

**UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA**

**Faculté des Sciences de l'Ingénieur**

Département de Chimie Industrielle

# **MEMOIRE DE MAGISTER**

Spécialité : Génie des Procédés

## **EXTRACTION ET ANALYSE DES XENOBIOTIQUES A PARTIR DES CHEVEUX.**

Par

**DEMED Hamoud**

Devant le jury composé de :

R. ISSAADI	Professeur, U.S.D de Blida	Président
N.M. MOULAI	Professeur, U.Y.F. de Médéa	Examineur
M. EL-HATTAB	Docteur , U S. D. de Blida	Examineur
H. BOUTOUMI	C.C., U S.D. de Blida	Rapporteur

Blida, Juillet 2009

**UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA**

**Faculté des Sciences de l'Ingénieur**

Département de Chimie Industrielle

# **MEMOIRE DE MAGISTER**

Spécialité : Génie des Procédés

## **EXTRACTION ET ANALYSE DES XENOBIOTIQUES A PARTIR DES CHEVEUX.**

Par

**DEMED Hamoud**

Devant le jury composé de :

R. ISSAADI	Professeur, U.S.D de Blida	Président
N.M. MOULAI	Professeur, U.Y.F. de Médéa	Examineur
M. EL-HATTAB	Docteur , U S. D. de Blida	Examineur
H. BOUTOUMI	C.C., U S.D. de Blida	Rapporteur

Blida, Juillet 2009

## Résumé

La détection des xénobiotiques dans les cheveux est une discipline nouvelle en toxicologie légale. Le cheveu possède la propriété unique d'être le marqueur des expositions répétées ou chroniques, permettant en outre d'établir le profil de consommation à long terme et son évolution.

À travers cette étude, nous avons mis en évidence par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse la présence dans les cheveux des alcaloïdes (Nicotine, Caféine et Théobromine). Le mode d'incorporation s'est avéré endogène à partir des analyses urinaires.

D'autre part, la recherche des benzodiazépines (Bromazépam, Clonazépam) dans cette matrice par la même technique n'a pas donné de résultat du fait de leurs faibles concentrations.

**Mots clés:** Analyse des cheveux, Caféine, Nicotine, Clonazépam, Bromazépam.

## **Abstract**

The xenobiotic detection in hair is a new discipline in forensic toxicology. The hair has the single property to be the tracer of repeated or chronic exposures, allowing moreover to establish the long-term profile of consumption and its evolution.

Through this study, we have underscored by gaseous phase chromatography coupled with the mass spectrometry GC/MS the presence of alkaloids in the hair (Nicotine, Caffeine and Theobromine). The mode of incorporation proved to be endogenous from the urinary tests.

Moreover, the research for benzodiazepines (Bromazépam, Clonazépam) in this matrix by the same method was unfruitful as a result of their weak concentrations.

**Key words:** Hair analysis, Caffeine, Nicotine, Clonazépam, Bromazépam.

## الملخص

الكشف عن "الكزينووبيوتيك" في الشعر هو علم جديد في مجال السمامة "توكسيكولوجي" الشرعية. إن الشعرة تملك الخاصية الفريدة لتكون مؤشرا لتعرضات متكررة أو دائمة كما انها تمكن من تبين استهلاك طويل المدى لهته المواد وتطوره.

من خلال هذه الدراسة ،قمنا بإبراز بواسطة تحليل "كروماتوغرافي" أثناء المرحلة الغازيةالمقرنة بالطفيه المكتلة وجود الكلويدات "نيكوتين، كافيين وثيوبرومين" بالشعرتبين أن طريقة الادمج ظهرت داخلية المصدر انطلاقا من التحاليل البولوية .

من ناحية أخرى البحث عن "بنزوديازيبين " (برومازيپام، كلونازيبام) في هذا القالب بنفس التقنية ظهر غير مثمر بسبب ضعف تركيزهم.

**الكلمات المفتاحية:** تحليل الشعر، كافيين، نيكوتين، كلونازيبام، برومازيپام .

# Remerciements

Je remercie le bon Dieu, le clément et le miséricordieux qui m'a donné le courage, la force et la patience de terminer cette étude.

Ce travail a été réalisé au Laboratoire Analytique du Centre de Recherche et de Développement du Ministère de la Défense Nationale (CRD/MDN) de Blida, ce qui me donne l'occasion de manifester ma gratitude au Directeur du centre, Mr AGOUN H., pour son aide.

Je remercie vivement Mr Boutoumi Houcine, chargé de cours à l'Université Sâad Dahleb de Blida, pour m'avoir encadré. Je lui suis très reconnaissant d'être resté toujours disponible, pour sa grande écoute et bien sûr pour toutes les discussions scientifiques indispensables à ce travail.

Je remercie Mr Houari, chef de Département de Chimie Industrielle, et Mr Ouazzane chef du Post Graduation au sein du même département de l'université Sâad Dahleb de Blida pour leurs orientations précieuses.

Je remercie vivement Mr ISSAADI Rachid professeur à l'Université Sâad Dahleb de Blida pour sa gentillesse, pour ses conseils et pour avoir accepté de présider ce jury et évaluer mon travail.

Je remercie très chaleureusement Mr MOULAI N. M. professeur à l'Université Yahia Fares de Médéa d'avoir accepté de faire partie de ce jury, pour ses orientations et sa disponibilité.

Je remercie Mr El-Hattab Mohamed maître de conférences à l'université Saad Dahleb de Blida d'avoir accepté également de faire partie à ce jury et pour le temps qu'il y a consacré.

Je remercie Mr Nacer Wahib professeur à l'université Sâad Dahleb de Blida pour sa gentillesse, sa bonne humeur pour ses conseils scientifiques précieux et pour son grand soutien moral et son écoute qui m'on été d'un grand réconfort.

Je remercie aussi le Professeur Ridouh Bachir de l'hôpital Frantz Fanon de Blida qui m'a permis d'accéder à son service de toxicomanie et d'aide aux toxicomanes ; et de réaliser des prélèvements de cheveux sur des patients.

J'adresse mes remerciements au responsable du Département Physique-Chimie et à tous mes collègues du Laboratoire Analytique du Centre de Recherche et de Développement de Blida : Sofiane, Krim, Bilel, Hichem et Nadjia pour leur bonne humeur, leurs nombreux conseils et leur soutien continu durant ce travail.

Un immense merci à mes parents pour m'avoir permis de réaliser ces longues études et à ma femme pour m'avoir toujours soutenue et encouragée dans cette voie. Toutes les personnes, qui ont contribué à ce que je mène à bien ce travail.

## TABLE DES MATIERES

RESUME.....	13
REMERCIEMENTS.....	
TABLE DES MATIERES.....	
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX.....	
INTRODUCTION.....	13
1. LES CHEVEUX.....	16
1.1 Anatomie et physiologie du cheveu.....	16
1.1.1 La tige.....	17
1.1.2 La racine.....	18
1.2 Croissance du cheveu.....	18
1.3 Voies d'incorporation des xénobiotiques dans les cheveux .....	20
1.3.1 Mécanismes d'incorporation des xénobiotiques .....	20
1.3.2 Les paramètres influents sur l'incorporation.....	24
1.3.3 Avantages et limites d'utilisation de l'analyse de cheveux.....	26
2. HISTORIQUE SUR L'ANALYSE DES CHEVEUX ET TECHNIQUES D'EXTRACTION.....	29
2.1 Analyse des cheveux.....	29
2.1.1 Les opiacés .....	30
2.1.2 La cocaïne.....	32
2.1.3 Le cannabis.....	33
2.1.4 Les amphétamines et leurs dérivés.....	34
2.1.5 Les benzodiazépines.....	34
2.2 Techniques d'extraction.....	35
2.2.1 Extraction après incubation par la protéinase K.....	36
2.2.2 Extraction avec le mélange base-méthanol.....	36
2.2.3 Extraction avec le mélange acide-méthanol [méthanol:acide trifluoro- acétique (TFA) .....	36
2.2.4 Extraction après incubation au tampon de Soërensen.....	37
2.2.5 Extraction après digestion alcaline.....	37
2.2.6 Extraction après digestion enzymatique au Glucuronidase.....	37
2.2.7 Extraction après digestion enzymatique à la protéase.....	37
2.3 Stabilité des principes actifs dans les cheveux.....	38
3. PRESENTATION DES MOLECULES ETUDIEES.....	39
3.1 La caféine .....	39
3.2 La nicotine .....	41
3.3 Les benzodiazépines .....	43
3.3.1 Le clonazéпам.....	44
3.3.2 Le bromazéпам .....	46



4. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE (CG-SM).....	48
4.1 Introduction .....	48
4.2 Le chromatographe en phase gazeuse.....	48
4.3 Le spectromètre de masse.....	51
4.4 Principaux modes d'analyse en CG-SM .....	54
4.5 Conclusion .....	55
5. MISE EN ŒUVRE EXPERIMENTALE.....	57
5.1 Réactifs et matériels.....	57
5.2 Échantillons étudiés.....	58
5.2.1 cheveux et urines de consommateurs de café et/ou de tabac.....	58
5.2.2 cheveux de consommateurs du Rivotril.....	59
5.2.3 cheveux de consommateurs de Léxomil.....	59
5.2.4 cheveux imprégnés.....	60
5.2.5 cheveux de référence .....	60
5.3 Prélèvement des échantillons.....	60
5.4 Traitement des échantillons de cheveux avant analyse .....	61
5.4.1 Décontamination .....	62
5.4.2 Découpage .....	62
5.5 Préparation des échantillons.....	62
5.5.1 Préparation des cheveux contenant de la caféine et/ou nicotine.....	62
5.5.2 Préparation des cheveux contenant du Clonazépam ou du bromazépam.....	62
5.5.3 Préparation des échantillons d'urines contenant de la caféine et/ou nicotine.....	63
5.6 Technique analytique et instrumentation (analyse par CG-SM-IE).....	64
6. RESULTATS ET DISCUSSION.....	65
6.1 Mise en évidence de la caféine et de ses métabolites dans les cheveux....	65
6.2 Mise en évidence de la caféine dans les urines.....	73
6.3 Mise en évidence de la nicotine et de la cotinine dans les cheveux...	76

6.4 Mise en évidence de la nicotine dans les urines.....	80
6.5 Mise en évidence du clonazépam et du bromazépam dans les cheveux.....	84
6.5.1 Mise en évidence du clonazépam dans les cheveux.....	84
6.5.2 Mise en évidence du bromazépam dans les cheveux.....	87
CONCLUSION.....	93
REFERENCES.....	94
APPENDICES .....	99

## LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1	Coupe montrant la structure du cheveu.	16
Figure 1.2	La cuticule.	17
Figure 1.3	Le Cortex.	18
Figure 1.4	Le cycle pilaire.	19
Figure 1.5	Différentes régions de la tête.	19
Figure 1.6	Voies d'incorporation des xénobiotiques dans les cheveux.	21
Figure 1.7	Différentes structures de la mélanine.	25
Figure 3.1	Formule semi-développée de la caféine.	39
Figure 3.2	Métabolites de la caféine	40
Figure 3.3	Formule semi-développée de la nicotine	41
Figure 3.4	Formule semi développée de la cotinine	43
Figure 3.5	Formule semi- développée du clonazépam.	45
Figure 3.6	Métabolisme du clonazépam	45
Figure 3.7	Structure semi- développé du bromazépam.	46
Figure 4.1	Représentation schématique d'une colonne capillaire.	50
Figure 4.2	Schéma d'un appareil de couplage CG-SM.	51
Figure 4.3	Représentation simplifiée d'une trappe ionique.	54
Figure 5.1	Étapes suivies pour la préparation des échantillons de cheveux.	61
Figure 6.1	Mise en évidence de l'étalon de la caféine par CG-SM-IE.	66
Figure 6.2	Spectre de masse de la caféine selon la librairie NIST.	66
Figure 6.3	Comparaison entre le chromatogramme de l'analyse par CG-SM-IE de l'étalon de la caféine et l'extrait des cheveux de référence.	67
Figure 6.4	Mise en évidence de la caféine dans les cheveux du sujet N°1 par CG-SM-IE.	68
Figure 6.5	Résultat de l'identification du spectre de masse obtenu pour l'échantillon du sujet N°1 sur la librairie du NIST.	69
Figure 6.6	Mise en évidence de la théobromine dans les cheveux par CG-SM-IE.	71
Figure 6.7	Spectre de masse de la théobromine selon la librairie NIST.	71

Figure 6.8	Mise en évidence de la caféine dans les urines du sujet N°1 par CG-SM-IE.	73
Figure 6.9	Résultat de l'identification du spectre de masse obtenu pour l'échantillon d'urine du sujet N°1 sur la librairie du NIST.	74
Figure 6.10	Mise en évidence de la théobromine dans l'échantillon U.C.S4 par CG-SM-IE.	75
Figure 6.11	Spectre de masse de la nicotine selon la librairie NIST.	76
Figure 6.12	Chromatogramme CG-SM-IE de l'extrait des cheveux d'une personne non fumeur.	77
Figure 6.13	Mise en évidence de la nicotine dans les cheveux du sujet N°1 par CG-SM-IE.	78
Figure 6.14	Résultat de l'identification du spectre de masse obtenu pour l'échantillon N°3 sur la librairie du NIST.	79
Figure 6.15	Mise en évidence de la nicotine dans les urines du sujet N°3 par CG-SM-IE	80
Figure 6.16	Résultat de l'identification du spectre de masse obtenu pour l'échantillon du sujet N°2 sur la librairie du NIST.	81
Figure 6.17	Mise en évidence de la cotinine dans les urines par CG-SM-IE.	82
Figure 6.18	Spectre de masse de la cotinine selon la librairie NIST.	83
Figure 6.19	Résultats de l'analyse par CG-SM-IE de l'étalon du clonazépam	85
Figure 6.20	Spectre de masse du clonazépam selon la librairie NIST	86
Figure 6.21	Résultats CG-SM-IE d'un extrait de cheveux dans la zone du clonazépam.	86
Figure 6.22	Mise en évidence du standard du bromazépam par CG-SM-IE.	88
Figure 6.23	Spectre de masse du bromazépam selon la librairie NIST.	88
Figure 6.24	Mise en évidence du bromazépam dans des cheveux contaminés.	90
Figure 6.25	Résultat de l'identification du spectre de masse obtenu pour l'échantillon N°2 sur la librairie du NIST.	90
Figure 6.26	Pic du bromazépam silylé (BRZ-TMS)	91
Figure 6.27	Spectre de masse du Bromazépam silylé selon la librairie NIST	92
Figure B.1	Comparaison entre le spectre infrarouge du principe actif extrait du comprimé et celui de la librairie.	
Figure C.1	Mise en évidence de la caféine dans les cheveux du sujet N°2	

	par CG-SM-IE.	
Figure D.1	Mise en évidence de la caféine dans les urines du sujet N°2 par CG-SM-IE.	
Figure D.2	Mise en évidence de la caféine dans les urines du sujet N°3 par CG-SM-IE.	
Figure D.3	Mise en évidence de la caféine dans les urines du sujet N°4 par CG-SM-IE.	
Figure D.4	Mise en évidence de la caféine dans les urines du sujet N°5 par CG-SM-IE.	
Figure E.1	Mise en évidence de la nicotine dans les cheveux du sujet N°2 par CG-SM-IE.	
Figure E.2	Mise en évidence de la nicotine dans les cheveux du sujet N°3 par CG-SM-IE.	
Figure E.3	Mise en évidence de la nicotine dans les cheveux du sujet N°4 par CG-SM-IE.	
Figure F.1	Mise en évidence de la nicotine dans les urines du sujet N°1 par CG-SM-IE	
Figure F.2	Mise en évidence de la nicotine dans les urines du sujet N°2 par CG-SM-IE	
Figure F.3	Mise en évidence de la nicotine dans les urines du sujet N°4 par CG-SM-IE	
Tableau 2.1	Méthodes d'analyse des opiaces dans les cheveux.	30
Tableau 2.2	Concentration de la cocaïne et de ses métabolites dans les cheveux selon Cone.	32
Tableau 2.3	Gammes de concentrations de la cocaïne dans les cheveux.	32
Tableau 2.4	Procédures analytiques pour l'analyse du cannabis dans les cheveux.	33
Tableau 3.1	Principales benzodiazépines commercialisés.	44
Tableau 5.1	Sujets consommateurs de café et/ou de nicotine ayant fait objet d'analyse.	58
Tableau 5.2	Sujets consommateurs de Rivotril ayant fait objet d'analyse	59
Tableau 5.3	Sujets consommateurs de Léxomil ayant fait objet d'analyse	59

Tableau 6.1	Temps de rétention de la caféine dans les échantillons de cheveux étudiés.	68
Tableau 6.2	Structures chimiques des fragments caractéristiques de la caféine.	69
Tableau 6.3	Structures chimiques des fragments caractéristiques de la théobromine.	72
Tableau 6.4	Temps de rétention de la caféine dans les échantillons d'urine étudiés.	73
Tableau 6.5	Structures chimiques des fragments caractéristiques de la nicotine	76
Tableau 6.6	Temps de rétention de la nicotine pour les échantillons de cheveux étudiés.	78
Tableau 6.7	Temps de rétention de la nicotine dans les échantillons d'urine étudiés.	80
Tableau 6.8	Structures chimiques des fragments caractéristiques de la cotinine.	84

## INTRODUCTION

La détection et la quantification de xénobiotiques à l'état de traces à partir de matrices biologiques constituent un défi auquel sont confrontés quotidiennement de nombreux analystes. Les domaines d'application de ce type d'investigations sont divers, et vont des analyses toxicologiques aux tests antidopage en passant par les expertises judiciaires, etc.

La majorité de ces analyses biologiques s'appuient sur les deux matrices urine et sang. L'intérêt principal de ces deux fluides est qu'ils apportent une information certaine et très utile sur la présence ou non de xénobiotiques dans le corps humain. Néanmoins, et à cause de leurs nature même, ils présentent une limitation majeure, celle d'être un milieu d'investigation valable uniquement sur une très courte période de temps, celle qui suit immédiatement l'exposition ou la consommation de xénobiotiques. Cette période est généralement de quelques jours, et peut rarement aller à 1 ou 2 mois pour quelques éléments et composés inorganiques.

Cette limitation a contribué ces dernières années à l'essor d'un nouveau type d'analyses basées sur des matrices dites « alternatives », telles que les cheveux. Cet intérêt est illustré par le nombre de plus en plus important de publications portant sur l'analyse de cette « nouvelle » matrice.

La première étude publiée au sujet de la détermination de xénobiotiques dans les cheveux humains remonte à 1857, et avait pour objectif d'identifier l'arsenic dans les cheveux provenant d'une dépouille qu'on avait exhumée 11 ans après l'enterrement.

Une centaine d'année plus tard, en 1954 plus précisément, des dermatologues qui étudiaient le dépôt des médicaments dans la peau et les phanères de cobayes ont réussi à prouver la possibilité de détection de composés organiques dans les poils de mammifères. Toutefois, cette réussite était limitée par le

manque d'appareils sensibles permettant d'atteindre des limites de détection suffisantes pour généraliser ce type d'analyse.

Dans les années 60 et 70, les cheveux ont surtout été utilisés pour évaluer l'exposition aux métaux lourds comme l'arsenic, le plomb ou le mercure. Ceci a été rendu possible par l'existence de techniques déjà sensibles à l'époque comme par exemple la spectrométrie d'absorption et d'émission atomique.

L'étude qui a vraiment initié le domaine de l'analyse de substances organiques dans les cheveux est certainement celle qui a été menée par Baumgartner et ses collaborateurs en 1979 [1]. Ces derniers ont utilisé une méthode radioimmunologique pour détecter la présence d'opiacés dans les cheveux de personnes dépendantes. C'était la première fois que l'idée de suivi de la concentration des xénobiotiques à partir de cheveux fût introduite.

Depuis cette date, avec l'amélioration notable de la sensibilité des appareils analytiques et le développement des techniques chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse, de nombreux travaux ont pu examiner sous plusieurs angles cette matrice. Comme témoin de l'intérêt croissant porté à l'analyse des cheveux, on dénombrait à la fin des années 90 pas moins de 450 études publiées à ce sujet.

Ces investigations ont permis de montrer qu'il était désormais possible d'identifier et de quantifier des substances qu'on ne retrouvait pas ou très peu dans les autres matrices dites 'classiques' comme l'urine ou le sang. Cette constatation ouvrait un champ immense à tous les analystes pour développer de nouvelles applications et proposer des approches inédites dans le domaine de la toxicologie analytique. En terme de nombre de travaux publiés sur l'analyse de substances organiques dans les cheveux, on retrouve en premier lieu la cocaïne et ses dérivés, suivi par les opiacés et en troisième position les amphétamines. Ces trois familles de composés classées parmi ce qu'on appelle communément 'les drogues usuelles' représentent à elles seules plus de 50% des publications. Toutefois, on assiste depuis quelques années à une réelle diversification des composés étudiés, dont on peut citer notamment les agents dopants (clenbuterol, stéroïdes anabolisants...), les principes actifs (benzodiazépines...) ou les composés du tabac (nicotine...).



Ainsi, cette matrice est devenue aujourd'hui un support complémentaire lors de contrôle antidopage. Ceci étant et afin d'harmoniser les protocoles utilisés par les différents laboratoires et coordonner les efforts entrepris pour résoudre les différents et nombreux problèmes soulevés par l'analyse des cheveux, plusieurs sociétés savantes ont vu le jour, parmi lesquelles on peut notamment citer la ***Society of Hair Testing (SHT)***. La société française de toxicologie analytique (SFTA) a également mis en place une 'commission de cheveux'. Le but principal de ces sociétés est d'œuvrer pour la mise au point de consensus couvrant l'analyse de cheveux depuis le prélèvement jusqu'à la validation et publication des résultats.

Afin de mettre en évidence les intérêts stratégiques de l'analyse des xénobiotiques dans les cheveux, nous nous sommes intéressés à étudier quatre (04) molécules dans les cheveux de personnes consommatrices de café, tabac, Rivotril et Léxomil. Ces molécules ont été récupérées à partir des cheveux par extraction liquide-liquide et identifier par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en mode impact électronique, comme mode d'ionisation CG-SM-IE. La mise en évidence de la voie de pénétration des xénobiotiques dans les cheveux est illustrée par la recherche de ces molécules dans les urines des mêmes personnes.

Par ailleurs et pour répondre aux importantes exigences en termes de sensibilité et sélectivité requise par des échantillons aussi complexe que les cheveux, toutes les manipulations et les analyses devront être soigneusement préparés et bien faites. Les étapes d'extraction, de purification et de concentration des l'échantillons devront faire l'objet d'une attention particulière.

## CHAPITRE 1 LES CHEVEUX.

### 1.1 Anatomie et physiologie du cheveu

Bien que les cheveux puissent paraître de prime abord comme étant une structure primitive, ils constituent en réalité une partie intégrante étonnamment complexe du corps humain [2].

Le cheveu, dont une coupe transversale est représentée sur la figure 1.1 [3], est constitué de deux parties essentielles : la tige libre à la surface du tégument et la racine.

Les poils sont des structures kératinisées propres aux mammifères, produites au niveau d'une invagination de l'épithélium épidermique, le follicule pilo-sébacé. Chacun de ces follicules représente une unité anatomique, constituée du poil proprement dit avec son bulbe pileux, sa racine et sa tige, du follicule, d'une glande sébacée et d'un muscle horripilateur.

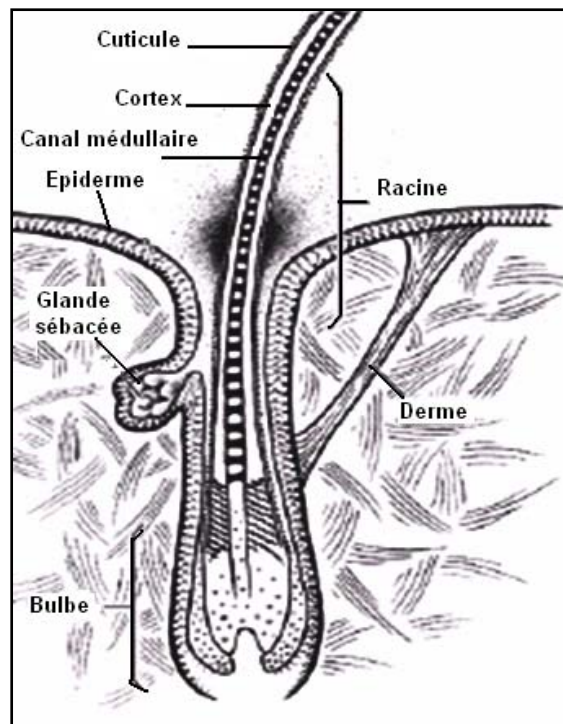


Figure 1.1 : Coupe montrant la structure du cheveu.

L'homme adulte possède environ 5 millions de follicules pileux, et qui donnent naissance aux cheveux, dont un million au niveau de la tête [4]. Une première poussée de poils a lieu vers le 5<sup>ème</sup> ou 6<sup>ème</sup> mois de la vie fœtale : c'est le lanugo.

### 1.1.1 La tige

La tige, qui peut atteindre un mètre de longueur avec un diamètre de 30 à 150  $\mu\text{m}$ , comprend trois couches cylindriques concentriques emboîtées les unes dans les autres.

#### a. La cuticule

Une couche superficielle appelée la cuticule, dont une photo est représentée sur la figure 1.2 [5], est constituée d'une seule assise de cellules riches en soufre, transparentes et aplaties, sans noyau ni pigment. Elle assure la brillance et l'éclat des cheveux tout en les protégeant contre les attaques du milieu extérieur [6].

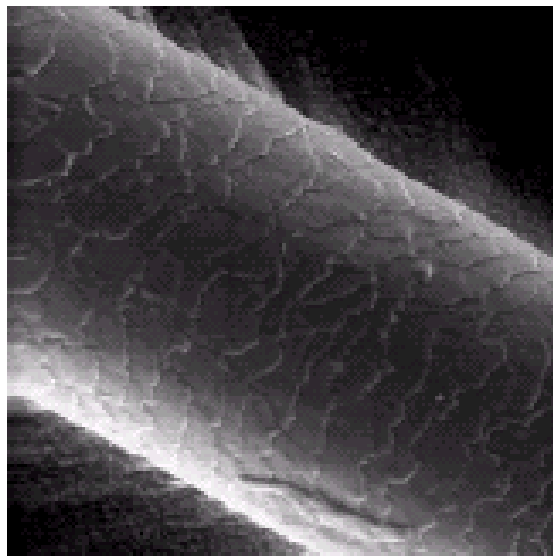


Figure 1.2 : Schéma de la cuticule.

#### b. Le cortex

Le cortex, une couche plus épaisse, figure 1.3, représente en général 80 à 90 % du poids total du cheveu. Cette couche comporte plusieurs strates de cellules constituées essentiellement de protéines dont les  $\alpha$ -kératines (85 à 93%) et la mélanine (pigment dérivant de la tyrosine, responsable de la coloration de la peau,

des yeux et des cheveux), d'eau (3-5%), de lipides (1-9%) et de composés minéraux (0,25 à 0,95%).

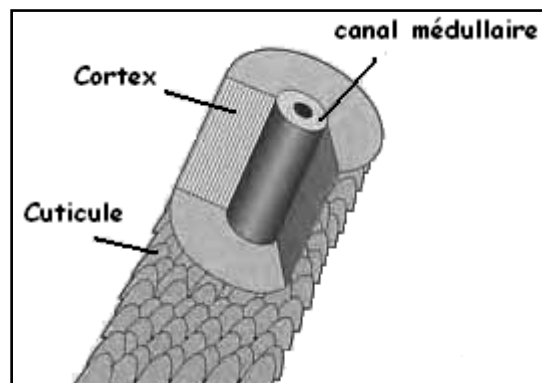


Figure 1.3 : Coupe du Cortex.

### c. Le canal médullaire

Au centre, le canal médullaire est formé des quelques rangées de cellules sans noyaux, séparées par de l'air, et dans lesquelles il n'y a pas de kératinisation ; le canal médullaire n'est présent que dans le cheveu mature.

### 1.1.2 La racine

La racine, entourée d'un follicule pileux, est incluse dans le derme. Son pôle inférieur est renflé en bulbe (le bulbe pileux) qui repose à son tour sur la glande sébacée.

Les poils se développent puis chutent de façon individuelle et cyclique, selon trois phases.

### 1.2 Croissance du cheveu

Nous avons en moyenne entre 100 000 et 150 000 cheveux. Chaque cheveu naît, vit et meurt et pour chaque cheveu qui meurt, un nouveau le remplace. Cette séquence de phase s'appelle le cycle pileux.

La croissance de cheveu passe par trois cycles distincts [2,7-9]. Elles sont représentées sur la figure 1.4.

- La phase anagène (ou de croissance) : La racine du cheveu est profondément située dans le derme, de taille relativement importante, bien pigmentée. C'est

pendant cette phase qu'on assiste à une croissance active et continue du cheveu. Elle dure entre 4 et 6 ans.

- La phase catagène (ou de transition) : c'est une courte période de transition qui dure de 4 à 6 semaines et pendant laquelle le follicule ne fabrique plus de cheveux.
- La phase télogène (ou de repos) : c'est au cours de laquelle que le cheveu ne croît plus. Il est considéré comme mort, et va tomber. Il peut alors facilement être arraché au cuir chevelu, poussé par un nouveau cheveu vivant qui se forme au niveau du follicule pileux. Cette phase est relativement courte et dure environ 10 semaines.

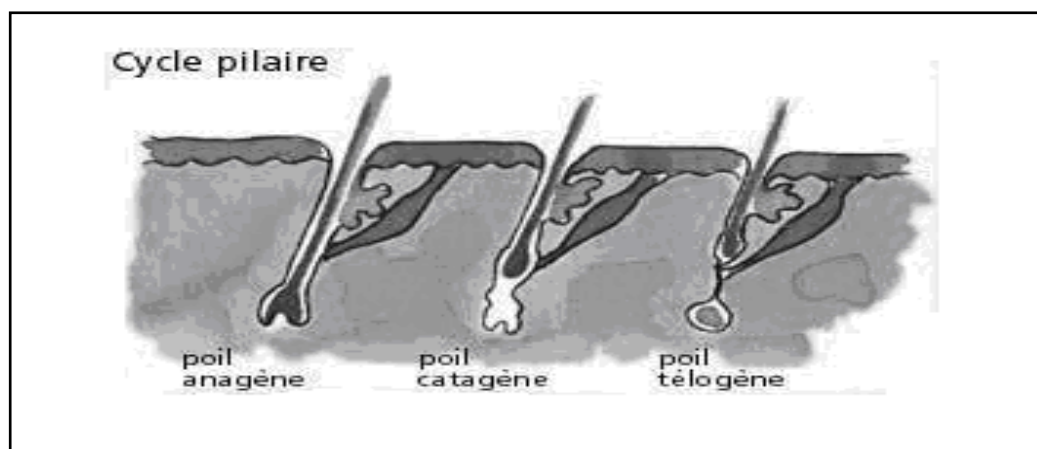


Figure 1.4 : Le cycle pileux.

A un instant donné, environ 85 % des cheveux sont en phase anagène. On considère généralement que les cheveux au niveau du vertex poussent de 0,44 mm/jour, soit 1 à 1,3 cm/mois, avec des variations allant de 0,7 à 1,5 cm/mois.

Le nombre de cycles au cours d'une vie est de 20 à 25 dans le meilleur des cas, c'est-à-dire pour les cheveux des régions occipitales et latérales, figure 1.5 [10]. On admet que la valeur moyenne de pousse est d'environ 1 cm/mois.

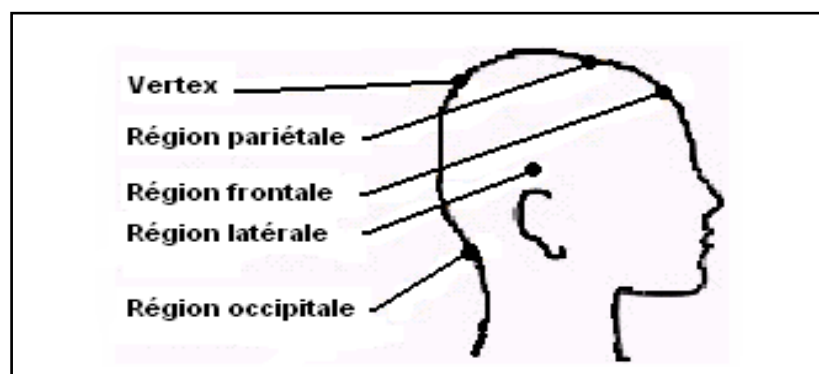


Figure 1.5 : Différentes régions de la tête.

Texture, longueur, couleur, diamètre et taux de croissance sont directement déterminés par le type des cheveux qui dépend à son tour de plusieurs facteurs dont notamment le sexe, l'âge ou l'appartenance à tel groupe ethnique [2,11].

### 1.3 Voies d'incorporation des xénobiotiques dans les cheveux

#### 1.3.1 Mécanismes d'incorporation des xénobiotiques

Sujet de discussion, de controverse, parfois même de polémiques violentes, le mécanisme d'incorporation des xénobiotiques dans les cheveux n'est pas encore bien défini.

De tout le corps humain, les cellules qui forment les cheveux sont parmi les plus rapides en terme de division. En fusionnant pour former le cheveu, les cellules en croissance piègent les substances dans la structure kératinisée. Les cinétiques d'incorporation sont dépendantes des liaisons du xénobiotique incorporé à la mélanine, un pigment des cheveux.

L'hypothèse de liaison à la mélanine est appuyée par deux séries d'expériences. Il semble qu'il existe une différence quantitative d'incorporation suivant la couleur des cheveux, c'est-à-dire en fonction du degré d'oxydation de la mélanine. Les cheveux foncés, présentant un degré d'oxydation plus important de la mélanine, concentrent ou retiennent plus fortement les drogues que les cheveux clairs, à doses ingérées équivalentes. Par ailleurs, il a été observé une nette diminution du contenu en stupéfiants (opiacés, cocaïne) dans les mèches de cheveux décolorés par rapport aux cheveux de couleur naturelle de la même personne.

D'une manière générale, les composés et éléments chimiques peuvent être incorporés dans la matrice pilaire selon trois voies distinctes, figure 1.6.

- Voie endogène, à partir du sang circulant dans les cellules en croissance dans le follicule pileux.
- Voie endo-exogène : essentiellement par la transpiration (sueur, sébum et excréctions transdermales).
- Voie exogène : la fixation des xénobiotiques dans les cheveux pourrait s'effectuer par le biais de l'environnement atmosphérique et concerne plus particulièrement les substances à l'état de particules en suspension. Ainsi, les

substances fumées, comme la nicotine, le cannabis, le crack ou même l'héroïne peuvent se déposer sur toute la longueur du cheveu.

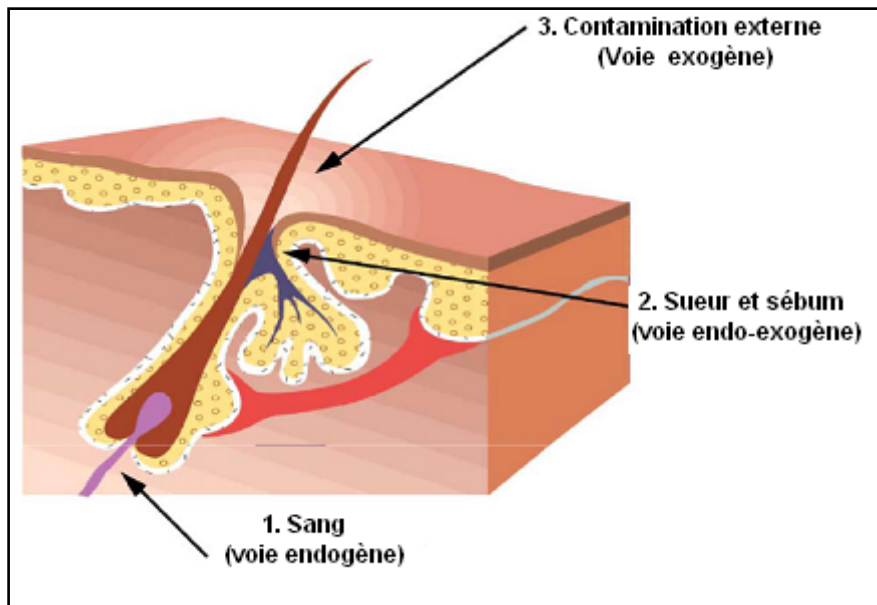


Figure 1.6 : Voies d'incorporation des xénobiotiques dans les cheveux.

Les substances mères sont généralement présentes dans les cheveux ou poils à des concentrations plus élevées que celles de leurs métabolites, alors que dans le sang les rapports sont parfois inversés.

Les substances déposées sur les cheveux par voie passive seraient alors moins bien liées à la matrice, ce qui a conduit les toxicologues à développer des méthodes de décontamination des échantillons. Elles consistent en des lavages, soit par une solution aqueuse, soit par un solvant organique, soit par les deux successivement, pendant différents temps d'incubation et à différentes températures. Des cinétiques de lavage et l'analyse des solutions de décontamination ont révélé que les contaminants étaient très vite éliminés (après deux lavages) et qu'ensuite, d'autres lavages n'avaient plus aucun effet.

L'incorporation se faisant dans tous les poils, si les cheveux ne peuvent être prélevés ou sont manquants, d'autres poils conviennent également, comme les poils pubiens ou auxiliaires.

De plus, avec le débit sanguin, très important au niveau du follicule pileux, les xénobiotiques se trouvent à proximité immédiate et permanente de la région de synthèse et croissance du cheveu.

Parmi ces trois mécanismes, la voie endogène est sans doute la plus importante, car c'est celle qui fait intervenir les composés en présence dans la circulation sanguine et donc réellement ingérés dans le corps. Les deux autres mécanismes, à savoir la voie endo-exogène et la voie exogène, constituent pour le premier un processus difficile à maîtriser car pas forcément répétable, et pour le deuxième un phénomène carrément parasitaire, car source de contamination.

Pour revenir à l'incorporation endogène, il a été constaté et prouvé que les substances qui arrivent à franchir la barrière cellulaire au niveau du bulbe à la racine des cheveux se retrouvent piégées dans la matrice pilaire et se déplacent avec elle sans subir de changement notable au niveau de leur structure. C'est là une des plus importantes caractéristiques de la 'matrice cheveux'. Ce support est capable de conserver intacts et pendant une longue période des composés complexes, sans dénaturation.

Une deuxième propriété toute aussi intéressante consiste à privilégier l'incorporation des molécules mères plutôt que les métabolites. Cette propriété est d'autant plus précieuse que dans les autres matrices urine et sang, on est habitué à retrouver les produits métabolisés et plus rarement les composés précurseurs. Dans le cas des cheveux, bien que le bulbe à la racine des cheveux contienne des enzymes capables théoriquement de métaboliser les substances organiques, cette activité demeure très limitée.

### Diffusion passive

La diffusion passive des xénobiotiques à travers les phospholipides, qui représente 80% de la surface des membranes cellulaires, est le principal mécanisme impliqué. La vitesse d'absorption peut être modélisée par la loi de Fick, équation 1 :



$$V = \frac{dQ}{dt} = \frac{DSK}{e} (C_{ext} - C_{int}) \dots\dots\dots (1)$$

Dans laquelle :

- D : coefficient de diffusion de xénobiotique à travers la membrane, qui dépend de la taille et de l'état d'ionisation de celui-ci ;
- S : surface de la membrane ;
- e : épaisseur de la membrane ;
- K : coefficient de partage du xénobiotique entre la membrane et la phase aqueuse située de part et d'autre ;
- C<sub>ext</sub> et C<sub>int</sub> : concentration du xénobiotique de part et d'autre de la membrane.

Le facteur K fait donc intervenir la lipophilie intrinsèque du composé, mesurée en pratique par son coefficient de partage entre une phase aqueuse à pH 7,4 et une phase organique (octanol ou chloroforme) alors que le facteur D dépend de l'état d'ionisation de ce composé. En effet, pour les composés ionisables, le pourcentage de formes ionisées dépend du pH du milieu, selon les équations d'Henderson-Hasselbalch :

- pour les acides :  $\text{pH} - \text{pKa} = \log [(i)/(ni)]$ .
- pour les bases :  $\text{pH} - \text{pKa} = \log [(ni)/(i)]$

Le coefficient de diffusion D de la forme ionisée (i) d'une molécule est généralement très faible et pourra être considéré comme négligeable en regard du coefficient de diffusion de sa forme non ionisée (ni). Par conséquent, les acides traverseront plus vite les membranes en milieu acide qu'en milieu basique et inversement, les bases traverseront plus vite le double feuillet phospholipidique en milieu basique qu'en milieu acide.

Enfin l'équation de Fick fait intervenir la surface (S) et l'épaisseur (e) des membranes.

### 1.3.2 Les paramètres influant sur l'incorporation

D'une manière générale, la plupart des xénobiotiques sont des composés basiques ou faiblement acides, qui existent par conséquent sous les deux formes neutres ou ionisées dans les fluides biologiques. Les membranes cellulaires lipidiques affichent une faible perméabilité aux molécules polaires. Seules les molécules neutres, suffisamment lipophiles sont capables de traverser cette membrane. Une fois dans la cellule, la molécule va se dissocier en fonction de son pKa. On dit que cette réaction de dissociation est pH-dépendante. Ceci a pour résultat une distribution inégale des substances dans les différents tissus en fonction du pH physiologique de ces derniers.

Comme résultat de ce mécanisme préférentiel, on sait par exemple que les molécules basiques diffusent mieux dans les tissus de plus faible pH.

Le pH isoélectrique des protéines constituant les cheveux est estimé à environ 6, et montre clairement la nature légèrement acide de cette matrice, et par conséquent la bonne incorporation des composés basiques. C'est aussi pour ces raisons que se sont principalement les composés lipophiles et neutres (généralement les composés précurseurs) qu'on retrouve en forte concentration dans les cheveux en comparaison des composés hydrophiles et ionisés (comme la plupart des métabolites), même si ces derniers ont une demi-vie plus longue.

Un autre point important à considérer est l'affinité à la mélanine. Contrairement à la plupart des cellules de la matrice pileuse, les mélanocytes représentent une catégorie bien spéciale, avec un pH intercellulaire qui varie entre 3 et 5 environ. Ces valeurs de faible pH procurent à ces cellules un grand pouvoir d'accumulation des xénobiotiques basiques.

#### La mélanine

Les mélanines sont des pigments synthétiques ou naturels dérivés de l'oxydation et la polymérisation de plusieurs précurseurs, exemple : L-dopa, tyrosine et la cystéine. Leurs fonctions principales sont de protéger le tissu interne contre les radiations UV. Les observations d'interactions des drogues avec les tissus pigmentés ont été reportées depuis les années 50. Les mélanines sont des polymères d'une

structure largement irrégulière d'unité de pyrrol contenant des groupes carboxyliques et hydroxyle phénolique, souvent associés aux protéines. Elles sont classées en mélanines contenant du soufre (phéomélanines) et des mélanines ne contenant pas de soufre (eumélanines) et cela en se basant sur des résultats d'analyses élémentaires [12].

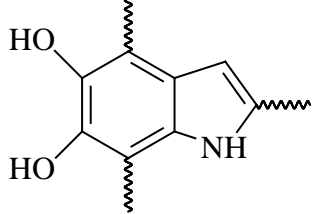
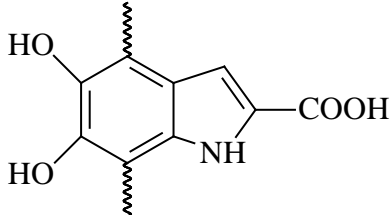
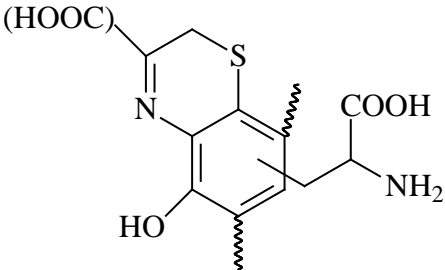
<p>Monomère eumélanine qui domine dans la mélanine noire.</p>	
<p>Monomère eumélanine qui domine dans la mélanine brune</p>	
<p>Monomère phéomélanine</p>	

Figure 1.7 : Différentes structures de la mélanine.

Du fait qu'il n'y a pas une grande différence entre la mélanine naturelle et la mélanine synthétique [13], plusieurs auteurs ont démontré l'affinité des mélanines pour plusieurs drogues par des études *in vivo* et *in vitro*. Parmi les drogues qui ont été étudiées on peut noter la cocaïne [14], l'impiramine [15], la quinine [16] et l'halopéridol [17].

L'étude réalisée par Anne-Francoise Aubry [18] porte sur l'application de l'affinité chromatographique à l'étude des interactions drogue-mélanine. D'autres

auteurs ont employé, pour voir l'affinité drogue- mélanine, des colonnes remplies de poudre de cheveux humains [19]. Ces derniers ont noté que des différences significatives sont observées entre les cheveux non traités et les cheveux traités par des produits cosmétiques (blanchis). M. Salazar et ses collaborateurs ont étudié le phénomène en utilisant des ligands radiolabels [20].

Des expériences, *in vitro*, réalisés par L. Potsch [21] sur les interactions du H3-cocaine à la mélanine confirment l'existence des sites de liaison entre drogues et granules de mélanine. Les résultats suggèrent que la liaison drogues- surface de mélanine soit analogue à une adsorption d'une drogue sur un solide et suit une isotherme d'adsorption de Langmuir de type 1.

En résumé, l'incorporation des xénobiotiques dans les cheveux est influencée par plusieurs paramètres :

- La taille et la structure du xénobiotique,
- Le degré d'affinité avec la mélanine,
- Le gradient de concentration et de pH de part et d'autre de la membrane des cellules en formation,
- Le débit sanguin, les liaisons plus ou moins fortes des xénobiotiques avec les protéines présentes dans le plasma,
- La lipophilie,
- Le taux d'ionisation des molécules considérées (taux directement dépendant de la valeur du pKa).

Les valeurs les plus importantes sont très probablement l'affinité à la mélanine, la lipophilie et la basicité (pKa).

### 1.3.3 Avantages et limites d'utilisation de l'analyse des cheveux

#### a. Avantage de l'étude des cheveux

Grâce à leur capacité à conserver et à accumuler les drogues, l'étude des cheveux offre plusieurs avantages dans le contexte du dépistage des toxicomanies et du contrôle antidopage et représente un outil complémentaire aux analyses d'urines. On peut noter que :

- Le prélèvement étant non invasif, les cheveux sont relativement faciles à collecter. Ils sont, par contre, plus faciles à dénaturer pour falsifier le test.
- Grâce à sa nature même, le cheveu est une matrice stable, facile à conserver (une conservation à l'abri de la lumière, mais à température ambiante est suffisante) sans problème de détérioration, ce qui est particulièrement utile dans le contexte médico-légal ou des contre-expertises peuvent être demandées.
- Dans l'urine, les drogues ne sont détectables que si le prélèvement a lieu 2 à 3 jours au maximum après la dernière consommation de drogues. Dans les cheveux, la fenêtre de détection des drogues est beaucoup plus longue, mais ne donne pas assez d'information le premier mois.
- Bien que les teneurs des xénobiotiques dans les cheveux ne puissent pas toujours être corrélées avec les doses administrées, il est possible d'obtenir des renseignements sur l'évolution de la toxicomanie, sur les périodes de forte consommation et les périodes d'abstinence d'un individu.
- Cette matrice offre la possibilité de faire des analyses segmentaires qui peuvent être très utiles pour l'étude de l'évolution d'une toxicomanie ou d'un programme de sevrage. Le principe est simple : il est basé sur le découpage des cheveux par segments de 1 cm environ, correspondant à la pousse mensuelle moyenne. L'examen de ces différents fragments permet dans le cas idéal de tracer l'historique d'incorporation (et donc de consommation) mois après mois. Ce genre d'analyse est largement utilisé dans le domaine toxicologique et d'expertise judiciaire (pour prouver l'arrêt définitif de consommation de drogues par exemple)
- Dans le cas post-mortem où le corps est déjà en voie de décomposition avancée, le cheveu reste en général intact et permet toujours un examen toxicologique.
- Enfin, le cheveu est un échantillon permanent, en effet il est possible de refaire un nouveau prélèvement et une nouvelle analyse en tout moment en cas de nécessité.

Néanmoins, l'analyse des cheveux présente aussi certains inconvénients.

### b. Inconvénients liés à l'analyse de cheveux

Hormis les nombreux avantages cités précédemment, le cheveu n'en demeure pas moins une matrice complexe. Ceci va induire quelques inconvénients, dont toute analyse devra tenir compte. Parmi ces inconvénients, nous pouvons relever les points suivants :

- Les possibilités d'incorporation des drogues par contamination extérieure nécessitent certaines précautions et des procédures de lavage soigneuses avant les analyses proprement dites.
- L'influence de la nature chimique de la molécule qui détermine de façon majeure le mode d'incorporation dans la matrice pilaire, et donc le domaine des concentrations détectées.
- Plusieurs études ont montré l'influence de l'origine ethnique et de la couleur du cheveu sur l'incorporation des drogues.
- Il faut aussi noter l'influence des traitements cosmétiques du cheveu (coloration, décoloration, ...) qui peuvent modifier le mécanisme de fixation des xénobiotiques dans les cheveux ainsi que leurs concentrations
- La quasi-impossibilité de faire des corrélations entre la quantité détectée dans les cheveux et la dose de drogue ingérée.

## **CHAPITRE 2 HISTORIQUE SUR L'ANALYSE DES CHEVEUX ET TECHNIQUES D'EXTRACTIONS**

### 2.1 Analyse des cheveux

Jusqu'à présent, l'analyse des cheveux est employée d'une manière routinière dans la détection des drogues en médecine légale, médecine de travail et en toxicologie clinique. Les scientifiques ont exprimé beaucoup d'intérêt quand au rôle de l'analyse des drogues dans les cheveux pour des applications toxicologiques. La société de toxicologie légale et la société d'analyse des cheveux (Société of Hair Testing) ont publié un consensus d'opinion portant sur les zones d'ombres sur l'état actuel des connaissances quand à l'incorporation et la détection des drogues dans les cheveux.

Dans une revue publiée par Müller en 1992 [22], l'auteur a montré que la plupart des analyses de dépistage des drogues dans les cheveux étaient basées sur l'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse CG-SM. Dans les années qui ont suivi, la CG-SM reste la technique la plus utilisée. La comparaison entre les différents procédés d'extractions a montré que les résultats sont plus ou moins similaires s'il s'agit de la même drogue.

La plupart des études récentes ont utilisé la CG-SM en mode impact électronique (IE), mais dans des cas spécifiques, où la sensibilité est cruciale, l'ionisation chimique négative (ICN) ou même la CG-SM-SM, ont été adoptées.

Des travaux utilisant la radio-immunoessai (RIA) ont été publiés, parmi lesquels les travaux de Magura et collaborateurs [23] sur la consommation de la cocaïne et les travaux de Wang et collaborateurs sur la détection du fentanyl dans les cheveux [24]. Pour la détermination des benzodiazépines, l'utilisation de la chromatographie en phase liquide (CLHP) combinée au DAD devient de plus en plus importante. L'extraction par fluide supercritique a été introduite comme une nouvelle méthode d'extraction, et

l'analyse par électrophorèse capillaire de plus en plus utilisée dans la détection des drogues dans les cheveux.

### 2.1.1 Les opiacés

Le développement des méthodes utilisées pour l'analyse des opiacés dans les cheveux durant les cinq dernières années est étroitement lié aux nouvelles méthodes de dépistage de cette famille de molécules. Les techniques les plus utilisées dans la littérature pour l'extraction et l'analyse des opiacés sont résumées dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1 : Méthodes d'analyse des opiacés dans les cheveux.

Référence	Kintz et Mangin [25]	Moeller et al [26]	Kauert et Röhrich [27]
<b>Analytes</b>	Héroïne Codéine Dihydrocodéine	Héroïne Codéine Dihydrocodéine	Héroïne Codéine Dihydrocodéine
<b>Décontamination</b>	Dichlorométhane (5ml, 2 x 5mn).	Eau (2 fois 20 ml), Acétone (20 ml)	Bain ultrason avec successivement 5 ml d'eau, acétone, éther de pétrole.
<b>Extraction</b>	Solution acide (0,1 M HCl) (16h, 56°C).	Hydrolyse enzymatique (1h30, 40°C)	Méthanol au bain ultrason (5 h, 50°C)
<b>Dérivatisation</b>	Avec	Avec	Avec
<b>Identification</b>	-	CG-SM-IE	CG-SM-IE

La méthode d'extraction liquide-liquide introduite par Kintz et Mangin [25] et celle de Moëller et collaborateurs [26] utilisant l'extraction en phase solide après hydrolyse enzymatique avec la  $\beta$ -glucuronidase/sulfatase, conduisent vers des résultats pratiquement identiques, le seul inconvénient est que l'héroïne doit être hydrolysée en morphine avant son analyse. L'extraction par le méthanol était bien connue depuis le



début des années 90, mais elle n'a été publiée en détail qu'en 1996 par Kauert et Röhrich [27]. C'est certainement la méthode la plus simple avec la sensibilité la plus élevée pour l'héroïne, mais en contre partie avec la plus mauvaise sensibilité à ses métabolites. En 1995, Rothe et Pragst [28] ont confirmé à travers leurs travaux qu'un taux d'extraction élevé est obtenu en utilisant le mélange méthanol – eau.

Une nouvelle méthode d'extraction pour la détermination des opiacés dans les cheveux a été développée par Edder et collaborateurs [29] en utilisant le CO<sub>2</sub> supercritique. Cette méthode a été testée pour l'extraction simultanée d'héroïne, morphine, MAM et méthadone. Elle permet une rapidité d'extraction (30 min environ), ce qui représente un grand avantage. Elle permet aussi l'utilisation d'infime quantité de solvants organiques non halogénés. Mais, elle présente des coûts relativement très élevés par rapport aux extractions sur phase solide (E.P.S) ou liquide-liquide (E.L.L).

On peut citer d'autres méthodes non usuelles testées pour l'analyse des opiacés dans les cheveux tels que l'électrophorèse capillaire (E.C) et l'I.R.T.F. Il est à noter cependant qu'il est très difficile d'avoir une bonne sensibilité avec ces méthodes.

Pötsh et collaborateurs [30] ont trouvé une diminution de la teneur en opiacés, atteignant le zéro, après un traitement des cheveux *in vitro* avec des produits cosmétiques ou après une exposition aux radiations U.V. Jurado et collaborateurs [31] ont retrouvé les mêmes résultats en comparant des cheveux de toxicomanes colorés, non colorés, lavés et non lavés, mais la concentration des drogues ne devient très faible que pour des cheveux extrêmement endommagés (fortement exposés).

Les poils pubiens et auxiliaires montrent une plus forte concentration en drogues par rapport aux cheveux du scalp [32,33], ceci est dû, probablement, à leur faible vitesse de croissance.

Elisabeth Vinner [34] a étudié la présence des opiacés dans les cheveux des nouveau-nés et elle a pu révéler la présence de la morphine et la MAM. La présence de ces deux molécules prouve l'exposition des mamans pendant la grossesse.

### 2.1.2 La cocaïne

Selavka et Rieders [35] ont rapporté tous les travaux concernant la cocaïne jusqu'à 1994.

Les travaux de Cone et collaborateurs [36] ont permis la caractérisation lors d'une seule analyse la cocaïne et ses métabolites : benzoylecgonine, ecgonine méthylester, norcocaïne, cocaéthylène et la norcocaéthylène, et cela après une extraction sur phase solide (EPS) à partir des cheveux. Les concentrations obtenues sont résumées dans le tableau 2.2.

Tableau 2.2 : Concentration de la cocaïne et de ses métabolites dans les cheveux selon Cone.

<b>Analytes</b>	<b>Gamme de concentration (ng/mg)</b>
Cocaïne	6,4 – 19,2
Benzoylecgonine	0,3 – 2,5
Ecgonine méthylester	0 – 1,9
Norcocaïne	Traces à 0,7
Cocaéthylène	0 – 2,6
Norcocaéthylène	0 ou traces.

Le tableau 2.3, résume les principaux travaux sur l'extraction de la cocaïne à partir des cheveux et les concentrations relatives retrouvées.

Tableau 2.3 : Gammes de concentrations de la cocaïne dans les cheveux.

<b>Référence</b>	<b>Gamme de concentration de la cocaïne (ng/mg)</b>
Kintz et Mangin [25]	0,4 – 78,4
Moeller et collaborateurs [26]	0,3 – 127,0
Kauert et Röhrich [27]	0,04 – 129,7
Pépin et Gaillard [28]	0,89 – 242,0

La mise en évidence de l'androhydroecgonine méthylester (AEME), qui est un produit du pyrolyse de la cocaïne, permet de différencier entre les consommateurs du crack et les consommateurs de cocaïne.

De nombreux travaux ont étudié le phénomène de décontamination ainsi que l'incorporation externe de la cocaïne dans les cheveux [37,38].

### 2.1.3 Le cannabis

Les premiers résultats sur l'identification du delta9 tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ THC) et de son métabolite majoritaire le 11-nor- $\Delta^9$ THC (THC-COOH) ont été reportés simultanément dans les travaux de Cirimele et collaborateurs [39] et Jurado et collaborateurs [40], en utilisant la CG-SM comme technique d'analyse. Comme les concentrations retrouvées par ces chercheurs étaient très faibles, en comparant à d'autres drogues, certains auteurs suggèrent l'utilisation de l'ionisation chimique négative ICN [41,42] ou même la CG-SM tandem (CG-SM-SM)[43].

Les procédures analytiques qui apparaissent dans la littérature sont résumées dans le tableau 2.4.

Tableau 2.4 : Procédures analytiques pour l'analyse du cannabis dans les cheveux

Réf.	Composés	Extraction	Dérivatisation	Méthode d'analyse	Limite de détection (ng/mg)
[27]	THC	-	Avec	CG-SM-IE	0,1
[39]	THC/THC-COOH	L - L	Avec	CG-SM-IE	0,1
[40]	THC/THC-COOH	L - L	Avec	CG-SM-IE	0,01
[41]	THC/11-OH-THC/ THC-COOH	L - L	Avec	CG-SM-ICN	0,01 - 0,25
[42]	THC-COOH	L - L	Avec	CG-SM-ICN	0,005
[43]	THC-COOH	EPS	Avec	CG-SM-SM	<0,0002
[44]	CBD, CBN, THC.	L - L	-	CG-SM-IE	0,01 - 0,1

Cirimele et collaborateurs [44] ont développé une méthode basée sur l'identification simultanée du cannabinol (CBN), cannabidiol (CBD) et le

tetrahydrocannabinol (THC). Comme le THC, CBD et CBN sont présents dans la fumée, et pour éviter l'hypothèse de la contamination externe, le THC-COOH doit être identifié pour confirmer la consommation réelle de cette drogue.

L'extraction du THC a été aussi étudiée en utilisant un bain ultrason [26] ou encore avec un fluide supercritique [45].

#### 2.1.4 Les amphétamines et leurs dérivés

La plupart des études retrouvées dans la littérature traitante sur les amphétamines et leurs dérivés proviennent de chercheurs japonais. L'amphétamine (AP) et le méthamphétamine (MA) sont les molécules les plus étudiées. Plus récemment, un intérêt particulier est porté pour l'analyse des dérivés du méthylènedioxy-amphétamine, tel que : le méthylène dioxyméthamphétamine (MDMA). Les méthodes d'analyses résumées sur le tableau 1, sont aussi applicables pour la détermination des amphétamines et leurs dérivés dans les cheveux [25-27]. En 1995, Nakahara [46] a publié un excellent résumé bibliographique sur ce sujet.

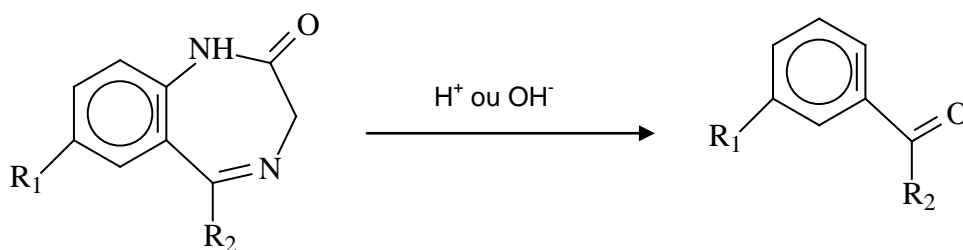
Une méthode d'analyse développée par Röhrich et Kauert [47], permet la détermination simultanée du AP, MDA, MDMA et MDEA. Elle est basée sur une extraction par bain ultrason, dérivatisation des analytes et identification par CG-SM-IE. La limite de détection pour tous les composés, en utilisant 50-100 mg de cheveux, était de l'ordre de 0,01 ng/mg.

Des modifications dans les structures des molécules par dérivatisation [48] ont permis l'identification simultanée de plusieurs composés : AP, MA, MDA, MDMA, MDEA et MBDB ainsi que son métabolite le BDB.

#### 2.1.5 Les benzodiazépines

Jusqu'en 1995, la littérature ne contenait aucune étude sur l'analyse chromatographique des benzodiazépines (BDZ), malgré que cette classe de médicament soit la plus utilisée de par le monde, à l'exception d'une seule étude par

radioimmunoessay (RIA) [49]. L'hydrolyse acide ou alcaline n'est pas appropriée pour l'extraction de ces médicaments à partir des cheveux [50,51], car cette extraction conduit à la formation des benzophénones selon la réaction suivante :



R<sub>1</sub> : Halogène, NO<sub>2</sub>,...

R<sub>2</sub> : Pyridine, phényl-halogénure, ....

## 2.2 Techniques d'extraction

L'extraction et la détection des psychotropes et particulièrement les benzodiazépines à partir de cheveux sont relativement difficiles vue les faibles quantités qui sont incorporées dans ces derniers.

La détection des benzodiazépines dans les cheveux a été rapportée pour la première fois en 1992 quand Sramek et collaborateurs [49] ont réalisé la détection du diazépam par radioimmunoessai. Ultérieurement, plusieurs études se sont focalisées sur l'analyse des benzodiazépines dans les cheveux en utilisant des méthodes analytiques très sensibles. Parmi les plus connues de ces études, celles de Cirimele et collaborateurs [52-54] et Kintz et collaborateurs [51] lesquelles se concentrent sur l'extraction par un tampon de Soërensens et détection par CG-SM-ICN. Sachs et Kintz [55], ont démontré que les méthodes d'extractions nécessitant un hydrolyse acide ou alcalin sont inappropriées pour l'extraction des benzodiazépines à partir des échantillons de cheveux, et que l'incubation au méthanol donne de mauvais chromatogrammes.

Couper et collaborateurs [50] ont reporté l'échec de quatre méthodes d'extractions, la digestion acide et alcaline, l'extraction enzymatique et au méthanol, pour déterminer les benzodiazépines à partir des échantillons de cheveux authentiques. L'évaluation des méthodes d'extraction est handicapée par l'absence des échantillons de cheveux standards contenant une quantité de drogue bien définie.

K. S. Scott et Y. Nakahara [63] ont reporté la possibilité d'utilisation de sept méthodes d'extraction et ils les ont commentées. Ces méthodes sont résumées comme suit :

#### 2.2.1 Extraction après incubation par la protéinase K

La digestion d'une quantité de cheveux se fait dans une solution tampon de phosphate pH 7,5 contenant la protéinase K (1mg) à 40°C pendant une nuit. Après refroidissement, les cheveux digérés sont filtrés et rincés. Le filtrat est soumis à l'extraction avec du chloroforme sous agitation pendant 3 minutes [56].

#### 2.2.2 Extraction avec le mélange base-méthanol (méthanol: NH<sub>4</sub>OH 25% 20:1)

Une quantité de cheveux est soumise à l'extraction avec le mélange (méthanol: NH<sub>4</sub>OH 25% 20:1) pendant une (01) heure sous ultrason, ensuite elle est conservée à température ambiante pendant toute une nuit. Les cheveux sont ensuite filtrés et lavés avec le même mélange. Le filtrat est évaporé jusqu'à sec sous un flux d'azote et le résidu est reconstitué dans un (01) millilitre d'un tampon phosphaté pH 7,4. Cette solution a été soumise à l'extraction avec un (01) millilitre de chloroforme sous agitation pendant 3 minutes.

#### 2.2.3 Extraction avec le mélange acide-méthanol [méthanol:acide trifluoroacétique (TFA)

Une quantité de cheveux a été soumise à l'extraction avec le mélange [méthanol:acide trifluoroacétique (TFA) (50:1)] sous ultrason pendant une (01) heure et préservée à température ambiante pendant toute une nuit. Les cheveux sont par la suite filtrés et rincés avec le même mélange. Le filtrat est évaporé jusqu'à sec sous un flux d'azote et le résidu a été reconstitué dans un tampon de phosphate pH 7,4. Cette solution a été extraite avec un (01) millilitre de chloroforme avec agitation pendant trois (03) minutes [57].

#### 2.2.4 Extraction après incubation au tampon de Soërensen

Des échantillons de cheveux ont été soumis à l'incubation avec le tampon de Soërensen à pH 7,6 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) à 40° C pendant deux (02) heures. Après incubation, les cheveux ont été filtrés et lavés avec la même solution. Extraction du filtrat avec du chloroforme par agitation pendant trois (03) minutes [51-54].

#### 2.2.5 Extraction après digestion alcaline

Une quantité de cheveux a été digérée avec une solution de 1M NaOH à 40°C pendant une nuit. Après filtration et lavage, le pH de la solution a été ajusté à 8-9 avec 6M HCl et un ajout d'un (01) millilitre d'une solution saturée de borate de sodium. Extraction avec du chloroforme sous agitation pendant trois (03) minutes [58].

#### 2.2.6 Extraction après digestion enzymatique au Glucuronidase

L'étude réalisée par M. Ygles et collaborateurs [59] évoque une méthode d'hydrolyse par  $\beta$ -Glucuronidase/arylsulfatase et extraction en phase solide. Les drogues seront identifiées par CG-SM.

On ajoute deux (02) millilitre d'une solution tampon de phosphate pH 7,6 à une quantité de cheveux, avec 75 microlitre de  $\beta$ -glucuronidase/aryl sulfatase. On réalise une hydrolyse à 40°C pendant deux (02) heures. Après refroidissement, les cheveux sont filtrés et lavés avec la même solution. Le filtrat est extrait avec du chloroforme sous agitation pendant trois (03) minutes [26,59].

#### 2.2.7 Extraction après digestion enzymatique à la protéase

Une quantité de cheveux a été digérée à 37 °C pendant douze (12) heures avec une solution de biopurase. Après incubation, l'échantillon est filtré et lavé avec une solution de 0,1 M de borate. On ajoute au filtrat un (01) millilitre d'une solution saturé en NaCl, et on fait une extraction avec du chloroforme en agitant, pendant cinq (05) minutes [60].

### 2.3 Stabilité des xénobiotiques dans les cheveux

La stabilité des xénobiotiques dans les cheveux a été étudiée par plusieurs auteurs. En 1989, Baumgartner et collaborateurs détectent la présence des opiacés dans les cheveux d'un poète (John Keats) 167 ans après sa mort [61], ce dernier consommait de l'opium pour réduire les douleurs d'une tuberculose.

D'autres cheveux très anciens appartenant à des chiliens ont aussi été testés positifs [62]. Toutes ces études indiquent que l'incorporation des drogues est très stable dans les cheveux. Il est clair donc, que des substances organiques sont capables de survivre dans les cheveux pour des milliers d'années sous des conditions favorables (Température ambiante et atmosphère sèche).



## CHAPITRE 3 PRESENTATION DES MOLECULES ETUDIEES

### 3.1 La caféine

La caféine, anciennement appelée *guaranine*, a été découverte en 1819 par Friedrich Ferdinand Runge et Von Giese et décrite en 1821 par Pierre Joseph Pelletier et Pierre Jean Robiquet. La *théine*, découverte en 1827 par Oudry, a été démontrée, en 1838, identique à la caféine. La différence d'effet entre thé et café s'explique essentiellement par le fait que le thé contient une grande quantité de tanins, qui ralentit l'assimilation de la caféine. C'est pourquoi son effet est plus doux et plus progressif, bien qu'il s'agisse de la même substance.

#### Composition chimique

La caféine ou le 1,3,7-triméthylxantine ou encore 1,3,7-triméthyl-1H-purine-2,6-dione (de formule brute  $C_8H_{10}N_4O_2$ , CAS # [107115-50-4]) est une molécule de la famille des méthylxanthines, qui comprend également la théophylline et la théobromine. Dans sa forme pure, elle est constituée d'une poudre blanche d'un goût extrêmement amer. La figure 3.1 montre la structure semi-développée de la caféine.

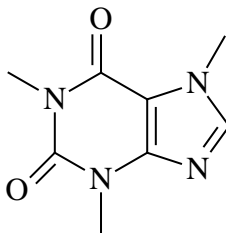


Figure 3.1 : Formule semi-développée de la caféine.

Une tasse normale de café filtré contient de 80 à 130 mg de caféine (jusqu'à 160 mg pour certaines marques 'le robusta'). Une dose de 30 à 40 g d'espresso, quant à elle, en contient environ 100 mg, atteignant les 130 mg ; 100 ml de thé contient jusqu'à 45 mg de caféine ; 100 ml de boisson lactée au chocolat contient jusqu'à 10 mg ; 100 ml d'une boisson au cola jusqu'à 12 mg; des boissons énergisantes homologuées peuvent contenir jusqu'à 32 mg par 100 ml de caféine. Des pilules stimulantes peuvent en contenir jusqu'à 200 mg chacune.

Les métabolites de la caféine sont représentés sur la figure 3.2.

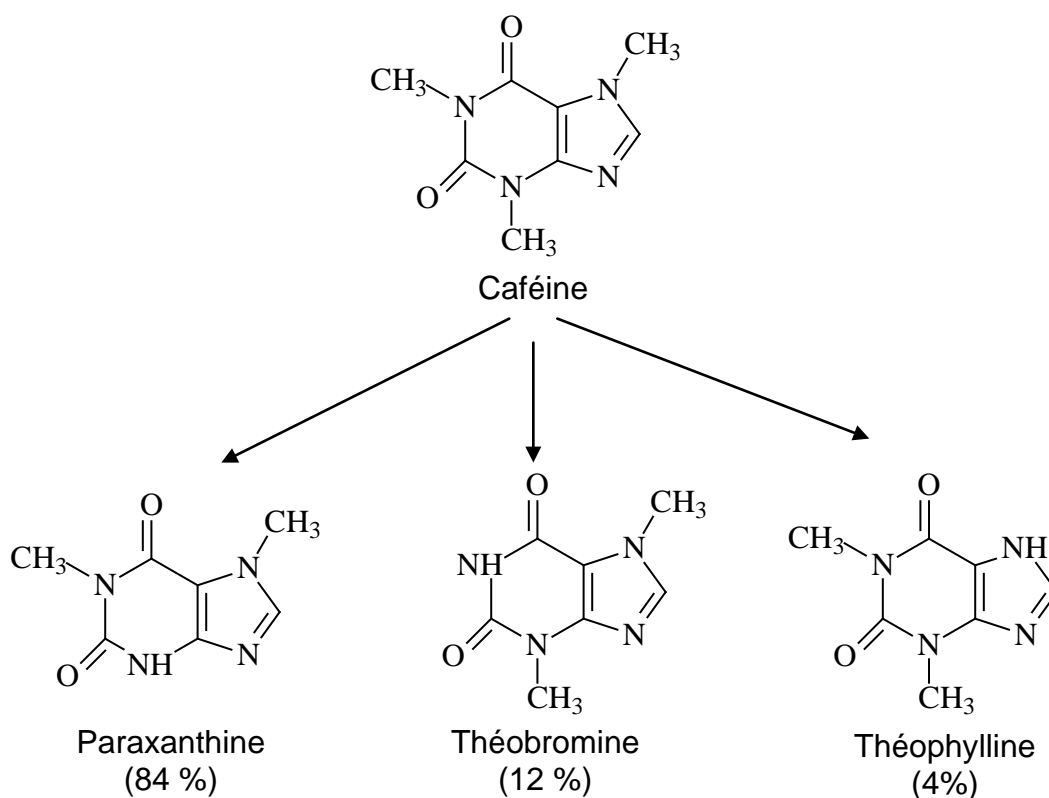


Figure 3.2 : Métabolites de la caféine.

La caféine est un psychostimulant qui a pour principaux effets d'accélérer le rythme cardiaque au bout de quelques minutes puis de provoquer une sensation de réveil.

### 3.2 La nicotine

En terme de consommation, la nicotine constitue la principale drogue des temps modernes [64]. Cette molécule fait partie de la famille des alcaloïdes.

A l'état pur, la nicotine ou la (S)-3-(1-méthyl-2-pyrrolidiny)pyridine (de formule brute  $C_{10}H_{14}N_2$ , CAS # [54-11-5]) se présente sous forme de liquide huileux de couleur claire qui brunit au contact de l'air.

Cette molécule, dont la formule semi-développée est représentée sur la Figure 3.3, est composée d'un cycle pyridinique associé à un noyau pyrrolidine. Elle possède une faible masse molaire ( $M_m = 162,23$  g/mole), une température d'ébullition égale à  $247^\circ\text{C}$  et deux constantes d'acidité mesurées à  $15^\circ\text{C}$  :  $pK_{a1} = 6,16$  et  $pK_{a2} = 10,96$  [65].

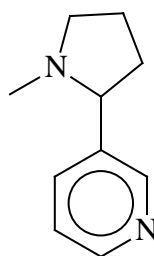


Figure 3.3 : Formule semi-développée de la nicotine

C'est un composé très toxique, la dose létale étant de 60 mg [66]. L'importante concentration de la nicotine dans le tabac est sans doute à l'origine de l'intérêt tout particulier dont elle a fait l'objet depuis sa découverte au début du 19<sup>ème</sup> siècle. Cette molécule a été extraite pour la première fois en 1828 des feuilles de tabac dans lesquelles elle représente 0,5 à 8 % du poids sec selon les variétés [66,67]. Synthétisée au niveau des racines, elle est transportée dans les feuilles où elle se concentre. C'est ainsi qu'on la retrouve en grande quantité dans les cigarettes [68].

La majorité des cigarettes disponibles sur le marché renferme entre 5 et 10 mg de nicotine. Pendant la combustion, cette dernière est transportée en partie par la phase particulaire - où elle se trouve adsorbée à la surface de très fines particules de goudron - et par la phase gazeuse. La cigarette fumée présente finalement, selon la machine à fumer standardisée, un rendement de l'ordre de 1 mg, soit environ 10 à 15 % de la quantité initiale de nicotine présente dans le tabac [67,69,70].

Aujourd'hui, l'utilisation de la nicotine ne se limite pas à la fabrication de cigarette et autres tabacs, mais elle est également de plus en plus utilisée à des fins thérapeutiques. En effet, des recherches sont actuellement en cours pour étudier le rôle éventuel dans le traitement de la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la colite ulcéreuse, l'obésité, la dépression, l'anxiété et le syndrome de Tourette.

Une autre utilisation industrielle de la nicotine consiste à inclure cet alcaloïde dans la composition de certains pesticides [66].

### Métabolisme de la nicotine

Malgré le fait que la nicotine soit une molécule relativement simple, plus de douze métabolites ont été identifiés [71]. Les nombreuses études menées sur ce thème ont permis de mettre en évidence les principaux mécanismes qui sont en jeu. On sait aujourd'hui que la nicotine est partiellement dégradée dans les poumons, mais que le métabolisme principal est hépatique, c'est-à-dire qu'il se passe dans le foie. La période de demi-vie est estimée à deux (02) heures [70].

Des études menées sur l'homme et les animaux ont montré que l'alcaloïde principal du tabac est largement métabolisé de sorte que seulement 10% est excrété inchangé dans l'urine [72,73].

La plupart des métabolites sont formés par réaction d'oxydation dans le foie. La plus caractéristique de ces réactions est l'oxydation du 5'-carbone du cycle pyrrolidinique de la molécule de nicotine qui conduit à la formation du métabolite principal chez les mammifères : la cotinine. On estime que pas moins de 70 à 80 % de

la quantité totale de la nicotine ingérée est métabolisée en cotinine via cette réaction [50,72].

### Présentation de la cotinine

La cotinine ou la 1-méthyl-5-(3-pyridinyl)-2-pyrrolidinone (CAS# : [486-56-6]), de formule brute  $C_{10}H_{12}N_2O$  se présente à l'état pur sous forme de solution huileuse. Sa formule semi-développée est représentée sur la figure 3.4.

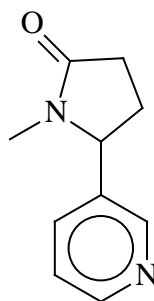


Figure 3.4: Formule semi-développée de la cotinine

Cette molécule est caractérisée par une masse molaire  $M_m = 176,22$  g/mole. Cette molécule est pharmacologiquement active. Des expériences menées sur les animaux montrent qu'elle diminue la résistance vasculaire et la pression artérielle. Chez les fumeurs abstinents, la privation de nicotine aurait des effets sur la diminution des performances cognitives[73].

Tout comme la nicotine, la cotinine est à son tour largement métabolisée par réactions simultanées dans le foie, et 10 à 15 % sont excrétés dans les urines.

La demi-vie de la nicotine est de 2-3 h, alors que celui de la cotinine est environ 17 h. Cette dernière représente alors un meilleur biomarqueur.

### 3.3 Les benzodiazépines

Les benzodiazépines (BZD) sont une classe de médicaments aux propriétés hypnotiques, anxiolytiques, antiépileptiques, amnésiantes et myorelaxantes. Les benzodiazépines sont souvent utilisées pour soulager à court terme l'anxiété, l'insomnie sévère ou incapacitante. L'usage à long terme peut être problématique à cause de

l'apparition d'une tolérance et d'une addiction (dépendance). Elles sont apparues dans les années 1960 et 1970.

Les principales benzodiazépines commercialisées sont représentées dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1 : Principales benzodiazépines commercialisées.

<b>Principales benzodiazépines</b>			
<b>Molécule</b>	<b>Spécialités</b>	<b>Demi-vie (heures)</b>	<b>Usage</b>
<b>Alprazolam</b>	Apotex® - Xanax®	6-12	A
<b>Bromazépam</b>	Anxyrex® - Bartul® - Bromiden® - Lectopam® Lexomil® - Lexotanil® - Quietiline®	10-20	A
<b>Clonazépam</b>	Rivotril® - Klonopin®	18-50	A
<b>Diazépam</b>	Dialag® - E-Pam® - Novazam® - Paceum® - Valium® Psychopax® - Stesolid® - Vivol®	36-200	A
<b>Flunitrazépam</b>	Narcozep® - Rohypnol®	36-200	H
<b>Lorazépam</b>	Ativan® - Loridem® - Serenase® - Temesta®	10-20	A
<b>Nitrazépam</b>	Imeson® - Mogadon®	15-38	H
<b>Oxazépam</b>	Seresta® - Sigacalm® - Serax®	4-15	A

H : Hypnotique

A : Anxiolytique

### 3.3.1 Le clonazépam

Le clonazépam (CLZ) (Klonopin®, Rivotril®) est une molécule aux propriétés sédatives, hypnotiques, anxiolytiques et anticonvulsivantes de la classe des benzodiazépines.

A l'état pur, le clonazépam ou le 5-(2-chlorophényl)-7-nitro-2,3-dihydro-1*H*-1,4-benzodiazépin-2-one (de formule brute  $C_{15}H_{10}ClN_3O_3$ , CAS # : [1622-61-3]) se présente sous forme de poudre cristalline, légèrement jaunâtre.

Cette molécule, dont la formule semi-développée est représentée sur la figure 3.5, est pratiquement insoluble dans l'eau, peu soluble dans l'alcool et dans le méthanol, très peu soluble dans l'éther.

Elle possède une masse moléculaire  $M_m = 315,7112 \text{ g.mole}^{-1}$ , une température d'ébullition égale à  $239 \text{ °C}$  et deux constantes d'acidité. Sa demi vie d'élimination est 30-40 heures

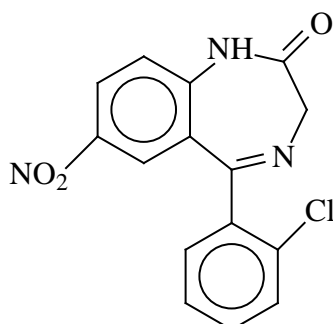


Figure 3.5 : Formule semi- développée du clonazépam.

Le métabolisme du clonazépam est hépatique et suit le mécanisme schématisé sur la figure 3.6.

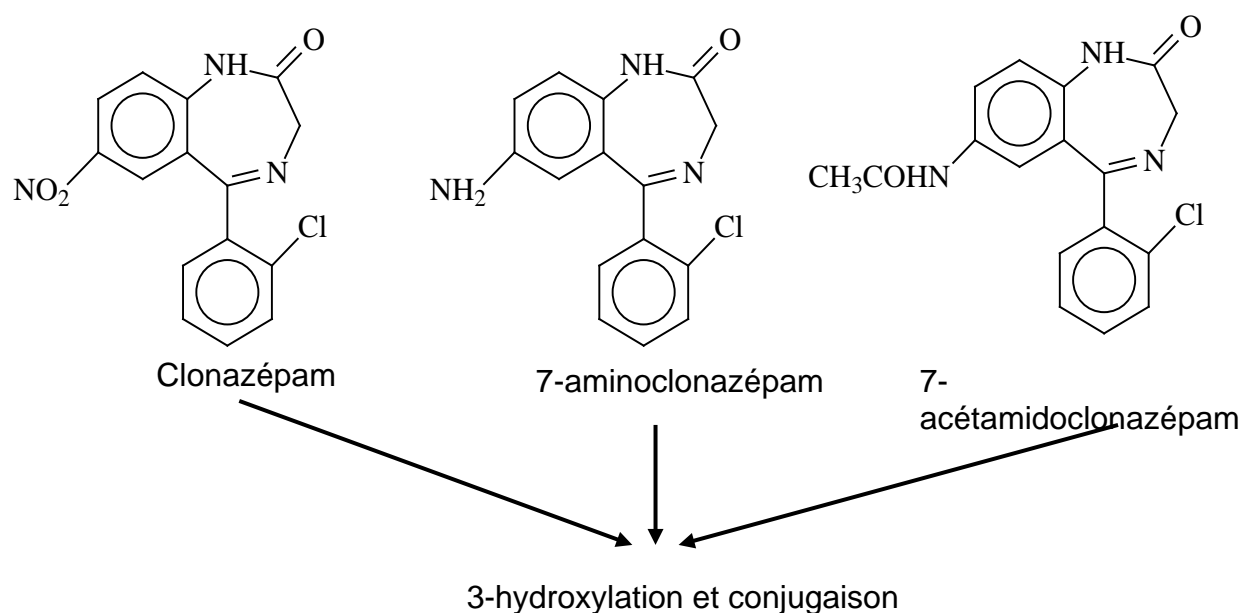


Figure 3.6 : Métabolisme du clonazépam.

En terme de consommation, le clonazépam « Rivotril » constitue le principal psychotrope administré par les toxicomanes.

Il fait l'objet d'un usage détourné dans des populations marginalisées ayant des conditions de vie précaires, soit à petites doses pour lever les inhibitions soit à forte dose pour anesthésier. De fortes doses et/ou un usage prolongé peuvent entraîner une dépendance physique et psychique et un syndrome de sevrage.

En Algérie, l'usage détourné du clonazépam se développe de plus en plus au cours de ces dernières années.

### 3.3.2 Le bromazépam

Le bromazépam, dont la formule semi-développée est représentée sur la figure 3.7, est un médicament sédatif-hypnotique, anxiolytique de la classe des benzodiazépines. C'est un dérivé bromé des 1,4-benzodiazépines [7-bromo-1,3-dihydro-5-(2-pyridinyl)-2H-1,4benzodiazépin-2-one] et est principalement prescrit comme agent anti-anxiolytique. Quoiqu'il soit relativement sans risque à doses thérapeutiques, une overdose aiguë peut conduire à la mort, spécialement en association avec l'alcool ou autres drogues.

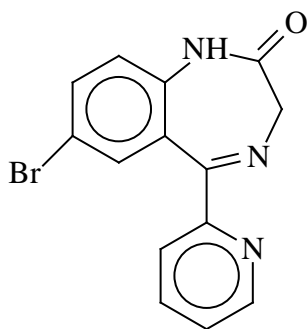


Figure 3.7 : Structure semi- développée du bromazépam.

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour déterminer les teneurs du bromazépam dans le plasma et les urines, incluant la chromatographie en phase gazeuse (CG), la chromatographie liquide à haute performance (CLHP), et la chromatographie liquide couplée avec la spectrométrie de masse (CL-SM). La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse CG-SM n'a pas été utilisée pour déterminer la teneur de ce psychotrope et on ne trouve pas de documentation sur la



détermination du bromazépam dans les cheveux. Les travaux de Zhang et collaborateurs en 1996, ont mis en évidence la présence du bromazépam dans les matrices biologiques suivantes : le sang, le foie, les reins, les poumons, la rate, la graisse cellulaire, les muscles et le cerveau, par CG-SM.

## **CHAPITRE 4 CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE (CG-SM)**

### 4.1 Introduction

Nombreux sont les laboratoires de chimie analytique aujourd'hui équipés d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse. La technique est généralement désignée par ses utilisateurs sous le terme abrégé de CG-SM ou encore "GC-MS" pour "Gas Chromatography – Mass Spectrometry". La CG-SM est aujourd'hui à son apogée et trouve des applications dans des domaines aussi variés que l'industrie agroalimentaire, la médecine, la pharmacologie ou l'environnement [74].

### 4.2 Le chromatographe en phase gazeuse

Le rôle du chromatographe est de séparer les constituants d'un mélange. La chromatographie en phase gazeuse est réservée à l'analyse de composés relativement volatils et thermiquement stables. Le chromatographe en phase gazeuse est constitué de trois modules : un injecteur, une colonne capillaire dans un four et un détecteur. Il existe différents types de détecteurs mais le spectromètre de masse tend aujourd'hui à supplanter tous les autres car il est le seul à fournir des informations structurales sur les composés séparés par chromatographie.

#### a. L'injecteur

L'injecteur est une zone chauffée où l'échantillon est introduit en solution au moyen d'une seringue puis vaporisé et mélangé au gaz vecteur. Le gaz vecteur, classiquement de l'hélium, constitue la phase dite "mobile". Son rôle consiste à véhiculer les analytes depuis l'injecteur jusqu'au détecteur via la colonne analytique.

Il existe deux familles d'injecteurs. La première regroupe les injecteurs dits "à fuite". Le mode d'injection le plus répandu est l'injection en "split" ou injection avec "division de flux", il est utilisé pour l'analyse de solutions concentrées. L'injection se fait à haute température.

L'échantillon est rapidement introduit dans l'injecteur où il est instantanément vaporisé et mélangé au gaz vecteur. Ce procédé permet de faire en sorte qu'une fraction importante du flux gazeux soit évacuée, diminuant ainsi la quantité d'échantillon qui pénètre dans la colonne et évitant ainsi de saturer la phase stationnaire. Très simple à mettre en oeuvre, l'injection en mode "split" présente néanmoins un inconvénient : des problèmes de discrimination sont fréquemment rencontrés lorsque la solution à analyser contient des composés dont les volatilités sont très hétérogènes (les produits "légers" auront tendance à s'échapper par la fuite alors que les produits "lourds", mal vaporisés, resteront majoritairement dans l'injecteur).

La seconde famille regroupe les injecteurs "sans fuite". L'injection "splitless", ou "sans division de flux", est utilisée pour introduire des analytes en solution diluée. L'électrovanne est fermée pendant les quelques dizaines de secondes qui suivent l'injection, de manière à ce qu'une quantité maximum d'analyte pénètre dans la colonne. Elle est ensuite ouverte pour purger l'injecteur d'éventuels résidus.

#### b. Le four et la colonne capillaire

Le four contient l'élément clé de la séparation chromatographique : la colonne analytique. De nos jours, les colonnes utilisées en CG-SM sont des colonnes dites "capillaires". La figure 4.1 représente une coupe de colonne capillaire ; la colonne est constituée d'un tube de silice fondue dont la paroi interne est couverte d'un film chimique nommé "phase stationnaire" ; la paroi externe est gainée d'un revêtement en polyimide qui confère souplesse et robustesse à la colonne.

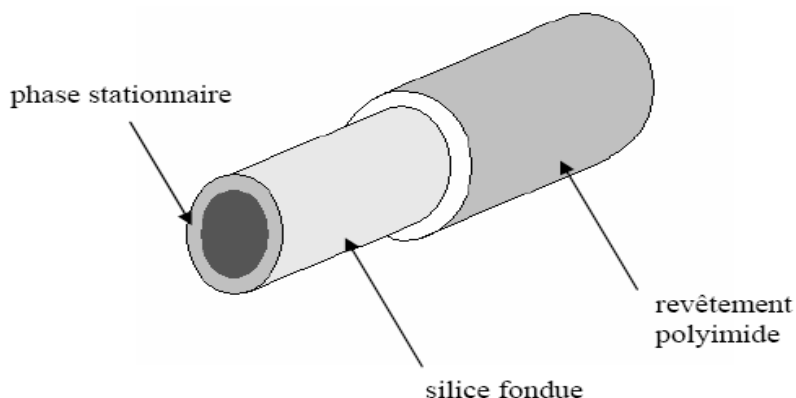


Figure 4.1 : Représentation schématique d'une colonne capillaire.

La phase stationnaire est caractérisée par les fonctions chimiques greffées sur la silice. Si ces dernières sont peu polaires (chaînes alcanes ou groupements phényles, par exemple), la colonne est dite "peu polaire". Si, au contraire, la phase stationnaire est constituée de composés polaires tels que, par exemple, des polyéthylènes glycols, la colonne est dite "polaire". Les constituants d'un mélange sont séparés en fonction de leur polarité si la phase stationnaire est polaire, de leur volatilité si cette dernière est apolaire ; leurs différences de propriétés physicochimiques leur confèrent des vitesses d'élution différentes et ils sont donc séparés en fonction du temps. Confronté à un mélange mixte, on privilégie souvent le choix d'une colonne peu polaire, les phases stationnaires peu polaires étant généralement plus robustes et thermiquement beaucoup plus stables que leurs homologues polaires.

En plus de la nature de la phase stationnaire, la colonne capillaire est caractérisée par trois paramètres géométriques : sa longueur (de 10 à 100 m), son diamètre interne (de 0,1 à 0,5 mm), l'épaisseur de sa phase stationnaire (0,1 à 5  $\mu\text{m}$ ) ; chacun exerce une influence déterminante sur la qualité de la séparation. La plupart des applications de CG-SM utilisent des colonnes de 25 à 30 m.

La colonne capillaire est placée dans un four car les interactions entre les composés et la phase stationnaire sont fonction de la température. Augmenter cette dernière favorise l'élution des composés et diminue ainsi les temps d'analyse. La plupart des utilisateurs travaillent en "programmation de température", il est très fréquent que

des méthodes, dites de "screening" utilisent une programmation de température allant de 40°C à 350°C pour permettre la détection de toutes sortes de composés aux propriétés physico-chimiques variées.

La colonne capillaire sort du chromatographe et entre dans le spectromètre de masse via une "ligne de transfert". Il s'agit d'un cylindre intensément chauffé (environ  $T=300^{\circ}\text{C}$ ) de manière à éviter que les molécules éluées ne se recondensent entre les deux appareils. La figure 4.2 présente un schéma d'appareil de couplage CG-SM [75].

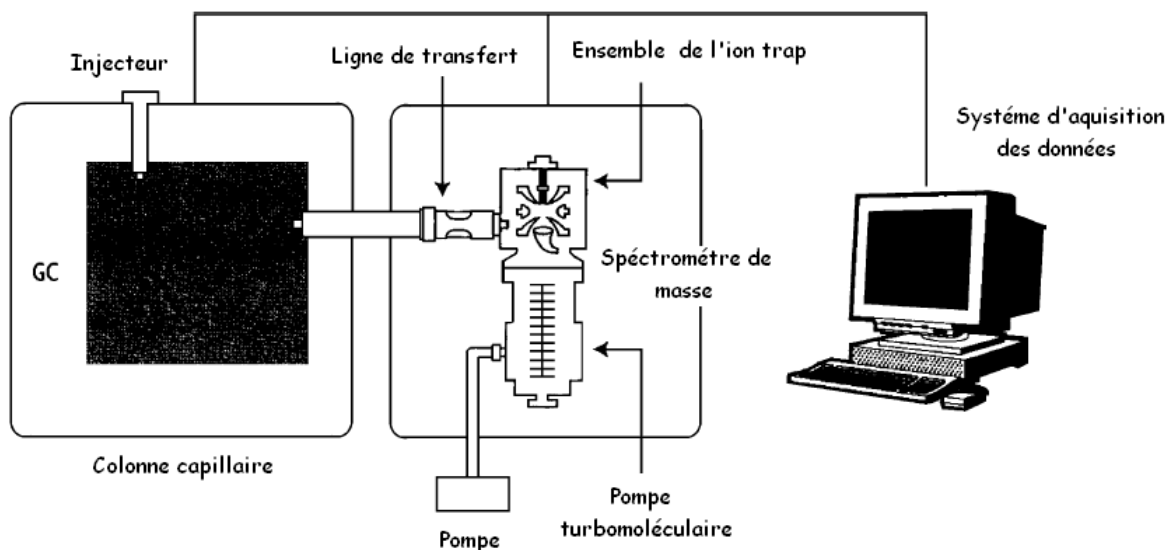


Figure 4.2. Schéma d'un appareil de couplage CG-SM.

### 4.3 Le spectromètre de masse (SM)

Le spectromètre de masse permet l'identification et la quantification des analytes. Il existe de nombreux types de spectromètres de masse ; tous ont en commun trois éléments : une source, un analyseur et un détecteur [76].

Ces spectromètres sont équipés de système de pompage assurant un vide de l'ordre de  $10^{-4}$  à  $10^{-5}$  mbar. La qualité du vide est un facteur déterminant pour l'analyse. Il s'agit d'évacuer les molécules résiduelles telles que l'azote, l'oxygène et l'eau

atmosphériques ainsi que les molécules éluées du chromatographe qui, pour la plupart, n'auront pas été ionisées (les rendements d'ionisation sont très faibles) et qui pourraient polluer le spectromètre de masse. Il s'agit également de garantir le bon fonctionnement du filament et du multiplicateur d'électrons (voir ci-dessous) qui sont extrêmement fragilisés par une pression trop élevée.

#### a. La source

La source est la partie du spectromètre de masse où sont produits des ions gazeux à partir des molécules introduites.

En couplage avec un chromatographe en phase gazeuse, où les composés élués arrivent au spectromètre à l'état gazeux, les sources utilisées sont dites à "ionisation électronique" ou à "ionisation chimique"; on parle d'"IE" pour "Ionisation par Électron", de "IC" pour "Ionisation Chimique". La source est maintenue à une température élevée (généralement comprise entre 100 et 250°C) pour éviter la condensation des analytes.

L'ionisation électronique consiste à "bombarder" les molécules par un faisceau d'électrons de haute énergie. L'"impact" d'un électron (on parle toujours d'"impact électronique" alors que les physiciens ont démontré l'impossibilité d'un réel impact) sur la molécule M a pour effet d'arracher un électron à cette dernière, conduisant ainsi à la formation d'un ion radicalaire  $M^{\cdot+}$ . L'énergie des électrons incidents est telle que l'ion  $M^{\cdot+}$  acquiert une grande quantité d'énergie interne qui l'amène généralement à se fragmenter spontanément en ions plus petits baptisés "ions-fils" ou "ions-fragments". Les électrons sont produits par le chauffage d'un filament métallique (tungstène ou rhénium, le plus souvent) et accélérés par une différence de potentiel de 70 V, ce qui leur confère une énergie cinétique de 70 eV.

L'IE n'est pas le seul mode d'ionisation utilisé en couplage CG-SM ; l'ionisation chimique est également largement employée en complément de l'ionisation électronique. L'IC est plus sélective et toutes les molécules éluées ne sont pas ionisées, ce qui peut constituer un avantage avec des échantillons particulièrement complexes.

Comparée à l'IE, l'IC est un mode d'ionisation "doux" : les ions  $MH^+$  obtenus en IC ont

beaucoup moins d'énergie interne que les ions  $M^+$  produits par IE et se fragmentent donc beaucoup moins que ces derniers [77].

### b. L'analyseur

L'analyseur sépare les ions produits par la source en fonction de leur rapport masse sur charge :  $m/z$ . Dans un contexte de couplage CG-SM, on parle souvent abusivement de mesure de masse car  $z=1$  (ou  $-1$ , beaucoup plus rarement, lorsque l'on utilise l'ionisation chimique négative), les ions étant trop petits pour être chargés plusieurs fois (on considère qu'en phase gazeuse un ion peut porter 1 charge pour environ 1000 unités de masse).

Il existe deux catégories d'analyseurs quadripolaires ; la première regroupe les quadripôles, la seconde est constituée des trappes ioniques (encore appelées "pièges à ions").

### Les trappes ioniques

Il existe deux types de trappes ioniques en couplage CG-SM. Lorsque les ions sont produits dans une source analogue à celle d'un quadripôle avant d'être introduits dans la trappe, on parle de "trappe ionique à source externe". Lorsque les ions sont directement produits au cœur de la trappe (la colonne chromatographique "arrive" dans la trappe), cette dernière joue tour à tour le rôle de source et d'analyseur ; on parle alors de "trappe ionique à ionisation interne". Une trappe ionique est constituée de trois électrodes métalliques : une électrode annulaire et deux électrodes dites "chapeaux". Des "séparateurs" ou "spacers" en forme d'anneau jouent le rôle d'isolants électriques entre ces électrodes, figure 4.3.

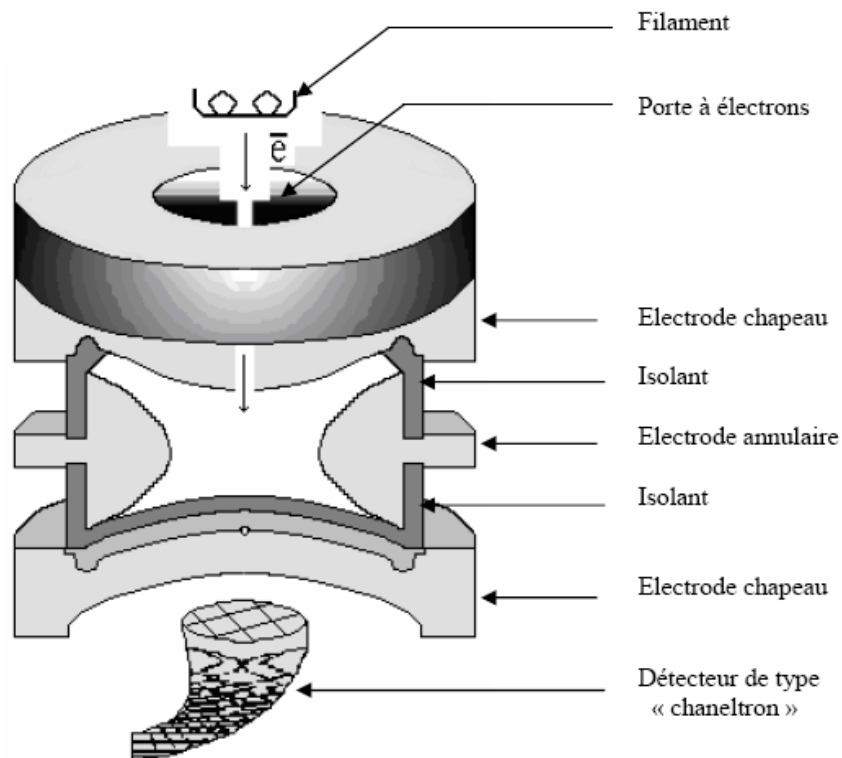


Figure 4.3. Représentation simplifiée d'une trappe ionique

### c. Le détecteur

Le rôle du détecteur est double : détecter les ions proportionnellement à leur nombre et amplifier le courant correspondant (de l'ordre de  $10^{-12}$  A) pour le rendre détectable par l'électronique du système.

## 4.4 Principaux modes d'analyse en CG-SM

### a. Analyse en balayage ou "fullscan"

Le mode dit "de balayage" ou "fullscan" est utilisé lorsque l'on souhaite enregistrer des spectres dit "de source", c'est-à-dire des spectres où sont présents tous les ions produits dans la source à un instant donné. On parle de "balayage" car l'obtention d'un tel spectre nécessite le balayage des tensions U et V du potentiel utilisé. Les spectres "de source" permettent l'identification des analytes



### b. Analyses en "SIM" et "SIS"

Le terme "SIM" ("Single Ion Monitoring") est employé par les utilisateurs de quadripôles pour désigner l'opération qui consiste à ne détecter que un (ou quelques) ion(s). Le terme "SIS" ("Single Ion Storage") désigne la même opération sur une trappe ionique. En SIM ou en SIS, le spectromètre de masse fonctionne comme un filtre ; il est programmé pour ne détecter que quelques ions caractéristiques des analytes étudiés (1 à 4, en général).

### 4.5 Conclusion

Les limites de la CG-SM sont celles de la chromatographie en phase gazeuse. Le facteur limitant étant la volatilité des analytes, cette technique est réservée à l'analyse de molécules aisément vaporisables et thermiquement stables, c'est à dire, en première approximation, de composés de poids moléculaire faible à moyen (inférieur à 700 Da). Ces limites admises, la CG-SM est un formidable outil d'analyse. La diversité des modes d'injection et des colonnes capillaires (géométrie, nature de la phase stationnaire) autorise la séparation de mélanges extrêmement complexes (huiles essentielles, métabolites, hydrocarbures...). Contrairement aux autres détecteurs, le spectromètre de masse fournit des informations structurales sur les analytes étudiés et peut permettre leur identification instantanée si ceux-ci sont répertoriés dans des bibliothèques de spectres.

La plupart des utilisateurs de GC-MS utilisent des bases de données qui répertorient des dizaines de milliers de spectres de masse et qui permettent l'identification instantanée des molécules analysées (sous réserve, évidemment, que ces dernières aient été enregistrées dans ces bases de données). Lorsque les molécules étudiées n'ont pas été préalablement répertoriées (nouveaux produits de synthèse, métabolites...), l'identification doit se faire par déduction, à partir des ions observés. Ceci est souvent fastidieux et nécessite impérativement une formation spécialisée en spectrométrie de masse.

Le fait de disposer d'un standard mondial pour l'énergie des électrons ionisants permet de comparer des spectres de masse réalisés sur différents appareils et d'avoir recours à des bases de données (comprenant plusieurs dizaines de milliers de spectres) dispensant d'interpréter les spectres obtenus pour identifier les analytes. Les algorithmes de recherche extraient des bases de données les composés dont les spectres de masse ressemblent le plus au spectre étudié et il est parfois difficile de trancher entre les solutions proposées. Les bases de données ne sont évidemment efficaces que si les spectres des composés étudiés y sont répertoriés. Lorsque ça n'est pas le cas, l'analyste doit tenter "d'interpréter" le spectre de masse, ce qui est souvent difficile ! L'universalité de l'ionisation électronique (la quasi-totalité des molécules sont "ionisables"), justifie l'immense succès de cette technique.

## CHAPITRE 5 MISE EN ŒUVRE EXPERIMENTALE

### 5.1 Matériels et réactifs

#### Matériels

Le matériel et les équipements utilisés pour les préparations et les analyses des échantillons sont les suivants :

- chromatographe de marque Varian CP3800 couplé à un spectromètre de masse Saturn 2200 Ions Trap (IT),
- spectromètre Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IRTF) de type :JASCO400,
- fusiomètre de marque BUCHI B-545,
- centrifugeuse de marque HERMEL Z300,
- vortex de marque Heidolph.

#### Réactifs

Nous avons disposé pour ce travail des réactifs suivants :

- caféine de marque Prolabo,
- bromazépam ; obtenu auprès du Centre de Recherche Développement de Sidal.
- clonazépam, extrait à partir du médicament Rivotril (Roche) ; l'identification s'est effectuée par IRTF et par point de fusion (Appendice B).
- dichlorométhane de marque Prolabo,
- NaOH de marque Prolabo,
- diéthyléther de marque Prolabo,
- chloroforme de marque Prolabo,
- bistriméthyltrifluoroacetamide BSTFA de marque Merck,
- triméthylchlorosilane TMCS de marque Merck.

Les solutions de tampons de søerensen sont préparées en ajoutant 19,6 ml de solution A à 80,4 ml de solution B pour avoir un pH 7,4 :

Solution A :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  9,07 g/L pH 4,5.

Solution B :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  11,83 g/L pH 9,3.

## 5.2 Échantillons étudiés

Les cheveux et l'urine ont constitué nos deux matrices biologiques utilisées au cours de nos travaux.

### 5.2.1 Cheveux et urines de consommateurs de Café et/ou de Tabac

Les échantillons de cheveux et d'urines étudiés appartiennent à des personnes volontaires habitués à consommer en moyenne 3-5 cafés par jour et/ou plus de 20 cigarettes en moyenne par jour. Le tableau 5.1, résume des informations sur les sujets participant à cette étude.

Tableau 5.1 : Sujets consommateurs de café et/ou de nicotine ayant fait objet d'analyse

<b>Caféine</b>						
<b>Sujet N°</b>	<b>Age (ans)</b>	<b>Sexe</b>	<b>Couleur des cheveux</b>	<b>Doses administrées (moyenne)</b>	<b>Réf. des extraits de cheveux</b>	<b>Réf. des extraits d'urine</b>
1	23	Masculin	Noir	3 cafés/jour	C.C.S1	U.C.S1
2	26	Masculin	Noir	5 cafés/jour	C.C.S2	U.C.S2
3	35	Masculin	Noir	4 cafés/jour	C.C.S3	U.C.S3
4	25	Masculin	/	3 cafés/jour	/	U.C.S4
5	21	Masculin	/	3 cafés/jour	/	U.C.S5
<b>Nicotine</b>						
1	23	Masculin	Noir	20 cigarettes/jr	C.N.S1	U.N.S1
2	26	Masculin	Noir	25 cigarettes/jr	C.N.S2	U.N.S2
3	35	Masculin	Noir	20 cigarettes/jr	C.N.S3	U.N.S3
6	25	Masculin	Noir	20 cigarettes/jr	C.N.S6	U.N.S6

Il est à signaler que les cheveux des trois premières personnes qui ont fait l'objet de recherche de la caféine sont les mêmes pour la recherche de la nicotine.

Les échantillons d'urines ont été prélevés dans des flacons spéciaux et stockés dans un réfrigérateur à 4°C jusqu'à l'analyse.

### 5.2.2 Cheveux de consommateurs de Rivotril (clonazépam)

Les quatre échantillons de cheveux étudiés appartiennent à des personnes volontaires consommatrices de Rivotril. Pour ce faire, on s'est rapproché du Service de Toxicomanie et d'Aides aux Toxicomanes de l'hôpital Frantz Fanon de Blida, où on a sélectionné quatre sujets.

Ces volontaires sont des personnes habituées à consommer ce psychotrope pour s'intoxiquer et satisfaire à leur besoin en matière de dépendance. Ils sont venus à ce service pour être pris en charge par des médecins spécialistes et réduire voire arrêter définitivement de prendre ce psychotrope, dont les effets de la consommation entraînent des conséquences très graves.

Les informations sur les quatre personnes sont résumées dans le tableau 5.2.

Tableau 5.2 : Sujets consommateurs de Rivotril ayant fait objet d'analyse

<b>Sujet N°</b>	<b>Age (ans)</b>	<b>Sexe</b>	<b>Couleur des cheveux</b>	<b>Doses administrées (moyenne)</b>	<b>Référence des extraits</b>
<b>7</b>	27	Masculin	Noir	1-2 cp/jour	C.CLZ.S6
<b>8</b>	35	Masculin	Noir	2 cp/jour	C.CLZ.S7
<b>9</b>	24	Masculin	Noir	2gttes/jour	C.CLZ.S8
<b>10</b>	16	Masculin	Noir	1-2 cp/jour	C.CLZ.S9

### 5.2.3 Cheveux de consommateurs de Léxomil (Bromazépam)

La dernière série de cheveux analysée appartenait à des personnes (malades hospitalisés) consommateurs du Léxomil. Les cheveux étudiés ont été prélevés au même service de l'hôpital Frantz Fanon de Blida.

Au contraire du Rivotril, Léxomil est une benzodiazépine que les médecins prescrivent aux malades, pendant 21 jours, en substitution à d'autres psychotropes ou drogues.

Quatre volontaires ont été sélectionnés pour cette étude dont les informations relatives sont résumées sur le tableau 5.3.

Tableau 5.3 : Sujets consommateurs de Léxomil ayant fait objet d'analyse

Sujet N°	Age (ans)	Sexe	Couleur des cheveux	Doses administrées (moyenne)	Référence des extraits
11	19	Masculin	Noir	3 cp/jour	C.BRZ.S10
12	22	Masculin	Noir	3 cp/jour	C.BRZ.S11
13	24	Masculin	Noir	3 cp/jour	C.BRZ.S12
14	17	Masculin	Noir	3 cp/jour	C.BRZ.S13

#### 5.2.4 Cheveux imprégnés (ou contaminés)

Les cheveux imprégnés au Bromazépam ont été utilisés pour valider l'efficacité de notre protocole d'extraction.

Les cheveux imprégnés ont été préparés selon la procédure décrite par Edder et collaborateurs [29].

L'imprégnation se fait par l'ajout de 300 mg de cheveux sains à une solution aqueuse d'une concentration de 200µg/l de Bromazépam sous agitation pendant environ 15 heures. Une fois l'imprégnation faite, nous avons procédé à trois lavages successifs de nos cheveux avec 5 ml d'eau distillée sous agitation. Un deuxième lavage a été effectué avec 5 ml de méthanol, cette opération a été répétée deux fois.

Le but de ces lavages répétés est d'enlever toutes les molécules qui sont adsorbées à la surface et ne laisser que ceux fortement liés aux mélanocytes.

Ces cheveux vont subir les mêmes étapes d'extraction que nos échantillons.

#### 5.2.5 Cheveux de références (cheveux sains)

Des cheveux sains appartenant à des personnes non-consommatrices de Caféine, Nicotine, Rivotril et de Léxomil, ont été utilisés comme témoins négatifs dans nos analyses.

### 5.3 Prélèvement des échantillons

Les cheveux sont généralement prélevés au niveau du vertex postérieur (partie arrière de la tête). Tous les prélèvements sont réalisés en duplicate pour pouvoir refaire les analyses. Les cheveux sont prélevés le plus près de la peau,

coupés au ciseau ou avec une tondeuse (ne pas arracher). La conservation est aisée; elle s'effectue en tube sec ou dans une enveloppe, à température ambiante. Ce procédé de stockage est nettement plus favorable par rapport à celui des urines, qui nécessite le froid (4°C).

#### 5.4 Traitement des échantillons de cheveux avant analyse

Tous les échantillons de cheveux ont subi le même traitement. Les différentes étapes sont résumées sur la figure 5.1.

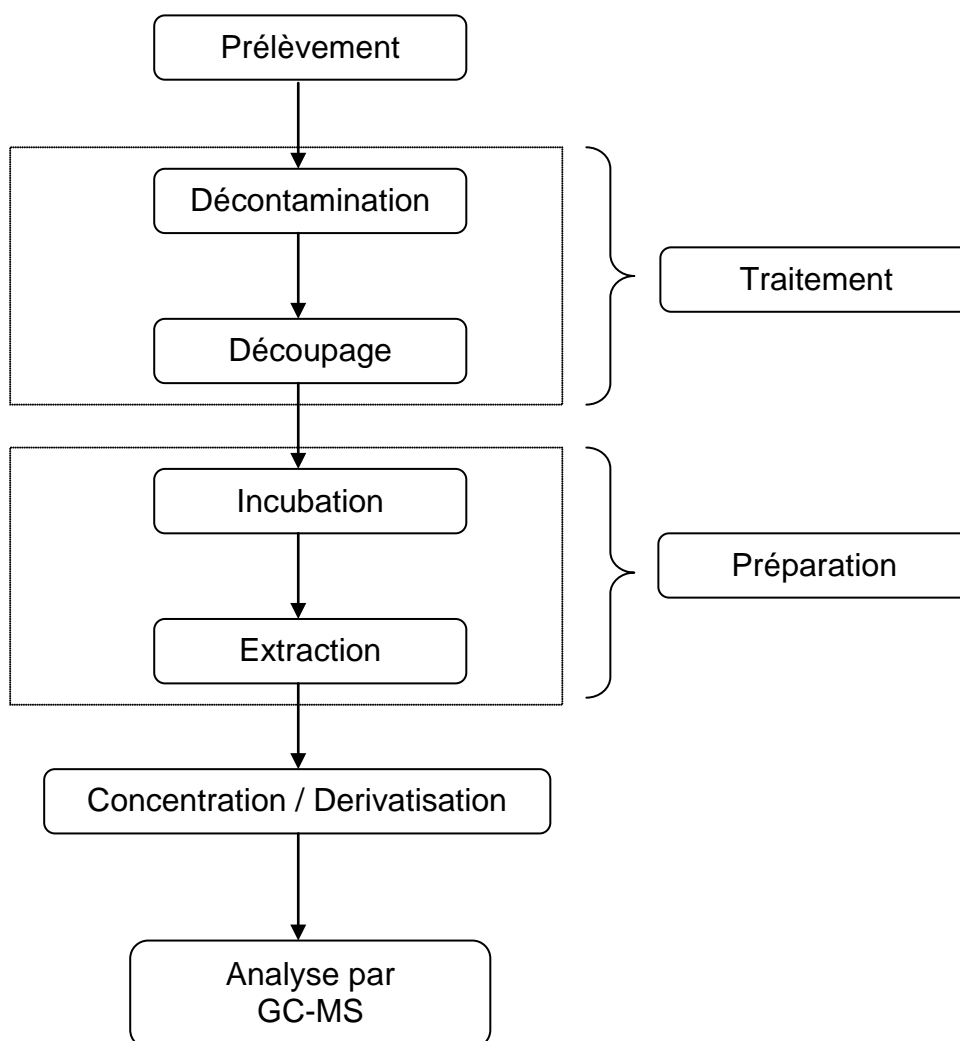


Figure 5.1 : Étapes suivies pour la préparation des échantillons de cheveux.

#### 5.4.1 Décontamination

Cette étape est essentielle pour débarrasser les cheveux de toute pollution extérieure éventuelle, elle permet d'éviter ce qui est communément appelé les faux positifs, elle se résume à :

- ✓ Un lavage avec de l'eau jusqu'à ce que la solution devienne claire.
- ✓ Un lavage avec deux fois 5 ml de dichlorométhane sous agitation pour éliminer les molécules polaires.
- ✓ Un séchage des cheveux lavés dans l'étuve pour éliminer les résidus des solvants utilisés lors des étapes précédentes.

#### 5.4.2 Découpage

Afin d'assurer une parfaite homogénéisation de l'échantillon, il est nécessaire de découper les cheveux en très fine portions (< 1 mm) à l'aide d'un ciseau. Cette étape facilite l'hydrolyse et donc contribue à augmenter le rendement de l'extraction.

Les résultats de l'étude réalisée par P. Eser et collaborateurs ont clairement montré que le rendement d'extraction des drogues à partir des cheveux en poudre est meilleur que celui des cheveux broyés. [78].

### 5.5 Préparation des échantillons

Les protocoles de préparation varient selon les molécules recherchées dans les cheveux. Les deux benzodiazépines à savoir le clonazépam et le bromazépam ont subi la même préparation, différente de celle des deux autres molécules à savoir la caféine et la nicotine.

#### 5.5.1 Préparation des cheveux contenant de la caféine et/ou nicotine

La méthode adoptée pour préparer les échantillons de cheveux susceptibles de contenir de la caféine et/ou nicotine est celle décrite par P. Kintz et qui se résume comme suit. [79].

##### a- Incubation

Incubation de 200 mg de cheveux, dans un tube en verre conique, dans une solution 1N NaOH pendant dix (10) minutes à 100°C. L'incubation est suivie par un refroidissement recommandé pendant environ dix (10) minutes à l'air libre.



### b- Extraction

L'extraction est faite avec 5 ml de diéthyléther sous forte agitation. La phase organique est récupérée après centrifugation à 2500 tr/mn, cette dernière est évaporée à sec sous un flux d'azote.

La reconstitution de l'échantillon à analyser se fait dans 30 µl de dichlorométhane.

### 5.5.2 Préparation des cheveux contenant du Clonazépam ou du bromazépam

La méthode adoptée pour préparer les échantillons de cheveux susceptibles de contenir les benzodiazépines est celle décrite par V. Cirimele [54], elles se résument comme suit :

#### a- Incubation

Incubation de 200 mg de cheveux, dans un tube en verre conique, dans une solution tampon phosphaté pH 7,4 pendant 2 heures à 50°C. L'incubation est suivie par un refroidissement recommandé pendant 10 minutes à l'air libre.

#### b- Extraction

L'extraction est faite avec 4 ml du mélange diéthyléther / chloroforme 80/20 (V/V) sous forte agitation. La phase organique est récupérée après centrifugation à 2500 tr/min, cette dernière est évaporée à sec sous un flux d'azote.

La reconstitution de l'échantillon à analyser se fait dans 30 µl de dichlorométhane.

### 5.5.3 Préparation des échantillons d'urines contenant de la caféine et/ou nicotine

Un échantillon de 5 ml d'urine est mélangé avec 0,5 ml de NaOH 2N et 300 mg de carbonate de sodium ( $K_2CO_3$ ). L'extraction se fait en additionnant 5 ml d'éther diéthylique sous agitation pendant 10 minutes. La phase organique est récupérée après centrifugation à 3500 tr/mn pendant 5 minutes, cette dernière est évaporée à sec sous un flux d'azote.

La reconstitution de l'échantillon à analyser se fait dans 15  $\mu$ l de dichlorométhane.

#### 5.6 Technique analytique et instrumentation, analyse par CG-SM-IE

La chaîne analytique utilisée est constituée d'un chromatographe Varian CP3800 couplé à un spectromètre de masse Saturn 2200 Ions Trap (IT).

Toutes les injections ont été faites en mode splitless, le volume d'injection et la température de l'injecteur sont respectivement fixés à 1  $\mu$ l et 250°C.

La colonne utilisée est une colonne capillaire de type CP-Sil 8CB Low Bleed (5% diphenyle – 95% dimethylpolysiloxane), équivalente à une HP 5 ou une DB 5. Le gaz vecteur employé est l'hélium ultra pur de grade N55 (99,999%) avec un débit de 1ml/mn.

Les températures de la ligne de transfert, la trappe d'ions et le manifold sont respectivement 250°C, 150°C et 100°C.

Le programme de travail pour l'analyse de la caféine et la nicotine s'établit comme suit : la température initiale est maintenue à 80°C pendant une (01) minute, suivie d'une montée à 300°C à une vitesse de 20°C/mn. Le four est maintenu également à cette température finale (300°C) pendant 8 minutes. La durée totale de l'analyse est de 20 minutes. La détection est faite en mode full scan.

En ce qui concerne le clonazépam et le bromazépam, le programme quant à lui, s'établit ainsi : la température initiale est de 70°C, puis montée à 300°C à une vitesse de 30°C/mn. On maintient le four à cette température finale (300°C) pendant 30 minutes. La durée totale de l'analyse est de 37,66 minutes. La détection se fait en mode full scan.

## CHAPITRE 6 RESULTATS ET DISCUSSION

Pour mettre en évidence l'identification de principes actifs dans les cheveux de sujets consommateurs de café, de tabac et potentiellement de psychotropes, nous avons fait appel à l'analyse par chromatographie en phases gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en opérant en mode impact électronique (CG-SM-IE) ; ce qui nous a permis d'obtenir les résultats ci-après.

### 6.1 Mise en évidence de la caféine et de ses métabolites dans les cheveux

La présence de la caféine et de ses métabolites dans les cheveux a été réalisée grâce à l'analyse d'un étalon, une matrice de référence ; issus de cheveux provenant de sujets sains non consommateurs de café ou d'autres substances contenant éventuellement de la caféine ; ainsi que des échantillons de cheveux issus de personnes habituées à la consommation de café.

#### a- Analyse de l'étalon

Le chromatogramme de l'étalon de la caféine est caractérisé par la présence d'un pic important pour un temps de rétention de 8,524 mn, figure 6.1.

Par ailleurs, le spectre de masse correspondant est exactement identique à celui de la caféine et conforme à celui de la librairie de NIST [numéro sur NIST # 250547], figure 6.2.

Ceci étant, la qualité du spectre de masse de l'étalon confirme le choix optimal des conditions chromatographiques, ainsi que le mode de détection.

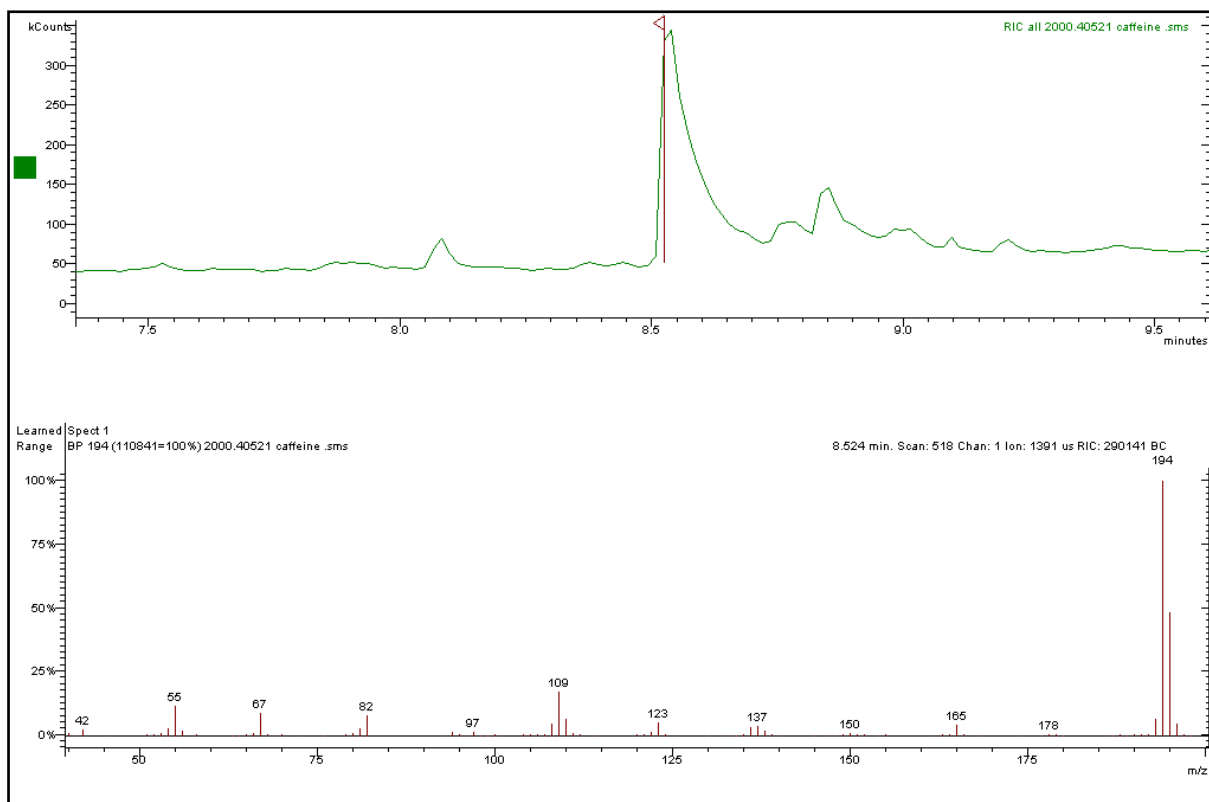


Figure 6.1 : Mise en évidence de l'étalon de la caféine par CG-SM-IE.

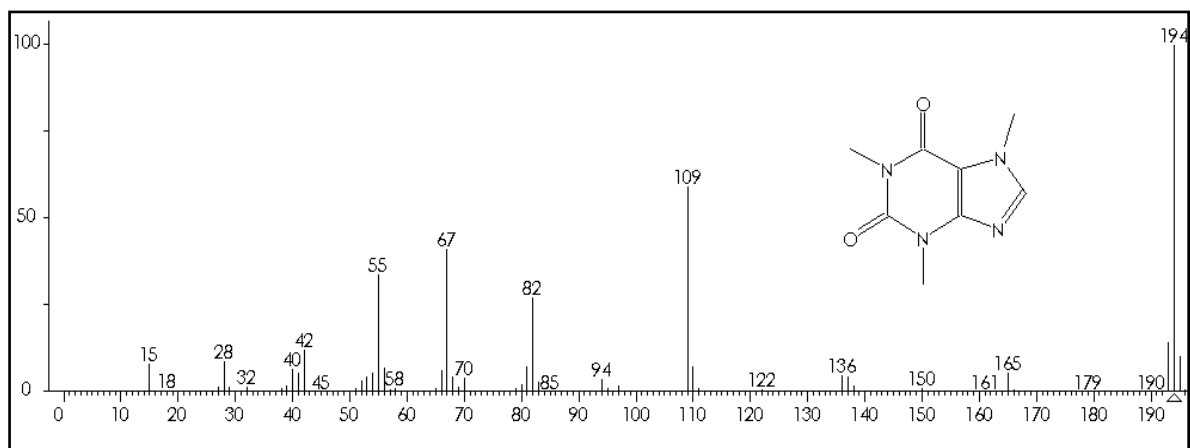


Figure 6.2 : Spectre de masse de la caféine selon la librairie NIST.

### b- Analyse des cheveux sains (matrice de référence)

L'analyse du chromatogramme d'extrait émanant de cheveux de sujets non consommateurs de café ou tout autre produit (chocolat, thé...) pouvant contenir potentiellement de la caféine, servira donc comme une matrice de référence puisqu'il n'est décelé aucun pic au temps de rétention de l'étalon.

La figure 6.3 montre la différence entre le chromatogramme de l'étalon de la caféine et celui d'extrait de cheveux sains.

Ce résultat est en accord avec nos prévisions, et confirme l'inexistence de cette molécule à l'état naturel dans les cheveux.

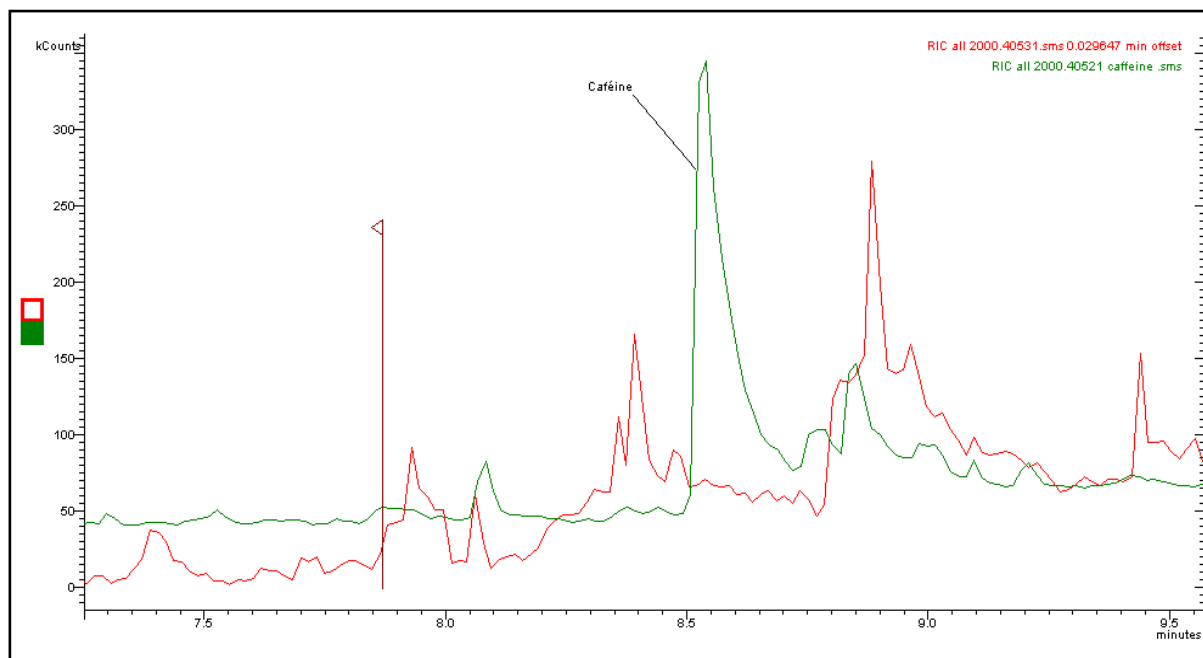


Figure 6.3 : Comparaison entre le chromatogramme de l'analyse par CG-SM-IE de l'étalon de la caféine et l'extrait des cheveux de référence.

### c- Analyse de cheveux contenant de la caféine et ses métabolites

#### Mise en évidence de la caféine dans les cheveux

Le chromatogramme obtenu par analyse de cheveux de personnes habitués régulièrement et quotidiennement à la consommation de café, permet de relever la présence d'un pic sous forme d'épaulement à un temps de rétention identique à celui de la caféine.

L'analyse du spectre de masse correspondant à cet épaulement permet de déceler la présence de tous les fragments caractéristiques de la caféine, ce spectre de masse est identique à celui de la librairie.

L'analyse de l'échantillon C.C.S1 provenant de cheveux du sujet N°1 susceptibles de contenir de la caféine par CG-SM-IE a permis d'obtenir un chromatogramme présentant un épaulement à 8,632 mn, figure 6.4. Des temps de

réention similaires sont obtenus pour les deux autres échantillons considérés (C.C.S2 et C.C.S3) relatifs aux sujets 2 et 3, tableau 6.1.

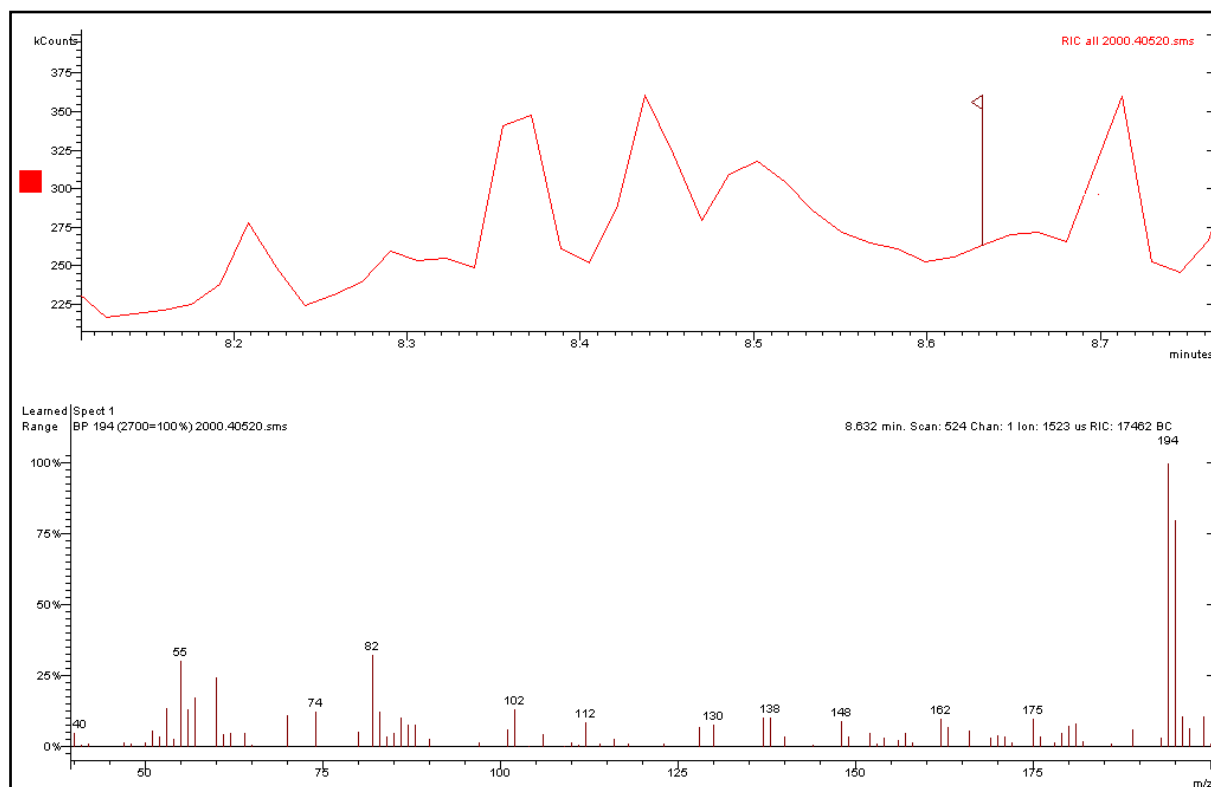


Figure 6.4 : Mise en évidence de la caféine dans les cheveux du sujet N°1 par CG-SM-IE.

Le spectre de masse correspondant renferme tous les fragments spécifiques à la caféine, ils correspondent à ceux retrouvés pour l'étalon.

Tableau 6.1 : Temps de rétention de la caféine dans les échantillons de cheveux étudiés.

Échantillon	Référence	Temps de rétention (minute)
<b>C.C.S1</b>	40 520	8,632
<b>C.C.S2</b>	40 532	8,620
<b>C.C.S3</b>	40 519	8,656

Le résultat pour l'échantillon C.C.S2 appartenant au sujet 2 est représenté en appendice C, figure C.1.

Les fragments caractéristiques de la caféine et leurs structures chimiques obtenues par le logiciel de traitement des spectres de masse « Masse Interpreter V 0.9, NIST » sont représentés dans le tableau 6.2.

Tableau 6.2 : Structures chimiques des fragments caractéristiques de la caféine.

m/z	194	165	137	
Structure				
m/z	109	82	67	56
Structure				

Le logiciel SATURN permet de faire une comparaison selon le degré de similitude, et donc de pureté, entre les fragments obtenus pour l'échantillon C.C.S1 et ceux de la librairie de NIST.

Un degré de pureté de 79,2% a été obtenu, figure 6.5, ce dernier est satisfaisant pour confirmer la présence de la caféine dans les cheveux du sujet N° 1.

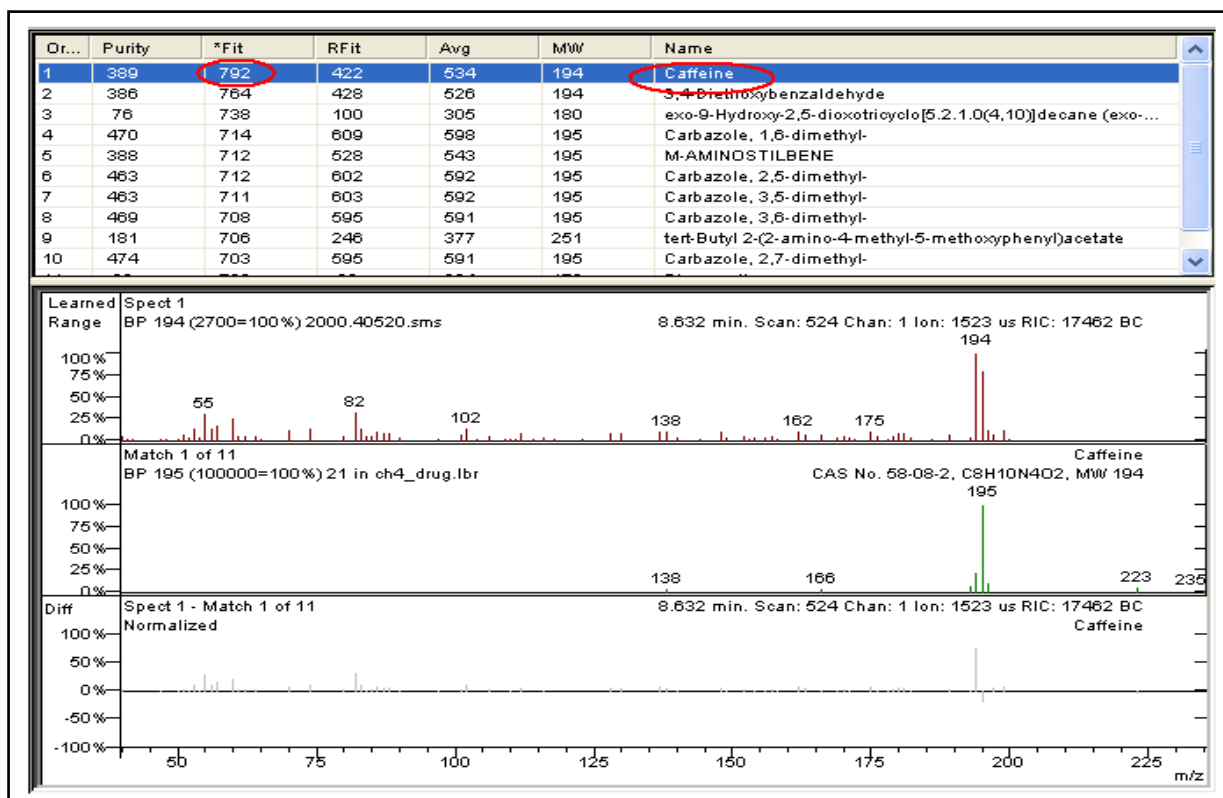


Figure 6.5 : Résultat de l'identification du spectre de masse obtenu pour l'échantillon de cheveux du sujet N°1 sur la librairie du NIST.

### Mise en évidence des métabolites de la caféine dans les cheveux

La recherche des métabolites de la caféine dans les différents extraits de cheveux de personne consommatrices de café, en plus de la caféine, constitue un moyen supplémentaire pour prouver la consommation.

L'analyse des différents échantillons d'extraits de cheveux permet de relever la présence d'un pic spécifique relatif aux dérivés de méthylxanthine. Ces dérivés dont la théobromine sont des isomères de position déméthylés, plus légers et plus polaires que la caféine.

Le spectre de masse du pic élué à un temps de rétention d'environ six (06) minutes, est référencié dans la librairie comme étant le spectre de masse de la théobromine.

La mise en évidence des métabolites de la caféine et de façon plus spécifique dans les cheveux présente des difficultés pratiques dûes principalement à leurs faibles teneurs. Néanmoins, l'interprétation des chromatogrammes obtenus suite aux analyses des extraits de cheveux C.C.S1, C.C.S2 et C.C.S3 par CG-SM-IE montre l'existence en plus du pic de la caféine d'autres pics parmi lesquels se trouve celui correspondant aux dérivés du méthylxanthine. En effet le pic en question ayant un temps de rétention autour de six minutes. La figure 6.6 représente le résultat obtenu pour l'échantillon C.C.S2. Un épaulement apparaît à 6,079 mn dont le spectre de masse correspondant est identique à celui de la théobromine, de la figure 6.7, représenté sur la librairie NIST [numéro sur NIST # 118950].

La présence d'un pic caractéristique de la théobromine dans les cheveux du sujet N° 2 pourrait s'expliquer par le fait que ce dernier présente la plus grande fréquence de consommation de café ( en moyenne 5 cafés/ jour) par rapport aux autres sujets.



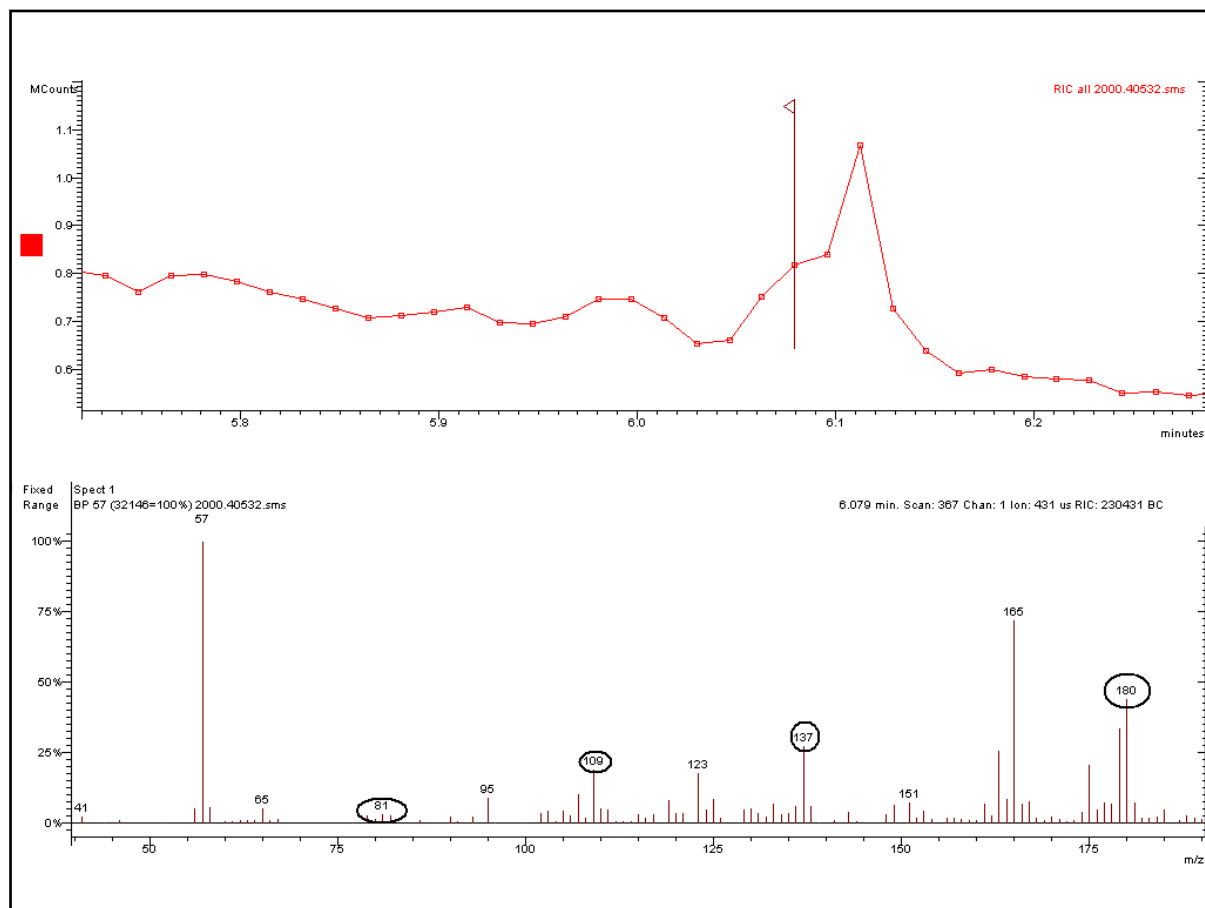


Figure 6.6 : Mise en évidence de la théobromine dans les cheveux par CG-SM-IE.

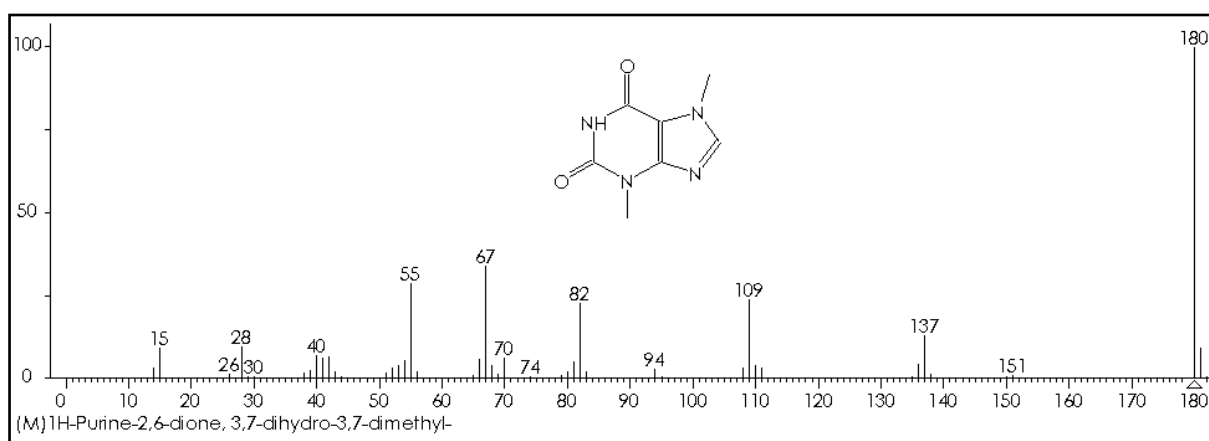


Figure 6.7 : Spectre de masse de la théobromine selon la librairie NIST.

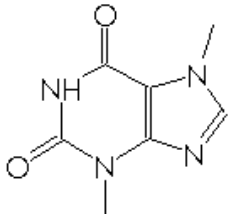
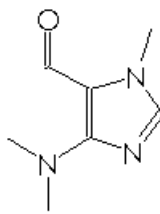
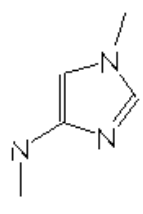
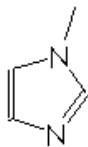
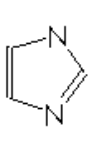
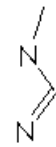
La présence des métabolites dans les cheveux peut être expliquée par le fait que toute substance étrangère au corps humain est éliminée par biotransformation au niveau du foie pour être enfin rejetée dans les urines. Cette transformation consiste à rendre une substance hydrophobe hydrophile par des réactions

enzymatiques. Les dérivés de méthylxanthine obtenus à partir de la caféine par déméthylation sont facilement éliminés.

Une difficulté apparaît lors de détection de la théobromine dans les échantillons C.C.S1 et C.C.S3, elle est due essentiellement à sa faible concentration, ce qui entraîne son enfouissement dans le bruit de fond.

Les principaux fragments de masse à rechercher pour la théobromine, ainsi que leurs structures chimiques, sont représentés dans le tableau 6.3.

Tableau 6.3 : Structures chimiques des fragments caractéristiques de la théobromine.

m/z	180	137	109
Structure			
m/z	81	66	56
Structure			

Les résultats obtenus précédemment nous ont permis d'identifier et de caractériser la présence de caféine dans les cheveux humains suite à une extraction liquide-liquide et analyse chromatographique par CG-SM-IE. Ces résultats sont reproductibles. La présence des métabolites de caféine dans les cheveux apporte une indication supplémentaire quant à la consommation de ce produit.

La méthode d'extraction ainsi que les conditions d'analyses employées sont favorables afin d'extraire et d'analyser la caféine et ses métabolites à partir de cheveux.

## 6.2 Mise en évidence de la caféine dans les urines

L'urine a été utilisée comme milieu (ou matrice) d'analyse pour élucider le mode d'incorporation de la caféine ainsi que ses métabolites dans les cheveux.

Cinq (05) échantillons d'urine de personnes consommatrices de café ont été étudiés afin de déterminer la présence de la caféine dans leurs urines.

Les chromatogrammes obtenus des cinq échantillons sont caractérisés par la présence du pic relatif à la molécule de la caféine avec des temps de rétentions autour de 8,5 mn, comme dans le cas de l'analyse de cheveux.

La figure 6.8 représente le résultat d'analyse des urines par CG-SM-IE de l'échantillon U.C.S1 appartenant au sujet N°1.

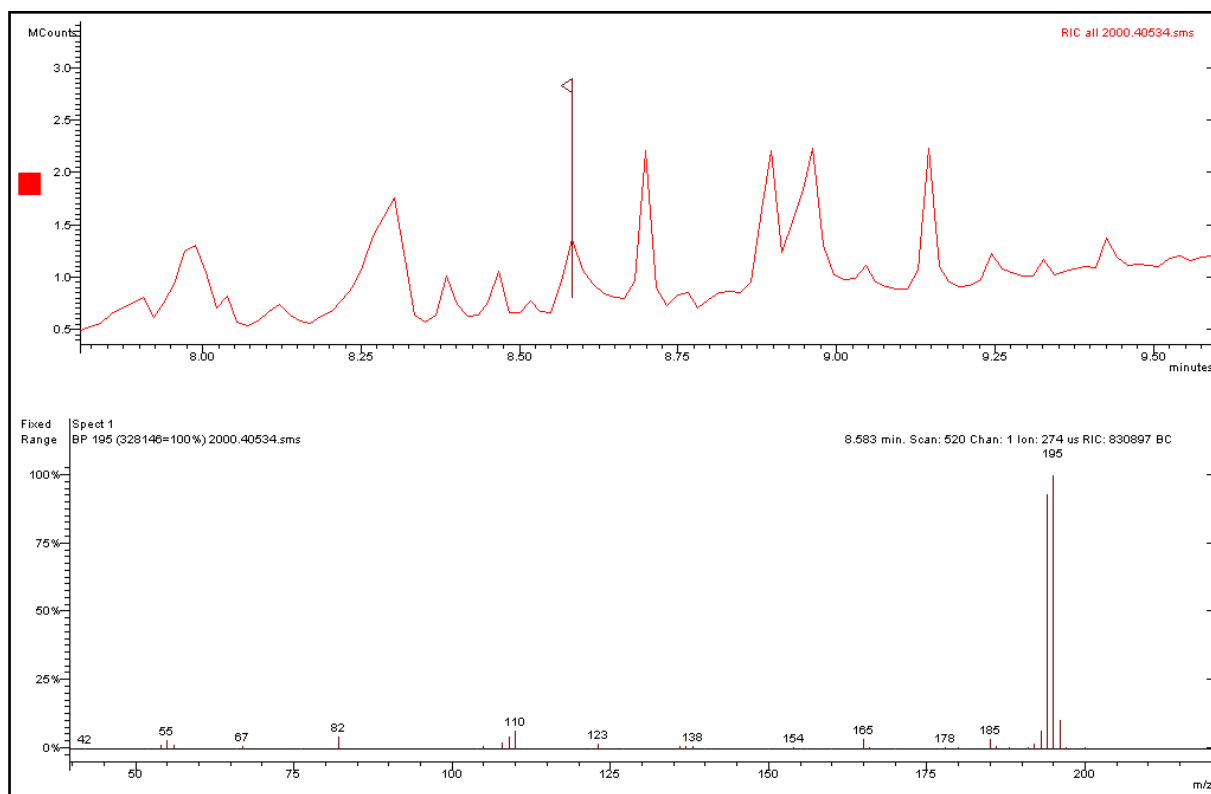


Figure 6.8 : Mise en évidence de la caféine dans les urines du sujet N° 1 par CG-SM-IE.

Les résultats obtenus pour les quatre autres échantillons, à savoir U.C.S2, U.C.S3, U.C.S4 et U.C.S5, sont représentés en Appendice D sur la figure D1, figure D2, figure D3 et figure D4 respectivement.

Le tableau 6.4 montre une reproductibilité des temps de rétention pour les cinq échantillons analysés.

Tableau 6.4 : Temps de rétention de la caféine pour les échantillons d'urine étudiés.

Échantillon	Référence	Temps de rétention (minutes)
<b>U.C.S1</b>	40534	8.583
<b>U.C.S2</b>	40535	8.567
<b>U.C.S3</b>	40542	8.585
<b>U.C.S4</b>	40536	8.614
<b>U.C.S5</b>	40537	8.578

En outre, un degré de similitude supérieur estimé à 85,6%, figure 6.9 a été obtenu pour l'échantillon d'urine U.C.S1 par rapport à l'échantillon de cheveu C.C.S1 (79,2%), ceci est dû aux caractéristiques propres à chaque matrices.

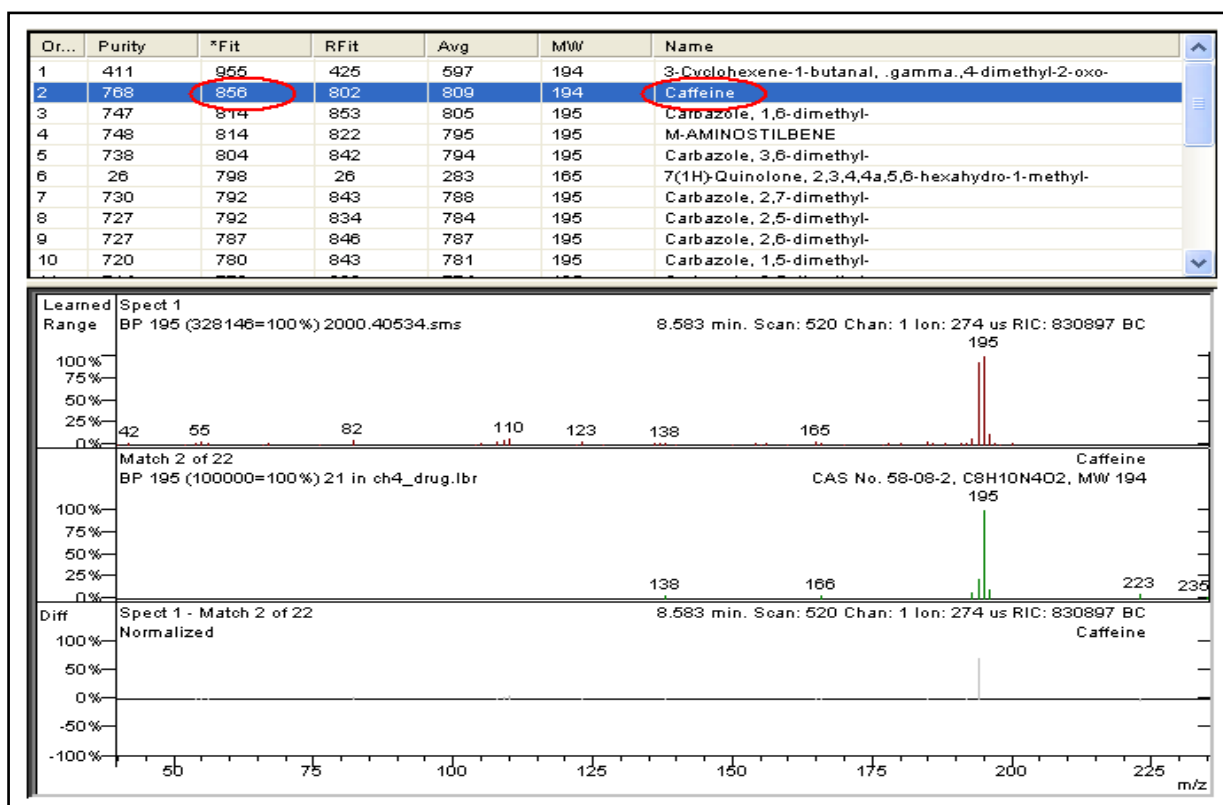


Figure 6.9 : Résultat de l'identification du spectre de masse obtenu pour l'échantillon d'urine du sujet N°1 sur la librairie du NIST.

## Les métabolites de la caféine dans les urines

L'analyse du chromatogramme obtenu, après analyse par CG-SM de l'échantillon d'urine du sujet N°4, a permis de déceler la présence d'un pic à un temps de rétention de 6,07 mn spécifique à un métabolite de la caféine à savoir la théobromine, figure 6.10. Son spectre de masse est identique à celui retrouvé sur la librairie de NIST.

Toutefois, il est intéressant de noter que la détection dans les urines de ces métabolites est plus importante que dans le cas des extraits de cheveux.

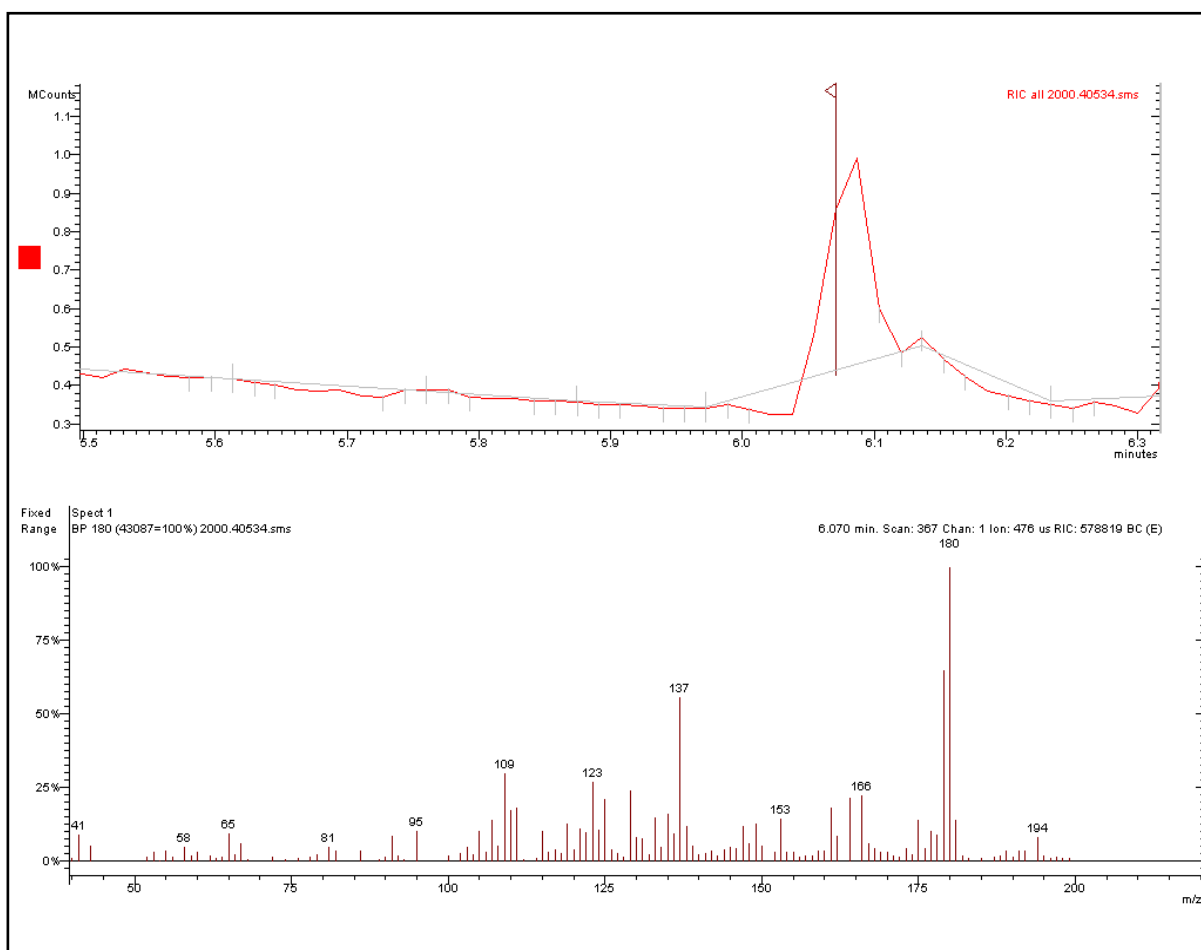


Figure 6.10 : Mise en évidence de la théobromine dans l'échantillon U.C.S4 par CG-SM-IE.

La méthode d'analyse utilisée a permis d'identifier la présence de métabolites de la caféine dans les urines.

A la lumière des ces résultats, il en ressort que le mode d'incorporation de la caféine dans les cheveux est endogène.

### 6.3 Mise en évidence de la nicotine et de la cotinine dans les cheveux

Pour mettre en évidence la nicotine dans les cheveux et en absence d'un étalon, l'analyse des cheveux a été effectuée sur des cheveux de sujets non fumeurs et ceux appartenant à des habitués.

L'identification de la nicotine a été réalisée grâce à la comparaison au spectre de masse existant au niveau de la librairie de NIST (numéro sur NIST [# 232303]), figure 6.11.

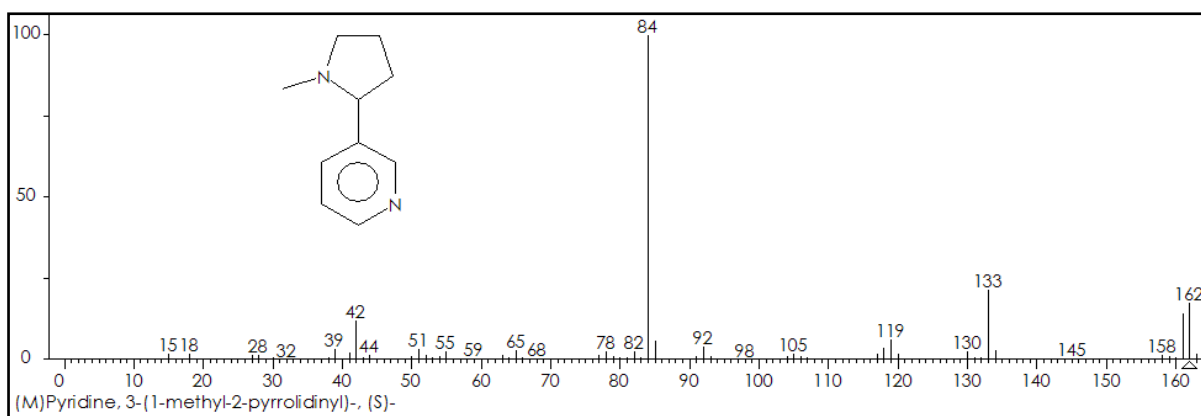


Figure 6.11 : Spectre de masse de la nicotine selon la librairie NIST.

Les fragments caractéristiques de la molécule de nicotine ainsi que leurs structures chimiques sont représentés sur le tableau 6.5

Tableau 6.5 : Structures chimiques des fragments caractéristiques de la nicotine.

m/z	162	133	119	105
Structure				
m/z	92	84	78	42
Structure				

### a- Analyse de la matrice de référence (cheveux sains)

L'analyse du chromatogramme relatif à l'extrait émanant de cheveux de sujet non fumeur, montre l'absence de pic de nicotine, figure 6.12.



Figure 6.12 : Chromatogramme CG-SM-IE de l'extrait des cheveux d'une personne non fumeur.

En effet, l'observation du spectre de masse de chaque point du chromatogramme ne donne aucun signe de présence de fragments caractéristiques de la molécule de nicotine.

### c- Analyse des cheveux contenant de la nicotine et de la cotinine

#### Mise en évidence de la nicotine dans les cheveux

L'analyse des chromatogrammes relatifs aux extraits de cheveux des sujets fumeurs indique la présence d'un pic au alentour de 5.50 mn. La comparaison du spectre de masse de ce pic avec celui de la nicotine, existant dans la librairie de NIST, permet de confirmer la similitude.

L'examen attentif des spectres de masse des échantillons fait ressortir la présence de tous les fragments caractéristiques à la nicotine.

Quatre échantillons de cheveux de fumeurs ont fait l'objet de notre expérimentation. La figure 6.13 représente le résultat obtenu pour l'extrait de cheveux C.N.S1 du sujet N°1. Le pic de la nicotine apparaît après un temps d'élution de 5,472 mn.

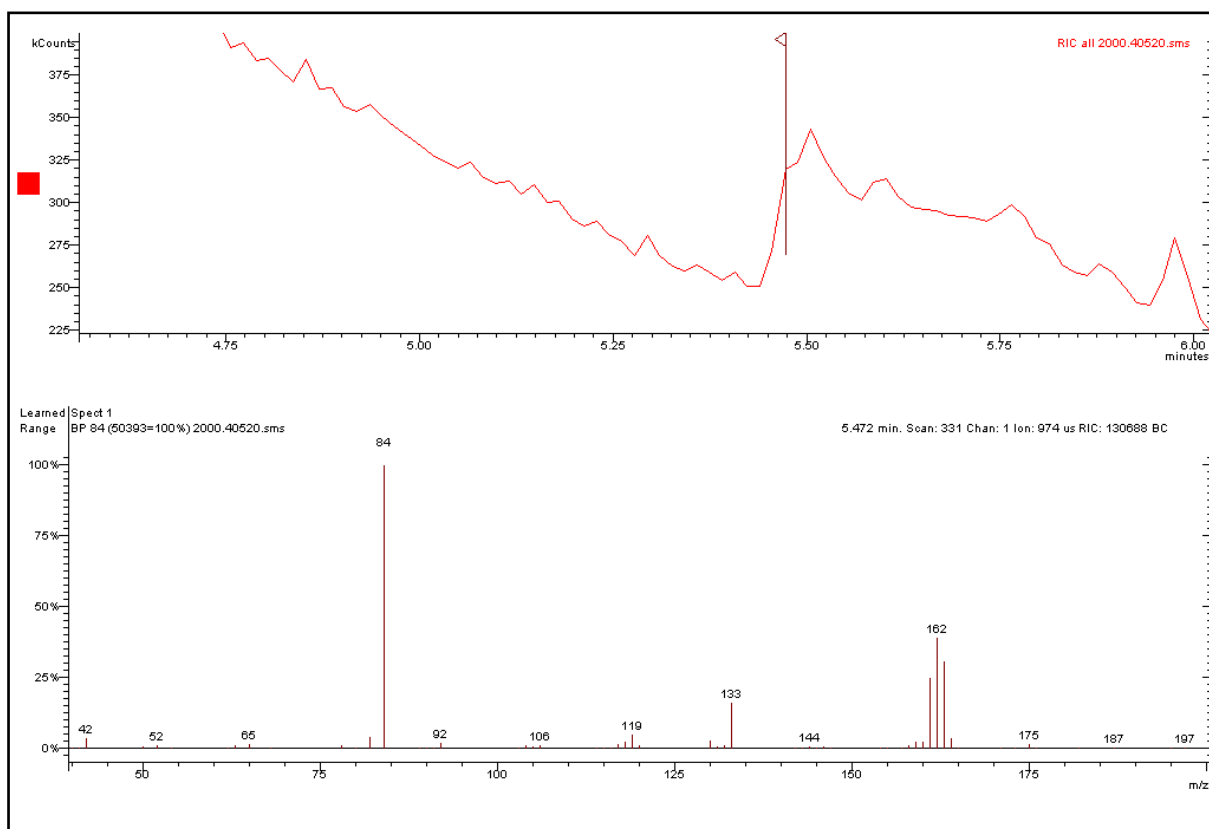


Figure 6.13 : Mise en évidence de la nicotine dans les cheveux du sujet N°1 par CG-SM-IE.

Les résultats des trois autres échantillons étudiés, relatifs aux trois autres sujets, confirment celui obtenu pour le sujet N°1, tableau 6.6.

Tableau 6.6 : Temps de rétention de la nicotine pour les échantillons de cheveux étudiés.

Échantillon	Référence	Temps de rétention (minutes)
<b>C.N.S1</b>	40520	5,472
<b>C.N.S2</b>	40532	5,483
<b>C.N.S3</b>	40519	5,519
<b>C.N.S6</b>	40478	5,560



Les résultats obtenus indiquent une reproductibilité et fiabilité de la méthode d'extraction et des conditions d'analyse pour cet alcaloïde.

Les résultats des échantillons appartenant aux trois autres personnes sont représentés en appendice E (figure E1, E2 et E3).

L'identification de la nicotine est rendue difficile en raison de la présence d'autres pics, au voisinage immédiat à celui de la nicotine, correspondants à d'autres molécules. Notre objectif premier est d'identifier la présence de nicotine dans les cheveux au dépourvu des autres molécules existantes au sein d'une matrice aussi complexe que les cheveux.

Les spectres de masse des autres échantillons renferment des fragments spécifiques à la nicotine. L'interprétation du résultat d'analyse de l'extrait C.N.S3 du sujet N°3 permet d'obtenir un degré de pureté de 87,9%, suite à la consultation de la librairie du NIST, figure 6.14.

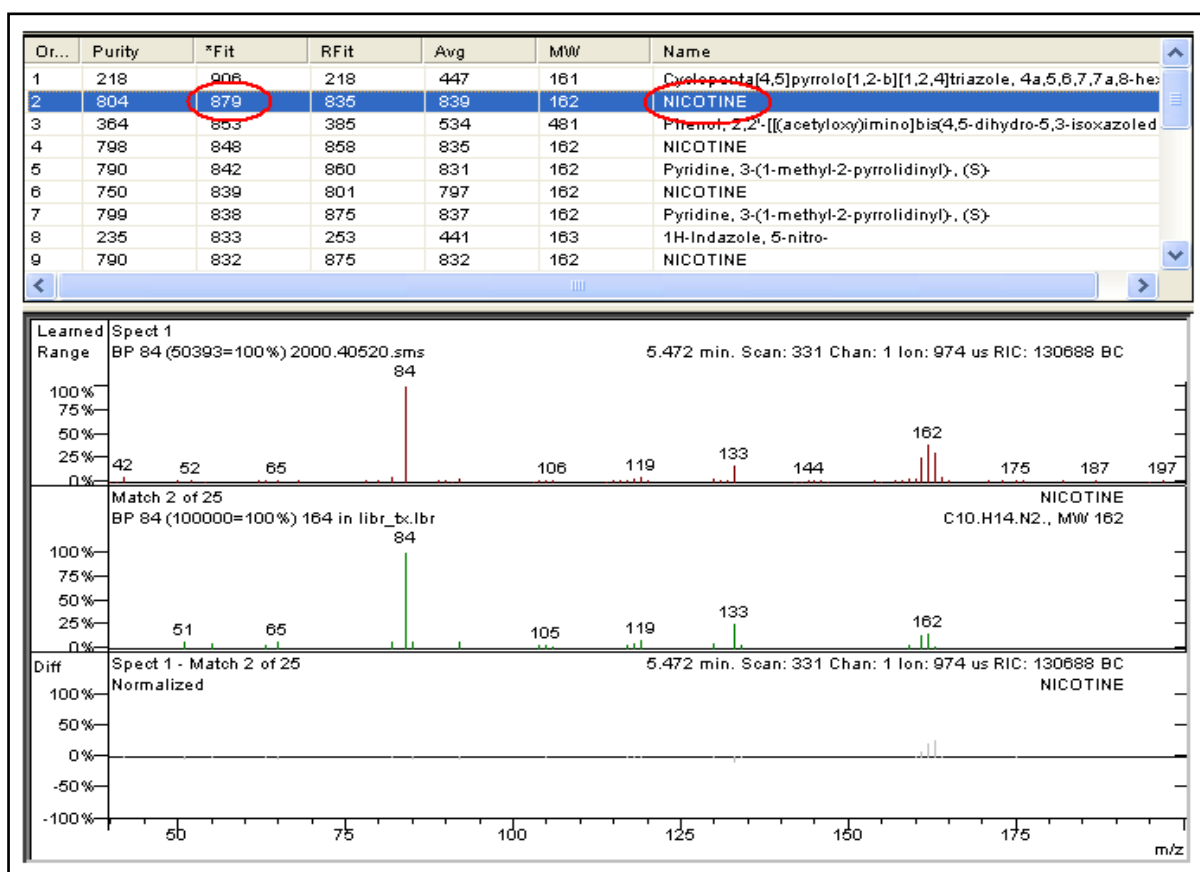


Figure 6.14 : Résultat de l'identification du spectre de masse obtenu pour l'échantillon N°3 sur la librairie du NIST.

La méthode d'extraction et les conditions d'analyses employées sont convenables pour extraire et analyser la nicotine à partir des cheveux.

## Mise en évidence des métabolites de la nicotine dans les cheveux

Après interprétation des spectres de masse obtenus par analyse des échantillons de cheveux, nous n'avons pu mettre en évidence l'existence d'aucun des métabolites de la nicotine, ceci revient au fait qu'ils soient sous le seuil de détection.

### 6.4 Mise en évidence de la nicotine dans les urines

Dans le but de confirmer la nature de la voie d'incorporation de la nicotine dans les cheveux, nous avons recherché cette dernière dans une autre matrice biologique : l'urine.

Quatre échantillons d'urine de sujets fumeurs ont fait l'objet de cette étude afin de déterminer la présence de la nicotine.

Les chromatogrammes obtenus par CG-SM-IE des quatre échantillons sont caractérisés par la présence du pic relatif à la molécule de nicotine avec des temps de rétentions autour de 5,55 mn.

La figure 6.15 représente le résultat d'analyse des urines par CG-SM-IE de l'échantillon U.C.S3 appartenant au sujet N°3. Un pic important a été obtenu à 5,505 mn dont le spectre de masse correspond parfaitement à celui de la nicotine.

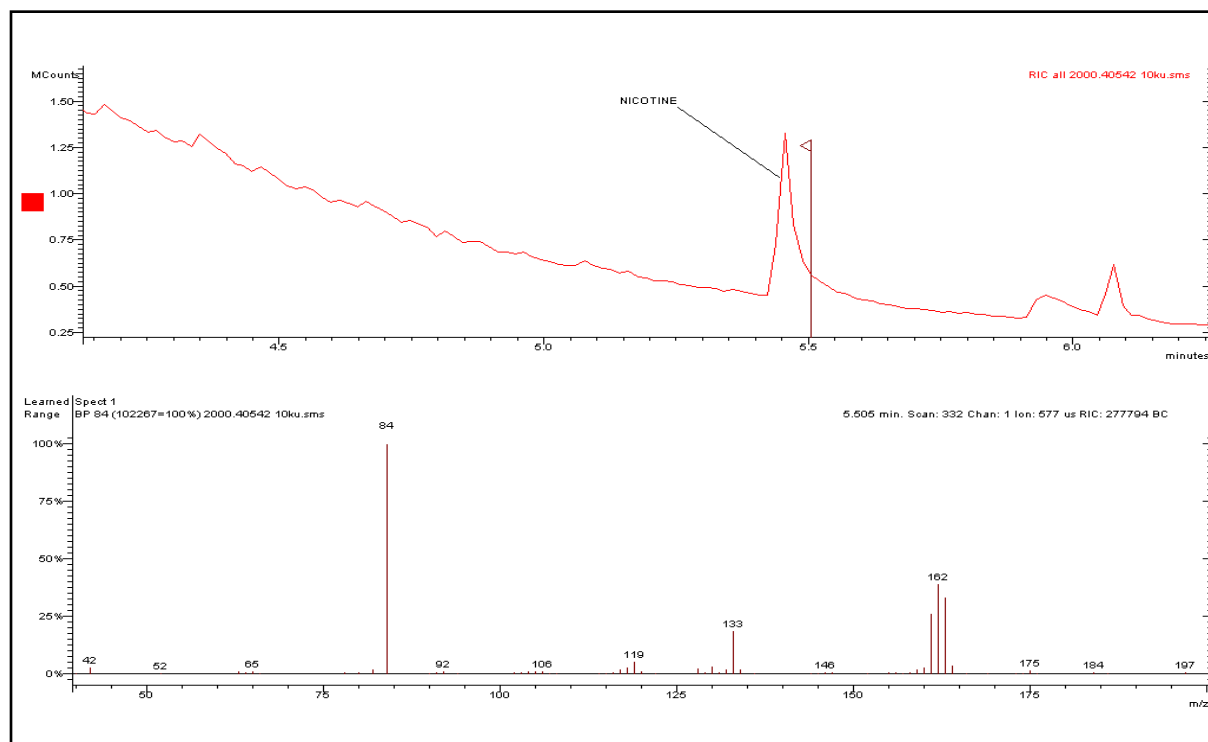


Figure 6.15 : Mise en évidence de la nicotine dans les urines du sujet N°3 par CG-SM-IE.

Les temps de rétention de la nicotine dans tous les échantillons d'urine analysés sont représentés dans le tableau 6.7.

Tableau 6.7 : Temps de rétention de la nicotine dans les échantillons d'urine étudiés.

Échantillon	Référence	Temps de rétention (minutes)
<b>U.N.S1</b>	40534	5,564
<b>U.N.S2</b>	40535	5,628
<b>U.N.S3</b>	40542	5,505
<b>U.N.S6</b>	40539	5,564

On remarque une reproductibilité dans les temps de rétention des quatre échantillons analysés. Les résultats obtenus pour les trois autres sujets sont représentés en appendice F (figure F1, F2 et F3).

En outre, un degré de pureté important estimé à 78,2 %, figure 6.16 a été obtenu pour l'échantillon d'urine U.N.S2 suite à la consultation de la librairie NIST.

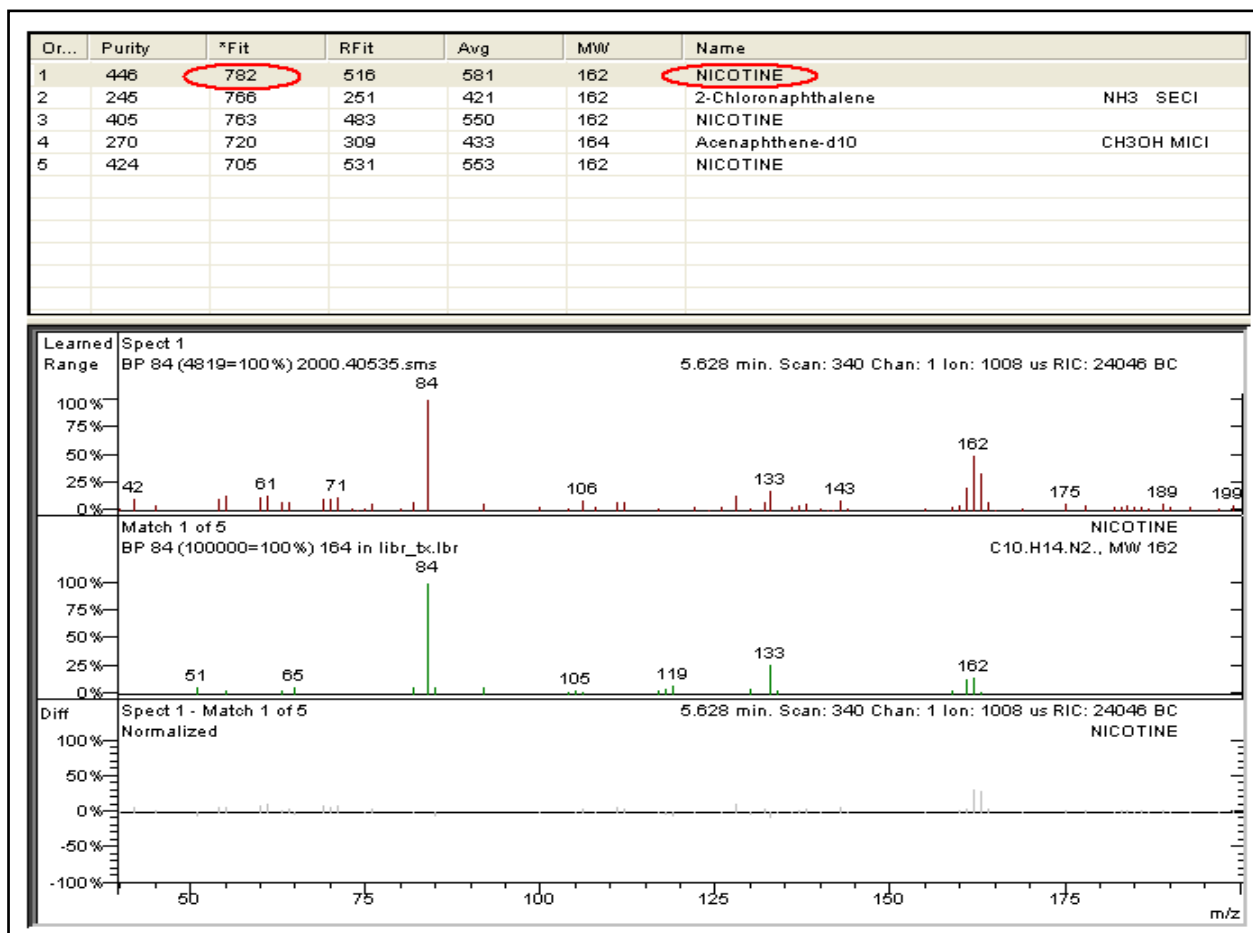


Figure 6.16 : Résultat de l'identification du spectre de masse obtenu pour l'échantillon du sujet N°2 sur la librairie du NIST.

A la lumière de ses résultats, il en ressort que le mode d'incorporation de la nicotine dans les cheveux est endogène.

### Mise en évidence de la de la cotinine dans les urines

De même que pour les cheveux, et suite à l'interprétation des spectres de masses obtenus pour l'ensemble de nos échantillons d'urine, il apparaît clairement la présence de cotinine, métabolite de la nicotine, dans l'un de nos échantillons.

Le pic caractéristique à la cotinine est enregistré après un temps d'élution de 7,836 mn, figure 6.17.

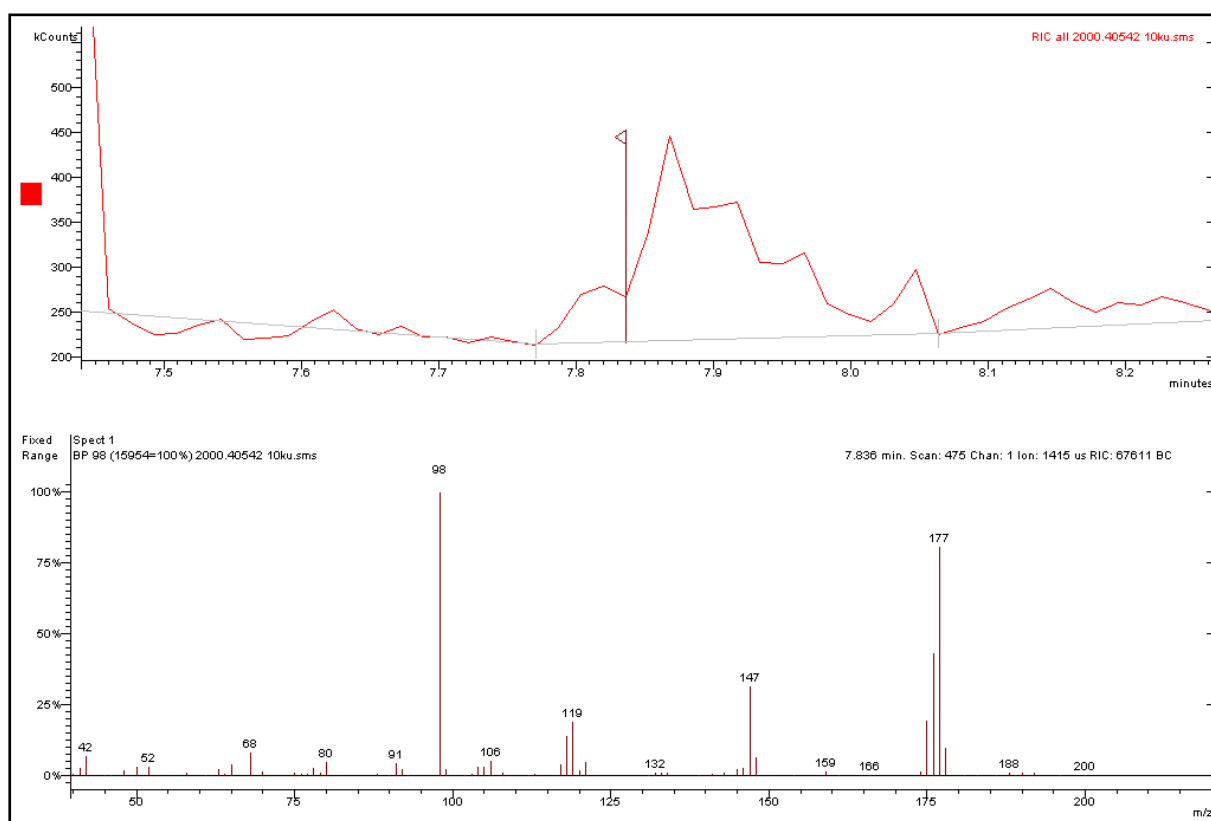


Figure 6.17 : Mise en évidence de la cotinine dans les urines par CG-SM-IE.

En l'absence d'un standard de cotinine, nous avons orienté l'identification de la molécule en question en se référant au spectre de masse existant au niveau de la librairie du NIST (numéro dans NIST [#248817]), figure 6.18.

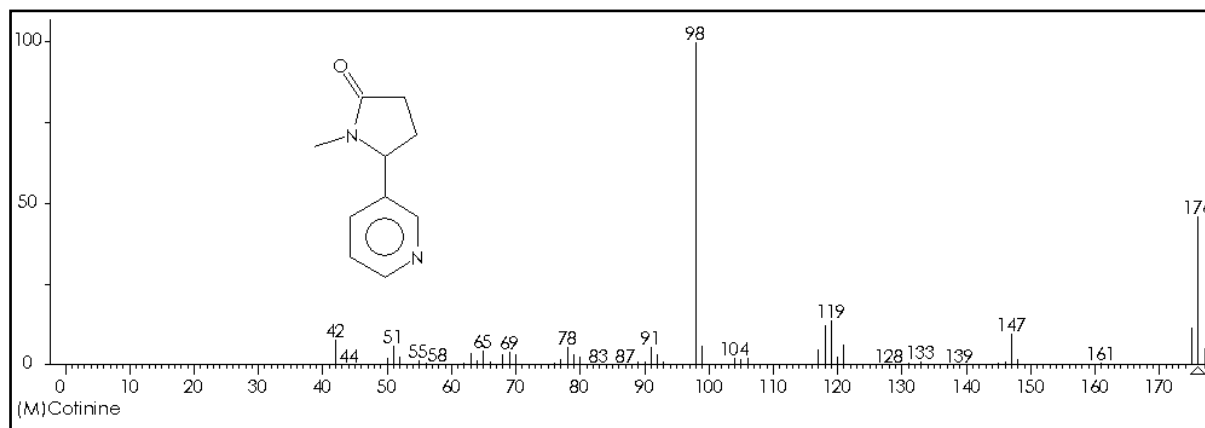


Figure 6.18 : Spectre de masse de la cotinine selon la librairie NIST.

Les fragments caractéristiques de la molécule de cotinine ainsi que leurs structures chimiques sont représentés dans le tableau 6.8.

Tableau 6.8 : Structures chimiques des fragments caractéristiques de la cotinine.

m/z	176	147	119
Structure			
m/z	98	92	78
Structure			

A travers nos différentes expérimentations, nous avons pu mettre au point de façon originale des méthodes d'analyses fiables, reproductibles et spécifiques à l'identification de deux alcaloïdes de large consommation, il s'agit respectivement de la caféine et de la nicotine au sein de deux matrices biologiques les cheveux et l'urine en utilisant la chromatographie gaz couplée à la spectrométrie de masse en opérant en impact électronique comme mode d'ionisation. Cependant, en l'absence de publication traitant de la problématique posée en amont, les interprétations des différents résultats ont été faites principalement par rapport à la base de données du NIST.

## 6.5 Mise en évidence du clonazépam et du bromazépam dans les cheveux

Afin d'exploiter au maximum des cheveux, utilisé précédemment pour la mise en évidence et l'identification de la caféine, la nicotine et leurs métabolites et d'élargir le champs d'application de cette matrice ; il a été jugé utile d'étudier quelques molécules utilisées comme principes actifs dans des psychotropes. Notre intérêt a été attiré vers les benzodiazépines, une famille de molécules à large consommation en toxicomanie, en particulier le clonazépam et le bromazépam.

Malgré le peu de données et de travail dans la littérature concernant l'analyse des benzodiazépines, l'espoir de leur détection au niveau des cheveux est important. Ce manque d'intérêt est dû à leur instabilité thermique et chimique, qui conduit facilement à la formation des benzophénones.

Les résultats d'analyses des cheveux de consommateurs de Rivotril et de Léxomil par CG-SM-IE sont présentés comme suit :

### 6.5.1 Mise en évidence du clonazépam dans les cheveux

Pour mettre en évidence le clonazépam dans les cheveux de toxicomanes, nous avons procédé à l'analyse d'une part d'un étalon extrait à partir du médicament, des cheveux provenant de sujets sains non consommateurs de Rivotril et ceux appartenant à des habitués, d'autre part.

#### a- Analyse de l'étalon de clonazépam

L'absence d'étalon de clonazépam n'a pas été un handicap à la poursuite de ce travail. L'utilisation d'un étalon extrait à partir du Rivotril dans nos expérimentations nous a permis lors de l'analyse par CG-SM-IE de déterminer le temps de rétention de cette molécule.

L'analyse du chromatogramme obtenu suite à l'analyse de l'étalon par CG-SM-IE permet de déceler l'apparition d'un pic à 19,925 mn, figure 6.19.

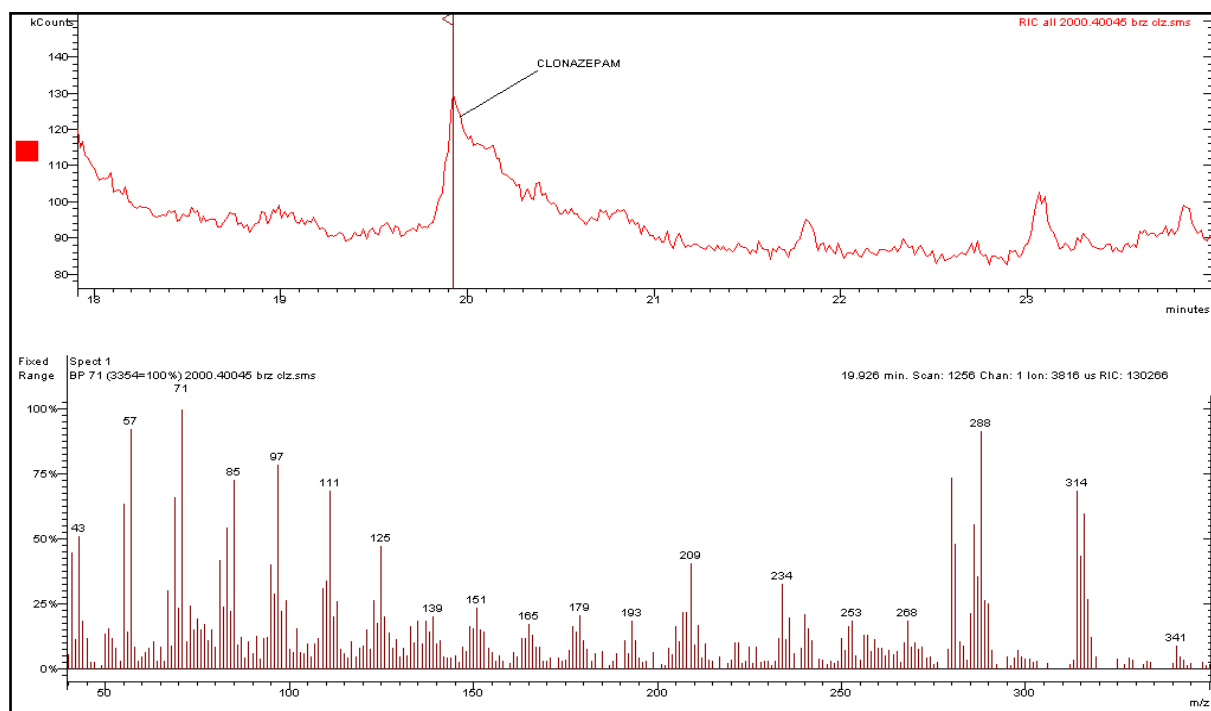


Figure 6.19 : Résultats de l'analyse par CG-SM-IE de l'étalon du clonazépam

L'identification du spectre de masse obtenu a été rendu possible par sa comparaison avec celui existant au niveau de la librairie du NIST, figure 6.20. Le pic ayant un temps de rétention de 19,925 mn correspond parfaitement à celui du clonazépam (numéro du clonazépam dans NIST [#107191]).

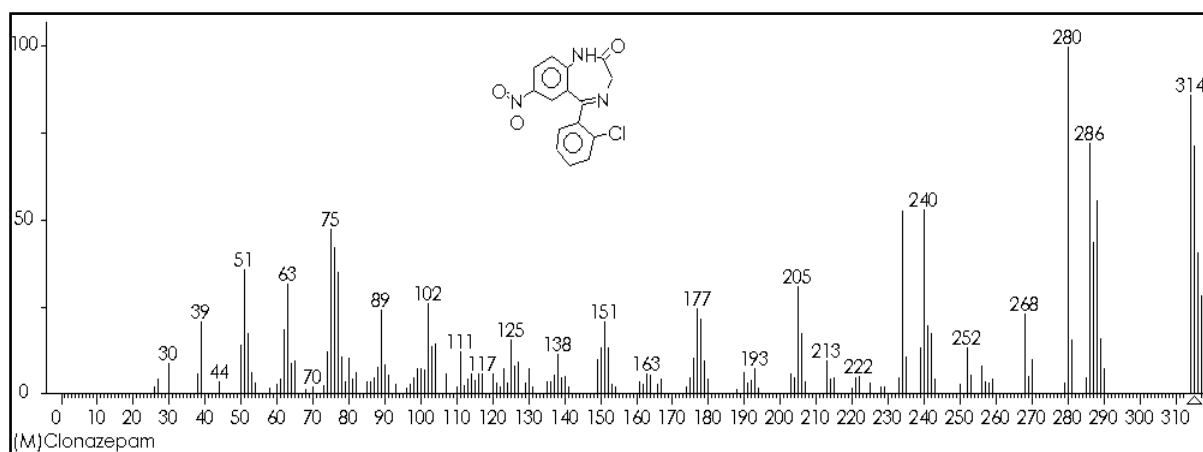


Figure 6.20 : Spectre de masse du clonazépam selon la librairie de NIST.

La détection de l'étalon confirme la fiabilité des conditions chromatographiques et spectrométriques utilisés lors de notre analyse.

Toutefois, il est à noter que le spectre de masse obtenu est considéré non propre du fait qu'il renferme des fragments étrangers à ceux spécifiques au clonazépam ; cela pourrait être dû à la présence d'autres molécules au voisinage du clonazépam. La présence de ces fragments étrangers rend l'interprétation des résultats difficiles, car elles engendrent un background assez élevé masquant les fragments d'intérêt présents à l'état de traces.

#### b- Analyse des cheveux de référence (cheveux sains)

L'analyse du chromatogramme de l'extrait de cheveux de personnes non consommatrices de Rivotril n'a pas révélé la présence de fragments caractéristiques au clonazépam.

#### c- Analyse des cheveux de consommateurs de Rivotril :

Le chromatogramme obtenu par analyse de cheveux d'une personne habituée à la consommation de Rivotril, permet de révéler l'absence de pic au temps de rétention de clonazépam, figure 6.21.

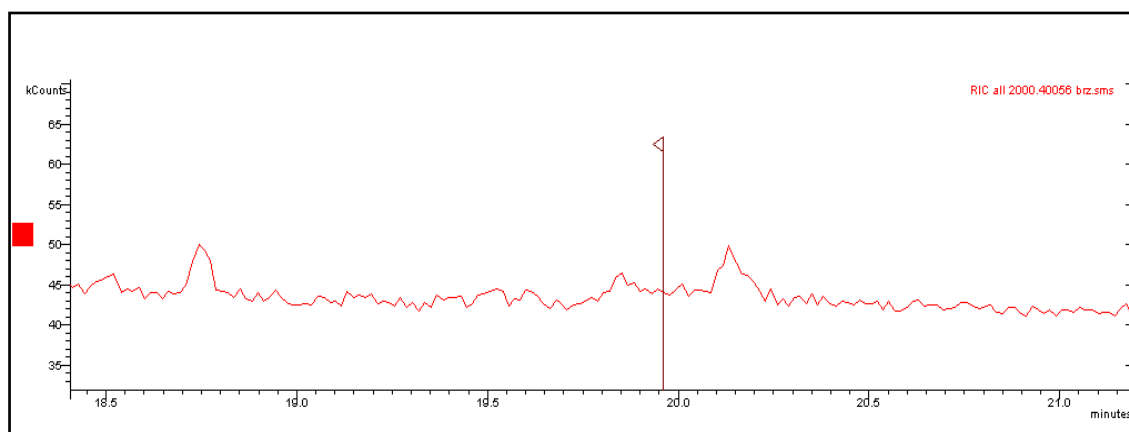


Figure 6.21 : Résultat d'analyse par CG-SM-IE d'un extrait de cheveux dans la zone du clonazépam.

Le même résultat est obtenu pour les quatre échantillons de cheveux de consommateurs de Rivotril ayant fait objet d'étude.



À la lumière des expérimentations ci-dessus, il revient à dire que l'absence de traces de clonazépam lors de l'analyse de cheveux de consommateurs probables de Rivotril serait dûe à l'une des raisons suivantes :

- La concentration du clonazépam est en dessus du seuil de détection dans les cheveux.
- Les quatre échantillons de cheveux des toxicomanes choisis peuvent ne pas contenir de clonazépam, car la fréquence et la durée de consommation sont des facteurs importants pour la détection des xénobiotiques dans les cheveux.
- Le fait que l'analyse par CG-SM-IE ne soit pas adéquate pour la détection des traces de clonazépam à partir des cheveux humains, contrairement à l'analyse par CG-SM-ICN que la bibliographie recommande.

#### 6.5.2 Mise en évidence du bromazépam dans les cheveux

Pour mettre en évidence le bromazépam dans les cheveux de toxicomanes, nous avons procédé à l'analyse d'un étalon, des cheveux de référence provenant de sujets sains non consommateurs de Léxomil, ceux appartenant à des habitués et des cheveux volontairement contaminés.

##### a- Analyse de l'étalon

L'analyse du chromatogramme relatif à l'étalon du bromazépam permet de distinguer un pic très bien séparé à un temps de rétention de 17,201 mn, figure 6.22.

Par ailleurs, le spectre de masse correspondant est exactement identique à celui du bromazépam et conforme à celui de la librairie de NIST [numéro sur NIST # 107109], figure 6.23.

La détection de l'étalon confirme la fiabilité des conditions chromatographiques et spectrométriques utilisés lors de notre analyse.

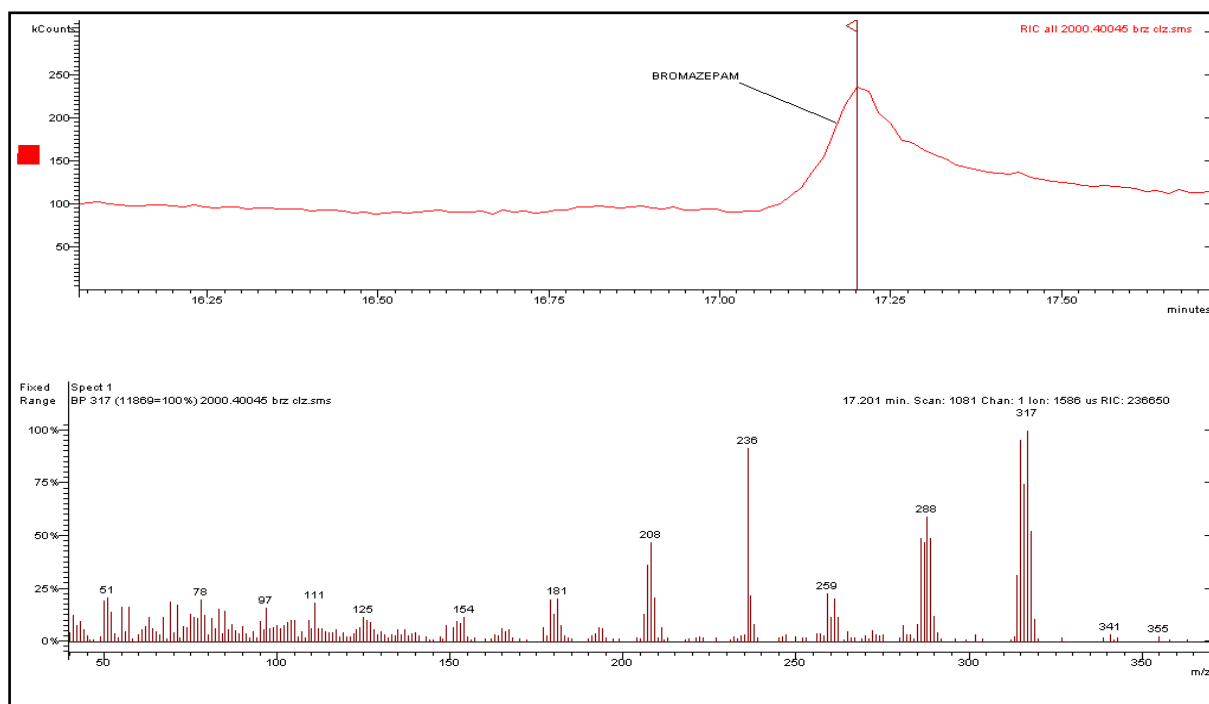


Figure 6.22: Mise en évidence de l'étalon du bromazépam par CG-SM-IE.

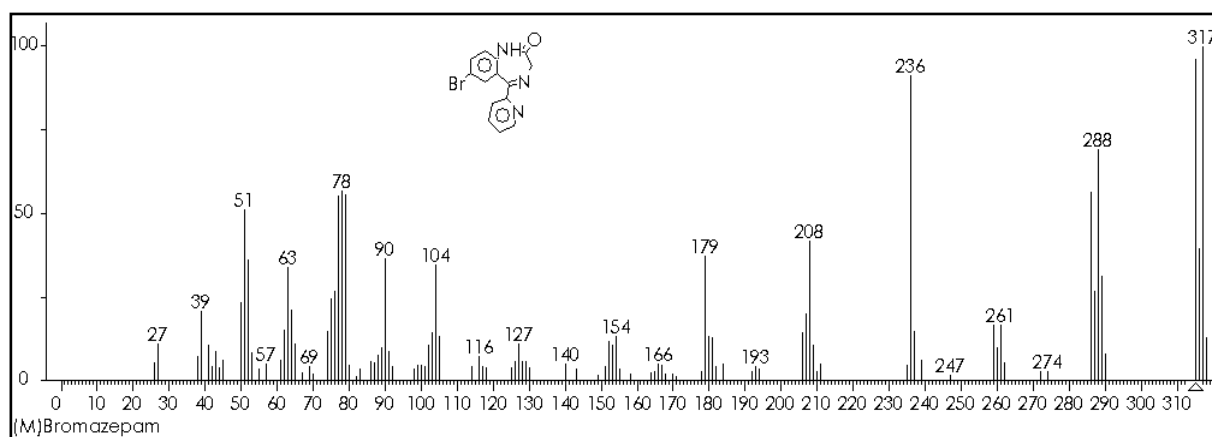


Figure 6.23 : Spectre de masse du bromazépam selon la librairie de NIST.

### b- Analyse des cheveux de référence (cheveux sains)

L'analyse du chromatogramme de l'extrait de cheveux de personnes non consommatrices de Léxomil indique l'absence de pic relatif à la présence du bromazépam dans la région du temps de rétention de 17,2 minutes.

### c- Analyse des cheveux de consommateurs de Léxomil

Le chromatogramme obtenu par analyse de cheveux d'une personne habituée à la consommation de Léxomil, permet de révéler l'absence de pic au temps de rétention de bromazépam.

Le même résultat est obtenu pour les quatre échantillons de cheveux de consommateurs de Léxomil ayant fait objet d'analyse.

À la lumière des expérimentations ci-dessus, il revient à dire que l'absence de traces de bromazépam lors de l'analyse de cheveux de consommateurs probables de Léxomil serait dûe aux mêmes raisons énumérées précédemment pour le clonazépam, à savoir :

- La concentration du bromazépam est en dessus du seuil de détection dans nos cheveux.
- Les quatre échantillons de cheveux des toxicomanes choisis peuvent ne pas contenir de bromazépam.

### d- Analyse des cheveux imprégnés ou contaminés volontairement par du bromazépam

Afin d'exclure toute ambiguïté quant à l'efficacité de la méthode d'extraction utilisée, nous avons contaminé volontairement des cheveux sains suivant la méthode d'Eder [29] par du bromazépam. Ces cheveux ont subi les mêmes étapes d'extraction que nos échantillons.

L'analyse du chromatogramme d'extrait des cheveux contaminés indique la présence d'un pic dans le temps d'apparition du bromazépam, autour de 17,2 minutes, figure 6.24.

Le spectre de masse du pic obtenu à un temps de rétention de 17,744 mn correspond au bromazépam, il contient tous les fragments de masse caractéristiques à cette molécule.

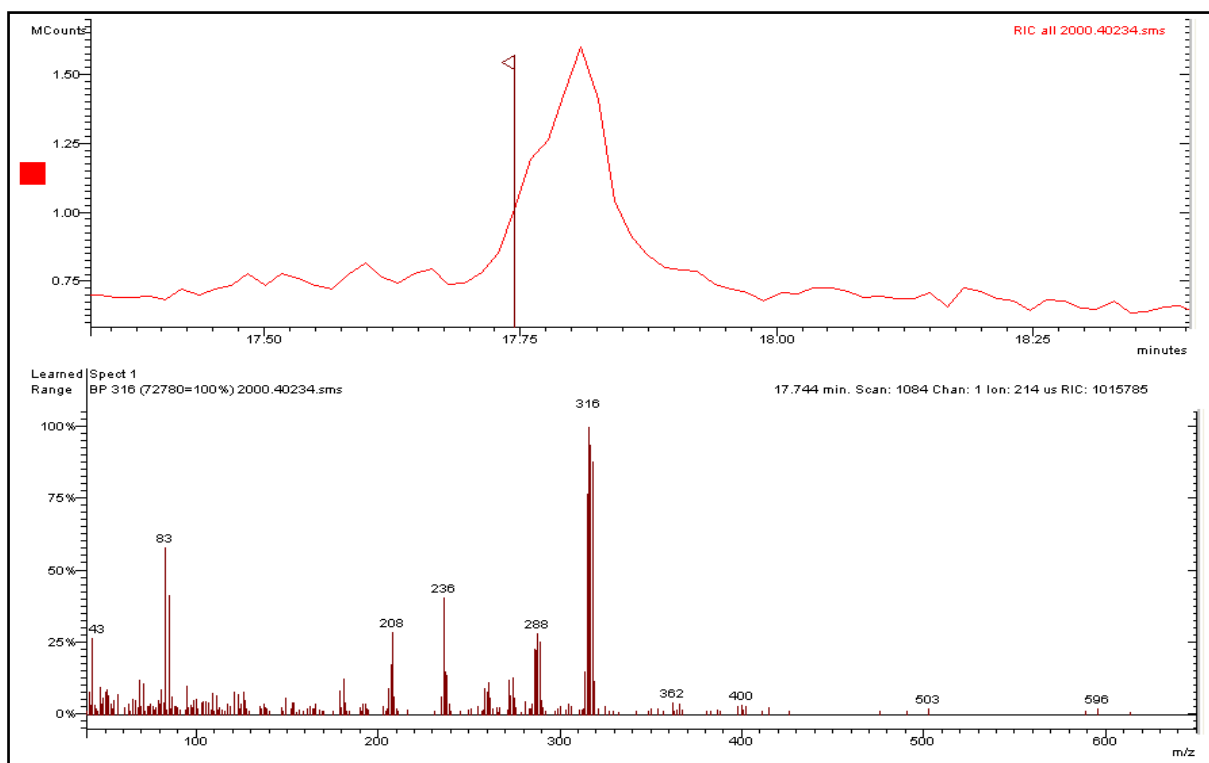


Figure 6.24 : Mise en évidence du bromazépam dans des cheveux contaminés.

La comparaison des fragments de masse obtenus au spectre de masse du bromazépam sur la librairie de NIST, a permis d'obtenir un degré de pureté de 89,9%, figure 6.25.

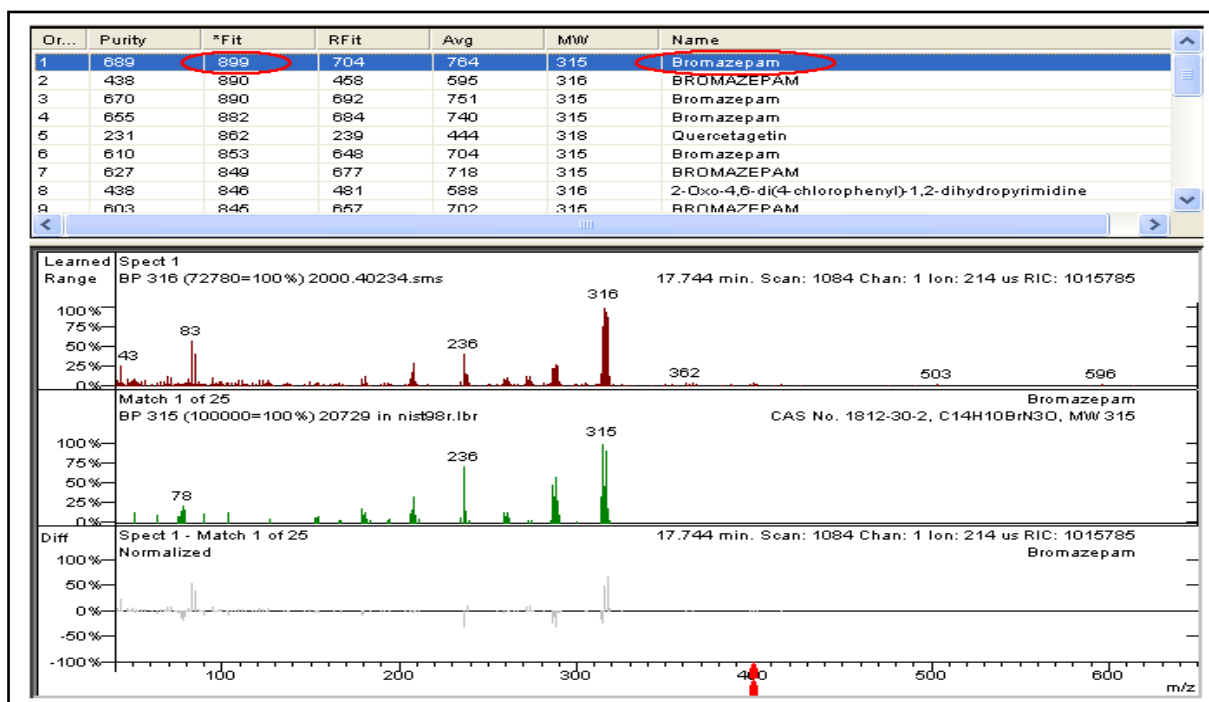


Figure 6.25 : Résultat de l'identification du spectre de masse obtenu pour les cheveux imprégnés sur la librairie du NIST.

Suite à ces résultats, on peut dire que le protocole d'extraction [54] convient pour la mise en évidence du bromazépam dans les cheveux.

À travers les expérimentations entreprises dans le but de mettre en évidence la présence de benzodiazépines dans les cheveux de consommateurs éventuels, il apparaît que la technique employée pourrait ne pas être appropriée pour la recherche des benzodiazépines à l'état de traces et d'ultra traces. Cependant, des auteurs ont obtenu des résultats probants en utilisant la CG-SM-ICN. De plus, M.Chèze a pu détecter la présence du clonazépam dans les cheveux d'un sujet sain ayant pris une seule dose par CL-SM-SM, signe de la forte sensibilité de cette technique.

En ce qui concerne le protocole d'extraction adopté, il répond parfaitement à ce type de recherche.

#### e- Dérivation du bromazépam

Dans certaines références, on a remarqué qu'on pouvait analyser le bromazépam après dérivation. Pour cela nous avons procédé à la silylation du bromazépam par le mélange BSTFA-1%TMCS.

L'analyse du chromatogramme de l'étalon de bromazépam silylé permet d'obtenir un pic après 15 minutes d'élution, figure 6.26.

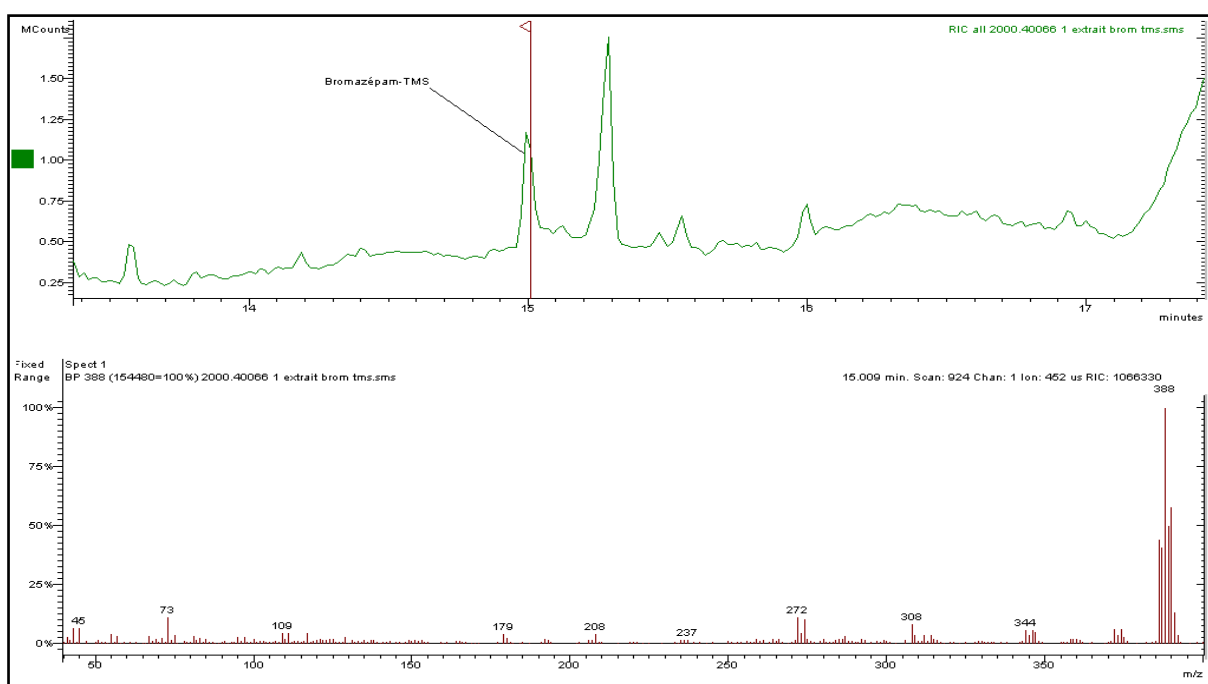


Figure 6.26 : Pic du bromazépam silylé (BRZ-TMS)

Le spectre de masse du pic qui apparaît à 15,009 mn correspond au bromazépam silylé de la librairie de NIST, figure 6.27, il contient tous les fragments caractéristiques de cette molécule.

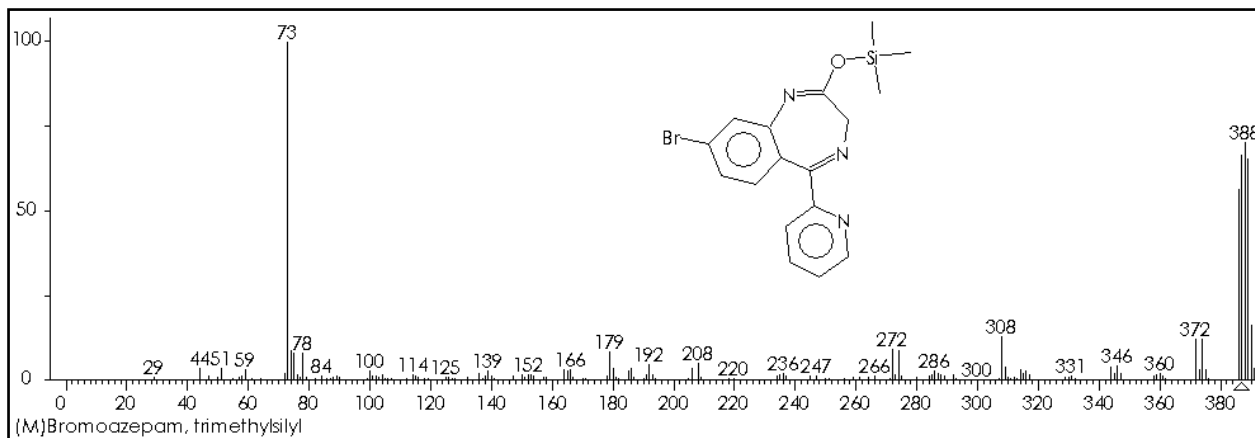


Figure 6.27 : spectre de masse du Bromazépam silylé selon la librairie NIST

#### Analyse des extraits dérivés

Le chromatogramme obtenu par analyse d'extraits silylés de cheveux des personnes habituées à la consommation de Léxomil, permet de révéler l'absence de pic au temps de rétention de bromazépam silylé.

## CONCLUSION

A travers cette étude qualitative, nous avons pu mettre en évidence d'une façon originale l'existence de deux alcaloïdes de large consommation à savoir la caféine et la nicotine dans les cheveux par chromatographie gaz couplée à la spectrométrie de masse suite à une extraction liquide-liquide.

Le mode d'incorporation des alcaloïdes étudiés dans les cheveux s'est montré endogène après leur identification dans les urines, ceci dans le but d'éviter toute hypothèse relative à une contamination externe..

Notre étude a montré également que la chromatographie gaz couplée à la spectrométrie de masse permet la détection des benzodiazépines à l'état pur ou extrait à partir de cheveux imprégnés. Néanmoins, la recherche de leurs traces dans les cheveux de toxicomanes à l'état moléculaire se révèle difficile ou même impossible du fait des faibles teneurs et de la complexité de la matrice étudiée.

Enfin, notre étude présenterait un large champ d'application allant de la médecine légale à la toxicologie.

Comme perspectives, une étude quantitative apportera plus d'éléments de réponses à notre problématique, et plus particulièrement sur la posologie et la durée d'exposition. Aussi, il serait intéressant d'explorer l'utilisation de la GC-MS-NCI dans la mise en évidence des benzodiazépines dans les cheveux en utilisant l'extraction en phase solide.

## REFERENCES

1. A.M. Baumgartner, P.F. Jones, W. Baumgartner, C.T. Black, Radioimmunoassay of hair for determining opiate-abuse histories, *J. Nuclear Med.* 20 (1979) 748–752.
2. Y. Nakahara, Hair analysis for abused and therapeutic drugs. *J. Chromatogr. B* 733(1999) 161–180.
3. [http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/topics/mammal\\_anatomy/hair.html](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/topics/mammal_anatomy/hair.html)
4. I. Ishiyama, T. Nagai, S. Toshida, Detection of basic drugs (metamphetamine, antidepressants and nicotine) from human hair. *Journal of forensic science* 28(1983)380-385. H. Zahn, *Int. J. Cosmet. Sci.* 24(2002)163.
5. Zoe Diana Draelos, MS, *Hair Care: An Illustrated Dermatologic Handbook*, Taylor and Francis edition 2005, pp 8.
6. Ulrich Blume- Peytavi, Antonella Tosti, David A. Whiting, Ralph M. Trueb, *Hair growth and disorders*, Springer-Verlag edition, 2008, pp6.
7. R. Wennig, Potential problems with the interpretation of hair analysis results, *Forensic Sci. Int.* 107 (2000) 12–15.
8. H. Sachs, Theoretical limits of the evaluation of drug concentrations in hair due to irregular hair growth, *Forensic Sci. Int.* 70 (1995) 53–61.
9. Mahly M.A., mise au point et évaluation d'une technique de dépistage de sept familles de psychotropes et stupéfiants dans les cheveux, Université Claude Bernard Lyon 1, 1995.
10. <http://www.centre-claudrer.com/diagnostic/testexp.html>
11. F. Tagliaro, F.F. Smith, Z. De Battisti, G. Manetto, M. Marigo, Hair analysis, a novel tool in forensic and biomedical sciences: new chromatographic and electrophoretic/electrokinetic analytical strategies, *J. Chromatogr. B* 689 (1997)261–271.
12. G. Prota, Progress in chemistry of melanins and related metabolites. *Med Res Rev* 8(1988)528–556



13. A.M. Potts, The reaction of uveal pigment in vitro with polycyclic compounds. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 3(1964) 405–416
14. Y. Nakahara, Hair analysis for abused and therapeutic drugs. *J. Chromatogr. B* 733(1999), 161–180.
15. A. Randwanska, T. Frankoviac, H. Ibrahim, A. Aubry, R. Kalirzan, *Biomed. Chromatogr.* 9(1995)233
16. A.H. Lowry, G.R. Famini, V. Loumbev, L.Y. Wilson, J.M. Tosk, *Pigment cell Res.* 10(1997)251.
17. R. Knörle, E. Schmitz, T.J. Feuerstein, Drug accumulation in melanin: An affinity chromatography study, *J. Chromatogr. B.* 714 (1998) 171–178.
18. A. F. Aubry, Applications of affinity chromatography to the study of drug\_melanin binding interactions. *Journal of Chromatography B*, 768(2002)67-74.
19. C. Rostaing, M. Caude, F. Leroy, D. Bauer, *Analisis* 18(1990)476.
20. M. Salazar, T.D. Sokoloski, P.N. Patil, *Fid. Proc.* 37(1978)2403.
21. L. Pötsch, G. Skopp, G. Rippin, A comparaison of H3-cocaine binding on melanin granules and human hair In-vitro, *Int. J. Legal Med* 110(1997)55-62].
22. M.R. Moeller, Drug detection in hair by chromatographic procedures. *J. Chromatogr.* 580(1992)125-134.
23. S. Magura, R.C. Freeman, Q. Siddiqi, D.S. Lipton, The validity of hair analysis for detecting cocaine and heroin use among addicts, *Int. J. Addict.* 27 (1992) 51–69.
24. W.L. Wang, E.J. Cone and J. Zacny, Immunoassay evidence for fentanyl in hair of surgery patients. *Forensic Sci. Int.*, 61 (1993) 65-72.
25. P. Kintz, P. Mangin, What constitutes a positive result in hair analysis: proposal for the establishment of cut-off values, *Forensic Sci. Int.* 70 (1995) 3–11.
26. M.R. Moeller, P. Fey, R. Wenning, 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.* 63(1993)185-206.
27. G. Kauert and J. Rohrich, Concentrations of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, cocaine and 6- monoacetylmorphine in hair of drug abusers. *Int. J. Legal Med.*, 108 (1996) 294-299.
28. M. Rothe, F. Pragst, Solvent optimization for the direct extraction of opiates from hair samples. *J. Anal. Toxicol.* 19(1995)236-240.

29. P. Edder, C. Staub, J.L. Veuthey, I. Pierroz, W. Haerdi, Subcritical fluid extraction of opiates in hair of drug addicts, *J. Chromatogr. B. Biomed, Appli.* 658(1994)75-86.
30. L. Pötch, R. Aderjan, G. Skopp, M. Herbold, in: V. Spiehler(editor), proceedings of the 1994 Joint TIAFT/SOFT International meeting, Tampa, FL, Oct. 31-Nov. 4, 1994, p. 65-69.
31. C. Jurado, P. Kintz, M. Menendez, M. Repetto, Influence of cosmetic treatment of hair on drug testing, *Int. J. Leg. Med.* 110 (1997) 159–163.
32. P. Kintz, A. Tracqui, P. Mangin, *J. Forensic Sci.* 38(1993)657-662.
33. C. Offidani, S. Strano Rossi, M. Chiarotti, Improved enzymatic hydrolysis of hair. *Forensic Sci. Int.* 63(1993)105-108.
34. Elisabeth Vinner, hair analysis of opiates in mothers and newborns for evaluating opiate exposure during pregnancy, *For. Sci. Int.* 133(2003)57-62.
35. C. M. Selavka, F. Rieders, The determination of cocaine in hair: a review, *Forensic Sci. Int.* 70(1995)155-164
36. E.J. Cone, D. Yousefnejad, W.D. Darwin and T. Maguire, Testing human hair for drugs of abuse. II. Identification of unique cocaine metabolites in hair of drug abusers and evaluation of decontamination procedures. *J. Anal. Toxicol.*, 15 (1991) 250-255.
37. W.A. Baumgartner, V.A. Hill, in : I. Sunshine (Editor), *Recent development in Therapeutic Drug Monitoring and clinical toxicology*, Marcel Dekker, New York, 1992, p. 577.
38. G. Koren, J. Klein, R. Forman and K. Graham, Hair analysis of cocaine: differentiation between systemic exposure and external contamination. *J. C/in. Pharmacol.*, 32 (1992) 671-675.
39. V. Cirimele, P. Kintz, P. Mangin. Testing human hair for cannabis. *Forensic Sci Int* 1995;70:175–182.
40. C. Jurado, M.P. Gime´nez, M. Mene´ndez, M. Repetto, Simultaneous quantification of opiates, cocaine and cannabinoids in hair, *Forensic Sci. Int.* 70 (1995) 165–174.
41. D. Wilkins, H. Haughey, E. Cone, M. Huestis, R. Foltz, D. Rollins, Quantitative analysis of THC, 11-OH-THC and THCCOOH in human hair by negative ion chemical ionisation mass spectrometry. *J. anal. Toxicol.* 19(1995)483-491
42. P. Kintz, V. Cirimele, P. Mangin, *J. Forensic Sci.* 40(1995)619-623.

43. M. Uhl, Determination of drugs in hair using GC/MS/MS, *Journal of forensic Science International*. 84(1997)281-294.
44. V. Cirimele, H. Sachs, P. Kintz, P. Mangin. Testing human hair for cannabis. III. Rapid screening procedure for the simultaneous identification of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, cannabinal, and cannabidiol. *J Anal Toxicol* 1996;20:13–6.
45. V. Cirimele, P. Kintz, R. Majdalani and P. Mangin, Supercritical fluid extraction of drugs in drug addict hair. *J. Chromatogr. B*, 673 (1995) 173-181.
46. Y. Nakahara, Detection and diagnostic interpretation of amphetamines in hair, *Forensic Sci. Int.* 70 (1995) 135–153.
47. J. Röhrich, G. Kauert, Determination of amphetamine and methylenedioxy-amphetamine-derivatives in hair, *Forensic Sci. Int.* 84 (1997) 179–188.
48. P. Kintz, V. Cirimele, A. Tracqui, P. Mangin, Simultaneous determination of amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine and 3,4-methylene dioxymethamphetamine in human hair by gas chromatography– mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 670 (1995) 162–166.
49. J.J. Sramek, W.A Baumgartner, T.N. Ahrens, V.A. Hill, N.R. Cutter, Detection of benzodiazepines in human hair by radioimmunoassay, *Ann. Pharm.* 26 (1992) 469-472.
50. F.J. Couper, I.M. McIntyre, O.H. Drumme, Extraction of psychotropic drugs from human scalp hair, *J. Forensic Sci.* 40(1995)83-86
51. P. Kintz, V. Cirimele, F. Vayssette, P. Mangin, Hair analysis for nordiazepam and oxazepam by GC-MS-NCI, *J. Chromatogr. B* 677(1996)241-244.
52. V. Cirimele, P. Kintz, P. Mangin, Determination of chronic flunitrazepam abuse by hair analysis using GC-MS-NCI, *J. Anal. Toxicol.* 20(1996)596-598.
53. V. Cirimele, P. Kintz, P. Mangin, Detection and quantification of lorazepam in human hair by GC-MS-NCI in a case of traffic accident, *Int. J. Legal Med.* 108(1996)265-267.
54. V. Cirimele, P. Kintz, B. Ludes, Screening for forensically relevant benzodiazepines in human hair by GC-MS-NCI, *J. Chromatogr. B* 700(1997)119-129.
55. H. Sachs, P. Kintz, Testing for drugs in hair : critical review of chromatographic procedures since 1992, *J. Chromatogr. B* 713(1998)147-161.
56. G.L. Henderson, M.R. Herkey, C. Zhou, R.T. Jones, Cocaine and metabolite concentrations in the hair of South American coca chewers, *J. Anal. Toxicol.* 16(1992)199-201.

57. Y. Nakahara, R. Kikura, K. Takahashi, Hair analysis for drugs of abuse. VIII. Effective extraction and determination of 6-acetylmorphine and morphine in hair with TFA-methanol for the confirmation of retrospective heroin use by GC-MS, J. Chromatogr. B 657(1994) 93-101.
58. K.M. Hold, D.J. Crouch, D.G. Wilkins, D.E. Rollins, R.A. Maes, Detection of Alprazolam in hair by NCI-MS, Forensic Sci. Int. 84(1997)201-209.
59. M. Ygles, F. Mersch, R. Wenning, detection of benzodiazepines and other psychotropic drugs in human hair by GCMS, Forensic Sci. Int. 84(1997)211-218.
60. J. Fuji, A. Higashi, N. Nakano, Examination of stability of anticonvulsants in a protease solution and assay of anticonvulsants in hairs, Biol. Pharm. Bull. 19(1996)1614-1617.
61. WA Baumgartner, V Hill, W Blahd, hair analysis for drugs of abuse, J For Sci 34(1989)1433-1453
62. LW Cartmell, A Aufderhide, C Weems, cocaine metabolites in pre-columbian mummy hair, J Okla state Med Asso 84(1991)11-12.
63. K. S. Scott, Y. Nakahara, A study into the rate of incorporation of eight benzodiazepines into rat hair. J. For Sci. Int. 133(2003) 47-56.
64. Lavoie, F.W.; Harris, T.M. Journal of emergency medicine 1991, 9, 133-136.
65. Budavari, S. The Merck Index, Elventh Edition. Merck and Co Inc., 1989, p1030.
66. Baselt, R.C.; Cravey, R.H. Nicotine; dans Disposition of toxic drugs and chemicals in man (Third Edition); INC. Year Book Medical Publishers, 1989, pp 591-595.
67. P. Kintz, Gas chromatographic analysis of nicotine and cotinine in hair, Journal of chromatography, 580(1992), 347-353.
68. L'Encyclopédie hachette multimédia, Version 6.0, (CD-ROM), Hachette Multimédia / Hachette Livre, 2002.
69. Abrous, N. et al, Tabac: comprendre la dépendance pour agir ; Edition Inserm, 2004, pp 488.
70. T.P. Moyer, J. R. Charlson, R. J. Enger, L. C. Dale, J. O. Ebbert, D. R. Schroeder and R. D. Hurt, Simultaneous analysis of nicotine, nicotine metabolites, and tobacco alkaloids in serum or urine by tandem mass spectrometry, with clinically relevant metabolic profiles, Clinical Chemistry 2002, 48:9, 1460-1471.

71. Jacob Iii, P. ;Benowitz, N.L. Oxidative metabolism on nicotine in vivo; dans: Effects of nicotine on biological Systems. Advances in Pharmacological Sciences; Klaus Thurau; Birkhauser Verlag, 1991, pp 35-44.
72. Papadoyannis, I.N.; Samanidou, V.F.; Stefanidou, P.G. Journal of liquid chromatography & related technologies 2002, 25, 2315–2335.
73. Castagnoli, N.J.; Shigenaga, M.; Carlson, T.; Trager, W.F.; Trevor, A. The in vitro metabolic fate of (S)-nicotine; Dans Effects of Nicotine on Biological Systems. Advances in Pharmacological Sciences; Klaus Thurau; Birkhäuser Verlag, 1991, pp 25-34.
74. Tranchant J., Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, 1995, Masson.
75. Marvin C. McMaster, Edition 2008 John Wiley & Sons, Inc, GC-MS A Practical User's Guide, Second Edition. pp 120.
76. Bouchonnet S., Hoppilliard Y., Kargar-Grisel T., Les différents types de spectromètres de masse utilisés pour l'analyse des composés organiques et bio-organiques, Spectra Analyse, 1999, 207, p 11-25.
77. Longevialle P., Principes de la spectrométrie de masse des substances organiques, 1981, Masson.
78. Hans P. Eser, Lucia Pötsch, Gisela Skopp, Manfred R. Moeller, Influence of sample preparation on analytical results : drug analysis [GCMS] on hair snippets versus hair powder using various extractions methods For. Sci. Int. 84(1997)271-279.
79. P. Kintz, Analysis of nicotine and cotinine in hair, Journal of chromatography, 580(1992)347-353.

**APPENDICE A**  
**LISTE DES ABREVIATIONS**

A	: Ampère
AEME	: Androhydroecgonine méthylester
AP	: Amphétamine
BRZ	: Bromazépam
BRZ-TMS	: Bromazépam-triméthylsilyl
BSTFA	: Bistriméthyltrifluoroacetamide
BZD	: Benzodiazépines
°C	: Degré Celsius
C.A.S	: Chemical American standard
CBD	: Cannabidiol
CBN	: Cannabinol
C.BRZ.S10	: Cheveux du sujet N°10 consommateur de Bromazépam
C.CLZ.S6	: Cheveux du sujet N°06 consommateur de Clonazépam
C.C.S1	: Cheveux du sujet N°01 consommateur de Café
CG	: Chromatographie en phase gazeuse
CG-SM	: Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
CG-SM-IE	: Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse avec impact électronique
CLHP	: Chromatographie Liquide Haute Performance
CL-SM	: Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse
CLZ	: Clonazépam
C.N.S1	: Cheveux du sujet N°01 consommateur de Nicotine
cp	: Comprimé
Da	: Dalton
DAD	: Détecteur à barrette d'iode (diodearray detecteur)
EC	: Electrophorèse capillaire.
ELL	: Extraction liquide-liquide
EPS	: Extractions sur Phase Solide
eV	: Électron volt
h	: Heure
ICN	: Ionisation Chimique Négative
IE	: Impact Electronique.
IRTF	: Infra-Rouge à Transformée de Fourier
IT	: Ion Trap
m	: Mètre
MA	: Methamphétamine
MAM	: Methylmethamphetamine
mbar	: Millibar
MDMA	: Méthylène dioxymathamphetamine
mg	: Milligramme
mn	: Minute
ml	: Millilitre

Mm	: Masse moléculaire
N	: Normalité
ng	: Nanogramme
NIST	: National Institute of Standard Technology
pK	: Constante d'acidité
RIA	: Radio-immunoessay
SIM	: Single Ion Monitoring
SIS	: Single Ion Storage
SM	: Spectromètre de Masse
T	: Température
TFA	: Acide trifluoroacétique
TMCS	: Triméthylchlorosilane
tr/min	: tour / minute
U	: Tension
U.C.S1	: Urine du sujet N°01 consommateur de Café
U.N.S1	: Urine du sujet N°01 consommateur de Nicotine
UV	: Ultra violet
V	: Volt
µl	: Microlitre
Δ9THC	: Δ9tetrahydrocannabinol

## APPENDICE B

### IDENTIFICATION DU CLONAZÉPAM EXTRAIT DU MÉDICAMENT

Afin d'obtenir le clonazépam étalon, nous avons d'abord broyé un comprimé de Rivotril (2mg/cp), ensuite extraction du clonazépam par 3 ml de chloroforme.

Le principe actif a été identifié par analyse Infra Rouge à Transformée de Fourier IRTF et par température de fusion.

#### a. Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF):

Le matériel utilisé ainsi que les conditions opératoires sont comme suit :

Appareil	JASCO400
Résolution	4 cm <sup>-1</sup>
Mode d'analyse	Pastille de KBr.

Le spectre infrarouge obtenu, et celui de la banque des données sont représentés sur la figure B.1.

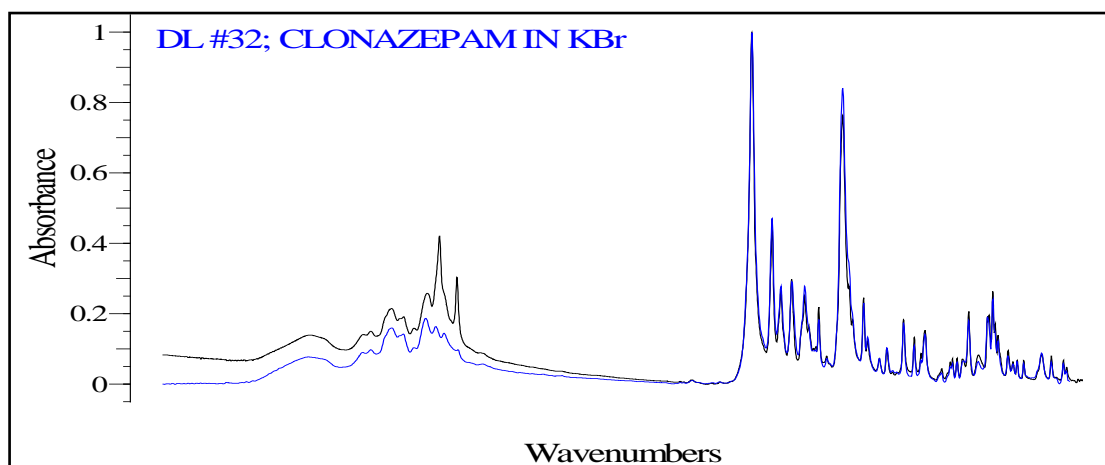


Figure B.1 : comparaison entre le spectre infra-rouge du principe actif extrait du comprimé et celui de la librairie.

- : spectre du standard extrait du médicament.
- : spectre du standard de la banque des données



b. Détermination du point de fusion :

Le point de fusion est déterminé en analysant la poudre du clonazépam obtenue à partir du médicament par un appareil qui calcule le point de fusion de marque BUCHI B-545. L'échantillon est introduit dans l'appareil dans des tubes capillaires en verre. Nous effectuons par la suite une montée de température progressive de 100°C à 250°C à raison de 5°C. La température est automatiquement donnée par l'appareil, et les résultats obtenus s'établissent comme suit :

<b>Température théorique</b>	<b>Température retrouvée</b>
Environ 239°C	226,2° --- 229,3°

## APPENDICE C

### RÉSULTATS DE L'IDENTIFICATION DE LA CAFÉINE DANS LES CHEVEUX

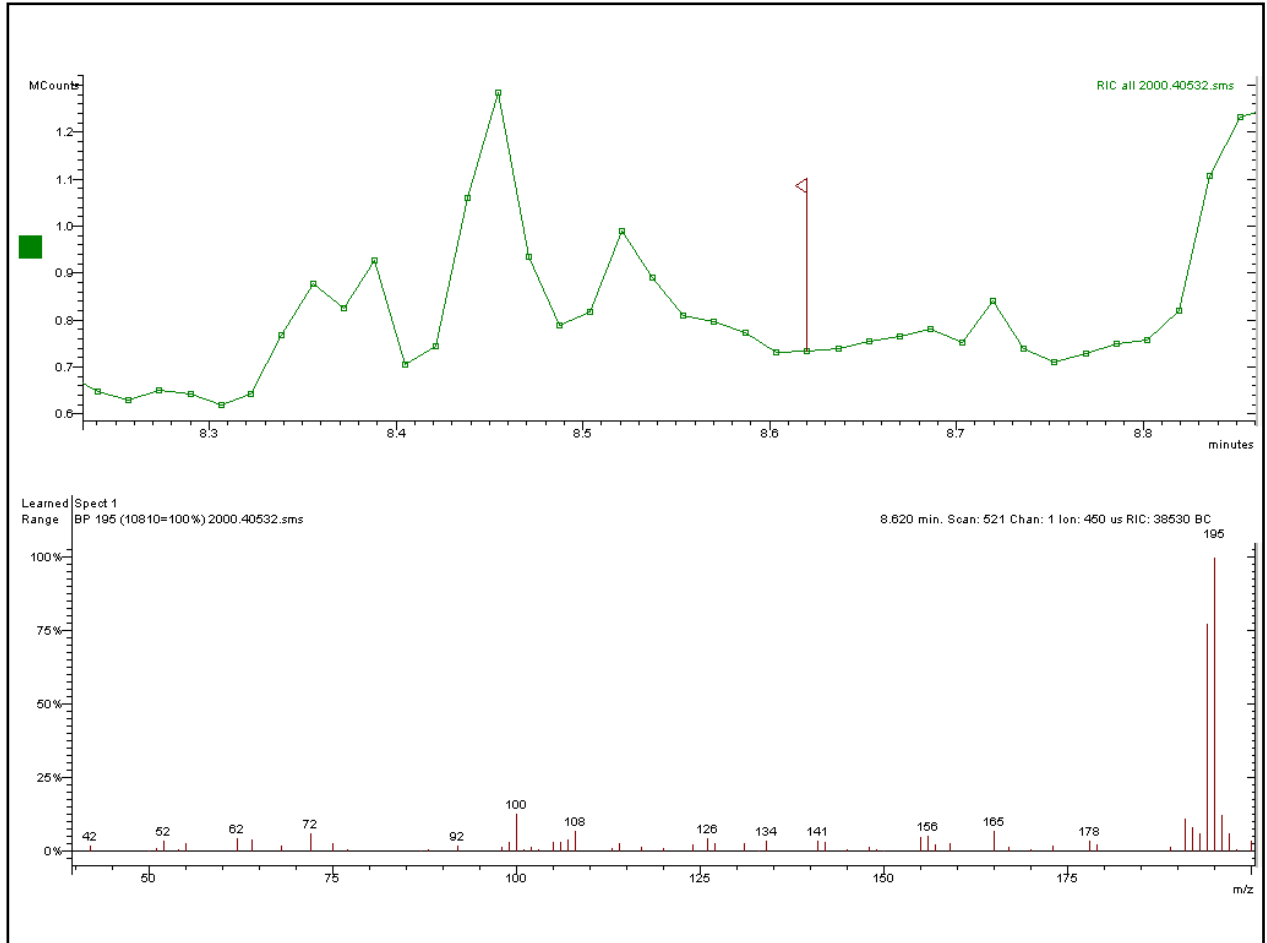


Figure C.1 : Mise en évidence de la caféine dans les cheveux du sujet N°2 par CG-SM-IE.

## APPENDICE D

### RÉSULTATS DE L'IDENTIFICATION DE LA CAFÉINE DANS LES URINES.

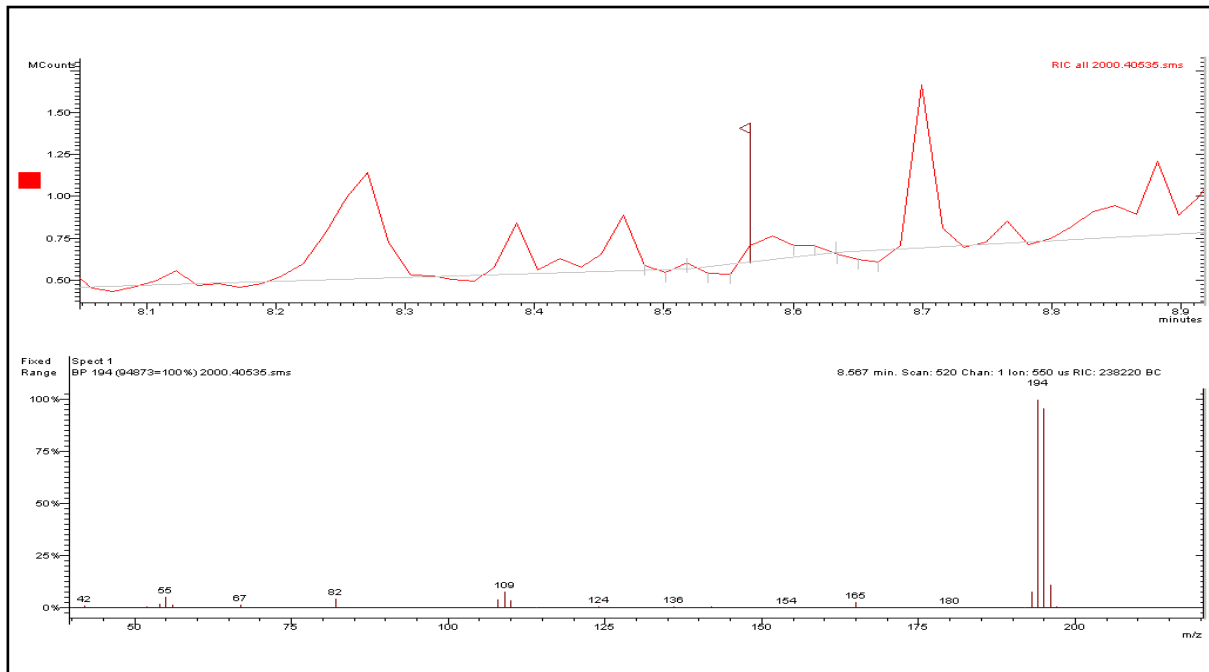


Figure D.1 : Mise en évidence de la caféine dans les urines du sujet N°2 par CG-SM-IE.

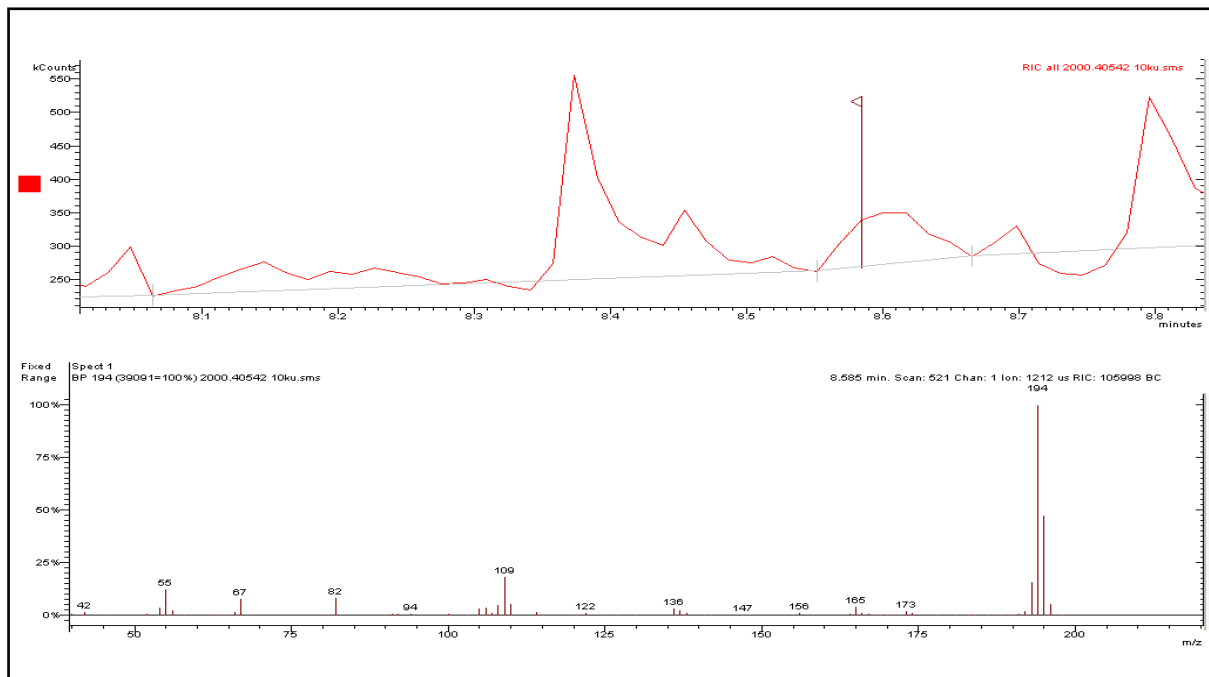


Figure D.2 : Mise en évidence de la caféine dans les urines du sujet N°3 par CG-SM-IE.

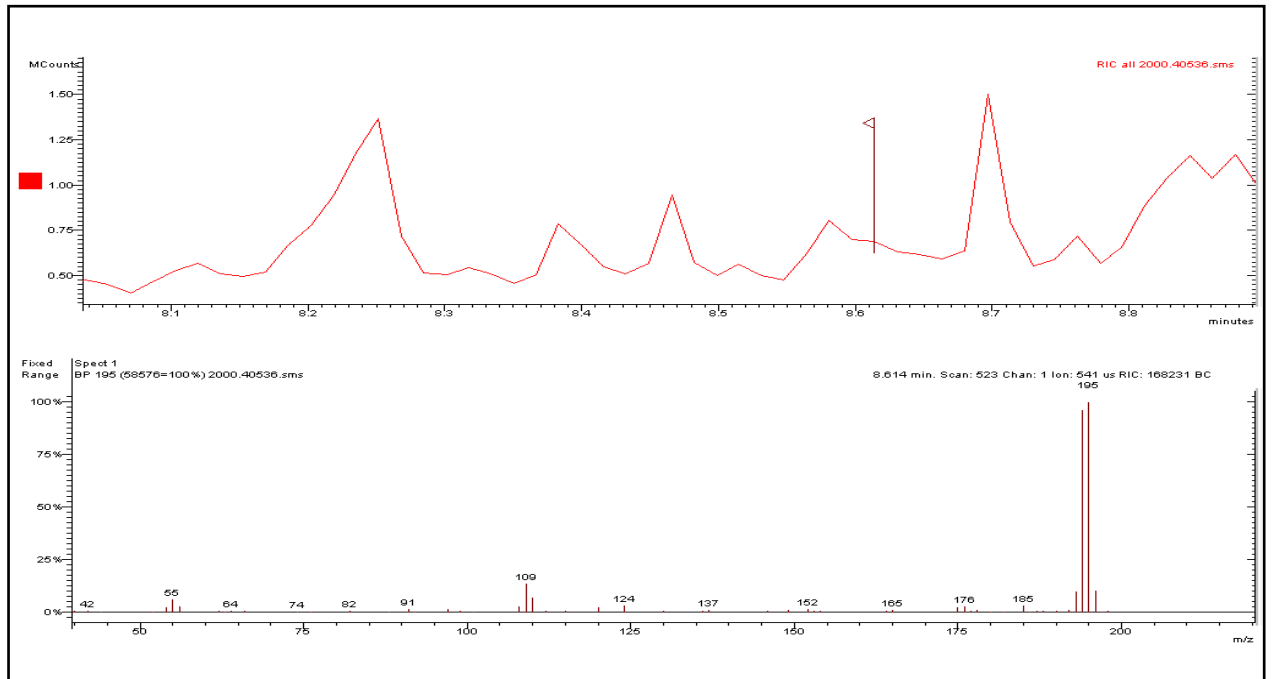


Figure D.3 : Mise en évidence de la caféine dans les urines du sujet N°4 par CG-SM-IE.

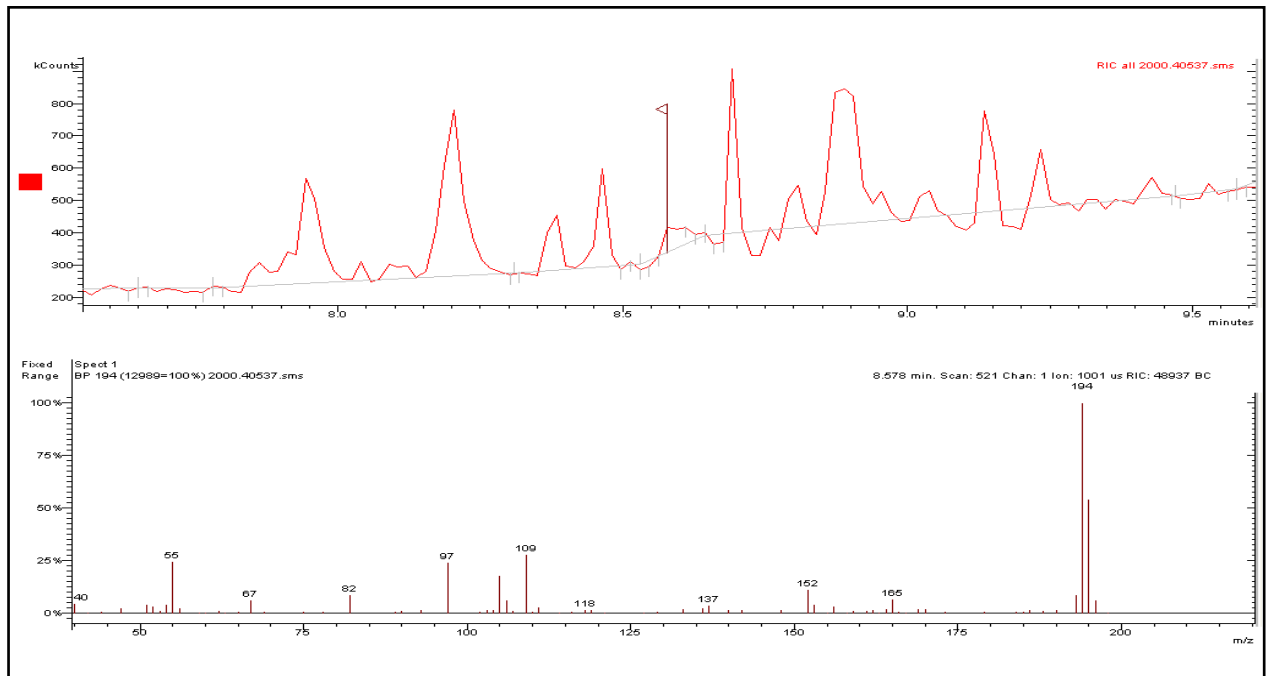


Figure D.4 : Mise en évidence de la caféine dans les urines du sujet N°5 par CG-SM-IE.

## APPENDICE E

### RÉSULTATS DE L'IDENTIFICATION DE LA NICOTINE DANS LES CHEVEUX

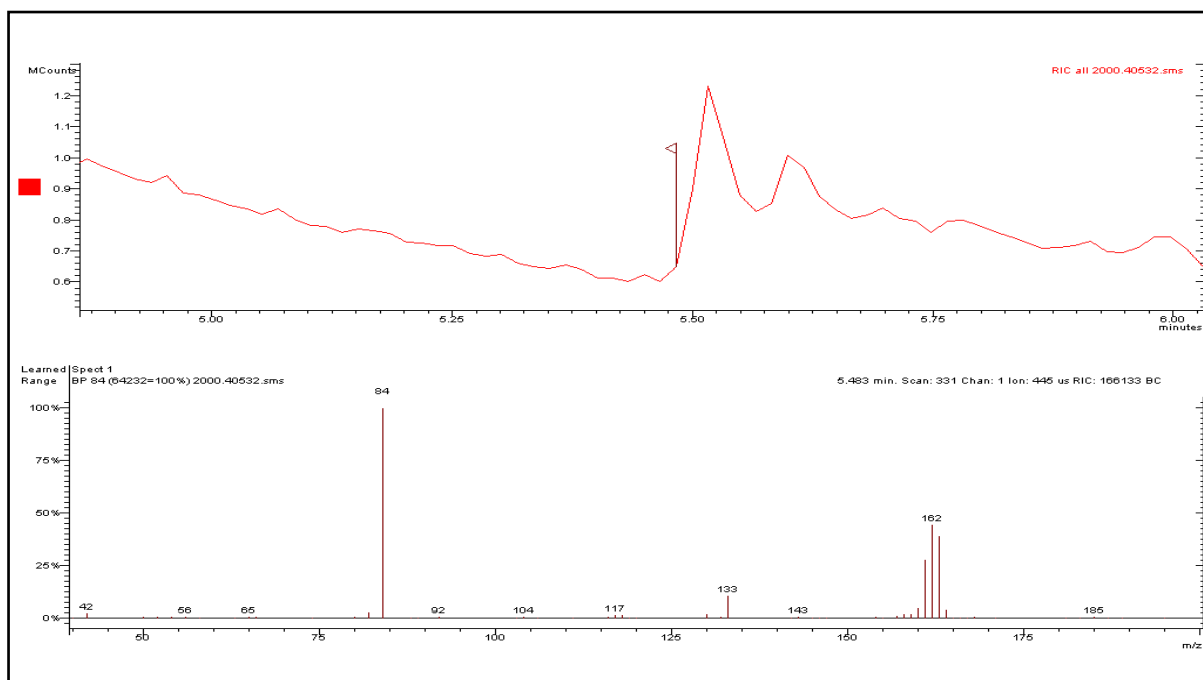


Figure E.1 : Mise en évidence de la nicotine dans les cheveux du sujet N°2 par CG-SM-IE.

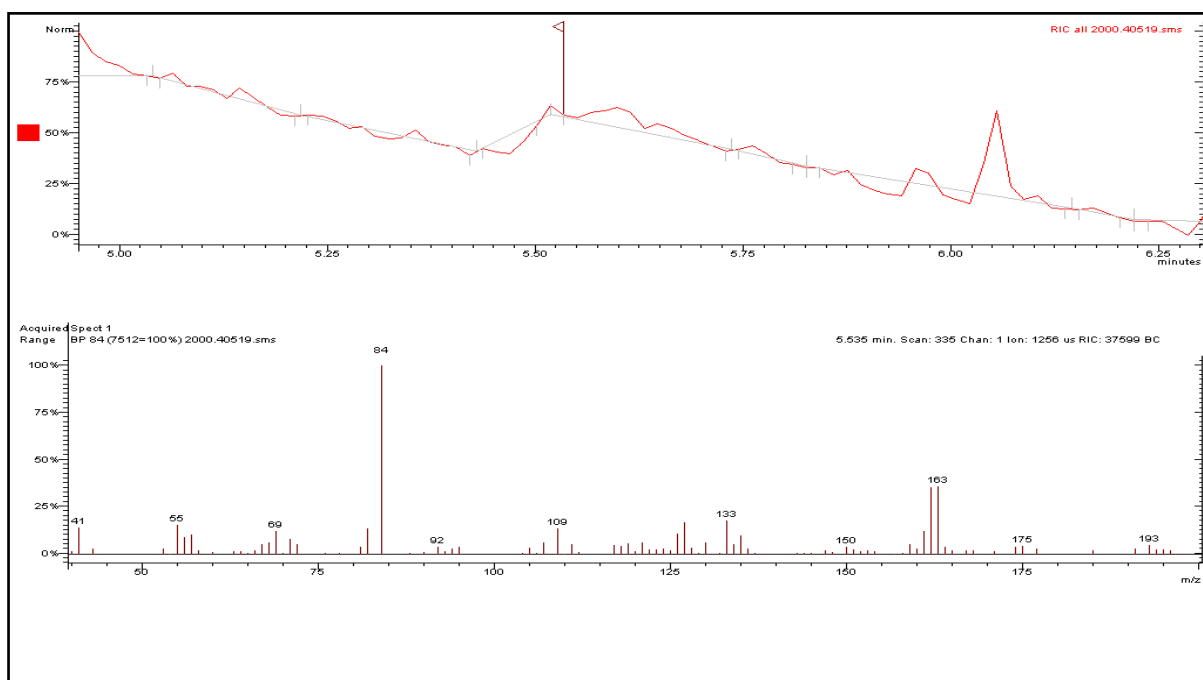


Figure E.2 : Mise en évidence de la nicotine dans les cheveux du sujet N°3 par CG-SM-IE.

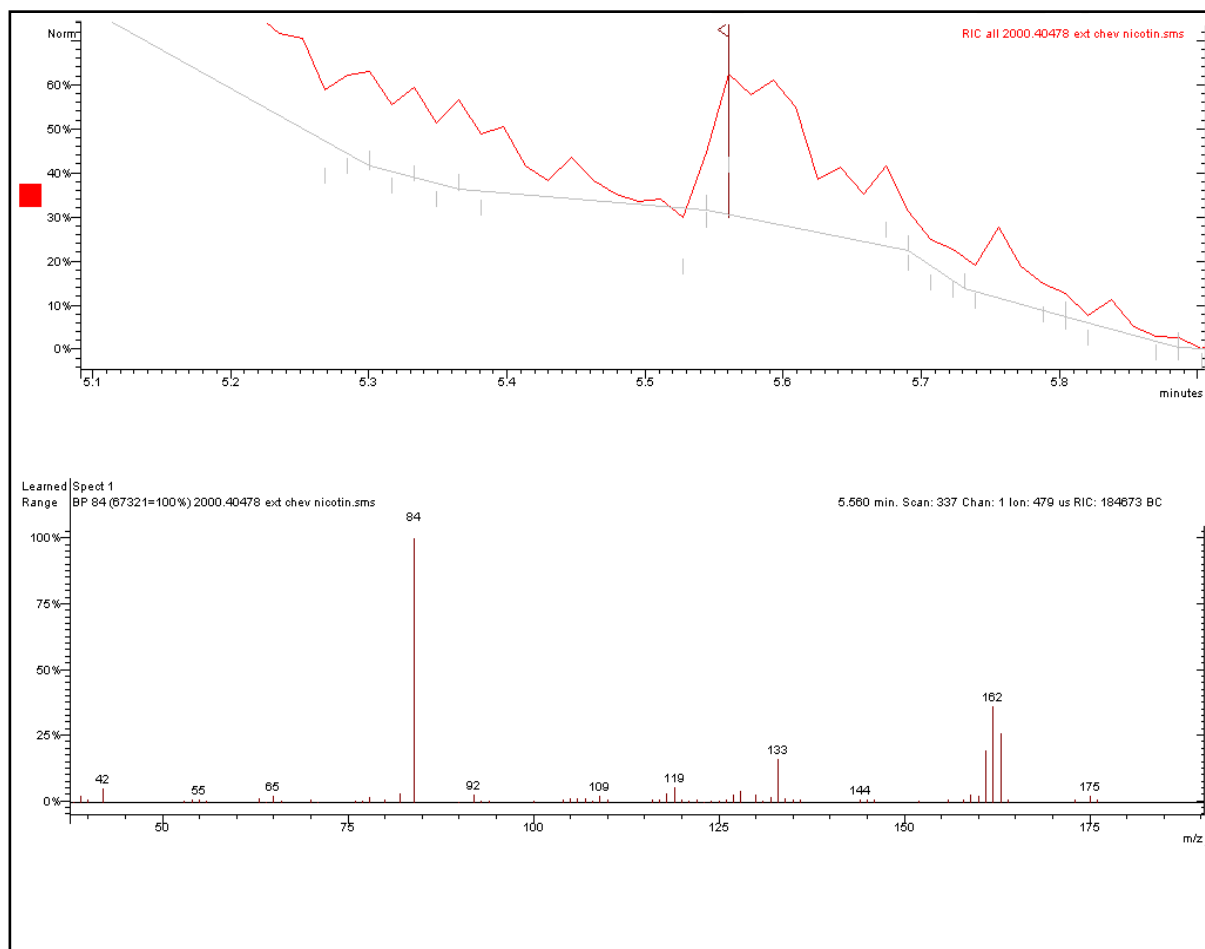


Figure E.3 : Mise en évidence de la nicotine dans les cheveux du sujet N°4 par CG-SM-IE.

## APPENDICE F

### RÉSULTATS DE L'IDENTIFICATION DE LA NICOTINE DANS LES URINES

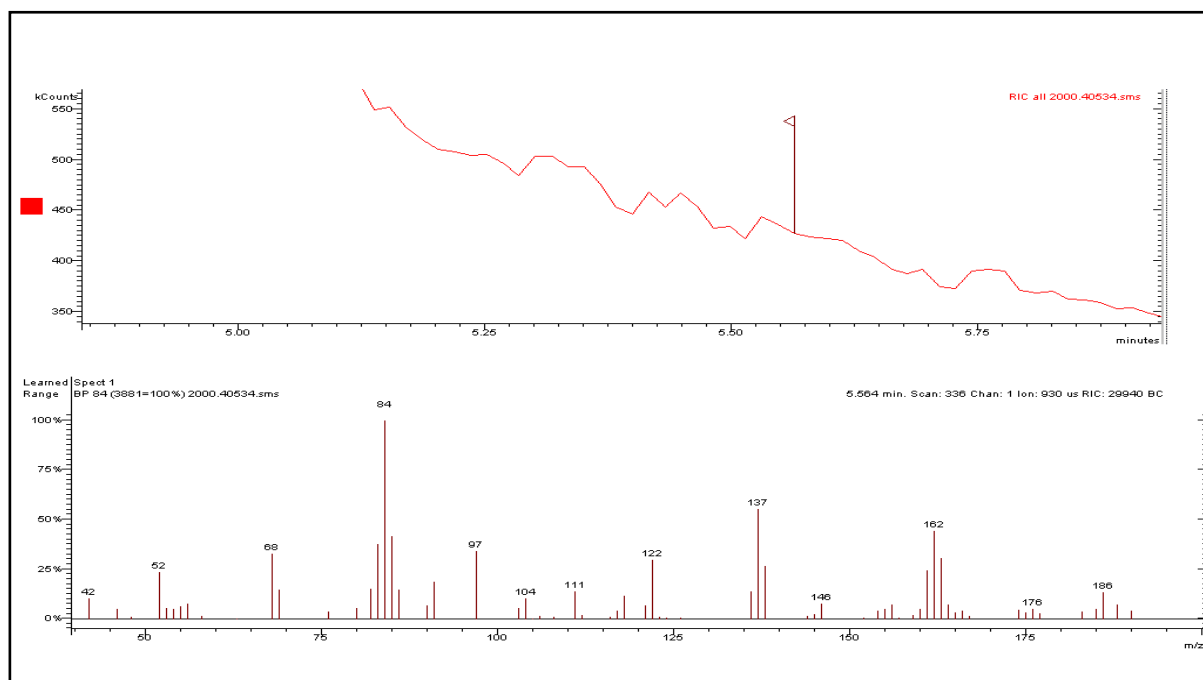


Figure F.1 : Mise en évidence de la nicotine dans les urines du sujet N°1 par CG-SM-IE.

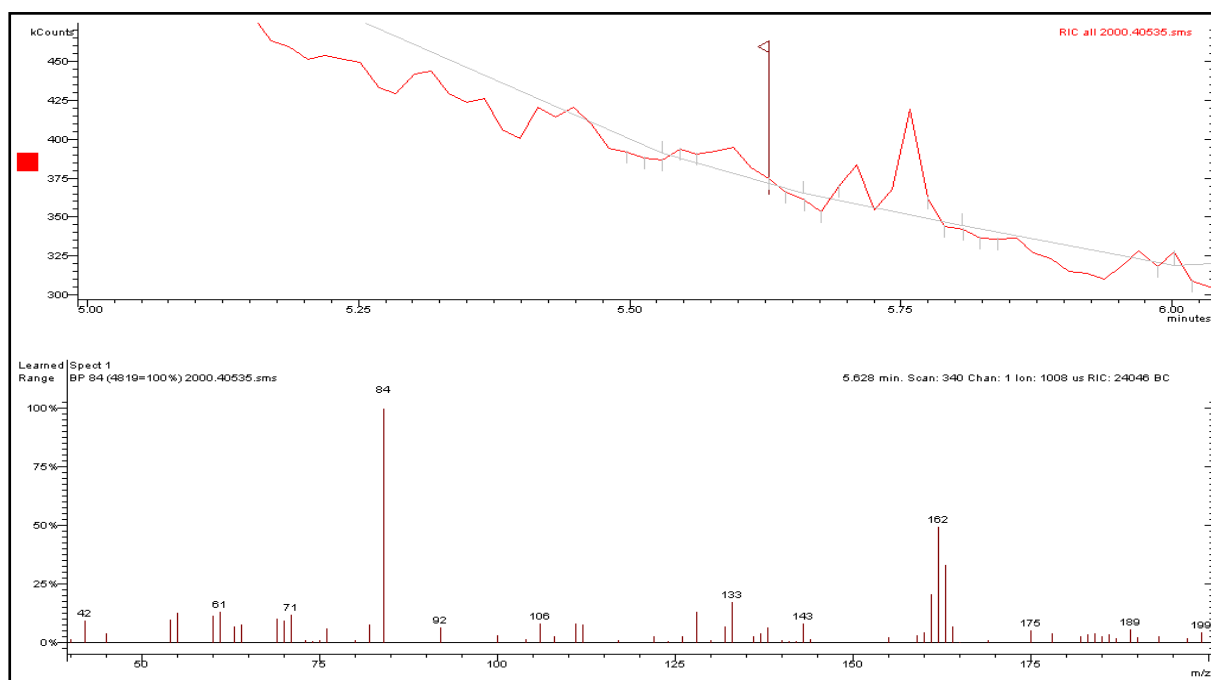


Figure F.2 : Mise en évidence de la nicotine dans les urines du sujet N°2 par CG-SM-IE.

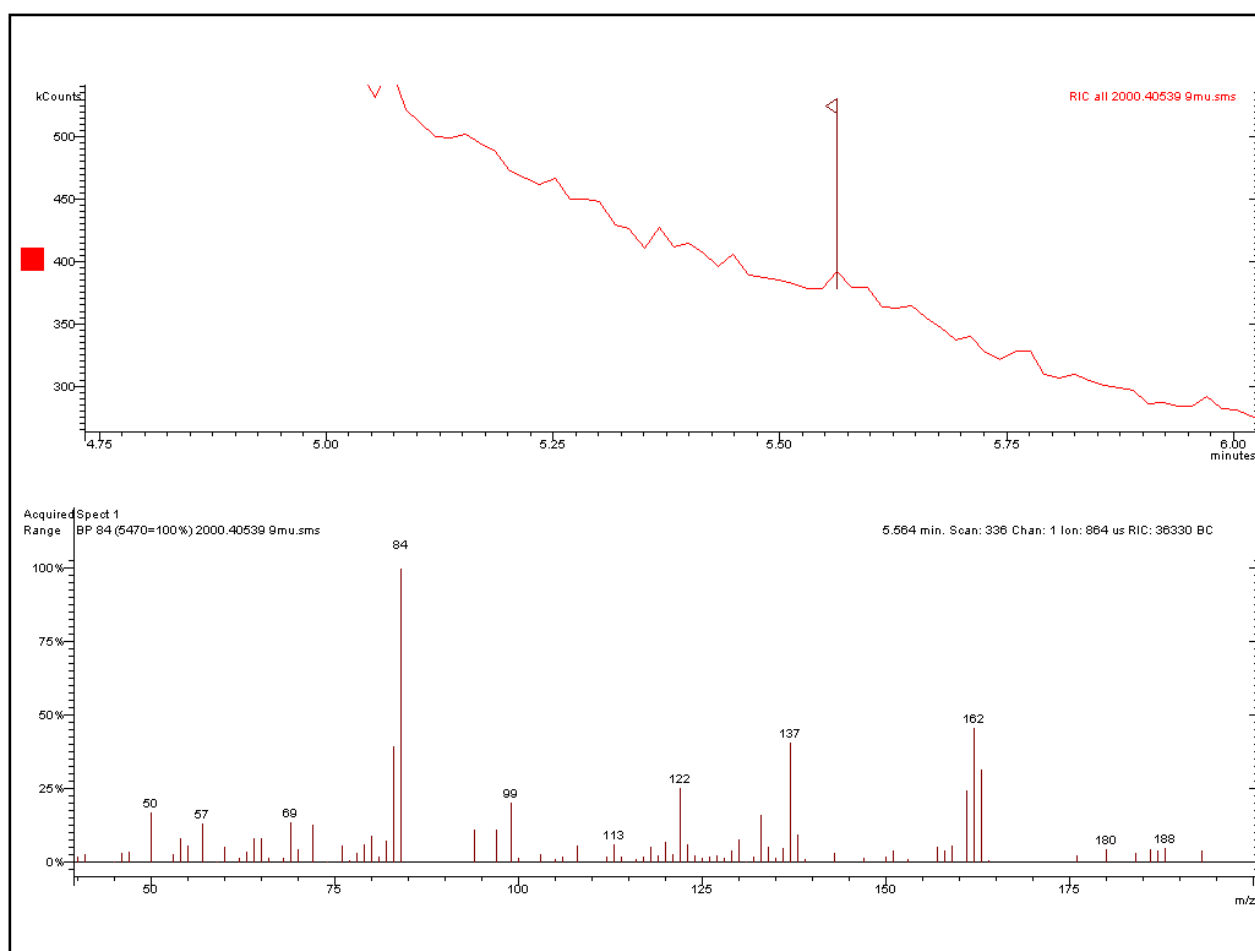


Figure F.3 : Mise en évidence de la nicotine dans les urines du sujet N°4 par CG-SM-IE.