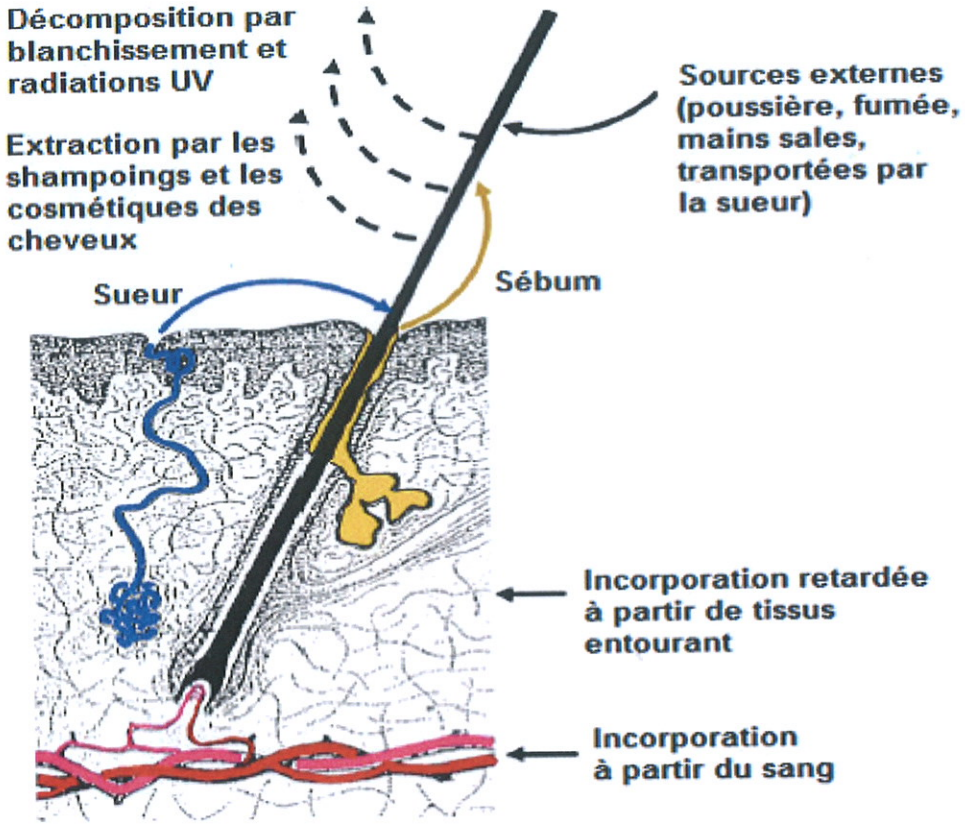


Figure 7 : Représentation schématique des principaux mécanismes d'incorporation, de dégradation des substances dans les cheveux et de pollution des échantillons capillaires.

La nature du xénobiotique concerné (pKa, solubilité, lipophilie), le contenu capillaire en mélanine, la structure de la kératine ainsi que les caractéristiques ethniques et physiologiques de la personne (pigmentation des cheveux, facteurs métaboliques ...) sont autant de facteurs susceptibles d'influencer et de moduler fortement l'incorporation des xénobiotiques dans les cheveux [2, 48, 55].

Les mélanocytes et la pigmentation jouent un rôle important dans l'incorporation des xénobiotiques dans les cheveux. L'intensité de pénétration est largement fonction des origines ethniques. Malgré l'exposition de la racine capillaire à la même concentration des xénobiotiques que dans le sang, la concentration des substances basiques dans les cheveux

pigmentés est dix fois supérieure à celle des cheveux non pigmentés. Ainsi, les cheveux des asiatiques concentrent davantage les drogues que les cheveux des caucasiens. Ces résultats ont été confirmés dans des études contrôlées qui comparaient différents cheveux : noirs, bruns, blonds et roux dans les deux populations caucasienne et non-caucasienne [48, 56]. En revanche, aucune différence de taux d'incorporation dans les cheveux pigmentés et non pigmentés pour des composés neutres, telle que la carbamazépine, n'a été mise en évidence [56].

La kératine, de par sa structure riche en groupements thiols permettant la fixation de nombreux composés, influence également fortement le passage des xénobiotiques dans les cheveux. Cette fixation constitue un facteur de stabilité des structures chimiques des drogues incorporées. Elle facilite ainsi la conservation et expliquerait le fait que l'on retrouve toujours dans les cheveux davantage de drogues sous leur forme « molécule-mère » que sous leur forme métabolite [57].

L'incorporation des xénobiotiques dans les cheveux à partir du sang dépend des propriétés pharmacologiques et/ou physico-chimiques des substances concernées. Les molécules organiques lipophiles (non chargées) peuvent facilement pénétrer les membranes et diffuser selon le gradient de concentration dans les cellules matricielles. Cependant, pour les molécules hydrophiles ou les ions organiques de masse moléculaire moyenne, les membranes forment généralement une barrière peu perméable. Les xénobiotiques, acides ou basiques, ionisés au pH physiologique peuvent atteindre les cellules matricielles après protonation ou déprotonation, respectivement, pour atteindre un état neutre (Figure 8). Le pKa d'un composé et le pH des cellules matricielles jouent un rôle majeur. Le pH intracellulaire des kératinocytes est plus acide que le plasma et le pH des mélanocytes est compris entre 3 et 5. De plus, une affinité significative de la mélanine pour les xénobiotiques basiques a été démontrée *in vitro* [54]. Ces deux facteurs, pH faible et affinité pour la mélanine, conduisent à l'accumulation de substances lipophiles et basiques dans les cellules matricielles avec une préférence nette pour les cheveux pigmentés. Ainsi, en ce qui concerne les molécules acides telles les métabolites d'acide salicylique, d'acide valproïque ou du Delta9-tétrahydrocannabinol ou THC (acide 11-nor-delta9-tétrahydrocannabinol-9-carboxylique ou THC-COOH), l'équilibre de distribution n'est pas en faveur d'une accumulation dans les cellules matricielles acides [2, 48].

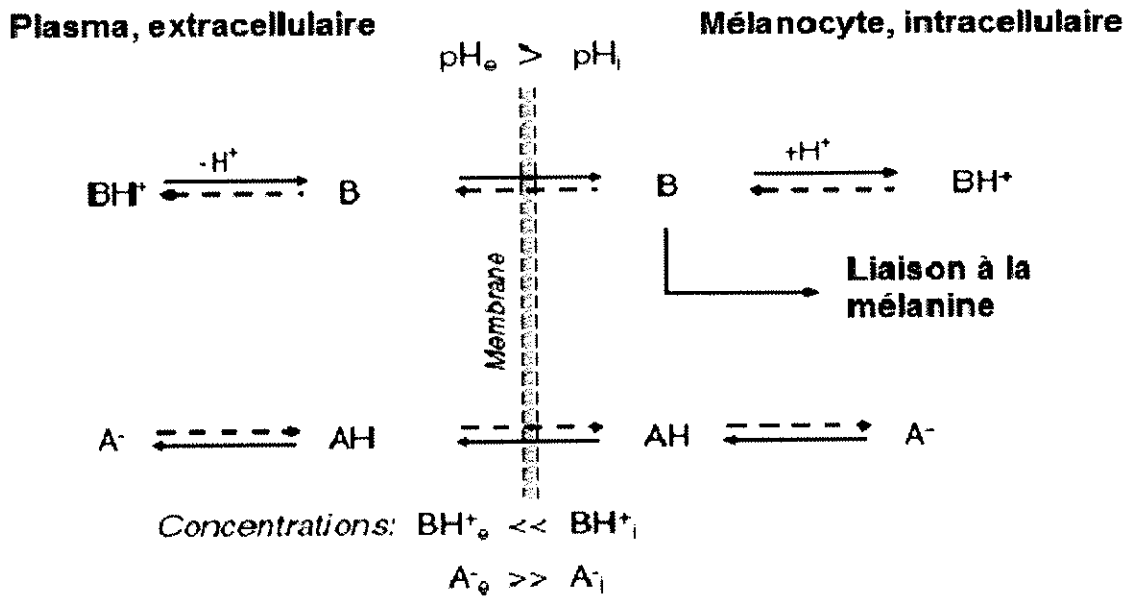
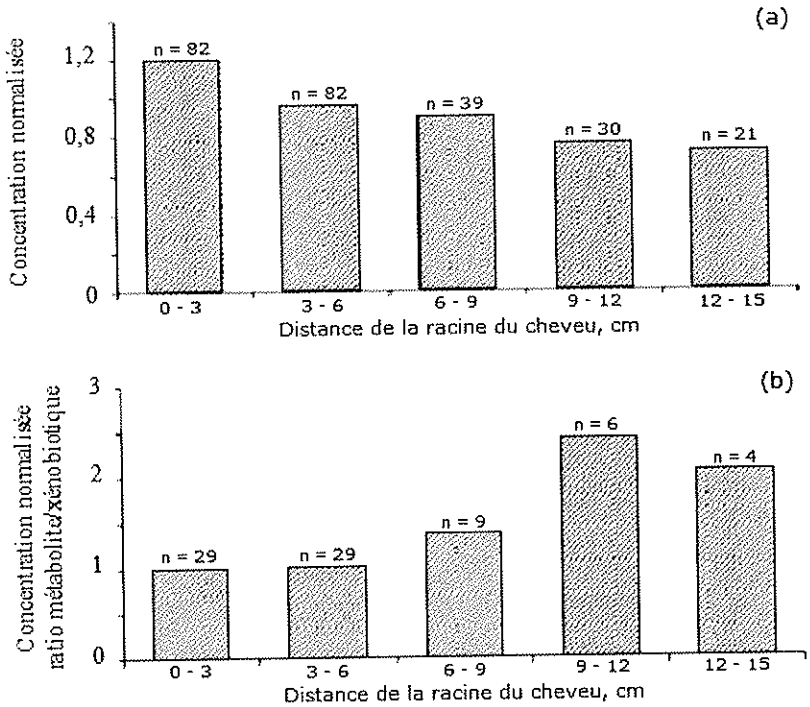


Figure 8 : Effet des propriétés basiques et acides des xénobiotiques sur leur taux d'incorporation dans les cheveux. A = xénobiotique acide ; B = xénobiotique basique ; e = milieu extracellulaire ; i = milieu intracellulaire.

Le délai d'apparition des xénobiotiques dans la partie aérienne des cheveux semble variable mais demeure peu connu : il peut-être d'un jour pour certaines amphétamines, de cinq jours pour la codéine et la pholcodine et d'une semaine pour la morphine [58]. Il est usuel de considérer que ce délai est généralement situé entre 2 à 3 jours et 10 jours.

La stabilité des xénobiotiques dans les cheveux est généralement considérée comme bonne. Ceci a été observé dans des segments de cheveux de personnes ayant reçu une dose régulière d'un xénobiotique (Figures 9a et 9b). Les mesures des concentrations capillaires ont été réalisées dans 2 à 5 segments de 3 cm de longueur chacun pour 82 échantillons de cheveux, pour 23 métabolites de différents xénobiotiques. Une légère décroissance de la concentration a été observée au fur et à mesure de l'éloignement de la racine du cheveu (Figure 9a). Il convient cependant, de toujours considérer, en cas d'analyses capillaires, une possible dégradation de la substance recherchée par la lumière ou les variations de température. Cette stabilité dépend de la structure chimique et augmente avec la polarité des substances. Ainsi, les métabolites déméthylés des antidépresseurs sont éliminés plus lentement que les

molécules mères. Pour cette raison, généralement, le ratio de concentration métabolite/substance mère augmente de la partie proximale à la partie distale (Figure 9b). Ainsi, il est consensuel d'admettre que dans des cheveux lavés régulièrement, non traités par des agents cosmétiques agressifs tels que les colorants oxydants ou les permanents, les xénobiotiques peuvent être détectés plus d'un an après la prise [48, 59].



Figures 9 : (a) Valeurs moyennes des concentrations du xénobiotique ou du métabolite dans des segments de 3 cm de longueur de 82 échantillons de cheveux de patients ayant reçu un traitement médical de longue durée à dose constante. (b) Ratio métabolite/xénobiotique dans 29 échantillons de cheveux étudiés sur des segments de 3 cm de longueur pour la même étude [60].

III.3. Recherche et/ou dosage spécifique de substances ou de familles de substances dans les cheveux

L'analyse toxicologique à partir d'échantillons de cheveux est très ancienne. La première application analytique fut développée en 1936 par Marsh dans la recherche de l'arsenic. A partir des années soixante, divers travaux ont été réalisés sur l'exposition et la détermination de métaux lourds dans la matrice capillaire. En 1979, Baumgartner a publié le premier rapport sur la détection de la morphine dans les cheveux de consommateurs d'héroïne par RIA (ou Radio Immuno Assay) [2, 48, 61-62].

De nos jours, grâce au développement de nouvelles méthodes analytiques très sensibles et très spécifiques, l'analyse capillaire est devenue une analyse de routine dans plusieurs laboratoires de toxicologie français et étrangers. Ce nouveau moyen d'investigation biologique présente de nombreuses applications très variées notamment dans la recherche et le dosage de stupéfiants [2, 62].

III.3.1. Recherche et/ou dosage de stupéfiants dans les cheveux

La recherche et/ou le dosage de stupéfiants dans les cheveux concernent essentiellement des études portant sur les opioïdes, les cannabinoïdes, la cocaïne et ses dérivés ainsi que les amphétamines. De nombreux auteurs emploient des techniques analytiques regroupant la recherche et/ou le dosage de plusieurs stupéfiants simultanément. D'autres, en revanche, développent des analyses spécifiques d'un type de stupéfiant.

III.3.1.1. Recherche et/ou dosage des opioïdes dans les cheveux

Dans les cheveux, le traceur le plus important et le plus représentatif de la consommation d'héroïne est la 6-monoacétylmorphine (ou 6-MAM) qui se métabolise de la façon suivante :

Diacétylmorphine (héroïne) → 6-MAM → Morphine

Sa présence, même si elle est nécessaire, n'est en revanche pas suffisante pour affirmer une consommation d'héroïne. En effet, en cas de conduite toxicophile exclusive à l'héroïne, la codéine est toujours détectée dans les cheveux. La codéine acétylée (provenant de l'acétylation de la codéine lors de la synthèse de l'héroïne) est une impureté contenue dans l'héroïne : la codéine est une impureté présente dans les poudres de morphine, un peu de codéine étant extraite de l'opium en même temps que la morphine. La 6-MAM est présente en concentration supérieure à celle de la morphine qui, elle, est présente en concentration supérieure à celle de la codéine. Cette tendance s'inverse en cas de conduite toxicophile exclusive à la codéine pour laquelle la 6-MAM n'est pas retrouvée (Figure 10) [1, 63].

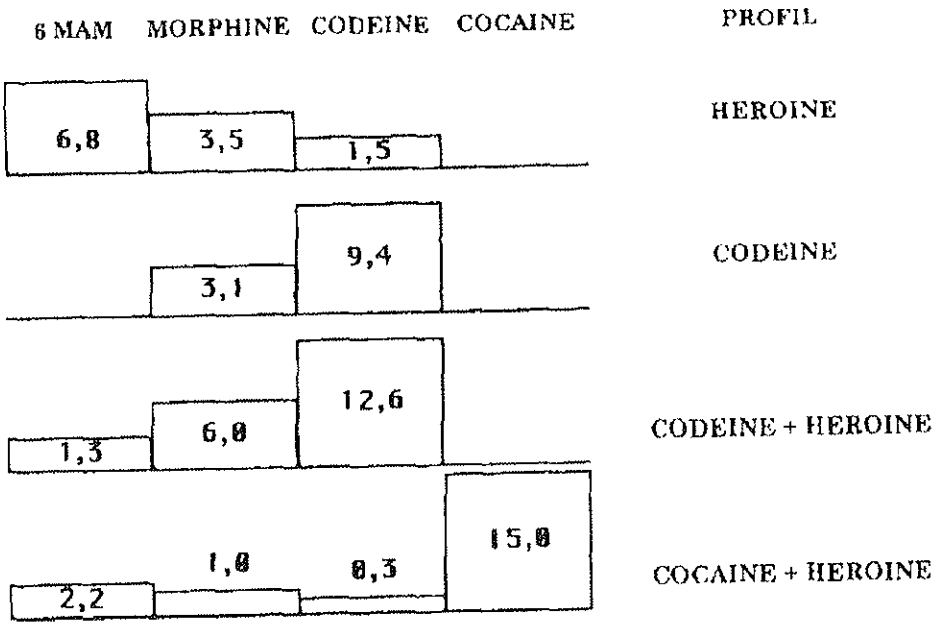


Figure 10 : Exemples de profils d'exposition au cours de conduites toxicophiles. Les résultats sont exprimés en ng/mg de cheveux. Concentrations typiques observées en 6-monoacétylmorphine (6-MAM), morphine, codéine, cocaïne dans les cheveux de sujets toxicomanes à l'héroïne, à la cocaïne, à l'héroïne + codéine, à la cocaïne + héroïne.

Pour la recherche et/ou le dosage des opioïdes dans les cheveux, la première étape est l'étape de décontamination des mèches qui peut être réalisée dans différents solvants organiques selon les auteurs, tels que l'acétone [64], le méthanol [65-66], l'éthanol [67] et le dichlorométhane [68-69]. Cependant, aucun consensus n'a réellement été établi [70]. Trois types d'hydrolyse sont également largement utilisés pour l'étape d'extraction : l'hydrolyse enzymatique [64], l'hydrolyse acide avec de l'acide chlorhydrique (HCl) 0,1 M [69, 71] et l'incubation dans le méthanol [72-73]. L'hydrolyse alcaline n'est, en revanche, pas employée car le pH alcalin conduit à la transformation de la 6-MAM en morphine et solubilise la matrice kératinisée. L'hydrolyse acide ou enzymatique conduit à l'obtention de concentrations légèrement plus élevées que celles obtenues par incubation méthanolique [74].

Les techniques analytiques développées pour la recherche et/ou le dosage des opioïdes dans les cheveux font intervenir la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (ou CG-SM) et la chromatographie en phase liquide ou gazeuse couplées à la spectrométrie de masse en tandem (ou CL-SM/SM ou CG-SM/SM) [75]. La CG-SM/SM s'avère toutefois la technique la plus utilisée et la plus sensible [76]. Cette sensibilité peut cependant être améliorée par une phase de purification des extraits utilisant des colonnes d'extraction solide/liquide (ou SPE, du terme anglo-saxon *Solid Phase Extraction*) [73, 77] ou liquide-liquide (ou LLE, du terme anglo-saxon *Liquid Liquid Extraction*) [68, 78].

De nombreuses études ont été menées afin de montrer une éventuelle relation entre la quantité de toxique utilisée et la concentration retrouvée dans les cheveux [79]. Selon Girod C. *et al.*, aucune relation n'existerait entre une prise quotidienne d'héroïne et la concentration en 6-MAM retrouvée dans les cheveux [80]. D'autres auteurs sont, en revanche, plus nuancés [81].

III.3.1.2. Recherche et/ou dosage de la cocaïne et ses dérivés dans les cheveux

La consommation très répandue et simultanée d'héroïne et de cocaïne a conduit au développement de techniques d'identifications communes. Plusieurs procédures de décontamination des cheveux ont été proposées avec l'emploi, selon les auteurs, de différents solvants organiques comme le dichlorométhane [76, 82], le méthanol [66, 83], l'eau et le méthanol [84] ou encore trois bains successifs dans du dichlorométhane, de l'eau et du méthanol [85-86]. Baumgartner W.A. et d'autres auteurs ont proposé une décontamination dans un premier bain d'éthanol suivi de trois bains successifs dans du tampon phosphate 0,5 M, pH 5,6 [87-89]. Les trois procédures d'extraction utilisées pour les opioïdes sont également retrouvées pour la cocaïne et ses dérivés : l'hydrolyse enzymatique [88], l'hydrolyse acide [85-86, 90] et l'incubation méthanolique [83, 91-92]. Segura J. *et al.* ont montré que l'ajout d'acide trifluoroacétique au méthanol augmentait le rendement d'extraction [82]. A pH alcalin, la cocaïne est hydrolysée en benzoylecgonine et ecgonine methylester (Figure 11). Ce type d'hydrolyse n'est donc pas conseillé.

La technique chromatographique la plus utilisée est la CG-SM [76, 92]. Elle nécessite cependant une étape de « dérivation » préalable pour les composés polaires. Segura J. *et al.* ont fait un bilan de l'ensemble des différents types de « dérivations » retrouvés dans la littérature [93], la silylation est la plus largement retrouvée. La sensibilité des techniques chromatographiques peut cependant être améliorée par une étape supplémentaire de purification des extraits en utilisant des colonnes SPE [85-86, 94]. La CL-SM [94] et la CL-SM/SM [88-89] sont également très utilisées. Ces deux techniques chromatographiques présentent l'avantage de ne pas nécessiter d'étape de « dérivation » pour les composés polaires.

L'analyse des cheveux au cours de conduites toxicophiles à la cocaïne a conduit à de nombreuses controverses en raison d'une possible contamination externe, chez les non consommateurs, par de la poudre de cocaïne ou par la fumée du crack; contamination externe qui n'est pas entièrement éliminée par les techniques de lavages préalables au dosage. Un

autre marqueur, témoin d'une consommation de cocaïne, doit donc être mis en évidence simultanément (Figure 11) :

- la benzoylecgonine, l'ecgonine méthylester, la norcocaïne, métabolites de la cocaïne.
- le cocaéthylène, issu de la liaison de la cocaïne à l'éthanol.

L'anhydroecgonine méthylester, obtenu par pyrolyse de la cocaïne base ou crack, permet de différencier un individu fumant du crack d'une personne consommatrice de chlorhydrate de cocaïne [95]. Toutefois, aujourd'hui, cette appréciation doit être extrêmement nuancée car de nombreux consommateurs de chlorhydrate de cocaïne consomment leur poudre par inhalation après chauffage. Ainsi, pour l'interprétation des résultats, des ratios de métabolites spécifiques (benzoylecgonine/cocaïne > 0,05) ou la recherche de métabolites spécifiques (cocaéthylène, norcocaïne) sont préférés aux seuils de positivité.

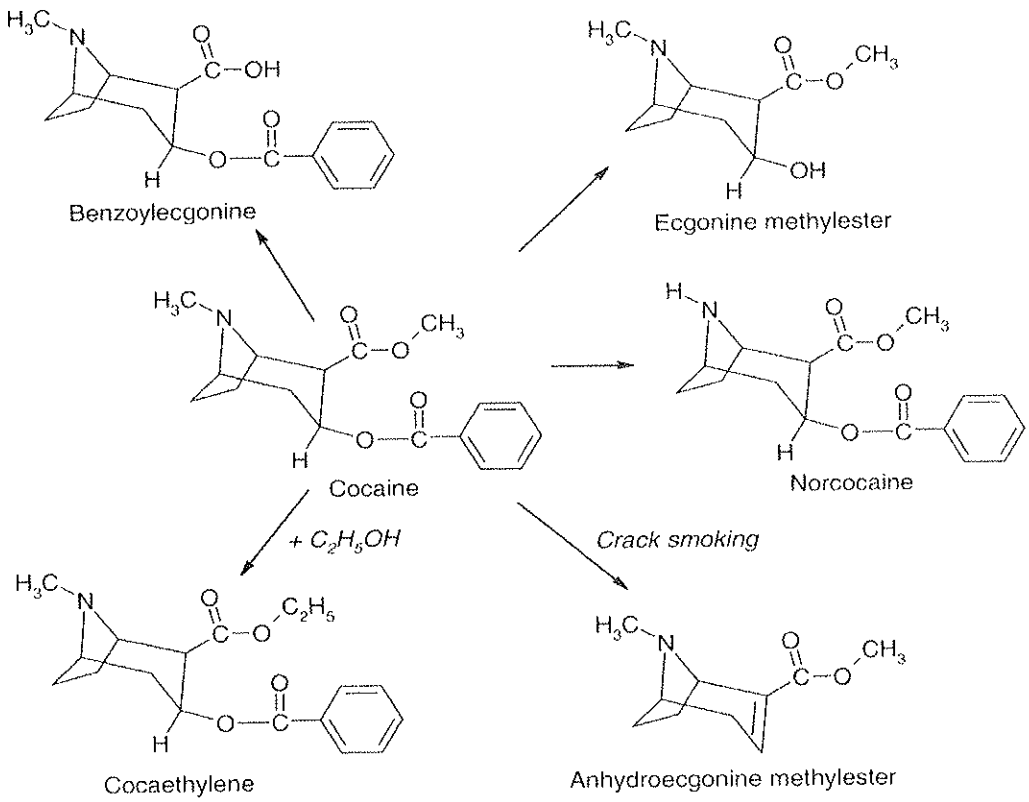


Figure 11 : Les différentes voies de transformation de la cocaïne [48].

III.3.1.3. Recherche et/ou dosage des cannabinoïdes dans les cheveux

Le Delta9-tétrahydrocannabinol (ou THC), aux propriétés psychotropes, est le principal composé du cannabis. Les principaux métabolites initiaux du THC sont le 11-hydroxy-delta9-tétrahydrocannabinol et l'acide 11 nor-delta9-tétrahydrocannabinol-9-carboxylique (ou THC-COOH). Le cannabinol (ou CBN), issu de l'oxydation du THC, possède une faible propriété psycho active. Le cannabidiol (ou CBD), provenant de l'oxydation du CBN, est, quant à lui, dépourvu de propriétés psycho actives.

Les cannabinoïdes sont très difficiles à extraire de la matrice kératinisée. Leurs concentrations mesurées dans la matrice capillaire sont faibles. Le THC, fortement lié aux protéines plasmatiques, possède une faible affinité pour la mélanine et pénètre difficilement les membranes [96]. Plusieurs techniques sont décrites dans la littérature pour la recherche des cannabinoïdes dans les cheveux. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse par impact électronique est la technique la plus décrite [75].

Le THC, le CBD et le CBN, présents dans les fumées, peuvent s'incorporer dans les cheveux [97] et être à l'origine de « faux positifs » par exposition passive. L'étape de décontamination par plusieurs bains successifs est indispensable. Plusieurs solvants peuvent être utilisés : méthanol, eau, dichlorométhane. Contrairement à l'héroïne et à la cocaïne, l'hydrolyse alcaline est la plus retrouvée dans la littérature. Jurado C. *et al.* ont publié une procédure associant une hydrolyse acide, afin d'analyser les opioïdes et les dérivés de la cocaïne, suivie d'une alcalinisation du résidu permettant d'extraire les cannabinoïdes [68]. Cirimele V. *et al.* ont, quant à eux, développé une procédure permettant l'identification et la quantification directe du CBN et du CBD sans passer par une dérivation du THC [98]. La CG-SM avec identification par ionisation chimique négative du THC-COOH, métabolite carboxylé endogène, permet ainsi d'éliminer le risque de contamination externe par les fumées et confirme la consommation de cannabis [99].

Selon les auteurs, les limites de détection (LDD) varient de 0,03 à 3 ng/mg pour le CBD, de 0,01 à 1,07 ng/mg pour le CBN et de 0,10 à 0,29 ng/mg pour le THC [98]. Pour pallier le

risque de faux positifs, trois sociétés savantes, la SFTA (Société Française de Toxicologie Analytique), la GTFCh (Société Allemande de Toxicologie Analytique) et la SoHT (Society of Hair Testing) ont défini la valeur de 0,1 ng/mg de cheveux comme étant la concentration seuil de THC au-delà de laquelle un résultat doit être considéré comme positif [100-102].

III.3.1.4. Recherche et/ou dosage des amphétamines dans les cheveux

La plupart des travaux consacrés à la recherche et/ou au dosage des amphétamines dans les prélèvements capillaires ont été publiés par des auteurs japonais confrontés historiquement à ce type de toxicomanie. Différentes techniques chromatographiques sont décrites dans la littérature depuis le début des années 80.

Les prises d'essai varient selon les auteurs, d'un cheveu à 250 mg. En 1984, Suzuki O. *et al.* ont décrit une procédure de dosage de la methamphétamine et de l'amphétamine par CG-SM avec ionisation chimique à partir d'un seul cheveu (!) [103]. Dans la majorité des cas, même si aucun consensus n'a été réellement établi, une étape de décontamination dans un bain à ultrasons est nécessaire. Cette étape est primordiale afin d'éviter les « faux positifs » dus à une contamination passive par les fumées. En comparant différentes procédures d'hydrolyse, Kintz P. *et al.* ont observé que l'hydrolyse alcaline conduisait à de meilleurs rendements d'extraction par rapport à l'hydrolyse acide, enzymatique ou l'incubation dans le méthanol [104].

L'utilisation de la methamphétamine au Japon depuis la fin de la Seconde Guerre Mondiale, a conduit des auteurs japonais à publier de nombreux articles sur la détection des amphétamines dans les cheveux. Dans la littérature, la chromatographie en phase gazeuse précédée d'une hydrolyse alcaline et d'une étape de « dérivation » s'avère la technique la plus communément utilisée. Les solvants utilisés pour la « dérivation » sont très différents suivant les auteurs. En 1984, Takahashi K. [105] et Nagai T. [106] ont décrit deux études sur la recherche de la methamphétamine et de l'amphétamine dans les cheveux avec une « dérivation » par de l'anhydride trifluoroacétique (ou TFA). La même année, une technique permettant le dosage

de l'amphétamine et de la methamphétamine par GC-MS, précédée d'une « dérivation » des extraits avec du TFA, a également été publiée [103]. L'emploi de l'anhydride heptafluorobutyrique (ou HFBA) pour l'étape de « dérivation » a permis, en 1997, la recherche de l'amphétamine, la methamphétamine, la MDA (3,4-méthylènedioxyamphétamine), la MDMA (3,4-méthylènedioxymethamphétamine), la MDEA (3,4-méthylènedioxyéthylamphétamine) et 2 autres métabolites avec des limites de détection allant de 0,02 à 0,05 ng/mg à partir d'une prise d'essai de 50 mg de cheveux [107]. Le 2,2,2-trichloroéthylchloroformate est également un agent de « dérivation » retrouvé dans la littérature [108]. Villamor J.L. *et al.* ont décrit en 2005, une nouvelle technique permettant la détection et la quantification simultanée de l'amphétamine, la methamphétamine, la MDA la MDMA et la MDEA [109].

Depuis les dix dernières années, la chromatographie liquide haute performance (ou CLHP) couplée à différents détecteurs, comme le spectromètre de masse par exemple, s'est beaucoup développée. En 2004, Stanaszek R. et Piekoszewski W. ont mis au point une méthode de recherche d'un groupe de huit amphétamines dans les cheveux (l'amphétamine, l'éphédrine, la methcathinone, la paraméthoxyamphétamine, la methamphétamine, la MDA, la MDMA et la MDEA) par CL-SM avec détection par ionisation chimique à pression atmosphérique. Cette technique a ainsi permis d'atteindre des LDD allant jusqu'à 0,05 ng/mg pour la methamphétamine, la MDA, la MDMA et la MDEA, jusqu'à 0,10 ng/mg pour l'amphétamine, l'éphédrine et enfin, jusqu'à 0,20 ng/mg pour la methcathinone, la paraméthoxyamphétamine [110].

Au Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Limoges, une méthode d'identification et de dosage de l'amphétamine, de la methamphétamine, de la MDA, de la MDMA et de la MDEA par CG-SM a été développée. Après extraction liquide-liquide en milieu basique par le diéthyl oxyde, les amphétamines sont dérivées par l'HFBA puis l'extrait est purifié par lavages successifs avec de l'eau désionisée puis avec du NH_4OH à 4 %. La séparation est effectuée par une colonne capillaire polaire et l'ionisation est réalisée par impact électronique. Cette technique a permis d'atteindre des LDD de 0,5 à 8 ng/mL selon les composés et une limite de quantification (LDQ) de 10 ng/mL à l'exception de la methamphétamine (20 ng/mL) et de la MDA (50 ng/mL).

Dans la littérature, la CG-SM s'avère donc la technique la plus sensible même si d'autres techniques comme la CL-SM/SM se développent de plus en plus.

III.3.2. Recherche et/ou dosage de l'éthylglucuronide dans les cheveux

L'analyse des cheveux peut également présenter un intérêt clinique et toxicologique très utile dans le diagnostic d'une consommation excessive et chronique d'alcool, le suivi de patients en cours de sevrage, le suivi de grossesse chez des patientes suspectées d'éthylisme. Au cours de ces différentes situations, cliniciens et biologistes doivent disposer de marqueurs spécifiques. L'éthyl-glucuronide (ethyl-β-D-6-glucuronide, EtG, Figure 12) est un métabolite mineur mais hautement spécifique de l'éthanol utilisé comme biomarqueur de la consommation alcoolique. Il est détectable dans de nombreux fluides et tissus humains, en particulier dans le sérum, les urines et les cheveux même après élimination complète de l'éthanol par l'organisme.

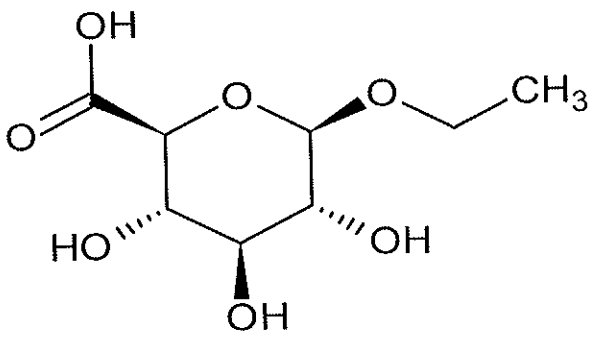


Figure 12 : Structure chimique de l'Ethyl-Glucuronide, masse moléculaire 222 $g.mol^{-1}$.

Depuis quelques années, différentes techniques analytiques ont été développées et publiées pour le dosage de l'EtG dans les cheveux (Tableau I). La CG-SM et la CL-SM/SM s'avèrent les plus sensibles [111-116]. Les prises d'essai varient de 30 mg à 100 mg. Les solvants de l'étape de décontamination des mèches de cheveux sont également très variés. L'extraction s'effectue, pour la plupart des auteurs, dans un bain à ultrasons pendant une période de 2 heures. Après cette période d'incubation, Lamoureux F. *et al.*, Yegles M. *et al.* et Janda I. *et al.* ont procédé à une phase de purification des extraits en utilisant des colonnes SPE [117-

118]. Les extraits obtenus peuvent être directement injectés dans le cas de la chromatographie en phase liquide ou, alternativement, nécessiter une « dérivation » afin d'augmenter la volatilité de l'analyte pour la chromatographie en phase gazeuse. Ces techniques ont ainsi permis d'atteindre des LDD jusqu'à 2 pg/mg à partir d'une prise d'essai de 100 mg de cheveux [114].

Lorsque la consommation d'éthanol dépasse 60 grammes par jour pendant plusieurs semaines, l'EtG s'accumule dans les cheveux, matrice biologique où il permet ainsi de poser le diagnostic d'éthylisme chronique. Différentes études ont ainsi montré que les concentrations d'EtG dans les cheveux d'alcooliques connus variaient de 30 à 13 000 pg/mg de cheveux [111, 116]. Toutes ces études indiquent, par ailleurs, que les cheveux de patients abstinents et buveurs modérés étaient négatifs en EtG ou présentaient des concentrations en éthylglucuronide inférieures à 30 pg/mg de cheveux, confirmant ainsi l'excellente spécificité de ce marqueur avec un risque de « faux positifs » nul dès lors que les concentrations seuils étaient suffisantes. Des valeurs seuils ou « cut-off » variant de 25 à 50 pg/mg de cheveux ont ainsi été proposées par certains auteurs pour différencier les patients alcooliques chroniques des buveurs modérés et/ou abstinents [118-119]. Des travaux récents et prometteurs ont montré l'intérêt de la recherche et/ou du dosage de l'EtG dans les cheveux : en particulier, pour détecter une consommation excessive de boissons alcoolisées chez la femme enceinte [120-121] ou dans le cadre du suivi des patients en cours de sevrage [119]. Compte tenu du fait que ce marqueur est de plus en plus utilisé, validé et reconnu par la communauté scientifique [122], l'interprétation des concentrations capillaires fait aujourd'hui l'objet d'un consensus [123] qui rejoint les conclusions de notre expérience personnelle :

- une concentration capillaire supérieure à 30 pg/mg traduit un alcoolisme chronique, c'est-à-dire une consommation de plus de 60 grammes d'alcool par jour, depuis plusieurs semaines (définition de l'OMS).
- une concentration capillaire inférieure à 10 pg/mg de cheveux est en faveur d'une abstinence ou d'une consommation occasionnelle et modérée de boissons alcoolisées.

Tableau I : Le dosage de l'Ethyl-Glucuronide dans les cheveux par techniques chromatographiques dans la littérature

Références	Lamoureux 2008	Morini 2005	Yegles 2004	Jurado 2004	Janda 2002	Skopp 2000
Technique	LC-ESI-MS/MS	LC-ESI-MS/MS	GC-NCI/MS	GC-NCI/MS	LC-ESI-MS/MS	GC-MS
Prise d'essai	30 mg	100 mg	30 mg	100 mg	100 mg	50 mg
Extraction	Lavage: DiCl./Eau Eau+US 2h + SPE (CleanScreen)	Lavage: DiCl./MeOH Eau +US 2h	Lavage: Eau/n-heptane Eau+US 2h + SPE (Isolute NH2)	Lavage: Eau/Acétone Eau+US 2h	Lavage: MeOH/Acétone Eau+US 2h + SPE (Isolute NH2)	Lavage: Ether/Acétone MeOH+US 3h
Colonne	Uptisphère-3SI	Chrompack Inertsil ODS3	HP-Ultra 2	DB-1	Synergy Polar RP	CP-Sil 5
Elution	Ac. Formique / ACN (5/95)	Ac. Formique 0,1% / ACN (99/1) Addition ACN post- colonne	Helium/Methane	Helium	Ac. Formique 0,1% / ACN (99/1)	NR
Système	Perkin Elmer/API 2000	Agilent 1100/4000 Q- TRAP	HP 6890 et 5973	HP 6890 et 5973	Shimadzu /API 365	HP 5890 II et 5972
Transitions (m/z)	221→75 et 226→75 (quant.) 221→85 (conf.)	221→75 et 226→75 (quant.) 221→85 (conf.)	Dérivation : PFPA 496→347 (quant.)	Dérivation : PFPA 496→338 (quant.)	221→75 et 226→75 (quant.) 221→85 et 221→221 (conf.)	Dérivation : MSTFA m/z = 405 (quant.)
LDD	4 pg/mg	2 pg/mg	2 pg/mg	25 pg/mg	51 pg/mg	22 pg/mg
LDQ	10 pg/mg	3 pg/mg	4 pg/mg	50 pg/mg	102 pg/mg	50 pg/mg

III.3.3. Recherche et/ou dosage de familles de médicaments dans les cheveux

III.3.3.1. Recherche et/ou dosage des benzodiazépines dans les cheveux

L'analyse des cheveux peut également s'avérer extrêmement riche d'informations et être mise à profit dans un contexte de soumission chimique par la détection et le dosage de composés psychotropes tels que les benzodiazépines. En raison de leurs propriétés pharmacologiques, physico-chimiques et de leur facilité d'obtention, elles possèdent le « profil type » des substances idéales et constituent de ce fait les molécules les plus employées par les agresseurs afin d'obtenir un « état favorable » chez la victime (violences volontaires, vol, viol, actes de pédophilie).

Dans la littérature, les méthodes les plus récemment décrites pour la recherche et/ou le dosage des benzodiazépines dans les cheveux sont basées sur des techniques chromatographiques en phase liquide avec une détection par spectrométrie de masse en tandem.
Le mode de préparation des échantillons capillaires et les solvants utilisés pour l'étape d'hydrolyse varient d'un auteur à un autre. Laloup M. *et al.* décontaminent les cheveux dans deux bains de dichlorométhane, suivi de deux bains successifs d'eau et de méthanol alors que Villain M. *et al.* emploient deux bains de chlorure de méthylène et Hegstad S. *et al.*, un bain de 2-propanol suivi d'un bain de tampon phosphate 0,01 M et de nouveau un bain de 2-propanol. Irving R.C. *et al.* utilisent un bain d'eau suivi de deux bains avec de l'éthanol. Une décontamination avec une solution de dodécyl sulfate de sodium (SDS) dans l'eau (0,1 %) et du dichlorométhane est également retrouvée.
La plupart des auteurs utilisent une extraction liquide-liquide. Les solvants les plus couramment utilisés sont le dichlorométhane, le méthanol, des mélanges de dichlorométhane/diéthyléther, dichlorométhane/éther ou encore du méthanol/acide trifluoroacétique [124-130]. Très peu d'auteurs utilisent une extraction en phase solide [131-132].

La CG-SM est une technique décrite dans la littérature [133] mais la CL-SM avec ionisation par electrospray est la technique la plus couramment retrouvée.

Ces différentes techniques ne conduisent pas au même nombre de benzodiazépines retrouvées mais elles ont permis d'atteindre des LDD allant jusqu'à 0,01 pg/mg pour le midazolam [126].

III.3.3.2 Recherche et/ou dosage d'autres médicaments dans les cheveux

D'autres psychotropes sont également recherchés dans les prélèvements capillaires pour des applications tant cliniques que médico-légales. Les neuroleptiques (chlorpromazine, halopéridol) ont été parmi les médicaments les plus étudiés. La CL-UV/BD constitue la technique de choix pour cette classe thérapeutique [134]. Sato H. *et al.* ont publié une étude montrant que la concentration en chlorpromazine dans les cheveux était corrélée, à la fois avec la concentration plasmatique à l'état d'équilibre et avec la posologie. De plus, ils ont également pu constater que ce neuroleptique avait une forte affinité pour la mélanine car sa concentration était plus faible chez des sujets ayant des cheveux blancs donc pauvres en mélanine [135].

Les antidépresseurs et notamment les antidépresseurs tricycliques ont également fait l'objet de publications. Pour ce type de molécules, la CL-UV/BD peut se substituer à la CG-SM après une étape d'extraction en phase solide à pH alcalin [134].

Des études concernant la recherche et/ou le dosage des hypnotiques ont également été développées. En 2004, Villain M. *et al.* ont mis au point une technique permettant le dosage de la zopiclone par CL-SM/SM avec une étape de décontamination par du dichlorométhane et une extraction liquide-liquide. Cette technique a permis d'atteindre une LDD de 0,3 pg/mg [136].

D'autres familles de médicaments sont également recherchées dans les cheveux comme les hypoglycémiants parmi lesquels le glibenclamide. Villain M. *et al.* ont développé en 2006 une

technique permettant sa recherche par CL-SM/SM avec une extraction liquide-liquide permettant d'atteindre une LDD de 2 pg/mg [137].

III.4. Intérêts et limites des analyses capillaires

Les cheveux se distinguent des autres matrices biologiques utilisées classiquement dans les analyses toxicologiques, telles que le sang ou les urines, et représentent un puissant moyen de diagnostic clinique complémentaire, par leur capacité unique à stocker les xénobiotiques pendant plusieurs semaines, voire plusieurs mois (alors que leur présence dans le sang et les urines est souvent temporaire). Cette longue fenêtre de détection permet la recherche rétrospective de la consommation de drogues ou de médicaments [2, 62, 138-139]. De plus, grâce à leur structure solide et durable, l'analyse des cheveux peut être réalisée des années (parfois même des siècles) après la réalisation des prélèvements [140].

Tout laboratoire réalisant des analyses capillaires doit avoir validé des directives afin de vérifier la précision, l'exactitude, la sensibilité et la spécificité des essais [141-143]

Selon les techniques analytiques utilisées, une mèche de 50 à 100 mg de cheveux est généralement nécessaire par analyse. Un prélèvement d'une quantité de deux à trois fois plus importante est donc recommandé. Ces cheveux doivent être coupés à l'arrière du crâne au niveau du vertex inférieur (Figure 13) pour diverses raisons. En effet, la phase anagène y est la plus élevée (96%) et la vitesse de croissance y est relativement homogène. De plus, cette zone est relativement protégée des contaminations extérieures, et le prélèvement n'est pas la source de « dégâts esthétiques » trop importants. La coupe est réalisée à l'aide d'une paire de ciseaux. Il est indispensable de noter l'orientation de pousse (racine → pointe) lorsqu'une segmentation est prévue. Généralement, un fil est noué à la base de la mèche et la section est réalisée entre cette ligature et le cuir chevelu, au plus près de ce dernier [2, 48]. Les cheveux sont ensuite conditionnés, à température ambiante, dans une enveloppe ou dans du papier d'aluminium (Figure 13). Après les étapes de décontamination, l'hydrolyse et l'extraction s'effectuent sur des cheveux pulvérisés ou coupés finement.

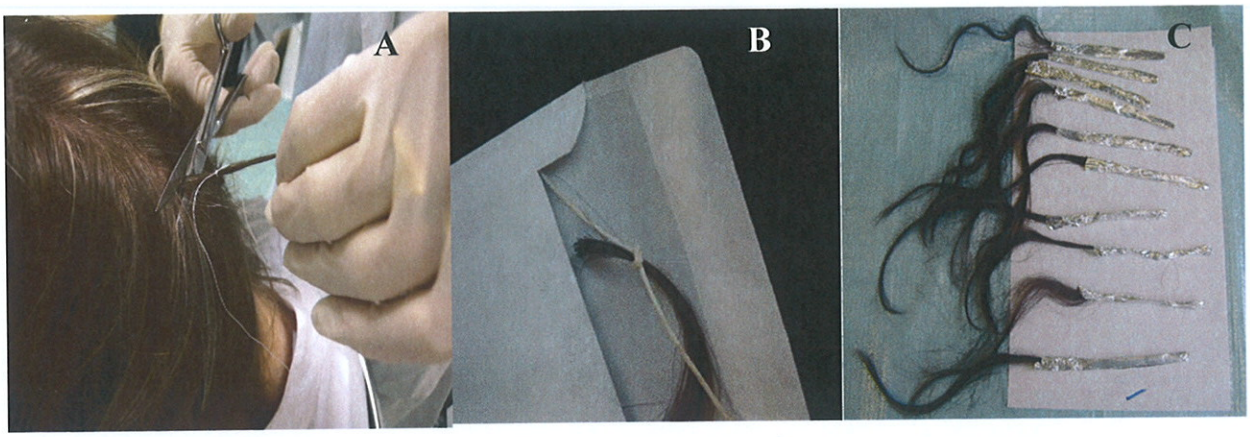


Figure 13 : Photographies représentant les étapes de prélèvement au niveau du vertex inférieur (A) et de conditionnement des échantillons capillaires pour analyse (B et C).

De par leur capacité à constituer la seule mémoire biologique à disposition dans de nombreuses situations, les cheveux constituent ainsi une matrice potentiellement intéressante, notamment, en toxicologie médico-légale pour de multiples applications :

- pour prouver une exposition cachée, illicite ou criminelle aux stupéfiants, les conséquences pénales n'étant pas les mêmes qu'un individu soit considéré comme consommateur ou comme dealer.
- pour mettre en évidence le type de drogue consommée, la durée et la régularité des prises.
- pour confirmer ou au contraire infirmer des délits graves comme des meurtres ou des viols sous l'emprise de stupéfiants par la mise en évidence d'une consommation à distance.
- pour révéler une tentative d'intoxication chronique à des fins criminelles.
- pour préciser le traitement permettant d'identifier une victime en l'absence d'autres milieux biologiques disponibles ou exploitables [144].

Le champ d'investigation est également immense en clinique. Le cheveu peut s'avérer être un moyen de dépistage très utile pour la surveillance des patients traités par des antiépileptiques. En effet, dans ce type de situation, la surveillance thérapeutique repose classiquement sur les

dosages sanguins mais lorsque ceux-ci n'ont pas été réalisés, quand des troubles cliniques sont constatés chez un malade bon observant ou en cas de dissociation entre les concentrations sanguines mesurées et la symptomatologie clinique, l'analyse capillaire peut apporter des informations pertinentes et compléter utilement les dosages sanguins. L'analyse capillaire s'avère également extrêmement riche d'informations pour mettre en évidence une exposition d'un nouveau-né à un toxique pendant la grossesse, dans la surveillance thérapeutique pour confirmer une erreur de prescription, comme marqueur du tabagisme passif par le dosage de la nicotine ou enfin chez des malades psychiatriques pour contrôler la bonne observance thérapeutique au long cours, l'interrogatoire pouvant être parfois difficile voire impossible chez ce type de patient [1-2, 145].

Depuis les 20 dernières années, les cheveux gagnent donc en reconnaissance en matière d'investigations rétrospectives d'abus chronique de substance(s) ou lors d'intoxications. Les prélèvements capillaires sont donc devenus des matrices importantes en clinique et dans le domaine médico-légal, particulièrement dans les contextes de soumission chimique. Contrairement au sang et aux urines, le cheveu permet d'apporter des informations tardives et cumulatives, mais il présente également certaines limites. En effet, les possibilités d'incorporation des xénobiotiques par contamination extérieure nécessitent certaines précautions et les procédures de décontamination des cheveux doivent être parfaitement définies avant de réaliser les analyses. De très nombreux auteurs effectuent uniquement un dosage quantitatif ciblé d'un type de substances en particulier. Or, dans de nombreuses situations, une recherche qualitative d'un large échantillon de composés appartenant à plusieurs familles différentes, appelé le « General Unknown Screening » s'avère nécessaire.

IV. Screening dans les cheveux

IV.1. Introduction

Les analyses capillaires représentent donc un moyen d'investigation, tardif et cumulatif, dans de nombreuses situations à la fois cliniques et médico-légales en complément des prélèvements sanguins et urinaires [1-2].
Dans la littérature, deux types de stratégie de screening toxicologique dans les cheveux sont décrits :

- le « screening ciblé» qui permet la recherche et/ou le dosage de quelques molécules appartenant à un nombre restreint de classes thérapeutiques (exemple : le screening des antidépresseurs). C'est le type de screening le plus largement retrouvé. Le screening des stupéfiants est, par exemple, plus spécialement utilisé dans le dépistage et la surveillance des conduites toxicophiles, le screening des psychotropes (benzodiazépines, neuroleptiques) afin d'évaluer une exposition médicamenteuse lors d'une tentative d'empoisonnement.

- le « General Unknown Screening » (ou GUS) qui consiste en la recherche d'un nombre illimité ou non de substances, sans *a priori* et qui permet ainsi d'élargir considérablement le champ des investigations.

Les xénobiotiques présents dans les cheveux peuvent être mis en évidence pendant une période allant de quelques semaines à quelques mois, voire des années [2, 62, 138]. Ces deux stratégies de screening sont donc généralement réalisées en complément des analyses sanguines et urinaires pour lesquelles la durée de détection est de quelques heures à quelques jours. En revanche, dans certaines situations, les analyses capillaires représentent le seul moyen d'investigation mis à disposition. C'est le cas par exemple, lors de la découverte d'un cadavre lorsque le corps est déjà en voie de décomposition avancée, et pour lequel ni prélèvement sanguin, ni prélèvement urinaire n'est réalisable, ou pour compléter les résultats des analyses de ces deux types d'échantillons. Les cheveux demeurent en général intacts et permettent de réaliser un examen toxicologique afin de connaître les habitudes de

consommation du défunt vis-à-vis d'une classe médicamenteuse ou de stupéfiants. Le seul facteur limitant peut être la longueur de la mèche disponible, mais également le risque de contamination *post-mortem*, notamment à la suite d'exhumations (les cheveux pouvant être contaminés par un « bain dans les fluides de putréfaction ») [144, 146].

Dans des cas de soumission chimique (violences volontaires, vol, viol, actes de pédophilie), les cheveux peuvent également s'avérer riches d'informations. Dans ce type de situation, les substances sont administrées à l'insu de la victime, qui n'a pas, généralement, ni conscience, ni souvenir, des faits. En effet, certains composés, à l'origine d'amnésies partielles voire totales, peuvent conduire à un retard de déclaration de l'agression, et par conséquent, à une réalisation tardive des prélèvements biologiques. L'enquête de police, les interrogatoires sont donc très souvent réalisés longtemps après les faits. Les investigations initiales (sang et urines) peuvent alors s'avérer inefficaces, voire négatives (par exemple, l'acéprométazine, neuroleptique phénothiazinique présent dans le Noctran® a une demi-vie très courte et peut être éliminé en 8 heures) [147]. Dans ces conditions, les prélèvements capillaires sont utiles car, en réalisant des sections sur une mèche de cheveux, ils peuvent représenter le seul moyen de confirmer des aveux, ou de prouver, dans la période des faits, une administration chez une personne « naïve ». L'état de conscience d'un agresseur au moment des faits peut également être exploré. Ainsi et par exemple, lorsque l'agression a eu lieu quelques mois avant les prélèvements capillaires, et que l'agresseur est un ancien toxicomane. Ce dernier peut alors déclarer avoir agi en « état de manque » et les résultats des analyses, en fonction des différentes segmentations réalisées sur les mèches de cheveux, pourront être révélateurs de l'évolution de sa consommation de stupéfiants au moment des faits [148-149].

Cependant, et idéalement, l'identification d'un xénobiotique dans les cheveux par « screening » n'est pas suffisante, et doit si possible être confirmée par un dosage avec une méthode spécifique.

IV.2. Revue de la littérature

Dans la littérature, les publications décrivant des techniques de GUS dans les cheveux sont extrêmement rares car la plupart des auteurs recherchent et/ou dosent seulement quelques molécules, appartenant de surcroît à un nombre restreint de classes thérapeutiques.

Gaillard Y. *et al.* ont été parmi les premiers à publier en 1997 un article décrivant une technique de GUS par chromatographie en phase liquide haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes (ou CL-UV/BD) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (ou CG-SM). Des échantillons variant de 200 à 250 mg de cheveux ont été collectés et décontaminés dans deux bains d'eau chaude pendant 3 minutes suivi de 2 bains de dichlorométhane également pendant 3 minutes. Les prélèvements ont ensuite été coupés en segments de 2 cm puis des prises d'essais de 75 mg ont été incubées à 56°C pendant 12 heures dans deux milieux différents suivant l'extraction de composés acides d'une part et basiques et neutres d'autre part. Pour les composés acides, l'hydrolyse a été réalisée avec le prazépam comme étalon interne dans 2 mL d'eau distillée. Pour les composés basiques et neutres, l'hydrolyse a été réalisée avec la bupivacaine comme étalon interne dans 1 mL d'acide chlorhydrique 0,1 M. Après cette période d'incubation, les extraits ont subi une double phase de purification en utilisant des colonnes SPE et ont été injectés dans les deux systèmes chromatographiques. La mesure des temps de rétention et les spectres ultraviolets ont permis l'identification de 675 xénobiotiques (stupéfiants, benzodiazépines, antidépresseurs tricycliques, antiépileptiques, β-bloquants, anticoagulants, anti-inflammatoires non stéroïdiens...). Par exemple, le méprobamate qui n'absorbe pas dans l'ultraviolet a été identifié par CG-SM alors que l'acénocoumarol, anticoagulant non volatile, a été mis en évidence par CL-UV/BD [134].

Kronstrand R. *et al.*, en 2004, ont analysé 75 échantillons capillaires provenant d'autopsies par LC-MS/MS en complément des prélèvements sanguins et urinaires. Les prises d'essais, variant de 10 à 50 mg de cheveux, ont été hydrolysées à 37°C pendant 18 heures dans un bain avec agitation orbitale de 0,5 mL de phase mobile (acétonitrile, méthanol, tampon formate 20 mM pH 3 (10 : 10 : 80)) et 25 µL d'étalons internes deutérés (2,0 ng/mL de morphine-d_3, cocaïne-d_3, amphétamine-d_5 et diazépam-d_5). Après cette période d'incubation, 10 µL ont été

injectés dans le système chromatographique. Les temps de rétention ont été mesurés pour chaque composé. Cette technique a permis l'identification de 14 xénobiotiques : nicotine, cotinine, morphine, 6-acétylmorphine, codéine, éthylmorphine, amphétamine, methamphétamine, MDA, MDMA, cocaïne, benzoylecgonine, diazépam et 7-aminoflunitrazépam. Chaque composé retrouvé était ensuite dosé par une méthode spécifique, la CG-SM pour les opioïdes et les amphétamines et la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (ou CL-SM/SM) pour les benzodiazépines [89].

D'autres auteurs ont également décrit des techniques de GUS dans les cheveux par CL-SM/SM comme Hegstad S. *et al.* qui ont publié en 2008 une technique permettant la recherche de 22 composés associant des psychotropes, des stupéfiants et leurs métabolites. Les mèches de cheveux ont été prélevées au niveau du vertex inférieur du personnel du laboratoire et de leur famille, quatre échantillons provenaient d'autopsies. Ces différentes mèches ont ensuite été coupées en petits segments de 1 cm afin de garder 20 mg de prise d'essai pour l'analyse. Chaque échantillon a été décontaminé dans 2 mL de propan-2-ol pendant 15 minutes puis dans 3 bains successifs de 15 minutes chacun de 2 mL de tampon phosphate 0,01 M (pH 6) et enfin de nouveau dans un bain de 2 mL de propan-2-ol pendant 15 minutes. Les mèches ont ensuite été séchées à température ambiante. Chaque échantillon a été mélangé à 0,45 mL d'un mélange d'acétonitrile/acide formique 25 mM et 50 µL d'étalons internes deutérés (500 ng/mL de morphine-d_3, amphétamine-d_{11}, 7-aminoflunitrazépam-d_7 et diazépam-d_5). Après une centrifugation à 2600 tours/min, l'étape d'hydrolyse a été réalisée dans un bain à 37°C pendant une période de 18 heures. 10 µL ont ensuite été analysés par CL-SM/SM. Cette technique a permis l'identification de 22 composés et de leurs métabolites : nicotine, cotinine, morphine, 6-MAM, codéine, amphétamine, methamphétamine, MDMA, cocaïne, benzoylecgonine, 7-aminonitrazépam, 7-aminoclonazépam, 7-aminoflunitrazépam, oxazépam, diazépam, alprazolam, zopiclone, zolpidem, carisoprodol, méprobamate, buprénorphine et méthadone [128].

Comme Kronstrand R. *et al.* et Hegstad S. *et al.*, Bucelli F. *et al.* ont également permis, en 2009, la recherche de plusieurs xénobiotiques par CL-SM/SM. Des prises d'essais de 20 à 50 mg de cheveux étaient prélevées sur des personnes admises dans des centres de désintoxication, puis finement coupées en segments et décontaminées dans deux bains de 2 mL de dichlorométhane. Les mèches étaient ensuite incubées dans 3 mL de tampon phosphate

0,1 N (pH 5) et mélangées à deux étalons internes (amphétamine-d_5 et benzoylecgonine-d_8) avant d'être incubées pendant une période de 18 heures à 45°C. Les extraits étaient ensuite déposés à la surface d'une colonne d'extraction avant d'être injectés en deux temps dans le système chromatographique. Une première injection permettait la recherche des opioïdes, de la cocaïne et de ses métabolites. La deuxième injection permettait de rechercher d'autres xénobiotiques comme des benzodiazépines. La détection a été réalisée avec une ionisation par electrospray. Seize composés ont ainsi été analysés : ecgonine méthylester, cocaïne, benzoylecgonine, morphine, 6-MAM, codéine, amphétamine, methamphétamine, MDA, MDEA, MDMA, MBDB, éphédrine, phentermine, phendimétrazine et buprénorphine [150].

La CL-SM/SM a également été décrite par Liu H.S. *et al.* en 2010. La masse de la prise d'essai était de 50 mg et 50 µL de nalorphine ont été utilisés comme étalon interne. La période d'incubation était de 1 heure à 60°C dans un bain de 2 mL d'acide chlorhydrique 0,1 N. Ces auteurs ont mis en application cette méthode afin d'analyser le sang, les urines et les cheveux d'une personne retrouvée inconsciente et décédée à son arrivée à l'hôpital. Ils ont comparé les spectres obtenus à partir de ces trois types d'échantillons à une bibliothèque contenant 800 spectres de composés et ont ainsi pu constater que certaines substances retrouvées dans les cheveux n'étaient pas identifiées dans les prélèvements sanguins et urinaires comme par exemple, la MDMA, l'héroïne et la kétamine. Les résultats de ces trois prélèvements ont donc été complémentaires les uns des autres ce qui a permis une interprétation plus aisée de la cause du décès [38].

Une autre technique, plus rare, est également retrouvée dans la littérature, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (ou LC-TOFMS du terme Anglo-Saxon *Liquid Chromatography-Time-Of-Flight Mass Spectrometry*). Elle a été décrite par Pelander A. *et al.* en 2008 pour la recherche qualitative de xénobiotiques basiques dans les cheveux en comparaison avec les prélèvements sanguins et urinaires. 32 échantillons ont ainsi été prélevés sur des personnes de type caucasien autopsiées et connues pour être consommatrices de médicaments. 100 à 250 mg de cheveux ont été décontaminés dans 5 mL d'éthanol pendant 10 minutes. Une hydrolyse alcaline avec 2 mL d'hydroxyde de sodium 1 M a ensuite été réalisée pendant une période d'une heure à 100°C puis le pH a été ajusté à 7 avec de l'acide chlorhydrique. Les extraits ont subi une purification en utilisant des colonnes SPE avant d'être injectés dans le système chromatographique. Cette technique a permis l'identification de 35 composés appartenant à différentes classes thérapeutiques : opioïdes

(tramadol et ses métabolites, méthadone, codéine, oxycodone), amphétamines (amphétamine, methamphétamine, MDMA), antiépileptiques (lamotrigine, carbamazépine, oxcarbazépine, phénytoine), antidépresseurs (citalopram, mirtazapine, venlafaxine, trimipramine), β-bloquants (bisoprolol, propranolol), benzodiazépines (alprazolam), paracétamol,... En revanche, peu de benzodiazépines ont été retrouvées par cette technique car l'hydrolyse alcaline n'est pas recommandée pour rechercher ce type de composés. Toutefois, de nombreux xénobiotiques non retrouvés dans le sang et/ou les urines ont été identifiés dans les cheveux [46].

IV.3. Discussion

L'ensemble de ces différents travaux n'a pas permis d'établir de réel consensus sur une technique de GUS dans les cheveux.
La plupart des échantillons sont issus de cadavres autopsiés ou de personnes connues pour être consommatrices de médicaments. Les prélèvements sont toujours réalisés en deçà du vertex crânien.

Les masses des prises d'essais restent très variables d'un auteur à un autre allant de 10 mg pour Kronstrand R. *et al.* jusqu'à 250 mg pour Pelander A. *et al.* Une masse moyenne de 50 mg d'échantillon est cependant très souvent rencontrée.

L'étape de décontamination des mèches de cheveux est également très différente selon les auteurs notamment en ce qui concerne les solvants utilisés. Plusieurs bains successifs pendant des durées variables demeurent nécessaires de façon à éliminer toutes substances hydrophiles et lipophiles présentes à la surface des échantillons (pouvant augmenter le bruit analytique, réduire la sensibilité et être à l'origine de résultats « faux positifs »). Le dichlorométhane est le solvant le plus retrouvé.

Le mode d'hydrolyse est variable entre les différentes méthodes décrites dans la littérature. L'hydrolyse acide pendant une période d'incubation de 18 heures est la plus utilisée par les auteurs. En revanche, la température des bains n'est pas identique et varie de 37°C à 60°C. En général, plus la température du bain est élevée, plus le temps d'incubation est court. Cependant, les solutions employées sont différentes (tampon phosphate 0,1 N, mélange acétonitrile/acide formique 25 mM, acide chlorhydrique 0,1 M...). L'hydrolyse enzymatique n'est retrouvée dans aucune publication. L'hydrolyse alcaline est également très peu employée car elle n'est pas recommandée pour la recherche des benzodiazépines.

La CL-SM/SM est la technique chromatographique la plus largement retrouvée. Contrairement à la CG-SM, nécessitant un temps d'analyse beaucoup plus long, une étape de « dérivation » et qui est plus consommatrice d'échantillon, et à la CL-SM, très souvent

utilisée pour la recherche d'une ou deux classes pharmacologiques spécifiques, la CL-SM/SM apparaît être la technique la plus sensible et la plus spécifique.
Les xénobiotiques classiquement retrouvés sont ceux appartenant à la classe des stupéfiants (cocaïne, opioïdes et ses dérivés, amphétamines) ainsi qu'aux benzodiazépines et autres psychotropes. Ce sont, en effet, des molécules très largement identifiées dans des situations de mort inexpliquée, ou de soumission chimique. Les antécédents de traitement de la victime ainsi que le contexte du décès et les constatations cliniques sont donc autant d'éléments très utiles pour orienter l'interprétation des résultats en l'absence de prélèvements sanguins et/ou urinaires pouvant éventuellement les confirmer.

Une certaine prudence doit, cependant, avoir lieu concernant l'interprétation des résultats car chaque composé identifié devrait idéalement être ensuite dosé par une méthode spécifique.

V. Etude préliminaire réalisée au Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Limoges

V.1. Objectifs

Après avoir réalisé une revue de la littérature des différentes techniques de « General Unknown Screening » (ou GUS) dans les cheveux, l'objectif de notre travail était de réaliser une étude préliminaire dans le but de définir une procédure comparant trois types d'hydrolyses (hydrolyse acide, hydrolyse basique et hydrolyse dans le méthanol) ainsi que trois techniques chromatographiques (CG-SM, CL-UV/BD et CL-SM/SM) permettant la recherche d'un large éventail de composés dans les cheveux.

L'idée était de tester ces trois types d'hydrolyses et ces trois techniques chromatographiques en analysant des échantillons de cheveux provenant de différentes populations de patients, et en tenant compte des antécédents connus de traitements, du contexte clinique ou médico-légal, ainsi que des résultats obtenus dans d'autres matrices biologiques, afin de définir une procédure générale de GUS la plus sensible et la plus spécifique.

V.2. Plan expérimental

Au Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Limoges, trois techniques chromatographiques de GUS (CG-SM, CL-UV/BD, CL-SM/SM) peuvent être mises en oeuvre dans divers milieux biologiques tels que le sang total, le sérum, le plasma, l'urine, le liquide gastrique, ou dans d'autres matrices biologiques comme des poudres ou des organes.
Afin de pouvoir mettre en place une procédure générale de GUS dans les cheveux suffisamment sensible et spécifique, un plan expérimental listant l'ensemble des étapes à réaliser a été défini.
Dans un premier temps, toutes les étapes concernant la réception du prélèvement capillaire ont été détaillées :

- date du prélèvement
- nombre de mèches
- longueur de la (des) mèche(s) de cheveux
- masse de la (des) mèche(s) de cheveux
- couleur de la (des) mèche(s) de cheveux
- orientation ou non à l'aide d'un lien
- masse totale du (ou des) prélèvement(s) (avec lien) avant lavage
- masse totale du (ou des) prélèvement(s) après lavage et séchage et avant segmentation

Pour chaque échantillon capillaire, l'ensemble de ces informations a été conservé sur une fiche nommée « Fiche de suivi : Prélèvement capillaire » (Annexe I) déjà utilisée au Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Limoges pour les analyses réalisées sur des échantillons de cheveux.

Les étapes de décontamination et d'échantillonnage ont également été décrites :

- nombre de bains de décontamination
- solvants utilisés
- temps de lavage de chaque échantillon capillaire
- séchage

- conservation du prélèvement
- segmentation ou non
- échantillonnage
- masse de prise d'essai nécessaire pour la réalisation des analyses

Les trois types d'extraction et les différents systèmes chromatographiques ont enfin, eux aussi, été définis de façon très précise afin que chaque prélèvement soit traité et analysé de façon identique :

- étape d'hydrolyse : étalons internes utilisés, solvants, durée d'incubation, température du bain
- techniques analytiques : CG-SM, CL-UV/BD, CL-SM/SM

Un diagramme énumérant chaque étape et reprenant l'ensemble de ces informations a été défini (Annexe II).
Afin de pouvoir regrouper et comparer les résultats obtenus, un tableau Excel récapitulant l'ensemble des caractéristiques de chaque prélèvement capillaire étudié (identification de l'échantillon, les commémoratifs, les antécédents de traitements du patient, la date des prélèvements, la couleur des cheveux, la longueur de la (des) mèche(s) en centimètres, la partie du segment analysé et les résultats des différentes techniques chromatographiques) a été établi.

V.3. Méthodologie

V.3.1. Matériels et réactifs

V.3.1.1. Solvants et substances purs

L'étalon interne, la glafénine, a été obtenu auprès de SIGMA.

Le THC-D_3 a été fourni par Promochem.

L'acétonitrile, le n-Heptane pour HPLC et le méthanol, tous de qualité analytique, ont été fournis par Carlo-Erba-Reagent (France).

Le dichlorométhane Normapur, de qualité Chromanorm, a été obtenu auprès de la société VWR (France).

L'acide chlorhydrique concentré R.P. Normapur a été fourni par la société VWR (France).

La pyridine et l'anhydride acétique ont été obtenus auprès d'ALLTECH.

L'acide orthophosphorique 85% minimum, d1, 70, RP Normap, le chlorure d'ammonium RP Normapur et le propanol-2 RP Normapur ont été obtenus auprès de PROLABO.

L'ammoniaque 25% pour analyses a été fournie par MERCK.

L'eau désionisée a été obtenue par utilisation d'un système Millipore Direct-Q3 (Millipore, France).

V.3.1.2. Appareillage

Pour les étapes d'extraction, des cartouches EXTRELUT® NT 1 et NT 3 à usage unique (MERCK) et des cartouches OASIS® HLB 3 cc (WATERS) ont été utilisées.

Pour la CG-SM, la séparation chromatographique a été réalisée par utilisation d'une colonne capillaire PTE 5 (SUPELCO) de longueur 30 m, de diamètre 0,25 mm et d'épaisseur de film 0,25 µm.

Pour la CL-UV/BD, une colonne Nucléosil C_{18} (150 x 4,6mm, d.i. = 5 µm) a été utilisée.
La chromatographie et la détection par CL-SM/SM ont été réalisées à l'aide d'un système chromatographique équipé d'une colonne en acier XTerra® MS C_{18} de 2,1 mm de diamètre, de 100 mm de longueur et ayant une phase stationnaire d'une granulométrie de 3,5 µm.

V.3.2. Caractéristiques des échantillons capillaires

La connaissance de l'historique du patient, de ses antécédents médicaux et du contexte clinique et médico-légal, sont autant d'éléments essentiels à prendre en considération pour choisir nos échantillons témoins.

Dans un premier temps, avant de commencer à élaborer la procédure générale de GUS, la base de données médico-légale interne au Service a été consultée afin de :

- lister l'ensemble des cas médicaux légaux ayant fait l'objet d'une expertise au sein du Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Limoges au cours de l'année 2003. Effectivement, compte tenu de nos procédures internes (conservation post-analytique pendant un délai de 5 ans des scellés, sauf avis contraire du tribunal), les scellés correspondant à ces dossiers étaient promis à la destruction d'ici 2009, et, par conséquent, éventuellement disponibles pour mon travail.
- conserver les cas ayant fait l'objet d'un prélèvement capillaire, susceptibles d'être intéressants à analyser c'est-à-dire avec une notion ou une forte suspicion de consommation chronique et/ou ponctuelle de xénobiotiques et dont les résultats des analyses réalisées sur diverses matrices biologiques telles que le sang, l'urine, le plasma ou encore le liquide gastrique se sont avérés positifs.

Dans un deuxième temps, parmi l'ensemble des cas médico-légaux de l'année 2003 retenus, les échantillons capillaires prélevés ont fait l'objet d'une deuxième sélection en fonction de leur taille et de la masse de la (des) mèche(s) de cheveux disponibles. Ainsi, plusieurs échantillons potentiellement intéressants se sont révélés non exploitables : mèche trop courte ou liée avec du ruban adhésif la rendant inexploitable, ... D'autres prélèvements, réalisés à titre médical au cours des années 2006 et 2007, ont également été retenus comme échantillons témoins selon les mêmes critères. Ainsi, c'est au total les prélèvements capillaires de 12 sujets qui ont été analysés. Leurs principales caractéristiques figurent dans le tableau II.

Tableau II : Principales caractéristiques des échantillons capillaires testés (n = 12)

Identification de l'échantillon (n=12)	Commémoratifs Traitements	Date des prélèvements	Couleur de la mèche de cheveux	Taille de la mèche de cheveux (cm)
RG 1	Cas de soumission chimique, prise connue de fluoxétine de janvier à mai 2007 et venlafaxine au cours de l'année 2006	24/05/2007	Brun	8 cm
RG 2	Contexte inconnu, traitement et composés retrouvés : diazépam, paracétamol, dexchlorphéniramine, sevelamer, carbonate de calcium, héparine calcique, oxacilline, amoxicilline, acide clavulanique, polystyrène sulfonate de sodium, fluindione, furosémide	26/06/2007	Gris-brun	Mèche 1 : 4,5 cm Mèche 2 : 3,5 cm Mèche 3 : 2,5 cm
RG 3	Polytoxicomane depuis « au moins » 1993 ; depuis environ 2000, prise de buprénorphine; en octobre 2003, prise de oxazépam, buprénorphine, zopiclone, miansérine; en mars 2004, prise de buprénorphine, cannabis, amphétamines ; en novembre 2004, prise de buprénorphine; d'avril à juin 2005, prise de oxazépam, buprénorphine, zopiclone, miansérine, olanzapine; d'octobre à novembre 2005, prise de oxazépam, buprénorphine, zopiclone, miansérine; en novembre 2005, prise de clonazépam, lévomépromazine, zopiclone; en février 2006, prise de diazépam	12/04/2007	Brun	3 cm
RG 4	Pendaison, plusieurs tentatives de suicides retrouvées dans ses antécédents, personne éthylique, traitement et composés retrouvés : alprazolam, méprobamate et diverses benzodiazépines	21/04/2006	Brun	3,5 cm

Identification de l'échantillon (n=12)	Commémoratifs Traitements	Date des prélèvements	Couleur de la mèchede cheveux	Taille de la mèche de cheveux (cm)
RG 5	Suicide par chute d'une grande hauteur (40 m), traitement et composés retrouvés : lorazépam, natisédine,loxapine, amitriptyline, zolpidem, etifoxine	14/03/2006	Brun	22 cm environ
RG 6	Suicide, traitement et composés retrouvés : alprazolam, imipramine, clomipramine, desméthylchlomipramine, flunitrazépam, amino-7-flunitrazépam, tramadol, thiocyanates	24/02/2003	Brun	12 cm environ
RG 7	Décès en centre de détention, traitement et composés retrouvés : GHB, nordazépam, oxazépam, alprazolam, zolpidem, cyamémazine, acéprométazine, acide valproïque, paroxétine, mirtazapine, desméthylmirtazapine, hydroxyzine, cétirizine	05/11/2003	Brun	4,5 cm environ
RG 8	Contexte inconnu, traitement et composés retrouvés : GHB, acide 11 nor-9-THC, lévomépromazine, méprobamate, loprazolam, bromazépam, buprénorphine, norbuprénorphine	01/09/2003	Brun	4 cm environ
RG 9	Contexte inconnu, traitement et composés retrouvés : arsenic, acide valproïque, GHB, nordazépam, tramadol, cyamémazine, fluvoxamine, venlafaxine, toluène, acide hippurique	18/01/2003	Non relevé	Non relevé
RG 10	Contexte inconnu, traitement et composés retrouvés : lithium, GHB, nordazépam, oxazépam, méprobamate, trihéxyphénidyle, venlafaxine	15/12/2003	Non relevé	Non relevé

Identification de l'échantillon (n=12)	Commémoratifs Traitements	Date des prélèvements	Couleur de la mèche de cheveux	Taille de la mèche de cheveux (cm)
RG 11	Exposition à des fumées d'incendies, traitement et composés retrouvés : lorazépam, morphine, méthylmorphine, paracétamol, quinine, paroxétine	Non retrouvée	Blanc-Châtain clair	14 cm
RG 12	Décès sur la voie publique, composés retrouvés : GHB, Delta-9-tétrahydrocannabinol, acide 11 nor THC, 11-hydroxy -THC, MDMA, MDA	04/11/2003	Noire	3 cm

V.3.3. Procédure de décontamination

La décontamination des mèches de cheveux a été effectuée en quatre étapes successives dans des tubes à fond rond de 15 mL de diamètre 19 mm :

- 1er bain dans 5 à 10 mL d'eau à température ambiante (en fonction de la longueur de la mèche de cheveux) pendant 1 minute
- 2ème bain dans 5 à 10 mL de dichlorométhane à température ambiante (en fonction de la longueur de la mèche de cheveux) pendant 1 minute
- 3ème bain de nouveau dans 5 à 10 mL d'eau à température ambiante (en fonction de la longueur de la mèche de cheveux) pendant 1 minute
- 4ème bain dans 5 à 10 mL de dichlorométhane à température ambiante (en fonction de la longueur de la mèche de cheveux) pendant 1 minute

Toutes ces étapes sont nécessaires de façon à éliminer toutes substances hydrophiles et lipophiles présentes à la surface des échantillons. Un séchage des prélèvements capillaires entre deux feuilles de papier filtre courant a été réalisé après chaque étape de rinçage.

Le dernier bain de lavage de dichlorométhane a été transféré dans un tube à fond conique de 10 mL puis évaporé à sec. L'extrait sec a été conservé dans une chambre de congélation après y avoir inscrit l'identification de l'échantillon et la masse de la mèche de cheveux.

V.3.4. Segmentation, pesée, échantillonnage

En fonction du nombre de mèches de cheveux disponibles, de leur longueur et des commémoratifs, une étape de segmentation préalable à l'échantillonnage a été effectuée pour trois échantillons (RG 1, RG 6 et RG 11).

Pour ce faire, chaque mèche de cheveu a été enroulée dans une feuille de papier aluminium en veillant à bien renseigner le côté de la cordelette qui indique la racine du cheveu, pour ne pas perdre l'orientation de la mèche. Puis, la segmentation a été réalisée à l'aide d'une paire de ciseaux et d'une règle.
Pour RG 1, la mèche de cheveu a été découpée en trois segments (premier segment de 1 à 3 cm, deuxième segment de 3 à 5 cm et troisième segment de 5 à 8 cm, de la racine à la pointe de la mèche).
Pour l'échantillon RG 6, les analyses ont été réalisées uniquement sur les 5 premiers centimètres de la mèche de cheveu.
Pour l'échantillon RG 11, les analyses ont été effectuées sur les 3 premiers centimètres de la mèche.

Tous les autres prélèvements ont été analysés dans leur globalité. Ces échantillons ont également été placés dans une feuille de papier aluminium pour faciliter la fragmentation.

Puis, chaque segment ou chaque mèche de cheveux a été finement coupé à l'aide de ciseaux en petits morceaux d'une longueur d'environ 1 mm et placés dans des tubes à fond rond de 15 mL préalablement tarés afin de connaître la masse exacte de cheveux découpés. Les tickets de pesée ont été imprimés et collés sur la « Fiche de suivi : Prélèvement capillaire » (Annexe I).

Trois échantillonnages de 20 mg de cheveux chacun ainsi coupés ont été nécessaires pour réaliser les analyses soit, au total, une prise d'essai d'une masse de 60 mg de cheveux pour chaque prélèvement après lavage, séchage et fragmentation.

Les échantillons de cheveux ont été stockés dans un endroit sec et à l'abri de la lumière.

V.3.5. Hydrolyse des échantillons capillaires

Cette étude préliminaire visant à définir une procédure générale de GUS dans les cheveux, trois types d'hydrolyses dans trois milieux différents ont été comparées :

- une hydrolyse dans le méthanol
- une hydrolyse en milieu basique
- une hydrolyse en milieu acide

Les étalons internes utilisés ont été différents suivant les techniques chromatographiques réalisées. La glafénine à 10 mg/L dans le méthanol a été choisie pour les analyses par CL-UV/BD et par CL-SM/SM alors que le THC-D_3 à 100 mg/L dans le méthanol a été utilisé pour les analyses par CG-SM.

Ainsi, pour l'hydrolyse méthanolique, 1 mL de méthanol, 50 µL de la solution de THC-D_3 100 mg/L et 200 µL de la solution de glafénine 10 mg/L ont été ajoutés au premier échantillonnage.
Pour l'hydrolyse en milieu basique, 4 mL de tampon phosphate 0,05 M (pH 7,6), 50 µL de la solution de THC-D_3 100 mg/L et 200 µL de la solution de glafénine 10 mg/L ont été ajoutés au deuxième échantillonnage.
Enfin, pour l'hydrolyse en milieu acide, 4 mL d'un mélange méthanol/eau, 50/50, v/v et d'acide chlorhydrique 0,5 M (pH 3), 50 µL de la solution de THC-D_3 100 mg/L et 200 µL de la solution de glafénine 10 mg/L ont été ajoutés au troisième échantillonnage.

Les trois mélanges obtenus ont alors été vortexés et déposés dans un bain à 40°C pendant une période de 18 heures.
Après cette période d'incubation, le mélange en milieu acide a été neutralisé avec 25 µL d'hydroxyde de sodium 0,1 M.

Puis, chaque mélange a été centrifugé pendant 10 minutes à 3000 tr/min.

V.3.6. Systèmes chromatographiques et conditions analytiques

Trois techniques chromatographiques ont été comparées : la CG-SM, CL-UV/BD et la CL-SM/SM. .

V.3.6.1. Screening par CG-SM

V.3.6.1.1. Méthodes d'hydrolyse et d'extraction

Un screening acétylé et un non acétylé ont été réalisés pour chacun des trois types d'hydrolyses.

Pour l'hydrolyse méthanolique, après centrifugation pendant 10 minutes à 3000 tr/min, 300 µL de surnageant ont été récupérés et évaporés à sec sous flux d'azote à 40°C pendant 15 minutes au moyen d'un système Turbovap® (Zymark, France). Le résidu a ensuite été repris par 50 µL de méthanol. 1 µL a alors été injecté dans le système chromatographique.
Pour réaliser l'acétylation, 40 µL de pyridine et 60 µL d'anhydride acétique ont été incorporés au résidu sec, le mélange a été chauffé pendant 30 minutes puis de nouveau évaporé à sec. Le résidu a alors été repris par 50 µL de méthanol et 1 µL a été injecté dans le système chromatographique.
Pour les hydrolyses en milieux alcalin et acide, 2 mL de surnageant ont été récupérés car une étape d'extraction supplémentaire liquide-solide (en milieux alcalin et acide), non présente pour l'hydrolyse dans le méthanol, est nécessaire. Pour ce faire, 1 mL de surnageant a été introduit, d'une part, dans un premier tube à hémolyse de 10 mL dans lequel a également été incorporé 1 mL de tampon carbonate pH 9,7 pour l'extraction en milieu alcalin. D'autre part, dans un deuxième tube à hémolyse de 10 mL, 1 mL de surnageant et 1 mL d'acide chlorhydrique 0,1 N ont été introduits pour l'extraction en milieu acide. Les deux tubes à hémolyse ont été vortexés pendant 10 secondes puis le contenu de chaque tube a été déposé à la surface d'une cartouche EXTRELUT® NT 3. Après 10 minutes d'imprégnation, chaque cartouche a ensuite été éluée par 10 mL de dichlorométhane et les éluats ont été recueillis

dans des tubes à fond coniques de 10 mL. L'éluat basique et l'éluat acide ont alors été évaporés à moitié sous courant d'azote puis mélangés dans un seul tube. Ce mélange a, de nouveau, été séparé en deux afin de permettre l'acétylation, chaque tube a ensuite été évaporé à sec. 40 µL de pyridine et 60 µL d'anhydride acétique ont été incorporés au résidu sec d'un des deux tubes pour réaliser l'acétylation puis ce tube a été chauffé pendant 30 minutes avant d'être de nouveau évaporé à sec et repris par 50 µL de méthanol. Le résidu sec du tube n'ayant pas été acétylé a également été repris par 50 µL de méthanol. 1 µL a été injecté dans le système chromatographique.

V.3.6.1.2. Méthode chromatographique

Le système chromatographique utilisé est composé (Figure 14) :

- d'un chromatographe en phase gazeuse
- d'un spectromètre de masse avec ionisation par Impact Electronique (IE) et détection par Courant Ionique Total (TIC)

Figure 14 : Système de chromatographie en phase gazeuse couplé au spectromètre de masse utilisé pour le screening dans les cheveux.

La séparation est réalisée à l'aide d'une colonne capillaire PTE 5 (SUPELCO) de longueur 30 m, de diamètre 0,25 mm et d'épaisseur de film 0,25 µm.

V.3.6.1.3. Méthode de recherche

L'identification des composés a été réalisée par comparaison des temps de rétention relatifs, lorsqu'ils sont connus, à savoir le temps de rétention de la molécule identifiée rapporté à celui de l'étalon interne utilisé pour sa quantification, et des spectres de masse des composés éventuellement trouvés avec les données correspondantes mises en mémoire dans la bibliothèque du système informatique ou publiées dans la littérature.

Les différentes bibliothèques mises à disposition pour l'identification des composés étaient CRIBLIM., PMW-TOX2 (ou 3), WILEY 7N ou NIST147.

Les résultats obtenus pour chaque type d'hydrolyse, sont reportés dans le tableau III.

V.3.6.2. Screening par CL-UV/BD

V.3.6.2.1. Méthodes d'hydrolyse et d'extraction

Pour l'hydrolyse méthanolique, après la centrifugation pendant 10 minutes à 3000 tr/min, 300 µL de surnageant ont été récupérés et évaporés à sec sous flux d'azote à 40°C pendant 15 minutes au moyen d'un système Turbovap® (Zymark, France). Le résidu a ensuite été repris par 100 µL d'un mélange de 30% d'acétonitrile et de 70% de tampon pH 2,6. 40 µL ont alors été injectés dans le système chromatographique.

Pour les hydrolyses en milieux alcalin et acide, 450 µL de surnageant ont été récupérés et mélangés, dans un tube à hémolyse de 5 mL, à 450 µL de tampon (NH_4Cl saturé/Eau désionisée – 30/70 v/v) ajusté à pH 9,50 avec une solution de NH_4OH 25%. Les mélanges ont été déposés à la surface de colonnes EXTRELUT® NT 1, munies d'une aiguille. Puis, après 10 minutes d'imprégnation, l'élution a été réalisée avec 5 mL de solvant d'extraction CH_3Cl/propanol-2/n-Heptane (60/14/26, v/v/v). Les éluats ont ensuite été évaporés à sec sous courant d'azote à 40°C. Les résidus secs ont été repris par 100 µL de solvant de reprise : mélange de (tampon phosphate 0,025 M ajusté à pH 2,6 avec de l'H_3PO_4 et CH_3CN/H_2O (90/10, v/v)) (70/30, v/v) et vortexés. 40 µL ont été injectés dans le système chromatographique.

V.3.6.2.2. Méthode chromatographique

Le système chromatographique par CL-UV/BD est composé (Figure 15) :

- d'un chromatographe en phase liquide à haute performance à polarité de phases inversées
- d'un détecteur par spectrophotométrie ultraviolet à barrette de diodes

Figure 15 : Système de chromatographie en phase liquide couplé à un détecteur par spectrophotométrie UV à barrette de diodes utilisé pour le screening dans les cheveux.

La séparation est réalisée à l'aide d'une colonne Nucléosil C_{18} (150 x 4,6 mm x d.i. = 5µm) et avec un débit de phase mobile de 1,3 mL/min.

La phase mobile est constituée de tampon phosphate 0,025 M ajusté à pH 2,60 avec de l'H_3PO_4 (phase A) et d'un mélange CH_3CN/H_2O (90/10, v/v) (phase B). Le gradient de la phase mobile est présenté dans le tableau IV.

Tableau IV : Gradient de la phase mobile

Temps (minutes)	% Phase A	% Phase B
0	85	15
2	85	15
42	25	75
45	10	90
48	10	90
50	85	15

V.3.6.2.3. Méthode de recherche

L'identification des composés a été réalisée en comparant les données obtenues (spectres ultraviolets de 200 à 400 nm, temps de rétention) avec des données correspondantes de 863 produits, présentes dans les spectrothèques TOX 1, 2, 3 et 4.

Les résultats obtenus pour chaque type d'hydrolyse sont reportés dans le tableau III.

V.3.6.3. Screening par CL-SM/SM

V.3.6.3.1. Méthodes d'hydrolyse et d'extraction

Pour l'hydrolyse méthanolique, après centrifugation pendant 10 minutes à 3000 tr/min, 300 µL de surnageant ont été récupérés et évaporés à sec sous flux d'azote à 40°C pendant 15 minutes au moyen d'un système Turbovap® (Zymark, France). Le résidu a ensuite été repris par 50 µL d'un mélange de tampon formiate d'ammonium 0,002M pH 3 / acétonitrile 70/30, v/v. 20 µL ont alors été injectés dans le système chromatographique.
Pour les hydrolyses en milieux alcalin et acide, une étape d'extraction est nécessaire. Des cartouches OASIS® HLB 3 cc ont été conditionnées avec 2 mL de méthanol puis avec 2 mL d'eau purifiée. 1 mL de chaque surnageant a été récupéré et déposé à la surface de chaque cartouche. Puis, les cartouches ont été lavées par 3 mL d'eau purifiée avant d'être séchées sous vide pendant 15 minutes. L'élution a été réalisée avec 3 mL d'un mélange (dichlorométhane/propanol-2 (75/25, v/v) et d'acide formique 99%) (98/2, v/v) puis les éluats ont été évaporés à 40°C sous vide sous faible courant d'azote. Les extraits secs ont ensuite été repris par 100 µL d'un mélange acétonitrile/Tampon formiate 10 mmol/L pH 3,0 (30/70, v/v). 20 µL ont été injectés dans le système chromatographique.

V.3.6.3.2. Méthode chromatographique

Le système chromatographique par CL-SM/SM est composé (Figure 16)

- d'un chromatographe en phase liquide à haute performance et de deux pompes haute pression
- d'un spectromètre de masse en tandem hybride triple quadrupôle/trappe d'ion linéaire pouvant fonctionner en mode IDA (Acquisition Dépendante de l'Information) dans lequel deux conditions d'acquisition sont appliquées en alternance.

Figure 16 : Système de chromatographie en phase liquide couplé à un spectromètre de masse en tandem utilisé pour le screening dans les cheveux.

Dans un premier temps, un « survey scan » est obtenu en mode EMS « Enhanced Mass Spectrometry ». Lors de cette opération, le spectromètre de masse fonctionne en mode « full scan », c'est-à-dire qu'en permanence est réalisé un balayage des masses entre 100 et 1100 uma avec une vitesse de balayage de 4000 uma/s. Les ions détectés comme étant les plus intenses à un instant t sont alors concentrés dans la trappe. La deuxième étape correspond à l'étape de l'IDA. Les ions détectés comme étant les plus intenses lors de la 1ère étape sont sélectionnés. Toutefois, certains paramètres peuvent être définis lors de cette étape. Certains ions peuvent être exclus après un certain nombre de sélections consécutives et pendant un temps prédéfini. Grâce à cette opération, certaines molécules présentant des temps de rétention voisins peuvent être différenciées, même lorsqu'elles ne sont pas présentes aux mêmes concentrations (un pic pouvant masquer l'autre). La troisième étape correspond au mode EPI (Enhanced Product Ion Scan). Il s'agit du « dependant scan ». Lors de cette étape, les ions sélectionnés lors de l'étape de l'IDA sont fragmentés dans la cellule de collision. A tout ion sélectionné sont ainsi appliquées trois énergies de collision (une faible (15 V), une moyenne (40 V) et une plus élevée (65 V)). Les fragments sont ensuite recherchés par balayage entre 50 et 1100 uma avec une vitesse de balayage de 4000 uma/s. Les spectres de

fragmentation obtenus à ces trois énergies de collision sont ensuite sommés et permettent d'obtenir le « spectre EPI » de l'ion sélectionné.
L'ensemble de ce cycle dure 1,36 s.

La séparation est réalisée à un débit de phase mobile de 200 µL/min. La phase mobile est constituée de tampon formiate 0,5 mmol/L pH 3,0 (phase A) et d'un mélange acétonitrile/tampon formiate 10 mmol/L pH 3,0 (90/10, v/v) (phase B). Le gradient de la phase mobile est présenté dans le tableau V.

Tableau V : Gradient de la phase mobile

Temps (minutes)	% Phase A	% Phase B
- 5,0	97	3
2,5	97	3
21,5	10	90
23,0	10	90
23,5	97	3
25	97	3
30	97	3

V.3.6.3.3. Méthode de recherche

L'acquisition peut successivement être réalisée en mode positif et en mode négatif.
Chaque composé peut être caractérisé par son temps de rétention relatif (temps de rétention de la molécule par rapport à celui de l'étalon interne) et son spectre EPI. Une bibliothèque incluant plus de 1000 composés a été élaborée dans le Laboratoire après injection des substances pures à 10 mg/L dans le méthanol.
L'identification des molécules est ainsi réalisée par comparaison entre les spectres EPI des composés inconnus observés lors de l'acquisition et ceux entrés dans la bibliothèque de spectres. Trois facteurs inhérents au logiciel de recherche Analyst sont utilisés lors de la comparaison entre les spectres (fit, reverse fit et purity). Ces paramètres évaluent les

corrélations entre les deux spectres comparés et plus les valeurs obtenues sont proches de 100 %, plus le spectre inconnu correspond à celui sélectionné par la bibliothèque.

Les résultats obtenus pour chaque type d'hydrolyse sont reportés dans le tableau III.

V.4. Résultats

Après identification de chaque pic par comparaison des spectres obtenus avec ceux enregistrés dans des bibliothèques de spectres, le calcul de chaque aire a été réalisé permettant ainsi de comparer par technique chromatographique et suivant le type d'hydrolyse utilisé, l'ensemble des résultats obtenus.

Les résultats préliminaires de notre étude, pour chaque type d'hydrolyse et pour chacune des trois techniques chromatographiques, sont regroupés dans le tableau III.

Tableau III : Résultats préliminaires, obtenus selon trois types d'hydrolyses (Hydrolyse 1 : méthanol ; Hydrolyse 2 : à pH 7,6 ; Hydrolyse 3 : à pH 3) par CG-SM, CL-UV/BD et CL-SM/SM, exprimés par le calcul des aires ([A] : Acétylé, [NA] : Non Acétylé)

Identification de l'échantillon	Segment analysé	Résultats	Hydrolyse 1 : méthanol	Hydrolyse 2 : pH 7,6	Hydrolyse 3 : pH 3
RG 1	1-3 cm	CG-SM	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé
		CL-UV/BD	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé
		CL-SM/SM	Métabolite de la venlafaxine : Aire = 4,2e6 cps	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé
	3-5 cm	CG-SM	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé
		CL-UV/BD	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé
		CL-SM/SM	Aucun composé retrouvé	Métabolite de la venlafaxine : Aire = 3,9e6 cps	Aucun composé retrouvé
	5-8 cm	CG-SM	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé
		CL-UV/BD	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé
		CL-SM/SM	Volume de l'hydrolysat obtenu insuffisant	Aucun composé retrouvé	Venlafaxine : Aire = 2,3e7 cps
RG 2	Global (Réunion des 3 mèches)	CG-SM	Paracétamol : Aire = 4,5e7 (A) et 1,2e7 (NA)	Paracétamol : Aire = 9,7e35 (A) et bruit de fond (NA)	Paracétamol : Aire = bruit de fond
		CL-UV/BD	Paracétamol : Aire = $1,0.10^5$	Paracétamol : Aire = $9,8.10^4$	Paracétamol : Aire = $1,4.10^5$
		CL-SM/SM	Paracétamol : Aire = 3,9e7 cps	Paracétamol : Aire = 2,7e7 cps	Paracétamol : Aire = 2,9e5 cps

Identification de l'échantillon	Segment analysé	Résultats	Hydrolyse 1 : méthanol	Hydrolyse 2 : pH 7,6	Hydrolyse 3 : pH 3
RG 3	Global	CG-SM	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé
		CL-UV/BD	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé
		CL-SM/SM	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé
RG 4	Global	CG-SM	Citalopram : Aire = bruit de fond	Citalopram : Aire = bruit de fond	Citalopram : Aire = bruit de fond
		CL-UV/BD	Citalopram : Aire = $1,4.10^4$	Citalopram : Aire = $1,6.10^4$	Citalopram : Aire = $1,3.10^4$
		CL-SM/SM	Citalopram : Aire = 1,2e8 cps Desméthyl citalopram : Aire = 1,4e7 cps	Citalopram : Aire = 2,6e8 cps Desméthyl citalopram : Aire = 3,0e7 cps	Citalopram : Aire = 2,9e8 cps Desméthyl citalopram : Aire = 4,0e7 cps
RG 5	Global	CG-SM	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé
		CL-UV/BD	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé
		CL-SM/SM	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé

Identification de l'échantillon	Segment analysé	Résultats	Hydrolyse 1 : méthanol	Hydrolyse 2 : pH 7,6	Hydrolyse 3 : pH 3
RG 6	Analyse sur les 5 premiers cm	CG-SM	Clomipramine : Aire = bruit de fond (A) Desméthyl clomipramine : Aire = bruit de fond (A)	Tramadol : Aire = bruit de fond (A)	Clomipramine : Aire = bruit de fond (A) et (NA) Desméthyl clomipramine : Aire = bruit de fond (A)
		CL-UV/BD	Clomipramine : Aire = $2,8.10^4$	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé
		CL-SM/SM	Alimémazine : Aire = 3,6e7 cps Métabolite 1 alimémazine : Aire= 1,2e7 cps Métabolite 2 alimémazine : Aire= 3,3e7 cps Clomipramine : Aire = 5,3e7 cps Métabolite clomipramine : Aire = 3,3e7 cps Desméthyl clomipramine : Aire = 5,5e7 cps Tramadol : Aire = 4,6e7 cps Métabolite tramadol : Aire = 4,2e7 cps	Métabolite 1 alimémazine : Aire= 1,3e7 cps Métabolite 2 alimémazine : Aire= 4,6e7 cps Métabolite tramadol : Aire = 2,3e7 cps	Alimémazine : Aire = 3,0e7 cps Métabolite alimémazine : Aire= 2,0e7 cps Clomipramine : Aire = 4,3e7 cps Métabolite clomipramine : Aire = 2,1e7 cps Desméthyl clomipramine : Aire = 5,5e7 cps Métabolite tramadol : Aire = 2,2e7 cps

Identification de l'échantillon	Segment analysé	Résultats	Hydrolyse 1 : méthanol	Hydrolyse 2 : pH 7,6	Hydrolyse 3 : pH 3
RG 7	Global	CG-SM	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé
		CL-UV/BD	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé
		CL-SM/SM	Cyamémazine : Aire = 1,2e7 cps Métabolite cyamémazine : Aire = 1,3e7 cps Alimémazine : Aire = 3,3e7 cps Paroxétine : Aire = 3,5e7 cp Maprotiline : Aire = 1,9e7 cps	Aucun composé retrouvé	Alimémazine : Aire = 1,2e7 cps Paroxétine : Aire = 1,5e7 cps
RG 8	Global	CG-SM	Méprobamate : Artéfact (A) Lévomépromazine : Aire = bruit de fond (A) et (NA)	Lidocaïne : Aire = bruit de fond (A)	Aucun composé retrouvé
		CL-UV/BD	Diclofénac : Aire = $6,7.10^4$	Diclofénac : Aire = $1,9.10^4$	Diclofénac : Aire = $3,2.10^4$

Identification de l'échantillon	Segment analysé	Résultats	Hydrolyse 1 : méthanol	Hydrolyse 2 : pH 7,6	Hydrolyse 3 : pH 3
RG 8	Global	CL-SM/SM	Cyamémazine : Aire = 2,6e7 cps Métabolite 1 cyamémazine : Aire = 4,7e7 cps Métabolite 2 cyamémazine : Aire = 1,3e7 cps Lévomépromazine : Aire = 1,1e7 cps Métabolite 1 lévomépromazine : Aire = 1,1e8 cps Métabolite 2 lévomépromazine : Aire = 1,0e8 cps Halopéridol : Aire = 1,4e7 cps Métabolite halopéridol : Aire : 1,2e7 cps Méprobamate : Aire = 4,0e7 cps	Métabolite cyamémazine : Aire = 3,5e7 cps Métabolite 1 lévomépromazine : Aire = 5,1e7 cps Métabolite 2 lévomépromazine : Aire = 9,2e7 cps Méprobamate : Aire = 2,4e7 cps	Cyamémazine : Aire = 8,2e6 cps Métabolite cyamémazine : Aire = 1,4e7 cps Métabolite 1 lévomépromazine : Aire = 4,7e7 cps Métabolite 2 lévomépromazine : Aire = 6,9e7 cps Métabolite halopéridol : Aire : 4,9e6 cps Méprobamate : Aire = 2,4e7 cps

Identification de l'échantillon	Segment analysé	Résultats	Hydrolyse 1 : méthanol	Hydrolyse 2 : pH 7,6	Hydrolyse 3 : pH 3
RG 9	Global	CG-SM	Pipéranyl butoxide : Aire = 3,8e7 (A) et 4,0e7 (NA) Permethrin : Aire = bruit de fond (A) et 3,4e6 (NA) Clomipramine : Aire = bruit de fond (NA)	Pipéranyl butoxide Aire = 1,2e7 (A) et 1,0e7 (NA)	Pipéranyl butoxide : Aire = 3,5e7 (A) et 3,0e7 (NA) Permethrin : Aire = bruit de fond (A) et (NA)
		CL-UV/BD	Nordazépam : Aire = $2,9.10^4$	Nordazépam : Aire = $8,6.10^3$	Nordazépam : Aire = $1,9.10^4$
		CL-SM/SM	Hydroxyzine : Aire : 8,3e7 cps	Hydroxyzine : ?	Hydroxyzine : Aire : 9,3e6 cps
RG 10	Global	CG-SM	Méprobamate : Bruit de fond (A) et 4,1e6 (NA) Venlafaxine : Aire = 5,1e6 (A) et 7,6e6 (NA) Tramadol : Bruit de fond (A) Norvenlafaxine : Aire = 1,9e6 (NA)	Venlafaxine : Aire = 1,9e6 (A) et 7,0e6 (NA)	Venlafaxine : Bruit de fond (A) et Aire = 6,6e6 (NA)

Identification de l'échantillon	Segment analysé	Résultats	Hydrolyse 1 : méthanol	Hydrolyse 2 : pH 7,6	Hydrolyse 3 : pH 3
RG 10	Global	CL-UV/BD	Paracétamol ; Aire = $4,1.10^4$ Nordazépam : Aire : $2,9.10^5$ Diclofénac : Aire = $3,0.10^4$	Paracétamol : Aire = $1,3.10^4$ Nordazépam : Aire = $1,1.10^5$ Diclofénac : Aire = $1,3.10^4$	Paracétamol : Aire = $1,1.10^4$ Nordazépam : Aire : $1,3.10^5$ Diclofénac : Aire = $1,2.10^4$
		CL-SM/SM	Venlafaxine : Aire = 2,8e8 cps Métabolite 1 venlafaxine : Aire = 7,5e7 cps Métabolite 2 venlafaxine : Aire = 3,9e7 cps Méprobamate : Aire = 5.6e7 cps Métabolite acéprométazine : Aire = 1,3e7 cps Carbamazépine : Aire = 6,1e6 cps Nordazépam : Aire = 3,0e7 cps	Venlafaxine : Aire = 2,2e8 cps Métabolite 1 venlafaxine : Aire = 5,4e7 cps Métabolite 2 venlafaxine : Aire = 3,4e7 cps Méprobamate : Aire = 4,0e7 cps Métabolite acéprométazine : Aire = 2,9e6 cps Carbamazépine : Aire = 5,4e6 cps Nordazépam : Aire = 2,0e7 cps	Venlafaxine : Aire = 2,5e8 cps Métabolite 1 venlafaxine : Aire = 4,9e7 cps Métabolite 2 venlafaxine : Aire = 2,3e7 cps Méprobamate : Aire = 4,0e7 cps Métabolite acéprométazine : Aire = 4,3e6 cps Carbamazépine : Aire = 4,9e6 cps Nordazépam : Aire = 2,2e7 cps

Identification de l'échantillon	Segment analysé	Résultats	Hydrolyse 1 : méthanol	Hydrolyse 2 : pH 7,6	Hydrolyse 3 : pH 3
RG 11	Analyse sur les 3 premiers cm	CG-SM	Paracétamol : Aire = 2,4e6 (A) et 4,5e6 (NA) Acetaminophen acétate : Aire = 6,4e6 (A) Tramadol : Aire = 2,0e6 (A) et 3,4e6 (NA) Quinine : Aire = 1,4e6 (A)	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé
		CL-UV/BD	Paracétamol : Aire = $3,0.10^5$	Paracétamol : Aire = $8,3.10^4$	Paracétamol : Aire = $9,4.10^4$ Tramadol : Aire = $1,9.10^4$
		CL-SM/SM	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé
RG 12	Global	CG-SM	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé
		CL-UV/BD	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé
		CL-SM/SM	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé	Aucun composé retrouvé

V.4.1. Difficultés rencontrées

Ce travail étant une étude préliminaire, de nombreuses difficultés ont été initialement rencontrées lors de l'établissement du plan expérimental, tant sur la sélection des échantillons témoins que lors de la réalisation des analyses. La consultation de la base de données interne au Service pour la sélection des cas ayant fait l'objet d'une expertise médico-légale au Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Limoges et susceptibles d'être intéressants à analyser a permis de faire une première sélection. En effet, pour certains cas, la description des commémoratifs, des antécédents médicaux et des résultats sur d'autres milieux biologiques n'étaient pas suffisamment explicite et détaillée pour être retenue. Seules quelques données très succinctes décrivant les faits étaient expliquées. Or, pour cette étude comparant trois types d'hydrolyses (méthanolique, en milieu acide et en milieu alcalin) et trois techniques chromatographiques (CG-SM, CL-UV/BD et CL-SM/SM), plus les informations disponibles au départ étaient importantes, plus l'interprétation des résultats (composés retrouvés ou non) était facilitée.

De plus, au cours de la sélection des différents prélèvements capillaires, de nombreux échantillons n'ont pas pu être retenus. En effet, une prise d'essai d'une masse de 60 mg de cheveux au total était nécessaire. La masse totale de nombreuses mèches était parfois trop faible et certains prélèvements étaient par conséquent inexploitables. L'orientation à l'aide d'une cordelette n'était pas toujours respectée et certaines mèches de cheveux étaient trop courtes ou fixées avec un ruban adhésif rendant impossible leur segmentation.

Au cours de l'étape de décontamination, certains prélèvements capillaires ont également du être écartés car la masse totale de cheveux, à la suite des différents bains de lavage, n'était plus suffisamment importante pour réaliser trois échantillonnages de 20 mg chacun.

Par manque de temps, le dernier bain de lavage de dichlorométhane n'a pas été analysé. Cette analyse aurait été intéressante à prendre en compte afin d'apprécier les résultats en fonction du risque de contamination externe. En effet, le but de cette étape de nettoyage vise à éliminer des cheveux tout apport passif exogène potentiel d'autres xénobiotiques qui augmentent le

bruit analytique, réduisent la sensibilité et peuvent être à l'origine de résultats « faussement positifs ».

Le choix des étalons internes a été également une étape délicate à mettre en place car il a fallu trouver des étalons internes suffisamment concentrés et détectables à la fois dans le méthanol, à pH acide et à pH alcalin par chaque technique chromatographique (CG-SM, CL-UV/BD et CL-SM/SM). Plusieurs essais ont ainsi du être réalisés préalablement à la rédaction du plan expérimental et le choix s'est porté non pas sur un étalon interne commun mais sur deux étalons internes : la glafénine pour la CL-UV/BD et la CL-SM/SM et le THC-D_3 pour les analyses par CG-SM.

Des erreurs de manipulations sont enfin survenues lors de la préparation de certains échantillons. Cela a été le cas par exemple, pour l'échantillon RG 1, dans lequel du 11-nor-THC a été ajouté à la place du THC-D_3 pour les segments 3-5 cm et 5-8 cm. Le THC-D_3 a été ajouté une fois l'erreur constatée. Cette raison peut expliquer le peu de composés identifiés pour cet échantillon.

Enfin, certaines analyses n'ont pas pu être réalisées en raison d'un manque de volume de l'hydrolysat obtenu. C'est le cas, par exemple, de l'analyse par CL-SM/SM du segment 5-8 cm de l'échantillon RG 1 par exemple.

V.5. Discussion

D'après l'ensemble des résultats obtenus, le nombre de sujets testés est clairement insuffisant pour établir une procédure validée de screening dans les cheveux.
Toutefois, concernant les résultats obtenus et les aires des différents composés retrouvés pour l'ensemble des échantillons testés, c'est l'hydrolyse dans le méthanol et l'analyse par CL-SM/SM en GUS qui s'avère être la procédure la plus appropriée (Tableau VI).

Tableau VI : Nombre total et pourcentage respectif de composés retrouvés suivant la technique d'hydrolyse et la méthode de dosage

	Hydrolyse dans le méthanol	**Hydrolyse en milieu basique**	**Hydrolyse en milieu acide**
CG-SM	11 composés retrouvés (34,4 %)	6 composés retrouvés (18,8 %)	6 composés retrouvés (18,8 %)
CL-UV/BD	5 composés retrouvés (15,6 %)	4 composés retrouvés (12,5 %)	5 composés retrouvés (15,6 %)
CL-SM/SM	**16 composés retrouvés (50 %)**	11 composés retrouvés (34,4 %)	15 composés retrouvés (46,9 %)

Au total, 32 composés ont été retrouvés par l'ensemble des trois types d'hydrolyses et par les trois techniques chromatographiques (les molécules mères et leurs métabolites ont été comptabilisés comme 1 composé) :

- Aucun composé retrouvé pour les échantillons RG 3, RG 5 et RG 12
- 1 composé retrouvé pour les échantillons RG 1, RG 2 et RG 4
- 3 composés retrouvés pour les échantillons RG 6 et RG 11
- 4 composés retrouvés pour l'échantillon RG 7
- 5 composés retrouvés pour l'échantillon RG 9

- 6 composés retrouvés pour l'échantillon RG 8
- 8 composés retrouvés pour l'échantillon RG 10

Au vu des résultats obtenus, la CL-SM/SM avec hydrolyse méthanolique semble être la procédure permettant d'identifier le plus grand nombre de molécules soit 16 composés tous les échantillons confondus (50 % des 32 molécules identifiées).

Concernant les aires des différentes molécules, plus la surface se situant sous le pic chromatographique est importante, plus le signal observé est intense et donc meilleure est l'identification de la molécule. La comparaison peut donc se faire suivant le type d'hydrolyse, mais uniquement pour une même technique chromatographique. En aucun cas, la comparaison ne peut s'effectuer entre différentes techniques chromatographiques. Les résultats préliminaires obtenus indiquent également que la CL-SM/SM avec une hydrolyse dans le méthanol semble être la procédure la plus appropriée. En effet, le signal observé est plus intense pour les composés retrouvés par CL-SM/SM avec une hydrolyse dans le méthanol que pour ceux obtenus avec les deux autres types d'hydrolyse. Par exemple, pour l'échantillon RG 6, l'aire du métabolite du tramadol identifié par CL-SM/SM avec une hydrolyse méthanolique est de 4,2e7 cps alors qu'elle est seulement de 2,3e7 cps avec une hydrolyse en milieu alcalin et de 2,2e7 cps avec une hydrolyse en milieu acide. C'est également le cas pour l'échantillon RG 10 avec la venlafaxine, les métabolites 1 et 2 de la venlafaxine, soit respectivement le O-déméthyl-venlafaxine et le n-oxyde-venlafaxine, le méprobamate, le métabolite de l'acéprométazine, la carbamazépine ou encore le nordazépam.

L'avantage de l'hydrolyse dans le méthanol est l'absence d'étape d'extraction, indispensable pour les hydrolyses réalisées à pH acide et à pH alcalin, permettant ainsi un gain de temps considérable sur les analyses et la mise à disposition des résultats.
Ces résultats doivent cependant être nuancés. Pour certains échantillons, des molécules ont été identifiées uniquement par CG-SM et CL-UV/BD. C'est le cas par exemple, du prélèvement RG 11 pour lequel aucun composé n'a été identifié par CL-SM/SM quel que soit le type d'hydrolyse utilisé.

D'un point de vue général, parmi les différentes classes thérapeutiques retrouvées, les neuroleptiques sont mieux identifiés par CL-SM/SM et les benzodiazépines par CL-UV/BD. En revanche, les stupéfiants sont des molécules très difficilement identifiables par ces

screenings larges, quels que soient le type d'hydrolyse et la technique chromatographique utilisés. C'est le cas, par exemple, pour l'échantillon RG 3, pour lequel, dans les antécédents de polytoxicomanie du patient, de nombreux stupéfiants ont été consommés alors qu'aucun composé n'a été retrouvé. Ceci est également observé pour l'échantillon témoin RG 12.

D'autres échantillons témoins doivent être testés afin de compléter ces premiers résultats et afin d'étudier et préciser l'influence de certaines variables sur l'identification des composés comme la pigmentation des cheveux. La plupart de nos échantillons témoins sont de couleur brune, mais une décoloration préalable ou une teinture auraient-elles eu une influence particulière sur l'interprétation des résultats ?

Même si de nombreux points restent donc encore à définir et à être investigués, cette étude préliminaire a permis, toutefois, d'obtenir des résultats intéressants. Il s'agit d'un complément d'analyse non négligeable de tout autre prélèvement de sang, de plasma, d'urine, de liquide gastrique ou encore d'organes. En effet, une technique permettant la recherche d'un nombre illimité ou non de substances, sans *a priori*, dans les prélèvements capillaires également appelée « General Unknown Screening » (GUS), permet d'apporter des informations supplémentaires dans de nombreuses situations au cours desquelles seuls les cheveux restent les matrices biologiques à disposition des enquêteurs. C'est le cas, par exemple, lorsqu' aucun prélèvement sanguin et/ou urinaire n'a pu être réalisé (découverte de cadavre putréfié) ou lorsque les prélèvements sanguins et/ou urinaires ont été réalisés trop tardivement (cas de soumission chimique).

VI. Conclusions et perspectives

Les techniques de screening dans les prélèvements capillaires demeurent encore très peu décrites, voire inexplorées. Les cheveux constituent, cependant, une matrice de choix par la large fenêtre de détection offerte et la facilité d'obtention. Par conséquent, leur analyse peut s'avérer précieuse dans certaines situations cliniques et médico-légales en complément des prélèvements sanguins et/ou urinaires.

Cette étude avait pour objectif d'explorer la faisabilité d'une recherche large, de premier abord, de xénobiotiques dans des prélèvements capillaires. Dans cette démarche de disposer d'une méthode simple et relativement sensible, nous avons comparé trois types d'hydrolyses et trois techniques chromatographiques différentes.

Nos résultats préliminaires indiquent qu'une hydrolyse du prélèvement capillaire dans le méthanol, suivie d'un « General Unknown Screening » (ou GUS) par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM) semble être la procédure la plus appropriée.

Des publications récentes décrivent une approche de « screening ciblé » : recherche de molécules incluses dans une liste préalablement définie Cette approche peut venir en complément du GUS. En revanche, nous ne pensons pas qu'elle puisse s'y substituer. Effectivement, dans le cas de « screenings ciblés », les métabolites sont souvent « oubliés » au profit des molécules mères disponibles dans le « commerce ». Or, d'après les résultats obtenus par notre étude préliminaire, de nombreux métabolites peuvent également être mis en évidence dans les cheveux [39, 151].

Il s'agit, maintenant, de compléter ces premiers résultats. La procédure choisie (hydrolyse dans le méthanol et GUS par CL-SM/SM) peut être réalisée systématiquement dans les prélèvements capillaires disponibles lors les missions de recherche des causes de la mort. Cela permettrait d'enrichir notre expérience de GUS dans les cheveux, mais également de constituer, dès à présent, un appoint d'information pour l'expert. La mise en place de ce projet peut reposer sur un appareil récent (3200 QTRAP® de la Société AB Sciex) dédié à la réalisation de screenings par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

VII. Annexes

Annexe I : Fiche de suivi : Prélèvement capillaire

SERVICE [illegible]

FICHE DE SUIVI : PRELEVEMENT CAPILLAIRE

Fiche N°

N° de dossier :

Date de réception :

Nature du prélèvement :

Demandeur :

Date du prélèvement :

Contexte :

Analyse(s) demandée(s) :

Nombre de mèches :

Masse totale du (ou des) prélèvement(s) (avec lien), avant lavage :

Description du prélèvement :

Ticket de pesée (à coller)

– Orientation : oui / non

Longueur(s) (en cm) :

– Couleur :

– Traitement capillaire : oui / non

Visa préparateur :

Stratégie de l'analyse :

Visa biologiste :

Analyse

N° de la mèche analysée :

Date de la préparation du prélèvement :

Masse totale du (ou des) prélèvement(s), après lavage et séchage, avant segmentation :

Ticket de pesée (à coller)

Ticket(s) de pesée du (ou des) segment(s) analysé(s) :

Ticket de pesée (à coller)

Masse du reliquat du (ou des) prélèvement(s) :

Ticket de pesée (à coller)

Résultat : positif / négatif

Date de rendu du résultat :

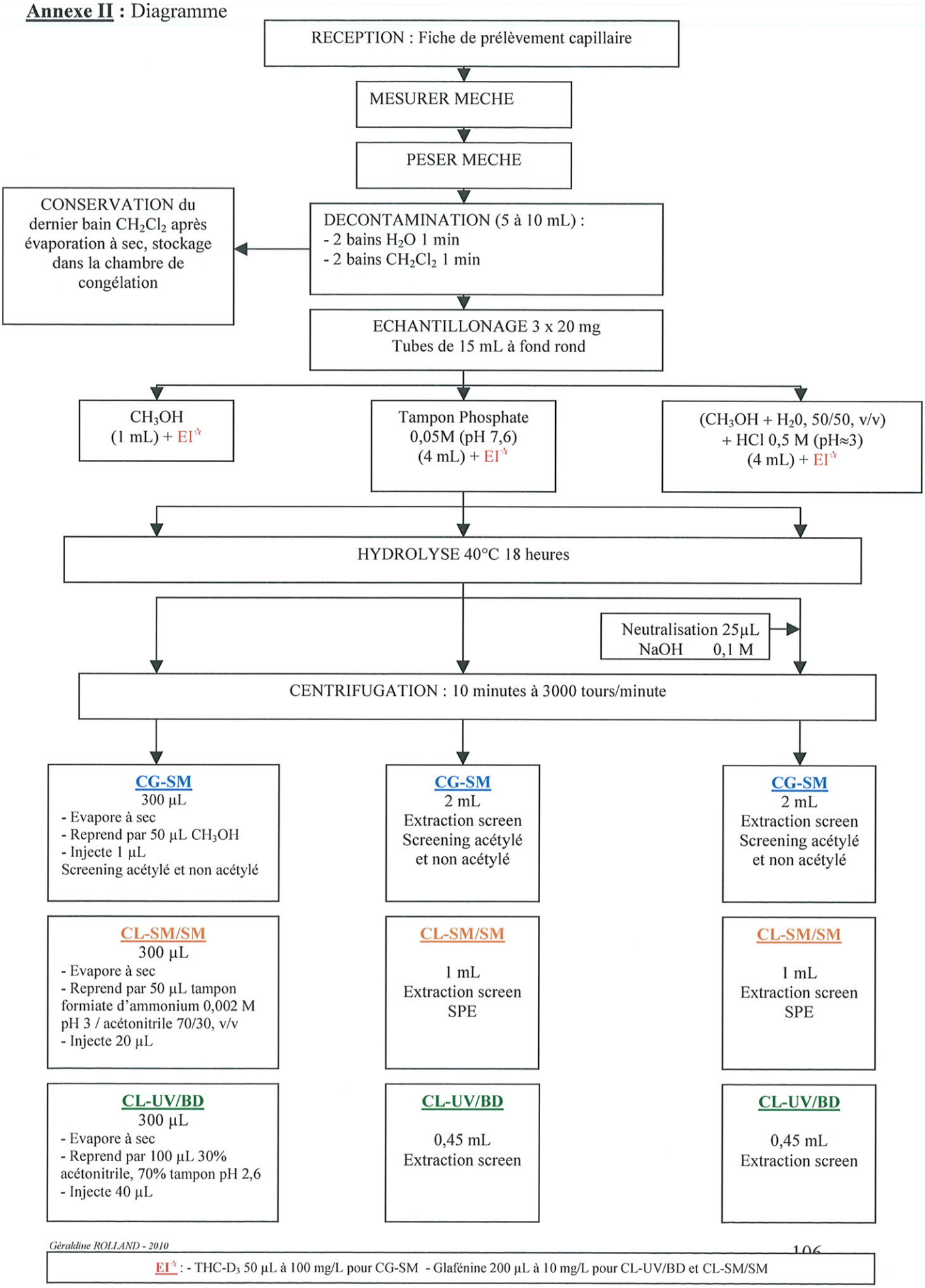
Visa opérateur(s) :

Page 1/1

Réf. IS-1S-EC-02

Version n° 000

Annexe II : Diagramme



Géraldine ROLLAND - 2010

EI* : - $THC-D_3$ 50 µL à 100 mg/L pour CG-SM - Glafénine 200 µL à 10 mg/L pour CL-UV/BD et CL-SM/SM

VIII. Bibliographie

1. Goullé J.P., Kintz P. Un nouveau moyen d'investigation biologique : l'analyse des cheveux. Intérêts en pratique médicale. *Rev Med Interne.* 1996; 17: 826-835.
2. Goullé J.P., Kintz P. Human hair, powerful biological marker for xenobiotics exposure. *Ann. Biol. Clin.* 1997; 55: 435-442.
3. Maurer H.H. Screening by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS). *An. Tox. Anal.* 2005; vol. XVII, n°1: 13-20.
4. Dehan C., Ponchel C., Oliver M., Bohand S., Moalic J.L., Chevrier M., Carpentier J.P., Pauli A.M. Apport du screening toxicologique par CLHP/BD lors d'intoxications médicamenteuses. *Revue Française des Laboratoires.* 2001; n° 336 : 65-70.
5. Goullé J.P. Talec R. Quelles technologies pour l'analyse toxicologique en 2003 ? *ITBM-RBM. 2004;* 25: 48-53.
6. Lai C.K., Lee T., Au K.M., Yan-Wo Chan A. Uniforme solid-phase extraction procedure for toxicological drug screening in serum and urine by HPLC with photodiode-array detection. *Clin. Chem.* 1997; 43(2): 312-325.
7. Koves E.M. Use of high-performance liquid chromaography-diode array detection in forensic toxicology. *J. Chromatogr. A.* 1995; 692: 103-119.
8. Mathieu O., Gutknecht S., Barnay F., Berthezene J.M., Bongrand A.F., Mathieu-Daude J.C. Screenings toxicologiques par LC-MS simple-Quad versus HPLC-DAD : bilan après un an de pratique en urgence hospitalière. *An. Tox. Anal.* 2005; vol. XVII, n°1: 21-26.
9. Gaillard Y., Pépin G. Use of high-performance liquid chromatography with photodiode-array UV detection for the creation of a 600-compound library. Application to forensic toxicology. *J. Chromatogr. A.* 1997; 763: 149-163.
10. Schönberg L., Grobosch T., Lampe D., Kloft C. New screening method for basic compounds in urine by on-line extraction-high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J. Chromatogr. A.* 2006; 1134: 177-185.
11. Tracqui A., Kintz P., Mangin P. Systematic toxicological analysis using HPLC/DAD. *J. Forensic Sci.* 1995; 40(2): 254-62.
12. Drummer O.H. Chromatographic screening techniques in systematic toxicological analysis. *J. Chromatogr. B.* 1999; 733: 27-45.

13. Pragst F., Herzler M., Erxleben B.T. Systematic toxicological analysis by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC/DAD). *Clin. Chem. Lab. Med.* 2004; 42(11): 1325-1340.
14. Lambert W.E., Van Bocxlaer J.F., De Leenheer A.P. Potential of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection in forensic toxicology. *J. Chromatogr. B. : Biomed. Sci. Appl.* 1997; 689(1): 45-53.
15. Maurer H.H. Systematic toxicological analysis of drugs and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 1992; 580(1-2): 3-41.
16. Humbert L., Lhermitte M. Molécules indétectables par chromatographie en phase gazeuse. *An. Tox. Anal.* 2005; vol. XVII, n°1: 57-62.
17. Polettini A., Groppi A., Vignali C., Montagna M. Fully-automated systematic toxicological analysis of drugs, poisons, and metabolites in whole blood, urine, and plasma by gas chromatography-full scan mass spectrometry. 1998; *J.Chromatogr. B*, 713: 265-279.
18. Maurer H.H., Pfleger C., Weber A.A. Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and their Metabolites. Part 4, Wiley-VCH : Weinheim, 2000;3.
19. Maurer H.H. 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.* 2005; 38: 310-318.
20. Maurer H.H. Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic and clinical toxicology. *J. Chromatogr. B.* 1998; 713: 3-25.
21. Müller C., Schäfer P., Störtzel M., Vogt S., Weinmann W. Ion suppression effects in liquid chromatography-electrospray-ionisation transport-region collision induced dissociation mass spectrometry with different serum extraction methods for systematic toxicological analysis with mass spectra libraries. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2002; 773(1): 47-52.
22. King R., Bonfiglio R., Fernandez- Metzler C., Miller-Stein C., Olah T. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2000; 11: 942-950.
23. Gergov M., Robson J.N., Duchoslav E., Ojanpera I. Automated liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for screening B-blocking drugs in urine. *J. Mass Spectrom.* 2000; 35: 912-918.

24. Rittner M., Pragst F., Neumann J. Screening method for seventy psychoactive drugs or drug metabolites in serum based on high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 2001; 25: 115-124.
25. Weinmann W., Lehman N., Müller C., Wiedemann A., Svoboda M. Identification of lorazepam and sildenafil as examples for the application of LC/ionspray-MS and MS/MS with mass spectra library searching in forensic toxicology. *Forensic Sci. Int.* 2000; 113: 339-344.
26. Müller C., Vogt S., Goerke R., Kordon A., Weinmann W. Identification of selected psychopharmaceuticals and their metabolites in hair by LC/ESI-CID/MS and LC/MS/MS. *Forensic Sci. Int.* 2000; 113: 415-421.
27. Marquet P. Is LC-MS Suitable for a Comprehensive Screening of Drugs and Poisons in Clinical Toxicology ? *Ther. Drug Monit.* 2002; 24(1): 125-133.
28. Spratt E., Vallaro G.M. LC/MS with a particle beam interface in forensic toxicology. *Clin. Lab. Med.* 1998; 18: 651-663.
29. Lips A.G.A.M., Lameijer W., Kokkens R.H., Nibbering N.M.M. Methodology for the development of a drug library based upon collision-induced fragmentation for the identification of toxicologically relevant drugs in plasma samples. *J.Chromatogr. B.* 2001; 759: 191-207.
30. Weinmann W., Wiedemann A., Eppinger B., Renz M., Svoboda M. Screening for drugs in serum by electrospray ionization/collision induced dissociation and library searching. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1999; 10: 1028-1037.
31. Mallet C.R., Lu Z., Mazzeo J.R. A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2004; 18: 49-58.
32. Annesley T.M. Ion suppression in mass spectrometry. *Clin. Chem.* 2003; 49: 1041-1044.
33. Marquet P. Progress of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Ther. Drug Monit.* 2002; 24: 255-276.
34. Saint-Marcoux F., Lachâtre G., Marquet P. Evaluation of an improved general unknown screening procedure using liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry by comparison with gas chromatography and high-performance liquid-chromatography-diode array detection. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2003; 14(1): 14-22.
35. Maquille A., Guillarme D., Rudaz S., Veuthey J.L. High-Throughput Screening of Drugs of Abuse in Urine by Supported Liquid-Liquid Extraction and UHPLC Coupled to Tandem MS. *Chromatographia.* 2009; 70(9/10): 1373-1380.

36. Remane D., Meyer M.R., Peter F.T. Fast and simple procedure for liquid-liquid extraction of 136 analytes from different drug classes for development of a liquid chromatographic-tandem mass sprectrometric quantification method in human blood plasma. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010.
37. Wohlfarth A., Weinmann W., Dresen S. LC-MS/MS screening method for designer amphetamines, tryptamines, and piperazines in serum. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010; 396(7): 2403-2414.
38. Liu H.C., Liu R.H., Lin D-L., Ho H-O. Rapid screening and confirmation of drugs and toxic compounds in biological specimens using liquid chromatography/ion trap tandem mass spectrometry and automated library search. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2010; 24: 75-84.
39. Dresen S., Ferreiros N., Gnamn H., Zimmermann R., Weinmann W. Detection and identification of 700 drugs by multi-target screening with a 3200 Q TRAP® LC-MS/MS system and library searching. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010.
40. Sauvage F.L., Saint-Marcoux F., Duretz B., Deporte D., Lachâtre G., Marquet P. Screening of Drugs and Toxic Compounds with Liquid-Chromatography-Linear Ion Trap Tandem Mass Spectrometry. *Clin. Chem.* 2006; 52: 1735-1742.
41. Decaestecker T.N., Lambert W.E., Van Peteghem C.H., Deforce D., Van Bocxlaer J.F. Optimization of a solid-phase extraction for a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric general unknown screening procedure by means of computational techniques. *J.Chromatogr. A.* 2004; 1056(1-2): 57-65.
42. Sauvage F.L., Picard N., Saint-Marcoux F., Gaulier J.M., Lachâtre G., Marquet P. General unknown screening procedure for the characterization of human drug metabolites in forensic toxicology : Applications and constraints. *J. Sep. Sci.* 2009; 32(18): 3074-3083.
43. Decaestecker T. N., Clauwaert K.M., Van Bocxlaer J.F., Lambert W.E., Van Den Eeckhout E.G., Van Peteghem C., De Leenheer A.P. Evaluation of automated single mass spectrometry to tandem mass spectrometry function switching for comprehensive drug profiling analysis using a quadrupole time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000; 14: 1787-1792.
44. Gergov M., Pelander A., Ojanperä I., Vuori E. Toxicological screening of urine for drugs by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry with automated target library search based on elemental formulas. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2001; 15: 521-526.

45. Pelander A., Ojanperä I., Laks S., Rasanen I., Vuori E. Toxicological Screening with Formula-Based Metabolite Identification by Liquid Chromatography/Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2003; 75: 5710-5718.
46. Pelander A., Ristimaa J., Rasanen I., Vuori E., Ojanperä I. Screening for Basic Drugs in Hair of Drug Addicts by Liquid Chromatography/Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Ther. Drug Monit.* 2008; 30(6): 717-724.
47. Boone C.M., Ensing K. Is capillary electrophoresis a method of choice for systematic toxicological analysis ? *Clin. Chem. Lab. Med.* 2003; 41(6): 773-781.
48. Pragst F., Balikova M.A. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clin. Chim. Acta.* 2006; 370(1-2): 17-49.
49. Jolles P., Zahn H., Höcker H. Formation and structure of human hair. *Birkhäuser Verlag.* 1997; 78.
50. Harkey M.R. Anatomy and physiology of hair, *Forensic Sc. Int.* 1993; 63: 9-18.
51. Schlake T. Determination of hair structure and shape. *Semin. Cell Dev.Biol.* 2007; 18: 267-273.
52. Kintz P. Value of hair analysis in postmortem toxicology. *Forensic Sc. Int.* 2004; 142: 127-134.
53. Nakahara Y. Hair analysis for abused and therapeutic drugs. *J.Chromatogr.B.* 1999; 733(1-2): 161-180.
54. Robbins C.R. Chemical and physical behaviour of human hair, 4th edition, Springer-Verlag, 2002.
55. Cirimele V. Incorporation des xénobiotiques dans les cheveux. *Revue Française des Laboratoires.* 1996; 1996(282): 31-35.
56. Rothe M., Pragst F., Thor S., Hunger J. Effect of pigmentation on the drug deposition in hair of grey-haired subjects. *Forensic Sci. Int.* 1997; 84(1): 53-60.
57. Henderson G.L. Mechanisms of drug incorporation into hair. *Forensic Sci. Int.*1993; 63: 19-29.
58. Nakahara Y., Takahashi K., Kikura R. Hair analysis for drugs of abuse. Effect of physicochemical properties of drugs on the incorporation rates into hair. *Biol Pharm Bull.* 1995; 18(9): 1223-1227.
59. Jurado C., Kintz P., Menendez M., Repetto M. Influence of the cosmetic treatment of hair on drug testing. *Int. J. Legal Med.* 1997; 110(3): 159-63.

60. Rothe M. Untersuchungen zur Abscheidung und analytischen Bestimmung von Arzneimittelwirkstoffen im haar. Thesis, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Humbolt-University, Berlin, Germany; 1997.
61. Baumgartner A.M., Jones P.F., Baumgartner W.A., Black C.T. Radioimmunoassay of hair for determining opiate-abuse histories. *J.Nucl. Med.* 1979; 20: 749-52.
62. Kintz P., Villain M., Cirimele V. Hair analysis for drug detection. *Ther. Drug Monit.* 2006; 28(3): 442-446.
63. Goldberger B.A., Caplan Y.H., Maguire T., Cone E.J. Testing human hair for drugs of abuse, III : identification of heroin and 6-acetylmorphine as indicators of heroin use. *J. Anal. Toxicol.* 1991; 15: 226-231.
64. Moeller M.R., Fey P.,Wennig R. Simultaneous determination of drugs of abuse (opiates, cocaine and amphetamine) in human hair by GC/MS and its application to a methadone treatment program. *Forensic Sci. Int.* 1993; 63(1-3): 185-206.
65. Goldberger BA. Disposition of heroine and its metabolites in heroin-related deaths. *J. Anal. Toxicol.* 1994; 18: 22-28.
66. Romolo F.S., Rotolo M.C., Palmi I., Pacifici R., Lopez A. Optimized conditions for simultaneous determination of opiates, cocaine and benzoylecgonine in hair samples by GC-MS. *Forensic Sci. Int.* 2003; 138(1-3): 17-26.
67. Kintz P., Tracqui A.,Mangin P. Detection of drugs in human hair for clinical and forensic applications. *Int. J. Legal Med.* 1992; 105(1): 1-4.
68. Jurado C., Gimenez M.P., Menendez M., Repetto M. Simultaneous quantification of opiates, cocaine and cannabinoids in hair. *Forensic Sci. Int.* 1995; 70(1-3): 165-74.
69. Kintz P., Mangin P. Simultaneous determination of opiates, cocaine and major metabolites of cocaine in human hair by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *Forensic Sci. Int.* 1995; 73(2): 93-100.
70. Marsh A., Carruthers M.E., Desouza N., Evans M.B. An investigation of the effect of washing upon the morphine content of hair measured by a radioimmunoassay technique. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1992; 10(1): 89-93.
71. Montagna M., Stramesi C., Vignali C., Groppi A., Polettini A. Simultaneous hair testing for opiates, cocaine and metabolites by GC-MS : a survey of applicants for driving licenses with a history of drug use. *Forensic Sci. Int.* 2000; 107(1): 157-167.
72. Kauert G., Rohrich J. Concentrations of D9-tetrahydrocannabinol, cocaine and 6-monoacetylmorphine in hair of drug abusers. *Int. J. Legal Med.* 1996; 108(6): 294-299.

73. Skender L., Karacic V., Brcic I., Bagaric A. Quantitative determination of amphetamines, cocaine, and opiates in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.* 2002; 125(2-3): 120-126.
74. Cirimele V., Kintz P., Mangin P. Comparison of different extraction procedures for drugs in hair of drug addicts. *Biomed. Chromatogr.* 1996; 10(4): 179-82.
75. Sachs H., Kintz P. Testing for drugs in hair : Critical review of chromatographic procedures since 1992. *J. Chromatogr. B : Biomed. Sci. Appl.* 1998; 713(1): 147-161.
76. Gambelunghe C., Rossi R., Ferranti C., Rossi R., Bacci M. Hair analysis by GC/MS/MS to verify abuse of drugs. *J. Appl. Toxicol.* 2005; 25(3): 205-211.
77. Balikova M.A., Habrdova V. Hair analysis for opiates : evaluation of washing and incubation procedures. *J. Chromatogr. B : Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2003; 789(1): 93-100.
78. Cingolani M., Scarella S., Mencarelli R., Mirtella D., Froldi R., Rodriguez D. Simultaneous detection and quantification of morphine, 6-acetylmorphine, and cocaine in toenails : comparison with hair analysis. *J. Anal. Toxicol.* 2004; 28(2): 128-131.
79. Kintz P., Bundelli P., Brenneisen R., Ludes B. Dose-concentration relationships in hair from subjects in a controlled heroin maintenance program. *J. Anal. Toxicol.* 1998; 22(3): 231-236.
80. Girod C., Staub C. Acetylcodeine as a marker of illicit heroin in human hair : method validation and results of a pilot study. *J. Anal. Toxicol.* 2001; 25: 106-111.
81. Musshoff F., Lachenmeier K., Wollerser H., Lichtermann D., Madea B. Opiate concentrations in hair from subjects in a controlled heroin-maintenance program and from opiate-associated fatalities. *J. Anal. Toxicol.* 2005; 29(5): 345-352.
82. Segura J., Stramesi C., Redon A., Ventura M., Sanchez C.J., Gonzalez G., San L., Montagna M. Immunological screening of drugs of abuse and gas chromatographic-mass spectrometric confirmation of opiates and cocaine in hair. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 1999; 724(1): 9-21.
83. Goldberger B., Darraj A.G., Caplan Y.H., Cone E.J. Detection of methadone, methadone metabolites, and other illicit drugs of abuse in hair of methadone-treatment subjects. *J. Anal. Toxicol.* 1998; 22(6): 526-530.
84. Brewer W.E., Galipo R.C., Sellers K.W., Morgan S.L. Analysis of cocaine, benzoylecgonine, codeine and morphine in hair by supercritical fluid extraction with carbon dioxide modified with methanol. *Anal. Chem.* 2001; 73(11): 2371-6.

85. Girod C., Staub C. Analysis of drugs of abuse in hair by automated solid-phase extraction, GC/EI/MS and GC ion trap CI/MS. *Forensic Sci. Int.* 2000; 107(1-3): 261-71.
86. Cognard E., Rudaz S., Bouchonnet S., Staub C. Analysis of cocaine and three of its metabolites in hair by gas chromatography-mass spectrometry using ion-trap detection for CI/MS/MS. *J. Chromatogr. B.* 2005; 826(1-2): 17-25.
87. Baumgartner WA., Hill V.A. Sample preparation techniques. *Forensic Sci. Int.* 1993; 63: 121-135.
88. Schaffer M.I., Hill V., Cairns T. An evaluation of two wash procedures for the differentiation of external contamination versus ingestion in the analysis of human hair samples for cocaine. *J. Anal. Toxicol.* 2002; 70: 2336.
89. Kronstrand R., Nyström I., Strandberg J., Druid H. Screening for drugs of abuse in hair with ion spray LC-MS-MS. *Forensic Sci. Int.* 2004; 145(2): 183-190.
90. Clauwaert K.M., Van Bocxlaer J.F., Lambert W.E., Van den Eeckhout E.G., Lemière F., Esmans E.L., De Leenheer A.P. Narrow-bore HPLC in combination with fluorescence and electrospray mass spectrometric detection for the analysis of cocaine and metabolites in human hair. *Anal. Chem.* 1998; 70(11): 2336-44.
91. De Toledo C.P.F., Yonamine M., de Moraes Moreau R.L., Alves Silva O. Determination of cocaine, benzoylecgonine and cocaethylene in human hair by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 2003; 798(2): 361-365.
92. Pichini S. *et al.* Determination of opiates and cocaine in hair as trimethylsilyl derivatives using gas chromtagography-tandem mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 1999; 23: 343.
93. Segura J., Ventura R., Jurado C. Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometry determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and dopings agents. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 1998; 713(1): 61-90.
94. Paulsen RB. *et al.* Quantification of cocaine and metabolites in hair via API-ES LC-MSD. Abstract. *J. Anal. Toxicol.* 2001; 25: 363.
95. Kintz P., Cirimele V., Sengler C., Mangin P. Testing human hair and urine for anhydroecgonine methylester, a pyrolysis product of cocaine. *J. Anal. Toxicol.* 1995; 19(6): 479-82.
96. Pragst F., Rothe M., Spiegel K., Sporkert F. Illegal and therapeutic drug concentrations in hair segments : a timetable of drug exposure ? *Forensic Sci. Rev.* 1998; 10: 81-112.
97. Thorspecken J., Skopp G., Pötsch L. In vitro contamination of hair by marijuana smoke. *Clin. Chem.* 2004; 50: 596-602.

98. Cirimele V., Sachs H., Kintz P., Mangin P. Testing human hair for cannabis. III. Rapid screening procedure for simultaneous identification of THC, cannabinol and cannabidiol. *J. Anal. Toxicol.* 1996; 20: 13-6.

99. Uhl M., Sachs H. Cannabinoids in hair : strategy to prove marijuana/hashish consumption. *Forensic Sci. Int.* 2004; 145(2-3): 143-7.

100. Consensus de la SFTA de décembre 2004. *An. Tox. Anal.* 2004; 16: 229.

101. SoHT. Recommendation for hair testing in forensic cases. *Forensic Sci. Int.* 2004; 145: 83-4.

102. Jurado C. Interpretation of results in hair analysis. *Annual Meeting of the Society of Hair Testing*. Cardiff, UK, Mai 2007.

103. Suzuki O., Hattori H., Asano M. Detection of methamphetamine and amphetamine in a single human hair by gas chromatography/chemical ionization mass spectrometry. *J. Forensic Sci.*1984; 29(2): 611-7.

104. Kintz P., Cirimele V. Interlaboratory comparison of quantitative determination of amphetamine and related compounds in hair samples. *Forensic Sci. Int.* 1997; 84(1): 151-156.

105. Takahashi K. Determination of methamphetamine and amphetamine in biological fluids and hair by gas chromatography. *Nippon Hoigaku Zasshi.* 1984; 38(3): 319.

106. Nagai T. Detection of methamphetamine and amphetamine from hair, bone and teeth. *Proceeding of the 21st International Meeting*. Dunnett, N. and Kimber, K.J., New York, 1984; 89-94.

107. Kintz P., Cirimele V., Ludes B. Dosage de la méthylènedioxyéthylamphétamine (MDEA) et de son métabolite, la méthylènedioxyamphétamine (MDA) dans les cheveux par CPG/SM. *Toxicorama.* 1997; vol. IX, n°2: 87.

108. Frisson G., Tedeschi L., Favretto D., Reheman A., Ferrara S.D. Gas chromatography/mass spectrometry determination of amphetamine-related drugs and ephedrines in plasma, urine and hair samples after derivatization with 2,2,2-trichloroethylchloroformate. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005; 19: 919-927.

109. Villamor J.L., Bermejo A.M., Fernandez P., Tabernero M.J. A new GC-MS method for the determination of five amphetamines in human hair. *J. Anal. Toxicol.* 2005(2), 29: 135-9.

110. Stanaszek R., Piekoszewski W. Simultaneous determination of eight underivatized amphetamines in hair by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure

chemical ionization mass spectrometry (HPLC-APCI-MS). *J. Anal. Toxicol.* 2004; 28(2): 77-85.

111. Lamoureux F., Sauvage F.L., Mercerolle M., Vallejo C., Gaulier J.M., Lachâtre G. A liquid-chromatography-Electrospray ionization-tandem mass spectrometry method following SPE extraction dedicated to the determination of ethyl-glucuronide in hair. *SFTA-TIAFT-SOHT International Meeting Martinique*, P115, 2008, Communication.

112. Lamoureux F., Gaulier J.M., Sauvage F.L., Mercerolle M., Vallejo C., Lachâtre G. Determination of ethyl-glucuronide in hair for heavy drinking detection using liquid chromatography-tandem mass spectrometry following solid-phase extraction. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009; 394(7): 1895-1901.

113. Janda I., Weinmann W., Kuehnle T., Lahode M. Alt A. Determination of ethyl glucuronide in human hair by SPE and LC-MS/MS. *Forensic Sci.Int.* 2002; 128:59-65.

114. Morini L., Politi L., Groppi A., Stramesi C., Polettini A.. Determination of ethyl glucuronide in hair samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 2006; 41: 34-42.

115. Yegles M., Labarthe A., Auwärter V., Hartwig S., Vater H., Wennig R., Pragst F. Comparison of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl ester concentrations in hair of alcoholics, social drinkers and teetotallers, *Forensic Sci. Int.* 2004; 29;145(2-3): 167-73.

116. Skopp G., Schmitt G., Pötsch L., Drönner P., Aderjan R., Mattern R. Ethyl glucuronide in human hair. *Alcohol.* 2000; 35(3): 283-5.

117. Politi L., Morini L., Leone F., Polettini A. Ethyl glucuronide in hair: Is it a reliable marker of chronic high levels of alcohol consumption? *Addiction.* 2006; 101: 1408-12.

118. Pragst F., Yegles M. Alcohol markers in hair. In: Kintz P, ed. *Analytical and Pratical Aspects of Drug Testing in Hair*, Boca Raton, FL: CRC Taylor & Francis. 2006; 287-323.

119. Appenzeller B.M., Agirman R., Neuberg P., Yegles M., Wennig R. Segmental determination of ethyl glucuronide in hair: a pilot study. *Forensic Sci. Int.* 2007; 20; 173(2-3): 87-92.

120. Wurst F.M., Kelso E., Weinmann W., Pragst F., Yegles M., Sundström Poromaa I. Measurement of direct ethanol metabolites suggests higher rate of alcohol use among pregnant women than found with the AUDIT -a pilot study in a population-based sample of Swedish women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2008; 198(4):407: 1-5.

121. Pragst F., Yegles M. Determination of fatty acid ethyl esters (FAEE) and ethyl glucuronide (EtG) in hair: a promising way for retrospective detection of alcohol abuse during pregnancy? *Ther. Drug Monit.* 2008; 30(2): 255-63.

122. Pragst F., Rothe M., Moench B., Hastedt M., Herre S., Simmert D. Combined use of FAEE en EtG in hair for diagnosis of allcohol abus. Interpretation and advantages. *Forensic Sci. Int.* 2010; 196(1-3): 101-110.

123. Consensus of the SoHT. Annual meeting of the Society of Hair Testing, Rome, Juin 2009.

124. Laloup M., Ramirez Fernandez M.D., De Boeck G., Wood M., Maes V., Samyn N. Validation of a Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the simultaneous Determination of 26 Benzodiazepines and Metabolites, Zolpidem and Zopiclone, in Blood, Urine, and Hair. *J. Anal.Toxicol.* 2005; 29(7): 616-626.

125. Chèze M., Duffort G., Deveaux M., Pépin G. Hair analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in toxicological crimes: Report of 128 cases over the period June 2003-May 2004 in metropolitan Paris. *Forensic Sci. Int.* 2005; 153(1): 3-10.

126. Irving R.C., Dickson S.J. The detection of sedatives in hair and nail samples using tandem LC-MS-MS. *Forensic Sci. Int.* 2007; 166(1): 58-67.

127. Villain M., Concheiro M., Cirimele V., Kintz P. Screening method for benzodiazepines and hypnotics in hair at pg/mg level by liquid chromatography-mass spectrometry/ mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 2005; 825(1): 72-8.

128. Hegstad S., Khiabani H.Z., Kristoffersen L., Kune N., Lobmaier P.P., Christophersen A.S. Drug screening of hair by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 2008; 32(5): 364-72.

129. Hall J., Edward A. Alleged drug facilitated sexual assault (DFSA) in Nothern Ireland from 1999 to 2005. A study of blood alcohol levels. *J. Forensic Legal Med.* 2008; 15(8): 497-504.

130. Wada M., Ikeda R., Kuroda N., Nakashima K. Analytical methods for abused drugs in hair and their applications. *Anal Bioanal Chem.* 2010; 397(3): 1039-67.

131. Miller E.I., Wylie F.M., Oliver J. Detection of benzodiazepines in hair using ELISA and LC-ESI-MS-MS. *J. Anal. Toxicol.* 2006; 30(7): 441-448.

132. Anderson R.A., Ariffin M.M., Cormack P.A.G., Miller E.I. Comparison of molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) with classical solid-phase extraction (SPE) for the detection of benzodiazepines in post-mortem hair samples. *Forensic Sci. Int.* 2008; 174(1): 40-46.

133. Cordero R., Paterson S. Simultaneous quantification of opiates, amphetamines, cocaïne and metabolites and diazepam and metabolite in a single hair sample using GC-MS. *J. Chromatogr. B.* 2007; 850(1-2): 423-431.

134. Gaillard Y., Pépin G. Screening and identification of drugs in human hair by high-performance liquid chromatography-photodiode-array UV detection and gas chromatography-mass spectrometry after solid-phase extraction. A powerful tool in forensic medicine. *J. Chromatogr. A.* 1997 ; 762(1-2): 251-267.

135. Sato H., Uematsu T., Yamada K., Nakashima M. Chlorpromazine in human scalp hair as an index of dosage history : comparison with simultaneously measured haloperidol. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1993; 44(5): 439-444.

136. Villain M., Chèze M., Tracqui A., Ludes B., Kintz P. Testing for zopiclone in hair application to drug-facilitated crimes. *Forensic Sci. Int.* 2004; 145(2): 117-121.

137. Villain M., Tournoud C., Flesch F., Cirimele V., Kintz P. Hair to document exposure to glibenclamide. *J Chromatogr B.* 2006; 842(2): 111-115.

138. Uematsu T. Utilization of hair analysis for therapeutic drug monitoring with a special reference to ofloxacin and to nicotine, *Forensic Sci. Int.* 1993; 63(1-3): 261-8.

139. CHU Rouen. http://www.chu-rouen.fr/cap/dossier5.html, consulté le 31 décembre 2009.

140. Kintz P., Goullé J.P., Fornes P., Ludes B. Une nouvelle série d'analyse des cheveux de Napoléon confirme une exposition chronique à l'arsenic. *An. Tox. Anal.* 2001; vol. XIII n° 4.

141. Cooper G., Moeller M., Kronstrand R. Current status of accreditation for drug testing in hair. *Forensic Sci. Int.* 2007; 176(1): 9-12.

142. Peters F.T., Drummer O.H., Musshoff F. Validation of new methods. *Forensic Sci. Int.* 2007; 165: 216-224.

143. Musshoff F., Madea. B. New trends in hair analysis and scientific demands on validation and technical notes. *Forensic Sci. Int.* 2007 ; 165: 204-215.

144. Pépin G., Gaillard Y. Applications médico-légales du dépistage dans les cheveux des conduites toxicophiles par chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse. *Revue Française des Laboratoires.* 1996; 282: 65-68.

145. Goullé JP., Noyon J., Bietry F., Le Roux P., Cron M., Fanon J.L., Rigaud J.P., Nouveau J., Anagnostides J.G. Analyse des cheveux : intérêt en pratique médicale hospitalière. *Revue Française des Laboratoires.* 1996; 282: 56-60.

146. Bogdanov A.V., Glazkov I.N., Polenova T.V., Marutsenko I.V., Revel'skii I.A. Determination of Organic Compounds in Human Hair. *J. Anal. Chem.* 2006; 61(10): 936-951.

147. Gaulier J.M., Sauvage F.L., Pauthier H., Saint-Marcoux F., Marquet P., Lachâtre G. Identification of Aceprometazine in Hair : An illustration of the Difficulties Encountered in Investigating Drug-facilitated Crimes. *J. Forensic Sci.* 2008; 53(3): 755-759.

148. Comité de Pilotage de l'Enquête Nationale Soumission Chimique, Paris. AFSSaPS, 15 mai 2008.

149. Soumission chimique, Résultats de l'enquête nationale 2007, le CEIP-Addictovigilance de Paris et le réseau des CEIP. AFSSaPS, 23 février 2009.

150. Bucelli F., Fratini A., Bavazzano P., Comodo N. Quantification of drugs of abuse and some stimulants in hair samples by liquid chromatography-electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *J.Chromatogr. B.* 2009; 877(31): 3931-3936.

151. Dresen S., Gergov M., Politi L., Halter C., Weinmann W. ESI-MS/MS library of 1,253 compounds for application in forensic and clinical toxicology. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009; 395(8): 2521-2526.

TABLE DES MATIERES

I. Introduction 14

II. Les techniques et méthodes de screening 16
II.1. Définition et généralités 16
II.2. Screening par chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur ultraviolet à barrette de diodes (CL-UV/BD) 19
II.3. Screening par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) 22
II.4. Screening par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM) 25
II.5. Screening par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM) 29
II.6. Autres techniques 31

III. Intérêt toxicologique des cheveux 33
III.1. Structure des cheveux 33
III.2. Incorporation des xénobiotiques dans les cheveux 38
III.3. Recherche et/ou dosage spécifique de substances ou de familles de substances dans les cheveux 43
III.3.1. Recherche et/ou dosage de stupéfiants dans les cheveux 43
III.3.1.1. Recherche et/ou dosage des opioïdes dans les cheveux 44
III.3.1.2. Recherche et/ou dosage de la cocaïne et de ses dérivés dans les cheveux 46
III.3.1.3. Recherche et/ou dosage des cannabinoïdes dans les cheveux 48
III.3.1.4. Recherche et/ou dosage des amphétamines dans les cheveux 49
III.3.2. Recherche et/ou dosage de l'éthylglucuronide dans les cheveux 52
III.3.3. Recherche et/ou dosage de familles de médicaments dans les cheveux 55
III.3.3.1. Recherche et/ou dosage des benzodiazépines dans les cheveux 55
III.3.3.2. recherche et/ou dosage d'autres médicaments dans les cheveux 56
III.4. Intérêts et limites des analyses capillaires 58

IV. Screening dans les cheveux 61
IV.1. Introduction 61
IV.2. Revue de la littérature 63
IV.3. Discussion 67

V. Etude préliminaire réalisée au Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Limoges 69
V.1. Objectifs 69
V.2. Plan expérimental 70
V.3. Méthodologie 72
V.3.1. Matériels et réactifs 72
V.3.1.1. Solvants et substances pures 72
V.3.1.2. Appareillage 72
V.3.2. Caractéristiques des échantillons capillaires 74
V.3.3. Procédure de décontamination 78
V.3.4. Segmentation, pesée, échantillonnage 79
V.3.5. Hydrolyse des échantillons capillaires 80
V.3.6. Systèmes chromatographiques et conditions analytiques 81
V.3.6.1. Screening par CG-SM 81

V.3.6.1.1. Méthodes d'hydrolyse et d'extraction....81
V.3.6.1.2. Méthode chromatographique....82
V.3.6.1.3. Méthode de recherche....83
V.3.6.2. Screening par CL-UV/BD....83
V.3.6.2.1. Méthodes d'hydrolyse et d'extraction....83
V.3.6.2.2. Méthode chromatographique....84
V.3.6.2.3. Méthode de recherche....85
V.3.6.3. Screening par CL-SM/SM....86
V.3.6.3.1. Méthodes d'hydrolyse et d'extraction....86
V.3.6.3.2. Méthode chromatographique....86
V.3.6.3.3. Méthode de recherche....88
V.4. Résultats....90
V.4.1. Difficultés rencontrées....99
V.5. Discussion....101

VI. Conclusions et perspectives....104

VII. Annexes....105
Annexe I : Fiche de suivi : Prélèvement capillaire....105
Annexe II : Diagramme....106

VIII. Bibliographie....107

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

BON A IMP. N° _____

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

Vu et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITÉ

ROLLAND Géraldine

TITRE : Méthodes de screening de xénobiotiques (médicaments et/ou stupéfiants) dans les cheveux : Etat de l'art et étude préliminaire

Thèse : Pharm. ; Limoges ; 2010.

RESUME : Les cheveux constituent une matrice de choix par leur large fenêtre de détection et leur facilité d'obtention. Leur analyse peut donc s'avérer précieuse dans certaines situations cliniques et médico-légales en complément des prélèvements sanguins et/ou urinaires plus classiquement utilisés. Parmi les différentes stratégies d'analyses toxicologiques, la recherche d'un nombre illimité ou non de substances, sans *a priori*, également appelée le « General Unknown Screening » (GUS) offre le champ d'investigations le plus large. Après une présentation des différentes techniques de screening dans les cheveux décrites dans la littérature, nous avons mené une étude préliminaire dans le Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie de Limoges avec pour objectif d'explorer la faisabilité d'une recherche large, simple et relativement sensible de xénobiotiques dans des prélèvements capillaires. Nous avons comparé trois types d'hydrolyse (en milieu acide, basique, ou dans le méthanol) et trois méthodologies analytiques (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM), chromatographie en phase liquide haute performance couplée à un détecteur ultraviolet à barrette de diodes (CL-UV/BD), ou chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (CL-SM/SM)). Nos résultats préliminaires indiquent qu'une hydrolyse du prélèvement capillaire dans le méthanol, suivie d'un GUS par CL-SM/SM semble être la procédure la plus appropriée. Des études complémentaires seront nécessaires afin d'enrichir cette expérience de GUS dans les cheveux par l'utilisation, notamment, d'un nouvel appareil plus récent, le 3200 QTRAP®.

MOTS-CLES : Analyse capillaire, screening, GUS, hydrolyse, CG-SM, CL-UV/BD, CL-SM/SM

TITLE : Screening methods of xenobiotics (drugs and/or drugs of abuse) in hair : review of the literature and preliminary study

ABSTRACT : Hair is a choice matrix due to its large window of detection and its easiness for sampling. In clinical and forensic toxicology situations, hair analysis is therefore a useful and complementary tool to conventional biological urine and/or blood samples. General Unknown Screening » (GUS), an analytical method which identifies an unlimited number of compounds, broadens the scope of application. After a review of the different screening methods in hair, we present a preliminary study developed in the Pharmacology and Toxicology Laboratory of the University Hospital of Limoges to evaluate the feasibility of a wide, simple and sensitive identification of xenobiotics in hair samples. We compared three types of hydrolysis (acid, basic, and in methanol) and three chromatographic techniques (Gas Chromatography- Mass Spectrometry (GC-MS), Liquid Chromatography-Diode Array Detection (LC-DAD), and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)). Methanol hydrolysis followed by LC-MS/MS provides the best preliminary results. Nevertheless, in order to improve our experience, further studies are necessary using a more recent chromatographic system, the 3200 QTRAP®.

KEYWORDS : Hair analysis, screening, GUS, hydrolysis, GC-MS, LC-DAD, LC-MS/MS

DISCIPLINE : Pharmacie Industrielle et Bio-Médicale
SPECIALITE DOCTORALE : Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

INTITULE ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :
Service de Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacovigilance, CHU Dupuytren, 87042 LIMOGES Cedex