



Université Sidi Mohamed Ben Abdellah
Faculté des Sciences et Techniques de Fès
Département des Sciences de la Vie



PROJET DE FIN D'ETUDES

Licence de Biologie & Santé

Présenté le : 17 JUIN 2010

Par : Mlle. Fatima Zahra HMADOUCH

Dosage de la Paracétamolémie en cas d'intoxication par HPLC-DAD

Encadrement: **Pr. Sanae ACHOUR**
Pr. Rachid BENCHEIKH

Membres du jury:

-  Président : Pr. BENCHEIKH. R.
-  Encadrant : Pr. ACHOUR. S.
-  Examinatrice : Pr. Benchemsi. N.
-  Examineur : Dr. El Attari. A.

Année Universitaire 2009-2010

اعوذ بالله من الشيطان الرجيم

بسم الله الرحمن الرحيم

سُبْحَانَكَ لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا مَا عَلَّمْتَنَا
إِنَّكَ أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ

صدق الله العظيم

سورة البقرة الآية: 31

DEDICACES

A mes Merveilleux Parents

Puisse ce Projet symboliser le fruit de vos longues années de sacrifices consentis pour mes études et mon éducation, et témoigner l'amour et l'affection que je nourris à votre égard.

Puisse dieu tout puissant vous accorder meilleure Santé et longue vie.

A Mes Frères et Sœurs

En témoignage de l'attachement et l'amour qui nous unissent, je souhaite à chacun une vie pleine de succès et de bonheur.

A toute ma Famille

Trouver ici l'expression de ma tendresse et de mon affection inaltérable.

A toutes Mes Fidèles Amies

A travers ce travail, je vous remercie toutes et je vous souhaite la réussite aussi bien dans votre vie familiale que professionnelle.

REMERCIEMENTS

Pr. BENCHEIKH Rachid

Chef du Département des Sciences de la Vie

FS7-FES

C'est pour moi un immense plaisir que vous acceptiez l'encadrement de ce travail.

Nous avons toujours été marqués par vos qualités humaines et l'étendue de vos connaissances.

Nous vous exprimons notre reconnaissance, notre grande admiration et profond respect.

Pr. ACHOUR Sanae

Professeure assistante en Toxicologie

Laboratoire central d'analyses médicales- Unité de

Pharmaco-toxicologie CHU-Hassan II de FES

Vous n'avez épargné aucun effort pour me soutenir tout au long de ce travail et vous m'avez beaucoup aidé à son élaboration par vos précieux conseils.

Que ce travail, si modeste qu'il soit, puisse être message de mes sentiments les plus respectueux et de ma sincère reconnaissance.

- ❖ *Tous mes enseignants de la FS7-FES*
- ❖ *Pr. Benchemsi qui a bien accepté d'examiner ce travail, ses observations et ses remarques contribueront à enrichir ce mémoire. Je vous exprime ici ma gratitude et mon profond respect.*
- ❖ *Dr. EL ATTARI Ahmed Pour tous vos précieux conseils, en témoignage de ma gratitude pour l'aide précieuse que vous m'avez apporté dans la réalisation de ce travail.*
- ❖ *Le Doyen de la FS7-Fès.*
- ❖ *Le Directeur du Centre Antipoison et de Pharmacovigilance du Rabat Professeur R. Soulaymani Bencheikh.*
- ❖ *Le Directeur du Centre Hospitalier Universitaire Hassan 99 Fès (CHU).*
- ❖ *Le responsable Dr. M. ELIDRISSI et tous les personnels du Laboratoire du Centre Antipoison du Rabat.*
- ❖ *Les Personnels de l'unité de Biochimie Pharmacologie Toxicologie du Centre Hospitalier Universitaire Hassan 99 Fès.*

Veuillez accepter l'expression de mes sentiments les plus respectueux, de mon estime et de ma profonde reconnaissance.

ABREVIATIONS :

CAPM: Centre Antipoison du Maroc

CAPQ : Centre Antipoison de Quédec

CH: Chirurgie

CH. E: Chirurgie Enfant

CHU: Centre Hospitalier Universitaire

CQ : Contrôle de qualité

DCI : Dénomination commune internationale

DAD : Diode Array Detected

DERMATO: Dermatologie

ENDO: Endocrinologie

GYNÉCO: Gynécologie

GSH : Glutathion

HPLC : Chromatographie liquide haute performance

MI: Médecine interne

NAC : N-acétylcystéine

NEURO CH.: Neurologie chirurgicale

OPHTA: Ophtalmologie

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

ORL: Oto Rhino Laryngologie

PED: Pédiatrie

PNEUMO: Pneumologie

REA CH.: Réanimation chirurgicale

RHUMATO: Rhumatologie

TRAU: Traumatologie

UA : Unité absorbante

UI : Unité internationale

URG: Urgence

URO: Urologie

Présentation de lieu de stage

Mon stage a été effectué au sein de deux laboratoires qui sont :

➤ Centre Hospitalier Universitaire Hassan II Fès (CHU-Hassan II Fès)



Centre hospitalier universitaire de Fès est un établissement public inauguré au mois de septembre 2009 par sa majesté le roi Mohammed VI. Il couvre les besoins d'une population estimée à plus de 3 millions d'habitants issus des régions de Fès Boulemane, Meknès-Tafilalet et Taza-Al Hoceima-Taounat.

L'infrastructure sanitaire du CHU est dotée de technologies de pointe, de normes de sécurité technique et de bâtiments conformes au système ISO.

Il est géré par un directeur et dispose de services suivants :

- Secrétariat.
- Service du personnel.
- Comptabilité.
- Caisse.
- Pharmacie.
- Hospitalisation.
- Maternité.
- Maintenance.
- Service général.
- Laboratoire central d'analyses médicales.
- Radiologie.
- Sécurité.

Le laboratoire centrale d'analyses médicales est composé de :

- Salle de réception.
- Salle de prélèvements.
- Laboratoire de biochimie/Pharmacotoxicologie.

- Laboratoire d'hématologie.
- Laboratoire de bactériologie /Immunologie.
- Laboratoire de parasitologie.
- Laboratoire de génétique.
- Laboratoire d'anatomie pathologique.

Le service de pharmacotoxicologie au sein duquel j'ai effectué mon stage de fin d'étude est dotée de

- Chromatographie (CCM, HPLC)
- Electrophorèse
- Automate OLYMPUS

Elle assure la recherche et/ou le dosage :

- Des médicaments : Acide valproïque.
Benzodiazépine.
Carbmazépine.
Paracétamol.
Phénobarbital.
Phénytoïne.
Salicylés.
- Des pesticides : Les Organophosphorée (OP).
Carbamates.
- Des Drogues : Amphétamines.
Cannabis.
Cocaïne.
Morphine.
- Takaout.

➤ Centre Antipoison et de Pharmacovigilance du Maroc (CAPM)



Le C.A.P.M est un service d'utilité publique mandaté par le ministère de la santé pour la gestion des problèmes toxicologiques à l'échelle individuelle et collective. Les objectifs spécifiques sont la diminution du nombre total d'intoxication, et la réduction du décès et des séquelles toxiques par l'amélioration de la prise en charge du patient intoxiqué.

Ces objectifs nécessitent l'élaboration d'une stratégie nationale de lutte antitoxique dont les composants sont :

- La maîtrise de la connaissance de l'état épidémiologique,
- La formation du personnel médical et paramédical,
- L'éducation de la population,
- L'élaboration des conduites à tenir standardisées,
- La disponibilité du matériel de réanimation, des antidotes et des médicaments.

Les différentes unités du CAPM :

- Service d'information toxicologique.
- Le Centre National de Pharmacovigilance.
- Le laboratoire de toxicologie et de pharmacologie clinique.
- Toxicovigilance.
- La Cellule de Communication Information (CCI).

Liste des termes cliniques

Absorption

Passage d'une substance de l'extérieur à l'intérieur de l'organisme. Les voies d'absorption sont des voies par lesquelles une substance pénètre sans lésion dans l'organisme.

Acidose métabolique

C'est un trouble de l'équilibre acido-basique de l'organisme. Il correspond à un excès d'acide dans le sang. L'équilibre acido-basique est le rapport constant et équilibré entre les acides et les bases dans l'organisme.

Anhydre

Milieu qui ne contient pas d'eau, par opposition à humide; ou substance qui ne contient pas d'eau, par opposition à hydratée.

Analgésique

Les analgésiques sont des médicaments utilisés en médecine ayant pour but d'éliminer la douleur d'un patient.

Antalgique

Les antalgiques sont des médicaments destinés à réduire la douleur.

Antipyrétique

Les antipyrétiques sont des médicaments dont le rôle est de combattre la fièvre.

Asymptomatique

Absence de symptômes ou de signes cliniques décelables.

Biodisponibilité

Quantité de substance ou de principe actif disponible dans la circulation sanguine.

Cirrhose

Maladie chronique et progressive affectant la structure et la fonction du foie.

Clairance

Mesure de la capacité d'un organe à se débarrasser d'une substance (quantité de substance éliminée par unité de temps). C'est une notion qui s'applique au foie (clairance hépatique), aux reins (clairance rénale), aux poumons (clairance pulmonaire), au plasma (clairance plasmatique), etc.

Cytochrome P450 ou P-450

Famille d'enzymes que l'on retrouve dans la plupart des êtres vivants. Elles jouent un rôle important en pharmacologie et en toxicologie puisqu'elles sont impliquées dans la biotransformation. Les activités d'oxydation du cytochrome P450 conduisent normalement à une élimination plus facile des métabolites.

Cytochromes

Protéines qui jouent un rôle important dans le fonctionnement de la cellule. Certains cytochromes possèdent une activité enzymatique, p. ex. le cytochrome P450 2E1 (CYP 2E1).

Encéphalopathie

Nom générique donné aux maladies diffuses du cerveau.

Hépatotoxique

Se dit d'un produit toxique pour le foie.

Ictère

Synonyme de jaunisse. Symptôme consistant en une coloration jaune plus ou moins intense de la peau et des muqueuses due à l'imprégnation des tissus par la bilirubine. Il peut être causé par une obstruction des voies biliaires, une destruction excessive des globules rouges ou à un mauvais fonctionnement hépatique.

Nécrose

Mort cellulaire, mort tissulaire.

Rétention

Se réfère à la quantité déposée moins la quantité éliminée, p. ex. la rétention pulmonaire.

Toxicocinétique

Étude du sort d'une substance toxique dans l'organisme. La quantité de substance qui agit avec l'organisme pour causer un effet néfaste dépend de quatre facteurs biologiques principaux qui sont : l'absorption, la distribution, le métabolisme (ou la biotransformation) et l'excrétion. La concentration d'une substance toxique dans l'organisme est influencée par différents facteurs qui peuvent être regroupés en trois catégories : les facteurs biologiques (endogènes), les facteurs environnementaux (exogènes) et les caractéristiques physico-chimiques.

Sommaire

Introduction.....	14
Synthèse bibliographique.....	15
1-Le paracétamol.....	15
1.1 Définition.....	15
1.2 Etude Pharmacologique.....	16
1.2.1 Propriétés physico-chimiques	16
1.2.2 Propriétés pharmacologiques	16
1.2.3 Propriétés pharmacocinétiques et toxicocinétiques.....	17
1.2.4 La dose toxique	18
2- L'intoxication aigue par le paracétamol.....	18
2.1 Symptomatologie	18
2.1.1 Les troubles digestifs.....	18
2.1.2 L'atteinte hépatique.....	18
2.1.3 L'atteinte rénale.....	19
2.1.4 Les autres symptômes	19
2.2 Les examens complémentaires.....	19
2.2.1 Examens paracliniques : Paracétamolémie.....	19
2.2.2 Evaluation de la fonction hépatique et rénale	20

3- Traitement des intoxications au paracétamol	21
3.1 La phase précoce	21
3.2 La phase tardive	22
4-Méthodes d'analyse utilisées pour la recherche et le dosage de la Paracétamolémie.....	23
4.1 La chromatographie liquide haute performance HPLC	24
Matériel et méthode	26
1-Matériels :	26
1.1 Appareils :	26
1.2 Réactifs :	27
2. Méthode.....	27
2.1 Principe.....	27
2.2 Préparation des solutions.....	27
2.3 Préparation de la gammes d'étalonnage.....	28
2.4 Traitement des échantillons.....	28
2.5 Conditions chromatographiques.....	30
Résultats et Discussion	30
Conclusion	36

Introduction

L'intoxication est un état pathologique spécial, due à l'entrée dans l'organisme d'une substance toxique qui bouleverse l'équilibre vital, l'altère momentanément ou l'abolit.

Le paracétamol, est de nos jours un antalgique-antipyrétique très largement commercialisé. Il fait partie des médicaments essentiels préconisés par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). C'est le premier analgésique mondial depuis les années 80, et le premier antalgique-antipyrétique prescrit, loin devant l'aspirine.

Du fait de la multiplicité des formes commerciales et galéniques, et de la facilité de se procurer ce médicament en pharmacie, le plus souvent sans ordonnance, les intoxications aiguës qu'elles soient volontaires ou accidentelles, sont de plus en plus nombreuses et graves.

La fréquence de l'intoxication par le paracétamol enregistrée par le Centre Antipoison du Maroc (CAPM) est passée de 0 cas en 1991 à 42 cas en 2007 (2,9%) **(1)**, et dans le Centre Antipoison de Québec (CAPQ) passée de 4,4% en 1984 à 10,1% cas en 1992 **(2)**.

En 2001, le CAPQ a collecté 2260 d'intoxications par le paracétamol ce qui représente 10,2% de l'ensemble des intoxications chez l'enfant de moins de 15 ans **(2)**.

Le plus utilisé des antidotes spécifiques, la N-acétylcystéine, qui doit être administré selon un protocole bien établi dans les heures suivant l'intoxication.

Les techniques de dosage de paracétamol les plus utilisées sont :

- Technique spectrophotométrique.
- Technique chromatographique sur HPLC.

L'intérêt de ce dosage c'est d'évaluer la gravité de l'intoxication au paracétamol et permet se prédire le risque hépatique et d'administrer la N-acétylcystéine en temps utile.

Dans le laboratoire d'accueil, la technique de dosage de paracétamol dans le sang (paracétamolémie) se fait dans un spectrophotomètre UV-Visible. L'objectif de mon stage est de développer et d'introduire cette technique dans un appareil de chromatographie liquide haute performance (HPLC). Mon travail consiste donc à bien maîtriser le mode de fonctionnement de l'appareil qui est piloté par un logiciel, de cerner les paramètres de la technique dans le but de pouvoir réaliser une courbe d'étalonnage et déterminer la paracétamolémie.

Synthèse bibliographique

1-Le paracétamol

1.1 Définition

Le paracétamol est la dénomination commune internationale (DCI) d'un médicament d'usage très répandu, qui entre dans la composition de très nombreuses spécialités pharmaceutiques tel que par exemple le Doliprane[®], l'Efferalgan[®] ou le Dolko[®]. Disponible sans ordonnance en [pharmacie](#), il n'en reste pas moins un médicament dont la posologie doit être respectée sans quoi des répercussions graves sur la santé peuvent être occasionnées.

Le paracétamol est un analgésique-antipyrétique capable de soulager les douleurs musculaires et d'abaisser la fièvre. Il est déconseillé aux alcooliques et à ceux qui souffrent d'insuffisance hépatique ou rénale de prendre du paracétamol en raison des effets secondaires potentiels de ce médicament.

1.2 Etude Pharmacologique

1.2.1 Propriétés physico-chimiques

Le paracétamol ou acétaminophène (N-acétyl-para-aminophénol), est un acétamide à un poids moléculaires de 151,2 Da, sa formule brute : $C_8H_9NO_2$, sa formule développée : est représentée dans la figure (1).

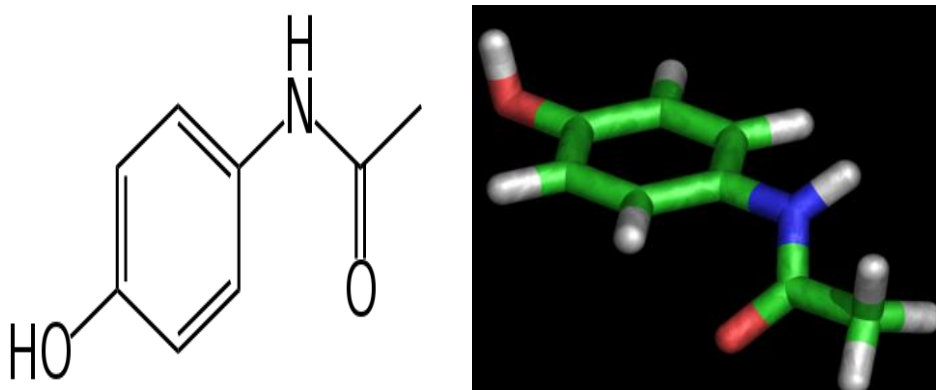


Figure 1 : Une représentation de la molécule de paracétamol, constituée d'un [cycle benzénique](#), substitué par un groupement [hydroxyle](#) et par un groupement [amide](#) en position *para*.

Il se présente sous forme d'une poudre cristalline blanche, inodore, de saveur amère. Cependant, les comprimés qui contiennent de la codéine ou du stéarate de magnésium se dégradent en diacétyl-p-aminophénol dans une atmosphère humide.

Sa fonction phénol faiblement dissociée, lui confère un Pka de 9,5 (à 25°C), Il se trouve essentiellement sous forme ionisée dans l'estomac et l'intestin grêle, condition favorable à son absorption. Sa solubilité dans l'eau à 20°C est d'environ 12g/l (ce qui limite sa concentration dans les formes hydrosolubles et sa quantité dans les comprimés effervescents).

1.2.2 Propriétés pharmacologiques

Le paracétamol possède des propriétés antalgiques et antipyrétiques qui ne diffèrent pas significativement de celle de l'aspirine ; cependant il n'a qu'un faible effet anti-inflammatoire qui serait expliqué par le fait que le paracétamol, agit en inhibant au niveau central, la production des prostaglandines impliquées dans le processus de la douleur et de la fièvre par le biais d'une action inhibitrice sur l'enzyme prostaglandine H₂ synthétase (PGHS). Celle-ci comporte notamment un site actif « cyclo-oxygénase » (ou COX) cible de la majorité des AINS, et un site « peroxydase » ou (POX) sur lequel agirait le paracétamol. Le paracétamol n'aurait pas d'action directe sur le COX1 et le COX2, les deux formes de COX sur lesquelles agissent les AINS comme l'aspirine ou l'ibuprofène(13).

De plus, le paracétamol n'inhibe pas l'activation des polynucléaires neutrophiles contrairement aux AINS.

A dose thérapeutique unique ou répétée, il n'a pas d'effet sur le système cardiovasculaire ou respiratoire, ne modifie pas l'équilibre acido-basique, n'a pas d'effet-sur les plaquettes, ne modifie pas le temps de saignement, ni l'excrétion de l'acide urique, et n'a pas d'effets indésirables digestifs.

1.2.3 Propriétés pharmacocinétiques et toxicocinétiques

L'**absorption** de paracétamol au niveau du tube digestif est rapide et totale. Toute fois, en cas de surdosage, l'absorption gastrique peut se prolonger. Les concentrations plasmatiques maximales après ingestion sont atteintes en 30 à 60 minutes. Le produit se lie faiblement aux protéines plasmatiques.

La **biodisponibilité** systémique est de 90 à 95%(13).

Sa **demi-vie plasmatique d'élimination** est de l'ordre de 2 heures. Il se distribue rapidement dans l'organisme, particulièrement dans le foie et le rein.

Son **volume de distribution** est de 1l/kg. Les concentrations dans le sang total, le plasma et la salive sont comparables. La fourchette des concentrations plasmatiques « thérapeutiques » se situerait entre 10 et 20 mg/l (3).

Son **métabolisme** est essentiellement hépatique. A doses thérapeutiques, il subit des conjugaisons. Ainsi, on le retrouve dans l'urine sous forme de glucuronoconjugués (60 à 80%), de sulfoconjugués (20 à 30%) et sous forme inchangée (moins de 5%). Une faible fraction est transformée également, sous l'action du Cytochrome P450, en N-hydroxyparacétamol, donnant lui-même une quinone-imine qui est normalement inactivée par le glutathion réduit (GSH). Lors des intoxications ce mécanisme détoxifiant est dépassé, et le métabolite formé se lie aux macromolécules hépatiques. Pouvant ainsi provoquer une nécrose hépatique.

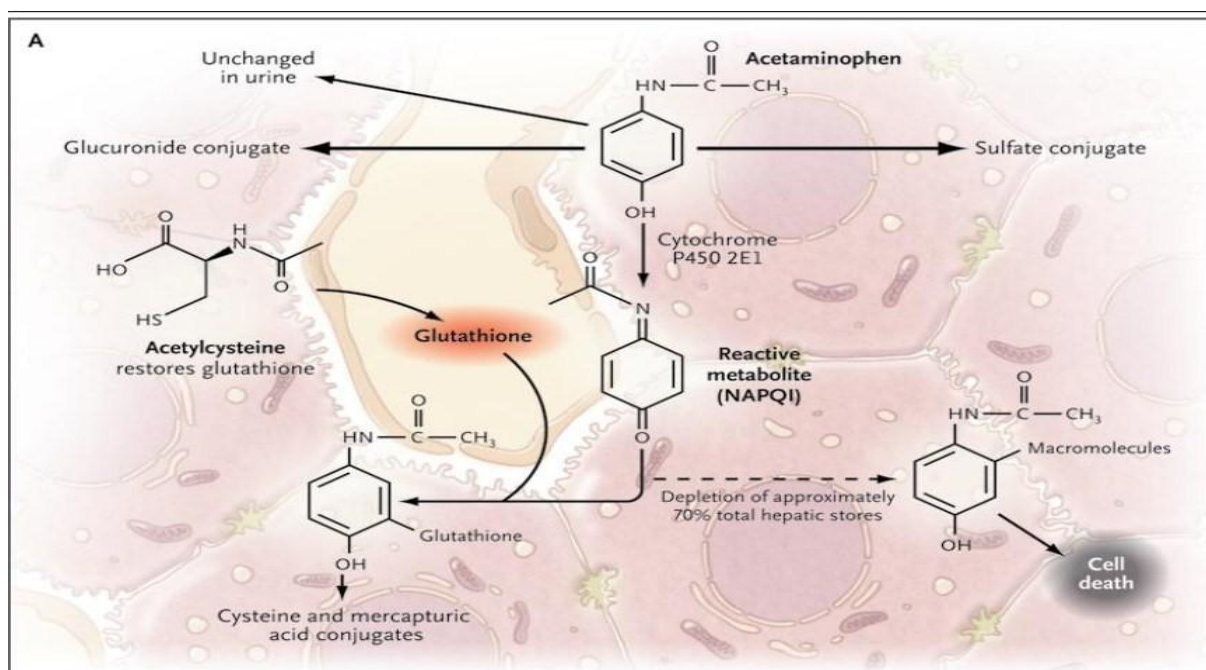


Figure 2 : Métabolisme du paracétamol (d'après Hraiech S, 2009).

1.2.4 La dose toxique

La dose de 125 mg/kg est récemment reconnue comme étant le seuil hépatotoxique potentiel chez la plupart des patients.

Enfant	100 mg/kg
Adolescent	125-150 mg/kg
Adulte	5-15g <125 mg/kg pas d'hépatotoxicité 250 mg/kg (risque hépatique sévère : 50%) 300 mg/kg (risque hépatique sévère : 100%)

Tableau I : Dose toxique selon le poids et l'âge des patients (d'après V.Danel et P.Barriot, 1993)

2- L'intoxication aigue par le paracétamol

2.1 Symptomatologie

2.1.1 Les troubles digestifs

Les premiers signes de l'intoxication par le paracétamol ne sont ni spécifiques ni prédictifs d'hépatotoxicité. De 2 à 12 heures après l'ingestion apparaissent des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales.

2.1.2 L'atteinte hépatique

Vers le deuxième jour peut apparaître une cytolysé hépatique avec des douleurs localisées à l'hypocondre droit. L'élévation enzymatique est alors très rapide, vers le 3^{ème} ou 4^{ème} jour. L'atteinte

hépatite sévère est définie par un taux sérique d'alanine aminotransférase et d'aspartate aminotransférase supérieure à 1000 UI/l. dans les formes les plus graves, et pour une faible proportion de cas, une hépatite fulminante se développe en 3 à 6 jours, marquée par un ictère, des troubles de la crase sanguine avec coagulation intra vasculaire disséminée, une hypoglycémie, une insuffisance rénale, une encéphalopathie et une hypertension intracrânienne (7). Le pronostic est alors réservé, la mortalité étant de 50%.

2.1.3 L'atteinte rénale

Elle est rapportée dans moins de 2% des cas d'intoxication par le paracétamol et chez près de 50% des patients ayant une insuffisance hépatique. L'atteinte rénale peut être isolée mais elle est le plus souvent associée à une atteinte hépatique. Elle nécessite rarement une épuration extrarénale et ce corrige en une à quatre semaines.

2.1.4 Les autres symptômes

D'autres complications de l'intoxication aigue par le paracétamol ont été exceptionnellement rapportées: pancréatite aigue, péricardite, myocardite, troubles de la conduction, de la repolarisation ou de l'excitabilité myocardique (8,9).

Les examens biologiques montrent souvent une hyperamylasémie, une hypo-phosphorémie et parfois une thrombopénie.

Dans les formes graves, deux signes cliniques peuvent être observés en l'absence de toute anomalie hépatique :

- une insuffisance rénale aigue.
- une acidose métabolique avec hyperlactatémie.

2.2 Les examens complémentaires

2.2.1 Examens paracliniques : Paracétamolémie

C'est le meilleur indicateur de la gravité potentielle de l'intoxication, si elle est réalisée entre 4 et 16 heures après l'ingestion médicamenteuse. Le risque d'apparition d'une atteinte hépatique est évalué en fonction de la paracétamolémie et du délai écoulé par rapport à l'ingestion (fig.1-ligne A) (6). Ce nomogramme a été validé dans le cas d'une ingestion unique de paracétamol, à un moment précis connu, chez un sujet en bonne santé.

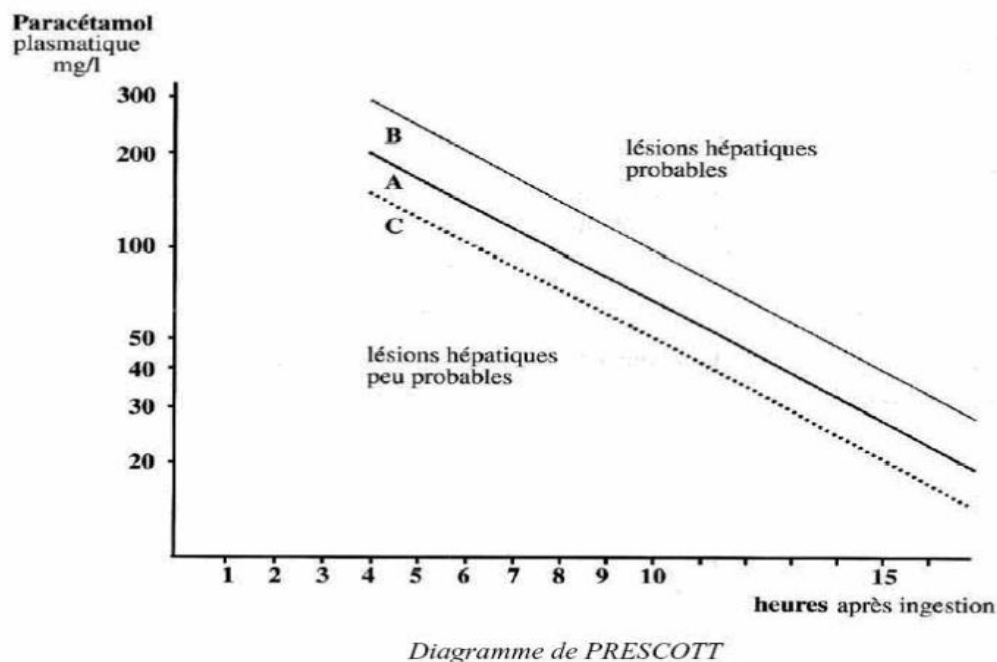


Figure 3 : Diagramme de PRESCOTT.

Ce graphe permet d'évaluer le risque de toxicité hépatique en fonction du taux plasmatique de paracétamol et du délai après l'absorption.

- Lorsque la paracétamolémie se situe au-dessus d'une ligne A reliant **200 mg/l** à la 4^{ème} heure et **30 mg/l** à la 15^{ème} heure, l'intoxication doit être considérée comme sévère.
- Lorsque la concentration plasmatique du paracétamol est située au-dessus d'une ligne B reliant **300 mg/l** à la 4^{ème} heure et **45 mg/l** à la 15^{ème} heure, le risque de développer une atteinte hépatique sévère est de **90%**.

Pour une paracétamolémie mesurée en dessous de la ligne A, l'hépatite est habituellement absente.

Donc, le pronostic peut être apprécié par la mesure du taux plasmatique du paracétamol et en connaissant le délai qui sépare l'intoxication de l'heure du prélèvement sanguin.

2.2.2 Evaluation de la fonction hépatique et rénale

- a- Dosage des taux sériques d'alanine aminotransférase et d'aspartate aminotransférase.
- b- Dosage de la Glycémie qui devint inférieur a la norme en cas d'intoxication.
- c- Dosage de la créatininémie.
- d- Dosage de l'urée.

3- Traitement des intoxications au paracétamol

Il comporte deux volets : l'évacuation digestive et/ou l'administration de charbon activé, le traitement par la (NAC). La prise en charge de l'intoxication par le paracétamol est fonction du délai de la prise médicamenteuse et du tableau clinique.

3.1 La phase précoce

Evacuation gastrique

Le lavage gastrique est intéressant s'il est réalisé précocement, dans les 2 heures qui suivent l'intoxication. Le charbon activé réduit l'absorption du paracétamol de 50 à 90% et son administration est justifiée jusqu'à 4 heures. Il est administré à la dose de 50g soit per os si le sujet est conscient, soit dans la sonde nasogastrique si le patient est dans le coma.

Afin d'éviter les vomissements, on veillera à administrer le charbon activé de façon fractionnée. L'apport de charbon activé per os implique une prescription simultanée de la NAC par voie IV.

La N-acétylcystéine

L'antidote, la N-acétylcystéine (NAC) agit en prévenant la déplétion mitochondriale et cytosolique en glutathion, dont elle est un des précurseurs (figure 4).

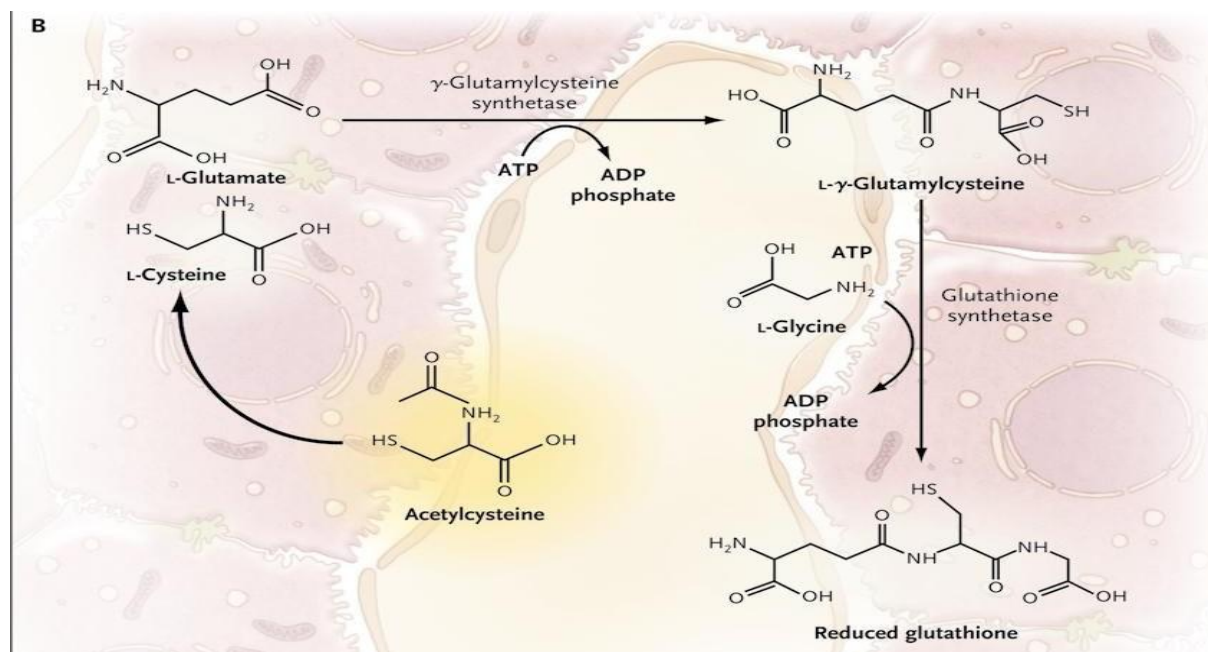


Figure 4 : la correction de la déplétion en glutathion réduit par le NAC

La NAC corrigerait également les lésions oxydatives causées par le métabolite réactif. Le traitement par la NAC est justifié dès que la dose de paracétamol ingérée est Supérieure à 125mg/kg. C'est la paracétamolémie qui permet ensuite de décider de la poursuite du traitement. Le protocole

d'administration de la NAC peut être interrompu si la Paracétamolémie réalisée au-delà de 4 heures n'est pas toxique, en tenant compte des situations qui abaissent son seuil toxique (Tableau II). L'administration de la NAC, moins de 10 heures après l'intoxication au paracétamol permet de prévenir l'apparition de lésions hépatiques sévères. Des délais supérieurs sont responsables d'une plus grande fréquence d'hépatotoxicité **(10)**.

L'administration orale de la NAC est une alternative à la perfusion intraveineuse. Cependant cette dernière voie d'administration paraît préférable. En effet, la prise per os peut être impossible du fait des vomissements induits soit par la NAC soit par le paracétamol. De surcroît, elle ne permet pas l'administration simultanée de charbon activé **(11)**. Un allongement de la durée de la perfusion initiale de NAC peut réduire la fréquence de survenue des accidents anaphylactoides (nausées, vomissements, urticaires, prurit). Ces manifestations semblent refléter un effet pharmacologique dose-dépendant peut-être associé à une libération d'histamine. Des réactions plus sévères ont été rapportées (bronchospasme, angioedème, hypotension) parfois liées à une dose excessive **(6)**. Ces effets indésirables faciles à prévenir ou à corriger (antihistaminiques) ne doivent pas remettre en cause la poursuite du traitement **(5)**.

voie d'administration	posologie	Dose totale	Durée
Intraveineuse	150 mg/kg sur 15 min +50 mg/kg sur 4h +100 mg/kg sur 16h	300 mg/kg	20h
Intraveineuse	140 mg/kg sur 15 min +70 mg/kg sur 4h×12	980 mg/kg	48h
Orale	140 mg/kg +70 mg/kg toutes les 4 h× 17	1330 mg/Kg	72h

Tableau II: Protocoles d'administration de la N-acétylcystéine (d'après V.Danel et P.Barriot, 1993)

3.2 La phase tardive

La N-acétylcystéine

Dans les 24 heures qui suivent l'intoxication. L'administration de NAC est indiquée si la paracétamolémie est dans la zone de toxicité sur le nomogramme de Prescott.

Si une atteinte hépatique apparaît ou si le patient est vu tardivement avec une hépatite cytolytique, l'administration prolongée de NAC pourrait réduire la mortalité. Il est préconisé de

poursuivre la procédure standard d'administration de la NAC par une perfusion de 100 mg/kg toutes les 16 heures jusqu'à la guérison.

4-Méthodes d'analyse utilisées pour la recherche et le dosage de la Paracétamolémie

L'appréciation du risque toxique, implique des techniques de dosage précises et spécifiques du paracétamol.

Le choix d'une technique de dosage dépend de sa spécificité, de sa sensibilité, de la fréquence des demandes, du matériel disponible et du personnel qui la mettre en œuvre.

Il y a deux types des techniques utilisées pour la révélation de la présence du paracétamol dans la matrice biologique (sang) :

- 1) Technique de recherche colorimétrique qui consiste à révéler le paracétamol par des réactions chimiques.
- 2) Technique de dosage basée sur :

Les mesures spectrophotométriques dans une longueur d'onde de 450 nm

Les mesures chromatographiques consistent à séparer différentes substances en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, et quantifier les produits séparés. Cette technique permet de déterminer le dosage simultané des différents métabolites. Elle utilise généralement des colonnes de type C18 et la détection UV est faite à 254 nm. L'injection de l'échantillon se fait directement ou après une extraction. Elle est précise, sensible et relativement rapide, mais nécessite un personnel entraîné à l'utilisation d'un appareillage délicat.

4.1 La chromatographie liquide haute performance HPLC

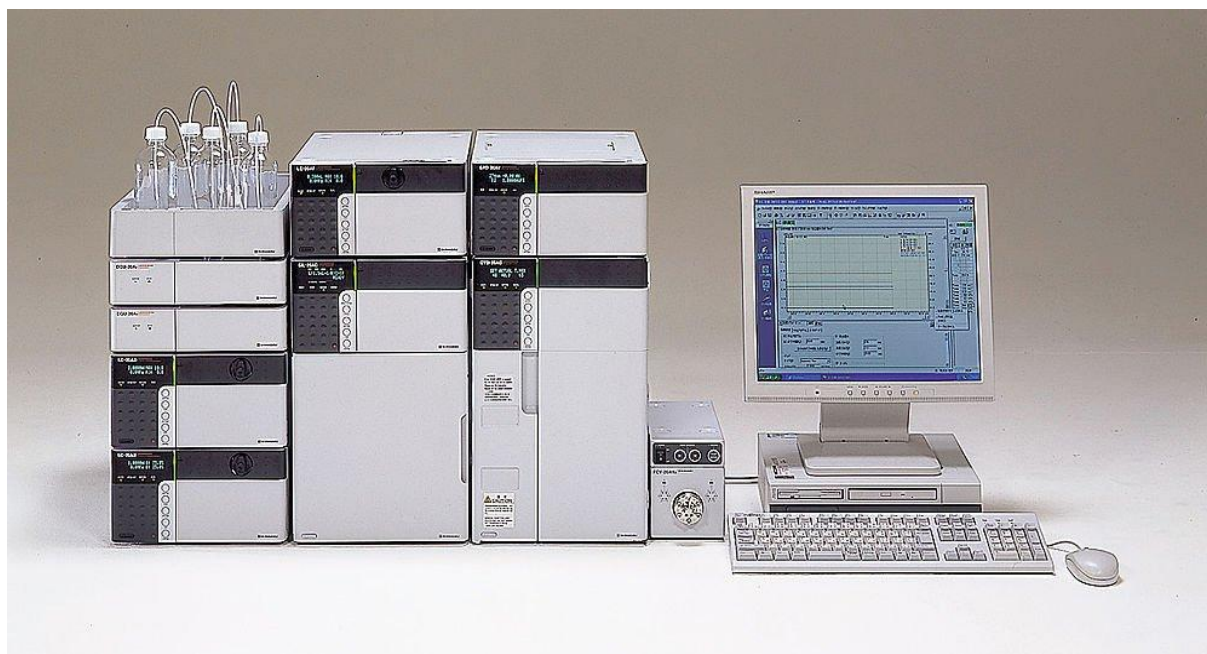


Figure 5 : HPLC Prominence system– Shimadzu

On choisit dans notre sujet la chromatographie liquide haute performance ou haute pression comme une technique de dosage de la paracétamolémie.

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants d'un mélange même très complexe.

La chromatographie liquide à haute performance se fait sous haute pression, elle nécessite l'emploi d'un appareillage lourd, dont le fonctionnement est contrôlé par un ordinateur.

Cette technique permet de réaliser au maximum les qualités de la méthode chromatographique : très petite quantité de matériel à analyser, extrême sensibilité, grand pouvoir de séparation et une excellente reproductibilité.

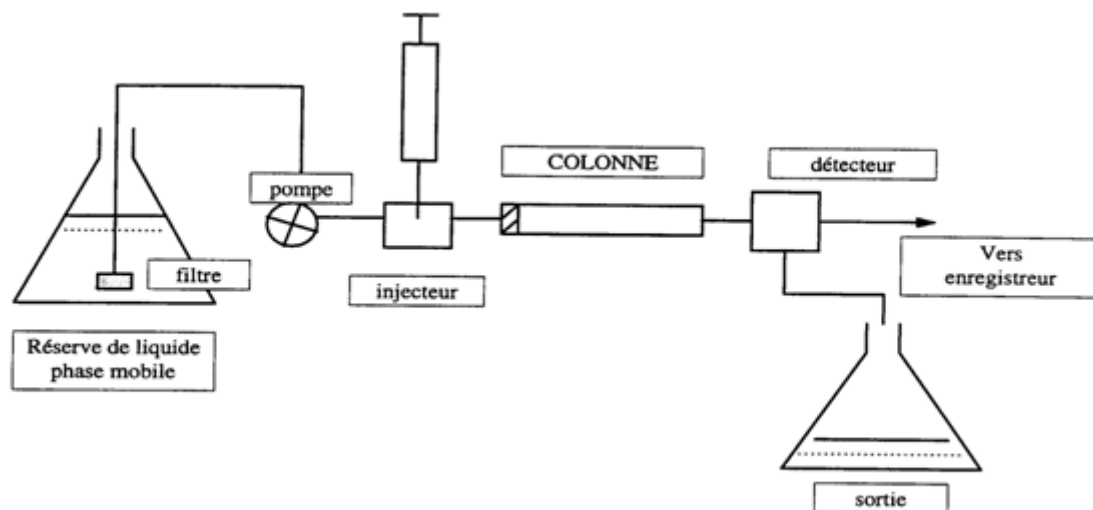


Figure 6 : schéma de technique d'HPLC

L'HPLC est constituée de :

➤ **Un réservoir de solvant (éluant)**

Qui contient la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluants (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'élution (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe.

➤ **La pompe**

Elle est munie d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. Elle permet de travailler:

- en mode isocratique, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.
- en mode gradient, c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluants.

Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques μl à plusieurs ml/min .

➤ **Vanne d'injection :**

C'est un injecteur à boucles d'échantillonnage. Il existe des boucles de différents volumes, nous utiliserons une boucle de $20\ \mu\text{l}$. Le choix du volume de la boucle se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser. Le système de la boucle d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, ce qui est important pour l'analyse quantitative.

➤ **La colonne**

Une colonne est un tube construit dans un matériau le plus possible inerte aux produits chimiques, souvent en inox ou en verre. Sa section est constante, de diamètre compris entre 4 et 20 mm pour des longueurs généralement de 15 à 30 cm. Au delà, les importantes pertes de charges exigeraient des pressions de liquide beaucoup trop élevées. La colonne est disposées dans un enceinte thermostatée à $\pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Figure 7 : Les colonnes utilisées dans l'HPLC

- **Portoir pour solvant**
- **Système de dégazage online** : Permet de dégazifier la phase mobile pour éliminer les bulles d'air.
- **Pompe Quaternaire basse pression** : permet de préciser le débit et la pression de délivrance des solvants.
- **Passeur Automatique d'échantillon** : permet de préciser
 - Le volume et la vitesse d'injection.
 - Le rinçage avant et après injection.
 - Le débit d'aspiration.
- **Four à colonne model marqué CE** : Chauffage a air forcé permet de régler la température dans une gamme de 4 à 85°C.
- **Détecteur à barrette diode.**

Matériel et méthode

1-Matériels :

1.1 Appareils :

- HPLC
- Colonne 250 X 4.6 5 μm Spherisorb C18.
- pH-mètre.

- Vortex.
- Centrifugeuse.
- Balance de précision.
- Sonificateur.
- Tubes à essai en verre de 20 ml.
- Tube à hémolyse en plastique de 5 ml.
- Tube à hémolyse en verre de 5 ml.

1.2 Réactifs :

- Eau pour HPLC (H₂O).
- Acétonitrile pour HPLC
- Acétate de sodium anhydre (CH₃COONa) : PM = 82.03 g/mol.
- Théophylline monohydratée.
- Paracétamol.
- Acide acétique glacial.

2. Méthode

2.1 Principe

L'extraction est de type liquide-liquide par déprotéinisation plasmatique par l'acétonitrile. La Théophylline monohydratée est utilisée comme standard interne. Les molécules sont séparées sur une colonne 250 X 4.6 5 µm Spherisorb C18 et détectées à une longueur d'onde de 254 nm.

2.2 Préparation des solutions

- **Solution mère du paracétamol à 1 mg/ml (conservation à +4°C)**

Dans fiole jaugée de 10 ml mettre :

- **10 mg** de paracétamol
- 10 ml d'eau HPLC.

La solution mère est aussi utilisée comme une **solution de contrôle qualité (CQ)**

- **Solution d'étalon interne Théophylline monohydratée à 150 mg/l**

Dans une fiole jaugée de 10 ml mettre :

- **1,5 mg** de théophylline monohydrate
- 10 ml d'Acétonitrile HPLC

NB : Cette solution est transvasée dans un petit flacon et conservée à +4°C.

- **Tampon acétate de sodium 0,01 mol/l**

Dans une fiole jaugée de 500 ml, mettre :

- **410 mg** d'acétate de sodium anhydre.
- 450 ml d'eau pour HPLC.
- Ajuster au pH 4 à l'aide de l'acide acétique glacial.
- Compléter le volume à 500 ml par l'eau HPLC.

NB : Cette solution est transvasée dans un flacon de 500 ml et peut être conservée à +4°C pendant 6 mois.

2.3 Préparation de la gamme d'étalonnage

On a préparé une gamme composée de 5 tubes à des concentrations croissantes de 0 à 200 mg/l du paracétamol et un tube (N° 6) pour le contrôle de qualité (CQ) comme il est indiqué dans le tableau suivant :

Tubes à hémolyse	1	2	3	4	5	6 : CQ
Concentration (mg/l)	0	25	50	100	200	150
solution mère à 1 mg/ml (µl)	0	50	100	200	400	0
solution contrôle à 1 mg/ml (µl)	0	0	0	0	0	300
Eau HPLC (µl)	1000	950	900	800	600	700
Plasma (ml)	1	1	1	1	1	1
Volume final (ml)	2	2	2	2	2	2

Vortexer chaque tube pendant 10 secondes.

2.4 Traitement des échantillons

Dans un tube à hémolyse, on met :

- 500 µl de l'échantillon (plasma, gamme d'étalonnage ou solution de contrôle qualité).
- 500 µl de la solution du standard interne (150 mg/l).
- On Vortex 10 Secondes.
- On Centrifuge 10 minutes 3000 tours/min.
- Dans un tube à hémolyse, On dilue au demi le surnageant dans de l'eau pour HPLC.
- On met les solutions dans des Racks.



- On met les racks dans l'automate.



- Injecter 20 μl .



Il y a des paramètres spécifiques pour cette étape :

- La distance entre l'aiguille et le fond du rack.
- Le volume d'injection.
- La vitesse de l'injection.

- Le volume du rinçage de l'aiguille.
- La vitesse du rinçage de l'aiguille.

2.5 Conditions chromatographiques

- Phase mobile : * 93% de tampon acétate 0.01N pH = 4.
* 7% d'acétonitrile.
* Dégazer aux ultrasons (10 minutes) ou à l'aide de la trompe à vide avant utilisation
- Colonne : 250 X 4.6 5 µm Spherisorb C18.
- Température de la Colonne : 20 °C.
- Volume à injecter : 20 µl.
- Détection : UV, $\lambda = 254$ nm.
- Sensibilité : 0.02 AUFS.

Résultats et Discussion

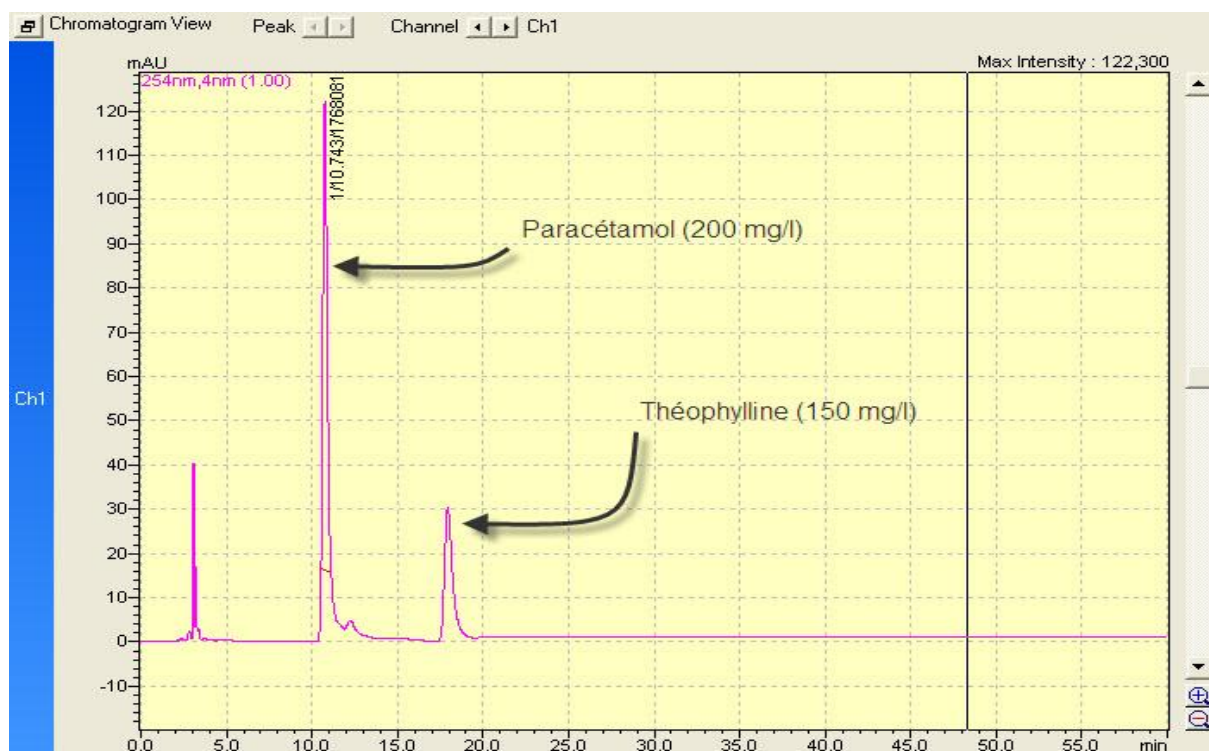
On a préparé une gamme étalon avec des concentrations de 0 à 200 mg/l, on a utilisé comme standard interne la théophylline monohydratée qui a pour but de garder et révéler tout changement dans le pic.

On a obtenu des chromatogrammes avec des pics qui croient avec l'augmentation des concentrations du paracétamol.

Préparation d'un Prérun :

Avant de lancer l'analyse de la séquence de notre gamme étalon, on commence par lancer une préanalyse qui simule un échantillon sanguin ou un des points de la gamme d'étalonnage contenant une concentration définie du Paracétamol. L'intérêt de ce test réalisé avec un temps d'analyse suffisamment long nous permettrait de savoir si on est en mesure primo de détecter un signal et secundo de bien cerner le temps de rétention de la molécule de Paracétamol dans la colonne

- Chromatogramme de prérun 200 mg/l du paracétamol



Ce chromatogramme montre une UA de 120 pour le pic du paracétamol (200mg)

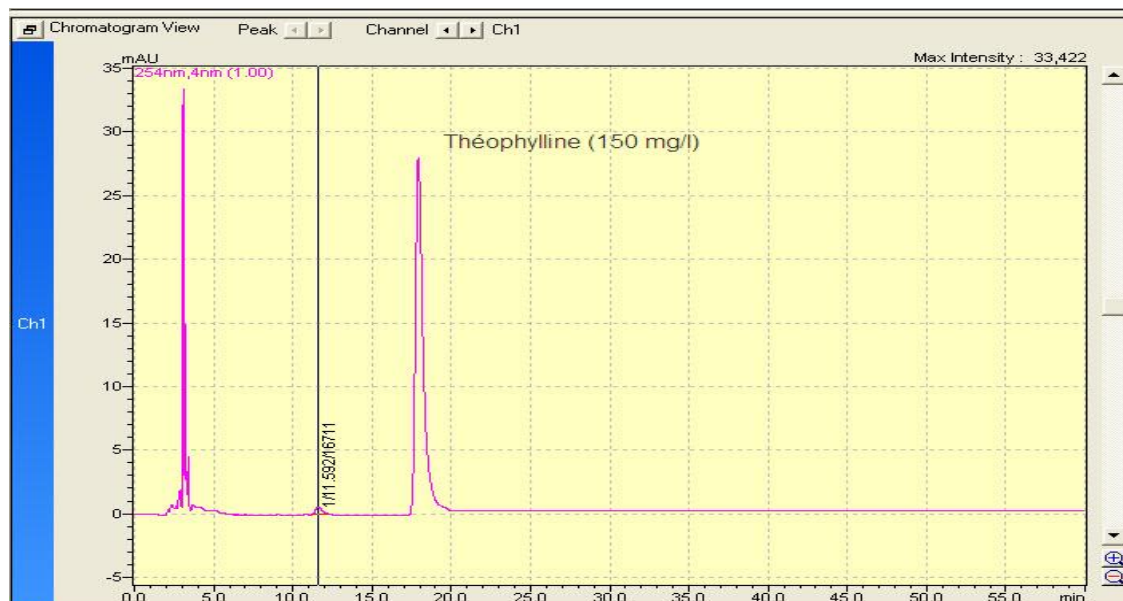
Un temps de rétention du paracétamol = 10,743 min.

Un temps de rétention de théophylline monohydratée = 17 min.

Le but de ce prérun est de préciser le temps de rétention de la molécule, et aussi d'étalonner l'appareil.

Réalisation de la courbe étalon.

- Chromatogramme du blanc

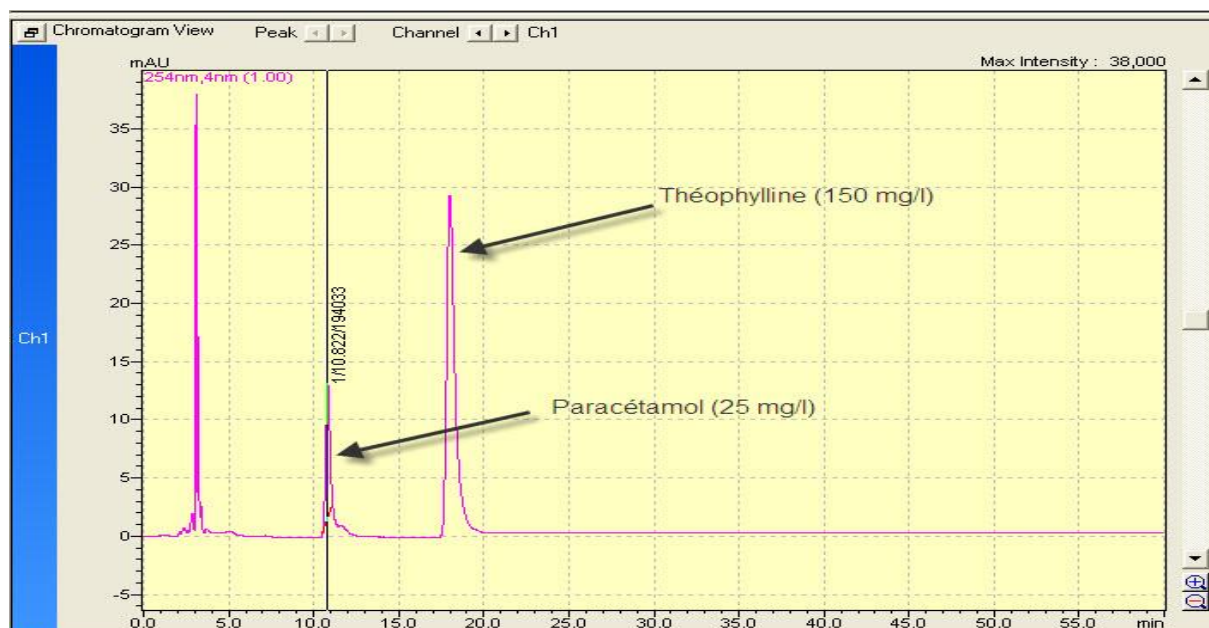


Ce chromatogramme correspond à une concentration de 0 mg/l de paracétamol caractérisé par une absence du pic qui montre une absorbance nulle.

Le chromatogramme à 0 mg/l de Paracétamol sert de témoin pour pouvoir identifier le pic de Paracétamol dans les autres points de la gamme d'étalonnage. Ce chromatogramme se caractérise par la présence d'un seul pic à 17 min qui n'est autre que la théophylline.

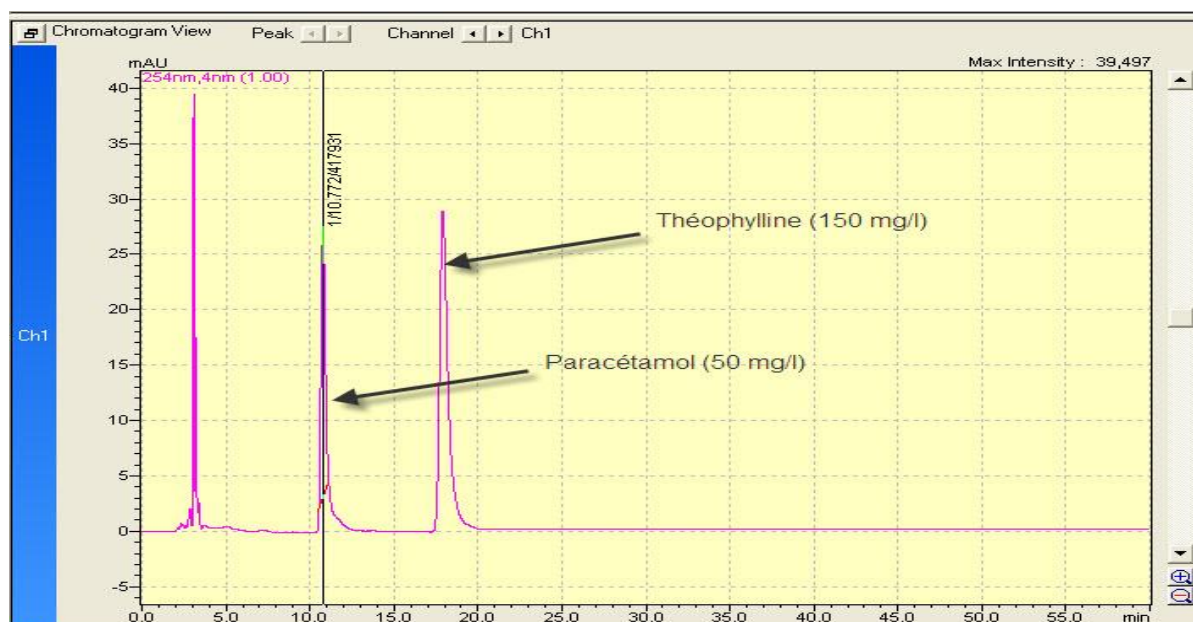
Le deuxième pic apparaît à la 11^{ème} min, c'est une petite bosse qui traduit l'existence d'une molécule contenu dans le sérum ayant presque la même longueur d'onde d'absorption.

- Chromatogramme de la concentration **25 mg/l du paracétamol**



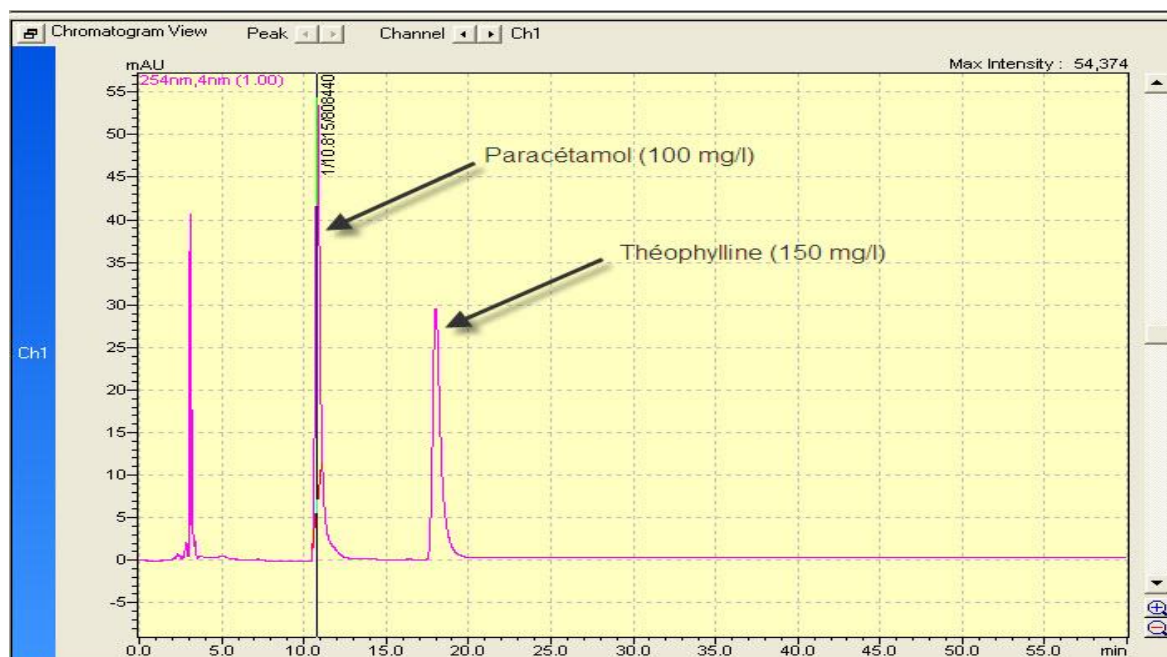
Apparition d'un pic à 10,7 min dans le chromatogramme 25 mg/l. C'est celui du Paracétamol.

- Chromatogramme de la concentration **50 mg/l du paracétamol**



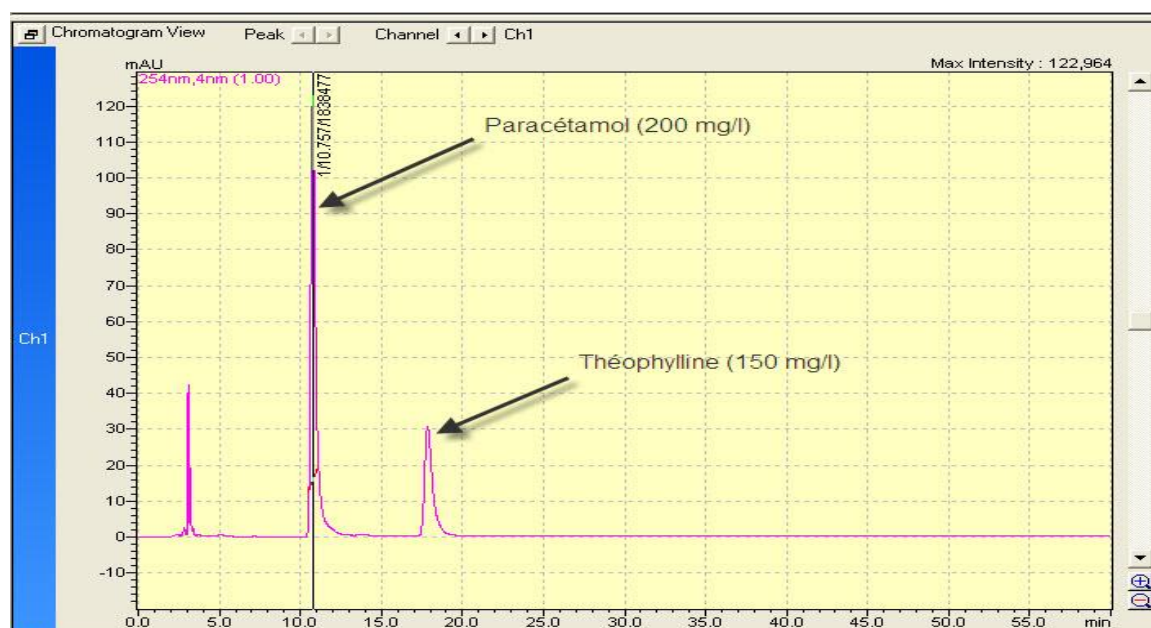
Le pic observé à 50 mg/l du paracétamol atteint une absorbance deux fois de celui de la concentration 25 mg/l.

- Chromatogramme de la concentration **100 mg/l du paracétamol**



Le pic atteint une absorption de 54 UA.

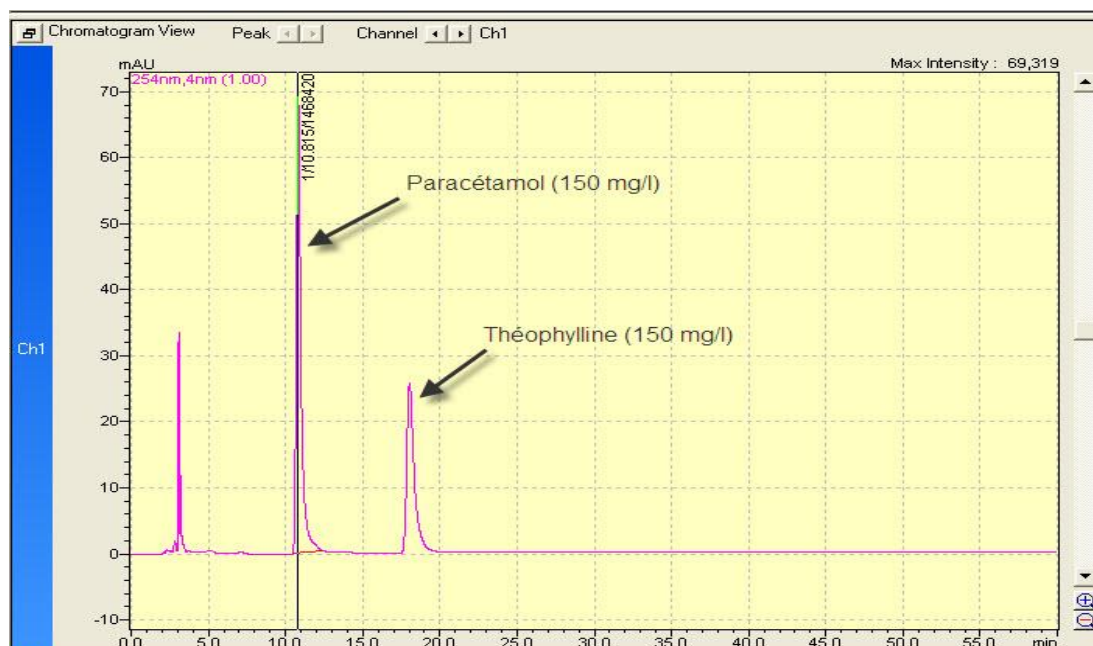
- Chromatogramme de la concentration **200 mg/l du paracétamol**



Le pic atteint une absorption de 120 UA.

➔ L'augmentation de la concentration est corrélée avec une augmentation de l'absorbance.

- Chromatogramme de point de contrôle de qualité **150 mg/l du paracétamol**



Le pic atteint 70 UA.

Après l'obtention des pics d'absorption, grâce à un logiciel intégré à la HPLC on fait une intégration du pic du paracétamol. Sur ce logiciel on règle un certains nombre de paramètres tel que l'unité de la concentration du paracétamol. Ce logiciel nous permet de tracer la courbe étalon : $[\text{paracétamol}] = f(\text{aire/hauteur du pic})$.

Quantitative Method: External Standard

Units: mg/L

Calculated by: ☐ Area ☒ Height

Format of Concentration: ☒ Decimals ☐ Significant Figures

of Calib. Levels: 4

Curve Fit Type: Linear

Zero: Not Forced

Weighting Method: None

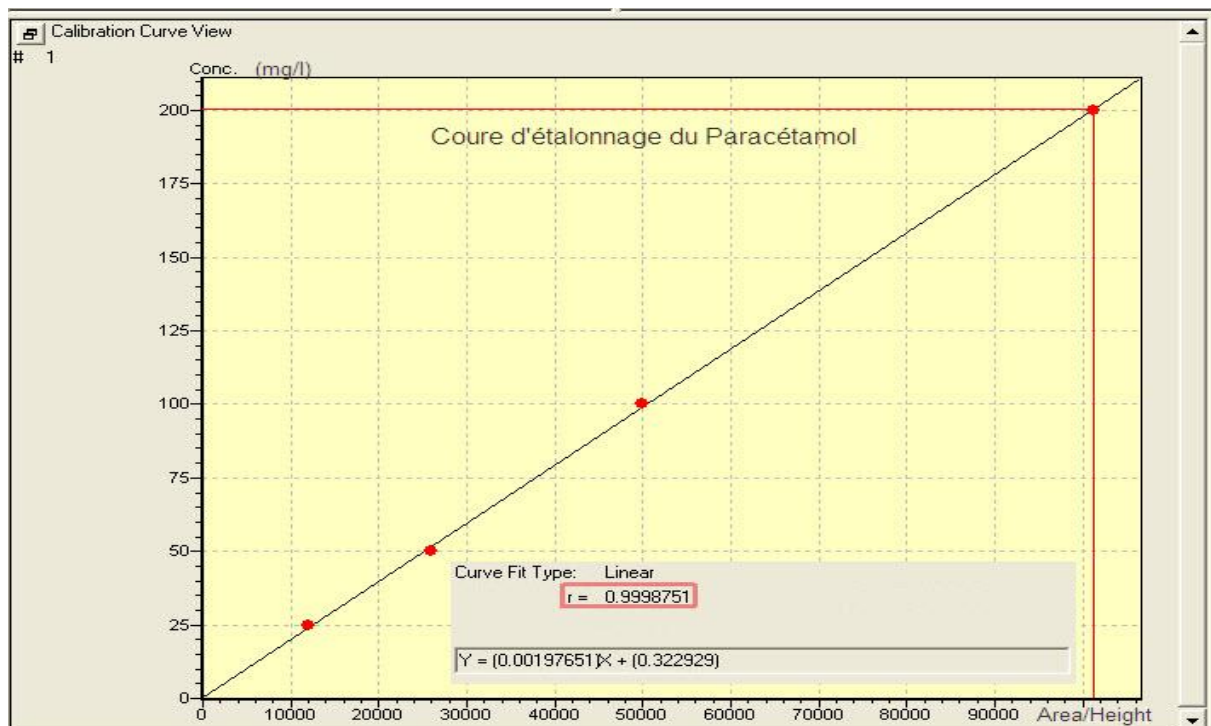
X Axis of Calib. Curve: ☐ Conc. ☒ Area/Height

5

Group Type: Not Used

Paramètres d'intégration du Pic

La courbe d'étalonnage



On a le coefficient de régression $R = 0,9998$ donc la courbe est linéaire.

→ Il y a une relation linéaire entre la concentration du paracétamol et la surface des pics.

Détermination d'une concentration de Paracétamol

Si on a un échantillon d'un malade, on va suivre ce protocole et après l'obtention de l'Area/Height de son pic on réalise une extrapolation sur l'axe des concentrations de la courbe d'étalonnage et on obtient la concentration du paracétamol de ce patient.

Durant mon stage aucun cas d'intoxication au paracétamol n'a été marquée, ce qui explique le manque des résultats à traiter.

Conclusion

L'intoxication au paracétamol est une intoxication grave, car il existe un risque non négligeable d'insuffisance hépatocellulaire.

On choisi la technique de chromatographie liquide en haute pression pour le dosage de la paracétamolémie. Ce dosage a pour but d'évaluer la gravité de cette intoxication.

Le traitement précoce par le N-acétylcystéine permet d'aboutir à une évolution favorable de cette intoxication.

Références

- (1) Rhalem N., Khattabi A., Abbadi F., Ouammi L.,Soulaymani. Paracetamol Poisoning-Moroccan Poison Control Centre Experience (1989-2007) R.Moroccan Poison Control and Pharmacovigilance Centre Email:nrhalem@capm.com
- (2) Les intoxications au Quédec. Bulletin d'information toxicologique. Juin 2001.
- (3) Alain Viala., Alain Botta. Toxicologie 2^{ème} édition – p : 739.
- (4) Hraiech S. Intoxication au paracétamol :Diagnostic, Traitement. Février 2009.
- (5) Proudfoot A. intoxication par le paracétamol. In : jaeger A, Vale JA, eds. Intoxication aiguës. Paris : Elsevier, 1999 : 249-261.
- (6) Jones AL, lheureux P.Progrès récent dans le traitement des intoxications au paracétamol. Rean Urg 1998; 6 : 643-658.
- (7) Ellenhorn MJ. Acetaminophen. Ellehorn's medical toxicology. Baltimore : wiliams & wikins, 1997: 180-192.
- (8) Mofenson HC, caraccio TR, Nawaz H, Stecler G, Acetaminophen induced pancreatitis. J Toxicol Clin Toxicol 1991; 29 :223-30.
- (9) Lip GYH, Val JA. Does acetaminophen damage the hart ? J Toxicol clin Toxicol 1996 ; 34 :145-7.

(10) Shriner K, Goetz MB. Severe hepatotoxicity in a patient receiving both acetaminophen and zidovudine. Am J Med 1992 ;93 : 94.

(11) Prescott LF, Swainson CP, Forrest ARW, Newton RW, Wright cysteamine. Lancet 1974 ; 6 :588-92.

(12) Keiji S, Intoxication aigue au paracétamol, ,N°203,2008.

Mode opératoire

- Carol G. Fletterick, Thomas H. Grove and David C. Hohnadel. Liquid-Chromatographic Determination of Acetaminophen in Serum. CLIN. CHEM. 25/3, 409-412 (1979).
- Tsan Z. Liu and Kris H. Oka. Spectrophotometric Screening Method for Acetaminophen in Serum and Plasma. CLIN. CHEM. 26/1, 69-71 (1980).
- George R. Gotelli, Pokar M. Kabra, and Laurence J. Marton. Determination of Acetaminophen and Phenacetin in Plasma by High-Pressure Liquid Chromatography. CLIN. CHEM. 23/6, 957-959 (1977).
- Lane J. Brunner, Shuang Bai. Simple and rapid assay for acetaminophen and conjugated metabolites in low-volume serum samples. Journal of Chromatography B, 732 (1999) 323–329.
- Khalid M. Alkharfy, Reginald F. Frye. High-performance liquid chromatographic assay for acetaminophen glucuronide in human liver microsomes. Journal of Chromatography B, 753 (2001) 303–308.
- B. Digneon, M. A. Charvin, M. T. Quenard, and H. Thome. Multi-Wavelength Analyses of Second-Derivative Spectra for Rapid Determination of Acetaminophen in Serum. CLIN. CHEM. 34/6, 1119-1121 (1988).
- Alfred J. Quattrone and Robert S. Putnam. A Single Liquid-Chromatographic Procedure for Therapeutic Monitoring of Theophylline, Acetaminophen, or Ethosuximide. CLIN. CHEM. 27/1, 129-132 (1981).
- John M. Meola. Emergency Determination of Acetaminophen. CLIN. CHEM. 24/9, 1642-1643 (1978).