



*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
*Université Larbi Tébessi –Tébessa-*  
*Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie*  
*Département de Biologie Appliquée*



# **Polycopié des Cours**

*Module*

## **Métabolisme des Médicaments et Analyses Toxicologiques**

*[Destiné aux étudiants de 1<sup>ère</sup> année master spécialité Pharmacotoxicologie]*

**Réalisé par : M. GASMI Salim**  
*Ph.D Toxicologie cellulaire*

## Introduction

L'homme est constamment exposé à des molécules présentes dans l'environnement désignées sous le terme général de xénobiotiques, regroupant contaminants alimentaires, composés synthétiques, polluants environnementaux et médicaments. L'accumulation de ces substances dans l'organisme est néfaste. Le métabolisme des xénobiotiques, par l'intermédiaire des enzymes du métabolisme et des transporteurs des xénobiotiques (EMTX), permet leur élimination, en convertissant ces composés lipophiles en composés hydrophiles, qui peuvent alors être excrétés dans les fluides biologiques. Les variations interindividuelles dans l'activité des EMTX sont très importantes et dépendent de plusieurs facteurs : génétiques, épigénétiques, environnementaux ou physiopathologiques (jeûne, diabète, hépatites, cirrhoses, cancers, etc.). L'expression des EMTX est notamment régulée par des xénosenseurs qui détectent la présence des xénobiotiques dans les cellules et coordonnent l'expression de gènes du métabolisme permettant de les inactiver et/ou de les éliminer. Cette variabilité a des conséquences pharmacotoxicologiques. D'une part, les variations du métabolisme peuvent entraîner des anomalies de réponse aux médicaments : la pharmacogénétique s'intéresse à l'influence des séquences de l'ADN sur l'efficacité et la toxicité des médicaments afin de développer des tests simples permettant de prédire la réponse des individus à certains traitements ; d'autre part, le métabolisme des xénobiotiques, et notamment des polluants environnementaux, peut entraîner la formation de métabolites très toxiques ou réactifs. Ainsi, les produits issus du métabolisme des pesticides peuvent conduire à la survenue de pathologies diverses comme des cancers, des maladies neurologiques et neurodégénératives, des troubles de la reproduction. La susceptibilité individuelle aux xénobiotiques (polluants, médicaments, composés alimentaires...) auxquels nous sommes nécessairement exposés, dépend, entre autres, de leur métabolisme et donc de l'expression des enzymes du métabolisme des xénobiotiques. Pour chacun d'entre nous, cette expression est très variable en fonction de facteurs génétiques, environnementaux et physiopathologiques, rendant compte ainsi de la grande diversité de la réponse pharmacologique ou toxique. Ainsi, la nature et l'intensité des effets d'un xénobiotique sur un organisme sont en relation avec la concentration du produit actif au niveau des cellules cibles. Celle-ci dépend de la dose introduite et de facteurs tels que l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion.

## Chapitre I. Xénobiotiques et Métabolisme

### 1. Définitions

- **Les xénobiotiques** sont des molécules étrangères à l'organisme. Il s'agit par exemple des médicaments, des polluants de l'eau ou de l'atmosphère, des additifs alimentaires mais également de certains composés naturels des aliments. Ces xénobiotiques sont généralement des substances hydrophobes, peu volatiles et peu précipitables. Ces propriétés rendent difficiles leur élimination urinaire. Ils ont une tendance naturelle à s'accumuler dans les phases lipidiques des membranes cellulaires engendrant ainsi une toxicité, voire une mort cellulaire.

Les xénobiotiques subissent un certain nombre de modifications chimiques dans l'organisme, visant dans la plupart des cas à augmenter leur caractère hydrophile, facilitant ainsi leur élimination. Ces réactions de biotransformation aboutissent classiquement à une diminution de la toxicité et de l'activité, mais il est possible dans certains cas de former des composés plus actifs ou toxiques.

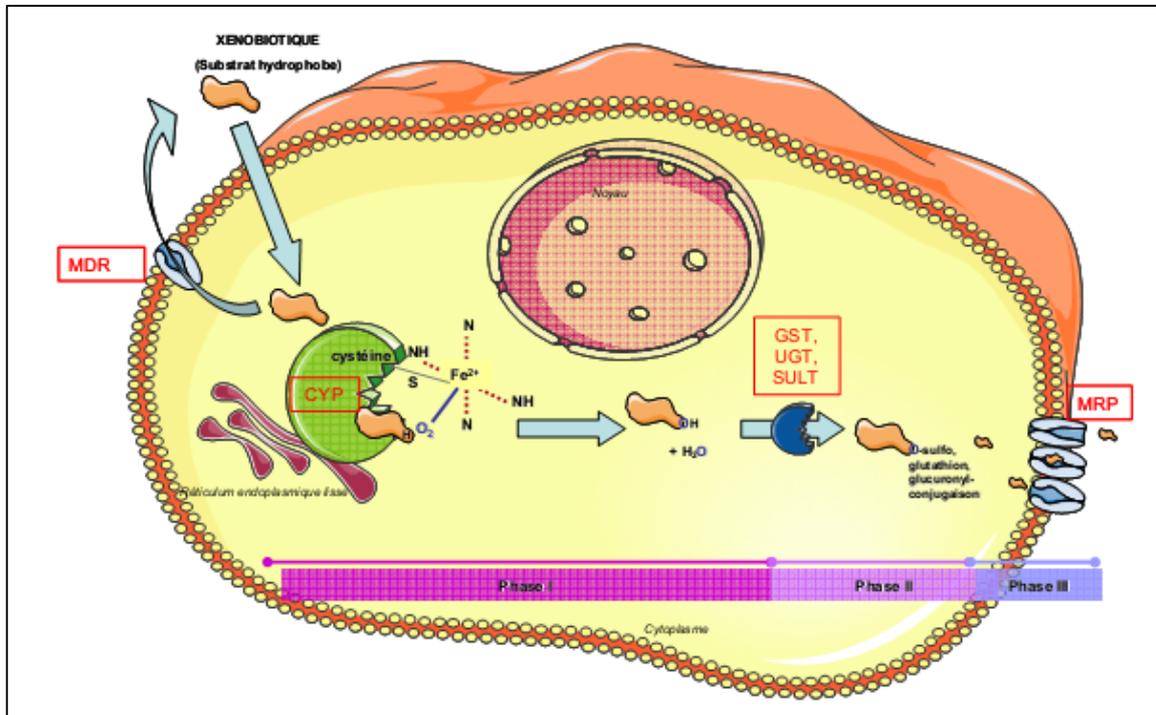
- **La pharmacocinétique** c'est l'étude de devenir d'une substance active d'un médicament après son administration dans l'organisme de l'évolution dans le temps des concentrations des médicaments dans les liquides biologiques

- **La pharmacodynamie** correspond à l'action exercée par les médicaments sur l'organisme, c'est l'étude détaillée de l'interaction entre récepteur et substance active. Cette réponse est une composante de l'effet thérapeutique recherché. Lors de cette étape, la substance active quitte la circulation sanguine pour diffuser jusqu'au site d'action dans l'organe cible et se combine avec un récepteur, une enzyme ou une structure cellulaire quelconque pour provoquer la réponse.

### 2. Métabolisme des xénobiotiques

Compte tenu de la grande diversité et de la nature imprévisible de la structure chimique de ces xénobiotiques, les êtres vivants doivent disposer d'un arsenal diversifié d'enzymes et d'isoenzymes pouvant effectuer un large spectre de réactions chimiques sur des substrats ayant des structures très diverses. Les xénobiotiques peuvent pénétrer facilement dans la cellule, mais ils peuvent également en être expulsés via des pompes telles la Pgp (P. glycoprotéine), produit du gène *mdr* (*multi drug resistance*). Les xénobiotiques sont alors pris en charge par des enzymes de phase I, dits de fonctionnalisation, dont les plus importants sont les cytochromes P<sub>450</sub> (CYP) qui catalysent une réaction de mono-oxygénation. Les enzymes de phase II conjuguent les xénobiotiques, fonctionnalisés ou non, avec un groupement (glutathion, acide glucuronique, méthyle, acétyle...), dont le rôle est soit de neutraliser un groupement réactif (thiol, amine,

aldéhyde), soit de rendre le xénobiotique hydrophile afin de faciliter son élimination par l'organisme. Enfin, si le métabolite obtenu est très hydrophile, il devra être transporté à travers la membrane cellulaire par des protéines de phase III (*figure 01*), telles que le transporteur *mrp* (*multidrug related protein*). Cette famille de transporteurs comprend de nombreux membres, et s'accroît régulièrement.



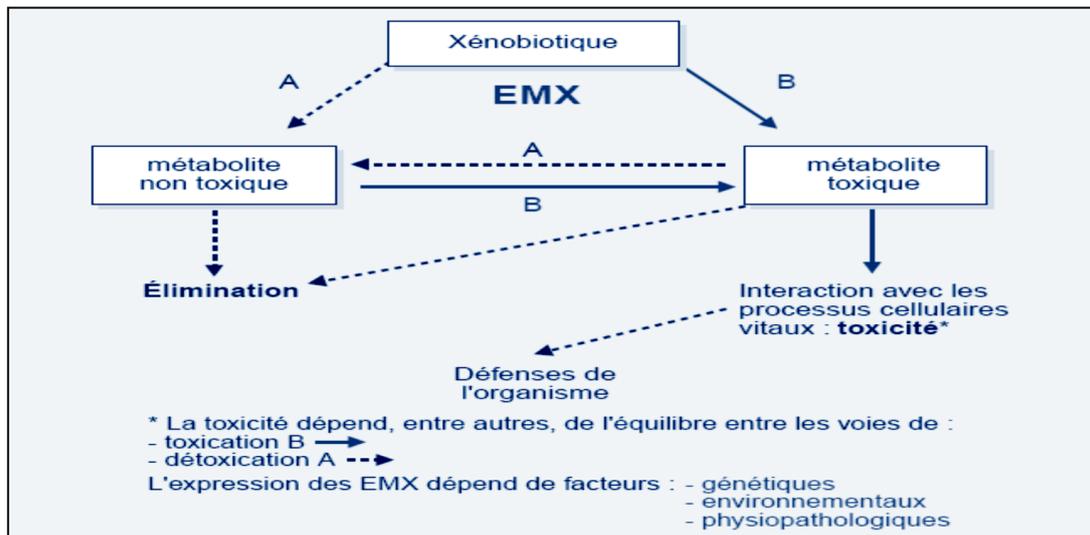
**Figure 01.** Phases du métabolisme des xénobiotiques.

Le métabolite ainsi produit pourra soit être éliminé dans la bile ou les urines, soit, après transport dans le sang ou dans la bile, être métabolisé de nouveau dans d'autres tissus possédant un autre spectre d'EMX (enzymes du métabolisme des xénobiotiques). Cette classification est destinée à clarifier la compréhension du métabolisme complexe des xénobiotiques.

Toutes les étapes ne sont pas obligatoires et le métabolisme de chaque composé est particulier. De nombreux métabolites peuvent être produits ; ils peuvent être plus ou moins toxiques que le produit parent, ou, s'il s'agit d'un médicament, plus ou moins actifs. Les conséquences de ce métabolisme en termes de toxicologie sont résumées dans la *figure 2*. Certains métabolites sont plus actifs (pro-drogues), d'autres n'ont pas d'activité ou une activité différente. L'équilibre entre les métabolites toxiques et non toxiques, actifs et inactifs, dépend de la nature et de la quantité des EMX (*figure 2*).

Parmi les propriétés des EMX sont : la spécificité relative et chevauchante (un CYP peut métaboliser plusieurs substrats, un substrat peut être métabolisé par plusieurs CYP) ainsi que la redondance (plusieurs enzymes, ou iso enzymes, peuvent prendre en charge le même

substrat) ces deux propriétés sont particulièrement importantes, car elles peuvent rendre compte, par exemple, de la fréquence élevée des polymorphismes génétiques à l'origine d'un déficit enzymatique.



**Figure 02.** Equilibre entre l'intoxication et la détoxication.

On peut citer les principales enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques dans le tableau suivant :

**Tableau 01 :** principales enzymes du métabolisme des xénobiotiques

Réactions	Enzymes
<b>Oxygénases et Oxydases</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cytochrome P450</li> <li>- Flavo-mono-oxygénases</li> <li>- Peroxydase</li> <li>- Monoamines et Aldéhyde oxydases</li> <li>- Alcool, Xanthine et Aldéhyde déhydrogénases</li> <li>- Aldo-kéto réductases</li> <li>- Quinone réductases</li> </ul>
<b>Hydrolases</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Estérases</li> <li>- Amidases</li> <li>- Epoxides hydrolases</li> <li>- <math>\gamma</math>-Glutamyl transpeptidases</li> <li>- dipeptidases</li> <li>- cystéine conjuguée <math>\beta</math>-lyases</li> </ul>
<b>Enzymes de conjugaison</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- glutathion S-transférases</li> <li>- sulfo transférases</li> <li>- acétyl transférases</li> <li>- UDP-glucuronyl transférases</li> <li>- Méthyl transférases</li> <li>- Conjugaison de la glycine</li> </ul>
<b>Enzymes piègeurs des radicaux libres</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Superoxide dismutases</li> <li>- Catalase</li> <li>- Glutathion peroxydases</li> </ul>

## 2.1. Métabolisme de phase I ou de fonctionnalisation

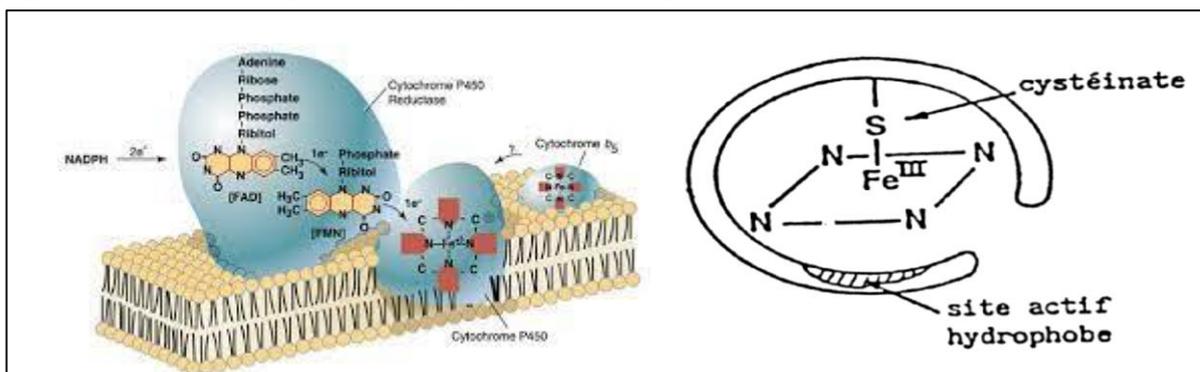
Le métabolisme de phase I a pour but la biotransformation des xénobiotiques en métabolites dotés d'une fonction réactive qui leur permettra de réagir avec un groupement polaire et de devenir ainsi plus hydrosolubles. Ce métabolisme met en jeu la réduction, l'hydrolyse mais surtout l'oxydation des composés exogènes par des enzymes dites de fonctionnalisation.

### 2.1.1. Oxydations

Les réactions d'oxydation comptent parmi les biotransformations les plus importantes des xénobiotiques. Elles se produisent sous l'action de systèmes enzymatiques, notamment les mono-oxygénases liées aux cytochromes P450,

#### A) Système enzymatique mono-oxygénase du cytochrome P450

Les cytochromes P450 sont des hémoprotéines membranaires, localisés dans le réticulum endoplasmique et exprimés dans le foie, et comprennent un système de support qui fournit les électrons donnés par le NADPH via la flavo-protéine NADPH-cytochrome P450 oxydoréductase ou le cytochrome  $b_5$  selon le cas (figure 3).



**Figure 03.** Structure d'une hémoprotéine du cytochrome P450 ; composée de l'hème ( $\text{Fe}^{3+}$ ) + Protéine + cystéinate + Site actif de CYP450

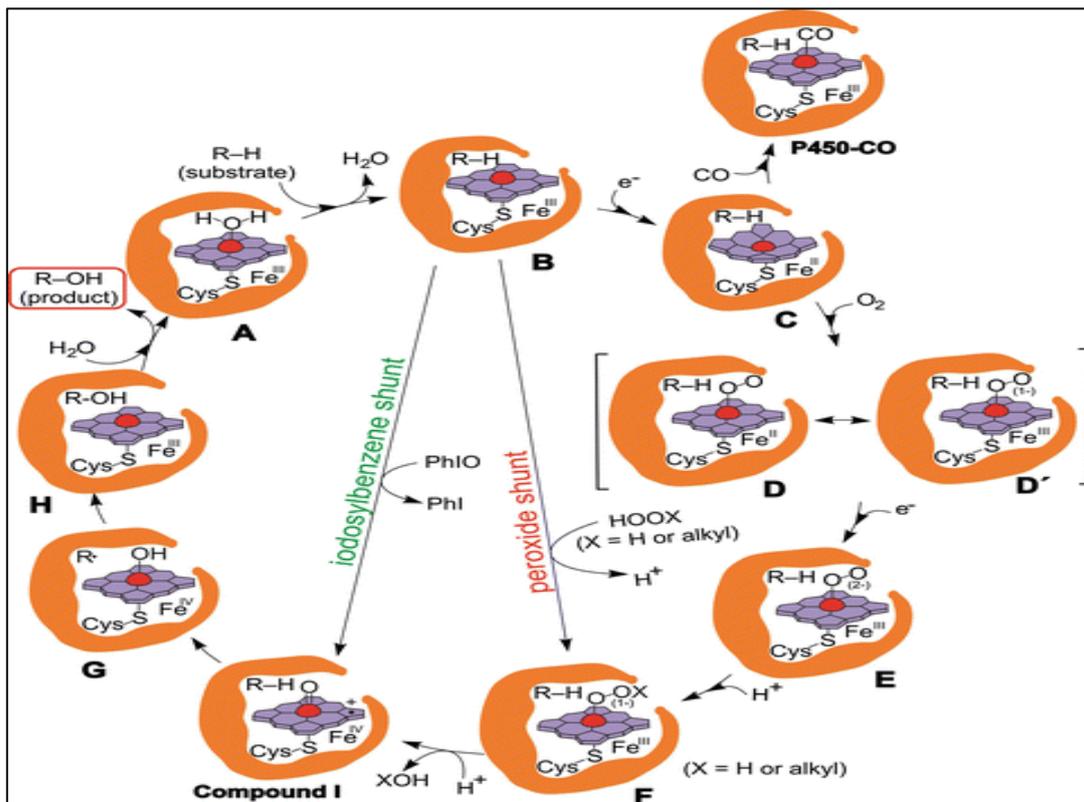
La nomenclature actuelle des cytochromes P450 dépend de la séquence d'acides aminés. Ainsi, s'il y a moins de 40% d'analogie dans la séquence d'acides aminés de deux cytochromes P450, ils seront classés dans des familles différentes. Si le pourcentage d'analogie dépasse 55%, alors les deux P450 seront considérés comme appartenant à la même sous-famille. La famille du cytochrome est identifiée par un chiffre arabe, la sous-famille par une lettre majuscule et chaque P450 par un chiffre arabe exemple ; *CYP2E*. Les caractères en italique représentent le gène associé à cette enzyme, exemple ; *CYP2E1*. Les isoenzymes du cytochrome P450 présentent certaines caractéristiques cliniquement importantes.

- Premièrement et selon la famille des cytochromes, ils ont peu de spécificité vis-à-vis leur substrats par comparaison aux relations spécifiques entre un ligand et son récepteur.

- Deuxièmement, ces enzymes microsomiales possèdent un grand potentiel d'interactions, plus particulièrement au niveau de l'induction et de l'inhibition de leur activité métabolique.
- Troisièmement, il existe une grande variabilité intra et inter espèces quant à l'expression et l'activité des cytochromes dans les divers tissus de l'organisme.

**B) Réactions catalysées par le cytochrome P450 :**

La liaison du substrat (xénobiotique) à la forme ferrique ( $Fe^{+3}$ ) de l'enzyme dans la poche hydrophobe de l'apoprotéine mène à la réduction à l'état ferreux ( $Fe^{+2}$ ) suite au transfert d'un électron via la réductase (figure 04).



**Figure 04.** cycle catalytique du cytochrome P450 ; (A) liaison du substrat, (B,C) la réduction du CYP450 de l'état ferrique à l'état ferreux par transfert d'un électron, (D) la liaison de l'oxygène moléculaire et la formation d'un complexe oxycytochrome P450, (E,F) transfert du second électron à ce complexe et la formation du peroxy-cytochrome, (I,G) la protonation et le clivage du lien O-O avec l'incorporation d'un atome d'oxygène distal dans une molécule d'eau et la formation d'espèces ferriques oxydées réactives, (H) le transfert de l'atome d'oxygène de ce complexe oxydatif au substrat lié, puis la dissociation et la libération du produit

Principales réactions d'oxydation :

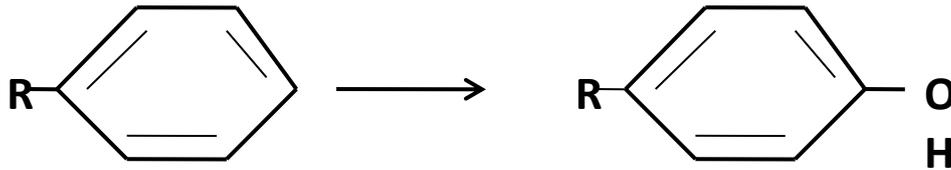
▪ Hydroxylation aliphatique :



Les alcools formés peuvent à leur tour être oxydés en aldéhydes, cétones et acides carboxyliques. Par exemple, l'hexane est métabolisé en hexane dione responsable de la neurotoxicité de ce solvant.

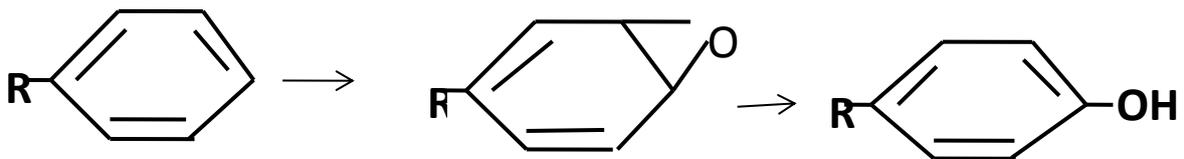
▪ **Hydroxylation aromatique :**

1<sup>er</sup> mécanisme :



Exemple : phénobarbital (barbiturique) se transforme en p. hydroxy-phénobarbital.

2<sup>ème</sup> mécanisme :



Phénobarbital

Oxyde d'arène ou époxyde

p. hydroxy-phénobarbital

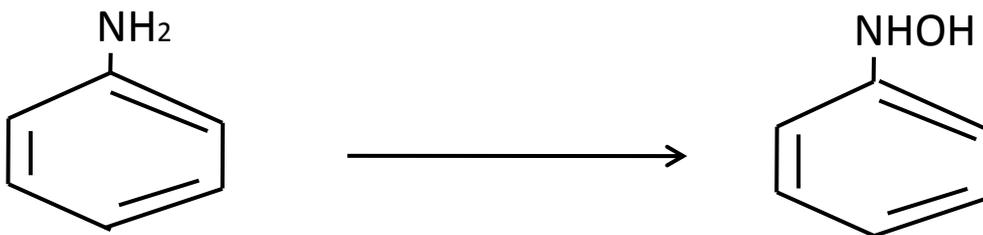
Les époxydes peuvent ensuite subir l'action d'une enzyme de phase II (époxyde hydratase) avec formation de fonctions alcool se prêtant à la conjugaison et à l'élimination dans les urines « détoxification ».

▪ **O-,N-,S-, désalkylation :  $R-X-CH_2 \rightarrow R-X-CH_2OH \rightarrow HCHO + R-NH_2$  (X=N)**

R-OH (X=O)

R-SH (X=S)

▪ **N-hydroxylation:**



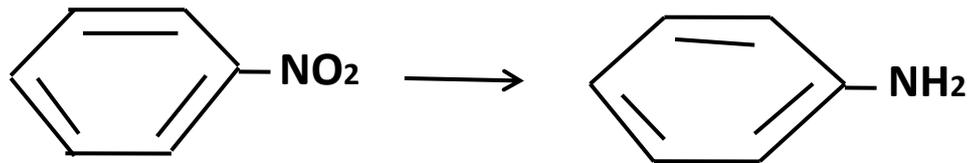
▪ **N-oxydation, S-oxydation:  $R_2N \rightarrow R_2N-\rightarrow-O$   $R_2S \rightarrow R_2S-\rightarrow-O$**

**2.1.2. Réduction:**

Peuvent impliquer des enzymes microsomaux à cytochrome P450.

• **Réduction des dérivés nitrés avec formation d'une amine.**

Exemple : Nitrobenzène  $\rightarrow$  aniline



- **Réduction des dérivés azoïques avec formation d'amines**

Exemple : azobenzène  $\longrightarrow$  aniline



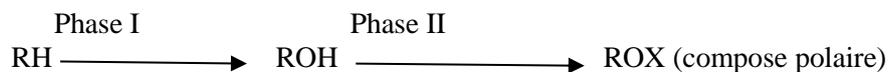
### 2.1.3. Hydrolyse :

De nombreux xénobiotiques peuvent subir des hydrolyses sous l'action des estérases, peptidases et des amidases. Exemple :

- L'acide acétylsalicylique (aspirine) est hydrolysé en acide salicylique et acide acétique ;
- La diacétylmorphine « héroïne » est hydrolysée en O<sub>6</sub>-monoacétylmorphine, puis en morphine, qui suit alors son propre métabolisme ;
- La cocaïne fournit par hydrolyse la benzoylecgonine, puis l'ecgonine et l'acide benzoïque ;

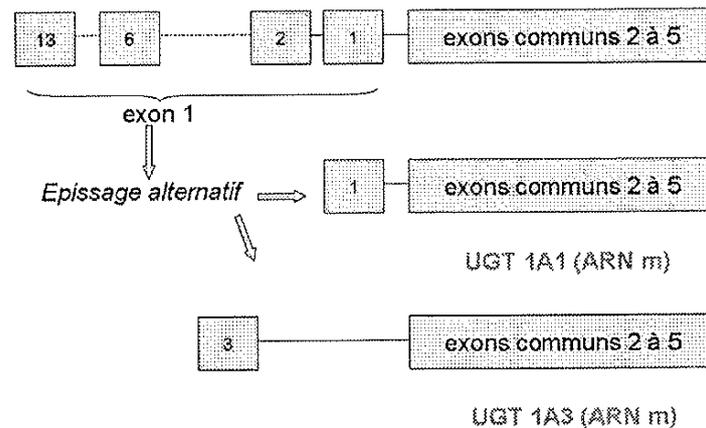
## 2.2. Métabolisme de phase II ou de conjugaison

Cette phase aboutit à la formation de substances conjuguées hydrosolubles et facilement éliminées par les urines ou la bile. Les réactions de phase II sont catalysées par les transférases, se définissent par la conjugaison du xénobiotique ou de son métabolite avec un substrat endogène de haute polarité. Les réactions les plus importantes de biotransformation de phase II des xénobiotiques sont : la glucuronidation, la sulfatation, la conjugaison du glutathion, méthylation, l'acétylation et conjugaison aux acides aminés, catalysées par différentes enzymes de conjugaison, soit respectivement les uridines diphosphate glucuronyl transférase (UDP-glucuronyl transférases), les sulfo-transférases, les glutathion-S-transférases (GST), et les N-acétyl transférases.



### 2.2.1. Glucurono-conjugaison

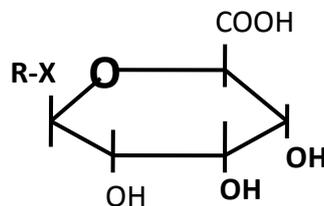
Est quantitativement la plus importante réaction de phase II et elle se réalise à l'échelle cellulaire, au niveau du réticulum endoplasmique et catalysée par les *UDP-glucuronosyltransférases* ou UGT.



**Figure 05 :** Structure de gène des enzymes des UGT 1

Elle a lieu dans le foie, mais sa présence est détectée dans d'autres tissus tels les reins, la muqueuse intestinale, les poumons et l'estomac, en ordre décroissant d'activité enzymatique.

Au niveau du tractus gastro-intestinal, les glucuronides peuvent être formés tout au long de l'intestin mais les plus fortes activités apparaissent dans la région du pylore et du duodénum. Au niveau du colon, la voie des glucuronyl transférase est la plus dominante des réactions de phase II. Les phénols, les alcools et les acides carboxyliques représentent les substrats les plus fréquemment conjugués par ces transférase, il se forme des conjugués glucuroniques ou glucuronides de structure :



Où  $X = O, N, S, \text{ ou } C$

### 2.2.2. Conjugaison au glutathion

La réaction est catalysée par des glutathion-S-transférase avec le glutathion comme cofacteur. Cette enzyme est présente dans les fractions cytosoliques et microsomiales. Les membres de cette famille catalysent la conjugaison des groupements sulphydyles du glutathion avec plusieurs substances électrophiliques et carcinogènes, exemple ; les époxydes, les dérivés nitrés et les hydroxylamines. Trois classes de GST sont distinguées selon leur point isoélectrique, les isoformes basiques (alpha), neutres (mu), et acides (pi). Le foie contient principalement les isoformes alpha et mu tandis que les isoformes alpha et pi se trouvent dans l'intestin grêle.

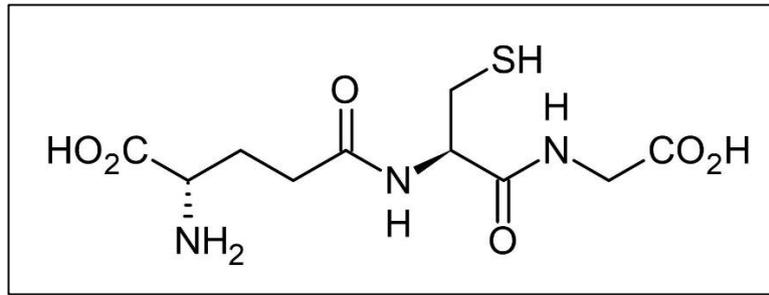
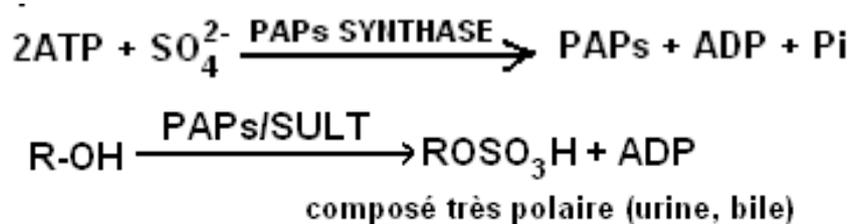


Figure 06. Structure de glutathion

### 2.2.3. Sulfo-conjugaison

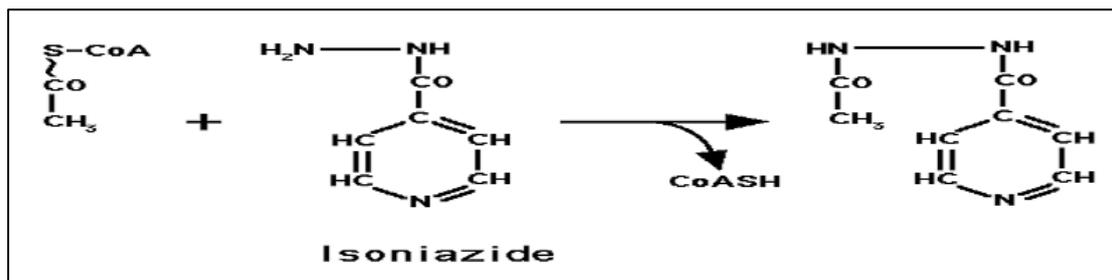
La conjugaison de l'ion sulfate avec les substrats endogènes ou exogènes est catalysée par les sulfotransférases cytosoliques et elle constitue une voie métabolique importante pour les neurotransmetteurs ou les composés phénoliques. De plus, plusieurs substrats comme alcools, phénols, amines aromatiques sont métabolisés par glucuronidation suite à la saturation de la voie de sulfatation, la disponibilité des enzymes de conjugaison, l'affinité de l'enzyme pour le substrat ou l'accès à l'enzyme. En général, les sulfotransférases ayant une haute affinité et une faible capacité, à l'opposé des glucuronyl transférases.



PAPs = 3 phospho adénosine 5' phosphosulfate

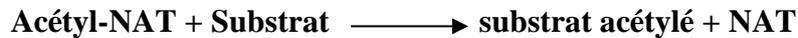
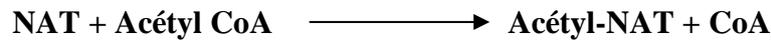
Exemple :  $\varphi\text{-OH} \rightarrow \varphi\text{-OSO}_3\text{H}$

### 2.2.4. Acétylation



L'acétylation est sous la dépendance de N-acétyltransférase « NAT », dont la coenzyme est l'acétyl-coenzyme A. les NAT assurent le transfert d'un groupement acétyl (CO-CH<sub>3</sub>) sur des amines aromatiques primaires, certaines amines aliphatiques primaires, des hydrazines, des hydrazides, des sulfoamides. Il existe deux isoenzymes de la N-acétyltransférase ; la NAT1 et NAT2, dont la première (NAT1) est exprimée dans la majorité des tissus de l'organisme et elle est responsable du métabolisme de substrat tels les acides *p*-amonobenzoïque et *p*-aminosalicylique. Tandis que la NAT2 est présente principalement dans le foie et l'intestin et

elle est impliquée dans le métabolisme des arylamines (exemple ; sulfaméthazine, procainamide), des hydrazines (ex ; isoniazide, hydralazine) et de la caféine.



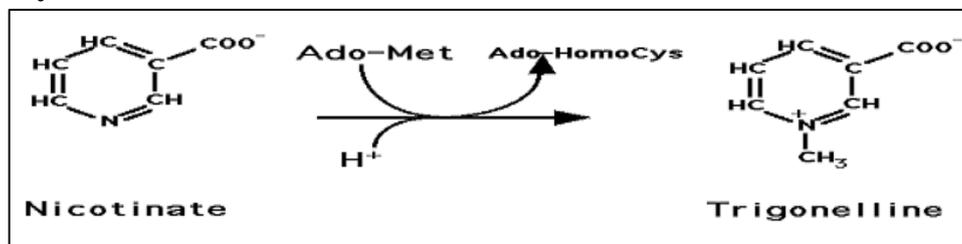
Composé endogène :-CO-CH<sub>3</sub> sous une forme activée = acétyl COA

Enzyme : N acétyl transférase : NAT

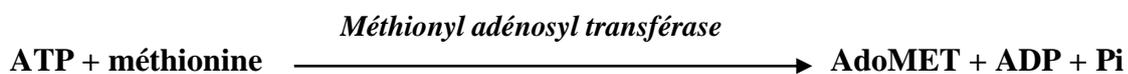
Substrat : R-NH<sub>2</sub>, R-NH-NH<sub>2</sub>, R-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>

Réaction : R-NH<sub>2</sub> → R-NH-CO-CH<sub>3</sub>

### 2.2.5. Méthylation



La réaction fait intervenir des méthyltransférases dont la coenzyme est la S- adénosylméthionine «SAM », sont des enzymes responsables de la N- méthylation des groupements aminés ou thiols. Une de ces enzymes ; la cathécol-O-méthyl transférase, elle est fortement exprimée dans le cytosol des cellules du foie et du cerveau. Les catécholamines endogènes et les xénobiotiques ayant une structure similaire. Les méthyl-transférases non spécifiques présentent dans la médulla des surrénales, certaines régions du cerveau, la rétine, le foie et le cœur. Ces enzymes sont impliquées dans le métabolisme de certains produits, exemple ; nicotine, thioguanine, captopril, spironolactone et N- acétylcystéine. Les méthyl-transférases détoxifient les thiols en produisant un dérivé S-méthyl, exemple ; mercapturine. Ces enzymes sont largement répandus dans les érythrocytes, les lymphocytes et le rein.



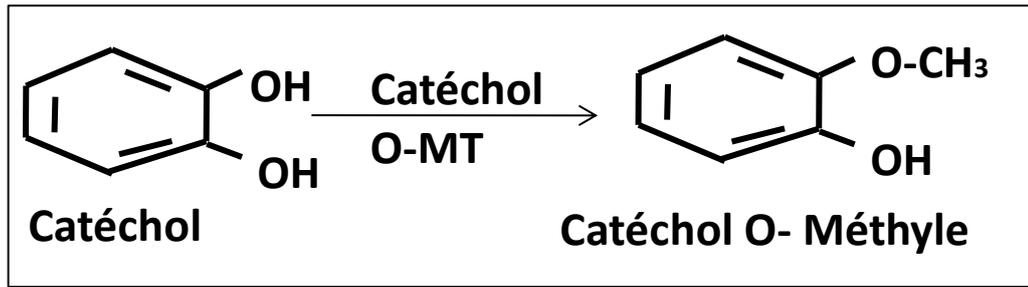
Enzyme : méthyl transférase MT

6 isoformes chez l'homme : O-, N-, S- méthyl transférases

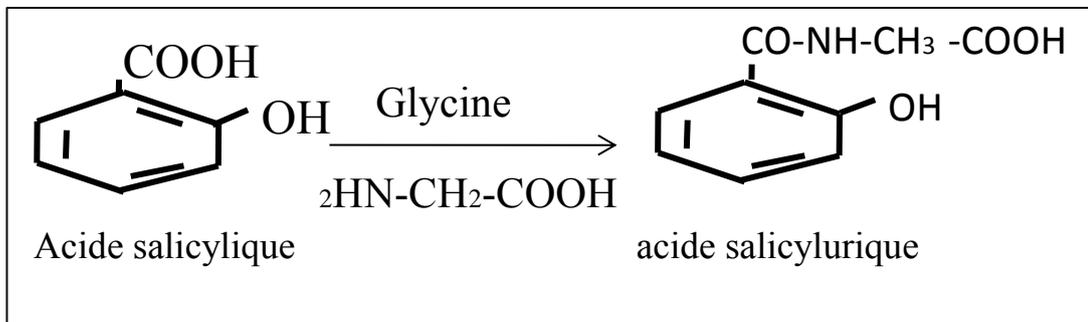
ex : catéchol O méthyl transférase COMT : O méthylation

thiopurine méthyl transférase TPMT :S méthylation

Substrat : phénol, amine ,thiol ,As (arsenic)

**Réaction :****2.2.6. Conjugaison aux acides aminés**

La glycine et la glutamine sont des acides aminés utilisés dans la conjugaison des xénobiotiques ayant des fonctions acide carboxylique, tels les acides salicyliques, benzoïque et nicotinique. Ces réactions se font grâce à l'acétyl-CoA synthétase et la N-acétyl-transférase qui se trouvent principalement dans les mitochondries du foie et des reins.

**2.2.7. Autres enzymes**

Plusieurs enzymes présentes dans les tissus de l'organisme et peuvent contribuer à différents degrés au métabolisme des xénobiotiques. Parmi ces enzymes on peut mentionner les estérases, l'alcool déshydrogénase, l'O-dé-éthylase, les N et O-déméthylases, l'époxyde hydrolase, la xanthine oxydase, la décarboxylase et la monoamine oxydase.

**a) Estérases**

Jouent un rôle important dans le métabolisme des composés en hydrolysant leur lien ester. Deux catégories d'estérases se distinguent selon leur action

- La première catégorie regroupe les enzymes qui hydrolysent les xénobiotiques et qui ne semble pas avoir un rôle physiologique particulier ; les cholinestérases, les carboxylestérases et les arylestérases.
- La deuxième catégorie comprend les lipases, les acétylestérases et les acétyl choline estérases qui hydrolysent surtout les substances endogènes, exemple ; l'acétylcholine et les triglycérides.
- La  $\beta$ -glucuronidase est une estérase présente en forte concentration dans la lumière des parties distales de l'intestin grâce à la flore bactérienne intestinale. Elle joue un rôle spécifique en clivant le lien entre le substrat et l'acide glucuronique, permettant ainsi d'initier un cycle entérohépatique.

**b) Epoxydes hydrolases**

Les époxydes sont des substances hautement réactives qui sont formées à la suite de l'oxydation de certains substrats par les isoenzymes du cytochrome P450. L'élimination des époxydes se fait par trois

voies, le réarrangement spontané en phénol, la conjugaison avec le glutathion et l'hydrolyse par les époxydes hydrolases donnant lieu à un composé plus stable, les trans-dihydrodiols. Dans l'organisme la distribution des époxydes hydrolases est parallèle à celle des isoenzymes du cytochromes P450, avec une plus grande concentration dans le foie que dans les tissus extra hépatiques.

### A) Phase III de métabolisme (transport et élimination)

Le métabolisme de phase 3 se rapporte au transport intracellulaire cytoplasmique des xénobiotiques vers l'excrétion et l'élimination extracellulaire ; elle est assurée par différentes protéines de transport, principalement les P-glycoprotéines (P-gps) et les « multi drug resistance-associated proteins » (MRPs). Il s'agit de protéines membranaires intégrales appartenant à la superfamille des ATPases « ATP-binding cassette » (ABC), et qui utilisent donc l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP afin d'expulser activement leurs substrats à l'extérieur des cellules. Exprimés entre autres au niveau du domaine canaliculaire des hépatocytes, ces transporteurs s'avèrent impliqués dans le passage transmembranaire des xénobiotiques (en particulier les médicaments) ou de leurs métabolites dans la bile et dans l'urine (Figure 07).

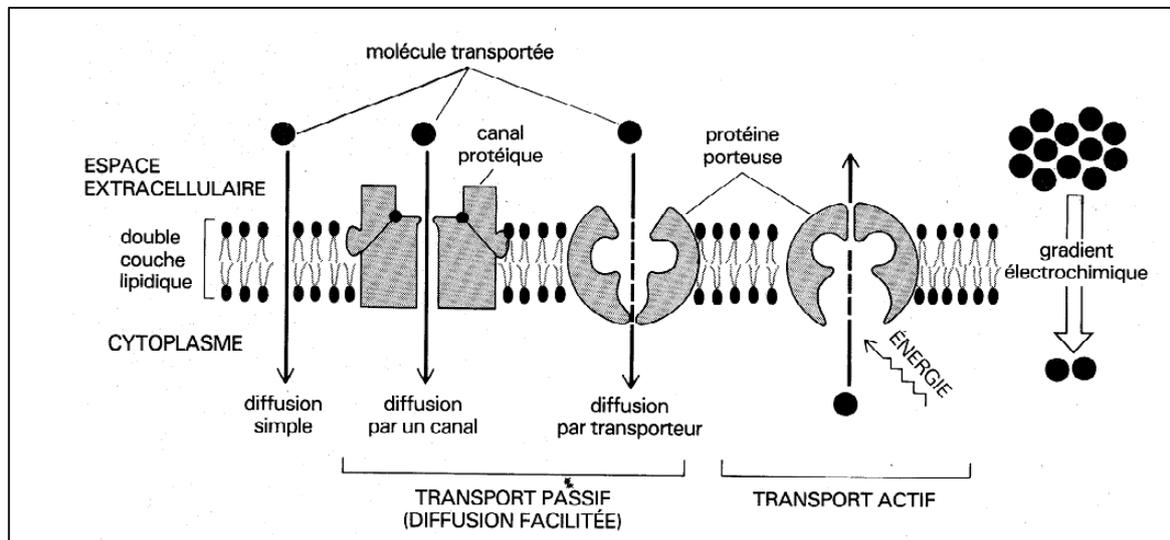


Figure 07. Transport et élimination des xénobiotiques

### B) Induction et répression des enzymes du métabolisme des xénobiotiques

L'expression des EMX peut également varier en fonction de l'environnement. En effet, ces enzymes sont fréquemment inductibles et répressibles. Le Tableau 2 indique les principaux inducteurs et leurs cibles parmi les EMX. Le taux de cette induction peut être élevé (jusqu'à 50 fois), elle peut affecter plusieurs enzymes (CYP, GST, UGT, etc.), et être elle-même sous la dépendance de facteurs génétiques (ainsi pour l'induction par la dioxine et les hydrocarbures aromatiques polycycliques des gènes comme le *CYP1A1*, des inducteurs faibles et forts ont été décrits, la nature de l'induction étant génétiquement déterminée. Enfin, ces enzymes peuvent être réprimées. Ces enzymes sont également sensibles à l'inhibition par des xénobiotiques, qui peuvent bloquer leur activité enzymatique de façon réversible ou irréversible. De nombreux médicaments, mais également des substances de l'environnement sont capables d'interférer avec l'enzyme et de moduler ainsi le métabolisme d'autres xénobiotiques. Ainsi

chez un même individu, la capacité métabolique peut être largement modulée aussi bien quantitativement que qualitativement, par des composés endo- ou xénobiotiques.

**Tableau 02 :** Quelques exemples d'inducteurs chez l'homme.

Inducteurs	Enzymes induits
Barbituriques	CYP (2B, 2C, 3A), UGT
Fumée de cigarette, dioxine	CYP (1A, 1B), UGT, GST
Rifanopicine, carbamazépine	CYP 3A
Stéroïdes	CYP3A
Ethanol	CYP2E1

*CYP: cytochromes P450.*

*UGT: UDP glycosyl transférase.*

*GST: glutathione-S-transférase.*

### C) Cibles de métabolisme des xénobiotiques

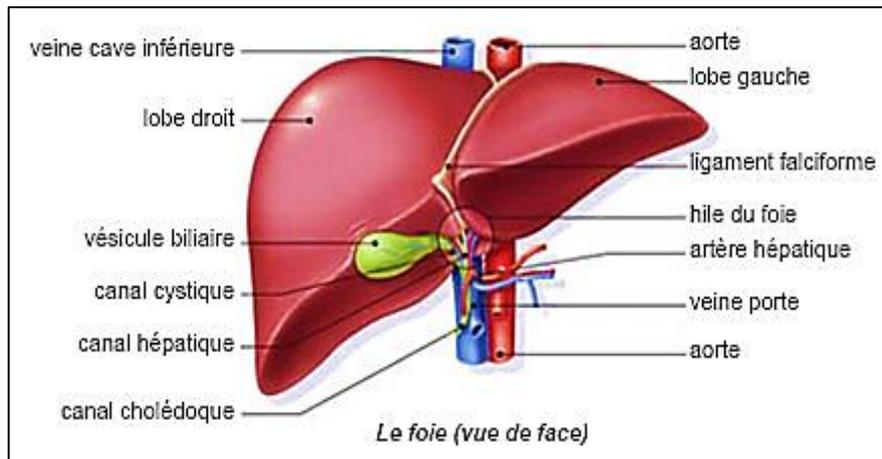
Le métabolisme des xénobiotiques et de toutes les substances endogènes a lieu dans tous les tissus contenant des enzymes de biotransformation. Le foie, l'intestin et les poumons, représentent les organes les plus riches en enzymes et ils peuvent contribuer à différents degrés au métabolisme des xénobiotiques.

Ces enzymes se retrouvent aussi dans d'autres organes avec des concentrations qui varient d'un tissu à l'autre et au sein du même tissu. Ces organes sont : la muqueuse nasale, les bronches, la vessie, le système nerveux central, le placenta, les leucocytes, les macrophages. Le cerveau contient plusieurs enzymes métaboliques telles que les mono amines oxydase et les cytochromes P450.

## Chapitre II : Organes intervenants dans le métabolisme des xénobiotiques

### 1. Le Foie

Le foie est la plus volumineuse des glandes annexes du tube digestif, il est à la forme d'un demi-ovoïde, orienté transversalement. La partie droite est la plus volumineuse et de forme arrondie. La partie gauche est aplatie et effilée à son extrémité. Le foie se compose de 2 lobes principaux, le lobe droit, le plus grand des deux, et le lobe gauche, plus petit. Entre ces deux parties majeures, se trouvent le lobe carré, et le lobe caudé (Spiegel). Chaque lobe est divisé en segments. Les lobes droit et gauche sont séparés par une bande de tissu appelée ligament falciforme, ou ligament large, qui aide à maintenir le foie fixé au diaphragme.



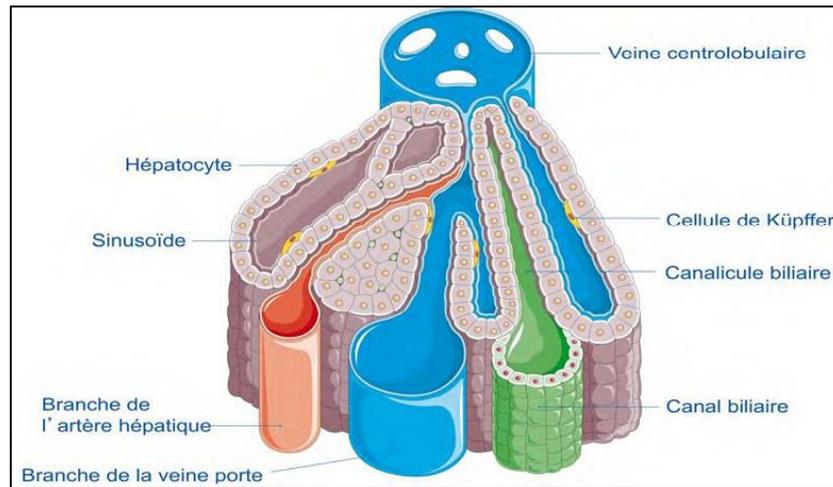
**Figure 01:** Organisation du foie

#### 1.1. Rôle principal :

Le foie est le premier organe traversé par les substances absorbées dans l'intestin : nutriments, vitamines, médicaments et toxiques. Ces substances sont ensuite extraites de la circulation sanguine et pénètrent dans les hépatocytes afin d'y être stockées, métabolisées ou excrétées dans la bile.

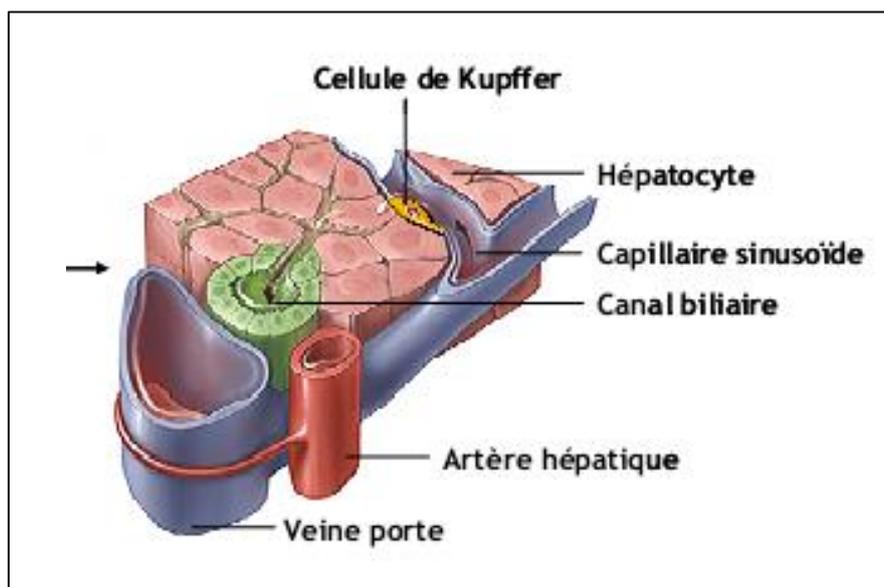
#### 1.2. Organisation :

Le foie a une structure complexe liée à la diversité de ses fonctions. En effet, il joue un rôle essentiel dans la détoxification de nombreux xénobiotiques (alcool, médicaments, etc.), dans la formation de la bile et dans le métabolisme des protéines, des hydrates de carbone et des lipides. Le foie reçoit 25% de sang provenant de l'artère hépatique et 75% provenant de la veine porte. Cette dernière recueille le sang veineux des organes intra0abdominaux et se divise en de nombreuses branches immédiatement après son entrée dans le foie. Le sang de la veine porte contient, entre autre, les nutriments et les substances absorbés par la muqueuse intestinale (dont certains médicaments).



**Figure 02:** Organisation lobulaire du foie

Le foie est un organe multilobé (5 lobes principaux chez le rat et 2 chez l'Homme). Il est constitué de très nombreux lobules hépatiques. Un réseau dense de capillaires sinusoides permet le passage du sang à l'intérieur du foie et l'absorption des diverses molécules par les hépatocytes. Le foie est également traversé par des canalicules biliaires, qui se rejoignent et forment des canaux biliaires. Ceux-ci se jettent dans le canal cholédoque qui rejoint la lumière intestinale. Les hépatocytes sont organisés en travées, elles-mêmes constituées de lobules (en forme de prismes polygonaux). Entre les travées se trouvent les capillaires sinusoides où se mélangent le sang artériel et le sang veineux. Ces capillaires sanguins se jettent dans la veine centrolobulaire, qui elle-même rejoint les veines sus-hépatiques, la veine hépatique puis la veine cave inférieure (Figure 03).



**Figure 03 :** Structure et organisation d'un lobule hépatique

## 2. L'appareil respiratoire

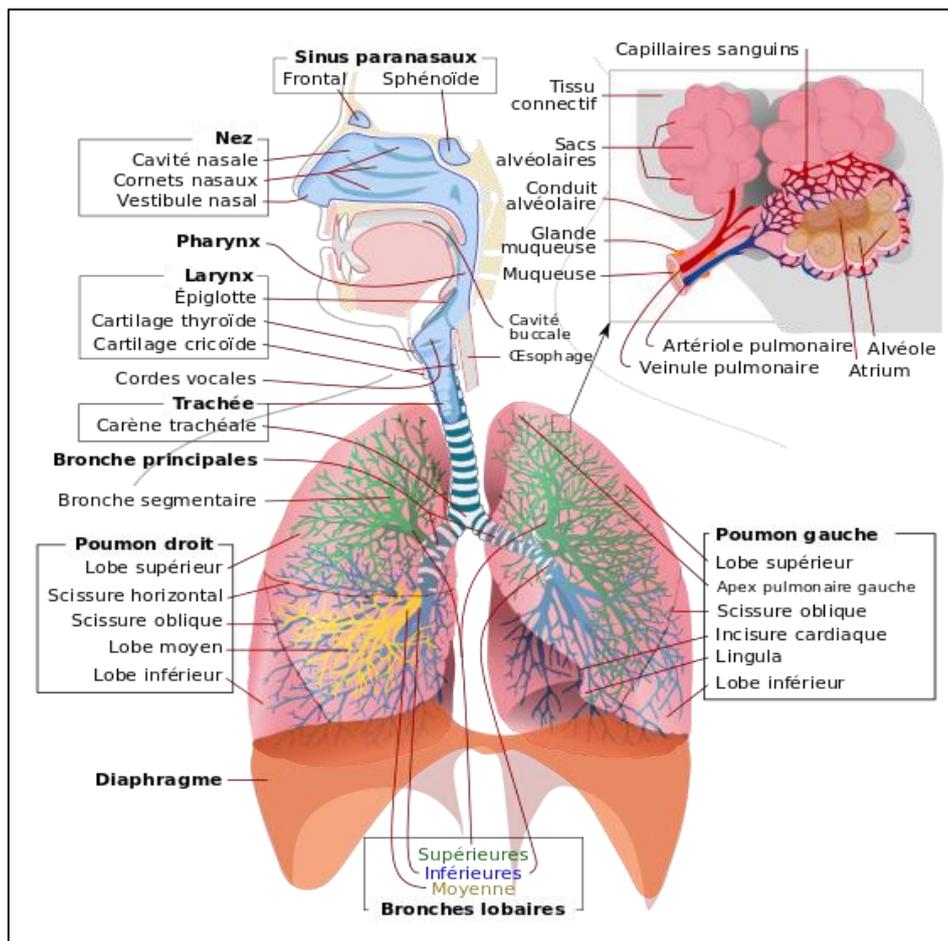
### 2.1. Rôle principal :

Assure les échanges gazeux en captant le dioxygène (O<sub>2</sub>) dans l'air et en y rejetant le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>).

### 2.2. Organisation :

#### ❖ L'appareil respiratoire est constitué par :

- les voies aériennes : fosses nasales, pharynx, larynx, trachée, bronches et bronchioles
- les poumons : situés dans la cage thoracique et limités ventralement par le diaphragme, sont enveloppés par les plèvres, paroi repliée sur elles-même et contenant un liquide. Les bronchioles des voies aériennes se terminent par des petits « sac à air » hémisphériques qui sont les alvéoles pulmonaires. Les poumons sont en fait constitués par ces alvéoles qui forment un ensemble spongieux (figure 04).



**Figure 04** : Structure et organisation de l'appareil respiratoire

#### ❖ Les voies aériennes zone de conduction :

Les voies aériennes constituent la zone de conduction de l'air qui relie l'air atmosphérique et l'air alvéolaire. De plus, sur son trajet l'air inspiré est progressivement réchauffé et hydraté

au contact des cellules épithéliales et «dépoussiéré » par un ensemble cilio-muqueux qui fixe les particules de l'air (poussières, pollens, microorganismes...)

❖ **La paroi alvéolaire zone d'échanges gazeux :**

La paroi des alvéoles pulmonaires constitue la zone respiratoire où s'effectuent les échanges gazeux entre l'air alvéolaire et le sang. Ces échanges gazeux s'effectuent par diffusion à travers la paroi alvéolaire.

❖ **La paroi alvéolaire représente une zone d'échange très efficace :**

- surface importante (70 m<sup>2</sup> / poumon) » surface d'un court de tennis
- faible épaisseur (0.1 à 0.4 µm)
- richement vascularisée
- diffusion des gaz rapide

**La paroi alvéolaire est constituée de plusieurs types cellulaires présentant des propriétés remarquables :**

- Les cellules épithéliales appelées pneumocytes I qui sont des cellules du revêtement de la paroi et constituent l'essentiel de cette dernière.
- Les macrophages qui ont un rôle dans les mécanismes de défense
- Les pneumocytes II qui sont dispersés dans la paroi et sécrètent le surfactant. Ce surfactant forme un film continu à la surface des alvéoles évitant ainsi qu'elles se replient sur elles-même et freinent la réalisation des échanges. Les pneumocytes II ne sont effectifs qu'à la fin de la vie foetale. Ce qui fait que certains prématurés, ne disposant pas encore de surfactant, présentent un syndrome de détresse respiratoire.

### **3. Appareil urinaire**

Les reins et plus généralement, le système urinaire, remplissent plusieurs fonctions de régulation nécessaires au maintien de l'homéostasie de l'organisme grâce à la production et à l'excrétion des urines. Les plus importantes missions des reins sont : l'élimination des produits de dégradation du métabolisme (exemple du métabolisme protéique), la détoxification par élimination des xénobiotiques (médicaments, etc.), la régulation des concentrations d'électrolytes (sodium, potassium, calcium et phosphore), le maintien du contenu hydrique et de la pression osmotique, le maintien de l'équilibre acido0basique et du pH, la formation de certaines hormones (rénine, érythropoïétine, etc.) et la transformation de la vitamine D en sa forme active.

#### **3.1. Rôle principal :**

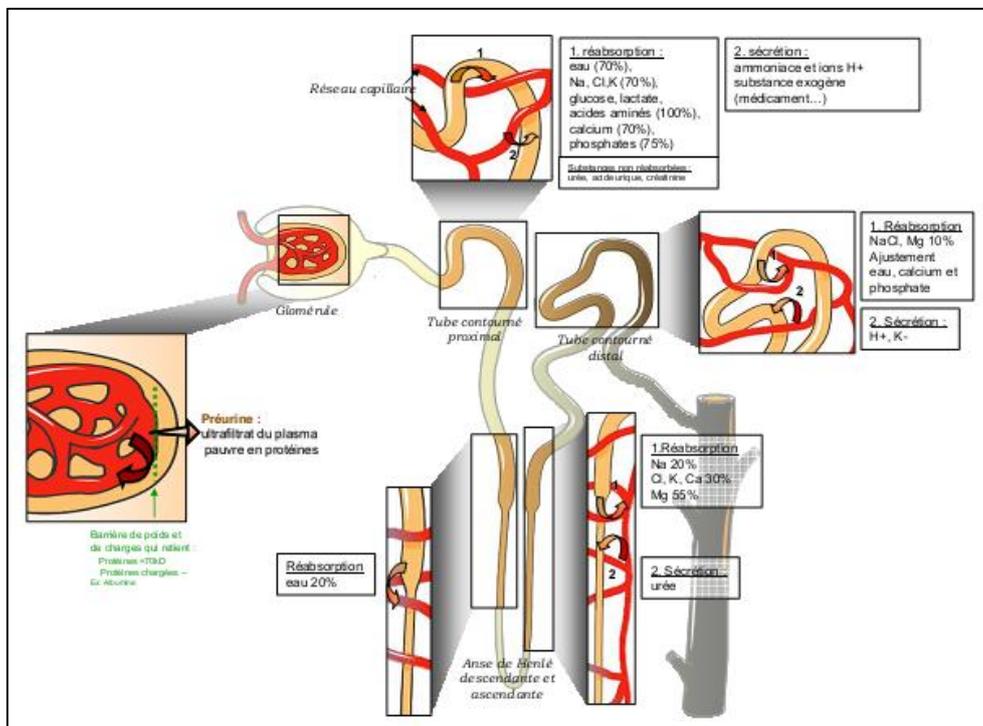
Élaboration de l'urine. Les reins filtrent le plasma (= portion liquide du sang (eau + électrolytes + protéines + gaz + nutriments + produits de déchets + hormones)) et permet

l'élimination des déchets toxiques ; ils permettent également de régler la concentration et le volume sanguin et ils contribuent à régler le pH du sang.

### 3.2. Organisation :

#### ❖ Ses différentes composantes :

- Deux reins qui élaborent l'urine définitive. Chaque rein contient 1 à 1,2 millions de tubules rénaux appelés néphrons. Ceux-ci sont très richement vascularisés et c'est à leur niveau que l'urine est fabriquée.
- Deux uretères qui relient les reins à la vessie. L'urine produite par les néphrons est recueillie dans le bassin et puis elle s'écoule par les deux uretères vers la vessie.
- Une vessie qui permet le stockage de l'urine
- Un urètre qui permet l'évacuation de l'urine (figure 05).



**Figure 05 :** Représentation schématique des fonctions glomérulaires et tubulaires dans la constitution des urines.

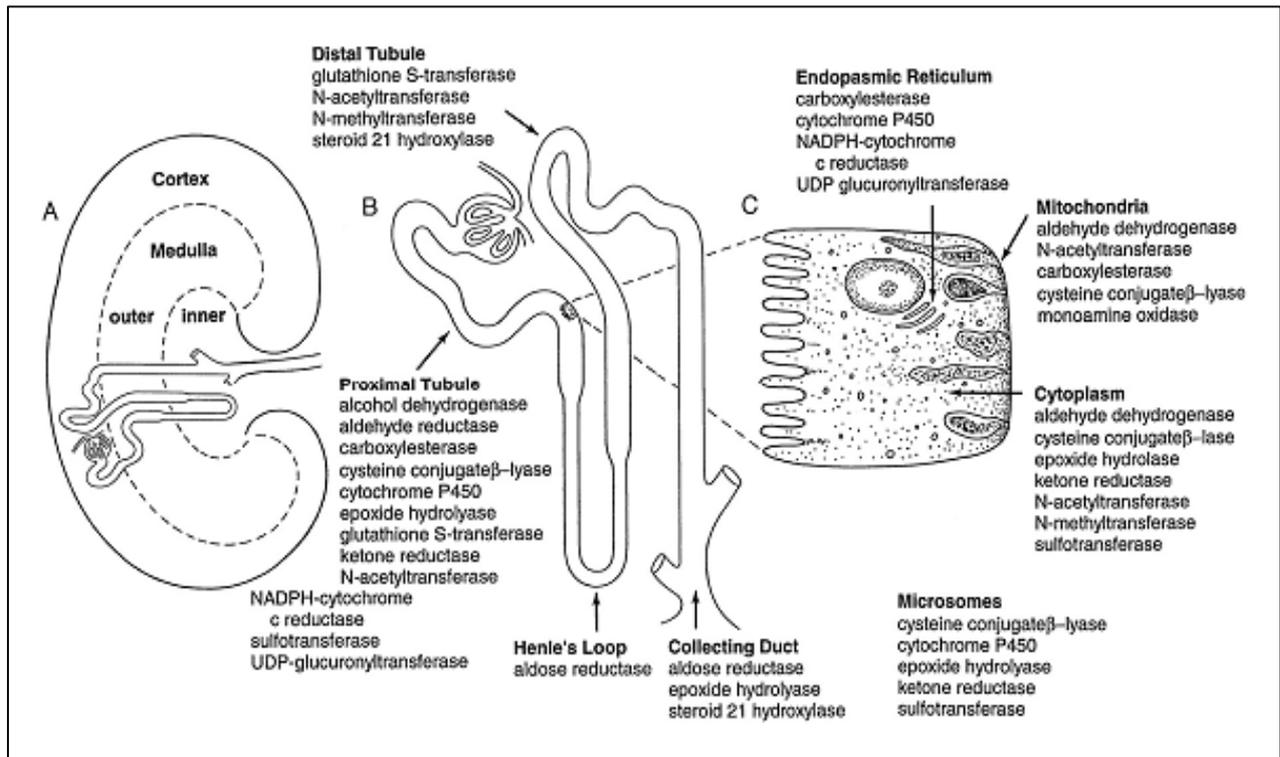
#### ❖ Sa vascularisation :

Chaque rein est irrigué par une artère rénale (en provenance de l'artère aorte) et d'une veine rénale (rejoignant la veine cave inférieure).

### 3.3. Rôle des reins dans la métabolisation des xénobiotiques :

Les reins participent, dans une moindre mesure que le foie, à un processus de détoxification des xénobiotiques par métabolisation. De manière générale, les EMXs présents dans la structure

rénale sont les mêmes que celles du foie mais on les retrouve en plus petite quantité et/ou dans d'autres proportions.



**Figure 06 :** Localisation rénale (A), tubulaire (B) et subcellulaire (C) des EMXs dans le rein.

Parmi ces enzymes du métabolisme des xénobiotiques, on retrouve la famille des cytochromes P450 avec notamment les CYP3A, CYP1A et CYP1B.

Parmi les enzymes de phase I, on note également la présence de flavines monooxygénases, monoamines oxydases. Concernant les enzymes de phase II, les familles d'enzymes les plus sollicitées sont les glucuronyltransférases, sulfotransférases et des glutathionOS0transférases.

La figure 06 illustre que la majeure partie des EMXs rénaux est localisée au niveau du cortex rénal et plus précisément au niveau des structures tubulaires dont le TCP. Bien que le rein soit muni d'EMX, la description détaillée de ces enzymes est située dans le chapitre relatif au foie puisque c'est au niveau hépatique qu'elles y jouent leur rôle principal.

## Chapitre III : Voies de métabolisme

### 1. Voies d'absorption des xénobiotiques

#### 1.1. Voie digestive

Diverses réactions enzymatiques ont lieu dans la muqueuse intestinale impliquant les cytochromes P450, les estérases et les enzymes de conjugaison. Les réactions de biotransformation varient d'une espèce à l'autre, de même qu'entre les régions du tube digestif. Ainsi pour un xénobiotique donné, l'absorption intestinale ou le métabolisme dépend de la concentration des enzymes dans les cellules épithéliales et de la vitesse de transfert des composés à travers ces cellules. En général, les produits faiblement absorbés par l'intestin risquent de subir un métabolisme luminal plus important. De plus la flore bactérienne secrète les enzymes métaboliques lumbales, elle est donc capable de catalyser plusieurs réactions de dégradation, de réduction et d'hydrolyse. Ces bactéries jouent un rôle important dans la recirculation entéro-hépatique en hydrolysant les conjugués de plusieurs xénobiotiques, exemple ; les contraceptifs oraux, la vitamine D. ces bactéries clivent également les conjugués de substances endogènes tels les acides biliaires, l'acide folique et le cholestérol. Les produits qui subissent un cycle entéro-hépatique sont normalement conjugués avec l'acide glucuronique, la glycine, le glutathion et l'ion sulfate et ils se retrouvent dans la lumière intestinale via la bile. Une fois secrétées dans l'intestin grêle, les enzymes lumbales comme la  $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -glycosidase, la sulfatase et les autres glycosidases hydrolysent les conjugués et libèrent ainsi le substrat, lui permettant d'être réabsorbé ou métabolisé.

#### 1.2. Voie hépatique

Le foie est l'organe de référence en termes d'activité de biotransformation des xénobiotiques et il contient les plus grandes concentrations et variété de cytochromes et autres enzymes de phase I et II.

#### 1.3. Voie pulmonaire

Les xénobiotiques administrés oralement traversent la barrière gastro-intestinale et ils traversent le foie en empruntant le système porte. Par la suite, et afin d'atteindre la circulation systémique, le substrat est transporté par la veine porte supra-hépatique, la veine cave supérieure et il passe par les poumons, c.-à-d. à la suite d'une dose orale, le poumon représente la dernière barrière à franchir avant que le xénobiotique n'atteigne la circulation systémique. Tandis que pour la voie respiratoire et la voie intra veineuse, le poumon constitue l'unique barrière entre le site d'administration et la circulation systémique. Le tissu pulmonaire contient plusieurs enzymes métaboliques telles que les hydrolases (époxydes hydrolase), les estérases

(carboxyl-estérase), les déhydrogénases (aldéhyde déhydrogénase) et les transférases (GST, UDP-glucuronyl-transférases, sulfo-transférases et méthyl-transférases).

#### 1.4. Voie rénale

Le rein représente une distribution particulière des enzymes impliquées dans le métabolisme des substrats endogène et exogènes. Ainsi, le cortex rénal contient principalement les iso-enzymes du cytochrome P450 et les glutathion transférases. Ces enzymes se retrouvent, dans un ordre décroissant, dans la médulla externe et la médulla interne. Les prostaglandines synthétases ont une distribution rénale à l'opposé des cytochromes avec une concentration décroissante allant de la médulla interne jusqu'au cortex rénal.

### 2. Voies d'élimination des xénobiotiques

Les xénobiotiques après leurs biotransformation empruntent les voies classiques d'élimination sous forme libre ou conjuguée comme suite :

#### 2.1. Elimination rénale

Les processus physiologiques utilisés pour l'élimination des molécules endogènes « filtration glomérulaire et sécrétion tubulaire » sont mis en jeu pour l'élimination des xénobiotiques.

- ❖ La filtration glomérulaire est basée sur le diamètre des pores des capillaires du glomérule. En revanche certains composés relativement liposolubles et présentant un caractère acide, non ionisés sont réabsorbés après filtration.
- ❖ Certains xénobiotiques sont excrétés dans les urines par diffusion passive à travers les tubules. Exemple ; l'élimination des bases faibles. Cette excrétion dépend du débit urinaire c'est pour cela qu'il est nécessaire d'utiliser des diurétiques pour le traitement de certaines intoxications.

#### 2.2. Elimination digestive

Elle permet l'élimination des molécules non résorbées dans le tube digestif ainsi que celle qui sont excrétées par :

- La salive : alcaloïdes, amphétamines, mercure...
- Le suc gastrique : substances basiques (nicotine)
- La bile : voie d'élimination des dérivés conjugués et des substances de poids moléculaire élevé (au-delà de 400 daltons).

#### 2.3. Elimination pulmonaire

Elle permet l'élimination des toxiques gazeux ou volatils tels les hydrocarbures volatils (halogène ou non), les cyanures, les oxydes du carbone ...

Les composés très liposolubles stockés dans le tissu adipeux, peuvent être excrétés pendant de longues périodes après l'exposition, exemple ; l'halothane ou le méthoxyflurane, que l'on retrouve dans l'air expiré plusieurs semaines après une anesthésie.

#### 2.4. Autres voies d'élimination

- Elimination par la sueur, qui se fait par diffusion passive.
- la voie mammaire, qui permet l'élimination de substances liposolubles, tels que les insecticides organophosphorés et les carbamates, les pyréthrénoïdes, ou les métaux lourds.
- Les phanères (cheveux, poils, ongles), qui concerne des xénobiotiques minéraux (arsenic, plomb, etc.) ou organiques. Certaines substances comme le tabac, le cannabis, l'héroïne ou certaines formes de cocaïne, peuvent se déposer passivement à la surface du cheveu (figure 01).

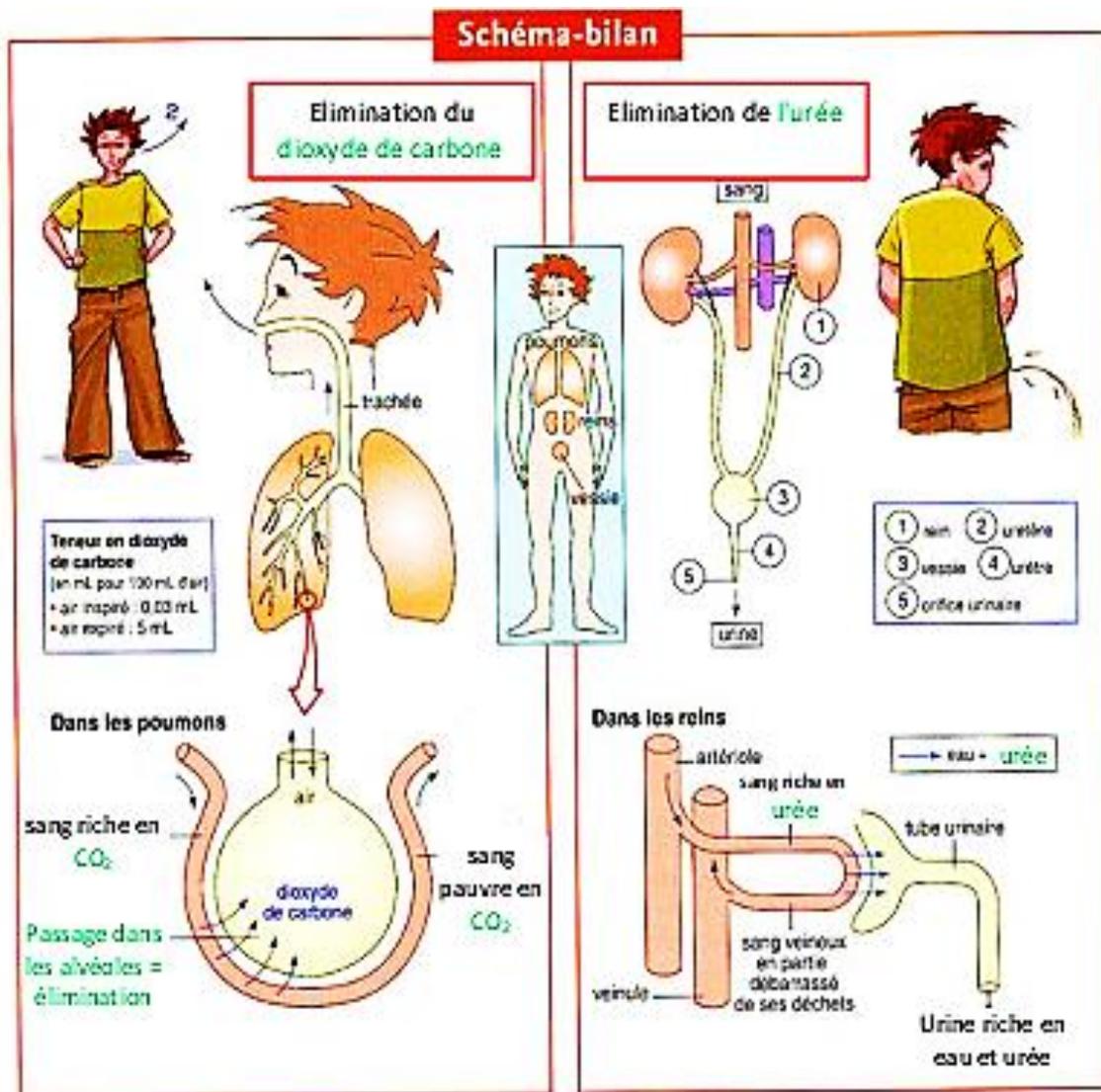


Figure 01 : Voies d'éliminations des xénobiotiques

## Chapitre IV. Besoins et spécificités analytiques en toxicologie

### 1. Introduction

L'identification des toxiques par l'analyse toxicologique constitue un point important, mais économiquement inadapté et doit être précédée par un examen clinique complet, anamnèse, électrocardiogramme et examen biologique de routine. Vu que les toxiques existent sous différentes catégories (gazeux, volatils ou entraînaibles, minéraux, extractibles par solvants), ils sont recherchés par des techniques particulières exemples :

- Les toxiques gazeux sont recherchés par des techniques applicables soit à l'analyse des atmosphères, soit à l'analyse des gaz du sang (monoxyde de carbone CO) ; gazométrie.
- Les toxiques volatils ou entraînaibles peuvent être isolés des matières biologiques qui les contiennent soit par simple distillation ou entraînement à la vapeur d'eau (à température inférieure à 100°C) ou à l'air chaud, soit par chromatographie gazeuse avec « espace de tête ; *head space* ». Les substances appartiennent à cette catégorie : des alcools, des aldéhydes, des hydrocarbures, des solvants chlorés, des phénols, des dérivés aminés et nitrés aromatiques, etc.
- Les toxiques minéraux qui sont des composés chimiques de nature non organique correspondant à des sels ou des complexes d'éléments minéraux, certains sont solubles dans l'eau (toxiques anioniques), d'autres non (toxiques cationiques).
- Parmi les toxiques anioniques on trouve ; hypochlorites, borates, chlorates, nitrites, nitrates, fluorure, bromures, iodures, cyanures, oxalates, sulfures, sulfates, phosphates, etc. les toxiques cationiques se trouvent des éléments métalliques (Pb, Hg, Cd, Ni, Bi, Al, Cr, Co, Sn, Mn, Zn...) et des non métaux (As, Se, Te, ..). la recherche de ces éléments nécessite le plus souvent la destruction préalable (partielle ou totale) de la matière organique qui les entoure dans les prélèvements biologiques ; opération de « minéralisation ». soit par une recherche de l'espèce chimique responsable de l'intoxication ; techniques dites de « spéciation ».
- Pour les toxiques extractibles par solvants non miscibles à l'eau (éther, chloroforme, dichlorométhane, hexane, etc), utilisés d'abord en milieu acide, puis en milieu alcalin, voire la neutralité ou à des pHpréalablement sélectionnés. Il est possible de procéder à des extractions « liquide-liquide »ou à des extractions « solide-liquide ». Passant dans les solvants en milieu acide : l'acide salicylique, les barbituriques et certains autres médicaments psychotropes, etc. Passant dans les solvants en milieu alcalin : les alcaloïdes en général et la plupart des bases organiques médicamenteuses.

Pour d'autres composés comme certains insecticides, des hétérosides (digitaliques), les bases puriques (caféine, théobromine, théophylline), c'est la nature du solvant organique mis en œuvre que le pH du milieu qui conditionne l'extraction.

## 2. Echantillons biologiques

Différents types de prélèvements peuvent être traités en toxicologie :

- Sang, cardiaque et périphérique, pour le dosage de l'alcool le sang doit être recueilli sur fluorure de sodium sous conditionnement étanche aux gaz ;
- Urine, contenu gastrique, bile ;
- viscères, tels quels : quelques grammes de chacun d'entre eux (foie, rein, poumon, cœur, cerveau) séparément ;
- Humeur vitrée ;
- Liquide de lavage gastrique ;
- Liquide céphalorachidien ;
- Liquide de putréfaction ;
- Prélèvement naso-pharyngés ;
- Sueur, prélevée par patch ou par frottement de la peau sur le vivant ;
- Salive, sur le vivant ;
- Vomissures, déjections, fragment d'os, dents, peau, etc. ;

Tous ces prélèvements doivent être conservés au congélateur jusqu'à l'analyse.

On peut rajouter, les phanères : les cheveux en particulier (environ une centaine), coupés de la racine à l'extrémité apicale, à défaut les poêles axillaires ou pubiens, les ongles ; ils seront conservés à température ambiante.

- Eventuellement, les échantillons qui peuvent provenir d'atmosphères suspectes ; l'air expiré, des échantillons de terre, des eaux, boissons, lait (maternels ou commerciaux), liquides, poudre et produits divers, aliments, etc.

## 3. Isolement des toxiques

### 3.1. Toxiques gazeux

Exemple le monoxyde de carbone (CO), est un gaz d'autant plus dangereux qu'il est incolore, inodore, insipide et non irritant, possède une très grande d'infusibilité (possibilité d'intoxication à distance). L'échantillon du sang doit être prélevé sur anti coagulant (fluorure de sodium, EDTA, héparine). Le dosage sanguin du CO se fait par deux méthodes à savoir :

- a- Celle qui s'intéresse à la carboxyhémoglobine (spectroscopie, spectrophotométrie, emploi d'un carboxymètre) ; les résultats des dosages sont exprimés en % de COHb.

b- Celle qui s'intéresse au monoxyde de carbone obtenu après dénaturation de COHb (méthode de boudène avec analyseur infrarouge, micro diffusion) ; les résultats des dosages sont exprimés en ml de CO pour 100 ml de sang.

### **3.2. Toxiques volatils ou entraînaables**

Ces toxiques peuvent être isolés des milieux biologiques par différentes techniques, dont le choix dépend pour beaucoup de la quantité de matière à traiter. Les quantités importantes d'échantillons subiront une distillation ou un entraînement à la vapeur d'eau. Les faibles quantités de matières subiront au besoin un prétraitement en vue d'une analyse par chromatographie en phase gazeuse.

### **3.3. Toxiques minéraux**

#### **3.3.1. Toxiques anioniques**

Le dosage est effectué sur le produit obtenu après macération dans l'alcool dilué et défécation des échantillons à traiter exemple ; les cyanures, les chlorates, les fluorures, les nitrites...

#### **3.3.2. Toxiques cationiques**

Le dosage des métaux « lourd » et non métaux nécessite une séparation préalable de la matière organique qui l'intègre. Les méthodes par calcination sont peu utilisées, car elles peuvent occasionner des pertes par volatilisation. On leur préfère les méthodes en veine liquide basées sur l'emploi d'acides forts.

### **3.4. Toxiques extractibles**

De nombreuses substances comme les toxiques organiques, certains médicaments, les pesticides, produits industriels etc., qui sont solubles dans les solvants organiques (éthanol, éther, chloroforme...), peuvent subir in vivo des biotransformations « conjugaisons », dont les conjugués formés sont hydrosolubles et facilement éliminables dans les urines ; la déconjugaison pourra être réalisée par hydrolyse modérée, enzymatique ( $\beta$ -glucuronidase, sulfatase, etc.) ou acide. Les techniques d'hydrolyse douce sont utilisées pour les liquides biologiques « sang, urine, bile, etc. ».

Deux méthodes sont utilisées selon les quantités des échantillons à traiter ; les techniques d'extraction directes utilisant des solvants, la méthode dite de Stas-Otto.

#### **3.4.1. Techniques d'extraction directes par solvants**

Ces extractions peuvent être faites à partir des liquides biologiques « sang, urine, etc. », ou d'un broyat de tissu ou organes. On distingue deux types d'extraction, liquide-liquide ou solide-liquide, alors que certains xénobiotiques nécessitent un prétraitement spécial avant l'extraction.

### 3.4.1.1. Extraction liquide-liquide

Centrifugation de l'échantillon à traiter puis addition d'un acide fixe ; acide tartrique ou autres « réaction acide », ou addition d'une base ; carbonate ou autres « réaction alcaline, ou encore addition d'un tampon approprié et cela selon la nature des toxiques à isoler. Les extractions peuvent être faites successivement en milieu acide et en milieu alcalin sur le même échantillon. Après addition d'un solvant organique « éther, chloroforme, etc. », le tube soumis à une agitation mécanique suffisamment longue pour assurer un bon épuisement. Après centrifugation la phase organique est récupérée et le solvant est évaporé sous vide, ou au bain marie à 40°C sous courant d'azote. Ce protocole est applicable après hydrolyse acide ou enzymatique des conjugués. Et les dosages sont effectués sur les résidus d'évaporation, après reprise par un solvant adéquat. Les extractions liquide-liquide peuvent être réalisées par le dichlorométhane, suivie de l'analyse par chromatographie gazeuse ou liquide à haute performance.

### 3.4.1.2. Extraction solide-liquide

Elles peuvent être pratiquées sur les liquides biologiques en particulier le sang total. L'échantillon est soumis à un pH déterminé à la surface d'une cartouche spéciale. Après absorption, l'addition d'un solvant approprié assure l'élution des xénobiotiques éventuellement présent dans l'échantillon. Cette technique réalise en même temps une purification. L'éluat qui s'écoule en bas de colonne, est soumis à analyse, au besoin après évaporation. L'analyse est faite par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

### 3.4.2. Méthode de Stas-Otto

C'est en 1851, le chimiste belge, fut amené à mettre au point une méthode de recherche des alcaloïdes dans les viscères à l'occasion d'une expertise d'empoisonnement criminel par la nicotine. Le procédé fut par la suite modifié par Otto, puis par d'autres toxicologues. Il comporte :

- La préparation d'une solution extractive après broyage et homogénéisation de la matière biologique à examiner et addition d'éthanol à 95° et l'acide tartrique en solution concentrée (1.5 de leur volume), puis incubation à une température de 50-60°C pendant 12 heures. Après filtration les alcaloïdes se trouvent dans le filtrat alors que les toxiques solubles sont dans l'éthanol en milieu tartrique. L'éthanol ensuite est évaporé sous une pression réduite à une basse température (purification est renouvelée deux fois ; addition de l'éthanol à 95°, filtration et évaporation de l'éthanol). Le liquide acide obtenu est généralement trouble, il faut éviter de filtrer en raison de l'existence de toxiques insolubles dans l'acide.

- La solution extractive purifiée est agitée en présence d'éther. Après décantation, la couche étherée est prélevée (plusieurs fois), les phases étherées sont déshydratées par l'utilisation de sulfate de sodium anhydre et filtrées sur papier sec, cette solution est appelée éther acide. Cet éther acide est additionné d'une solution alcaline (carbonate monosodique ou monopotassique concentrée) jusqu'à l'alcalinité. On obtient une deuxième phase étherée appelée ; éther alcalin.

NB : pour l'extraction de la morphine, il faut éviter d'utiliser la soude ou la potasse comme alcalinisant (il se forme alors un phénolate soluble dans l'eau et non extractible), on utilisera alors l'ammoniaque ou un carbonate, et un mélange de chloroforme et d'un alcool (isopropanol) comme solvant d'extraction. Les phases solvantes obtenues servent à l'identification des toxiques par différentes techniques : colorimétriques, chromatographiques, spectrophotométriques.

## Chapitre V. Principales méthodes analytiques

### 1. Méthodes de séparation, d'analyse et de dosage des molécules

#### 1.1. Introduction

La détection d'une biomolécule (protéine, acide aminé, sucre, acide nucléique, acide gras, vitamine, enzyme, hormone, lipide.....), ou d'un xénobiotique ainsi que l'évaluation de sa concentration ou de sa quantité peuvent être faites à l'aide d'instruments d'analyse tels que : les spectromètres, les chromatographes,.....). Les méthodes générales d'analyse biologiques sont les méthodes d'extraction et de séparation. Les méthodes de séparation en biologie exploitent les propriétés physico-chimiques des molécules (solubilité, charge électrique, volatilité....) selon le tableau 01.

**Tableau 01** : techniques de séparation des molécules selon leurs propriétés physico-chimiques.

Caractères moléculaire	Propriété physico-chimique	Techniques de séparation appropriée
<b>Polarité</b>	Volatilité	Chromatographie gaz-liquide
	Solubilité	Chromatographie liquide-liquide
	Adsorption	Chromatographie solide-liquide
<b>Ionicité</b>	Charge électrique	Chromatographie d'échange d'ions
		Electrophorèse
<b>Taille</b>	Diffusion	Chromatographie d'exclusion
		Dialyse
<b>Forme</b>	Sédimentation	Centrifugation- ultracentrifugation
	Fixation de ligands	Chromatographie d'affinité

#### A. Classification des techniques d'analyses :

Les méthodes d'analyses biologiques peuvent être classées de diverses manières :

- ✓ **Selon le type de la méthode** : méthode quantitative ou qualitative.
- ✓ **Selon l'automatisme** : analyse manuelle ou automatique
- ✓ **Selon la quantité d'échantillon utilisée** : macro ou microanalyte.
- ✓ **Selon le type de la molécule à doser** : gazeuse, volatile, minérale, ...

#### B. Critères de choix d'une méthode d'analyse :

La méthode utilisée doit être choisie selon les critères suivants :

- a. **La fiabilité** : c'est l'étude scientifique des qualités d'une méthode ou d'un appareil (confiance).

- b. La reproductibilité :** c'est –à-dire que pour la même méthode et après x répétitions (répétabilité), on trouve les mêmes résultats. Les calculs statistiques qui nous permettent de dire qu'il existe une différence significative ou non entre les valeurs obtenues.
- c. La sensibilité**  
Elle définit :
- D'une part un seuil de détection, c.à.d. la plus petite quantité de la substance à examiner pouvant être décelée dans un échantillon biologique, mais non quantifiée comme une valeur exacte.
  - D'autre part un seuil de quantification, c.à.d. la plus petite quantité de la substance à examiner pouvant être dosée dans un échantillon biologique dans les conditions expérimentales.
- d. La spécificité et sélectivité :** (exprimée en %) c.à.d. que la méthode ne dose effectivement que la molécule que l'on veut doser.
- e. La rapidité :** elle dépend de la durée et des étapes d'analyse.
- f. Coûts de l'analyse :** on choisit la méthode économique qui ne nécessite pas plusieurs réactifs.
- g. La praticabilité :** la praticabilité peut se définir comme l'aptitude d'une méthode (ou d'un appareil) à être réalisée (ou utilisée) par un biologiste donné, dans un laboratoire donné et dans des conditions données.

## 1.2. Techniques chromatographiques

Les méthodes chromatographiques regroupent des techniques très variées qui peuvent être classées selon trois modalités différentes :

### 1.2.1. Classification selon la nature des phases :

- La phase mobile est un fluide, donc soit un liquide, soit un gaz (soit encore un fluide "supercritique")
- la phase stationnaire est soit un solide, soit un liquide.

La combinaison de ces possibilités conduit à diverses possibilités :

- chromatographie liquide-solide (LSC)
- chromatographie liquide-liquide (LLC)
- chromatographie gaz-solide (GSC ou GC)
- chromatographie gaz-liquide (GLC ou GC)
- la chromatographie supercritique (SFC).

La SFC représente un cas intermédiaire entre LC et GC, les fluides supercritiques possédant des propriétés à la frontière entre celles des liquides et celles des gaz.

#### 1.2.1.1. Classification selon le phénomène chromatographique :

Ce dernier dépend de la nature (et de la structure) de la phase stationnaire utilisée. On distinguera donc :

- **la chromatographie d'adsorption** (LSC, GSC) (lorsque la phase stationnaire est un solide); par extension on pourrait y rattacher la **chromatographie d'affinité**, qui correspond à un cas où les propriétés d'adsorption de la phase stationnaire sont spécifiques vis-à-vis d'un (ou une famille de) composé(s).
- **la chromatographie de partage** (LLC, GLC), lorsque la phase stationnaire est un liquide non miscible avec la phase mobile (mise en jeu de coefficients de partage).
- **la chromatographie d'échange d'ions** (IEC), où la phase stationnaire porte des groupes fonctionnels acides ou basiques, destinée à séparer des composés ionisés.
- **la chromatographie d'exclusion** (SEC) où la phase stationnaire (poreuse) se comporte comme un tamis et sépare les composés en fonction de leur taille ; on parle aussi de chromatographie de perméation de gel (GPC)

#### 1.2.1.2. Classifications selon les procédés utilisés :

- Selon le conditionnement de la phase stationnaire, on distinguera :
    - la chromatographie sur **colonne** (y compris systèmes à contre-courant)
    - la chromatographie sur **papier**.
    - la chromatographie sur **couche mince**.
  - Selon les modalités de migration de la phase mobile, on distinguera
    - La **chromatographie par développement** (les constituants de l'échantillon restent sur la phase stationnaire)
    - La **chromatographie d'élution** (les substances sont entraînées hors de la phase stationnaire).
- Les méthodes chromatographiques, bien que très diverses, mettent en jeu un certain nombre de principes communs :*
- les substances se répartissent entre deux phases non miscibles, selon un **équilibre** lié à un **coefficient de partition**, qui dépend à la fois de la nature des composés et de celle des deux phases considérées ;*

- le renouvellement continu de la phase mobile remet en cause cet équilibre et entraîne une succession d'autres équilibres, ce qui se traduit par une **migration** des substances le long de la phase stationnaire ;

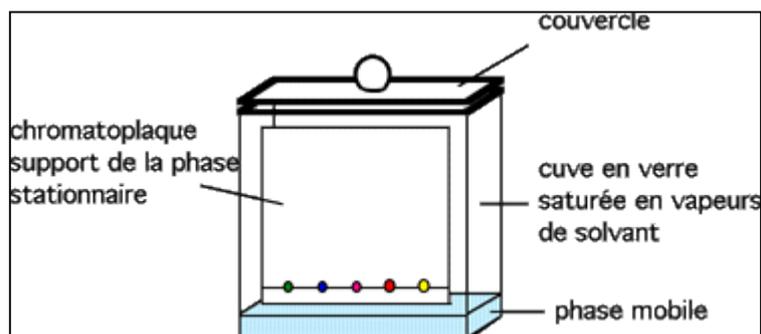
- la **séparation** est obtenue car chaque composé migre avec une vitesse qui lui est propre (et dépend du coefficient de partition décrit ci-dessus).

### 1.2.2. Chromatographie sur couches minces (CCM)

La chromatographie sur couche mince est une méthode d'analyse plus simple et plus fiable et ne nécessite pas un appareillage sophistiqué et peu coûteuse elle offre la possibilité de traiter un grand nombre d'échantillons. Elle a remplacé la chromatographie sur papier en raison de sa grande performance. La CCM est également appelée TLC (Thin Layer Chromatography), lorsqu'elle utilise des supports plus performants (composés de microparticules) sous le nom HPTLC.

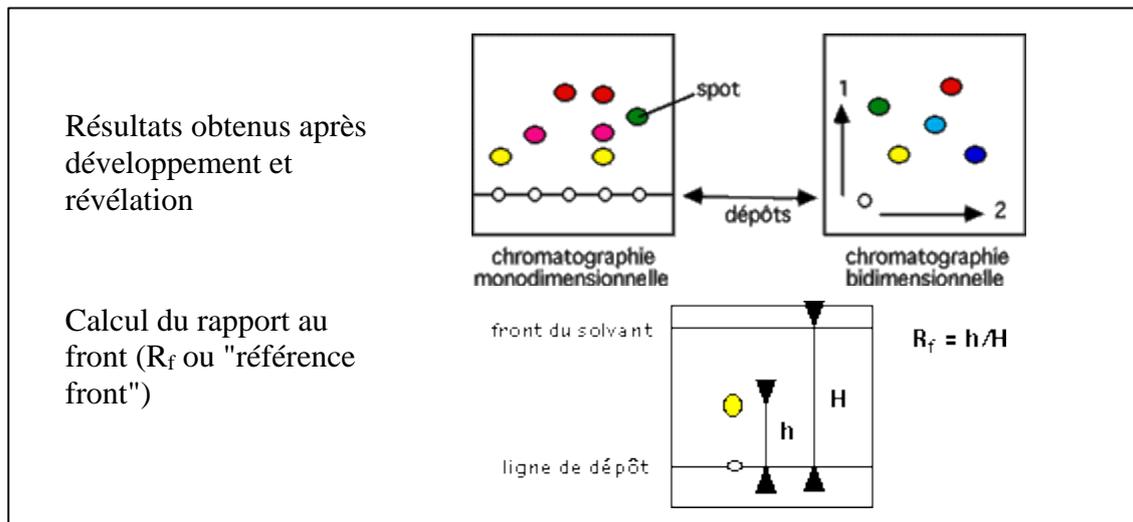
La méthode est basée sur l'utilisation de deux phases :

- **Phase stationnaire** : les supports utilisés sont variés :
  - silice, cellulose,
  - support imprégné ou greffé (phase inverse)
  - échangeurs d'ions,
  - micro-soutports (HPTLC)
- **Phase mobile** : tampon, selon la figure 01.



**Figure 01.** Chromatographie sur couche mince.

La CCM est une technique qualitative et quantitative, la révélation des spots se fait soit par une réaction colorée, soit par fluorescence. L'identification des constituants du mélange se fait par comparaison avec des témoins, en calculant le rapport au front ( $R_f$ ) de chaque soluté, ou encore le rapport à un témoin ( $R_t$ ) lorsque le solvant a dépassé le niveau supérieur de la plaque (figure 02).



**Figure 02.** Identification des constituants de mélange

L'analyse qualitative peut faire appel à un appareillage sophistiqué, qui permet de déterminer par exemple le spectre d'absorption, de fluorescence ou de masse de chaque spot. L'analyse quantitative des spots, se fait par :

- **Planimétrie** : évaluation de la surface du spot, dont le log est proportionnel à la quantité de soluté
- **Elution** : découpage ou grattage puis mise en solution dans un solvant approprié et dosage colorimétrique
- **Densitométrie** : mesure directe de l'absorbance du spot sur la plaque par des appareillages plus ou moins automatisés.
- On peut également mesurer la radioactivité grâce à un détecteur approprié.

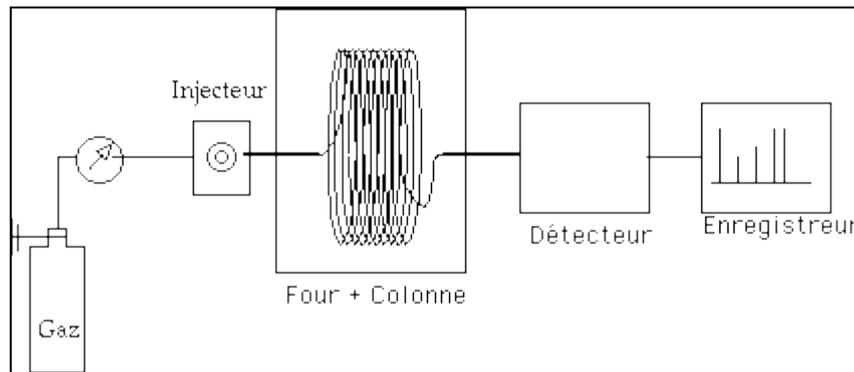
### 1.2.3. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Cette méthode permet de séparer des mélanges gazeux par suite d'équilibres entre deux phases :

- une phase stationnaire qui peut être soit liquide (chromatographie de partage ; GLC), soit solide (chromatographie d'adsorption ; GSC)
- une phase mobile : un gaz ou mélange de gaz

La méthode s'adresse à des molécules volatiles naturellement ou des molécules rendues volatiles par des réactions de **dérivatisation** (à des températures ne provoquant pas leur décomposition). Les différents composants du chromatographe sont indiqués dans la figure 03. Les détecteurs peuvent être :

- Non spécifiques : catharomètre, détecteur à ionisation de flamme, photomètre de flamme
- Spécifiques : détecteur thermo ionique, par capture d'électrons, spectromètre de masse

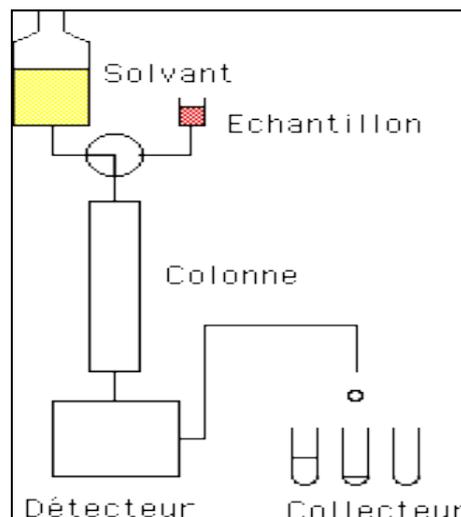


**Figure 03.** Chromatographie en phase gazeuse

#### 1.2.4. Chromatographie liquide (LC - HPLC)

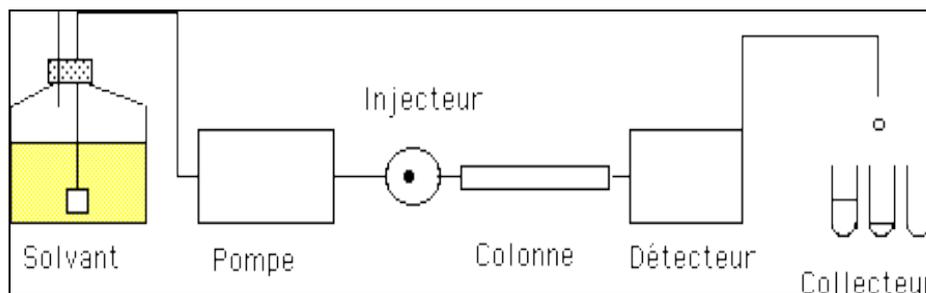
Il existe deux types de chromatographie liquide à savoir :

- La chromatographie liquide à basse pression « LC », celle-ci ne nécessite pas un appareillage sophistiqué c'est tout simplement une colonne de verre remplie de particules de phase stationnaire, le solvant migre sous l'effet de la pesanteur. Bien que la résolution obtenue soit relativement faible, cette technique est couramment utilisée à raison de son faible cout (figure 04).



**Figure 04.** Chromatographie liquide à basse pression

- La chromatographie liquide à haute performance/pression « HPLC », c'est une méthode de séparation chromatographique très développée à raison de l'utilisation des granules homogènes de très petites tailles permettant de réaliser des colonnes résistantes au passage de solvant, ce qui implique la nécessité d'employer des pompes à haute pression pour pousser les solvants (et des tubes résistants pour y mettre les phases stationnaires) selon la figure 05.

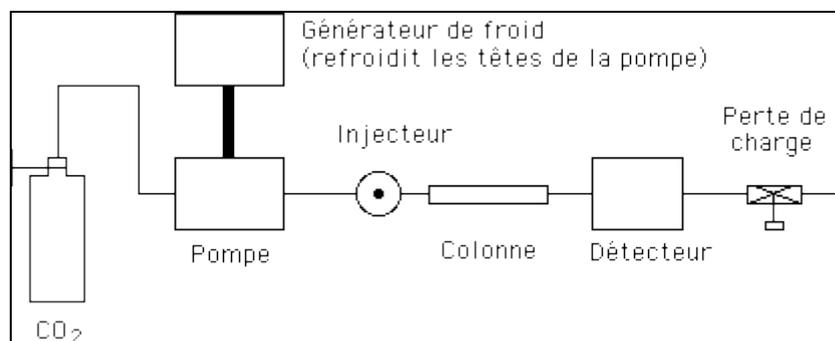


**Figure 05.** Chromatographie liquide à haute performance « HPLC »

### 1.2.5. Chromatographie supercritique (SFC)

La chromatographie supercritique est une méthode de séparation intermédiaire entre la chromatographie gazeuse « GC » et la chromatographie liquide « LC », elle est basée sur l'utilisation d'une phase mobile qui correspond à un liquide compressible de très faible viscosité « fluide supercritique », obtenu par compression à basse température et à très haute pression en utilisant une pompe d'HPLC à têtes réfrigérées et un gaz comme le  $\text{CO}_2$ . La faible viscosité du solvant (phase mobile), permet l'augmentation du débit sans influencer sur la séparation qui peut s'effectuer en quelques minutes à quelques dizaines de minutes (figure 06).

La chromatographie supercritique est également utilisée pour l'extraction des substances biologiques à partir d'échantillons bruts (ex. l'extraction des substances à intérêt pharmacologique - ou procédé de préparation du café décaféiné).



**Figure 06.** Chromatographie supercritique

Ce type de chromatographie permet l'emploi de très nombreux types de détecteurs à savoir :

- Les détecteurs de la GLC (ex. ionisation de flamme).
- Les détecteurs de la HPLC (UV, spectrophotométrie).
- Les couplages avec la spectrométrie de masse ou la spectrométrie infrarouge.

### 1.3. Techniques électrophorétiques

**1.3.1. Définition :** L'électrophorèse est une méthode de séparation de particules chargées électriquement par migration différentielle sous l'action d'un champ électrique grâce à l'utilisation d'un support poreux imprégné d'un solvant tamponné.

Les supports utilisés sont soit du papier, de l'acétate de cellulose, du gel de polyacrylamide du gel d'agarose, du gel d'amidon, du gel de silice, ...

On peut procéder sur bande (papier, acétate de cellulose), sur lame ou en tube (gels)

**1.3.2. Principes de la migration électrophorétique :** la migration électrophorétique dépend de la charge et de la géométrie de la particule. Une particule de charge électrique  $Q$ , placée dans un champ électrique  $E$ , est soumise à une force  $F$  qui l'entraîne vers l'électrode de signe opposé.

La charge  $Q$  est en fonction du pH isoélectrique de la particule et du pH du solvant : on appelle pH isoélectrique d'une particule ( $pH_i$  ou  $pI$ ) le pH pour lequel cette particule ne migre pas dans un champ électrique (ceci est une définition expérimentale).

- **La différence pH -  $pH_i$  détermine le signe de la charge  $Q$  d'une particule :**

si $pH > pH_i$	charge nette négative (anion)	migration vers l'anode
si $pH < pH_i$	charge nette positive (cation)	migration vers la cathode
si $pH = pH_i$	charge nette nulle	pas de migration
- **La différence pH -  $pH_i$  détermine l'intensité de la charge  $Q$  d'une particule :** plus cette différence est grande en valeur absolue, plus la charge est importante.

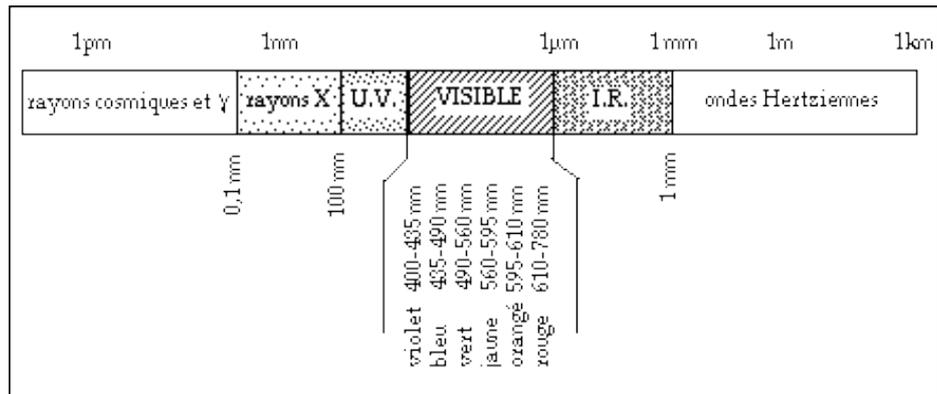
#### 1.3.3. Applications

L'électrophorèse permet la séparation de molécules chargées : protéines, peptides, acides aminés, acides nucléiques et nucléotides. Elle permet dans certaines conditions (emploi de micelles de détergents ioniques comme le SDS) de séparer des molécules non ioniques, comme des hormones stéroïdes par exemple.

### 1.4. Techniques spectroscopiques

#### 1.4.1. Spectrométrie uv- visible

La technique est basée sur la propriété de la matière, et plus particulièrement de certaines molécules, d'absorber certaines longueurs d'ondes du spectre UV-visible. Elle permet de réaliser des dosages grâce à la **loi de Beer-Lambert** qui montre une relation de proportionnalité entre l'absorbance et la concentration, aussi bien qu'une étude structurale des complexes par l'étude des spectres d'absorption. Le domaine UV s'étale entre 10 et 400 nm mais la plupart des spectroscopes ont comme limites 190 à 400 nm. De plus, ces appareils permettent aussi d'accéder aux longueurs d'ondes visibles, entre 400 et 750 nm (figure 07).



**Figure 07.** Domaines spectrales

Les deux grandeurs caractéristiques d'une molécule en spectroscopie UV-visible seront sa longueur d'onde d'absorption maximale ( $\lambda_{\max}$ ) et son coefficient d'absorption ( $\epsilon_{\max}$ ) à  $\lambda_{\max}$  donné. Précisons que le  $\lambda_{\max}$  correspond à la longueur d'onde la mieux absorbée par la molécule, et  $\epsilon_{\max}$  l'aptitude plus ou moins importante à absorber les photons à cette longueur d'onde.

#### 1.4.2. Principe du spectrophotomètre et lois générales :

Elle est basée sur l'absorption des radiations lumineuses par l'usage de la lumière pour mesurer une concentration qui est proportionnelle à l'absorption de la lumière. Cette lumière comprend des particules d'énergie discrète : le photon (modèle de Bohr) : quand un électron saute d'une orbite de plus haute énergie à une de plus basse énergie. L'énergie de ce photon est un multiple entier (quantification) de la valeur  $h\nu$ , ou  $\nu=c/\lambda E$  :

$$\Delta E = h\nu = hc/\lambda$$

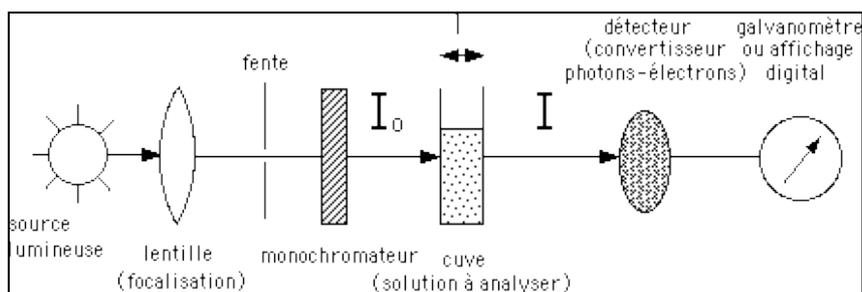
*E*: énergie de la radiation

*h*: constante de Planck  $h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$

*c*: vitesse de la lumière  $c = 2,998 \cdot 10^8 \text{ m/s}$ ,

$\lambda$ : longueur d'onde

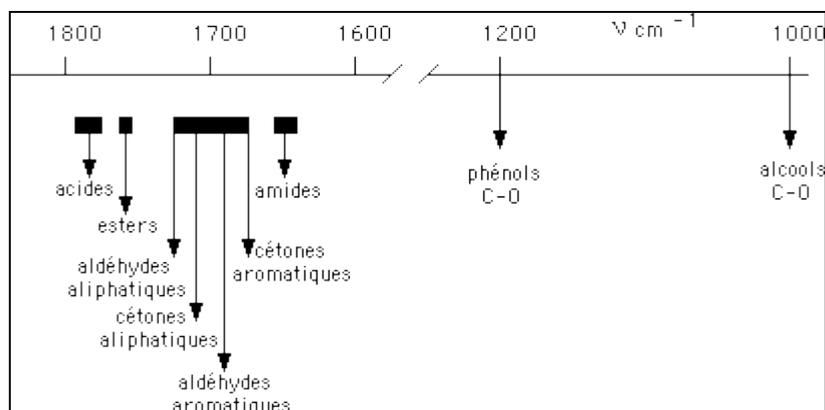
NB: plus la fréquence,  $\nu$ , est élevée, plus son énergie est importante et plus la couleur tend vers le bleu



**Figure 08.** Émission des photons

### 1.5. Spectrométrie IR

Il s'agit d'une méthode essentiellement qualitative, qui permet d'obtenir des informations structurales, ou pour tester la pureté d'une substance. Les différentes fonctions chimiques présentes sur une molécule donnée sont responsables de bandes d'absorption caractéristiques.



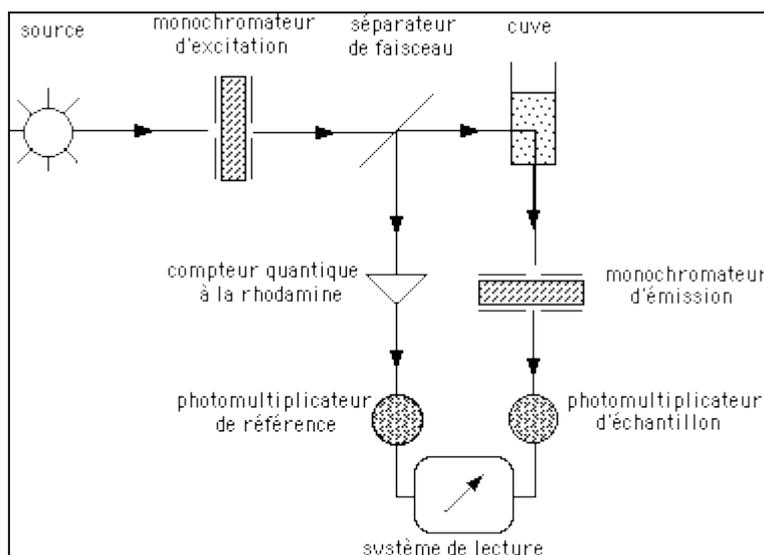
**Figure 09.** L'absorption dans l'infra rouge

*Exemples de valeurs des vibrations de valence ( $\nu$  C=O ou C-O) de carbonyles, carboxyles et dérivés divers ( $\nu$  = nombre d'onde =  $1/\lambda$ ).*

Les spectres d'absorption IR sont caractérisés par de faibles coefficients d'absorption molaire (compris entre 10 et 1500) : la méthode est donc peu sensible mais il existe maintenant des appareils dits « à transformée de Fourier » qui permettent l'accumulation et le moyennage de spectres successifs d'un même échantillon. En augmentant le temps d'accumulation, on arrive alors à obtenir des spectres avec de très faibles quantités de substance. Les spectres sont obtenus à partir de molécules à l'état gazeux, liquide (à l'état pur ou en solution dans des solvants « transparents » –  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CS}_2$  ou huile de paraffine, ou solide (pastillage dans du KBr).

### 1.6. Spectrofluorométrie

Les substances absorbant de l'énergie se trouvent alors « excitées » et elles doivent ensuite reperdre cette énergie. Ceci se fait le plus souvent sous forme de chaleur mais, dans certains cas, ce retour à l'état initial est lent et la substance peut alors émettre à son tour un photon (de plus basse énergie, donc de longueur d'onde plus élevée que celle de la lumière excitatrice). Ceci se manifeste plus particulièrement avec les substances possédant des cycles polyinsaturés. Les polycycles aromatiques (naphtalène, anthracène,...) et certains hétérocycles (coumarines, indoles,...) sont parmi les composés les plus fluorescents.



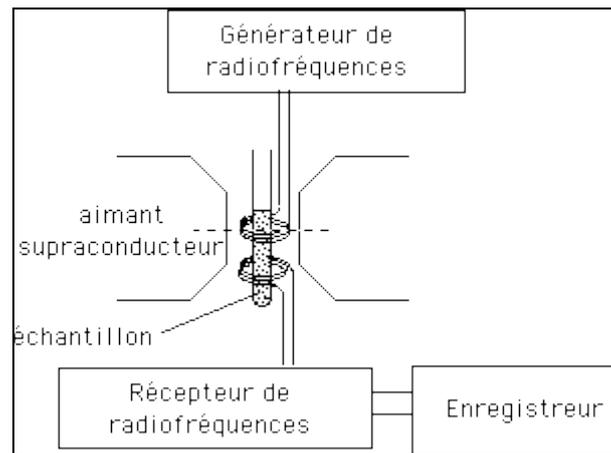
**Figure 10.** Spectro-fluorométrie

### 1.6.1. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une méthode destructive, qui permet à la fois d'accéder à la mesure de la masse moléculaire d'une substance ainsi que d'obtenir des données structurales : la substance ionisée se trouve dans un état excité qui provoque sa fragmentation. L'analyse de ces fragments informe sur la structure de la molécule. Chacun des ions formés est caractérisé par son rapport masse/charge ( $m/z$ ) et l'appareil est capable de séparer ces ions (par un champ magnétique) et de les détecter/caractériser (qualitativement et quantitativement).

### 1.6.2. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Cette technique, qui utilise les propriétés de résonance des atomes placés dans un champ magnétique, est particulièrement puissante. Le principe de cette méthode est basé sur l'utilisation d'un champ magnétique pour orienter les spins nucléaires des atomes, l'excitation des spins par une onde radio à la fréquence de résonance permet de basculer certains spins, ces spins excités reviennent à leur état initial, mais ceci n'est pas instantané cette relaxation dépend d'une composante appelée spin-réseau (interaction des spins avec les autres atomes) et d'une composante spin-spin (interaction entre les spins). Le spin nucléaire se définit comme la résultante des moments cinétiques (= rotation sur eux-mêmes) des protons + neutrons (= nucléons) d'un atome. A ce spin nucléaire est associé un nombre quantique  $I$ . La RMN concerne essentiellement les noyaux avec un nombre de spin =  $1/2$  ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ). Cette méthode permet, à condition de disposer d'une substance parfaitement pure et en quantité suffisante, d'aboutir à la détermination complète des structures avec en particulier la stéréochimie des liaisons entre atomes. Il est possible d'utiliser la RMN du proton ( $^1\text{H}$ -RMN), celle du carbone ( $^{13}\text{C}$ -RMN) ou celle du phosphore ( $^{31}\text{P}$ -RMN).



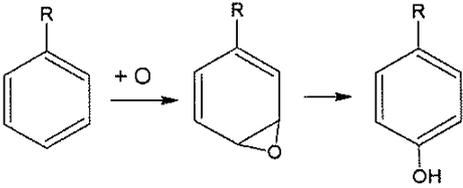
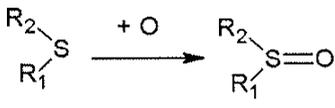
**Figure 11.** Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire

## RÉFÉRENCES

- [1]. Maitre, M., & Blicklé, J.-F.. Métabolismes hépatiques. EMC - Hépatologie, 2008; 3:1-16.
- [2]. Badawi AF, Stern SJ, Lang NP, Kadlubar FF. Cytochrome P-450 and acetyltransferase expression as biomarkers of carcinogen- DNA adduct levels and human cancer susceptibility. *Prog Clin Biol Res* 1996; 395: 109-40.
- [3]. Beaune PH. Les cytochromes P450 humains : applications en toxicologie. *Med Ther* 1999; 4: 18-38.
- [4]. Déloménie C, Grant DM, Krishnamoorthy R, Dupret JM. Les arylamines N-acétyltransférases : du polymorphisme génétique à la susceptibilité aux xénobiotiques. *Med Sci* 1998; 14: 27-36.
- [5]. Evans DA, Manley KA, McKusik VA. Genetic control of isoniazid metabolism in man. *Br Med J* 1960; 2: 285-91.
- [6]. Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 1999; 286: 487-91.
- [7]. Gonzalez FJ, Skoda RC, Kimura S. Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature* 1989; 331: 442-6.
- [8]. Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci* 1999 ; 20 : 342-9.
- [9]. Ingelman-Sundberg M. Duplication, multiduplication, and amplification of genes encoding drug-metabolizing enzymes : evolutionary, toxicological, and clinical pharmacological aspects. *Drug Metab Rev* 1999 ; 31 : 449-59.
- [10]. Keppler D. Export pumps for glutathione S-conjugates. *Free Radic Biol Med* 1999 ; 27 : 985-91.
- [11]. Krynetski EY, Evans WE. Pharmacogenetics as a molecular basis for individualized drug therapy : the thiopurine S-methyltransferase paradigm. *Pharm Res* 1999 ; 16 : 342- 9.
- [12]. Maghoub A, Idle JR, Dring LG, Lancaster R, Smith RL. Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man. *Lancet* 1977 ; 2 : 584- 6.
- [13]. Meyer R. et Denier C. Spectroscopie pratique dans le domaine du visible et de l'ultraviolet - *Bull. Un. Phys.*, 1996 ; 784, p. 895-908.
- [14]. Nebert DW, Ingelman-Sundberg M, Daly AK. Genetic epidemiology of environmental toxicity and cancer susceptibility : human allelic polymorphisms in drug-metabolizing enzyme genes, their functional importance, and nomenclature issues. *Drug Metab Rev* 1999 ; 31 : 467-87.
- [15]. Nebert DW, Roe AL, Dieter MZ, Solis WA, Yang Y, Dalton TP. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 65-85.
- [16]. Ronis MJ, Ingelman-Sundberg M. Induction of human drug metabolizing enzymes: mechanisms and implication. In: *Handbook of drug metabolism*, Thomas F. Woolf, Marcel Dekker Eds, New York, 1999: 239-62.
- [17]. Stieger B, Meier PJ. Bile acid and xenobiotic transporters in liver. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 462-7.
- [18]. Whitlock JP Jr. Induction of cytochrome P4501A1. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39: 103-25.
- [19]. Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T. Molecular diagnosis of thiopurine Smethyltransferase deficiency : genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Ann Int Med* 1997; 126: 608-14.

## Travaux Dirigés (TD)

Complétez le Tableau suivant sur les réactions catalysées par les enzymes du Cyp450 et citez des exemples sur chaque substrat :

Réaction	Mécanisme	Exemples
Hydroxylation aromatique		phénytoïne, phénobarbital, propranolol
Hydroxylation aliphatique	$\text{R}-\text{CH}_2\text{CH}_3 \xrightarrow{+\text{O}} \text{R}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}\text{CH}_3$	tolbutamide, ibuprofène, pentobarbital
N-desalkylation	$\text{R}-\text{NH}-\text{CH}_3 \xrightarrow{+\text{O}} \text{R}-\text{NH}_2 + \text{CH}_2\text{O}$	imipramine, diazépam, codéine
O-desalkylation	$\text{R}-\text{O}-\text{CH}_3 \xrightarrow{+\text{O}} \text{R}-\text{OH} + \text{CH}_2\text{O}$	codéine, indométhacine
N-oxydation	$\text{R}-\text{NH}_2 \xrightarrow{+\text{O}} \text{R}-\text{NH}-\text{OH}$	chlorphéniramine
S-oxydation		quinidine
Désamination	$\text{R}-\text{CH}_2-\text{NH}_2 \xrightarrow{+\text{O}} \text{R}-\text{CHO} + \text{NH}_3$	diazépam, amphétamines

- quantitatifs, qualitatifs (identification)
- Spectroscopies, HPLC, GC, spectrométrie de masse et couplage, RMN.
- Utilisation en toxicologie
- Le pré- analytique en toxicologie: échantillons, matrices.

**Introduction****Chapitre I. Xénobiotiques et Métabolisme**

1. Définitions .....	2
2. Métabolisme des xénobiotiques .....	2
2.1. Métabolisme de phase I ou de fonctionnalisation .....	5
2.1.1. Oxydations.....	5
2.1.2. Réduction: .....	7
2.1.3. Hydrolyse : .....	8
2.2. Métabolisme de phase II ou de conjugaison.....	8
2.2.1. Glucurono-conjugaison .....	8
2.2.2. Conjugaison au glutathion.....	9
2.2.3. Sulfo-conjugaison.....	10
2.2.4. Méthylation .....	11
A) Phase III de métabolisme (transport et élimination) .....	13
B) Induction et répression des enzymes du métabolisme des xénobiotiques .....	13
C) Cibles de métabolisme des xénobiotiques.....	14

**Chapitre II : Organes intervenants dans le métabolisme des médicaments**

1. Le Foie.....	15
1.1. Rôle principal : .....	15
1.2. Organisation : .....	15
2. L'appareil respiratoire .....	17
2.1. Rôle principal : .....	17
2.2. Organisation : .....	17
3. Appareil urinaire.....	18
3.1. Rôle principal : .....	18
3.2. Organisation : .....	19
3.3. Rôle des reins dans la métabolisation des xénobiotiques :.....	19
1. Voies d'absorption des xénobiotiques.....	21
1.1. Voie digestive.....	21
1.2. Voie hépatique.....	21
1.3. Voie pulmonaire .....	21
1.4. Voie rénale .....	22
2. Voies d'élimination des xénobiotiques .....	22
2.1. Élimination rénale .....	22
2.2. Élimination digestive.....	22
2.3. Élimination pulmonaire .....	22
2.4. Autres voies d'élimination .....	23

**Chapitre IV. Besoins et spécificités analytiques en toxicologie**

1. Introduction .....	24
2. Echantillons biologiques .....	25
3. Isolement des toxiques .....	25
3.2. Toxiques volatils ou entraînaibles .....	26
3.3. Toxiques minéraux .....	26
3.4. Toxiques extractibles.....	26
3.4.1. Techniques d'extraction directes par solvants.....	26
3.4.2. Méthode de Stas-Otto.....	27

**Chapitre V. Principales méthodes analytiques**

1. Méthodes de séparation, d'analyse et de dosage des molécules.....	29
1.1. Introduction .....	29
1.2. Techniques chromatographiques .....	30
1.2.1. Classification selon la nature des phases :.....	30
1.2.2. Chromatographie sur couches minces (CCM).....	32
1.2.3. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) .....	33
1.2.4. Chromatographie liquide (LC - HPLC).....	34
1.2.5. Chromatographie supercritique (SFC).....	35
1.3. Techniques électrophorétiques .....	36
1.4. Techniques spectroscopiques .....	36
1.5. Spectrométrie IR.....	38

**Travaux dirigés****Références**