



Année Universitaire : 2012-2013

Master Sciences et Techniques : CMBA  
Chimie des Molécules Bio Actives



**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**  
Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

**Mise au point et validation d'une méthode de dosage  
du méthanol dans le sang par chromatographie  
en phase gazeuse (CPG)**

**Présenté par:**

**Fatima zahra AMRI**

**Encadré par:**

- Mr Fouad OUAZZANI CHAHDI (FSTF)
- Dr Mouncef IDRISSE (CAPM)
- Mr Youssef KANDRI RODI (FSTF)

**Soutenu Le 21 Juin 2013 devant le jury composé de:**

- **Mr. F. OUAZZANI CHAHDI**
- **Mr. Y. KANDRI RODI**
- **Mr. C. IHSSANE**
- **Mr. M. EL ASRI**

**Stage effectué à : Centre Anti Poison et de Pharmacovigilance du MAROC**



Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques



**Nom et prénom: Fatima zahra AMRI**

**Année Universitaire : 2012 / 2013**

**Titre: Mise au point et validation d'une méthode de dosage du méthanol dans le sang par chromatographie en phase gazeuse (CPG).**

### Résumé

Le méthanol est un solvant qui présente un intérêt toxicologique constant, en raison de ses utilisations, de son mode d'action toxique et des moyens utilisés pour le combattre.

Les intoxications aiguës proviennent de l'ingestion de méthanol (substitution frauduleuse de l'alcool éthylique par le méthanol) ou de solutions d'antigel (intoxication volontaire). Le méthanol provoque une ébriété. Les troubles digestifs, oculaires (névrite optique pouvant conduire à la cécité), métaboliques et neuropsychiques surviennent quelques heures à quelques jours après l'ingestion. En l'absence de traitement, l'intoxication est mortelle. En milieu professionnel, l'exposition se fait essentiellement par la voie respiratoire et éventuellement cutanée. Le méthanol est métabolisé au niveau hépatique par l'alcool-déshydrogénase en formaldéhyde puis en acide formique par l'aldéhyde déshydrogénase. L'acide formique qui s'accumule est le principal responsable de la toxicité, par induction d'une acidose métabolique.

Dans le cadre de la mise au point et la validation d'une méthode de dosage plasmatique du méthanol, nous avons opté pour la CPG-Headspace-FID vu son extrême sensibilité, sa rapidité, et sa fiabilité compte aux résultats. La méthode a été validée sur une gamme d'étalonnage allant de 0 à 1 g/l de méthanol, en étudiant tous les critères de validités avec succès.

**Mots clés: Méthanol, intoxication, dosage, validation.**



## *Remerciements*

*Mes remerciements vont tout d'abord à Dieu le Tout Puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il m'a donné pour terminer ce travail, qui a été effectué au niveau du laboratoire de toxicologie et de pharmacologie de « Centre Anti Poison et de Pharmacovigilance du Maroc ».*

*Un remerciement particulier et sincère pour tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail. Madame Rachida SOULAYMANI BENCHERKJH, directrice du centre, que ce travail soit un témoignage de ma gratitude et mon profond respect. Mr le Dr Mouncef IDRISSE, responsable du laboratoire, j'ai eu le privilège de travailler parmi votre équipe, votre sérieux, votre compétence et votre sens du devoir m'ont énormément marqués. Veuillez trouver ici l'expression de ma considération. Un profond respect et un remerciement particulier pour tout le personnel et les stagiaires du centre, je cite Mlle Naima AIT DAOUD et Mr Mohammed GHANDI qui m'ont accompagné et étaient de très bon conseil.*

*A notre maître et juge de thèse Monsieur Fouad OUAZZANI CHAHDI, chef de département de chimie, veuillez trouver ici l'expression de mon grand respect et vifs remerciements pour votre estimable participation dans l'élaboration de ce travail.*



## *Dédicace :*

*Je dédie ce mémoire à :*

*Mon Père,*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi. Ce travail est le fruit des efforts et sacrifices que tu as consentis pour moi.*

*Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver, t'accorder santé, longue vie et bonheur.*

*Ma Mère,*

*Tu représentes pour moi la bonté, la tendresse et l'exemple du dévouement. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tout ce que tu m'as prodigué.*

*Mes sœurs, leur maris, et petites perles,*

*Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite. En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous.*

*A tous les membres de ma famille, petits et grands ;*

*Veillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection la plus sincère.*

*A tous mes amis,*

*Je ne peux trouver les mots justes pour vous exprimer mon affection, En témoignage de l'amitié qui nous unit.*



## **Sommaire :**

Table des abréviations

Présentation du Centre Anti Poison et de Pharmacovigilance du Maroc .....	1
I. ....	Missi
ons du CAPM .....	1
1.....	L'inf
ormation toxicologique .....	1
2.....	La
pharmacovigilance .....	2
3.....	La
toxicovigilance.....	2
4.....	L'ass
urance qualité.....	2
5.....	L'ana
lyse toxicologique et le suivi thérapeutique.....	2
II. ....	Orga
nigramme.....	3
III. ....	Reco
mmandations et promesses .....	3
Introduction.....	4
Chapitre I : Monographie du méthanol	
I. ....	Usag
e .....	7
II. ....	Propr
iétés physico-chimiques.....	7
III. ....	Circo
nstances des intoxications.....	8
IV. ....	Toxic
ocinétique.....	8
1.....	Abso
rption.....	8
2.....	Diffu
sion.....	8
3.....	Méta
bolisme.....	9
4.....	Elimi
nation .....	9
V. ....	Dosa
ge analytique.....	10



---

1.....	Dosa
ge du méthanol.....	10
a.....	Méth
odes chimiques.....	10
b.....	Méth
odes physiques.....	11
2.....	Dosa
ge de l'acide formique.....	12

Chapitre II : Matériel et méthode

A.....	Chro
matographie en phase gazeuse... ..	15
I.....	Intro
duction.....	15
II.....	Princ
ipe.....	15
III.....	Instru
mentation.....	16
1.....	Encei
nte thermostatée (Four).....	17
2.....	Colo
nnnes.....	17
3.....	Inject
eurs.....	18
4.....	Gaz
vecteur et régulateur de débit.....	20
B.....	Head
space (espace de tête).....	22
C.....	Détec
teur à ionisation de flamme (FID).....	23
D.....	Valid
ation d'une nouvelle méthode d'analyse en toxicologie analytique par CPG-FID.....	24
I.....	Intro
duction.....	24
II.....	Choi
x de la méthode d'analyse.....	24
III.....	Procé
dure de validation.....	25
1.....	Sélec
tivité.....	26



---

2.....	Linéa
rité .....	26
3.....	Exact
itude / justesse .....	26
4.....	Fidéli
té : répétabilité (ou fidélité intra-jour) et reproductibilité (ou fidélité intermédiaire) .....	27
5.....	Limit
e de quantification (LOQ et de détection (LOD) .....	29
6.....	Stabil
ité .....	29
E.....	Procé
dé expérimental .....	30
I. ....	Objet
.....	30
II. ....	Princ
ipe .....	30
III. ....	Maté
riel.....	30
1.....	Verre
rie .....	30
2.....	Systè
me chromatographique .....	30
3.....	Réact
ifs .....	31
IV. ....	Mode
opérateur .....	31
1.....	Prépa
ration de solutions mères .....	31
2.....	Prépa
ration de la gamme d'étalonnage.....	31
3.....	Prépa
ration des contrôles qualité internes.....	32
4.....	Mani
pulation .....	32
Chapitre III : Résultats et discussion	
I. ....	Valid
ation de la méthode.....	35
1.....	Sélec
tivité .....	35

---



---

2.....	Linéa
rité.....	36
3.....	Juste
sse.....	38
4.....	Inter
valle de confiance .....	40
5.....	Fidéli
té.....	41
a.....	Répét
abilité et fidélité intermédiaire .....	41
6.....	Limit
e de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ) .....	42
7.....	Stabil
ité .....	43
Conclusion .....	46
Référence bibliographiques	
Annexes	



## Liste des abréviations :

CAPM	Centre Anti Poison et de Pharmacovigilance du MAROC
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
FID	Détecteur à ionisation de flamme
OH-4-MP	4-méthylpyrazol ou fomépizole
ADH	Alcool déshydrogénase
ALDH	Aldéhyde déshydrogénase
NAD	Nicotinamide adéninedinucléotide
FDH	Formaldéhydedéshydrogénase
ATP	Adénosine triphosphate
Na-K-ATPase	Sodium Potassium ATPase
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
Tmax	Température maximale
LOQ	Limite de quantification
LOD	Limite de détection
SM	Solution mère
EI	Etalon interne
QSP	Quantité suffisante pour
CQ	Contrôle qualité



## Présentation du Centre Anti Poison et de Pharmacovigilance du

### Maroc :

Le Centre Antipoison et de Pharmacovigilance du Maroc (CAPM) a été créé en 1989. C'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.

Le CAPM veille sur la diminution du nombre total d'intoxications et d'effets indésirables, la réduction des décès et des séquelles toxiques par l'amélioration de la prise en charge du patient intoxiqué et l'évitement des erreurs médicamenteuses. Ces objectifs nécessitent l'élaboration d'une stratégie nationale de lutte et de prévention anti-toxique dont les composantes sont :

- Centraliser les déclarations et les informations sur les effets indésirables des médicaments et autres produits de santé en provenance des professionnels de santé, des industries pharmaceutiques et du public;
- Répondre aux demandes d'informations sur les produits de santé en général et sur leurs effets indésirables en particulier;
- Créer des centres régionaux et coordonner leurs activités;
- Maîtriser la connaissance de l'état épidémiologique;
- Programmer des enquêtes de Pharmacovigilance;
- Participer à l'enseignement et à la formation en Pharmacovigilance et entoxicologie du personnel médical et paramédical;
- Elaborer des conduites à tenir standardisées;
- Assurer la disponibilité des antidotes et des médicaments spécifiques à certains toxiques ;
- Générer les alertes.

### **I. Missions du CAPM :**

#### **1. L'information toxicologique :**

Le centre dispose d'un service téléphonique lancé en 1991. Ce dernier est assuré par un médecin pharmacotoxicologue et fonctionne 24 heures sur 24 et 7 jours sur 7. C'est une unité médicale spécialisée qui consiste à délivrer l'information en réponse à une demande de renseignement en



toxicologie, en pharmacologie ou à une situation d'intoxication. Elle donne des éléments de diagnostic, d'évaluation, de prise en charge thérapeutique et de pronostic.

## **2. La pharmacovigilance :**

Le centre national de pharmacovigilance a été reconnu en 1992 comme le 34<sup>ème</sup> membre du centre collaborateur de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), pour la surveillance des effets indésirables des médicaments (Uppsala Monitoring Centre : UMC).

## **3. La toxicovigilance :**

La toxicovigilance est une spécialité médicale qui s'occupe de la détection, l'évaluation et la prévention des risques encourus par l'homme suite à un contact direct ou indirect par inhalation ou ingestion d'un agent toxique pouvant générer un effet nuisible. Le département s'occupe de l'identification, l'évaluation et de la prévention des risques de toxicité existants dans une communauté pour les réduire ou les éliminer et ceci selon l'analyse des déclarations.

## **4. L'assurance qualité :**

Il s'agit d'un département visant à installer une démarche quantitative pour certifier la conformité du CAPM à un label de qualité internationalement reconnu : la norme ISO 9001 version 2000 pour les départements médicaux et ISO 17025 pour l'accréditation du laboratoire. Elle base son travail sur l'installation de procédures d'analyses, de gestion des ressources matérielles et humaines, de suivi de l'application et d'évaluation des actions pour garantir l'amélioration des prestations, de rendement à coût moindre et de satisfaction du client.

## **5. L'analyse toxicologique et le suivi thérapeutique:**

Le laboratoire de toxicologie et de pharmacovigilance est fonctionnel depuis 1994. Il est installé dans les mêmes locaux que le centre d'information toxicologique. Il couvre les examens de toxicologie médicale ainsi que les dosages des médicaments pour le suivi thérapeutique des patients. Il fonctionne 12 heures sur 24 et 7 jours sur 7. Toutes les techniques utilisées au laboratoire sont validées selon les critères de validation internationale.

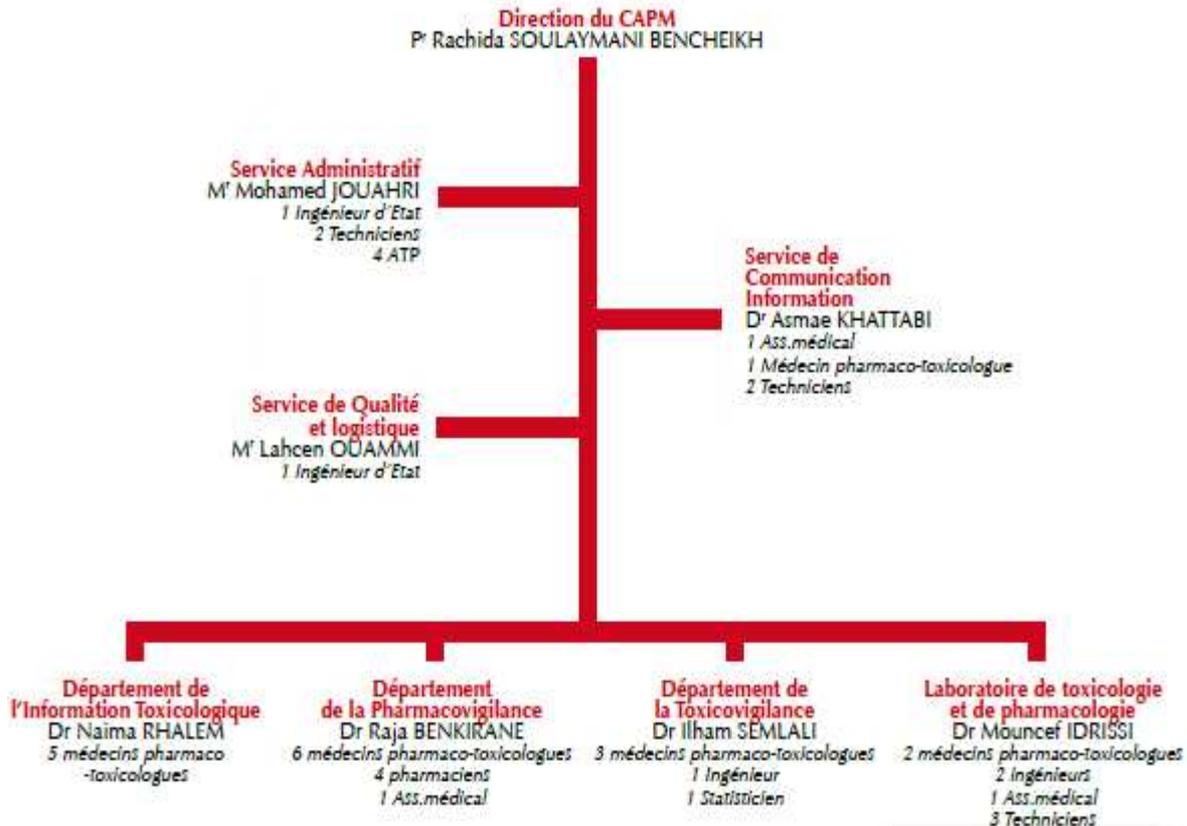
L'unité de toxicologie d'urgence est spécialisée dans l'identification et le dosage des toxiques dans les liquides biologiques (sang, urines et liquide de lavage gastrique) en situation d'urgence, notamment lorsque la connaissance de la quantité de toxique absorbée peut influencer le traitement.

L'unité de suivi thérapeutique assure le dosage des médicaments chez les patients sous traitement chronique afin d'éviter les surdosages qui favorisent l'apparition d'effets indésirables



médicamenteux et les sous dosages qui sont la cause d'échecs thérapeutiques, et de contrôler l'observance du malade au traitement.

## II. Organigramme :



## III. Recommandations et promesses :

Le CAPM constitue un centre de vigilance et d'information unique en matière de toxicologie et de pharmacovigilance. Son personnel diversifié et compétent, son équipement de haute gamme et ses multiples attributions lui ont permis d'acquérir une expertise en matière de toxicologie, qui devra être reconnue officiellement par des textes de loi. Par ailleurs, le CAPM constitue un lieu de formation complémentaire pour les jeunes, les internes et résidents urgentistes et réanimateurs dont le passage devra être institutionnalisé.



## Introduction :

Le méthanol est un alcool très présent dans notre environnement. On le trouve au niveau industriel comme solvant, au niveau domestique il est utilisé comme antigel et dégraissant et c'est aussi un carburant. D'autant plus, le méthanol est la base de la fabrication de certaines matières plastiques, du formol, de l'héxaméthylène-tétramine etc'est l'une des plus importantes matières premières de synthèse. Le méthanol n'est que peu toxique par lui-même, tandis que l'acide formique, produit de son métabolisme, est le responsable de la toxicité oculaire et neurologique [1,2].

Les intoxications aiguës, bien qu'elles, sont toujours potentiellement graves. En France, sur la période de 1980 à 1998, les centres anti-poisons français ont collecté 9461 cas d'intoxication par le méthanol et l'alcool à brûler dont 1975 cas au Centre Antipoison de Marseille. La symptomatologie est présente dans 8 % des cas, 26 % des patients ont été hospitalisés dont 4 % en réanimation. L'évolution des intoxications a été majoritairement favorable. On note cependant 8 cas de séquelles neurologiques ou oculaires et un décès [3]. Au cours des dernières années jusqu'à 2003, une quinzaine de patients par an ont été hospitalisés en réanimation médicale et toxicologique à l'hôpital Lariboisière pour ingestion accidentelle ou suicidaire de méthanol, et on retrouve une mortalité élevée de 89% sur 50 patients qui est due à l'acidose métabolique profonde [4].

Selon les données du Centre Anti Poison et de Pharmacovigilance du Maroc (CAPM), les premiers cas d'intoxication aiguë par le méthanol remontent à 1997, impliquant 76 sujets ayant consommé une boisson vendue comme de la vodka à partir d'un bateau russe, en passage au port de Safi ; le résultat fut 9 décès et 3 cas de cécité. En 2005 à Tiznit, ce fut 2 cas de décès liés à la prise d'alcool à brûler à 90%, contenant du méthanol à 100%. En 2008, 4 cas de décès et un cas de cécité ont été enregistrés à Rabat suite à la prise de méthanol dans de l'alcool frelaté. En décembre 2000, 8 cas de décès à Oued Zem (Province de Khouribga), chez des Sans Domicile Fixe (SDF) suite à la prise de l'alcool à brûler, et un 9ème cas qui a été mis sous hémodialyse et a bien évolué. Les analyses effectuées ont montré la présence du méthanol en grandes concentrations dans l'alcool consommé [5].

Le diagnostic est suspecté devant les données de l'interrogatoire, les signes cliniques neurologiques et ophtalmologiques, et la présence simultanée d'une acidose avec trou anionique et d'un trou osmolaire. La confirmation se fait par le dosage du méthanol au niveau sanguin. Le



traitement consiste en une alcalinisation, l'administration d'antidotes qui sont des inhibiteurs de son catabolisme (éthanol et fomépizole) et sur l'hémodialyse dans les cas les plus graves [1,2].

Le dosage du méthanol et ses métabolites dans le sang constitue une étape importante dans la confirmation du diagnostic, l'orientation du clinicien dans la prise en charge qui reste lourde et la surveillance du traitement antidotique [5].

En effet, il existe plusieurs méthodes physiques ou chimiques qui permettent le dosage du méthanol dans le sang [5].

Au Maroc, le Laboratoire de Toxicologie et de Pharmacologie du (CAPM) contribue à l'orientation du médecin clinicien dans les différentes situations d'intoxication auxquelles il est confronté; à travers l'élaboration de protocoles de détection et de dosage de xénobiotiques. Parmi ces protocoles figure celui du dosage sanguin du méthanol.

Cependant, L'adoption d'une méthode analytique nécessite son expérimentation, sa mise au point puis sa validation.

Dans ce sens, ce présent travail a comme objectif la mise au point et la validation d'une méthode de dosage du méthanol dans le sang par la chromatographie en phase gazeuse (CPG) avec injecteur « Headspace » couplée à un détecteur à ionisation de flamme (FID) afin d'instaurer par la suite une méthode fiable et reproductible. Cela principalement dans le but de doser le méthanol en cas d'intoxication au niveau du Laboratoire de Toxicologie et de Pharmacologie du (CAPM).



# *CHAPITRE I :*

# *Monographie du*

# *méthanol*

## **I. Usage :**



Le méthanol est largement utilisé comme solvant industriel dans les peintures, vernis, encres, colorants, adhésifs, et films. Il est également utilisé comme matière première pour la fabrication de formaldéhyde, acide acétique, dérivés méthyliques, acides inorganiques, antigel, carburant additif antigivrage et booster d'octane du carburant. C'est un constituant du méthylène-régie, dénaturant des alcools, un agent d'extraction, un solvant d'extraction, et en tant que combustible pour poêles de pique-nique et des torches à souder. Le méthanol est en outre utilisé en tant que solvant pour la fabrication du cholestérol, la streptomycine, les vitamines, les hormones, et d'autres produits pharmaceutiques[7,8,9].

## II. Propriétés physico-chimiques :

Le méthanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) est un liquide incolore, volatil, inflammable et à odeur caractéristique[10]. Dans son état pur, il a une odeur légèrement sucrée à température ambiante, et sous sa forme brut il peut avoir une répugnante odeur âcre [8,9,10].

Ses principales caractéristiques physiques sont les suivantes :

*Tableau 1 : propriétés physiques du méthanol.*

<b>Formule</b>	$\text{H}_3\text{C} - \text{OH}$
<b>Masse molaire</b>	32.04 g/mol
<b>Point de fusion</b>	-97.8 °C
<b>Point d'ébullition</b>	64.5 °C
<b>Densité</b>	0.7915
<b>Température d'auto inflammation</b>	464 °C

Il est soluble dans l'eau, l'éthanol, l'éther, le benzène, les cétones et les hydrocarbures halogénés. C'est un bon solvant des colorants, graisses, résines, matières plastiques, ainsi que de nombreux sels inorganiques ( $\text{NaI}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ...). Il est aussi est dialysable.

La fonction alcool confère au méthanol des propriétés chimiques importantes :

- Il est estérifiable par les acides organiques et inorganiques avec formation d'esters méthyliques qui peuvent présenter un intérêt analytique.
- C'est un réducteur qui est oxydable sous l'action des oxydants usuels ( $\text{KMnO}_4$  ou  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  en milieu acide) en formaldéhyde puis en acide formique.



➤ Sa réaction avec les métaux alcalins donne un méthylate avec dégagement d'hydrogène et peut être brutale. La plupart des autres métaux sont insensibles au méthanol, à l'exception du plomb, de l'aluminium et du magnésium.

### III. Circonstances des intoxications :

Le méthanol peut être responsable d'intoxications par différents moyens :

➤ Exposition professionnelle : lors de son utilisation comme agent de synthèse (formaldéhyde, esters méthyliques), et comme solvant et agent d'extraction. Les intoxications aiguës, ou surtout chroniques, sont alors consécutives à l'inhalation de vapeurs de méthanol et sont plus rare au contact avec les téguments.

➤ Accidentellement : généralement à partir de produits contenant du méthanol comme l'alcool à brûler (alcool dénaturé par addition de méthylène rouge contenant une forte proportion de méthanol et d'acétone) et l'alcool frelaté de contrebande (vente de méthanol à la place de l'éthanol dans les boissons alcoolisées).

➤ Environnemental : sa présence éventuelle dans des carburants de substitution est susceptible de poser des problèmes sanitaires et environnementaux.

### IV. Toxicocinétique:

#### 1. Absorption :

Le méthanol peut être absorbé par trois voies :

➤ Digestive : après ingestion unique, la concentration sanguine atteint un pic en 30 à 60 minutes.

➤ Pulmonaire : le taux de rétention pulmonaire a été estimé à 58%.

➤ Cutanée : le taux d'absorption a été estimé à  $0.192 \text{ mg/cm}^2/\text{min}$ , soit comparable à celui du benzène, du xylène et du sulfure de carbone [11].

#### 2. Diffusion :

Le méthanol se diffuse rapidement dans l'eau totale de l'organisme avec un volume de diffusion qui est de 0,6 à 0,7 l/kg de poids corporel, et sa demi-vie plasmatique est d'environ 8 à 28 heures. Au bout de quelques heures, la concentration du méthanol dans le liquide céphalorachidien est supérieure à celle dans le sang [2].



### 3. Métabolisme :

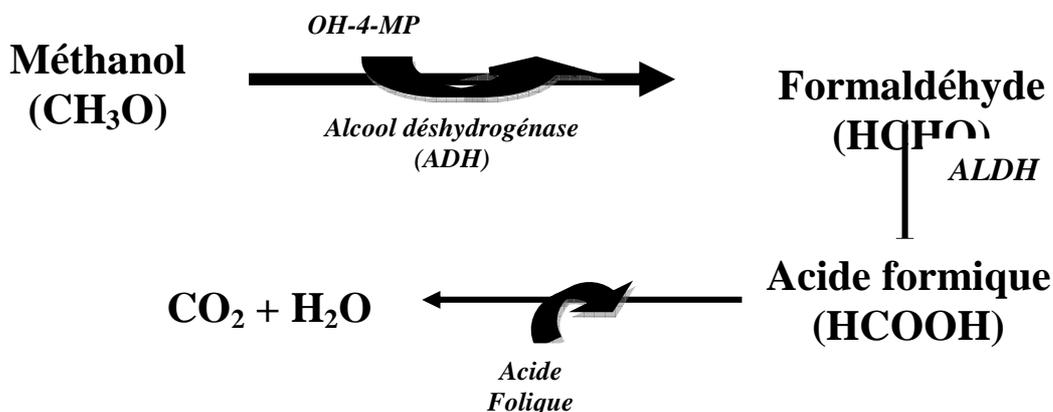
La toxicité du méthanol est liée à ses métabolites qui sont neurotoxiques et responsables d'acidose métabolique [12].

Le méthanol subit un métabolisme oxydatiftoxifiant, principalement au niveau du foie. Le processus se développe en trois étapes (figure.1):

➤ La majeure partie du méthanol résorbé (90 à 95 %) subit un métabolisme hépatique par oxydation en formaldéhyde sous l'action de l'alcool-déshydrogénase (ADH) cytoplasmique à nicotinamide adéninedinucléotide (NAD).

➤ Oxydation rapide du formaldéhyde en acide formique (toxique fonctionnel, potentiellement lésionnel, et principal métabolite responsable de la toxicité du méthanol) sous l'action de la formaldéhyde-déshydrogénase (FDH) cytoplasmique utilisant le glutathion, et de l'aldéhyde-déshydrogénase (ALDH) mitochondriale à NAD. Les formiates retrouvés dans le sang sont en partie excrétés dans les urines.

➤ Oxydation de l'acide formique en  $\text{CO}_2$ , sous l'action de la 10-formyltétrahydrofolate-déshydrogénase [2,12].



*Figure 1 : Schéma simplifié du métabolisme du méthanol*

### 4. Elimination :

Le méthanol peut être éliminé sous forme inchangée dans les urines (3 à 10%) ou dans l'air expiré (10 à 30%) par voie pulmonaire mais d'une façon assez lente [6] (figure 2).



Les formiates (dérivés de l'acide formique) s'accumulent dans l'organisme en raison de la lenteur de leur dégradation, mais sont excrétés dans les urines.



*Figure 2 : voies d'élimination du méthanol.*

## V. Dosage analytique :

En dehors des examens biologiques permettant de suivre l'évolution des paramètres précédemment cités, il faut procéder à la recherche et au dosage :

- Du méthanol lui-même dans le sang, l'urine et le liquide incriminé (si on dispose d'un échantillon) ;
- De l'acide formique dans le sang et l'urine.

### 1. Dosage du méthanol :

Il repose sur l'application de méthodes chimiques ou physiques :

#### a. Méthodes chimiques :

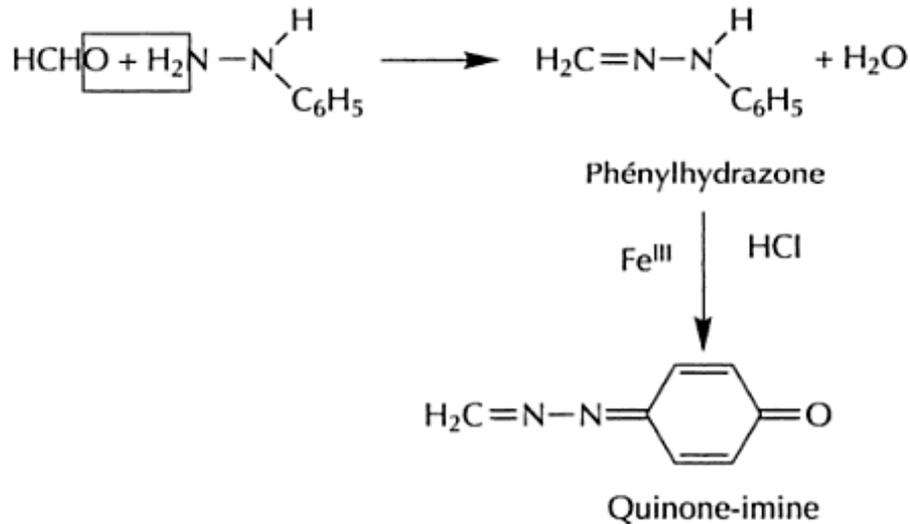
Le méthanol est isolé en premier lieu dans le plasma par distillation en présence d'acide picrique. Il est ensuite oxydé spécifiquement en formaldéhyde par le permanganate de potassium en milieu sulfurique. Le formaldéhyde est enfin dosé par colorimétrie, selon l'une des réactions suivantes [11]:

- Coloration violet-rouge avec la fuchsine basique décolorée, en présence d'acide sulfurique concentré (réaction de schiff), permet de distinguer entre l'intoxication par l'éthanol ou par le méthanol ;

- Coloration rouge avec l'acide chromotrope (acide 1,8-dihydroxynaphtalène -3,6-disulfurique) en présence d'acide sulfurique concentré (réaction d'Eegriwe);



- Coloration rouge avec le phénylhydrazine et le ferricyanure de potassium en milieu chlorhydrique, par formation d'une quinone-imine (réaction de Schryver) comme le montre le schéma suivant (figure 3) [6] :



*Figure 3 : réaction de Schryver.*

Dans les trois cas, le dosage est terminé par une lecture spectrométrique.

**b. Méthodes physiques :**

➤ **Méthodes enzymatiques :**

Des méthodes d'analyse enzymatiques de l'éthanol sont utilisées par de nombreux laboratoires cliniques, mais ne permettent pas de détecter de manière fiable le méthanol. La technique de chromatographie en phase gazeuse Headspace est la méthode de choix. D'ailleurs, elle est actuellement utilisée pour le dosage quantitatif du sérum de méthanol et d'acide formique [15].

➤ **Chromatographie en phase liquide haute performance :**

Une méthode de chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) a été développée pour analyser simultanément des échantillons post-mortem biologiques pour le méthanol, l'éthanol et l'alcool isopropylique. La limite de détection est de 5 mg/dl, une linéarité allant jusqu'à 500 mg/dl, et une reproductibilité supérieure à 90% [16].

➤ **Résonance magnétique nucléaire :**



Une technique utilisant un procédé de protons à résonance magnétique nucléaire (RMN  $^1\text{H}$ ) spectroscopie, pour la détermination quantitative plasmatique et urinaire du méthanol, l'éthylène glycol, et leurs métabolites (le formiate et le glycolate). Cette méthode offre les avantages d'un diagnostic rapide et une taille réduite de l'échantillon [17].

➤ **Chromatographie en phase gazeuse :**

⇒ Afin d'étudier la toxicocinétique du méthanol, la chromatographie en phase gazeuse (CPG) avec injection Headspace a été utilisée afin de déterminer la concentration sanguine du méthanol. Pour son dosage, 0,5 ml de sang était mélangé à 0,1 ml d'étalon interne (2-méthylpropanol 0,02 g/l) et 0,5 ml de carbonate de potassium saturé. L'échantillon de sang était incubé pendant 22 minutes à 60° C. La séparation était réalisée sur colonne Carbowax 1500 en conditions isothermiques (température de 100° C). La température du détecteur à flamme ionisée (FID) était de 200° C. Les chromatogrammes étaient enregistrés et les résultats étaient calculés à l'aide du logiciel Turbochrom. La limite de détection était de 0,05mg/l et la limite de quantification était de 0,1 mg/l, avec des coefficients de variation de 4,3% et 5,1% [18].

⇒ Une autre étude s'est intéressée au dosage plasmatique du méthanol par CPG-FID. Les prélèvements de sang ont été centrifugés afin de séparer le plasma. Ces derniers surchargés par du méthanol à 1 g/l et d'isopropanol (étalon interne à 1,9 g/l) ont été préparés. Les conditions opératoires étaient : température du four : 160 °C, pression d'azote (gaz vecteur) : 2,5 bars, température de l'injecteur : 240 °C, température du détecteur : 250 °C. À l'aide d'une seringue, 1 µl du mélange étaient injectés dans la colonne du chromatographe. La limite de détection de cette méthode était de 0,02 g/l, la sensibilité de 0,05 g/l. La technique est linéaire entre 0 g/l et 3g/l. Cette méthodologie permet donc un diagnostic fiable de l'intoxication aiguë par le méthanol, quels que soient les délais de prise en charge des patients [19].

## 2. Dosage de l'acide formique :

La détermination sanguine de l'acide formique est beaucoup moins courante, bien que la concentration de ce métabolite soit mieux corrélée aux effets toxiques que celle du méthanol. Un certain nombre de méthodes par CPG-FID ont été développées et consistent, le plus souvent, à l'isolement par des techniques en Headspace, et estérification par le méthanol ou l'éthanol en formiate de méthyle ou d'éthyle.



---

Il est aussi possible de réaliser ce dosage par une technique enzymatique spécifique utilisant une déshydrogénase bactérienne couplée à une réaction fluorescente ;

L'augmentation de la concentration sanguine des formiates (formiatémie) est plus tardive que celle du méthanol lui-même (méthanolémie). Elle peut aussi s'observer dans l'intoxication par le formaldéhyde [1,11].



---

# ***CHAPITRE II :***

## ***Matériel et méthode***



## A. Chromatographie en phase gazeuse :

### I. Introduction :

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique très répandue dont les premières applications sont vieilles de plus de 60 ans. Son développement, qui n'a cessé depuis, est dû à son extrême sensibilité, à sa polyvalence, à la rapidité de mise au point des analyses nouvelles et aux possibilités d'automatisation qui augmentent encore plus son intérêt. La séparation sur la colonne se faisant sur des composés qui doivent être à l'état gazeux, l'analyse des liquides ou solides impose de pouvoir les transformer à l'état de vapeur par chauffage. C'est sans doute la principale contrainte à laquelle il faut penser avant de choisir cette technique, puisqu'elle limite son emploi à l'étude des composés moléculaires thermostables et suffisamment volatils. La très grande sensibilité des détecteurs permet de déceler des quantités de l'ordre du picogramme pour certains composés. Les applications sont très nombreuses dans tous les domaines et les développements de la chromatographie gazeuse à grande vitesse ou multidimensionnelle rendent cette technique toujours plus attractive [20].

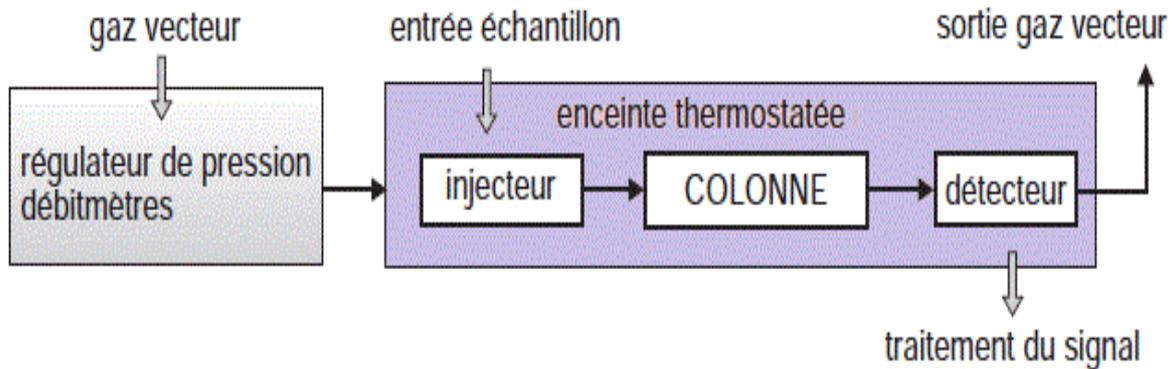
En chromatographie en phase gazeuse, l'échantillon est vaporisé et injecté en tête de colonne. L'éluion est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile. Contrairement à la plupart des autres chromatographies, il n'y a pas d'interaction entre les molécules d'analyte et la phase mobile ; la seule fonction de celle-ci est de transporter l'analyte dans la colonne. [21]

### II. Principe :

La chromatographie en phase gazeuse est une technique d'analyse de routine essentielle dans de nombreux laboratoires.

Un appareil de CPG réunit dans un bâti unique, outre les trois modules classiques, injecteur, colonne et détecteur, un four thermostaté qui permet de porter, si nécessaire, la colonne à une température élevée (figure 4). La phase mobile qui entraîne l'échantillon dans la colonne est un

gaz, appelé *gaz vecteur*. Les débits, contrôlés avec précision, permettent une grande répétabilité des temps de rétention [20].



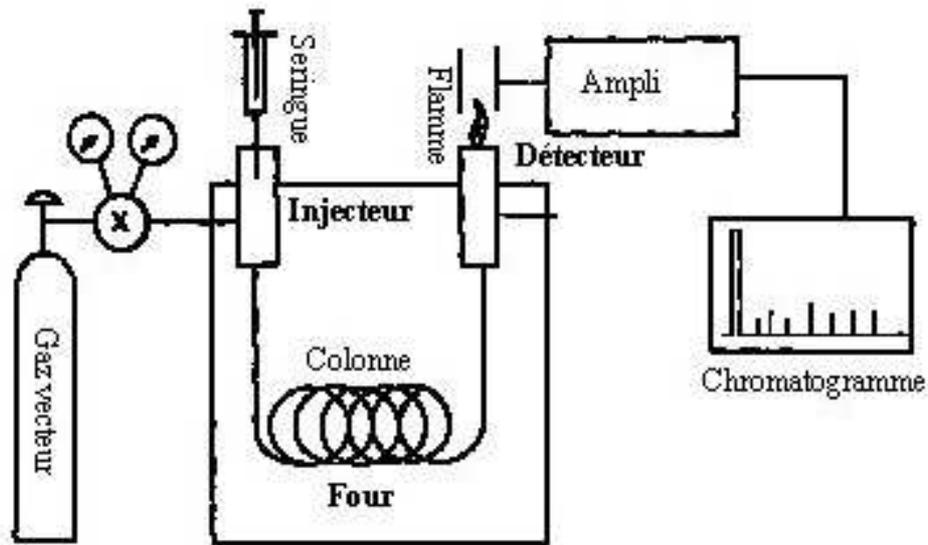
*Figure 4 : principe du fonctionnement d'une CPG.*

L'analyse débute à l'instant où on introduit une très petite quantité de l'échantillon (1ml), sous forme liquide ou gaz, dans l'injecteur, qui a la double fonction de le porter à l'état de vapeur et de l'amener dans le flux gazeux, sans décomposition, en tête de la colonne. Celle-ci se présente comme un tube de faible section enroulé sur lui-même, de 1 à plus de 100 m de longueur suivant les cas et contenant la phase stationnaire. Cette colonne est placée dans une enceinte à température régulée. Elle peut servir à des milliers d'injections successives. La phase gazeuse qui a traversé la colonne passe dans un détecteur avant de sortir à l'air libre.

En CPG il y a quatre paramètres opérationnels pour une phase stationnaire donnée : (L) longueur de la colonne, (u) vitesse de la phase mobile, (T) température de la colonne et (b) rapport de phase. Les réglages du chromatographe permettent d'agir sur T et sur U, donc sur l'efficacité et sur les facteurs de rétention.

### III. Instrumentation :

Dans la configuration la plus classique, le chromatographe est équipé d'un injecteur, d'une colonne capillaire et d'un détecteur à ionisation de flamme. Les données sont traitées par système informatique (figure 5).



*Figure 5 : schéma simplifié du chromatographe en phase gazeuse*

### 1. Enceinte thermostatée (Four) :

Le chromatographe comporte une enceinte qui permet de chauffer la colonne jusqu'à plus de 400°C. Elle doit avoir une faible inertie thermique pour permettre une montée contrôlée et rapide en température (rampe pouvant aller jusqu'à 100°C/min) et une excellente stabilisation.

La température du four peut être :

- Stable et identique du début à la fin de la manipulation (conditions isothermes) ;
- Programmée par palier successif (mode gradient).

### 2. Colonnes :

La colonne, balayée en permanence par le gaz vecteur, est placée dans le four, c'est un tube de faible section enroulé sur lui-même et contenant la phase stationnaire. Il existe deux types de colonnes, les colonnes *remplies* (ou colonnes à *garnissage*) et les colonnes *capillaires*, n'offrant pas les mêmes performances.

#### ➤ Colonnes remplies (à garnissage) :

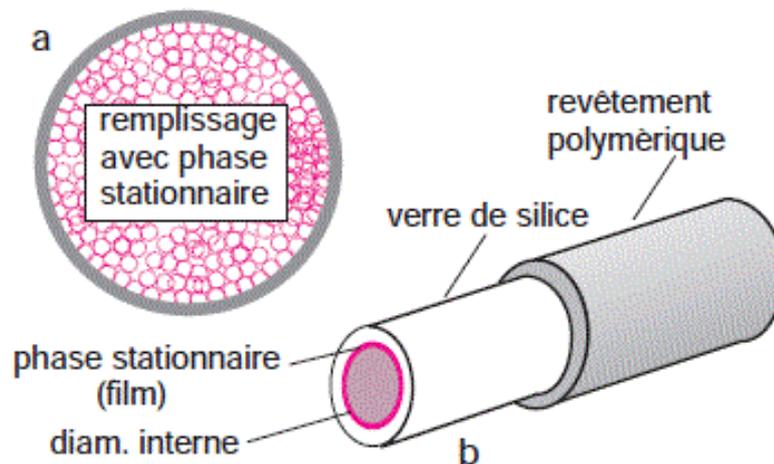
Ces colonnes (figure 7), d'un diamètre de 3,18 ou 6,35 mm et de 1 à 3 m de long, sont fabriquées à partir d'un tube d'acier ou de verre dont la paroi interne est traitée pour éviter d'éventuels effets catalytiques sur l'échantillon. Elles supportent un débit de gaz vecteur allant de 10 à 40 ml/min. Elles sont remplies d'un support poreux et inerte sous forme de grains sphériques.

Bien qu'ayant des performances moins élevées que les colonnes capillaires, elles sont toujours utilisées pour certaines analyses de routine normalisées.

➤ **Colonnes capillaires :**

Les colonnes capillaires sont plus résolutive que les colonnes remplies, et sont généralement en silice fondue de grande pureté, le diamètre interne de ces colonnes varie de 100 à 530  $\mu\text{m}$ . La technologie est particulièrement délicate en ce qui concerne l'obtention de colonnes parfaitement cylindriques dont la longueur peut aller de 10 à 100m pour une paroi d'environ 50  $\mu\text{m}$ . Elles comportent un revêtement extérieur brun de polyamide, polymère thermiquement stable ( $T_{\text{max}} = 370\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), pour les rendre moins fragiles et pouvoir les enrouler sur elles-mêmes grâce à un support métallique adapté. La phase stationnaire recouvre la paroi interne sur une épaisseur régulière pouvant aller de 0,05 à 5  $\mu\text{m}$ . Elle est directement déposée ou greffée sur la paroi interne par des liaisons covalentes (figure 7).

Pour les colonnes capillaires, les phases stationnaires correspondent à deux principaux types de composés: les polysiloxanes (également connus sous le nom d'huiles et gommages silicones) et les polyéthylène-glycols (polymères polaires), chaque catégorie pouvant faire l'objet de modifications structurales mineures.



*Figure 7 : a) colonne remplie, b) colonne capillaire*

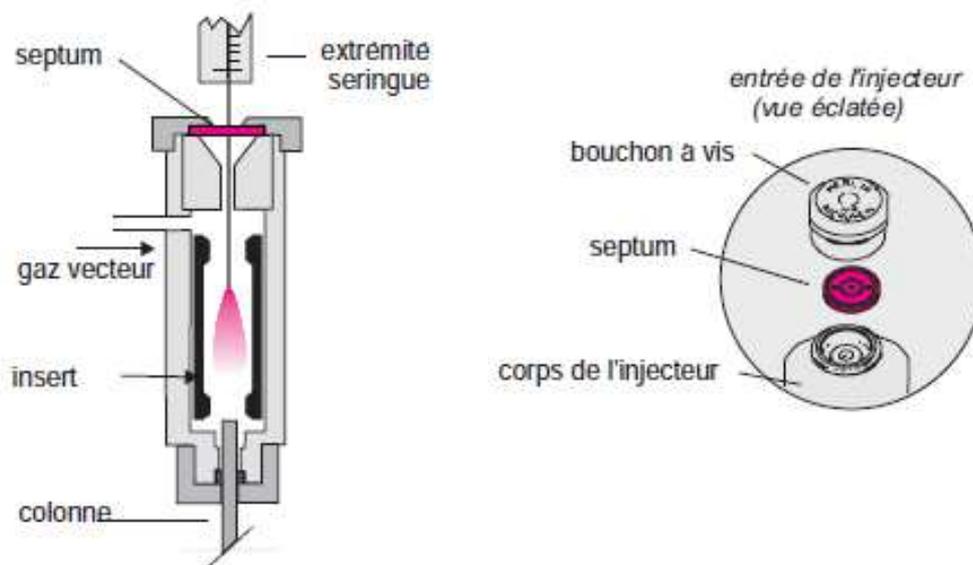
### 3. Injecteurs :

L'injecteur est placé à la porte d'entrée de l'échantillon dans le chromatographe. Il a deux fonctions : vaporiser et entraîner en tête de colonne l'échantillon mélangé au gaz vecteur. Les caractéristiques des injecteurs, ainsi que les modes d'injection, diffèrent suivant les types de

colonnes auxquels ils sont réunis. La qualité des séparations dépend de cette phase de l'analyse, on distingue :

➤ Un injecteur à vaporisation directe :

Il consiste en un tube métallique doublé d'un chemisage de verre (appelé insert), balayé par le gaz vecteur et chauffé à la température moyennée d'ébullition des composés à chromatographier. L'aiguille de la micro-seringue contenant l'échantillon traverse l'extrémité de l'injecteur obturée par une pastille d'élastomère en silicone (le septum), tandis que l'autre extrémité est raccordée à la colonne également chauffée (figure 8). La totalité de l'échantillon introduit, immédiatement vaporisé, part dans la colonne en quelques secondes. Cette méthode convient pour les colonnes remplies et les grosses colonnes capillaires quand le débit de gaz vecteur atteint au moins 8 ml/min.



*Figure 8 : Injecteur à vaporisation directe utilisé pour colonnes remplies. Schéma de base d'un modèle classique à septum.*

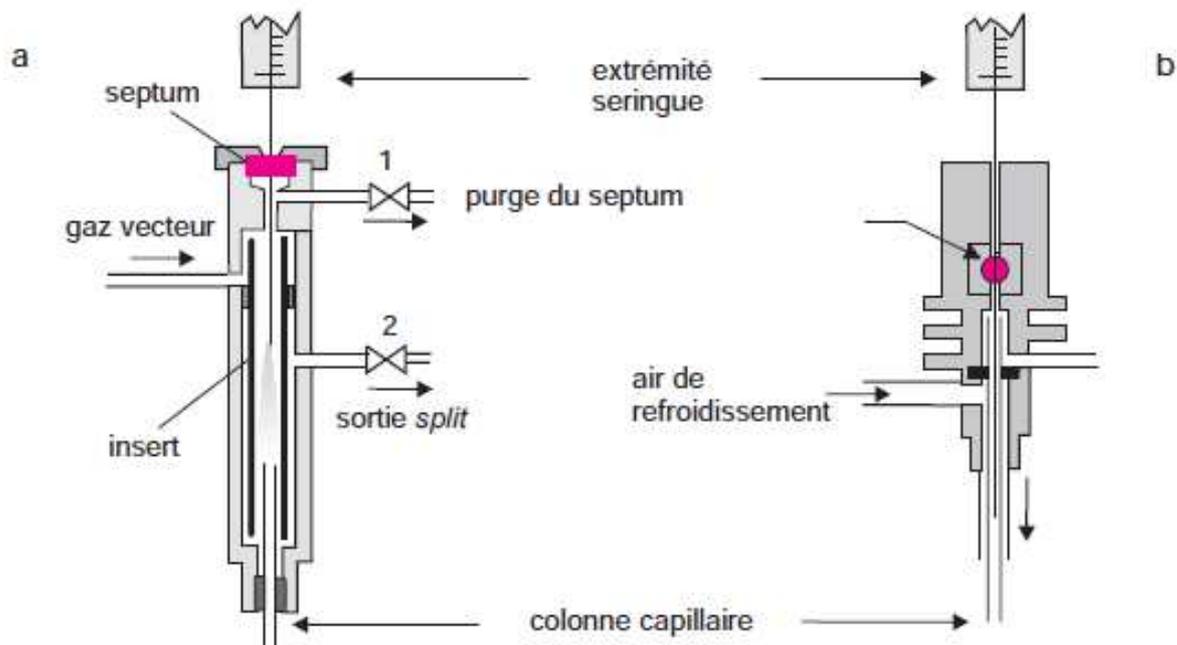
➤ Un injecteur avec ou sans division :

Pour les colonnes capillaires, à faible capacité d'échantillon, les plus petits volumes qu'il est possible de prélever avec une micro-seringue (0,1 ml) peuvent saturer la colonne. On utilise alors des injecteurs pouvant fonctionner suivant deux modes, avec ou sans division (encore appelés split ou splitless).

Un courant de gaz vecteur arrive avec un grand débit dans la chambre de vaporisation où il se mélange à l'échantillon injecté (figure 9). Une vanne de fuite, couramment réglée entre 50 et 100

ml/min, divise ce débit en deux fractions et seule la plus petite fraction pénètre dans la colonne. C'est le principe du mode split.

Ce type d'injecteur peut également fonctionner en mode splitless. Dans ce mode d'introduction qui est réservé aux échantillons en solution très diluée, on injecte lentement le contenu de la microsiringue en laissant la vanne 2 (figure 9) en position fermée durant 0,5 à 1 minute, afin que les composés vaporisés avec le solvant se concentrent dans les tous premiers décimètres de la colonne. Ce mode d'injection se fait à une température assez basse, au départ, pour que le solvant précède les composés dans la colonne.



*Figure 9 : a) chambre d'injection Split.*

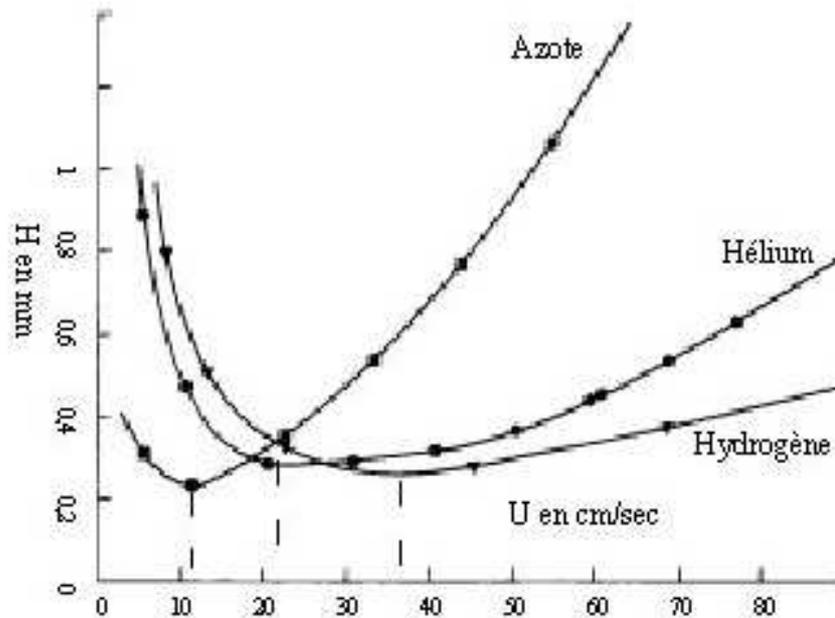
*b) injection à froid dans la colonne (Splitless)*

#### 4. Gaz vecteur et régulateur de débit :

On utilise comme phase mobile l'un des trois gaz suivants : l'hélium, l'azote ou l'hydrogène qui sont de faible viscosité. Le gaz est contenu dans des bouteilles munies d'un manomètre, ce qui a l'avantage de fournir sur place un gaz très pur. Ce gaz vecteur doit être exempt de traces d'hydrocarbures, de vapeur d'eau et de dioxygène qui se comportent comme des impuretés préjudiciables pour certaines phases stationnaires polaires, et qui réduisent la sensibilité des



détecteurs. La nature du gaz vecteur ne modifie pas de manière significative les valeurs des coefficients de distribution des composés suite à l'absence d'interaction entre gaz et solutés. La température est le seul facteur de modification important. En revanche, la viscosité et la vitesse du gaz dans la colonne ont une influence sur la dispersion des composés dans la phase stationnaire et sur la diffusion dans la phase mobile (équation de Van Deemter), donc sur le paramètre d'efficacité  $N$  et sur la sensibilité de la détection (figure 6).



*Figure 6 : Efficacité en fonction de la nature et de la vitesse linéaire du gaz vecteur*

Ces courbes typiques de Van Deemter montrent que la vitesse optimale de l'hydrogène est 3 fois plus grande que celle de l'azote. Les analyses employant l'hydrogène pourront donc être effectuées 3 fois plus rapidement que celles utilisant l'azote (à efficacité constante). Malheureusement, l'hydrogène est un gaz dangereux présentant des risques d'explosion. Pour ces raisons de sécurité, c'est l'hélium qui est en général utilisé.

A l'alimentation en gaz sont associés des régulateurs de pression, de jauges et des débitmètres afin que la pression en tête de colonne soit stabilisée avec le débit qui demeure constant, et souvent un tamis moléculaires qui élimine l'eau et d'autres impuretés. En effet, pour une analyse réalisée en mode de programmation ascendante de température, la viscosité de la phase stationnaire ainsi que la perte de charge augmentent au cours du temps. Il est donc préférable que la pression soit corrigée



pour conserver au gaz vecteur une vitesse constante et optimale. Il en résulte une analyse plus rapide et une longévité accrue des colonnes [21].

## B. Headspace (espace de tête) :

L'espace de tête est un dispositif d'extraction, fonctionnant en tandem avec une installation de CPG (figure 10), et réservé à l'analyse des composés volatils présents dans une matrice non chromatographiable. Le principe est illustré par deux variantes :

- Le mode statique : l'échantillon remplit incomplètement un petit récipient de verre fermé par un bouchon transperçable. Après une période d'équilibre thermodynamique entre les phases en présence, on prélève un peu de vapeur en équilibre. Dans ces conditions, la quantité de chaque composé volatil dans le volume d'espace de tête est proportionnelle à sa concentration dans la matrice. Après étalonnage (méthode du standard interne ou externe), il est possible de faire correspondre les concentrations réelles dans l'échantillon avec celles des vapeurs injectées dans le chromatographe.
- Mode dynamique : on opère dans un récipient spécial ouvert, appelé échantillonneur, contenant la phase aqueuse à extraire. On fait barboter un gaz vecteur, tel l'hélium, dans cette solution pour entraîner les parties volatiles vers un piège « purge and trap » où elles sont adsorbées et concentrées. Puis on procède à une désorption thermique du piège à contre-courant en vue de l'injection dans le chromatographe.

Cette technique est semi-quantitative.



*Figure 10 :HeadspaceAgilent 7694E associé à une CPG.*

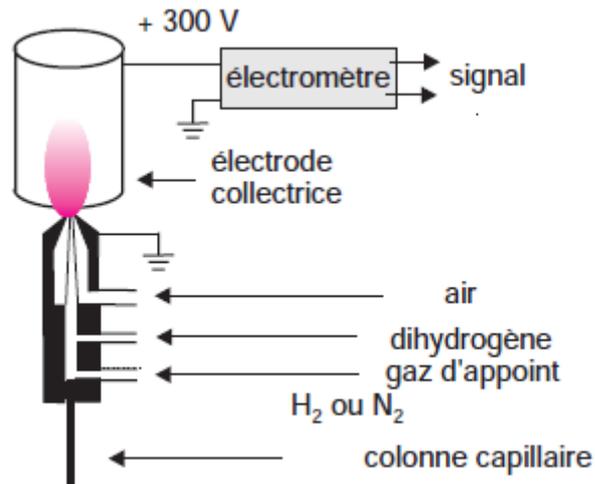
Le Headspace est une technique où les vapeurs de gaz sont en haut et en équilibre avec le liquide à prélevé. L'avantage de cette approche est que la chromatographie en phase gazeuse peut être utilisée comme technique d'analyse, offrant ainsi quatre à cinq ordres de plus grande magnitude de sensibilité. La procédure comprend l'extraction d'un volume de gaz d'équilibre au-dessus de l'échantillon à l'aide d'une seringue à travers un flacon contenant un lit d'un absorbant approprié. Le flacon est chauffé et placé en ligne avec une colonne capillaire, l'échantillon est vaporisé et balayé sur la colonne, et les composants séparés.

### **C. Détecteur à ionisation de flamme (FID) :**

Le détecteur permet de mettre en évidence le passage des différents gaz séparés par la colonne. La détection peut être basée sur des techniques de mesures différentes.

Détecteur à ionisation de flamme (FID) : Considéré comme pratiquement universel pour les composés organiques, c'est le détecteur par excellence de la CPG actuelle. Le courant gazeux issu de la colonne pénètre dans la flamme d'un petit brûleur alimentée par un mélange d'hydrogène et d'air. Ce détecteur détruit l'échantillon dont la combustion produit des ions et particules chargées,

qui sont responsables du passage d'un courant ionique extrêmement faible (10–12A) entre deux électrodes. L'extrémité du brûleur sert d'électrode de polarisation, et la seconde électrode de forme annulaire entoure la flamme. Le signal est amplifié par un électromètre en une tension mesurable (figure 11). Pour les composés organiques, l'intensité du signal est sensible au débit massique de l'échantillon, sachant bien que la présence de certains hétéro-éléments, tels les halogènes, peut modifier notablement la réponse. L'aire du pic reflète donc la masse du composé.



*Figure 11 : détecteur FID.*

## D. Validation d'une nouvelle méthode d'analyse en toxicologie analytique par CPG-FID :

### I. Introduction :

La maîtrise de la qualité des analyses est une préoccupation importante. La démarche à suivre ne se limite pas à la production de procédures dont le suivi assure la traçabilité totale des résultats, conditions nécessaires à l'accréditation. Elle intègre également la qualification de l'appareillage utilisé, son suivi et surtout la validation de la méthode de dosage qui permet de prouver que cette méthode répond bien aux besoins pour lesquels elle a été développée. Cela avec la possibilité de la transférer dans un autre laboratoire. Ceci impose une caractérisation précise des critères de la méthode.



Lors des études de pharmacocinétiques, toxicocinétiques et du suivi thérapeutique des patients, il est important d'utiliser une méthode analytique correctement validée pour obtenir des résultats fiables qui pourront être ainsi interprétés de façon satisfaisante.

Ce document a pour but d'une part de présenter les différents critères de validation d'une méthode de dosage en bioanalyse, en vue de son application à l'analyse d'échantillon en routine [22]. Et d'autre part, de traiter essentiellement la validation d'une méthode chromatographique en phase gazeuse avec détecteur FID.

## II. Choix de la méthode d'analyse :

Le choix de la méthode d'analyse et surtout le pré-traitement de l'échantillon biologique sont des étapes clés qui précèdent la validation proprement dite. En effet, les matrices biologiques contiennent une multitude de composés endogènes (protéines dans le plasma, acides gras dans l'urine) souvent en concentrations bien plus fortes que les analytes ou leurs métabolites qui peuvent interférer avec les composés à doser. Le développement d'une méthode de dosage comprend [22] :

- Le choix du solvant dans lequel l'analyte sera solubilisé et stabilisé. Il faudra vérifier le risque d'interaction contenant/analyte. Il est ainsi possible de silaniser la verrerie afin d'empêcher l'adsorption de l'analyte sur le verre.
- Le choix de la matrice : la méthode devra être validée dans chaque matrice dans laquelle le composé sera dosé. Il faudra ensuite s'assurer que les prélèvements soient conservés dans de bonnes conditions. En effet toutes variations de pH du plasma ou du sang peuvent modifier le pourcentage de liaison aux protéines plasmatiques et la stabilité des composés. De même, il faudra s'assurer que l'anticoagulant choisi n'a pas d'influence sur les performances de la méthode analytique utilisée pour quantifier le composé.
- Le choix de l'étalon interne : généralement, l'étalon interne est un composé de même série chimique que l'analyte. Il doit s'extraire dans les mêmes conditions et doit avoir un temps de rétention différent de l'analyte.
- Le choix du système d'analyse.
- Le choix du système de détection.
- Le choix de la relation entre concentration de l'analyte dans la matrice et réponse du détecteur.
- Le temps d'analyse.



Les différentes étapes du développement de la méthode analytique doivent être écrites et archivées afin de justifier les choix et d'être consultables pendant l'étape de validation.

### III. Procédure de validation :

La validation d'une méthode en bioanalyse comprend une succession de procédures afin de démontrer que la méthode utilisée permet de quantifier un analyte dans une matrice particulière pour une application précise. Différents paramètres permettent de définir l'acceptation d'une méthode analytique : sélectivité, linéarité, exactitude, justesse, fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire), limite de quantification et de détection, et stabilité. La validation est un événement dynamique et adaptable en fonction de son application et des conditions opératoires.

#### Validation complète :

La validation complète est nécessaire à chaque fois qu'une nouvelle méthode de dosage d'un ou plusieurs analytes est développée par le laboratoire, et devant être réalisée avec toutes les matrices qui seront utilisées par la suite en routine (plasma, urine).

Appelée aussi méthode quantitative, elle fournit un résultat chiffré sur une échelle continue, dont les limites basses et hautes sont connues, en relation directe avec une quantité ou une activité donnée de l'analyte à mesurer [23].

#### 1. Sélectivité :

C'est la capacité d'une méthode d'analyse de convenir exclusivement à la détermination de la grandeur de l'analyte considéré, avec la garantie que le signal mesuré provient seulement de l'analyte [29].

➤ La **sélectivité** est l'aptitude d'une méthode analytique à quantifier l'analyte et à le séparer des produits de dégradation, des métabolites et des composés coadministrés [22].

#### 2. Linéarité :



C'est la capacité d'une méthode d'analyse, à l'intérieur d'un certain intervalle, à fournir une valeur d'information ou des résultats proportionnels à la quantité en analyte à doser dans l'échantillon pour le laboratoire [29].

Il est nécessaire d'utiliser un nombre de points de gamme d'étalonnage suffisant pour définir la relation entre la concentration de l'analyte dans la matrice et la réponse correspondante du détecteur [22]. La quantification est toujours réalisée en utilisant un étalon interne.

Il est nécessaire d'établir une gamme d'étalonnage pour chaque analyte à quantifier dans la matrice. Cette gamme d'étalonnage doit être composée d'au moins 5 à 8 points; le point le plus faible de la gamme correspond en général au seuil de quantification. La courbe d'étalonnage décrivant la relation entre la concentration de l'analyte et la réponse doit être décrite par le modèle mathématique le plus simple possible.

La réponse mesurée est le rapport de l'aire/hauteur de l'analyte et de l'aire/hauteur de son étalon interne.

Il convient de choisir le modèle linéaire en vérifiant les critères suivants :

- L'ordonnée à l'origine de la droite d'étalonnage doit être statistiquement non différent de 0 et le coefficient de détermination non statistiquement différent de 1 ( $R^2 > 0,99$ ).
- Calculer l'équation moyenne en donnant la moyenne de la pente et de l'intercepte.

### 3. Justesse :

➤ **La justesse** est l'étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence.

La justesse (biais) correspond au pourcentage retrouvé par rapport à la concentration théorique, lors de l'étude de la répétabilité et/ou reproductibilité. Elle est mesurée, à un niveau donné de concentration, dans la zone quantifiable pratique de la méthode.

Elle est aussi exprimée par le taux de recouvrement (TR) qui doit être compris entre 85 et 115%, sauf pour la limite de quantification où il doit être compris entre 80 et 120%.

A partir des résultats obtenus, on calcule le biais selon la formule suivante :

$$\text{biais \%} = \frac{m - v}{v} \times 100$$

Avec :

m : moyenne des valeurs obtenues



$v$  : valeur vraie de l'échantillon à tester.

Le biais doit être <15% sauf pour la limite de quantification où il doit être <20%. La justesse peut aussi être exprimée par l'erreur relative selon le calcul suivant :

$$R\% = \frac{m}{v} \times 100$$

#### 4. Fidélité : répétabilité (ou fidélité intra-jour) et reproductibilité (ou fidélité intermédiaire) :

##### a. Répétabilité :

Fidélité de mesure selon un ensemble de conditions identiques : même échantillon, même opérateur, même lots de réactifs, même instrument, et ce pendant un court intervalle de temps (le même jour).

En pratique, cet essai sera réalisé sur un ou plusieurs matériaux d'essais stables (point de gamme). Un minimum de 5 répliques est souhaitable pour chaque matériau d'essai. L'objectif est de caractériser la meilleure performance possible, dans des conditions optimales et de vérifier le bon fonctionnement de l'instrument de mesure. L'exploitation des résultats consiste à calculer la moyenne ( $\bar{x}$ ), l'écart-type ( $S_r$ ) et le coefficient de variation (CV) des valeurs expérimentales de chaque série.

La moyenne ( $\bar{x}$ ) :

$$\bar{x} = \left( \sum_{i=0}^n xi \right) / n$$

L'écart-type ( $S_r$ ):

$$S_r = \frac{1}{p} \sqrt{\frac{\sum_1^n (xi - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Le coefficient de variation (CV) : il représentera la répétabilité de la méthode en %, et ne doit pas être supérieure à 15%

$$CV_r\% = \frac{S_r}{\bar{x}} \times 100$$

Selon la norme ISO 5725 :  $|x_{max} - x_{min}| \leq r = 2,8 \times S_r$



Avec :

$p$  : nombre de séries

$x_i$  : mesure

$n$  : nombre de mesures

$r$  : limite de répétabilité à 95%

**b. Fidélité intermédiaire :**

Fidélité intermédiaire de mesure selon un ensemble de conditions. Les mesures doivent être effectuées sur un même échantillon en faisant varier au moins un des facteurs : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs, l'étalonnage,.... Il est aussi évalué par le CV mais sur un long délai (3 jours minimum). Ces coefficients doivent être <15%. Pour la limite de quantification, on admet des coefficients de variation <20%.

Nous serons amené à calculer la moyenne ( $\bar{x}$ ), le coefficient de variation (CV) l'écart type ( $\sigma$ ) pour chaque série d'analyse à partir des quels nous allons exprimer l'écart type de reproductibilité  $S_{FI}$  :

$$S_{FI} = \sqrt{S_B^2 + S_r^2}$$

Le coefficient de variation (CV) est exprimé par la formule suivante :

$$CV_{FI} \% = \frac{S_{FI}}{\bar{x}} \times 100$$

Selon la norme ISO 5725 :  $|x_{max} - x_{min}| \leq FI = 2,8 \times S_B$

Avec :

$S_B$  : écart type entre groupes.

$S_r$  : écart type à l'intérieure des groupes.

FI : limite de la fidélité intermédiaire à 95%.

$S_{FI}$  : écart type de la fidélité intermédiaire.

**5. Limite de quantification (LOQ) et de détection (LOD) :**

**a. Limite de détection (LOD):**

La limite de détection d'une méthode est la plus basse concentration pour un composé analysé dans une matrice réelle, qui, lorsqu'il subit toutes les étapes d'une méthode complète, produit un signal détectable. Autrement dit, c'est la plus petite quantité d'un analyte à examiner dans un



échantillon pouvant être détectée et considérée comme différente de la valeur du blanc mais non nécessairement quantifiée [29].

C'est la concentration équivalente à 3 fois l'écart type ( $\sigma$ ) des blancs obtenus lors de l'établissement de la LOD.

$$LOD = (3 \times \sigma) + m$$

**a. Limite de quantification (LOQ) :**

La limite de quantification est la plus petite quantité d'un analyte à examiner dans un échantillon pouvant être déterminée quantitativement dans des conditions expérimentales décrites dans la méthode avec une variabilité définie [29].

Le premier point de la gamme d'étalonnage correspond le plus souvent au seuil de quantification.

Pour déterminer la limite de quantification et de détection, on procède à l'analyse de 20 échantillons de blancs (plasma dépourvue de la substance à analyser) dans une même série. On calcule ensuite la concentration à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage, la moyenne ( $\bar{x}$ ) et l'écart-type ( $\sigma$ ) exprimés en concentration.

La limite de détection est calculée selon la formule suivante :

$$LOQ = (10 \times \sigma) + m$$

**6. Stabilité :**

La stabilité de l'analyte à doser dans la matrice est déterminée par le dosage d'échantillons à un seul niveau de concentration, extemporanément, à différents temps de conservation, et à différentes températures : température ambiante, +4°C, et -20°C. Des essais de congélation-décongélation doivent être effectués, un cycle de congélation-décongélation est défini par au moins 12h à -20°C.

La stabilité est déterminée en ajoutant la substance à doser (analyte) à la matrice biologique (plasma) à laquelle la méthode doit s'appliquer.

Les concentrations obtenues après le stockage ne doivent pas varier de plus de 15% par rapport à la concentration théorique.

**E. Procédé expérimental :**

**I. Objet :**



Ce mode opératoire a pour but de permettre la réalisation des dosages du méthanol dans le plasma. Il s'applique sur tous les prélèvements sanguins recueillis sur tube sec ou avec anticoagulant.

## II. Principe :

L'échantillon à analyser est dilué avec l'étalon interne (butanol-1). La phase gazeuse, obtenue après chauffage du mélange dans le Headspace, est injectée dans le chromatographe. Cette phase gazeuse est entraînée par la phase mobile (gaz vecteur) dans la colonne pour arriver au détecteur à ionisation de flamme (FID). Enfin, les données sont traitées sur un ordinateur équipé d'un logiciel spécial.

## III. Matériel :

### 1. Verrerie

- Flacons en verre pour Headspace à sertir (vial), béchers, fioles ;
- Micropipettes.

### 2. Système Chromatographique :

Le dosage du méthanol est effectué par le biais d'un chromatographe en phase gazeuse « GC Agilent 6890N », avec injection des vapeurs de gaz par « Headspace 7694E » sur une colonne capillaire HP5 5% Phényl Méthyl Siloxane 30m × 320µm ID 0.25µm.

La détection des analytes est faite par ionisation de flamme « détecteur FID ».

L'acquisition et le traitement des données est réalisé sur un ordinateur équipé du logiciel « Chemstation ».

### 3. Réactifs

- Méthanol pur de densité 0.79 g/ml
- Etalon interne : Butanol-1 de densité 0,807 g/ml
- Eau distillée.
- Plasma vierge.

## IV. Mode opératoire :

### 1. Préparation des solutions mères :



Des solutions mères sont préparées, extemporanément, à partir desquelles nous allons préparer nos séries d'analyses. Les solutions sont :

- Solution mère (SM) de Méthanol à 2 g/l : 126 µl de méthanol pur + eau distillée à une quantité suffisante pour (qsp) 50ml ;
- Solution d'étalon interne (EI) Butanol-1 à 4g/l : 244 µl de butanol-1 + eau distillée qsp 50ml ;

Ces SM sont conservées au réfrigérateur à +4°C.

On effectue le dopage du plasma pour préparer la gamme d'étalonnage et les contrôles qualité.

**Remarque :** Les solutions utilisées pour les contrôles qualité et celles pour la gamme d'étalonnage doivent être préparées par deux personnes différentes.

## 2. Préparation de la gamme d'étalonnage :

A préparer dans des flacons en verre pour Headspace à sertir selon les concentrations correspondantes:

*Tableau 2 : gamme d'étalonnage.*

Concentration (en g/l)	0	0.1	0.2	0.5	1
Volume SM (en µl)	0	50	100	250	500
Volume plasma vierge	Qsp 1ml				

## 3. Préparation des contrôles qualité interne :

Trois contrôles de qualité interne (CQI) sont préparés dans des flacons en verre pour Headspace à sertir selon les concentrations correspondantes:

*Tableau 3 : contrôles qualité interne (CQI).*

Concentration (en g/l)	0.15	0.3	0.75
Volume SM (en µl)	75	150	375
Plasma vierge	Qsp 1ml		

## 4. Manipulation :

Avec chaque échantillon, une gamme d'étalonnage et 3 CQI sont réalisés conformément au mode opératoire suivant :



Traiter les échantillons séparément, dans un flacon en verre pour Headspace, en introduisant :

- 1 ml de l'échantillon (gamme d'étalonnage / contrôle qualité) ;
- 150 µl d'étalon interne à 4g/l ;
- Sertir les vials immédiatement après l'ajout de l'EI ;
- Injection automatique avec Headspace.

Conditions chromatographiques :

- Méthode : ALCOOLHS.M
- Séquence : MEOHHS.S
- Débit d'azote : 0.4 ml/min équivaut à une pression de 0,14Bar ;
- Débit d'hydrogène : 30 ml/min ;
- Débite d'air : 300 ml/min ;
- Volume d'injection : 0,5 ml ;
- Mode : split 10 : 1 ;
- Températures :
  - o Injecteur à 140°C
  - o Détecteur FID : 250 °C
  - o Four : isotherme à 40°C pendant 6min.

Conditions Headspace :

- Températures :
  - o Vial (four) : 70°C
  - o Loop (Boucle) : 80°C
  - o Ligne de transfert : 90°C
- Temps :
  - o GC cycle time : 13.5min
  - o Vial Eq. Time : 20min
  - o Temps de pression : 0.15min
  - o Loopfill time : 0.15min
  - o Loopeq time : 0.05min
  - o Temps d'injection : 0.50min



- 
- Pression :
- vial pressure : 15 Psi
  - Carrier gas pressure : 2,2 Psi



---

# ***CHAPITRE III :***

## ***Résultats et***

### ***discussion***



## I. Validation de la méthode :

### 1. Sélectivité :

La sélectivité a été étudiée en préparant un échantillon contenant l'éthanol, le méthanol, et le butanol, puis l'injection de ce dernier avec un débit de 1ml/min de la phase mobile (azote). La résolution entre les deux pics obtenus est  $R=1,06$  qui est inférieure à 1,5. Donc, il a été nécessaire d'optimiser la méthode en diminuant le débit du gaz vecteur. Le tableau suivant montre les résultats obtenus :

*Tableau 4 : résultats d'optimisation de la sélectivité.*

Débit (ml/min)	$t_R(\text{MeOH})$	$t_R(\text{EtOH})$	Résolution (R)
1	0,745	0,774	1,06
0.8	1,309	1,359	1,67
0,4	1,635	1,702	3,02

Avec un débit de 0,4 ; nous avons pu obtenir une résolution de 3,02 (supérieure à 1,5) donc les pics du méthanol et de l'éthanol sont bien séparés. Pour être sûr que la méthode est sélective, il faudra calculer le facteur de sélectivité ( $\alpha$ ) qui doit être supérieure ou égale à 1.

Le facteur de sélectivité ( $\alpha$ ) :

$$\alpha = \frac{t_{R_2}}{t_{R_1}}$$

La résolution (R) :

$$R = \frac{2 \times (t_{R_2} - t_{R_1})}{\omega_2 + \omega_1}$$

Le tableau ci-dessous montre les résultats obtenus pour l'étude de la sélectivité :

*Tableau 5 : étude du facteur de sélectivité et de la résolution.*

	$t_R$	$\omega$	$\alpha$	R
Méthanol	1.635	0.0211	1.04	3,02
Ethanol	1.702	0.0232		



<b>Butanol</b>	2.549	0.037		
----------------	-------	-------	--	--

D'après le tableau 5, le facteur de sélectivité ( $\alpha$ ) obtenue pour le couple MeOH / EtOH est supérieure à 1, et la résolution entre les deux pics est largement supérieure à 1,5 :

⇒ La méthode est sélective.

## 2. Linéarité :

La linéarité a été étudiée sur trois jours en effectuant l'analyse de cinq points de gammes. Chaque point de cette gamme est répété trois fois. Dans un premier lieu, on procède au calcul des rapports d'aire ( $R_{\text{aire}}$ ) entre le méthanol et le butanol (EI) dont la concentration dans l'échantillon est de 0,6g/l, comme cela est montré sur le tableau ci-dessous :

*Tableau 6 : résultats obtenus lors de l'étude de la linéarité.*

Concentrations (g/l)	$C_{\text{MeOH}}/C_{\text{EI}}$	$R_{\text{aire}}$ 1 <sup>er</sup> jour	$R_{\text{aire}}$ 2 <sup>ème</sup> jour	$R_{\text{aire}}$ 3 <sup>ème</sup> jour
<b>0</b>	0	0	0	0
<b>0,1</b>	0,167	0,077	0,076	0,074
<b>0,2</b>	0,333	0,124	0,121	0,126
<b>0,5</b>	0,833	0,318	0,319	0,300
<b>1</b>	1,667	0,635	0,637	0,636

A partir des résultats du tableau 6, nous allons déterminer la courbe d'étalonnage à régression linéaire qui présentera le rapport des aires (MeOH / BuOH) en fonction du rapport des concentrations (MeOH / BuOH). Il faudra aussi déterminer les paramètres de cette courbe notamment l'ordonnée à l'origine ( $a_0$ ), la pente ( $a_1$ ), et le coefficient de corrélation ( $R^2$ ). Ce qui va nous permettre de vérifier l'existence d'une pente significative

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant :

*Tableau 7: résultats de la linéarité.*

	<i>Coefficients</i>	<i>Erreur-type</i>	<i>Statistique t</i>	<i>Probabilité</i>
<b>Constante (<math>a_0</math>)</b>	0,0040	0,0040	1,0052	0,338
<b><math>C_{\text{MeOH}}/C_{\text{EI}}</math> (<math>a_1</math>)</b>	0,377	0,0042	89,076	7,7795E-16

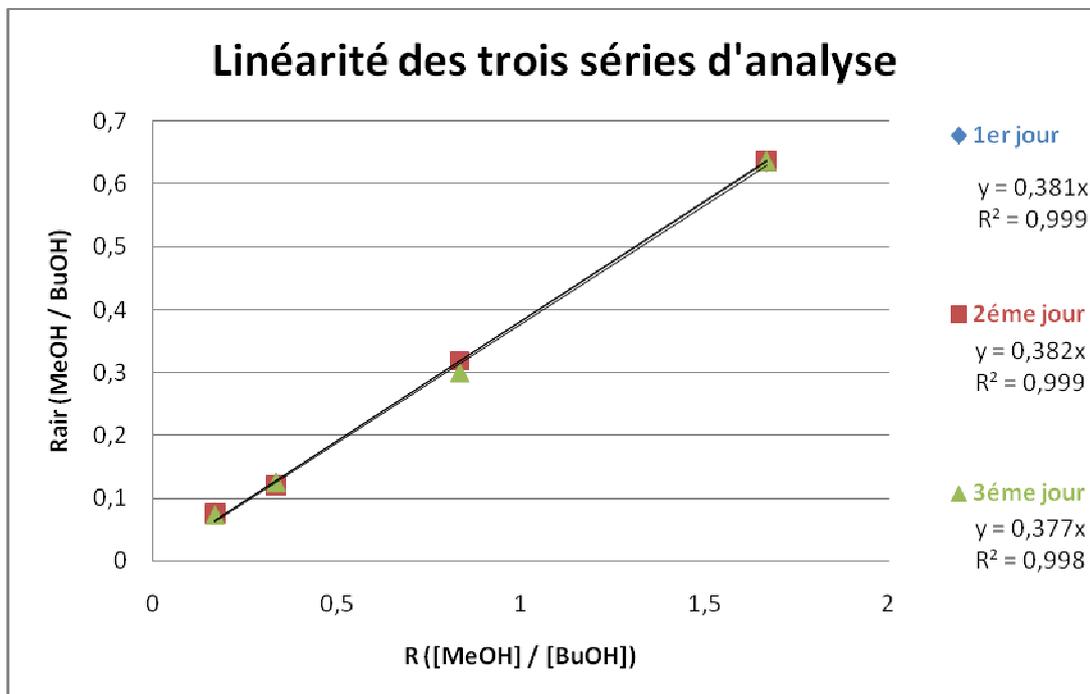


Nous remarquons que la probabilité d'erreur de  $a_0$  est égale à 33,8%, qui est supérieure à 5% donc le test est non significatif ce qui veut dire que  $a_0$  va être égal à 0. Tandis que la probabilité d'erreur de  $a_1$  a une valeur de 7,7795E-16 qui est inférieure à 5 % donc la pente est significative, ce qui veut dire que l'équation sera de type  $y=a_1x$  avec :

$$y = R_{air} (\text{MeOH} / \text{BuOH}) \quad \text{et} \quad x = R([\text{MeOH}] / [\text{BuOH}])$$

$$\Rightarrow \frac{R_{air} (\text{MeOH})}{R_{air} (\text{BuOH})} = \frac{[\text{MeOH}]}{[\text{BuOH}]} \times a_1$$

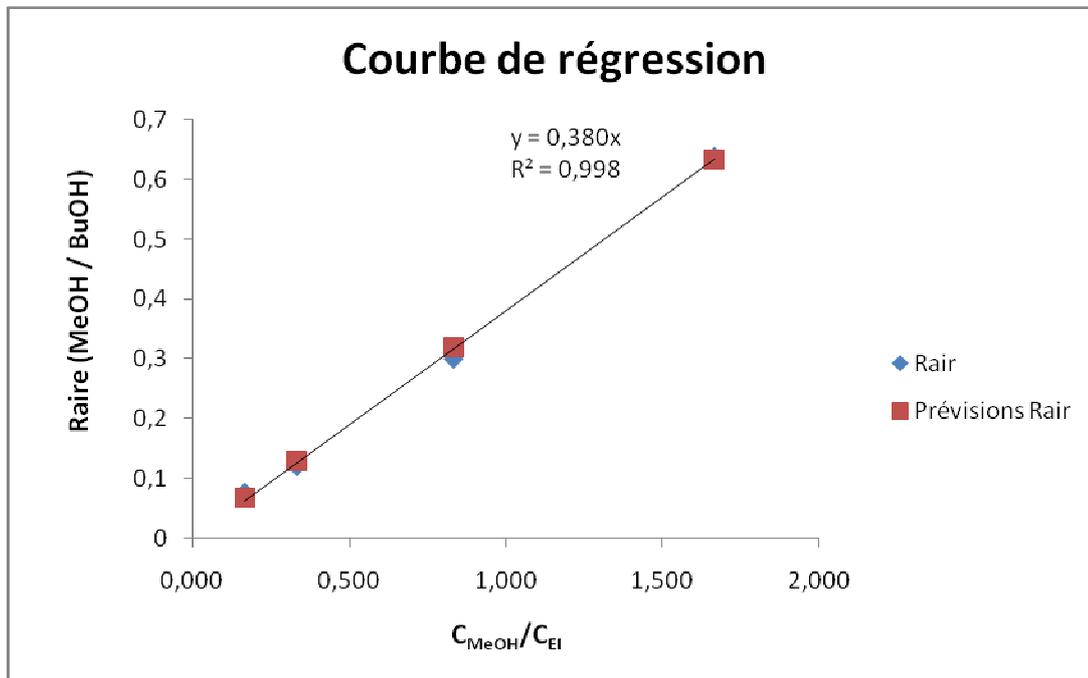
L'étape à venir consiste à interpréter les résultats précédents en traçant des droites à régression linéaire des rapports d'aires (MeOH / BuOH) en fonction des rapports de concentrations (MeOH / BuOH) pour chaque série d'analyse tout en effectuant l'intersection à l'origine (figure 12).



*Figure 12 : courbes d'étalonnage des analyses réalisées sur trois jours.*



Si l'on reporte les mesures (Raire) en ordonnées, en fonction des concentrations portées en abscisses, les résultats sont les suivants :



*Figure 13 : courbe d'étalonnage représentant le rapport d'air (MeOH/BuOH) en fonction des rapports de concentrations (MeOH/BuOH).*

Cette courbe montre une bonne proportionnalité entre les rapports d'air obtenus et les rapports de concentrations avec un coefficient de détermination qui est de  $R^2=0,9986 (>0,99)$ .

⇒ La méthode présente une bonne linéarité entre 0 et 1g/l de méthanol dans le plasma.

### 3. Justesse :

Lors de l'étude de linéarité, trois échantillons de contrôle qualité (QC) ont été préparés et analysés en parallèle à la gamme d'étalonnage. Ces QC ont des concentrations de 0,15 ; 0,3 ; et 0,75g/l, dont le but est d'évaluer la justesse et l'exactitude de la méthode en respectant les étapes suivantes :

- Recueillir les réponses pour chaque analyse et déterminer le Raire ;
- Calculer, en utilisant les équations des courbes d'étalonnage appropriées, les concentrations (Ccal) pour chaque QC afin de nous assurer que les réponses sont correctes et qu'ils correspondent aux concentrations théoriques de méthanol ( $C_{MeOH}$ ) (tableau 8).



$$C_{cal} = Raire \times \frac{[BuOH]}{a_1}$$

- Calculer la justesse (BR% ou R%) qui doit être inférieure à 15%. L'exactitude doit être comprise entre 85 et 115% (tableau 9).

*Tableau 8 : concentrations trouvées pour les Contrôles Qualité.*

$C_{MeOH}$ (g/l)	[BuOH] (g/l)	Raire (J1)	Raire (J2)	Raire (J3)	$C_{cal_1}$	$C_{cal_2}$	$C_{cal_3}$
0,15	0,6	0,098	0,106	0,108	0,154	0,166	0,172
0,3		0,195	0,197	0,168	0,306	0,309	0,267
0,75		0,472	0,477	0,490	0,742	0,749	0,778

Rappel :

Afin de calculer la justesse (biais) et l'exactitude, nous allons dans un premier temps calculer la moyenne (m) des concentrations obtenues.

Biais en % :

$$\text{biais \%} = \frac{m - C_{th}}{C_{th}} \times 100$$

Justesse (ou taux de recouvrement TR) en % :

$$R \% = \frac{C_{cal}}{C_{th}} \times 100$$

*Tableau 9 : taux de recouvrement et justesse.*

Cth	Ccal	Moyenne (m)	Biais %	TR %
0,15	0,154	0,164	9,35	109,347
	0,166			
	0,172			
0,3	0,306	0,294	-1,99	98,011
	0,309			
	0,267			
0,75	0,742	0,756	0,85	100,851



	0,749			
	0,778			

⇒ 85 % < TR% < 115% ET Biais % < 15% .

#### 4. Intervalle de confiance :

L'intervalle de confiance a une limite inférieure (LI) et une limite supérieure (LS) :

$$[LI ; LS] = [\bar{R} - FR ; \bar{R} + FR]$$

Avec :

$\bar{R}$  : moyenne des taux de recouvrements (TR)

FR : facteur de recouvrement

$$FR = t \times \frac{S}{\sqrt{n}}$$

t : test de Student

S : écart type des TR

n : nombre d'échantillons

Les paramètres de l'intervalle de confiance sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

*Tableau 10: calcul des paramètres.*

<b>n</b>	9
<b><math>\bar{R}</math></b>	102,737
<b>S</b>	7,218
<b>t</b>	2,306
<b>FR</b>	5,548
<b>LI</b>	97,188
<b>LF</b>	108,285

⇒ L'intervalle de confiance : [97,188 ; 108,285].

⇒ Puisque la valeur 100 % est incluse à l'intervalle de confiance donc la méthode est juste.



## 5. Fidélité :

### a. Répétabilité et fidélité intermédiaire:

La fidélité intermédiaire a été étudiée sur un seul point de gamme de concentration 0,5g/l dans les conditions de reproductibilité, c'est-à-dire en changeant un facteur et sur trois jours.

Dans un premier lieu, nous allons calculer les concentrations ( $C_{MeOH}$ ) à partir des Raire comme suit :

*Tableau 12 : résultats obtenus pour la fidélité intermédiaire.*

Raire			$C_{MeOH}$ (g/l)		
J1	J2	J3	J1	J2	J3
0,320	0,248	0,326	0,505	0,392	0,514
0,285	0,270	0,281	0,449	0,425	0,443
0,316	0,277	0,278	0,499	0,437	0,439
0,287	0,278	0,261	0,453	0,439	0,411
0,278	0,289	0,268	0,439	0,456	0,422
0,307	0,279	0,300	0,484	0,440	0,472

Dans un second lieu, nous allons analyser la variance sur un seul facteur (le jour) à partir des  $C_{MeOH}$ (tableau13).

*Tableau 13 : analyse de variance sur un facteur.*

### RAPPORT DÉTAILLÉ

Groupes	Nbr d'échantillons (n)	Moyenne $\bar{x}$	Moyenne des moyennes $\bar{\bar{x}}$	Variance
J1	6	0,471	0,451	0,0008
J2	6	0,431		0,0005
J3	6	0,450		0,0014



### ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés (MC)	F	Probabilité
Entre Groupes	0,004861676	2	0,0024	2,72869425	0,09756813
A l'intérieur des groupes	0,013362644	15	0,0009		
Total	0,01822432	17			

L'écart type de la fidélité intermédiaire ( $S_{FI}$ ) :

$$S_{FI} = \sqrt{S_r^2 + S_j^2}$$

Avec :

$S_r^2$  : moyenne des carrés à l'intérieur des groupes (résiduelle)

$S_j^2$  : écart type du facteur du jour.

$$S_j^2 = \frac{MC(\text{entre groupes}) - S_r^2}{n}$$

Le tableau ci-dessous montre les résultats de calcul de ces paramètres :

*Tableau 14 : écart type et coefficient de variation de la fidélité intermédiaire.*

$S_r^2$	0,0009	$S_r$	0,030	$CV_r(\%)$	6,62
$S_j^2$	0,0003	$S_j$	0,016	$CV_{FI}(\%)$	7,51
$S_{FI}^2$	0,00115	$S_{FI}$	0,034		

Nous avons pu obtenir des coefficients de variation qui sont inférieurs à 15%, donc la méthode est reproductible.

## 6. Limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ):

L'essai de la LOD et la LOQ a nécessité l'analyse de 18 blancs (contenant l'étalon interne), et d'intégrer par la suite les chromatogrammes obtenus.

A partir des Raire, nous allons devoir calculer les concentrations ( $C_{cal}$ ), leur moyenne ( $\bar{x}$ ), l'écart type ( $S$ ), tout cela dans le but de calculer les limites de détection et de quantification en concentration (g/l).



Rappel :  $LOD = (3 \times \sigma) + m$

et,  $LOQ = (10 \times \sigma) + m$

Le tableau suivant montre les calculs réalisés :

*Tableau 15 : LOD et LOQ*

Mesure	Rair	Ccal (g/l)	moyenne $\bar{x}$	S	LOD	LOQ
1	0,012	0,018	0,029	0,010	0,060	0,132
2	0,017	0,026				
3	0,020	0,032				
4	0,018	0,028				
5	0,018	0,029				
6	0,037	0,059				
7	0,018	0,029				
8	0,017	0,027				
9	0,016	0,025				
10	0,020	0,031				
11	0,018	0,028				
12	0,016	0,025				
13	0,012	0,018				
14	0,017	0,026				
15	0,031	0,049				
16	0,010	0,016				
17	0,024	0,037				
18	0,017	0,027				



⇒ LOD = 0.060 g/l

⇒ LOQ = 0.132 g/l

## 7. Stabilité :

La stabilité de l'analyte à doser dans la matrice est déterminée par le dosage d'échantillons préparés au préalable à un seul niveau de concentration (0,5 g/l), puis après différents temps de conservation à différentes températures : température ambiante (+23°C), +4°C, et -20°C.

Ces échantillons ont été répétés cinq fois espacés sur une période d'un mois, et les résultats sont affichés sur le tableau comme suit :

*Tableau 16 : taux de recouvrement de la stabilité.*

	Température (°C)	Ccal (g/l)	TR (%)
J1	-20	0,51	101,67
	4	0,5	99,42
	23	0,5	100,71
J5	-20	0,53	105,03
	4	0,53	106,89
	23	0,52	104,16
J8	-20	0,53	106,97
	4	0,52	104,51
	23	0,53	106,87
J14	-20	0,51	101,87
	4	0,51	102,24
	23	0,51	101,44
J35	-20	0,54	107,71
	4	0,54	108,84
	23	0,53	105,43

Nous remarquons que les taux de recouvrements sont compris entre 85 et 115%, ce qui respecte les normes. En effet, en utilisant le test d'ANNOVA, on va pouvoir étudier la variation des concentrations en fonction des températures de conservation et du temps.

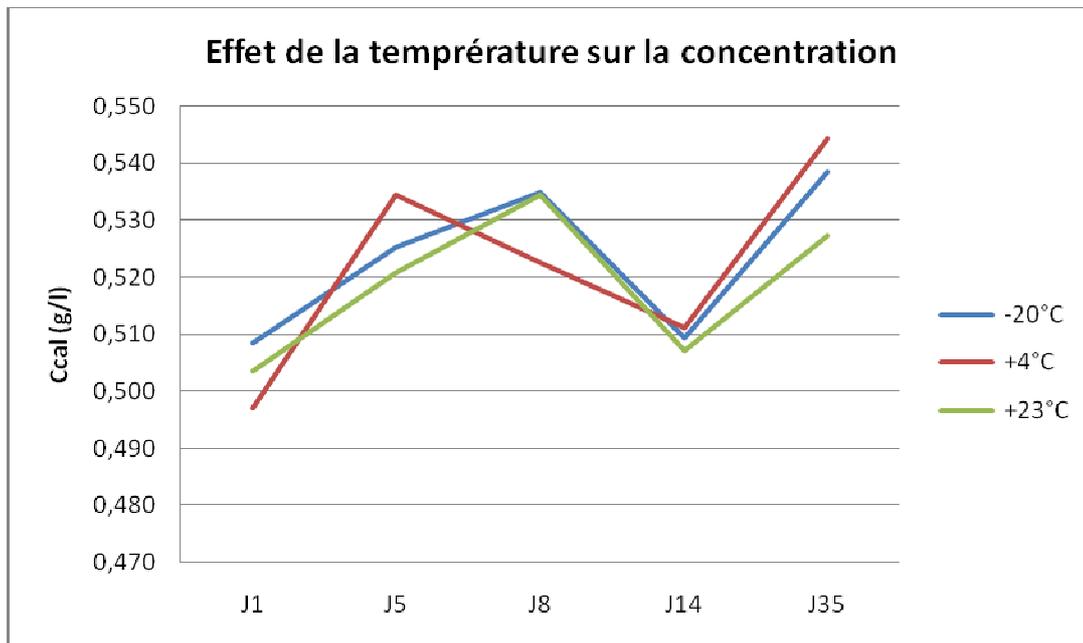


*Tableau 17 : analyse de variance*

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité
Entre Groupes	5,6738E-05	2	2,8369E-05	0,1199	0,889
A l'intérieur des groupes	0,003	12	0,00024		
Total	0,003	14			

D'après le tableau ci-dessus :  $88,9\% > 5\%$  donc  $H_0$  est acceptée ce qui veut dire qu'il n'y a pas d'effets du facteur de la température.

Cette conclusion est confirmée en interprétant les résultats sur un graphique (figure 14) qui va montrer la variation de la concentration en fonction du temps et de la température.



*Figure 14 : variation de la concentration en fonction de la température.*

En ce qui concerne la stabilité, la probabilité de variation est de 88,9%, et d'après le graphique, il y'a une légère variation de la concentration calculée par rapport à la concentration théorique (0,5



---

g/l). Ce qui veut dire que ni la température, ni le temps n'ont d'influence importante sur la variation de la concentration.



## Conclusion :

L'objectif de ce présent travail était d'optimiser et valider une méthode de routine simple pour la mesure quantitative du méthanol dans le plasma et le sang entier en utilisant une méthode de chromatographie en phase gazeuse avec injecteur Headspace et détecteur à ionisation de flamme, ce qui permettra entre autre l'orientation du médecin clinicien dans le traitement de l'intoxiqué.

L'analyse quantitative a porté, dans un premier temps, sur des sérums de calibration supplémentés en méthanol et en butanol dans une gamme de concentrations variant de 0 à 1 g/l. L'examen des résultats montre que :

- Le méthanol et le butanol ont été élus respectivement à environ 1,61 et 2,5 min.
- La linéarité est bien vérifiée dans les gammes de concentrations étudiées avec un intervalle de confiance de [97,188 ; 108,285], et un coefficient de détermination supérieur à 0,99. Par conséquent, l'analyse quantitative par CPG - FID peut fournir des mesures exactes.
- Les coefficients de variation pour les échantillons de plasma dopés à 0,5 g/l étaient inférieurs à 15%.
- Les taux de recouvrements pour les QC de concentrations 0,15 ; 0,3 ; et 0,75 g/l étaient compris entre 85 et 115%.
- Dans un deuxième temps, des sérums ont été supplémentés seulement en butanol pour préciser les limites de détection et de quantification du méthanol. La limite de détection a pu être estimée à 0,03 g/l et la limite de quantification à 0,1 g/l.

Nous avons donc démontré le dosage quantitatif du méthanol dans le plasma à différents niveaux de concentrations. Les résultats des analyses montrent l'applicabilité de la CPG - FID à la détermination directe du méthanol. Le méthanol étant responsable de la toxicité, son taux sanguin constitue un indicateur de la gravité de l'intoxication et permet l'ajustement des traitements nécessaires.

Nous pouvons en conclure que l'adoption de cette méthode peut très bien être utilisée de façon routinière, comme elle peut l'être dans le cadre de recherches scientifiques.



## Références bibliographiques :

- [1] :D. Lamiable, G. Hoizey, H. Marty, R. Vistelle. Intoxication aiguë au méthanol. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale***16-025-B-10(2003)**.
- [2] : D. Lamiable, G. Hoizey, H. Marty, R. Vistelle. Intoxication aiguë au méthanol. *EMC-Toxicologie Pathologie***1 (2004) 7–12**.
- [3] : J. Arditti, L. De Haro, J.H. Bourdon, A. Brun, B. Poussineau, J.M. David. Classification, usages et épidémiologie des intoxications par les mono et dialcools. *Laboratoire de Toxicologie et de Pharmacodépendance, Centre Antipoison, Hôpital Salvator, Marseille*.
- [4] : Dr. B. Mégarbane. Intoxication aiguë par le méthanol, **2003**.
- [5] : Les pesticides. *Toxicologie Maroc* (Publication officielle du Centre Anti Poison du Maroc) - **N° 4 - 1er trimestre 2010**.
- [6] : Wolters Kluwer France. Toxicologie, Sciences mathématiques, Physiques et Chimiques, **2007**.
- [7] : Ashford R: Ashford's Dictionary of Industrial Chemicals, Wavelength Publications Ltd, London, England, **2001**.
- [8] : Bingham E, Cohrssen B, & Powell CH: Patty's Toxicology, **Vol 6. 5th ed**, John Wiley & Sons, New York, NY, **2001**.
- [9] : Lewis RJ: Hawley's Condensed Chemical Dictionary, **14th ed**, John Wiley & Sons, Inc, New York, NY, 2001.
- [10] : Fiche toxicologique du méthanol. Fiche établie par les services techniques et médicaux de l'INRS, **édition 2009**.
- [11] : Alain Viala. Toxicologie **2ème édition, 2005**.
- [12] : N. Rhalem, Gh. Jalal, R. Soulaymani (CAPM). Intoxication par le méthanol, 2010
- [13] : H. Théfenne ; J. Turc ; T. Carmoi ; V. Gardet ; C. Renard. Intoxication aiguë au méthanol : réflexion à partir d'un cas. *Ann Biol Clin*, **vol. 63, n° 5, 2005**.
- [14] : Kruse JA. Methanol poisoning. *Intensive Care Med***1992; 18: 391-397**.
- [15] : Kinoshita H, Ijiri I, & Ameno S: Combined toxicity of methanol and formic acid: two cases of methanol poisoning. *Int J Legal Med***1998; 111:334-335**.
- [16] : Sharma VK, Jadhav RK, & Rao GJ: High performance liquid chromatographic determination of alcohols with reference to body distribution of methanol. *Forensic Internat***1991; 50:255-261**.



- [17] : Carpentieri DF, Wherli S, Pawel B, et al: Potential applications of proton nuclearmagneticresonanacespectroscopy in the diagnosis and management of methanol intoxication in the pediatric population. *PedEmerg Care***2003; 19:178-180.**
- [18] : W. Piekoszewski, T. Madej, S. Lata, E. Florek. Intoxication au méthanol : étude toxicocinétique. *Annales de Toxicologie Analytique*, vol. XIV, n° 2, 2002.
- [19] :P. Aouizerate, L. Dume, A. Astier. Intérêt du dosage de l'acide formique lors d'intoxications par le méthanol Cas d'une intoxication aiguë. *Journal de Pharmacie Clinique*. **Volume 20, Numéro 1, 47-51, Mars 2001.**
- [20] : F.Rouessac, A.Rouessac avec la collaboration de D.Cruché. ANALYSE CHIMIQUE: Méthodes et techniques instrumentales modernes. **6ème édition 2004.**
- [21] : C.Buess-Herman, F.Dumont, traduction et révision de la 5ème édition américaine. Principes d'analyse instrumentale. **1ère édition 2003.**
- [22] : Stratégie de validation de méthodes de dosage en bioanalyse en vue d'études pharmacocinétiques et toxicologiques. *Annales de Toxicologie Analytique*, vol. XVI, n°2, 2004.
- [23] : Aide à la validation des méthodes en Toxicologie et Suivi Thérapeutique Pharmacologique. *Annales de Toxicologie Analytique*, vol. xvii, n° 3, supplément 1, 2005.
- [24] : *EMEA*. Guideline on validation of bioanalyticalmethods. **2009.**
- [25] : *ICH*. Validation of analyticalprocedure : Text and methodology. Q2R1 (Q2A et Q2B).**2005.**
- [26] : validation of chromatographic and gaschromatographicmethods : application to pharmacokinetics. *Journal of chromatography B*, **686 (1997) : 175-180.**
- [27] : validation of liquidchromatographic and gaschromatographicmethods : application to pharmacokinetics. *Journal of chromatography B*, **686 (1996) : 3-10.**
- [28] : validation of new methods. *Forensic science international*. **165 (2007) : 216-224.**
- [29] : AFNOR XPT90-120 Décembre 1999.

