

Les méthodes analytiques en toxicologie

Youssef Moutaouakkil, Badr Adouani, Mina Ait Elcadi, Abdelaziz Bouklouze, Yahia Cherrah, Yassir Bousliman, Rachid Eljaoudi

Laboratoire de pharmacologie-toxicologie, faculté de médecine et de pharmacie, université Mohamed V de Rabat, Maroc
<youssefmoutaouakkil@yahoo.fr>

La prise en charge médicale d'une intoxication est généralement pluridisciplinaire. L'apport du laboratoire de toxicologie peut être déterminant pour le pronostic. La recherche large des toxiques, le dépistage toxicologique ou encore le dosage d'une molécule déterminée sont des approches qui peuvent être discutées selon les situations. Le toxicologue analyste dispose d'un large éventail de méthodes analytiques, dont la disponibilité dépend de la mission du laboratoire et de ses moyens. Si certaines méthodes sont à la disposition de tous les laboratoires, d'autres, à cause de leur coût et de leur complexité, restent réservés à certaines structures spécialisées.

Mots clés : toxicologie, analyse, pharmacie

Les intoxications, de quelque nature qu'elles soient, représentent un vrai problème de prise en charge, aussi bien pour le médecin clinicien que pour le toxicologue, lorsqu'une analyse toxicologique est demandée. La variabilité des tableaux cliniques, l'altération de l'état général de l'intoxiqué, la multitude des toxiques en cause sont quelques-uns des facteurs qui peuvent expliquer cette difficulté [1].

La prise en charge d'une intoxication est pluridisciplinaire ; elle engage à la fois le médecin traitant, le biologiste et le toxicologue. La consultation du centre antipoison est souvent d'une grande utilité aussi bien pour le médecin traitant que pour le toxicologue. La nature de la demande toxicologique peut être une recherche large (analyse nécessitant un matériel spécialisé et une compétence d'interprétation), un dépistage toxicologique (recherche limitée à certaines familles de toxiques en fonction de l'épidémiologie locale) et/ou le dosage d'un toxique donné [2]. Quelle que soit la nature de la demande, le laboratoire de toxicolo-

gie doit être capable d'y répondre, et donc disposer des compétences requises pour la réalisation et l'interprétation des analyses toxicologiques, ainsi que du matériel nécessaire à cette mission. Les techniques de recherche et/ou de dosage sont fonction de la nature de la mission du laboratoire et doivent être adaptées au budget de fonctionnement et au niveau de la compétence du laboratoire [2]. Le but de cette synthèse est de décrire les différentes techniques analytiques susceptibles d'être utilisées dans un laboratoire de toxicologie.

Les méthodes analytiques de dépistage et/ou de confirmation

Pour répondre à cette demande toxicologique, l'analyste dispose de nombreuses méthodes dont les caractéristiques techniques, en termes de spécificité, de sensibilité, de rapidité et de facilité de mise en œuvre sont très différentes.



Tirés à part : Y. Moutaouakkil

Méthodes colorimétriques

Elles sont parmi les techniques les plus anciennement utilisées en toxicologie. Leur principe est basé sur le développement d'une coloration plus au moins spécifique à un toxique après addition d'un ou de plusieurs produits chimiques. Ces techniques peuvent être de deux natures [3] : qualitatives ou quantitatives.

Méthodes colorimétriques qualitatives

La coloration développée met en évidence la présence de la substance recherchée sans permettre de la quantifier.

Exemple : recherche des phénothiaziniques par méthode de Forrest.

Méthodes spectrophotométriques quantitatives

Dans ce cas, la coloration obtenue peut être évaluée quantitativement par spectrophotométrie dans le visible (entre 400 et 800 nm).

Exemple : dosage des salicylés par méthode de Trinder.

Les méthodes colorimétriques, de faibles coûts, sont à la portée de la majorité des laboratoires et relativement faciles à mettre en place. Cependant, leur faible spécificité et leur sensibilité variable doivent être prises en compte lors de l'interprétation des résultats.

Méthodes spectrophotométriques dans l'ultraviolet

Ces techniques sont basées sur le même principe que les méthodes colorimétriques, si ce n'est que la coloration n'appartient pas au domaine du visible et nécessite un spectrophotomètre dans le domaine ultraviolet (UV). Elles peuvent être qualitatives (recherche des benzodiazépines par réalisation d'un spectre UV) ou quantitatives (dosage des barbituriques par la méthode de Bourdon) [3].

Méthodes volumétriques

Le principe de ces méthodes est basé sur des réactions chimiques (acide-base ou oxydoréduction), le calcul des concentrations se faisant par rapport aux volumes de réactif consommés. L'exemple type de ces techniques est le dosage de l'alcool éthylique par la méthode de Cordebar ; il s'agit d'une méthode officielle qui se réalise par un dosage en retour basé sur l'oxydoréduction [4]. Ces méthodes peuvent aussi souffrir du manque de spécificité et/ou de sensibilité, avec un risque de contamination relativement élevé.

Méthodes enzymatiques

Ces méthodes font appel à une mesure de l'activité enzymatique pour le dosage d'un toxique. Dans ce cadre, on peut citer le dosage de l'éthanol par méthode enzymatique automatisée sur un certain nombre d'automates. Il s'agit d'une méthode non officielle (nécessitant une méthode de confirmation) basée sur la mesure de

l'activité de l'alcool déshydrogénase et l'augmentation de l'absorbance à 340 nm [4].

L'enzymologie peut également être utilisée dans la mise en évidence d'une intoxication cyanhydrique par la mesure de la lactacidémie ou le dosage de l'acétylcholinestérase plasmatique comme indicateur biologique indirect de l'intoxication par les organophosphorés.

Ces méthodes nécessitent des spectrophotomètres à chambre thermostatée capables de mesurer l'activité enzymatique en cinétique ou en point final.

Méthodes immunochimiques

Ces méthodes représentent à elles seules plus de 60 % de l'activité d'un laboratoire de toxicologie. Elles sont dotées d'une bonne spécificité et d'une bonne sensibilité. Leur principe est fondé sur la réaction d'un antigène (molécule ou famille chimique) avec un anticorps spécifique de la molécule recherchée. On peut distinguer [5] :

- les méthodes en phase homogène sans étape de séparation : c'est le cas de l'*enzyme multiplied immunoassay technique* (EMIT), de la *clone enzyme donor immuno assay* (CEDIA), de la *fluorescence polarization immuno assay* (FPIA) et de la *kinetic interaction of microparticles in solution* (KIMS),

- les méthodes en phase hétérogène, nécessitant une phase de séparation : les immuno-essais tels que le *radio-immuno-assay* (RIA), l'*enzyme immuno-assay* (EIA) et l'*enzyme linked immuno-sorbent assay* (Elisa).

Ces méthodes ont l'avantage d'être rapides, de ne nécessiter aucune préparation d'échantillon, d'être automatisables et de ne pas exiger de formation particulière du personnel. Elles ont cependant quelques inconvénients : sensibilité et spécificité variables, existence de réactions croisées et coût élevé [6]. Ce sont principalement des méthodes de dépistage toxicologique mais pas de confirmation.

Il existe, dans le commerce, plusieurs automates utilisant ces technologies pour rechercher certaines familles de toxique comme les benzodiazépines, les barbituriques, les antidépresseurs tricycliques, les substances illicites (cannabinoïdes, opiacés, cocaïne, amphétamines, etc.). Ces techniques s'appliquent également aux dosages plasmatiques des médicaments à risque toxique comme le paracétamol, les salicylés, la carbamazépine, le phénytoïne, le valproate, la digoxine, la théophylline, le méthotrexate, etc. L'anticorps, dans ce type d'analyse, est à spécificité étroite.

Il faut signaler qu'il existe des tests rapides, basés sur les méthodes immunochimiques, qui permettent de rechercher rapidement et simultanément plusieurs familles de toxiques. Le test Multisreen-10-MTD, de la société BMD, par exemple, est un test immunochromatographique par compétition pouvant détecter dix familles

de toxiques dans les urines en 5 min. Ces tests sont utilisables pour le dépistage ; tout résultat doit cependant être confirmé par les méthodes séparatives de référence.

Méthodes séparatives

Les principales techniques de séparation utilisées en toxicologie pour détecter, identifier ou doser une molécule toxique sont les méthodes chromatographiques et sont les méthodes électrophorétiques (d'utilisation limitée, ces dernières ne seront pas traitées dans cette synthèse). Ces méthodes ont pris au cours des dernières années une part de plus en plus importante dans les investigations toxicologiques, car elles permettent de caractériser un éventail très large de molécules. Ce sont des techniques qui nécessitent le plus souvent un traitement de l'échantillon (extraction) avant l'analyse.

La séparation chromatographique résulte de la distribution dynamique des solutés à analyser entre deux phases non miscibles : l'une stationnaire et l'autre mobile, à l'état gazeux, ou liquide [7].

La chromatographie sur couche mince

Très utilisée en toxicologie, elle tend néanmoins à être remplacée par d'autres méthodes séparatives. C'est une application essentiellement qualitative, parfois semi-quantitative. La migration de la phase mobile est réalisée sur une plaque (en papier ou gel de silice) posée verticalement dans la cuve de chromatographie [3]. Elle peut être unidirectionnelle ou en deux dimensions ; la révélation se fait par vaporisation d'un produit chimique spécifique, qui développe une coloration au contact du toxique (cas des alcaloïdes avec le réactif iodomercurique de Mayer ou iodobismuthique de Dragendorff) ou par UV si le toxique absorbe en UV (comme les coumariniques et les barbituriques) [3]. L'identification du toxique se fait par le calcul du rapport frontal et comparaison à celui d'un étalon.

La chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique appliquée essentiellement aux composés de faible poids moléculaire, thermostables, gazeux ou volatils. Il est cependant nécessaire, dans certains cas, d'avoir recours à une dérivation pour avoir des composés plus facilement séparables. Les phases stationnaires les plus répandues en CPG sont des polymères siliconés dérivés du diméthyl polysiloxane, qui se présentent sous forme de colonnes spiralées de plusieurs mètres. Le gaz vecteur le plus souvent utilisé en CPG est l'hélium [8].

Les méthodes chromatographiques sont des méthodes de séparation et non de détection ; elles doivent donc être couplées à un détecteur pour pouvoir identifier les analytes séparés. Parmi les détecteurs utilisés en couplage avec la CPG, on peut citer les suivants (liste non exhaustive) [8].

Le détecteur à ionisation de flamme

Le couplage de la CPG avec un détecteur à ionisation de flamme (FID) est encore très répandu dans les laboratoires de toxicologie. Ce détecteur utilise normalement une flamme hydrogène/air pour oxyder les molécules organiques et produire des ions. Les ions sont collectés et produisent un signal électrique qui est ensuite mesuré. C'est un détecteur universel (non sélectif) pour les produits organiques, qui ne donne pas de détails sur la structure moléculaire. L'identification de la molécule se fait alors par le temps de rétention. Ce couplage peut être utilisé pour le dosage des alcools, par exemple.

Le détecteur azote-phosphore

Il s'agit d'un FID modifié par l'introduction d'un métal alcalin dans la flamme. C'est un détecteur spécifique aux produits azotés ou phosphorés et peut par conséquent être utilisé pour le dosage des pesticides organophosphorés.

Le détecteur à capture d'électrons

C'est un détecteur très sensible pour les composés organohalogénés ; il est qualifié de sélectif. Il est composé d'une chambre contenant un produit radioactif émettant des rayonnements β de haute énergie qui ionisent le gaz vecteur en produisant des électrons libres. Ceux-ci sont collectés par une anode induisant un courant électrique de base. Si une molécule électrophile (capable de capturer un électron) est éluée, elle produira une baisse de l'intensité du courant de base proportionnelle à la quantité éluée. Ce détecteur est utilisé pour le dosage des organochlorés par exemple.

Le spectromètre de masse

La spectrométrie de masse (SM) est une technique physique de détection basée sur la mesure du rapport masse/charge (m/z). Elle permet d'identifier avec une grande précision les molécules séparées dans le système chromatographique en mesurant le rapport m/z de l'ion moléculaire, mais aussi en étudiant leurs profils de fragmentation dans des conditions analytiques définies. Le mode d'ionisation et l'analyseur du SM les plus utilisés en couplage avec la CPG sont respectivement l'impact électronique et l'analyseur quadripolaire. Ces SM peuvent être simples ou en tandem (deux analyseurs utilisés en même temps avec une chambre de collision). Le couplage CPG-SM est une technique de référence en toxicologie, aussi bien pour la recherche large que pour le dosage. La commercialisation des bibliothèques spectrales a beaucoup facilité les recherches toxicologiques. Cependant, même si son utilisation est rendue de plus en plus aisée par l'amélioration des systèmes et de leur informatique, elle nécessite encore un personnel spécialisé et un budget d'investissement non négligeable.

La chromatographie en phase liquide à haute performance

La chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) a permis de s'affranchir des inconvénients de la CPG. Elle permet d'analyser des molécules de hauts poids moléculaires, thermolabiles et non volatiles [9]. La ou les phases stationnaires se présentent sous forme de colonnes de plus en plus courtes (de quelques centimètres) et de chimies très variées dont le choix est fonction de l'application analytique. La phase mobile est liquide : un solvant dont la nature change en fonction des substances à analyser. La CLHP a pris son essor au début des années 1970 et n'a cessé depuis de progresser. Comme la CPG, la CLHP doit être couplée à un détecteur pour identifier les substances éluées. Les détecteurs les plus utilisés en toxicologie sont les suivants [9].

Le détecteur ultraviolet-visible

C'est un détecteur utilisé pour toute substance contenant des chromophores dans sa structure, et donc susceptible d'absorber dans le domaine spectral UV-visible. Le détecteur peut fonctionner en longueur d'onde fixe (applicable surtout pour les dosages) ou en mode de balayage spectral (c'est le cas des détecteurs à barrette de diodes) applicable pour la recherche toxicologique large. Là encore, la disponibilité des bibliothèques spectrales a facilité l'utilisation de ce couplage dans le screening toxicologique.

Le détecteur à fluorescence

Ce détecteur est utilisé pour détecter toute substance fluorescente ou rendu fluorescente après une modification chimique (dérivation). Pour l'analyse, on doit fixer deux longueurs d'onde, une d'excitation et l'autre d'émission. Le détecteur à fluorescence est généralement plus sensible que le détecteur UV-visible. Le couplage CLHP-fluorimètre est surtout utilisé pour les dosages toxicologiques.

Le spectromètre de masse

Le couplage CLHP-spectromètre de masse (SM) représente une vraie avancée technologique, qui a beaucoup contribué au développement de la toxicologie analytique. Plusieurs modes d'ionisation pour la génération des ions peuvent être utilisés en toxicologie, mais l'ionisation par *electrospray* en mode positif ou négatif est le plus répandu. L'analyseur le plus courant est l'analyseur quadripolaire ; d'autres peuvent cependant être cités, comme la trappe ionique ou le temps de vol (TOF, pour *time of flight*). L'utilisation relativement récente en toxicologie du TOF a révolutionné ces analyses, puisqu'il permet d'analyser en mode haute résolution – aussi qualifié de « masse exacte ». Les systèmes disponibles sur le marché sont le plus souvent des tandems simples (triple quadripôles) ou parfois des systèmes hybrides (quadripôle-TOF). Ces

systèmes apportent des précisions analytiques rarement égalées, mais nécessitent un personnel hautement qualifié, un budget d'acquisition très important et un budget de fonctionnement non négligeable.

Méthodes d'analyse atomiques

Certains métaux et métalloïdes représentent des sources redoutables d'intoxication, dont la recherche et le dosage dans les matrices biologiques (ou autres) nécessitent une préparation particulière des échantillons et des techniques analytiques spéciales. En fonction de la matrice biologique, de l'élément à doser et de la technique analytique, la préparation de l'échantillon peut être une simple dilution dans de l'eau (en présence ou non d'autres additifs) ou une minéralisation en voie sèche ou en voie humide. Le développement de la minéralisation assistée par micro-ondes a beaucoup amélioré la qualité de ce type d'analyse ; l'acquisition d'un four à micro-onde nécessite cependant un budget non négligeable [10].

Plusieurs méthodes d'analyses des métaux ont été développées, mais la spectrométrie d'absorption atomique (SAA) et la spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP) sont les plus utilisées en toxicologie.

La spectrométrie d'absorption atomique

La SAA est une technique physique d'analyse atomique basée sur l'absorption de photons par des atomes à l'état fondamental. La source d'énergie est le plus souvent une lampe à cathode creuse spécifique d'un ou de plusieurs éléments (lampes multiélémentaires) [11]. Pour la génération des atomes deux modes peuvent être cités [11].

Atomisation par nébulisation dans une flamme

Un ensemble mécanique, appelé brûleur, alimenté par un mélange gazeux combustible/comburant (en général acétylène/air), produit une flamme située dans le trajet optique du système. L'échantillon mis en solution aqueuse est aspiré et nébulisé dans ce mélange gazeux. La flamme réalise la minéralisation et l'atomisation des échantillons. Ce mode n'est applicable que pour les métaux présents en quantités relativement élevées dans les prélèvements biologiques (de l'ordre du milligramme par litre), comme le cuivre et le zinc.

Atomisation électrothermique ou mode four

Le dispositif d'atomisation est un tube en graphite comportant une petite nacelle destinée à recevoir une quantité d'échantillon (quelques microlitres). Ce tube, dont l'axe central se superpose à l'axe optique du spectrophotomètre, fait office de résistance électrique. Il est susceptible d'atteindre, par effet Joule, plus de 3 000 °C. Ce mode d'atomisation est nettement plus sensible que le premier et permet de doser les éléments présents à l'état de traces

(de l'ordre du microgramme par litre) dans le milieu biologique.

Génération des hydrures, vapeur froide

Certains éléments, comme le sélénium et l'arsenic, présentent une mauvaise sensibilité que l'on peut améliorer en recourant à la méthode des générations des hydrures. Le principe repose sur la formation d'un hydrure volatil en présence d'un réducteur (le plus souvent le NaBH_4) en milieu acide. Les hydrures sont par la suite véhiculés par un gaz inerte (argon) pour être analysés en mode flamme.

Un cas particulier est le mercure, qui ne forme pas d'hydrure mais est réduit par un réducteur (NaBH_4 ou, mieux, SnCl_2) à l'état métallique volatil et analysé sans flamme (méthode de la vapeur froide).

Dans la SAA, le bruit de fond et les interférences spectrales ne sont pas négligeables (surtout en mode four) que même une bonne préparation de l'échantillon ne permet pas d'éliminer totalement. De ce fait, l'utilisation de systèmes de correction du bruit de fond est souvent obligatoire. Dans ce cadre, on peut citer la correction à deutérium, la correction Zeeman et la correction dite *self-reversal*, plus connue sous la méthode de Smith et Hieftje. Enfin, il faut préciser que la SAA est une technique mono-élémentaire qui ne permet en général d'analyser qu'un seul élément à la fois.

La spectrométrie à plasma à couplage inductif

L'ICP est une technique physique d'analyse atomique basée sur l'utilisation d'un plasma d'argon – une source hautement énergétique dont la température peut atteindre 10 000 °C. L'échantillon liquide est introduit dans le plasma par un nébuliseur, et la détection des métaux se fait soit par émission atomique (atomes excités), captés par un détecteur (ICP-OES pour *optical emission spectrometer*), soit par couplage avec un spectromètre de masse (ICP-SM) après ionisation des atomes [11, 12]. L'ICP permet d'analyser plusieurs éléments à la fois et sa sensibilité dépend de la technique de détection. L'ICP-SM est nettement plus sensible que l'ICO-OES [12].

Des couplages particuliers peuvent être utilisés, comme CLHP-ICP-SM ou CPG-ICP-SM, pour les analyses de spéciation ; ils sont cependant réservés à des laboratoires spécialisés.

La démarche analytique en toxicologie

Le toxicologue analyste est tenu d'optimiser au mieux les moyens dont il dispose pour répondre à la demande d'analyse. Les instruments analytiques doivent être qualifiés et étalonnés et les méthodes validées selon les référentiels en vigueur. Le technicien doit vérifier avec soin les résultats de l'analyse en utilisant les contrôles de

qualité, s'ils existent, et déceler les éventuels pièges analytiques pour assurer un résultat fiable au toxicologue. Ce dernier procédera à une validation biologique en confrontant le résultat de l'analyse au tableau clinique ; un bon dialogue toxicologue-médecin traitant est primordial.

Si le choix de la matrice biologique est fonction de la cinétique du toxique et du délai postexposition, le choix de la méthode analytique dépend de la nature de la demande. Pour la recherche toxicologique large, dite « tous azimuts », l'utilisation des méthodes séparatives est en général obligatoire ; la barrette de diodes ou la SM sont les plus utilisées (CPG-SM, CLHP-SM, CLHP-barrette de diodes) [13]. Pour le dépistage toxicologique, toutes les méthodes peuvent être utilisées à condition qu'elles soient suffisamment sensibles et spécifiques. Les méthodes dédiées au dosage doivent être validées avec une spécificité et une sensibilité très bonnes. Des contrôles qualité à plusieurs niveaux sont souvent utilisés pour rendre un résultat quantitatif.

Conclusion

La prise en charge d'une intoxication est une approche pluridisciplinaire engageant à la fois le clinicien, le biologiste et le toxicologue. Les investigations toxicologiques ne supplantent jamais l'expérience clinique dans le diagnostic d'une intoxication. Elles ne doivent pas être le point de départ de l'évaluation clinique mais son aboutissement.

Le laboratoire de toxicologie peut apporter au clinicien une aide précieuse en confirmant le diagnostic ou en écartant une intoxication, et en permettant une documentation analytique. Des technologies comme la CLHP-SM, la CPG-SM et l'ICP-SM ont apporté une avancée phénoménale aux investigations toxicologiques.

Liens d'intérêt : Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. Alapat PM, Zimmerman JL. Toxicology in critical care unit. *Chest* 2008 ; 133 : 1006-13.
2. Goullé JP, Saussereau E, Lacroix C. Analyse toxicologique en urgence. In : Danel V, Mégarbane B, eds. *Urgences toxicologiques de l'adulte*. Rueil-Malmaison : Arnette, 2009.
3. Flanagan RJ, Braithwaite RA, Brown SS, Widdop B, Wolff FA. *Basic analytical toxicology*. Geneva : WHO, 1997.
4. Deveaux M. Alcool éthylique. In : Kintz P, ed. *Traité de toxicologie médico-judiciaire*, 2^{ème} édition. Paris : Elsevier Masson, 2012.
5. Labat L, Deveaux M. Immunoanalyse et toxicologie. *Ann Toxicol Anal* 2009 ; 21(1) : 1-2.

-
6. Richard L, Abderrahim N, Collin E. Intoxications par les benzodiazépines et les antidépresseurs tricycliques : comparaison des résultats obtenus par les tests EMIT et l'HPCL avec détecteur à barrettes de diodes. *Rev Fr Lab* 2008 ; 402 : 81-2.
7. Lefebvre P. Différent type de chromatographie. In : Hainque B, Baudin B, Lefebvre P, eds. *Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire*. Paris : Flammarion, 2008.
8. Gramond JP, Lefebvre P. Chromatographie en phase gazeuse. In : Hainque B, Baudin B, Lefebvre P, eds. *Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire*. Paris : Flammarion, 2008.
9. Lefebvre P, Menet MC. Chromatographie liquide à haute performance. In : Hainque B, Baudin B, Lefebvre P, eds. *Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire*. Paris : Flammarion, 2008.
10. Laurence L. La préparation des matrices biologiques pour l'analyse des métaux. *Ann Toxicol Anal* 2010 ; 22 : 81-8.
11. Poupon J. Spectrométrie d'absorption et d'émission atomique. In : Hainque B, Baudin B, Lefebvre P, eds. *Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire*. Paris : Flammarion, 2008.
12. Poupon J. Analyse des molécules inorganiques et des éléments minéraux par spectrométrie de masse en plasma induit. In : Hainque B, Baudin B, Lefebvre P, eds. *Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire*. Paris : Flammarion, 2008.
13. Mathieu O, Gutknecht S, Barnay F, Berthezene JM, Bongrand AF, Mathieu-Daude JC. Screening toxicologiques par LC-MS : bilan après un an de pratique en urgence hospitalière. *Ann Toxicol Anal* 2005 ; 17 : 21-6.