

THESE  
POUR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Soutenue publiquement le 20 octobre 2025  
Par Mme Anne Laure MARECAUX**

---

**Criblage et dosage de toxiques par chromatographie liquide haute performance couplée à une détection UV après extraction sur phase solide.**

---

**Membres du jury :**

**Président : Monsieur le Professeur Jean-François GOOSSENS,**  
Professeur des universités en chimie analytique  
Faculté de pharmacie de Lille.

**Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Guillaume GARCON,**  
Professeur des universités en toxicologie  
Faculté de pharmacie de Lille.

**Assesseur : Madame Émeline BARBIER,**  
Docteur en pharmacie  
Université de Lille

**Membre extérieur : Monsieur le Pharmacien en chef Jean-Ulrich MULLOT,**  
Pharmacien Chef des services de classe normale  
Professeur Agrégé du Val de Grâce



 <b>UFR3S</b>   Université de Lille	<b>LISTE GEREE</b>	<b>LG/FAC/001</b>
Département Pharmacie	Enseignants et Enseignants-chercheurs 2024-2025	Version 2.3 Applicable au 02/12/2024
Document transversal		Page 3/102

### Université de Lille

Président	Régis BORDET
Premier Vice-président	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-présidente Formation	Corinne ROBACZEWSKI
Vice-président Recherche	Olivier COLOT
Vice-président Ressources Humaine	Jean-Philippe TRICOIT
Directrice Générale des Services	Anne-Valérie CHIRIS-FABRE

### UFR3S

Doyen	Dominique LACROIX
Premier Vice-Doyen, Vice-Doyen RH, SI et Qualité	Hervé HUBERT
Vice-Doyenne Recherche	Karine FAURE
Vice-Doyen Finances et Patrimoine	Emmanuelle LIPKA
Vice-Doyen International	Vincent DERAMECOURT
Vice-Doyen Coordination pluriprofessionnelle et Formations sanitaires	Sébastien D'HARANCY
Vice-Doyenne Formation tout au long de la vie	Caroline LANIER
Vice-Doyen Territoire-Partenariats	Thomas MORGENROTH
Vice-Doyen Santé numérique et Communication	Vincent SOBANSKI
Vice-Doyenne Vie de Campus	Anne-Laure BARBOTIN
Vice-Doyen étudiant	Victor HELENA

### Faculté de Pharmacie

Vice - Doyen	Pascal ODOU
Premier Assesseur et	
Assesseur à la Santé et à l'Accompagnement	Anne GARAT
Assesseur à la Vie de la Faculté et	
Assesseur aux Ressources et Personnels	Emmanuelle LIPKA
Responsable de l'Administration et du Pilotage	Cyrille PORTA
Représentant étudiant	Honoré GUISE
Chargé de mission 1er cycle	Philippe GERVOIS
Chargée de mission 2eme cycle	Héloïse HENRY
Chargé de mission Accompagnement et Formation à la Recherche	Nicolas WILLAND
Chargé de mission Relations Internationales	Christophe FURMAN
Chargée de Mission Qualité	Marie-Françoise ODOU
Chargé de mission dossier HCERES	Réjane LESTRELIN

**Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers (PU-PH)**

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique	81
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie	82
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie	82
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie	82
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie	82
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire	82

**Professeurs des Universités (PU)**

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique - RMN	85
M.	BERLARBI	Karim	Physiologie	86
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie	87
M.	BLANCHemain	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie	87
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques	87
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique - RMN	85
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie thérapeutique	86
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie bio inorganique	85
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire	87

M.	ELATI	Mohamed	Biomathématiques	27
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie	87
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique	85
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique	86
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique	85
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie	86
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique	86
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques	26
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire	87
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire	87
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique	85
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie physique	85
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences végétales et fongiques	87
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie	87
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie	86
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie	87
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie	86
M.	SERGHERAERT	Éric	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique	86

**Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers (MCU-PH)**

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique	85
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie	82

Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
Mme	GILLIOT	Sixtine	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie	82
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie	82

**Maîtres de Conférences des Universités (MCU)**

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique	86
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire	87
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique - RMN	85
M	BEDART	Corentin	ICPAL	86
M.	BOCHU	Christophe	Biophysique - RMN	85
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie	86
M.	BOSC	Damien	Chimie thérapeutique	86
Mme	BOU KARROUM	Nour	Chimie bioinorganique	
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie	87
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire	87
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	CHARTON	Julie	Chimie organique	86
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques	85

M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques	27
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique	86
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	FLIPO	Marion	Chimie organique	86
M.	FRULEUX	Alexandre	Sciences végétales et fongiques	
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie	87
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique	86
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques	26
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie	86
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie	87
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie	87
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique	85
Mme	LEHMANN	Hélène	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	LIBERELLE	Maxime	Biophysique - RMN	
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques	26
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie	86
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	
M.	MENETREY	Quentin	Bactériologie - Virologie	87
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique	86

Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques	85
M.	PIVA	Frank	Biochimie	85
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique	86
M.	POURCET	Benoît	Biochimie	87
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / Innovations pédagogiques	85
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique	86
Mme	ROGEL	Anne	Immunologie	
M.	ROSA	Mickaël	Hématologie	87
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie	86
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie	87
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie	87
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie	87
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Chimie organique	86
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques	87
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique	86
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques	85

**Professeurs certifiés**

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mme	KUBIK	Laurence	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

**Professeurs Associés**

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	BAILLY	Christian	ICPAL	86
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Chimie thérapeutique	86
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie pharmaceutique	86

**Maîtres de Conférences Associés**

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M	AYED	Elya	Pharmacie officinale	
M.	COUSEIN	Etienne	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques	85
Mme	DANICOURT	Frédérique	Pharmacie officinale	
Mme	DUPIRE	Fanny	Pharmacie officinale	
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques	85
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	85
Mme	GEILER	Isabelle	Pharmacie officinale	
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	MITOUMBA	Fabrice	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	86
M.	PELLETIER	Franck	Droit et Economie pharmaceutique	86
M	POTHIER	Jean-Claude	Pharmacie officinale	
Mme	ROGNON	Carole	Pharmacie officinale	

**Assistants Hospitalo-Universitaire (AHU)**

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	BOUDRY	Augustin	Biomathématiques	
Mme	DERAMOUDT	Laure	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	
M.	GISH	Alexandr	Toxicologie et Santé publique	
Mme	NEGRIER	Laura	Chimie analytique	

**Hospitalo-Universitaire (PHU)**

	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	DESVAGES	Maximilien	Hématologie	
Mme	LENSKI	Marie	Toxicologie et Santé publique	

**Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)**

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	BERNARD	Lucie	Physiologie	
Mme	BARBIER	Emeline	Toxicologie	
Mme	COMPAGNE	Nina	Chimie Organique	
Mme	COULON	Audrey	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	
M.	DUFOSSEZ	Robin	Chimie physique	
Mme	FERRY	Lise	Biochimie	
M	HASYEOUI	Mohamed	Chimie Organique	
Mme	HENRY	Doriane	Biochimie	
Mme	KOUAGOU	Yolène	Sciences végétales et fongiques	
M	LAURENT	Arthur	Chimie-Physique	
M.	MACKIN MOHAMOUR	Synthia	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	
Mme	RAAB	Sadia	Physiologie	

**Enseignant contractuel**

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
Mme	DELOBEAU	Iris	Pharmacie officinale
M	RIVART	Simon	Pharmacie officinale
Mme	SERGEANT	Sophie	Pharmacie officinale
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

**LRU / MAST**

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
Mme	FRAPPE	Jade	Pharmacie officinale
M	LATRON-FREMEAUX	Pierre-Manuel	Pharmacie officinale
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique

## ***UFR3S-Pharmacie***

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**





## Remerciements

En premier lieu je tiens vivement à remercier chaque membre du jury ;

**Monsieur Jean-François GOOSSENS**, Professeur en chimie analytique. Merci d'avoir accepté de présider mon jury.

**Monsieur Guillaume Garçon**, Professeur en toxicologie, mon directeur de mémoire de Master, puis le directeur de cette thèse. Depuis plusieurs années maintenant vous m'avez accompagnée et guidée pour dessiner mon projet professionnel. Merci pour votre disponibilité, votre bienveillance et votre soutien.

**Monsieur le Pharmacien en Chef Jean-Ulrich Mullot**, pour votre accompagnement et votre disponibilité. Je vous remercie à nouveau pour ce stage qui s'est conclu par la soutenance de cette thèse.

**Madame Emeline Barbier**, pharmacien chercheur dans l'unité U1172, merci d'avoir accepté de participer à ce jury.

**Madame le Pharmacien Béatrice Le Roy**, pour votre bienveillance, vos nombreuses explications et conseils, pour toutes ces heures devant la machine et les nombreuses relectures en Master. Votre accompagnement m'a beaucoup aidée, du Master à la thèse.

Je tiens également à remercier **ma Maman**, mes amis, et les amis devenus la famille.

**Anaëlle**, ma binôme de choc, grâce à toi je vois le rouge cerise et les prises au plafond, tu n'es pas obligée de me parler sur ce ton mais je n'oublierai jamais nos fous-rires ! Tu as été mes meilleures années, je suis fière de nous !

Merci à **Cécé kinkin, Lolo, Valou, Ma Douce, Ory, et mes Poussins**, les journées sont tellement plus belles avec vous.

**Ode**, ma sœur de cœur, je ne te remercierai jamais assez pour ces bons moments.

Mes **amis de Toulon, ma Clauclau et Franky, Bruno, David**, avec qui j'ai passé un stage exceptionnel, je n'oublierai pas les pains Bagnats, le Fort Saint Louis, et votre bonne humeur !

**Mon Bébé Jules**, tu remplis mon cœur de maman à chacun de tes sourires, je t'aime plus que tout mon grand Amour à Maman.

**A mon Papy et ma Mamie**, chaque jour dans mon cœur. Je vous aime.

A tous, qui avez contribué à votre façon à la réussite de cette thèse, je vous présente mes remerciements et ma gratitude.



## TABLE DES MATIERES

<i>Liste des figures</i> .....	19
<i>Liste des annexes</i> .....	20
<i>Liste des tableaux</i> .....	21
<i>Liste des équations</i> .....	22
<i>Liste des abréviations</i> .....	23
<b>CHAPITRE I. : LES GENERALITES</b> .....	25
<i>I. Introduction</i> .....	25
<i>II. Contexte : Surveillance du reseau EDCH</i> .....	28
a) Place des Laboratoires d'Analyses, de Surveillance et d'Expertise de la Marine Nationale dans l'analyse des échantillons d'EDCH .....	29
b) L'intérêt de l'analyse HPLC-UV dans la stratégie analytique du LASEM de Toulon .....	31
c) Les classes de molécules potentielles candidates .....	31
<i>III. Objectif du travail</i> .....	32
<b>IV. Référencement des molécules potentiellement utilisables pour une contamination dans les aliments à grande échelle et détectables par HPLC-UV</b> 33	
1. <i>Introduction</i> .....	33
2. <i>Matériels et méthodes</i> .....	33
a) Données d'entrée utilisées.....	33
b) Critères de classification des molécules d'intérêt .....	37
L'accessibilité à l'agent毒ique .....	37
La détectabilité par le consommateur.....	38
La toxicité .....	39
La solubilité.....	40
Score final.....	41
3. <i>Résultats</i> .....	42
a) Molécules priorisées en fonction de leur potentiel d'utilisation.....	42
b) Application de la méthode de cotation pour 2 exemples de molécules : l'aldicarbe et le malathion .....	45
L'aldicarbe .....	45
Le malathion .....	47
4. <i>Discussion</i> .....	50
5. <i>Conclusion</i> .....	51
<b>CHAPITRE II. DEVELOPPEMENT ET EXPERIMENTATION</b> .....	52
<b>PARTIE 1 : Extraction des toxiques par chromatographie liquide sur phase solide</b> .....	52
1. <i>Introduction</i> .....	52

<b>2. Matériels et méthodes .....</b>	<b>52</b>
a) Matériels : Les différentes méthodes d'extractions sur phase solide (SPE) .....	52
SPE classique en cartouche .....	52
SPE dispersive (d-SPE) : Méthode QuEChERS.....	53
La micro-SPE.....	53
La SPE sur disque ou membrane.....	54
SPE à échange d'ions (IEX).....	54
<b>3. Résultats .....</b>	<b>55</b>
a) Méthodes retenues pour l'extraction des toxiques dans des échantillons suspects.....	55
La méthode QuEChERS adaptée aux échantillons solides .....	56
La SPE sur cartouche retenue pour les échantillons liquides .....	56
b) Protocole d'extraction à partir d'un échantillon de ketchup avec la méthode QuEChERS.....	57
c) Protocole d'extraction à partir d'un échantillon de ketchup avec la méthode SPE classique.....	58
<b>4. Discussion .....</b>	<b>58</b>
<b>5. Conclusion .....</b>	<b>59</b>
<b>PARTIE 2 : mise au point de la méthode de screening et de dosage des molécules retenues.....</b>	<b>60</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>60</b>
a) La caféine.....	60
b) La nicotine .....	61
c) La colchicine : principe actif dans la spécialité Colchimax® .....	63
d) La crimidine .....	64
e) La digoxine .....	65
f) L'acénocoumarol .....	66
g) L'aldicarbe .....	66
h) Le 4-nitrophénol.....	67
<b>2. Matériels et méthode .....</b>	<b>68</b>
a) Matériel utilisé.....	68
b) Molécules testées et préparation des échantillons .....	68
Les molécules testées .....	68
Les conditions expérimentales .....	69
Échantillons de la gamme pour définir la droite de calibration .....	69
c) Développement de la méthode d'analyse et optimisation .....	70
Première méthode d'analyse – méthode n°1 .....	70
Seconde méthode d'analyse : Utilisation d'une phase mobile tamponnée – Méthode n°2 .....	71
Troisième méthode d'analyse : Modification du pourcentage d'ACN dans la phase mobile – Méthode n°3.....	71
<b>3. Résultats .....</b>	<b>72</b>
a) Protocole retenu .....	72
b) Les grandeurs caractéristiques des molécules.....	72
c) Vérification des performances.....	74
<b>4. Discussion .....</b>	<b>77</b>
<b>5. Discussion et conclusion générale .....</b>	<b>79</b>

<b>V. Annexes .....</b>	<b>I</b>
Annexe 1: Tableau de cotation des molécules identifiées par leur numéro de classement .....	I
Annexe 2 Protocole de dosage de la caféine dans un échantillon d'EDCH par HPLC-UV. ....	X
Annexe 3 Chromatogrammes et spectres de la caféine, crimidine, colchicine, 4-nitrophénol, aldicarbe, acénocoumarol, nicotine et digoxine.....	XVII
Annexe 4 Protocole de préparation de la solution tampon pH 3 .....	XVIII
<b>Bibliographie.....</b>	<b>XIX</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> Les domaines couverts par le LASEM (source interne LASEM).....	30
<b>Figure 2</b> Sélection des agents toxiques à classer. ....	36
<b>Figure 3</b> Classification de danger "toxicité aiguë" par voie orale selon le règlement CLP rédigé en 2009.(24) .....	40
<b>Figure 4</b> Répartition des classes d'agents chimiques étudiés.....	42
<b>Figure 5</b> Répartition des différentes classes retrouvées dans la catégorie des pesticides. ....	43
<b>Figure 6</b> Répartition des agents toxiques en fonction du logarithme en base 10 de leur score final de toxicité.....	43
<b>Figure 7</b> Graphique de la répartition des classes des agents toxiques en fonction de leur score final de toxicité.....	44
<b>Figure 8</b> Molécule d'aldicarbe n°CAS 116-06-3.....	45
<b>Figure 9</b> Molécule de malathion (N°CAS 121-75-5) .....	47
<b>Figure 10</b> Principe de fonctionnement de la SPE.....	58
<b>Figure 11</b> Molécule de caféine (N°CAS 58-08-2) source : INERIS .....	60
<b>Figure 12</b> Molécule de nicotine (N° CAS 54-11-5) source INRS .....	61
<b>Figure 13</b> Molécule de colchicine (N°CAS 64-86-8) source INERIS .....	63
<b>Figure 14</b> Molécule de crimidine (N°CAS 535-89-7) .....	64
<b>Figure 15</b> Molécule de vitamine B6 ou pyridoxal.....	64
<b>Figure 16</b> Molécule de digoxine .....	65
<b>Figure 17</b> Molécule d'Acénocoumarol n°CAS 152-72-7 .....	66
<b>Figure 18</b> Molécule d'aldicarbe n°CAS 116-06-3.....	66
<b>Figure 19</b> Molécule de 4-nitrophénol n° CAS 100-02-7.....	67
<b>Figure 20</b> Appareil de HPLC-UV, modèle Acquity Arc .....	68
<b>Figure 21</b> Gradient de phase mobile dans la méthode n°1 .....	70
<b>Figure 22</b> Composition de la phase mobile en fonction du temps, variation du pourcentage de la voie C (ACN 100%) .....	71
<b>Figure 23</b> Représentation en 3D des spectres des différentes molécules.....	73
<b>Figure 24</b> Chromatogramme de la gamme n°1 à 260 nm. ....	73
<b>Figure 25</b> Droites de calibration obtenues à-partir de la gamme n°1.....	74
<b>Figure 26</b> Chromatogramme de la solution suspecte préparée à-partir d'un comprimé de Colchimax®, analyse à une longueur d'onde de 260nm.....	75
<b>Figure 27</b> Structure de la warfarine et de l'acénocoumarol .....	77
<b>Figure 28</b> Paramètres de conditionnement de la colonne .....	XII
<b>Figure 29</b> Run table conditionnement colonne + enregistrement des échantillons + méthode STOP.....	XV
<b>Figure 30</b> Run table fonction "Amonts" pour enregistrer les échantillons standard	XVI
<b>Figure 31</b> Spectres des molécules à 260 nm .....	XVII
<b>Figure 32</b> Spectres des molécules 4-nitrophénol (14 min) et Acénocoumarol (21,3 min) à 305 nm .....	XVII

## **LISTE DES ANNEXES**

Annexe 1: Tableau de cotation des molécules identifiées par leur numéro de classement .....	I
Annexe 2 Protocole de dosage de la caféine dans un échantillon d'EDCH par HPLC-UV.....	X
Annexe 3 Chromatogrammes et spectres de la caféine, crimidine, colchicine, 4-nitrophénol, aldicarbe, acénocoumarol, nicotine et digoxine. ....	XVII
Annexe 4 Protocole de préparation de la solution tampon pH 3.....	XVIII

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> Classification des agents chimiques selon leur toxicité par Hodge et Stermer. -----	34
<b>Tableau 2</b> Le score "Prix" est déterminé à-partir du prix en euros pour 100mg de produit chez le fournisseur Sigma Aldrich entre juin et août 2022. -----	38
<b>Tableau 3</b> Critères du score détectabilité à-partir des informations recueillies dans les FDS ou les fiches caractéristiques du produit du fournisseur sur son site. -----	38
<b>Tableau 4</b> Estimation de la toxicité aiguë par voie orale selon l'UNECE. -----	40
<b>Tableau 5</b> Scores intermédiaires calculés à-partir des données toxicologiques, physico-chimiques et organoleptiques de l'aldicarbe. -----	46
<b>Tableau 6</b> Caractéristiques physico-chimiques, organoleptiques et toxicologiques du Malathion. -----	48
<b>Tableau 7</b> Groupements utilisés dans différentes phases stationnaires-----	54
<b>Tableau 8</b> Composition de la solution mère n°1 préparée par pesées.-----	69
<b>Tableau 9</b> Concentrations en mg/L des différentes molécules de la solution mère n°2 avec leurs pKa respectifs. -----	70
<b>Tableau 10</b> Variation de la composition de la phase mobile de la méthode n°1-----	70
<b>Tableau 11</b> Grandeurs caractéristiques des molécules selon le protocole retenu. --	72
<b>Tableau 12</b> Concentration de colchicine dans notre échantillon de solution suspecte. -----	76

## LISTE DES EQUATIONS

<b>Équation 1</b> Calcul du score accessibilité en fonction de la facilité d'achat, du prix de la molécule pour 100mg et de sa disponibilité -----	37
<b>Équation 2</b> Calcul du score intermédiaire de solubilité/toxicité à-partir des valeurs exactes du tableau en annexe.-----	41
<b>Équation 3</b> Calcul du score final pour le développement de la méthode dans une matrice aqueuse.-----	41
<b>Équation 4</b> Calcul du score final pour le développement de la méthode dans une matrice alimentaire -----	41

## LISTE DES ABREVIATIONS

2SNM	Système de Surveillance Nucléaire de la Marine
AEM	Action de l'État en Mer
ANSES	Agence Nationale de Sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'Environnement et du travail
ASTEE	Association Scientifique et Technique pour l'Eau et l'Environnement
CIAC	Convention d'Interdiction des Armes Chimiques
CLP	Classification, Labelling, Packaging
CMV	Chlorure de Vinyle Monomère
CSP	Code de Santé Publique
DL <sub>50</sub>	Dose létale 50
EDCH	Eaux Destinées à la Consommation Humaine
ELISA	Enzyme-linked Immuno Assay
EPA	Environment Protection Agency
EUP	Eau ultrapure
FDA	Food and Drug Administration
FDS	Fiche des Données de Sécurité
GC-MS	Chromatographie Gazeuse couplée à un Spectromètre de Masse
HPLC-UV	Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à un DéTECTeur Ultraviolet.
ICP	Inductively Coupled Plasma
JO	Jeux Olympiques
LASEM	Laboratoire d'Analyse, de Surveillance et d'Expertise de la Marine nationale
LCA	Laboratoire de Chimie Analytique
LSR	Laboratoire de Surveillance Radiologique
NR	Non Renseigné
NRBC-E	Nucléaire, Radiologique, Biologique, Chimique ou Explosif
OFDT	Observatoire Français des Drogues et des Tendances addictives
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PFAS	per- and polyfluoroalkyl substances
PGSSE	Plan de Gestion de la Sécurité Sanitaire des Eaux
PSA	Primary Secondary Amine
RNLBP	Réseau National des Laboratoires Biotox Piratox
SGH	Système général Harmonisé
SSR	Service de Surveillance Radiologique
SST	Santé Sécurité au Travail
TDL <sub>0</sub>	Lowest Published Toxic Dose
UHPLC	Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance
UNECE	Commission économique pour l'Europe et les nations unies
UT	Unité Technique
UV	Ultraviolet



# CHAPITRE I. : LES GENERALITES

## I. INTRODUCTION

Le 22 avril 2024 paraissait un article du Parisien avec comme titre « JO 2024 : « Bien manger en France, c'est important » ... Les grandes ambitions pour l'alimentation des athlètes ». T. Chaffotte, son auteur, nous informait que les objectifs étaient de 13 millions de repas servis pendant les Jeux olympiques et paralympiques.(1) Quel aurait été l'impact d'une éventuelle contamination, volontaire ou involontaire, de ces denrées ?

Nous avons très souvent lu des articles sur la pollution de la Seine et le renforcement des mesures visant à améliorer le traitement des eaux, mais qu'en était-il de la sécurité de l'eau destinée à la consommation humaine (EDCH) distribuée lors de cet évènement ? Quels moyens ont pu être mis en place afin de palier une éventuelle contamination de cette ressource ? Et comment détecter une probable contamination alimentaire par toxique ?

La question de la sécurité se pose encore régulièrement lors de tels évènements, mais il s'agit aussi d'une question de santé et de sécurité publique.

C'est pourquoi le scénario d'une éventuelle contamination de l'eau, notamment celle qui proviendrait du réseau d'eau potable, a été retenu afin de traiter cette question.

« Eau, tu n'as ni goût, ni couleur, ni arôme, on ne peut pas te définir, on te goûte, sans te connaître. Tu n'es pas nécessaire à la vie, tu es la vie » (*Terre des hommes*, 1938 - Antoine de Saint-Exupéry).

La communauté scientifique s'accorde à dire qu'il n'y a pas de vie possible sans eau et que grâce à elle, la vie est apparue il y a 3 milliards d'années sous la forme de micro-organismes unicellulaires. Cet élément ubiquitaire, de formes diverses et si commun, est néanmoins nécessaire à la survie de tout organisme vivant.

L'eau est une ressource précieuse, distribuée à grande échelle sur le territoire national, et en 2020, l'Observatoire des services publics d'eau et d'assainissement estimait que chaque Français utilisait en moyenne 149 litres d'eau potable par jour.(2)

Notons qu'en 2001, seuls 53% des Français consommaient de l'eau du robinet. Cette tendance s'est inversée en 2006 avec, entre autres, l'émergence des modes de consommation éco-responsables qui augmentent la part de consommation d'EDCH comme eau de boisson au-travers de divers moyens de filtration. Cette tendance se renforce avec la crise des eaux en bouteille mise en lumière par une enquête conjointe du « Monde » et de Radio France en 2024. Les français apprenaient que les eaux vendues comme « de source » ou « minérales naturelles » subissaient des techniques de purification interdites. (3)

De plus, d'après le baromètre 2018 TNS-SOFRES sur « Les Français et l'eau », 66% des français déclarent boire au quotidien de l'eau du robinet contre 47% pour l'eau embouteillée. (4). Cette dynamique reste stable, puisqu'en 2024, 67% des français consommaient l'eau du robinet tous les jours ou presque.(5)

Du fait de son caractère précieux et de sa grande distribution au-travers d'importants réseaux, l'eau est un vecteur de choix pour diffuser une substance néfaste dans le cas d'une contamination volontaire ou involontaire. Elle a le pouvoir d'impacter l'ensemble de la population desservie, dont les populations vulnérables (personnes âgées, malades, femmes enceintes, enfants...). Toute contamination de ce circuit conduirait à une paralysie des réseaux de distribution d'EDCH et un nombre important de cas possibles d'intoxication.

Il est donc primordial de maintenir une surveillance de ce réseau, de pouvoir détecter et quantifier un potentiel agent toxique lors d'une intrusion, et ce avec une grande réactivité dans un contexte où la menace d'une contamination volontaire ou accidentelle reste forte. L'eau du robinet est le produit alimentaire le plus contrôlé avec chaque année 28 millions d'analyses réalisées, 18,5 millions par les autorités sanitaires et 9,3 par les entreprises de l'eau.(4)

Plusieurs paramètres physico-chimiques (pH, conductivité, dureté de l'eau, concentrations en ions), microbiologiques et organoleptiques sont vérifiés de la ressource jusqu'au robinet du consommateur avec des valeurs de référence à respecter. A ces premiers, d'autres paramètres liés aux substances indésirables comme les nitrates, les nitrites ou les pesticides ainsi que les paramètres liés aux substances toxiques comme certains micropolluants (sélénium, cyanure, chrome) sont surveillés. L'ensemble des paramètres à intégrer à la surveillance des EDCH sont indiqués dans la Directive 2020/2184 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2020 relative à la qualité des EDCH.(6)

Dans ce contexte, le Laboratoire d'Analyse, de Surveillance et d'Expertise de la Marine Nationale (LASEM) de Toulon a souhaité améliorer ses capacités de détection d'agents toxiques pouvant potentiellement être utilisés pour contaminer des réseaux d'eau en développant un protocole de criblage des composés toxiques par une méthode analytique disponible dans la plupart des laboratoires d'analyses, la chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur ultraviolet (HPLC-UV).

Cette méthode de détection a été développée dans un premier temps pour répondre à une problématique de contamination chimique avec l'EDCH comme vecteur.

Nous n'écartons pas le risque de contamination d'aliments par ce même mode opératoire, c'est pourquoi cette méthode d'analyse peut aussi être utilisée après extraction en cas de suspicion de contamination d'aliments. Nous pouvons donc nous affranchir du vecteur de contamination dès lors que la méthode d'extraction est appropriée.

Pour répondre à notre objectif, ce travail s'articule en trois temps ; premièrement, nous décrirons le contexte avec l'étude d'une liste de molécules utilisables à des fins malveillantes en les classant selon différents critères. Puis, nous aborderons la méthode d'extraction dans plusieurs matrices alimentaires et enfin nous décrirons la méthode de détection et de dosage pour certains de ces composés toxiques par HPLC-UV.

## II. CONTEXTE : SURVEILLANCE DU RESEAU EDCH

La surveillance du réseau EDCH en France est parfois mise à mal dans certains départements comme dans le Loiret où en juillet 2023, une dizaine d'habitants ont été concernés par une contamination au chlorure de vinyle monomère (CMV). Ce CMV migre des tuyaux jusque dans l'eau potable, sous forme de gaz et affecterait 140 000 kilomètres de canalisation en France. C'est en 1987 que le CMV est classé cancérogène par le Centre international de Recherche sur le Cancer (CIRC) et l'Organisation mondiale de la Santé (OMS). Ces deux institutions confirment qu'une forte exposition au gaz favorise l'apparition de deux formes de cancer du foie : l'angiosarcome hépatique et le carcinome hépatocellulaire. (7)

Malgré les nombreux points de contrôle, il arrive que le réseau d'EDCH soit vulnérable aux contaminations, quelles soit volontaires ou accidentelles. Cette surveillance est placée au cœur des différents programmes notamment avec des renforcements des mesures de contrôle avec l'intégration des PFAS dans les programmes réglementaires de contrôles sanitaires des EDCH a-partir de janvier 2026. L'instruction DGS/EA4/2025/22 du 19 février 2025 précise les modalités de suivi et de gestion des risques sanitaires liés à la présence des PFAS dans les EDCH, à l'exclusion des eaux conditionnées.(8)

La notion d'«EDCH ou eaux destinées à la consommation humaine » recouvre toutes les eaux qui, soit en l'état, soit après traitement, sont utilisées pour la boisson, pour la cuisson et la préparation des aliments, ainsi que pour tous les autres usages individuels et collectifs qui participent à garantir aux personnels de bonnes conditions d'hygiène. Le terme d'«eaux techniques » est utilisé pour toutes les autres catégories. (9)

La surveillance est définie différemment selon que l'EDCH est distribuée à terre ou dans des conditions spécifiques telles qu'à bord d'un bâtiment de la marine nationale.

Dans le premier cas, c'est le Code de Santé Publique (CSP) qui énonce les conditions que l'eau potable doit remplir dès lors qu'elle est distribuée à terre. L'annexe 1 de l'arrêté du 11 janvier 2007 relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et des EDCH définit les limites et références de qualité à l'exclusion des eaux conditionnées selon plusieurs paramètres (10):

- Microbiologiques (E. coli, entérocoques)
- Chimiques (dont l'acrylamide, le plomb, les fluorures)
- La radioactivité avec pour exemple le dosage du tritium et du radon
- Organoleptiques (couleur, saveur, odeur)
- Métabolites de pesticides et hormones comme le 17 béta estradiol.

Pour l'EDCH distribuée à bord des bâtiments de la marine nationale c'est la circulaire N° 515069/ARM/DCSSA/ESSD/NP qui définit les conditions de cette surveillance. Cette circulaire s'applique aux installations d'embarquement, de production, de traitement, de stockage et de distribution des eaux destinées à la consommation humaine.

Les EDCH ont une obligation de conformité vis-à-vis de la présence ou de la concentration de microorganismes, de parasites ou toute autre substance pouvant constituer un danger pour la santé des personnes.

A bord des bâtiments, les EDCH peuvent avoir des provenances différentes :

- Directement d'un réseau réputé délivrer des eaux de qualité maîtrisée vers le réseau de distribution du bâtiment sans passer par ses réservoirs de stockage
- Des réservoirs de stockage du bâtiment remplis à partir :
  - Soit d'eaux brutes via les installations de production propres au bâtiment
  - Soit d'un bâtiment ravitailleur, d'une citerne ou par branchement sur le réseau d'adduction à condition que la qualité de ces eaux soit maîtrisée.

Le 23 décembre 2020, la Directive 2020/2184 du Parlement européen et du Conseil relative à la qualité des EDCH a été publiée au Journal officiel de l'Union Européenne. Son objectif est de « protéger la santé des personnes des effets néfastes de la contamination des EDCH en garantissant la salubrité et la propreté de celles-ci » avec, entre-autre la mise en place d'une approche basée sur les risques : le plan de gestion de la sécurité sanitaire des eaux (PGSSE). Ce plan est une approche globale qui tend à garantir en permanence la sécurité sanitaire de l'approvisionnement en EDCH. C'est une gestion préventive promue par l'OMS depuis 2004 avec l'élaboration d'un guide technique pour l'identification des dangers et la mesure de la maîtrise du risque accompagné de son tableau Excel qui recense les dangers sur les réseaux. Ces documents sont publiés depuis mars 2021 sur le site de l'Association scientifique et technique pour l'eau et l'environnement (ASTEE).<sup>(11)</sup> Il faut rappeler que cette Directive découle de la Directive européenne 98/83/CE du 3 novembre 1998 <sup>(12)</sup> relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine qui a été elle-même adaptée au progrès scientifique et technique la Directive 80/778/CEE du Conseil du 15 juillet 1980 <sup>(13)</sup>

a) *Place des Laboratoires d'Analyses, de Surveillance et d'Expertise de la Marine Nationale dans l'analyse des échantillons d'EDCH*

Les LASEM constituent des pôles scientifiques et techniques au sein des bases navales de Brest, Cherbourg et Toulon.

Leur organisation et leur fonctionnement sont définis par l'Instruction 681-2015 du 27 mai 2015 <sup>(14)</sup>

Les LASEM, concourent notamment au soutien des commandants des forces maritimes, des autorités maritimes à compétence territoriale et des préfets maritimes. Ils constituent l'un des moyens pour la marine nationale d'exercer ses responsabilités en matière de protection de l'environnement et de santé publique. En particulier, la responsabilité d'exploitant nucléaire impose à la marine des obligations réglementaires strictes en matière de surveillance de l'environnement, en situation normale d'exploitation comme en situation d'incident ou d'accident.

Les LASEM apportent un concours scientifique et technique par des analyses et expertises réglementaires ou opérationnelles dans plusieurs domaines repris dans la **Figure 1** ci-dessous.



**Figure 1** Les domaines couverts par le LASEM (source interne LASEM)

Le LASEM de Toulon se compose depuis le 18 août 2011 de trois services

- Le laboratoire de chimie analytique (LCA),
- Le laboratoire de surveillance radiologique (LSR),
- Le service de surveillance radiologique (SSR)

Des services annexes (Qualité, métrologie, achats...) concourent au bon fonctionnement du laboratoire.

C'est au sein de laboratoire de chimie analytique (LCA) du LASEM composé de 4 unités techniques (UT) que sont analysés les divers échantillons.

- Unité technique Amiante,
- Unité technique Eaux qui réalise les analyses physico-chimiques des EDCH et des « eaux diverses » telles que les eaux traitées ou les eaux déminéralisées (eaux industrielles).
- Unité technique Gaz,
- Unité technique Expertise en charge de l'analyse des autres échantillons dès lors qu'une expertise est demandée. C'est donc dans cette unité que la nouvelle méthode d'analyse a été développée.

Le LASEM de Toulon fait partie d'un réseau national de laboratoires pour répondre à la menace nucléaire, radiologique, biologique, chimique et par explosifs. (NBCR-E) (15) Ce réseau est constitué de laboratoires civils du secteur public et du secteur privé et de laboratoires militaires rattachés au ministère des Armées.

b) *L'intérêt de l'analyse HPLC-UV dans la stratégie analytique du LASEM de Toulon*

Lorsqu'un échantillon arrive au laboratoire, les éléments du contexte sont étudiés et un canevas d'analyses est mis en place en fonction de la quantité disponible en échantillon.

Le LASEM dispose de plusieurs équipements pour l'analyse de ces échantillons.

Le LASEM a choisi de développer une méthode par chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur UV (HPLC-UV) en complément des méthodes déjà existantes. C'est une méthode d'analyse facile à mettre en place et peu coûteuse au regard des autres technologies. Elle ne nécessite pas obligatoirement de préparation d'échantillon dans le cadre d'une suspicion de contamination du réseau d'eau, ce qui nous a permis de développer dans ce travail une méthode d'analyse dans des échantillons aqueux dans un premier temps.

L'un des avantages de cette technique d'analyse est sa facilité pour rechercher une simple présence de toxiques mais il est aussi possible de la quantifier.

Cette méthode chromatographique vient en complément des autres analyses et couvre une grande part des toxiques potentiellement utilisés ou redoutés.

c) *Les classes de molécules potentielles candidates*

La méthode que nous avons utilisée pour classer les molécules s'appuie tout d'abord sur une contamination de l'EDCH, considérée comme un aliment.

Cette méthode a vocation à servir dans des contextes plus larges comme la contamination de matrices alimentaires autres que l'EDCH (farines, préparations alimentaires, café).

Les agents potentiellement toxiques, pouvant être utilisés à des fins malveillantes, en grande quantité (dans le cadre d'une contamination d'une grande quantité d'eau dans un réservoir d'eau) ou en plus faible quantité (contamination d'un stockage plus petit, voire d'un verre d'eau) sont retenus en fonction de leurs caractéristiques physicochimiques et toxiques.

Nous avons donc cherché à identifier des molécules hydrosolubles et faciles d'usage notamment par leur accessibilité.

Le classement regroupe donc :

- Les médicaments humains ou vétérinaires plus ou moins accessibles selon leurs conditions de délivrance (*exemple : la colchicine*).
- Les pesticides (herbicides, fongicides, acaricides, insecticides, biocides) d'accès restreint ou non (*exemple : le malathion*).
- Les drogues illicites (*exemple : le carfentanyl*).

- Les produits chimiques industriels qui pourraient voir leur usage détourné  
*Exemple : l'aldicarbe).*

### **III. OBJECTIF DU TRAVAIL**

Dans un contexte de suspicion de contamination, face à un prodrome ou toxidrome évocateur ou encore en cas de situation d'urgence, notre travail a permis de répondre à ces questions :

- Pouvons-nous détecter la présence d'un toxique détectable par cette méthode dans cet échantillon ?
- Pouvons-nous doser ce toxique ?

C'est pourquoi dans un premier temps nous avons procédé à une extraction sur phase solide afin de s'affranchir d'une matrice complexe pour obtenir un échantillon analysable par HPLC-UV. L'échantillon a alors été analysé pour détecter et quantifier un éventuel toxique selon les limites de détection et de quantification de la méthode employée.

Avant toute manipulation, il a été question d'identifier de potentielles molécules utilisables à des fins malveillantes et détectable par notre méthode d'analyse. C'est pourquoi nous les avons classifiées selon plusieurs critères.

Dans un second temps nous nous sommes attardés sur l'extraction des molécules d'une matrice alimentaire pour enfin analyser les échantillons obtenus en HPLC-UV

## IV. REFERENCEMENT DES MOLECULES POTENTIELLEMENT UTILISABLES POUR UNE CONTAMINATION DANS LES ALIMENTS A GRANDE ECHELLE ET DETECTABLES PAR HPLC-UV

### 1. Introduction

La présence d'agents chimiques fait partie du risque de contamination volontaire ou involontaire.

Certains agents chimiques comme les toxiques de guerre sont interdits par la Convention sur l'Interdiction des Armes Chimiques (CIAC) signée le 13 janvier 1993 à Paris. La CIAC engage ses États parties à ne pas fabriquer, stocker ou utiliser des armes chimiques.

De plus, le risque d'utilisation est grandement pris au sérieux par les autorités françaises. Le Livre Blanc de la Défense et de la Sécurité Nationale (2013) prône la nécessité de renforcer le dispositif de prévention et de réponse face aux menaces NRBCE notamment dans le cadre international (16). Aujourd'hui la préoccupation de la menace terroriste est renforcée dans un contexte politique délicat avec la Russie.

C'est dans cette dynamique que le LASEM de Toulon s'inscrit en souhaitant tout d'abord éditer un classement des agents chimiques les plus « à risques », et dans le cadre de ce travail, il était intéressant d'identifier les molécules détectables par l'HPLC-UV. Ce travail de classification s'appuie en partie sur des critères physico-chimiques et toxicologiques issus de la littérature.

### 2. Matériels et méthodes

#### a) *Données d'entrée utilisées*

L'étude a été faite à-partir de publications identifiées au moyen du moteur de recherche de ScienceDirect (17) en ne sélectionnant que les articles de moins de 10 ans à-partir de mai 2022.

Les équations de recherche suivantes ont donné 219 résultats :

- « Poisoning case» and « drinking water » and « oral route » a donné 52 résultats.
- « Cas intoxication domestique » AND « voie orale » AND « chimique » : 111 résultats
- « Cas d'intoxication mortelle » OR « intoxications mortelles » AND « voie orale » OR « per os » and HPLC : 37 résultats.
- « Cas d'intoxication chimique » AND « voie orale » OR « per os » AND « eau potable » : 19 publications.

Après l'étude des titres selon l'intégration des mots clés : intoxication, chimique, voie orale, contamination, toxique, la suppression des résultats en doublon et la lecture des résumés, il reste 11 références dont 4 articles de recherche, 2 revues, 3 communications courtes, 2 résumés de conférence et 1 chapitre de livre. De cette recherche bibliographique nous avons pu lister les différentes molécules rencontrées.

Par ailleurs, 57 agents chimiques identifiés par le Pharmacien Le Roy (2016) dans son mémoire « Contamination des ressources en eau par des toxiques chimiques : Probabilité d'utilisation – probabilité de détection » ont été ajoutés.

Dans cette liste d'agents toxiques nous avons aussi inclus une sélection de molécules inscrites dans la base de données ChemIDPlus (18) accessible à l'adresse suivante : <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus> selon le critère de toxicité les molécules (DL50 inférieure ou égale à 1mg/kg chez le rat par voie orale), nous avons donc des composés extrêmement toxiques selon l'échelle de Hodge et Stermer (19) détaillée dans le **Tableau 1**.

De cette recherche, 177 molécules ont été identifiées.

Classe de toxicité	Terme utilisé	Paramètre toxicologique (DL <sub>50</sub> orale)
1	Extrêmement toxique	DL <sub>50</sub> ≤ 1mg/kg
2	Hautement toxique	1 mg/kg ≤ DL <sub>50</sub> ≤ 50 mg/kg
3	Modérément toxique	50 mg/kg ≤ DL <sub>50</sub> ≤ 500 mg/kg
4	Légèrement toxique	500 mg/kg ≤ DL <sub>50</sub> ≤ 5000 mg/kg
5	Presque toxique	5000 mg/kg ≤ DL <sub>50</sub> ≤ 15000 mg/kg
6	Relativement inoffensif	DL <sub>50</sub> > 15000mg/kg

**Tableau 1** Classification des agents chimiques selon leur toxicité par Hodge et Stermer, publiée en 1949 dans « tabulation of toxicity classes »

Au cours de sa conférence du 4 mai 2022, au congrès international de recherche et de l'innovation à Lille, Myers fait mention du carfentanyl que nous avons rajouté à la liste. Cette molécule fait partie des toxiques de la liste des nouveaux produits de synthèse identifiés en France depuis 2000 par l'Observatoire français des drogues et des tendances addictives (OFDT). (20)

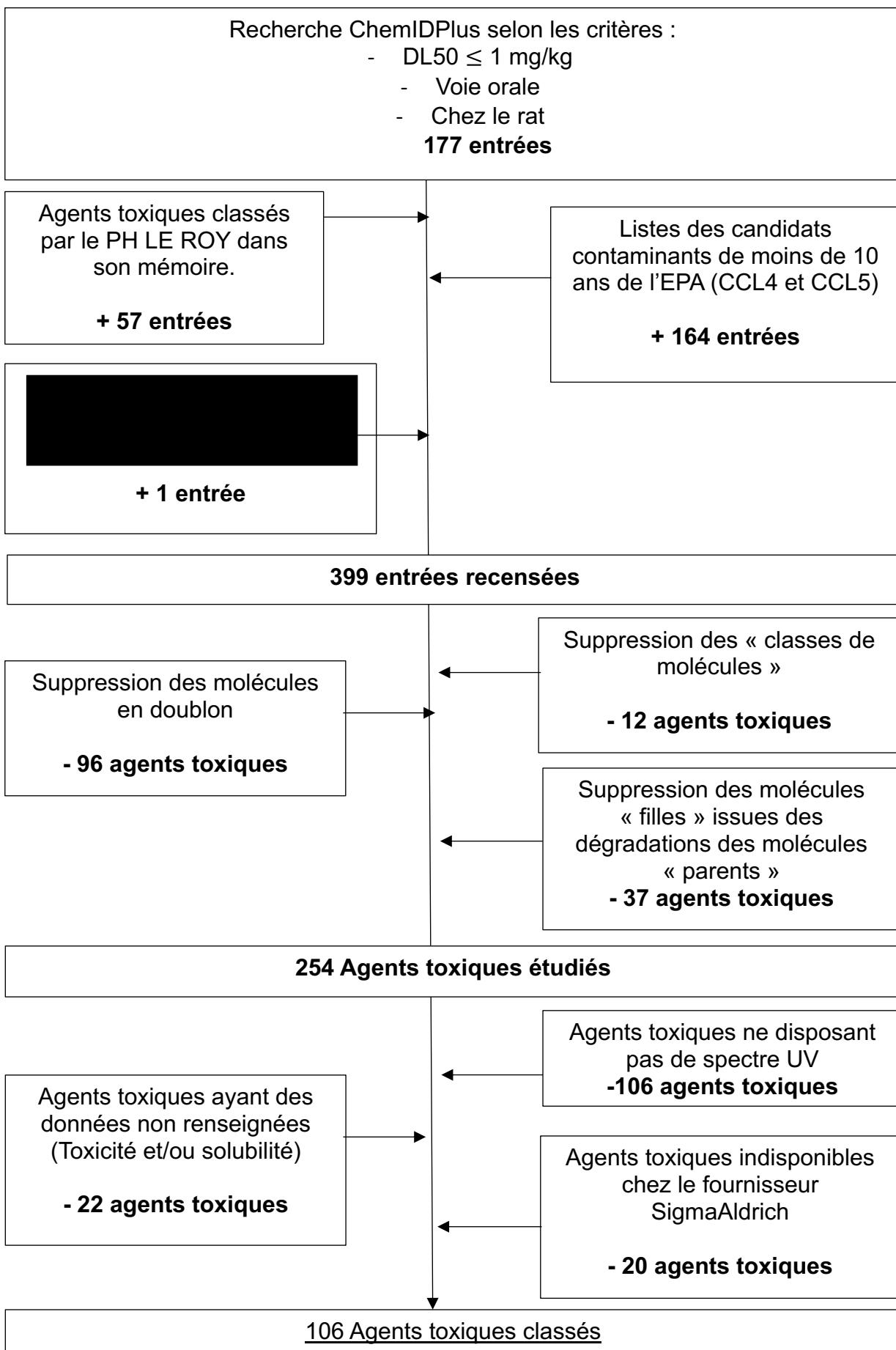
De plus, nous avons fait le choix d'intégrer les molécules des listes des candidats contaminants 4 (CCL4) (21) de 2016 et CCL5 de 2021 de l'Agence de protection de l'environnement des États-Unis (EPA) soit 97 et 67 molécules respectivement (22).

Nous avons choisi pour l'ensemble du travail de ne sélectionner que des molécules des listes datant de moins de 10 ans, soit après 2012.

Après avoir supprimé les doublons, les molécules filles issues des dégradations d'une molécule mère et les références qui correspondent à un groupe de molécules et non une seule molécule, la liste des molécules potentielles candidates s'élève à 254 références.

A cette première liste de 254 agents toxiques, une seconde sélection a été faite en incluant la disponibilité des références de toxicité et/ou solubilité, leur disponibilité chez le fournisseur que nous avons sélectionné ainsi que leur possible spectre UV. C'est pourquoi nous sommes arrivés à une liste de 106 agents toxiques classés dans notre travail.

Le processus de sélection étant schématisé ci-après avec la **Figure 2**.



**Figure 2** Sélection des agents toxiques à classer.

Le but de cette étude est de classer ces molécules selon plusieurs critères (déTECTabilité par le consommateur, accessibilité du produit, toxicité) et un score a été attribué pour chacun des critères traduisant *in fine* leur potentiel dangereux au travers d'un score.

Un score élevé signifie que le risque est conséquent alors qu'un faible score traduirait un faible risque selon nos critères de cotation. Les scores finaux varient de 0 à 1000.

*b) Critères de classification des molécules d'intérêt*

Nous avons retenu 5 critères pour établir un score reflétant leur potentiel dangereux :

- La facilité d'accès à l'agent toxique
- La détECTabilité par le consommateur (critères organoleptiques)
- La toxicité
- La solubilité
- Score final

Ces critères sont détaillés ci-après.

### **L'accessibilité à l'agent toxique**

Plus un agent toxique est accessible et plus son score accessibilité sera élevé. L'accessibilité sera donc définie par l'équation suivante :

$$\text{Score accessibilité} = \text{Score disponibilité Sigma} \times \text{Score prix} \times \text{Accès GP}$$

**Équation 1** *Calcul du score accessibilité en fonction de la facilité d'achat, du prix de la molécule pour 100mg et de sa disponibilité*

Nous avons utilisé pour cela 3 niveaux de cotation intermédiaires :

- 1) *La disponibilité* du produit à l'achat et pour cela nous nous sommes basés uniquement sur le catalogue du fournisseur Sigma Aldrich.

Si le produit est disponible nous lui attribuons score de 1, s'il ne l'est pas alors il a un score nul, comme les toxiques de guerre.

- 2) *Le score lié au prix* pour 100 mg de produit est traduit par la cotation ci-après ;

Nous lui avons attribué un score de 0,1 si 100mg de ce produit ont un prix d'achat sur la centrale d'achat supérieur à 100euros. Le score sera égal à 1 s'il est compris entre 10 et 100 euros inclus et enfin il aura un score égal à 10 si 100mg de produit coûtent moins de 10 euros à l'achat. Les scores sont reportés dans le **tableau 2** ci-contre.

Prix pour 100mg de produit	Score
< 10€	10
10€ ≤ prix < 100€	1
100€ ≤ prix	0,1

**Tableau 2** Le score "Prix" est déterminé à-partir du prix en euros pour 100mg de produit chez le fournisseur Sigma Aldrich entre juin et août 2022.

### 3) Pour l'accessibilité par le grand-public (Accessibilité GP),

Un produit chimique présentera d'autant plus de danger qu'il est facilement accessible, par son faible prix mais aussi par sa distribution.

La distribution au grand public a aussi un impact sur la disponibilité et le score final de l'accessibilité sera multiplié par 2 si le produit est disponible au grand public comme les médicaments ou certains rodenticides.

Ce critère a été vérifié pour les médicaments avec leur disponibilité en officine avec ou sans ordonnance. Pour les autres substances chimiques nous avons utilisé le support E-phy de l'agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES)(23). Une molécule disponible sous forme commerciale et disponible au grand public sera alors considérée comme accessible. Cette recherche s'est effectuée entre les mois de juin et août 2022.

Ce score d'accessibilité varie donc de 0 à 20.

### La détectabilité par le consommateur

A travers ce critère nous avons voulu retranscrire la composante organoleptique avec la couleur et le goût de l'agent chimique. Un toxique sera d'autant plus redouté s'il ne possède ni couleur ni goût.

Le scoring se fait sur la présence ou l'absence de couleur et/ou de goût, détaillé dans le **Tableau 3** ci-après.

Critères	Score
Présence de goût	0,5
Présence de couleur	0,5
Absence de goût	1
Absence de couleur	1

**Tableau 3** Critères du score détectabilité à-partir des informations recueillies dans les FDS ou les fiches caractéristiques du produit du fournisseur sur son site.

Le score de la détectabilité est alors obtenu par multiplication des scores des critères « goût » et « couleur ». Un agent sans couleur ni goût aura un score de détectabilité égal à 1, *a contrario*, un agent qui aurait une couleur et un goût aurait un score de 0,25.

Ce critère sera amené à être modifié dans le cadre des matrices alimentaires, nous ne prendrons pas en compte le critère goût car le goût du toxique pourra être masqué par les aliments. En revanche nous conservons le critère « couleur » car il peut être possible de l'adapter en fonction de la matrice alimentaire car le toxique peut être mélangé avec de la farine blanche et lui donner une teinte, alors que la couleur n'aura aucun impact dans une matrice foncée.

Il s'agit d'un critère difficilement accessible, du fait de la complexité pour recueillir le seuil de goût d'une molécule, c'est pourquoi nous avons choisi le pire scénario quand cette information n'était pas disponible et nous lui avons attribué un score de 1.

## La toxicité

Le critère toxique est étroitement lié au critère solubilité. Dans l'eau, il est nécessaire que le produit soit parfaitement soluble à la dose toxique retenue.

La toxicité est donc définie entre la plus faible  $DL_{50}$  chez le rat ou la souris (pondérée par un facteur de sécurité inter espèce de 10) et la plus faible dose toxique publiée chez l'Homme ( $TDL_0$ ).

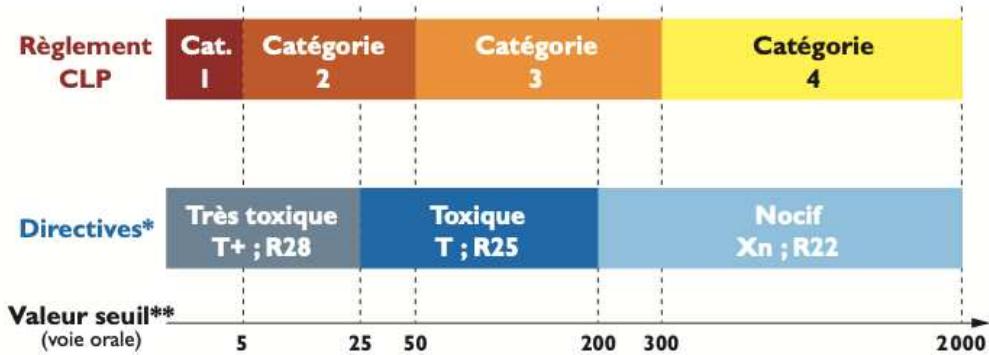
Nous avons choisi le rat comme modèle d'étude toxicologique, pour interpréter les  $DL_{50}$ . Il est avec la souris une espèce très utilisée en recherche biomédicale. Le rat possède l'avantage d'être plus proche physiologiquement de l'homme en comparaison avec la souris.

Nous nous sommes placés aux concentrations les plus faibles par principe de précaution. La  $TDL_0$  chez l'Homme apparaît comme davantage représentative mais très souvent plus élevée que le rapport  $\frac{DL_{50}}{10}$ .

Nous avons donc vu que le score évolue de façon proportionnelle avec la toxicité de la molécule étudiée. Les catégories ont été définies à-partir de la définition de la toxicité aiguë par la Commission économique pour l'Europe et les nations unies (UNECE) en 2009 à travers l'édition du règlement dit « CLP » qui signifie en anglais « Classification, Labelling, Packaging ». Il définit les nouvelles règles de classification, d'étiquetage des produits chimiques en Europe. Ce règlement met en œuvre les recommandations internationales du Système général harmonisé ou SGH.

Dans la **Figure 3** ci-après nous retrouvons les valeurs seuils d'estimation qui ont permis de classer un produit chimique selon sa toxicité aiguë (24). De ce fait, une substance classée très toxique par voie orale acquiert un score de 1000.

La classe de danger « toxicité aiguë » (voie orale) selon le règlement CLP.



\* Directives : Système préexistant – directives 67/548/CEE et 1999/45/CE modifiées (en France, arrêtés du 20 avril 1994 et du 9 novembre 2004 modifiés)

Valeurs seuils d'estimation\*\* basées sur la DL50 (valeur déterminée expérimentalement)

Cat. : catégorie

Attention, ce schéma n'est applicable que sur la base de l'utilisation des DL50.

**Figure 3 Classification de danger "toxicité aiguë" par voie orale selon le règlement CLP rédigé en 2009.(24)**

De la **Figure 3** nous avons édité le **Tableau 4** transcrivant les différents scores au regard des différentes catégories du règlement CLP. Nous avons rajouté un score supplémentaire pour une catégorie supplémentaire. Nous avons finalement 5 catégories avec des score varient de 1 à 1000 avec le score le plus élevé pour la catégorie la plus毒ique.

Catégorie	1	2	3	4	5
Estimation de la toxicité aiguë (mg/kg)	0-5	5-50	50-300	300-2000	2000-5000
Score	1000	100	50	10	1

**Tableau 4 Estimation de la toxicité aiguë par voie orale selon l'UNECE.**

Pour 19 molécules, nous n'avons pas recueilli l'information concernant leur toxicité et/ou leur solubilité. C'est pourquoi, il y a la mention « NR » pour « Non Renseigné » dans le tableau de classement des molécules en **annexe 1**.

### La solubilité

La solubilité est un critère important dans notre exercice pour les matrices aqueuses, il deviendra plus secondaire dans les matrices alimentaires ; un toxique pourra simplement être saupoudré dans une préparation et un agent insoluble a priori dans les matrices aqueuses pourra être alors utilisé dans les matrices plus complexes. La solubilité est un critère primordial pour la bonne dispersion de l'agent toxique dans une matrice aqueuse et pour cela une molécule fortement soluble aura un score plus élevé.

Un score  $\frac{Sol}{Tox}$  reflétant le lien entre la solubilité et la toxicité a été intégré pour rejoindre la réalité. Un agent toxique présentera d'autant plus de risques qu'il est davantage soluble dans l'eau.

La *Valeur toxique retenue*  $\left(\frac{mg}{L}\right)$  est obtenue à-partir de la  $\frac{DL50}{10}$  ou *TLDo* exprimée en  $mg/kg$ . Nous retenons qu'un adulte pèse en moyenne 70kg et boit 2L d'eau par jour. Nous obtenons donc la formule suivante pour la *Valeur toxique retenue*  $\left(\frac{mg}{L}\right)$  :

$$Valeur toxique retenue \left(\frac{mg}{L}\right) = \frac{DL50}{10} \times 70 \div 2 \text{ ou } TDLo \times 70 \div 2$$

C'est pourquoi, le *Score*  $\frac{Sol}{Tox}$  est défini selon la formule suivante :

$$Si \frac{Solubilité \left(\frac{mg}{L}\right)}{Valeur toxique retenue \left(\frac{mg}{L}\right)} < 1 \text{ alors } Score \frac{Sol}{Tox} = 0,01$$

$$Si \frac{Solubilité \left(\frac{mg}{L}\right)}{Valeur toxique retenue \left(\frac{mg}{L}\right)} > 1 \text{ alors } Score \frac{Sol}{Tox} = 1$$

**Équation 2** Calcul du score intermédiaire de solubilité/toxicité à-partir des valeurs exactes du tableau en annexe.

## Score final

Le score final est calculé selon la formule suivante :

$$Score final = \left(\frac{Score toxicité}{10}\right) \times Score Accessibilité \times Score détectabilité \times Score \frac{Sol}{Tox}$$

**Équation 3** Calcul du score final pour le développement de la méthode dans une matrice aqueuse.

Notre réflexion basée sur ces critères de cotation s'adapte pour le cas d'une contamination de ressources en eau. Nous pouvons nous affranchir facilement des critères organoleptiques et de la solubilité lors de contamination de matrice alimentaire. Et nous pourrons alors utiliser l'équation suivante pour définir le score final dans le cas d'une matrice alimentaire :

$$Score final = \left(\frac{Score toxicité}{10}\right) \times Score Accessibilité$$

**Équation 4** Calcul du score final pour le développement de la méthode dans une matrice alimentaire

### 3. Résultats

#### a) Molécules priorisées en fonction de leur potentiel d'utilisation

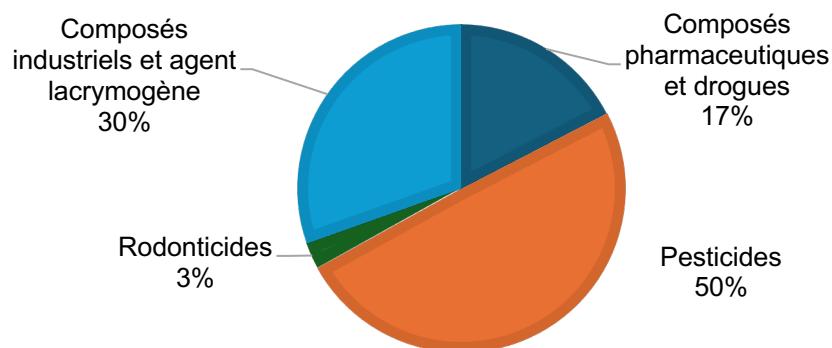
Dans notre étude nous avons repris plusieurs classes de molécules. Nous avons intégré des molécules médicaments utilisés en thérapeutique humaine, des rodenticides, des drogues, des agents chimiques issus de l'industrie et des pesticides.

Au total, nous avons basé notre classement sur 106 molécules.

Parmi les agents toxiques retenus nous avons plusieurs classes :

- Les pesticides qui regroupent les herbicides, les insecticides et les fongicides (50%),
- Les agents chimiques retrouvés dans l'industrie comme des intermédiaires de réaction ou les agents contenus dans les gaz lacrymogènes (30%),
- Les composés pharmaceutiques notamment avec les anticoagulants et les drogues (17%)
- Les rodenticides (3%).

RÉPARTITION DES CLASSES D'AGENTS TOXIQUES

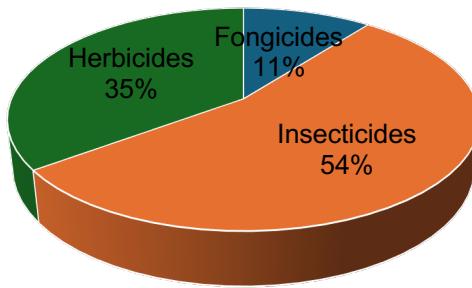


**Figure 4** Répartition des classes d'agents chimiques étudiés

Les pesticides représentent 50% des agents chimiques dans notre étude. Ils regroupent les herbicides, le fongicides et les insecticides et nous avons représenté leur répartition dans la **Figure 4**.

Dans cette classe de toxiques, 54% sont des insecticides, 35% sont des herbicides et les fongicides sont représentés à 11% dans la **Figure 5**.

Détail de la classe "Pesticides"

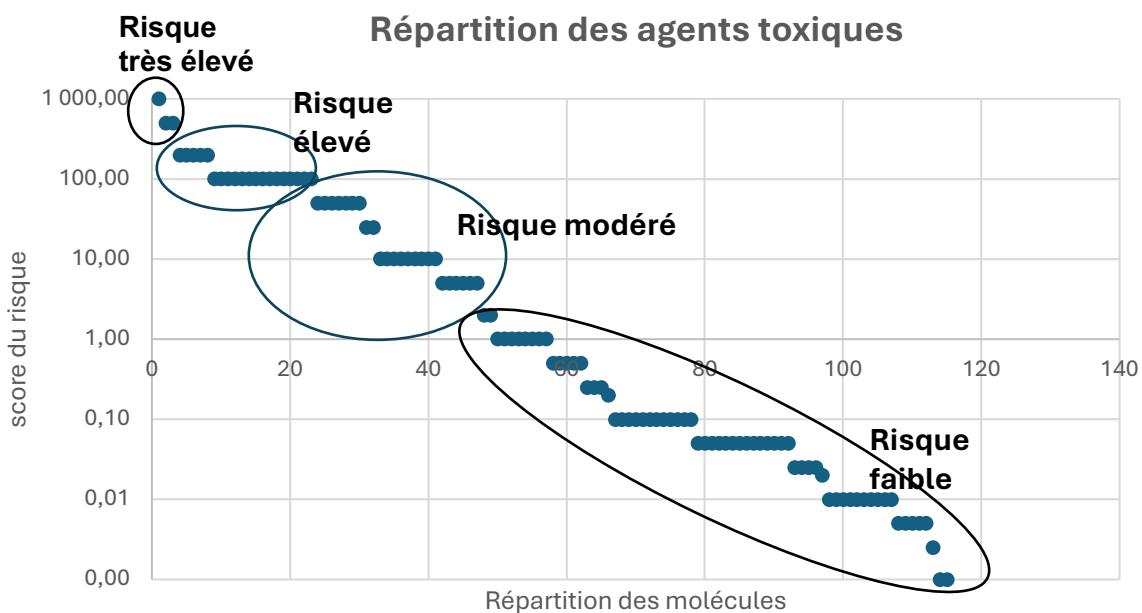


**Figure 5** Répartition des différentes classes retrouvées dans la catégorie des pesticides.

En conclusion, 254 molécules ont été retenues pour l'étude, après avoir retiré du classement les molécules qui n'avaient pas de spectre UV, celles dont nous ne disposons pas d'information sur leur toxicité et solubilité, nous avons pu classer 106 agents toxiques.

Les agents toxiques sont classés en 4 catégories en fonction de leur score final de dangerosité et représentés dans la **Figure 6**:

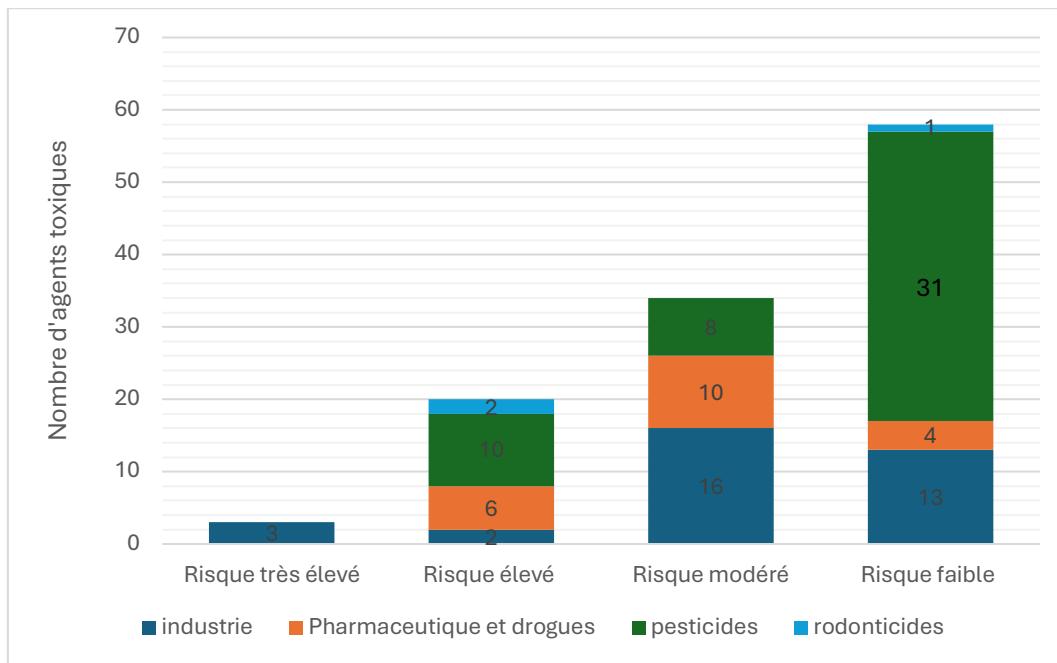
- Risque fortement élevé : scores compris entre 1000 et 500
- Risque élevé : scores compris entre 200 et 100
- Risque modéré : scores compris entre 50 et 1
- Risque faible : scores entre 0,5 et 0.



**Figure 6** Répartition des agents toxiques en fonction du logarithme en base 10 de leur score final de toxicité

Après le classement des différentes molécules nous pouvons identifier 3 molécules avec un risque très élevé provenant toutes les trois de l'industrie. 20 molécules présentent un risque élevé, 34 ont un risque modéré et 49 d'entre-elles ont un risque faible.

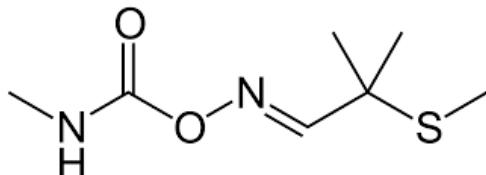
A travers le graphique de la **Figure 7**, nous pouvons facilement identifier les secteurs pouvant fournir plus facilement des produits en fonction de leur score final.



**Figure 7** Graphique de la répartition des classes des agents toxiques en fonction de leur score final de toxicité

b) Application de la méthode de cotation pour 2 exemples de molécules : l'aldicarbe et le malathion

### L'aldicarbe



**Figure 8** Molécule d'aldicarbe n°CAS 116-06-3

L'aldicarbe représenté dans la **Figure 8**, est un pesticide de la famille des carbamates retrouvé dans la spécialité Témik® interdit en France depuis 2007. Avec notre méthode de cotation, l'aldicarbe est 17<sup>e</sup> avec un score final égal à 100. Ce pesticide fait donc partie des molécules à risque élevé.

L'aldicarbe est une molécule qui possède un spectre UV avec un maximum d'absorption à 245nm.

#### Score accessibilité

Le score d'accessibilité est égal à 1. C'est une molécule disponible auprès du fournisseur Sigma Aldrich sous la référence « 33386-100MG » au prix de 73,60€ pour 100mg (25). Le score Accès Sigma vaut 1 et le Score Prix vaut 1.

Mais, depuis 2007, cette molécule est interdite dans les spécialités Témik®, nous avons donc estimé que depuis 15 ans les stocks de cette molécule n'existent plus, ou alors de manière anecdotique c'est pourquoi le score Accès GP vaut 1.

De ce fait, nous avons le calcul suivant :

$$\text{Score accès} = \text{Accès GP} \times \text{Score Prix} \times \text{Accès Sigma} = 1 \times 1 \times 1 = \mathbf{1}$$

En ce qui concerne le score de détectabilité, il vaut 1. L'aldicarbe est une molécule légèrement jaune mais la molécule a un très faible pouvoir colorant. Néanmoins, elle a une légère odeur piquante mais n'ayant pas d'information concernant son goût nous avons mis un score maximum de 1.

#### Score détectabilité

$$\text{Score détectabilité} = \text{Score goût} \times \text{Score Couleur} = 1 \times 1 = \mathbf{1}$$

L'aldicarbe a une solubilité de 6030 mg/L.

Le score de toxicité est calculé à-partir des DL<sub>50</sub> par voie orale chez le rat qui est de 0,5 mg/kg. Nous avons ajouté un facteur de sécurité interespèce de 10 pour obtenir une valeur toxicologique de **0,05 mg/kg**.

En parallèle, la TDLo chez l'Homme rapportée est de **28 mg/kg** d'après un cas d'intoxication d'une jeune femme de 28 ans avec des granules de Témik® (26). Nous avons conservé la plus faible concentration ayant une toxicité -entre la TDLo et la DL<sub>50</sub> - c'est-à-dire la dose毒ique obtenue à partir de la DL<sub>50</sub> chez le rat soit **0,05 mg/kg**.

Le score de toxicité est déterminé selon la formule précédemment détaillée plus haut. Pour un adulte de 70kg, on estime la dose toxique à 3,5mg par jour. Nous estimons que la consommation moyenne d'eau pour un adulte est de 2L par jour, nous obtenons une concentration en Aldicarbe de **1,75 mg/L/j**.

Le score  $\frac{Sol}{Tox}$  se calcule donc de la manière suivante :

$$\frac{Sol}{Tox} = \frac{Solubilité \left( \frac{mg}{L} \right)}{Valeur toxique retenue \left( \frac{mg}{L} \right)} = \frac{6030}{1,75} > 1 \text{ donc Score } \frac{Sol}{Tox} = 1$$

Le score final est donc calculé comme suit :

$$Score final = \left( \frac{Score toxicité}{10} \right) \times Score Accessibilité \times Score détectabilité \times Score \frac{Sol}{Tox}$$

Selon les critères suivants, nous pouvons calculer le score final de l'aldicarbe :

	Critères	Informations	Score
<b>Score Accessibilité</b>			<b>1</b>
	Disponibilité Sigma	Oui	1
	Prix pour 100mg	73,60€	1
	Accès GP	Jusqu'en 2007	1
<b>Score Déetectabilité</b>			<b>1</b>
	Goût	Non	1
	Couleur	Non	1
<b>Score Toxicité</b>			<b>1000</b>
	DL <sub>50</sub> chez le rat	0,5mg/kg	
<b>Score Sol/Tox</b>			<b>1</b>
	TDLo	28 mg/kg	
	DL <sub>50</sub> /10	0,05 mg/kg	
	Valeur toxicologique retenue	$0,05 \times 70 \div 2$ $= 1,75 \frac{mg}{L} /j$	
	Solubilité	6030 mg/L	
	$\frac{Solubilité}{\frac{Sol}{Tox}}$	$\frac{6030}{3445} > 1$	<b>1</b>

**Tableau 5** Scores intermédiaires calculés à-partir des données toxicologiques, physico-chimiques et organoleptiques de l'aldicarbe.

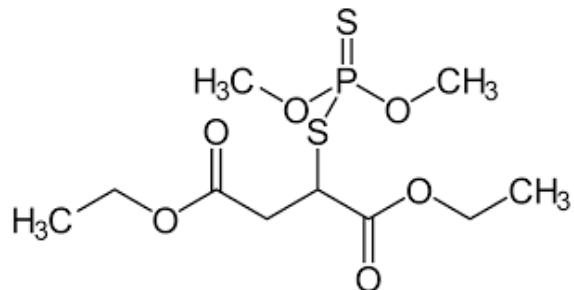
Soit

$$Score final = \left( \frac{1000}{10} \right) \times 1 \times 1 \times 1 = 100$$

Avec un score de 100, l'aldicarbe fait partie des molécules avec un risque élevé.

## Le malathion

Le malathion représenté à la **Figure 9** (N°CAS 121-75-5), appartient au groupe des insecticides organophosphorés. Autrefois utilisé dans la spécialité Prioderm® dans la lutte contre les poux, il agissait en intervenant dans la transmission de l'influx nerveux en inhibant l'acétyl-cholinestérase du poux.(27)



**Figure 9** Molécule de malathion (N°CAS 121-75-5)

En 2014 les ministères de la Santé et de l'Ecologie ont autorisé en Guyane le recours au malathion, un insecticide interdit dans l'UE pour éradiquer les moustiques tigres, vecteurs du virus chikungunya qui frappe l'Outre-mer. Dans la réponse du ministère des Affaires sociales, de la santé et des droits des femmes publiée dans le Journal Officiel Sénat, par mesure de précaution, le Gouvernement a, par arrêté du 27 mars 2015, levé l'autorisation dérogatoire d'usage de ce produit. (28). De plus, Depuis le 6 décembre 2018, tous les médicaments à base de malathion sont inscrits sur la liste I des substances vénéneuses, ce qui rend donc leur prescription médicale obligatoire. Parallèlement à ces restrictions d'emploi, le laboratoire Mylan a décidé d'arrêter la commercialisation du seul médicament à base de malathion encore disponible en France, la lotion Prioderm®. Cette dernière ne sera plus disponible à écoulement des stocks.(29)

### Score accessibilité

Le score d'accessibilité est égal à 1. C'est une molécule disponible auprès du fournisseur SigmaAldrich sous la référence « 36143-100MG» au prix de 48,20€. Le score *Accès Sigma* vaut 1 et le *Score Prix* vaut 1.(30)

Mais, depuis août 2018, ce biocide n'est plus autorisé au sein de l'Union Européenne. Son *Accès GP* vaut donc 1.

De ce fait, nous avons le calcul suivant :

$$\text{Score accès} = \text{Accès GP} \times \text{Score Prix} \times \text{Accès Sigma} = 1 \times 1 \times 1 = 1$$

### Score détectabilité

En ce qui concerne le score de détectabilité, il vaut 1. Le malathion est une molécule sans couleur dont on ne connaît pas l'odeur.

Le score détectabilité vaut donc 1.

### Score toxicité

Le malathion est classé nocif en cas d'ingestion sur la base d'une  $DL_{50}$  à 1778 mg/kg chez le rat d'après des données rapportées dans l'évaluation européenne de cette substance en tant que phytopharmaceutique (31). La Fiche des données de sécurité (FDS) du produit disponible sur le site marchand du fournisseur nous informe d'une  $DL_{50}$  chez le rat de 644 mg/kg. Par précaution nous avons conservé la plus faible valeur disponible, ce qui ne change néanmoins pas le score de toxicité. Nous n'avons aucune donnée sur l'homme, la valeur toxicologique retenue est donc **64,4 mg/kg** (ce qui correspond à la valeur  $DL_{50}/_{10}$ ).

Nous reprenons la formule précédemment détaillée pour déterminer score de toxicité ; Pour un adulte de 70kg, on estime la dose toxique à 4508mg par jour. Nous avons estimé que la consommation moyenne d'eau pour un adulte est de 2L par jour, nous obtenons une concentration en Malathion de **2254mg/L/j.**

Le score  $\frac{Sol}{Tox}$  se calcule donc de la manière suivante :

$$\frac{Sol}{Tox} = \frac{Solubilité (\frac{mg}{L})}{Valeur toxique retenue (\frac{mg}{L}/j)} = \frac{143}{2254} < 1 \text{ donc Score } \frac{Sol}{Tox} = 0,01$$

Le score final est donc calculé comme suit :

$$Score final = \left( \frac{Score toxicité}{10} \right) \times Score Accessibilité \times Score détectabilité \times Score \frac{Sol}{Tox}$$

	Critères	Informations	Score
<b>Score Accessibilité</b>			<b>1</b>
	Disponibilité Sigma	Oui	1
	Prix pour 100mg	48,20€	1
	Accès GP	Jusqu'en 2008	1
<b>Score Détectabilité</b>			<b>1</b>
	Goût	Non	1
	Couleur	Non	1
<b>Score Toxicité</b>			<b>50</b>
	$DL_{50}$ chez le rat	644mg/kg	
<b>Score Sol/Tox</b>			<b>0,01</b>
	$TDL_0$	Inconnue	
	$DL_{50}/10$	64,4 mg/kg	
	Valeur toxicologique retenue	$64,4 \times 70 \div 2$ $= 2254 \frac{mg}{L}/j$	
	Solubilité	143 mg/L	
	$\frac{Sol}{Tox}$	$\frac{143}{2254} < 1$	<b>0,01</b>

**Tableau 6** Caractéristiques physico-chimiques, organoleptiques et toxicologiques du Malathion.

Nous avons calculé le score final selon la formule suivante :

$$\text{Score final} = \left(\frac{50}{10}\right) \times 1 \times 1 \times 0,01 = 0,05$$

Avec un score de 0,05, le malathion observe un risque faible.

#### 4. Discussion

Notre classement des molécules s'est fait sur 115 molécules retenues parmi 254 molécules. 3 d'entre-elles présentent un risque élevé, toutes les 3 faisant partie des molécules issues de l'industrie.

Les classes de molécules industrie, pharmaceutiques, pesticides, rodenticides observent une homogénéité dans leur répartition. On ne peut pas dire qu'une classe observe un risque majoré d'utilisation.

La cotation des molécules a été faite selon les critères suivants : solubilité, toxicité, accessibilité et détectabilité. Dans un prochain travail il peut être plus « réel » d'inclure d'autres critères comme « l'existence d'antidote » ou « le nombre de cas d'intoxications recensées sur l'année écoulée ».

Ce travail a été réalisé sur des données issues de la base ChemIDPlus et certaines publications restent anciennes, nous pouvons donc opposer de nouvelles études.

De plus, certains produits ont été retirés du marché Français et/ou Européen mais par expérience, nous savons que certains toxiques n'ont pas été détruits à la suite de l'interdiction d'utilisation. C'est pourquoi, nous pouvons toujours retrouver ces molécules de manière exceptionnelle dans un contexte d'intoxication accidentelle. Dans notre cotation, nous avons pris en compte l'interdiction de commercialisation uniquement indépendamment de sa date de publication en ce qui concerne la délivrance au grand public. Néanmoins certaines molécules comme la crimidine restent disponibles chez les fournisseurs de produits chimiques à des fins de recherche et d'analyse.

Certaines molécules sont disponibles sous forme liquide. Pour la plupart nous ne disposons pas des valeurs de leur masse volumique, c'est pourquoi nous avons fait le choix de leur attribuer une densité égale à 1. Dans nos formules de cotations nous utilisons des intervalles de score, nous n'avons donc pas jugé nécessaire d'utiliser des valeurs exactes à ce niveau.

En ce qui concerne le score accessibilité, la cotation du prix se fait uniquement sur la base de 100mg. Or certains toxiques ne sont pas vendus par 100 mg, nous avons donc ramené le prix de vente au prix pour 100mg.

De plus, nous aurions pu mettre le prix du toxique en parallèle avec la quantité nécessaire, et donc modifier comme cela la quantité et donc le prix. Cette démarche nous l'avons eue pour la solubilité, nous aurions pu l'appliquer à son prix.

Néanmoins, certaines molécules restent chères lors de leur commande chez un fournisseur alors qu'elles sont délivrées sans coût direct pour le patient à l'officine. Ce qui est le cas pour un grand nombre de médicaments délivrés et remboursés par l'Assurance Maladie avec une ordonnance. Cette obligation d'ordonnance est liée au concours d'un médecin dans ce processus de dispensation mais nous pouvons tout à fait souligner la question des falsifications d'ordonnances.

Qu'en est-il des mélanges ? Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux produits séparément. Or, les mélanges de produits comme les cocktails de

polluants sont au cœur des préoccupations actuelles.(32) Nous pouvons imaginer des mélanges de toxiques entre eux qui pourraient observer une synergie, une potentialisation d'un autre toxique voire une totale inactivation. Mais les mélanges de toxiques chimiques ou de médicaments peuvent aussi se faire avec la nourriture. De plus, la présence de chlore dans les réseaux d'eau peut avoir un impact sur la stabilité du toxique avec une possible dégradation tout comme une potentielle hydrolyse par la température ambiante ou photodégradation dans certains réseaux. Il serait donc important de prendre en compte la résistance de la molécule à la chloration puisqu'il est obligatoire de maintenir une concentration minimale en chlore libre de 0,3 mg/l en sortie des réservoirs et viser une concentration de 0,1 mg/l en tout point du réseau de distribution. (33)

Pour certaines molécules comme le Carfentanyl nous ne disposons pas d'information sur la toxicité par voie orale chez le rat ou d'autres données chez l'homme. A travers les publications nous pouvons dire que cette drogue émergente est un fléau qui touche les Etats-Unis mais de plus en plus l'Europe (34)(35).

Concernant la biodisponibilité et la toxicocinétique du produit, nous n'avons pas inclus dans notre étude une cotation en fonction des organes touchés et de la possible mise en œuvre d'action correctives ou préventive face à ce genre d'attaque. Nous pourrions imaginer un critère de cotation en fonction de la rapidité d'action du toxique, le nombre d'organes touchés et/ou l'intensité des lésions, réversibles ou irréversibles.

## 5. Conclusion

Nous avons pu mettre en place une méthode de cotation qui nous permet de déterminer le danger d'une molécule en fonction de plusieurs critères intrinsèques mais aussi en fonction de sa disponibilité. La méthode de cotation peut être améliorée et renforcée avec l'addition de nouveaux critères en prenant en compte aussi d'autres matrices.

Il a été question de mettre au point dans un second temps une méthode d'extraction puis d'analyse de ces molécules.

## CHAPITRE II. DEVELOPPEMENT ET EXPERIMENTATION

### PARTIE 1 : EXTRACTION DES TOXIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE SUR PHASE SOLIDE

#### 1. Introduction

Le contexte d'intoxication a été imaginé au préalable avec comme vecteur l'EDCH. Il était très facile de prélever un échantillon et de l'analyser directement avec la méthode de chromatographie liquide mise en place et développée dans la partie 3 lorsqu'il s'agissait d'un échantillon d'EDCH. Néanmoins, il était essentiel d'élargir la liste des vecteurs possibles en intégrant le vecteur alimentaire au sens large, avec des denrées qui contiendrait d'autres molécules comme le café avec la caféine, des sauces ou bien des aliments plus secs comme la farine retrouvée dans des biscuits ou des pâtes. En élargissant le choix du vecteur en incluant une préparation d'échantillon nous serons capables d'analyser tout type d'échantillon, solide comme liquide.

Précédemment nous avons vu que les toxiques pouvaient être plus facilement intégrés à des préparations alimentaires qui permettraient de masquer leur goût et ou leur couleur. De plus, pour faire référence à l'étude de la partie 1, en utilisant des matrices sèches comme de la farine, du sucre ou tout autre vecteur sec, nous nous affranchissons du critère de solubilité.

Afin de nous affranchir de cette obligation et pour élargir les possibilités d'analyse dans le contexte d'une suspicion d'intoxication, nous avons dû choisir une méthode d'extraction qui serait adaptée à notre analyse en HPLC-UV tout en respectant les critères de facilité de mise en place, de rapidité, de coût ainsi que d'efficacité.

#### 2. Matériels et méthodes

##### a) *Matériels : Les différentes méthodes d'extraction sur phase solide (SPE)*

##### **SPE classique en cartouche**

La méthode SPE (solid phase extraction) est fréquemment utilisée pour purifier et concentrer des analytes à-partir d'échantillons complexes. Elle a pour objectifs d'extraire sélectivement les composés d'intérêt. Cette méthode repose sur un phénomène de rétention avec le transfert du soluté de l'échantillon vers la phase

stationnaire qui est un processus sélectif, et un phénomène d'élution avec la récupération du soluté grâce au solvant d'élution.

### **SPE dispersive (d-SPE) : Méthode QuEChERS**

La méthode QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) est une méthode rapide, simple, peu onéreuse, sûre et robuste. Elle a été développée et publiée depuis 2003 par le département de recherche du ministère de l'agriculture américaine pour la recherche de pesticides dans l'alimentation. Elle permet la purification de plus de 200 composés.

Cette méthode repose sur 2 étapes principales : l'extraction par solvant et le nettoyage par extraction en phase solide dispersive (dSPE).

C'est une méthode rapide avec un protocole simple et rapide, qui permet un gain de temps important au sein du laboratoire dans un contexte d'intoxication. Elle est facile à mettre en place avec peu d'étape et ne nécessite pas un appareillage spécialisé. De plus, la réduction de l'utilisation de solvants organiques ainsi que le peu de matériel nécessaire permettent de réduire les coûts d'analyse. C'est une méthode qui possède un bon rendement d'extraction pour une grande gamme de composés. Nous pouvons affirmer que la méthode QuEChERS a une bonne reproductibilité avec une standardisation du protocole.

Pour finir, d'un point de vue écologique, la diminution de solvant est à noter en comparaison aux techniques d'extraction liquide-liquide.

Néanmoins, cette méthode a aussi ses limites. Elle n'est pas toujours adaptée aux analytes très polaires ou fragiles qui pourraient être dégradés lors de l'extraction. De plus, il ne s'agit pas d'une purification complète imposant des étapes supplémentaires nécessaires pour l'analyse.

### **La micro-SPE**

Il s'agit d'une version miniaturisée de la SPE qui permet l'extraction, la préconcentration et la purification d'analytes à très faibles concentrations avec un très faible volume d'échantillon, un volume de solvant réduit et une haute sensibilité analytique.

Elle est utilisée en toxicologie, environnement et bioanalyse.

Pour la micro-SPE il est possible d'utiliser des pipettes SPE avec un sorbant compacté dans la pointe de la pipette ainsi que des seringues SPE.

Cette méthode comporte des avantages avec une faible consommation de solvant qui la rend compatible avec de faibles volumes d'échantillon permettant une préconcentration élevée. Cette méthode est idéale pour les analyses sensibles et peut être automatisée. Néanmoins sa capacité limitée qui est un avantage devient un frein

aux échantillons de grands volumes ou aux extraits très complexes. Son optimisation est d'autant plus difficile et ses consommables sont parfois plus coûteux. Qu'est

### **La SPE sur disque ou membrane**

La SPE sur disque ou membrane utilise une phase solide immobilisé sur un disque ou une membrane plate au lieu d'utiliser une cartouche ou une colonne. Elle permet le traitement de grands volumes d'échantillons comme des eaux environnementales. Le disque comporte une phase solide comme du C18 incorporée dans une matrice de fibre de verre ou de polymère. L'échantillon est filtré à travers le disque sous vide et les analytes sont retenus par interaction avec la phase solide pour être élués avec un faible volume de solvant organique.

Cette technique permet le traitement d'un grand volume d'échantillon en quelques minutes avec un risque diminué de colmatage. Les disques sont moins sensibles aux particules. L'élution demande peu de solvant.

Néanmoins, ses avantages sont ses défauts, elle est moins adaptée aux petits volumes d'échantillons, nécessite un système sous vide et elle reste moins sélective avec moins de choix dans les matrices contrairement aux cartouches SPE.

### **SPE à échange d'ions (IEX)**

La chromatographie d'échange d'ions est une méthode structurale utilisant la différence de charge entre la phase stationnaire et les analytes de la phase mobile. Elle est principalement utilisée pour des composés ioniques. Il en existe de 2 types, la chromatographie d'échange d'anions et la chromatographie d'échange de cations.

Il existe plusieurs phases échangeuses d'ions pour les différentes chromatographies en fonction des groupements, ces phases sont décrites dans le tableau ci-après.

	Force ionique	Groupements utilisés
Échange de cations	Fort (SCX)	Sulfonique
	Faible (WCX)	Acide carboxylique
Échange d'anions	Fort (SAX)	Ammonium quaternaire
	Faible (WAX)	Amine tertiaire

**Tableau 7** Groupements utilisés dans différentes phases stationnaires

### 3. Résultats

#### a) Méthodes retenues pour l'extraction des toxiques dans des échantillons suspects.

Nous devons utiliser une méthode d'extraction dans le cas d'une suspicion d'intoxication d'une denrée alimentaire. Cette dernière peut être liquide comme un jus de pomme ou solide comme une farine.

Nous avons comparé les différentes méthodes d'extractions entre-elles afin de déterminer laquelle serait la plus adaptée à notre scénario de contamination.

Pour cela, la méthode d'extraction doit être rapide tant dans sa mise en place que dans son exécution, elle doit permettre le traitement d'une grande variabilité d'échantillons tout en limitant les coûts et l'impact environnemental avec la consommation de solvants la plus faible possible.

Nous avons donc comparé ces critères entre les différentes méthodes et les résultats se trouvent dans le tableau ci-après.

	SPE Classique	$\mu$ SPE	d-SPE	SPE sur membrane	SPE éch. ions
Volume éch	1-50ml	10-500 $\mu$ L	1-10 ml	100ml-Litres	1-20ml
Ech. Liquide	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Ech. Solide	Non	Non	Oui	Non	Non
Rapidité	Rapide	Très rapide	Très rapide	Fn du volume	Rapide
Facilité	Moyenne	Moyenne	Très facile	Moyenne	Moyenne
Coûts	Moyen	Faibles	Faibles	Élevés	Moyen
Solvants	Modéré	Très faibles	Faibles	Très faibles	Modéré

**Tableau 8** Comparaison des différentes méthodes SPE. En fonction du volume d'échantillon, l'utilisation d'un échantillon liquide ou solide, la rapidité et la facilité de la méthode ainsi que les coûts de la méthode et la consommation de solvants.

Afin de pouvoir extraire les toxiques d'échantillons solides comme de la farine ou du ketchup nous avons choisi la méthode QuEChERS qui était la seule à pouvoir nous proposer l'utilisation d'échantillon solide. Nous pouvons tout à fait imaginer analyser un échantillon de viande qui serait mixé préalablement afin de faciliter la dispersion d'éventuels résidus toxiques.

En plus de cette première méthode nous avons choisi la SPE sur cartouche qui reste une méthode de référence. Le laboratoire dispose de cartouches ainsi que de pompes à vide afin de réaliser les extractions.

## La méthode QuEChERS adaptée aux échantillons solides

Dans notre exercice nous avons utilisé la méthode Originale QuEChERS en 2 étapes à-partir de tubes QuEChERS Interchim ® réalisés à-partir d'adsorbants de haute pureté dans des tubes à centrifuger de 50 ml.

Les adsorbants utilisés sont le sulfate de magnésium anhydre qui élimine les traces d'eau pour une meilleure dispersion des composés contenus dans l'échantillon et facilite le traitement de la phase organique ainsi que de la silice greffée PSA (primary Secondary Amine) pour retirer les composés acides, les pigments polaires, les sucres et acides gras de la matrice.

La méthode Originale QuEChERS combinait 2 étapes. La première était une extraction Liquide/Liquide en ajouter 10 ml d'ACN à 10g d'échantillon dans un tube à centrifuger de 50 ml contenant 4g de sulfate de magnésium anhydre.

L'ACN permet d'extraire les contaminants et l'ajout de sel permet de séparer la phase aqueuse de la phase organique, ce qui favorise le passage des analytes dans la phase organique composée d'ACN.

Après l'agitation et la centrifugation, 1 ml de surnageant a été récupéré.

La seconde étape consistait en la purification en phase SPE dispersée (dSPE) avec l'ajout de sorbants comme le PSA. Ils éliminent les co-extrats interférents comme les lipides, les acides organiques, les sucres ou les pigments largement retrouvés dans l'alimentation.

L'extrait nettoyé est ensuite analysé par HPLC-UV.

## La SPE sur cartouche retenue pour les échantillons liquides

La SPE est une méthode très sélective avec une bonne concentration des analytes. Elle utilise moins de solvant qu'une LLE et reste compatible avec notre analyse en HPLC-UV. Néanmoins elle nécessite une optimisation selon l'échantillon et l'analyte recherché, elle reste plus coûteuse que QuEChERS et le risque de perte des molécules d'intérêt est à prendre en compte. De plus, la SPE est une méthode bien moins rapide que QuEChERS.

La SPE repose sur plusieurs étapes :

- **Le conditionnement** de la phase stationnaire. C'est une étape de solvatation de la phase stationnaire avec un solvant organique compatible avec le solvant de l'échantillon (methanol le plus souvent). En phase inverse on utilisera de l'eau ou un tampon avec un volume de conditionnement 2 à 3 fois supérieur au volume de la colonne.
- **Le dépôt de l'échantillon** avec une vitesse d'écoulement modérée.

- **Le lavage** pour l'élimination des interférents avec un ou plusieurs lavages avec des solvants relativement peu éluants comme un mélange MeOH/H2O
- **L'élution** qui permet la récupération des solutés d'intérêt dans le solvant d'élution. L'élution se fait à vitesse lente.

Après évaporation du solvant d'élution, l'extrait est repris dans un volume plus petit dans un solvant adapté à l'analyse.

b) *Protocole d'extraction à partir d'un échantillon de ketchup avec la méthode QuEChERS*

Nous avons pu mettre en place un protocole pour l'analyse d'un échantillon non liquide comme le ketchup qui aurait été contaminé par un toxique.

La première étape est une extraction liquide / liquide :

Prélever 10g de l'échantillon dans un tube de 50 ml contenant 4g de MgSO<sub>4</sub> anhydre et 1g de NaCl.

Pour l'extraction, ajouter 10 ml d'ACN et refermer le tube pour agiter avec un vortex. Centrifuger à 4000 tr/min pendant 5 minutes.

Récupérer 1 ml de surnageant

La seconde étape est une purification en phase SPE dispersée (dSPE) :

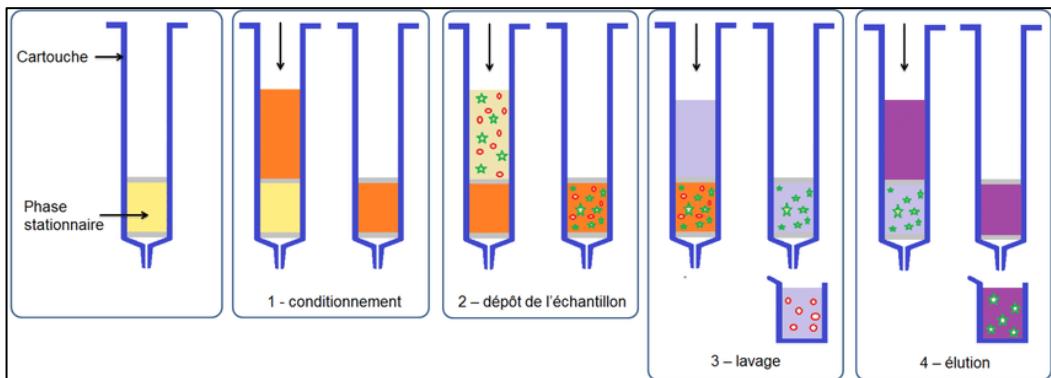
Transférer le surnageant de l'étape 1 dans un tube à centrifuger contenant 150mg MgSO<sub>4</sub> anhydre et 50 mg de PSA.

Agiter 1 minute et centrifuger 5 minutes.

La troisième étape est une filtration du surnageant avec un filtre PTFE 0,22µm dans un vial d'analyse

La dernière étape consiste en l'analyse de l'échantillon selon les méthodes de chromatographie

Toutes ces étapes sont reprises dans la **Figure 10** ci-dessous.



**Figure 10** Principe de fonctionnement de la SPE.

c) *Protocole d'extraction à partir d'un échantillon de ketchup avec la méthode SPE classique*

- Conditionnement de la cartouche avec 3 ml de méthanol
- Équilibration avec 3 ml d'eau ultra pure (EUP)
- Chargement de 50 ml d'échantillon
- Lavage avec 3 ml EUP
- Élution avec 1 ml de méthanol
- Évaporation à sec 110°C pendant 30 minutes
- Reprise avec 5 ml de phase initiale
- Analyse en HPLC-UV à 260 nm

#### 4. Discussion

La préparation de l'échantillon avec l'étape d'extraction est primordiale dans le cas d'un échantillon dont la matrice n'est pas de l'EDCH. Pour les échantillons liquides, les 2 méthodes d'extractions retenues sont envisageables, mais quand il s'agit d'un échantillon solide comme une farine, alors la technique QuEChERS apparait comme la plus adaptée. De plus, cette dernière peut tout aussi être utilisée pour le traitement des échantillons liquides avec des matrices plus complexes comme des jus de fruits, des sodas ou du café.

Il est nécessaire de purifier les échantillons afin d'obtenir un chromatogramme le plus simple possible en évitant toute interférence et avec les molécules d'intérêt. De plus, la colonne de chromatographie est un matériel très fragile et sensible à la moindre variation.

Cette étape supplémentaire mais néanmoins obligatoire rendra notre protocole d'analyse HPLV répétable.

Après l'élution de notre molécule d'intérêt il peut être nécessaire de concentrer l'éluat avec une évaporation puis sa reprise dans le solvant d'analyse. Cette technique de concentration ne peut se faire que si la molécule n'est pas thermolabile. Il s'agit d'un point que nous pourrons développer dans de futurs travaux en étudiant la sensibilité des molécules à la chaleur.

## 5. Conclusion

Afin de pouvoir procéder à une purification de notre échantillon en extrayant les composés d'intérêt dans un délai le plus court possible et avec la technique la plus reproductible et la plus simple nous avons décidé de mettre en place la méthode QuEChERS.

Nous avons donc retenu le protocole selon lequel la première étape est une extraction liquide / liquide en ajoutant 10g d'échantillon et 10 ml d'ACN. Ensuite, nous avons utilisé une purification en phase d-SPE avant de filtrer le surnageant pour l'analyser.

## PARTIE 2 : MISE AU POINT DE LA MATHODE DE SCREENING ET DE DOSAGE DES MOLECULES RETENUES

### 1. Introduction

Parmi les molécules classées, nous nous sommes intéressés à 8 d'entre-elles. La méthode de screening a été développée pour pouvoir doser ces 8 molécules, choisies pour leur disponibilité rapide au laboratoire et non forcément pour leur potentiel dangereux en cas de contamination.

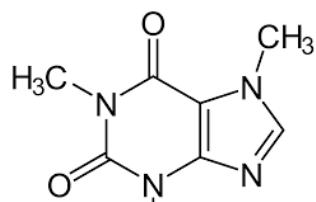
Les molécules retenues pour la mise au point de la méthode de screening sont la caféine, la nicotine, la crimidine, la colchicine, l'aldicarbe, l'acénocoumarol, la digoxine et le 4-nitrophénol avec des scores finaux différents repris dans **Tableau 9** ci-après.

Molécule	Score	Interprétation
Caféine	100	Risque élevé
Nicotine	5	Risque modéré
Crimidine	100	Risque élevé
Colchicine	200	Risque élevé
Aldicarbe	100	Risque élevé
Acénocoumarol	0,01	Risque faible
Digoxine	200	Risque élevé

**Tableau 9** Synthèse des molécules et de leurs scores finaux respectifs. Les scores finaux décrivent des risques tels que définis ci-après ; Un risque fortement élevé est traduit par un score compris entre 1000 et 500, un risque élevé correspond à un score compris entre 200 et 100, un risque modéré correspond à un score compris entre 50 et 1 et un risque faible a un score entre 0,5 et 0.

Dans un premier temps, nous allons présenter ces 8 molécules.

a) *La caféine*



**Figure 11** Molécule de caféine (N°CAS 58-08-2)  
source : INERIS

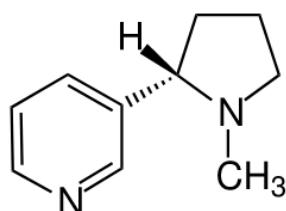
Selon la **Figure 11**, la caféine est un alcaloïde de la famille des méthylxanthines qui est présente dans les graines, les feuilles et les fruits de différentes plantes où elle agit comme insecticide naturel. Celle présente dans le café est obtenue par infusion à partir des graines de caféier et agit comme psychostimulant. Elle est présente dans le café, le thé, les boissons énergisantes comme le Coca-Cola® (environ 10 mg/100 ml) et le Red Bull® (24 mg/100 ml), certains compléments alimentaires et dans certains médicaments principalement en association avec le paracétamol ou l'aspirine.(36)

De ce fait, elle est la substance psycho-active la plus consommée au monde et légale dans tous les pays. La Food and Drug Administration (FDA) liste la caféine parmi les « substances alimentaires à buts multiples généralement reconnues comme sans danger » aux doses habituelles. Elle devient mortellement毒ique au-delà d'une certaine dose estimée à 10g.

D'un point de vue pharmacologique, la caféine agit comme antagoniste compétitif des récepteurs de l'adénosine. Elle bloque les récepteurs A1, ce qui peut entraîner une accélération du rythme cardiaque, une stimulation du système nerveux central avec une augmentation de la vigilance et parfois de l'anxiété. Elle est de ce fait utilisée dans le traitement de l'apnée idiopathique du prématuré grâce à ses propriétés de stimulation des centres respiratoires par action centrale bulbaire.(37) Sa biodisponibilité orale est de 100 % et les concentrations maximales sont obtenues 15 à 45 minutes après l'administration par voie orale (38).

Dans la littérature on retrouve une  $DL_{50}$  *per os* chez le rat de 192 mg/kg.(39) et nous lui avons attribué un score égal à 100 ce qui place la caféine dans les toxiques avec un risque élevé.

b) *La nicotine*



**Figure 12** Molécule de nicotine (N° CAS 54-11-5)  
source INRS

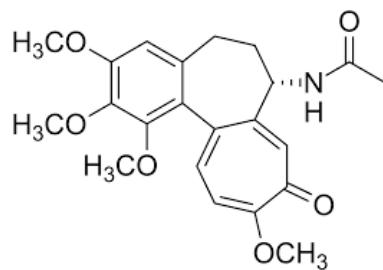
La nicotine représentée à la **Figure 12** est un alcaloïde présent dans les plantes de la famille des solanacées dont les feuilles ont des propriétés acaricides et insecticides notamment celles du tabac (40) du fait de son caractère neurotoxique (41), sa toxicité protège la plante des insectes (42); elle possède également des propriétés fongicides. De nombreuses plantes produisent cet alcaloïde comme la tomate, la pomme de terre ou l'aubergine. Cette dernière contiendrait 100ng de nicotine pour 1g d'aubergine. (43) C'est pourquoi une absorption digestive de nicotine reste possible.

Une cigarette contient de 6 à 11 mg de nicotine dont 1 à 3 mg seront absorbés par voie pulmonaire.

La nicotine imite l'action de l'acétylcholine au sein du système nerveux parasympathique et se fixe sur les récepteurs nicotiniques pour ouvrir le canal ionique après un changement de conformation du récepteur. L'entrée des ions sodium dépolarisent la membrane pour exciter le neurone puis le canal se referme. La nicotine déclenche donc des effets parasympathiques à faible dose en induisant une relaxation des fibres musculaires mais à forte dose la nicotine induit un effet stimulant avec une augmentation du rythme cardiaque, de la tension artérielle.

La nicotine a un score final égal à 5 selon notre grille de cotation. Nous avons retenu une  $DL_{50}$  de 3,34 mg/kg chez la souris (44).

c) *La colchicine : principe actif dans la spécialité Colchimax®*



**Figure 13** Molécule de colchicine (N°CAS 64-86-8)  
source INERIS

La **Figure 13** représente une molécule de colchicine, communément appelée poison du fuseau. Elle appartient à la famille des phénéthylisoquinolines retrouvés exclusivement dans la famille du colchique utilisé depuis longtemps pour le traitement et la prophylaxie de la crise de goutte ainsi que dans le traitement de la péricardite aiguë idiopathique en association aux traitements anti-inflammatoires conventionnels. Il est possible toutefois de retrouver la colchicine dans le traitement des accès aigus microcristallins. Il est important de rappeler que la colchicine a une marge thérapeutique étroite et les posologies maximales ne doivent pas être dépassées. (45)

La colchicine est utilisée pour diminuer l'afflux leucocytaire et inhiber la phagocytose des micro-cristaux d'urate ce qui freine la production d'acide lactique en maintenant le pH local normal. **Elle agit en** arrêtant la mitose en bloquant la formation du fuseau par les microtubules au stade de la métaphase. Son effet est plus marqué dans les tissus ayant un fort taux de renouvellement cellulaire comme l'épithélium du tractus gastro-intestinal ce qui explique l'apparition précoce des symptômes digestifs. A des concentrations toxiques la colchicine interfère avec le bon maintien de la structure et de la forme de la cellule via le réseau de microtubules. L'issue peut être fatale.

De plus, de nombreuses interactions médicamenteuses sont à prendre en compte avec cette molécule dont les statines qui sont très régulièrement prescrites pour faire diminuer le cholestérol, entraînant un risque accru de rhabdomyolyse, ainsi que les macrolides dont la prise concomitante de colchicine pourrait être fatale.

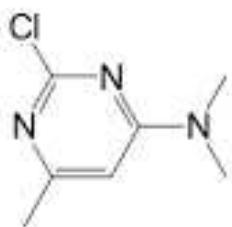
Pour notre exercice nous avons retenu une toxicité chez la souris avec une  $DL_{50}$  égale à 5,886 mg/kg (46) et une dose maximale de colchicine par prise de 1 mg.

La dose toxique à ne pas dépasser est de 3 mg/j chez l'adulte sans facteur de risque de toxicité. (47)

Nous avons relevé une  $TDL_0$  chez l'adulte de 0,51 mg/kg soit 35,7 mg pour un adulte de 70kg. (48)

La colchicine obtient un score de 200 et fait partie des agents toxiques à risque élevé.

d) *La crimidine*

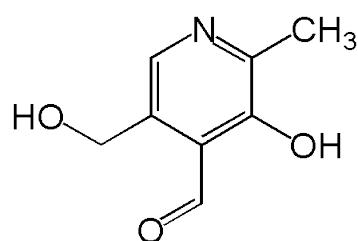


**Figure 14** Molécule de crimidine (N°CAS 535-89-7)

source INERIS

La **Figure 14** représente la molécule de crimidine, retrouvée dans une spécialité rodenticide Castrix de synthèse responsable d'un tableau clinique identique à celui de l'alpha-chloralose. En moyenne les appâts commerciaux sont habituellement dosés à 0,1% et l'ingestion de 10 g de produit suffit pour intoxiquer un chien de 10 kg.

La crimidine est un dérivé chloré de synthèse de la pyrimidine qui a une structure proche de la vitamine B6 ou pyridoxal représentée dans la figure 18. Elle agit donc comme un antagoniste de la vitamine B6 dans son rôle de cofacteur dans le métabolisme de nombreux acides aminés dont l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique ou GABA à partir de l'acide glutamique par la glutamate décarboxylase. C'est la baisse des concentrations en GABA qui est à l'origine des symptômes observés. En général, les premiers symptômes de l'intoxication apparaissent au bout de 30 minutes à 1h après l'ingestion du toxique. (49)

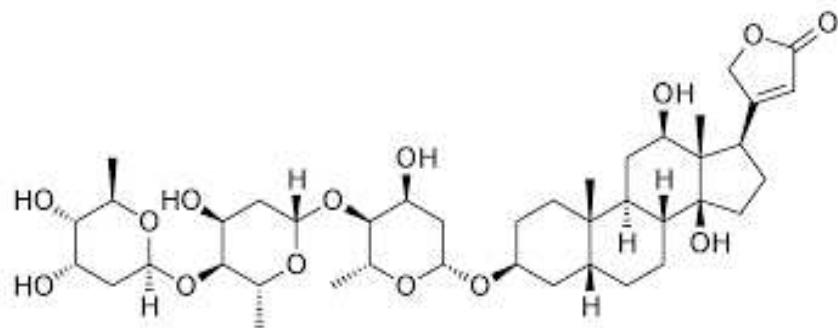


**Figure 15** Molécule de vitamine B6 ou pyridoxal.

source PubChem

La crimidine obtient un score de 100 selon notre grille de cotation. Nous avons retenu une DL<sub>50</sub> chez la souris de 1,25 mg/kg chez le rat.(50) Elle fait donc partie des agents toxiques à risque élevé.

e) *La digoxine*



**Figure 16** Molécule de digoxine

Source PubChem

La digoxine représentée à la **Figure 19** Molécule de 4-nitrophénol n° CAS 100-02-7 est un hétéroside digitalique qui possède trois unités de glucose. C'est encore le seul hétéroside commercialisé. La digoxine augmente donc la force de contraction du muscle cardiaque et possède également des propriétés antiarythmiques. (51)(52). La digoxine est donnée dans le traitement de l'insuffisance cardiaque et dans certains troubles du rythme bien qu'elle ne soit plus le traitement de première intention de l'insuffisance cardiaque.

Le médecin botaniste anglais Withering a publié en 1785 un rapport scientifique *An Account of the Foxglove and Some of its Medical Uses* qui examinait 163 cas dans lesquels la digitale avait été administrée. Il a donc pu établir que la digitale affectait les contractions du cœur. La digoxine est présente dans la plante *Digitalis purpurea L.* et *Digitalis lanata* de la famille du plantain (*Plantaginaceae*).

Les symptômes d'empoisonnement sont circulatoires avec une insuffisance cardiaque, neurologiques avec des céphalées, confusion, coma et digestifs avec nausées, vomissements, et diarrhée.

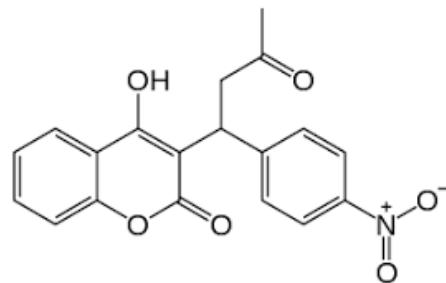
La digoxine possède un indice thérapeutique étroit, ce qui signifie que la dose thérapeutique est proche de la dose toxique. Tout comme beaucoup de médicaments, les interactions médicamenteuses sont nombreuses avec la digoxine notamment avec le millepertuis qui induit une diminution de la digoxémie par son effet inducteur enzymatique. Les médicaments bradycardisants sont eux aussi contre-indiqués à cause de leur mécanisme d'action.

Elle possède une demi-vie de 36 à 48 heures et elle est éliminée dans l'urine. Il existe néanmoins un antidote à l'intoxication digitalique avec le fragment Fab de d'immunoglobuline antidigitalique ovin. (52).

D'après les Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie (ChemIDPlus) la DL<sub>50</sub> chez la souris est de 17,78 mg/kg (53) et la TLDo femme : 0,1 mg/kg. (54)

La digoxine a un score égal à 200 selon notre grille de cotation et un risque élevé.

f) L'acénocoumarol



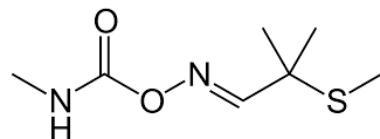
**Figure 17** Molécule d'Acénocoumarol n°CAS 152-72-7

Source Sigma-Aldrich

La **Figure 17** représente la molécule d'acénocoumarol qui est un dérivé coumarinique retrouvé dans la spécialité Sintrom et agit comme un antagoniste de la vitamine K. Il agit en inhibant la vitamine-K-époxyde-réductase. Cet enzyme réduit la vitamine K en co-facteur qui intervient dans la formation d'acide gamma-carboxyglutamique. L'acide gamma-carboxyglutamique est contenu dans la structure de quatre facteurs de la coagulation : les facteurs II, VII, IX et X ainsi que dans les protéines C et S. L'acénocoumarol a donc un effet anticoagulant indirect en inhibant la synthèse des formes actives des facteurs de coagulation. De plus, les Antivitamines K (AVK) induisent une hypoprothrombinémie. (55)

Nous avons retenu une DL50 chez le rat de 513 mg/kg (56) et nous lui avons attribué un score de 0,01 selon nos critères de cotation. Il s'agit donc d'un agent toxique à risque faible.

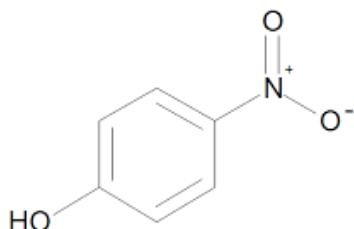
g) L'aldicarbe



**Figure 18** Molécule d'aldicarbe n°CAS 116-06-3

La **Figure 18** représente la molécule d'aldicarbe qui a été décrite précédemment dans le premier chapitre GENERALITES. Nous rappelons néanmoins que l'aldicarbe ainsi que ses métabolites sont des inhibiteurs irréversibles de cholinestérases. L'inhibition de cet enzyme conduit à une accumulation d'acétylcholine au niveau des fibres postganglionnaires du système nerveux parasympathique et autonome. Cette accumulation est responsable d'un syndrome muscarinique et nicotinique.

### h) Le 4-nitrophénol



**Figure 19** Molécule de 4-nitrophénol n° CAS 100-02-7

Source Sigma Aldrich

Le 4-nitrophénol décrit ci-dessus dans la **Figure 19** c'est un précurseur pour la fabrication de médicaments et de fongicides, c'est un intermédiaire de synthèse pour la fabrication de produits comme les colorants azoïques, les plastiques, certains composants utilisés dans l'industrie de la photographie. C'est aussi un produit de dégradation du paracétamol mais il est utilisé dans la synthèse de certains biocides et certains produits phytosanitaires.

Le 4-nitrophénol est absorbé par toutes les voies dont la voie digestive.

Le 9 juin 2009 l'ANSES a été saisie par la Direction générale de la santé afin d'effectuer une évaluation des risques sanitaires (ERS) liés à l'exposition à des substances reprotoxiques de catégorie 2 selon la directive 67/548/CE et : ou perturbatrices endocriniennes (PE) présentes dans des produits de consommation mis sur le marché en France. Il en ressort que huit études ont été recensées et à des niveaux d'exposition relativement élevés, aucun effet n'est observé sur la reproduction et le développement chez l'animal.

Selon notre grille de cotation le 4-nitrophénol obtient un score de 50 et nous avons retenu une DL<sub>50</sub> de 202 mg/kg chez le rat (57). Il a donc un risque modéré.

## 2. Matériels et méthode

### a) Matériel utilisé

Les analyses ont été réalisées sur une chaîne chromatographique Acquity UHPLC™ (Waters, Saint-Quentin en Yvelines, France) couplée à un détecteur ultraviolet à barrette de diode (DAD). Le DAD couvre une plage de longueurs d'onde de 150 à 800 nm et nos acquisitions sont réalisées de 150 à 400nm. La **Figure 20** illustre le modèle Acquity Arc de Waters ®.

Le système est équipé d'une colonne Waters BEH C18 (longueur 150 mm, diamètre 2,1 mm et diamètre des particules 1,7 m). BEH signifie Ethylene Bridged Hybrid, La colonne combine des composants de silice et organiques pour créer une particule hybride avec une stabilité chimique et thermique améliorée qui permet d'utiliser une gamme de pH plus large et une amélioration de la durée de vie de la colonne tout en améliorant les performances.



**Figure 20** Appareil de HPLC-UV, modèle Acquity Arc

### b) Molécules testées et préparation des échantillons

#### Les molécules testées

Parmi les molécules hiérarchisées dans la première partie, nous avons développé une méthode de criblage et de dosage sur 8 d'entre-elles.

- La caféine
- La nicotine
- La colchicine
- La crimidine
- La digoxine
- L'acénocoumarol
- L'aldicarbe
- Le 4-nitrophénol

La sélection de ces molécules ne tient pas compte de leur score final concernant une potentielle utilisation malveillante mais nous les avons sélectionnées car elles étaient rapidement disponibles au laboratoire et faisaient partie de notre étude.

## Les conditions expérimentales

Les analyses ont été réalisées à 20°C et avec une solution tampon pH 3. Nous avons utilisé une solution tamponnée afin d'éviter des modifications de pH non maîtrisées qui auraient pu modifier les temps de rétention dans la colonne. La stabilisation du pH permet d'éviter des modifications de pH qui peuvent influencer l'ionisation des analytes, leur rétention dans la colonne et donc leur temps de rétention.

Par conséquent, la stabilité du pH améliore la reproductibilité et la précision en améliorant la résolution.

### Échantillons de la gamme pour définir la droite de calibration

Les échantillons ont été préparés dans 100% de solution tamponnée d'acétate d'ammonium. La phase mobile initiale étant composée à 95% de solution tampon. Chaque molécule a été pesée à l'aide d'une balance METTLER TOLEDO précise à 0,1mg.

2 gammes de calibration ont été préparées :

- *Gamme 1* de 100mg à 10mg à-partir d'une *solution mère n°1*
- *Gamme 2* de 10 mg à 0,1 mg à-partir d'une *solution mère n°2*

Afin d'optimiser la consommation d'échantillon au sein du laboratoire, nous avons réalisé 2 grammes de calibration.

La première solution mère contient seulement 6 molécules : la caféine, colchicine, crimidine, nicotine, aldicarbe et 4-nitrophénol.

Nous avons préparé dans un premier temps *une solution mère n°1* d'un volume de 100mL contenant ces 6 molécules dans les concentrations suivantes reprises dans le **Tableau 10** Composition de la solution mère n°1 préparée par pesées.

Molécules	Concentrations (mg/L)
Caféine	114
Colchicine	101
Crimidine	114
Nicotine	100
4-nitrophénol	100
Aldicarbe	103

**Tableau 10** Composition de la solution mère n°1 préparée par pesées.

A partir de cette *solution mère n°1*, des dilutions ont été réalisées pour atteindre des niveaux de concentrations suivants : 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 20% et 10%.

Les dilutions ont été réalisées dans la solution tampon d'acétate d'ammonium.

Une seconde solution mère (*solution mère n°2*) a été réalisée, cette fois avec des concentrations plus faibles et avec les 8 molécules. Des dilutions au  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{10}$ ,  $\frac{1}{20}$ ,  $\frac{1}{100}$  ont été réalisées à-partir de cette deuxième solution mère. Les concentrations des molécules sont reportées dans le **Tableau 11** ci-après.

Molécules (pKa)	Concentrations (mg/L)
Caféine (10,4)	13,3
Colchicine	10,1
Crimidine (3,33)	11,1
Nicotine (3,04)	10,0
4-nitrophénol (7,08)	10,9
Acénocoumarol (5,05)	10,0
Digoxine (7,15)	10,2
Aldicarbe (11,7)	10,7

**Tableau 11** Concentrations en mg/L des différentes molécules de la solution mère n°2 avec leurs pKa respectifs.

c) Développement de la méthode d'analyse et optimisation

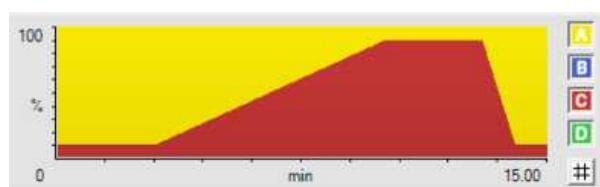
#### Première méthode d'analyse – méthode n°1

La première méthode utilisait une phase mobile initiale composée d'un mélange eau ultrapure et acétonitrile 90:10 (v/v) et suivait un gradient de concentration décrit ci-après (**Figure 21** Gradient de phase mobile dans la méthode n°1).

La méthode a une durée de 15 minutes.

Time	Flow (mL/min)	%A	%B	%C	%D
Initial	1.000	90.0	0.0	10.0	0.0
3.00	1.000	90.0	0.0	10.0	0.0
10.00	1.000	10.0	0.0	90.0	0.0
13.00	1.000	10.0	0.0	90.0	0.0
14.00	1.000	90.0	0.0	10.0	0.0
15.00	1.000	90.0	0.0	10.0	0.0

**Tableau 12** Variation de la composition de la phase mobile de la méthode n°1



**Figure 21** Gradient de phase mobile dans la méthode n°1

En ce qui concerne la stabilité des échantillons, nous savons que certaines molécules s'ionisent en fonction du pH. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser une solution tamponnée à pH 3 afin de n'avoir qu'une seule forme de la molécule en nous basant sur les pKa des molécules compilées dans le **Tableau 12**.

Nous en arrivons donc à la seconde méthode d'analyse où nous allons utiliser une phase mobile tamponnée à pH3.

### **Seconde méthode d'analyse : Utilisation d'une phase mobile tamponnée – Méthode n°2**

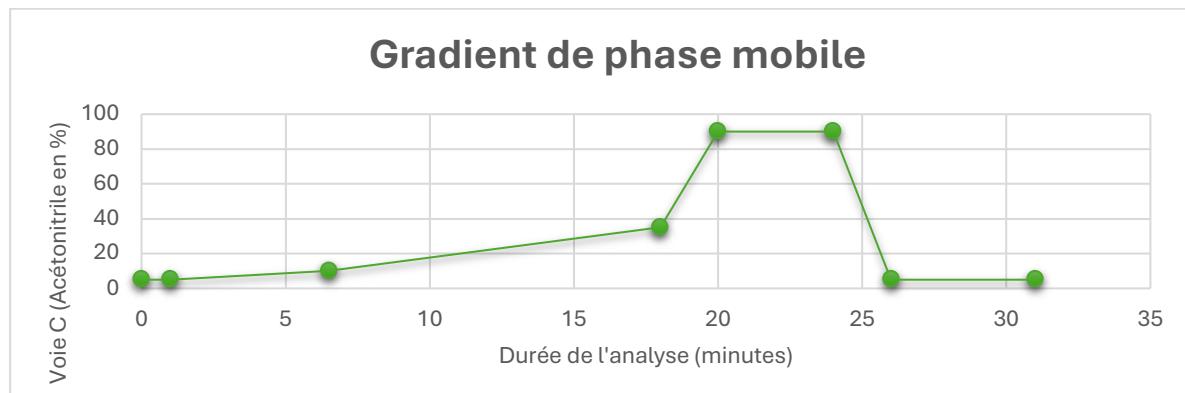
Dans sa publication pour doser les anticoagulants, le Pharmacien Le Roy utilise une phase mobile initiale constituée d'une solution tamponnée d'acétate d'ammonium 5mM à pH acide (pH=3) et d'acétonitrile (ACN) (58) . Nous avons donc décidé d'utiliser cette même phase mobile initiale.

Le protocole d'analyse est le même que la première méthode. Cette méthode dure 15 minutes. Toutes les molécules étaient bien individualisées sauf la nicotine qui était confondue avec le pic d'injection. C'est pourquoi nous avons choisi de diminuer le pourcentage de solvant organique dans la 3<sup>ème</sup> méthode d'analyse.

### **Troisième méthode d'analyse : Modification du pourcentage d'ACN dans la phase mobile – Méthode n°3**

Au cours des précédentes analyses, le pic de la nicotine était masqué, confondu dans le pic d'injection. Nous avons donc décidé de réduire le pourcentage d'ACN dans les conditions initiales de phase mobile et de passer à 95:5 (v/v) Eau ultrapure tamponnée / ACN.

Le temps d'analyse a été augmenté à 31 minutes pour obtenir le gradient de phase mobile de la **Figure 22**



**Figure 22** Composition de la phase mobile en fonction du temps, variation du pourcentage de la voie C (ACN 100%)

### 3. Résultats

#### a) *Protocole retenu*

L'acquisition est réalisée en 3D afin de pouvoir identifier les pics via leurs spectres d'absorption enregistrés au préalable dans une bibliothèque spécifique au LASEM.

La quantification quant à elle s'effectue à-partir de canaux 2D : 260 nm et 305nm, en fonction des spectres des molécules.

La phase mobile initiale est composée d'un tampon acétate d'ammonium (5 mM, pH 3) et d'acétonitrile dans des proportions (95:5).

L'analyse chromatographique, d'une durée de 31 minutes, est réalisée en gradient d'élution à débit constant (1 mL/min).

La composition initiale (95 % de tampon) est maintenue pendant 6,5 min, évolue à 65 % de tampon à  $t = 18$  min puis à 10 % à  $t = 20$  min pendant 4 minutes pour retourner aux conditions de phase mobile initiale à  $t=26$  minutes pendant 5 minutes.

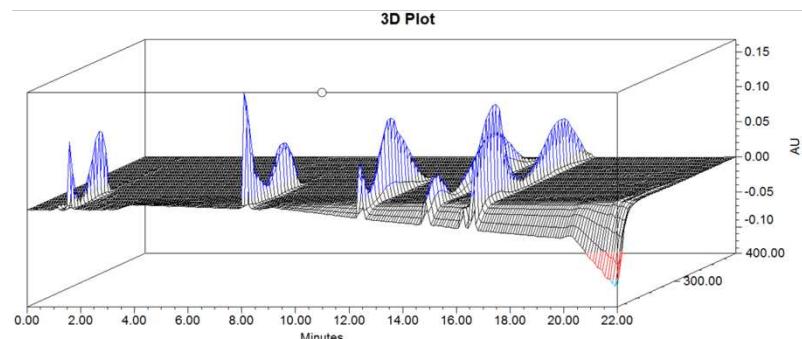
#### b) *Les grandeurs caractéristiques des molécules*

Grâce au protocole mis en place nous avons pu déterminer pour chaque molécule analysée individuellement son temps de rétention ( $t_r$ ) et sa longueur d'onde maximale d'absorbance  $\lambda$  (nm) décrits dans le **Tableau 13**

Molécules	$t_r$ (min)	$\lambda$ (nm)
Nicotine	1,72	159
Caféine	8,11	272
Crimidine	12,67	254
4-nitrophénol	14,84	226 - 316
Aldicarbe	16,18	245
Colchicine	16,59	243 - 352
Digoxine	18,45	220
Acénocoumarol	21,34	281 - 305

**Tableau 13** Grandeurs caractéristiques des molécules selon le protocole retenu.

Pour les 6 molécules de la première gamme de calibration (*gamme n°1*), nous avons extrait le spectre 3D;  
Sur l'axe des X nous avons le temps en minutes correspondant au temps de rétention, l'axe des Y représente d'intensité et l'axe Z représente la longueur d'onde en nm.



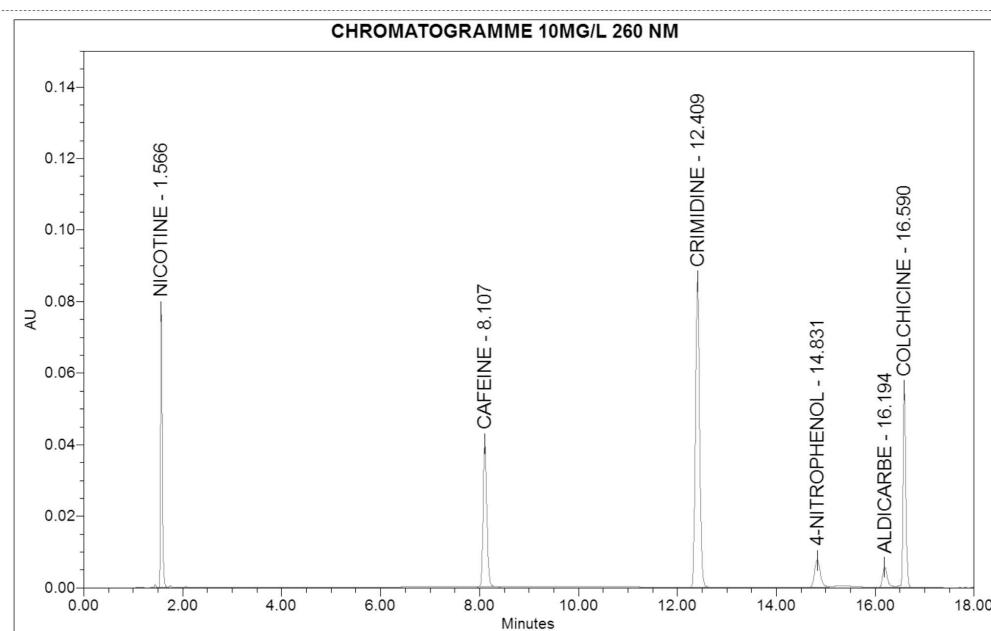
**Figure 23** Représentation en 3D des spectres des différentes molécules.

De gauche à droite, avec leurs temps de rétention, nous avons, la nicotine (1,7 min), Caféine (8,11 min), Crimidine (12,47 min), 4-Nitrophenol (14,84 min), Aldicarbe (16,18 min), Colchicine (16,58 min).

Nous avons sélectionné 2 longueurs d'onde d'analyse :

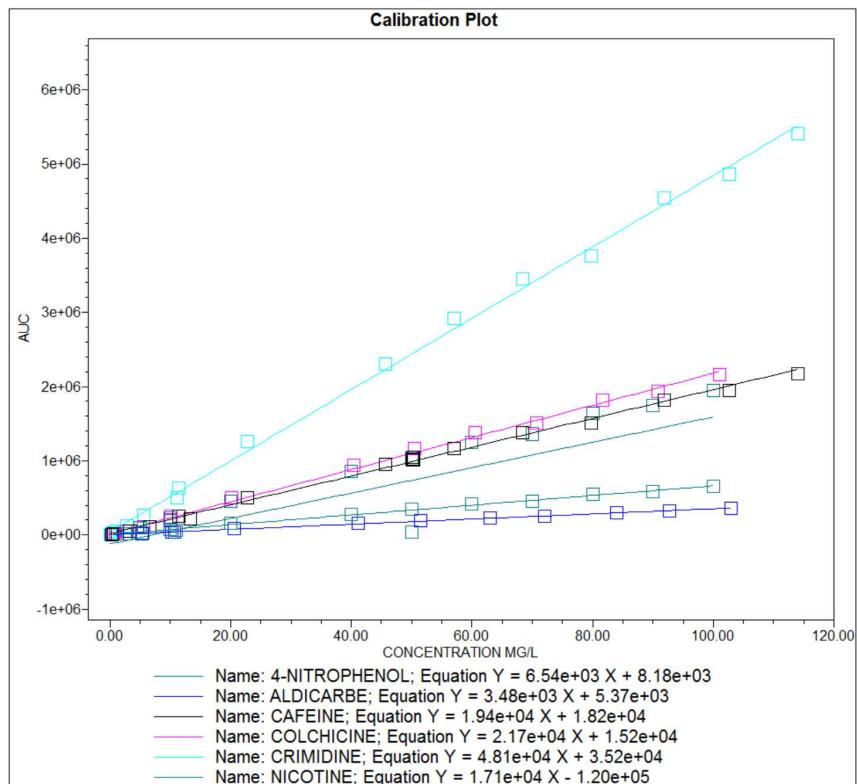
- 260 nm car la majorité des composés absorbent à cette longueur d'onde.
- 305 nm pour quantifier l'acénocoumarol et le 4-nitrophénol qui ont des *maxima* d'absorbance respectifs à 305 et 316 nm.

Ci-après (**Figure 24**), nous obtenons le chromatogramme correspondant à la première gamme (*gamme n°1*) de dilution avec les 6 pics.



**Figure 24** Chromatogramme de la gamme n°1 à 260 nm.

Nous avons pu déterminer des équations de droites de calibration pour chacune des molécules, ce qui nous permettra de déterminer la concentration des molécules dans un échantillon inconnu. Elles sont matérialisées dans la **Figure 25** ci-dessous.



**Figure 25** Droites de calibration obtenues à-partir de la gamme n°1.

### c) Vérification des performances

Afin de vérifier notre méthode, nous avons choisi de doser la colchicine contenue dans une solution dite suspecte afin de se plonger dans des conditions se rapprochant d'une éventuelle simulation d'intoxication.

Pour cela nous avons créé une solution suspecte à-partir d'un comprimé de la spécialité Colchimax ® pour un volume de 100mL d'eau Evian. La colchicine fait partie de notre étude et la spécialité Colchimax est très régulièrement prescrite pour le traitement de la crise de goutte. Cette spécialité contient 50,0 mg de méthylsulfate de tiémonium, 12,5 mg de poudre d'opium et 1,0 mg de colchicine cristallisée.

La solution dite suspecte contient théoriquement 50,0 mg de méthylsulfate de tiémonium soit une concentration théorique de 0,5g/L, 12,5 mg de poudre d'opium soit une concentration théorique de 125 mg/L et 1,0 mg de colchicine cristallisée soit une concentration théorique de 10 mg/L.

Chez la souris la DL50 est de 5,886 mg/kg(59). La valeur toxique à-partir de la DL50 est de 0,5886 mg/kg après avoir utilisé le facteur de sécurité interespèce.

La TDLo chez l'adulte retrouvée dans la littérature est de 0,32 mg/kg

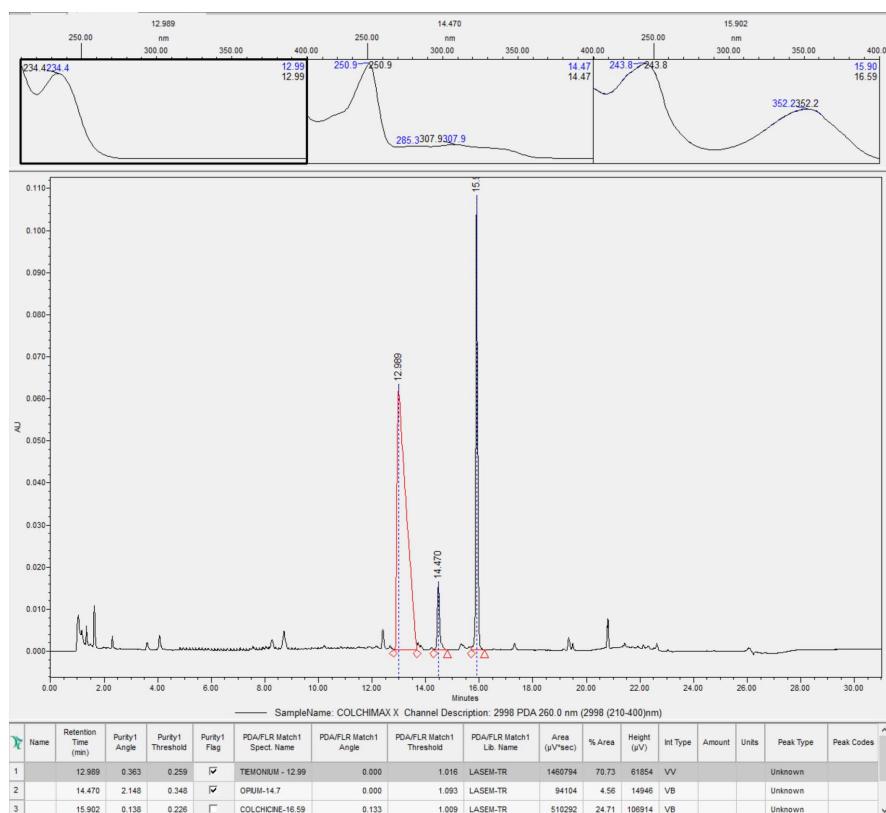
Nous retenons la plus faible dose toxique soit 0,32 mg/kg.

Pour un adulte de 70 kg qui consommerait 2L d'eau par jour, nous avons une concentration toxique de  $0,32 \times 70 = 22,4$  mg/2L/j.

Soit une concentration de **11,2 mg/L/j**.

Bien que le Vidal recommande de ne jamais dépasser 3 mg de colchicine par jour, nous conservons cette valeur toxicologique. Yaron Finkelstein et al. note comme plus faible dose létale de colchicine une dose comprise entre 7 et 21mg. (60)

Après analyse d'un échantillon de notre solution suspecte, nous obtenons le graphique ci-dessous.



**Figure 26** Chromatogramme de la solution suspecte préparée à-partir d'un comprimé de Colchimax®, analyse à une longueur d'onde de 260nm.

A-partir de l'analyse de l'échantillon, nous obtenons le tableau ci-après avec les concentrations calculées grâce aux droites d'étalonnage.

Il apparait que seules trois molécules sont détectées à la longueur d'onde de 260 nm, avec 3 pics individualisés avec des temps de rétentions différents. le premier pic à 12,98 minutes identifié comme celui du tiémonium, à 14,47 minutes identifié comme le pic de l'opium et à 15,90 minutes il s'agit du pic de la colchicine.

Il a donc été possible de quantifier ces 3 molécules grâce aux équations formulées précédemment dans la mise au point de la méthode d'analyse.

Nous obtenons donc une concentration en colchicine égale à 9,657 mg/L. Il n'a pas été possible de déterminer les concentrations des autres composés comme ils ne possèdent ni droite d'étalonnage ni d'équation permettant de déterminer leur concentration.

	Name	Retention Time (min)	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Purity1 Flag	PDA/FLR Match1 Spect. Name	PDA/FLR Match1 Angle	PDA/FLR Match1 Threshold	PDA/FLR Match1 Lib. Name	Area (µV*sec)	% Area	Height (µV)	Int Type	Amount	Units	Peak Type	Peak Codes
1	NICOTINE	1.722			<input type="checkbox"/>									Missing		Missing	
2	CAFEINE	8.110			<input type="checkbox"/>									Missing		Missing	
3	CRIMIDINE	13.740			<input type="checkbox"/>									Missing		Missing	
4		14.657	0.187	0.250	<input type="checkbox"/>	TIEMONIUM - 12.99	0.229	1.025	LASEM-TR	597356	73.49	40034	BB		Unknown		
5	4-NITROPHENOL	14.839			<input type="checkbox"/>									Missing		Missing	
6	OPIUM	15.576	1.652	0.813	<input checked="" type="checkbox"/>	OPIUM-14.7	4.171	1.388	LASEM-TR	13710	1.69	3777	BB		Found	Q20	
7	ALDICARBE	16.180			<input type="checkbox"/>									Missing		Missing	
8	COLCHICINE	16.624	0.136	0.221	<input type="checkbox"/>	COLCHICINE-16.59	0.093	1.015	LASEM-TR	201818	24.83	54219	BB	9.657	Found	Q10	

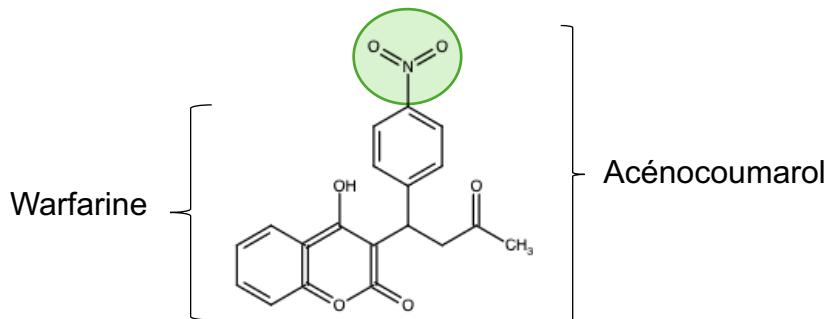
**Tableau 14** Concentration de colchicine dans notre échantillon de solution suspecte.

#### 4. Discussion

Nous avons souhaité mettre au point une méthode d'analyse pour détecter et quantifier de potentiels toxiques par une méthode rapide et simple à utiliser en routine. C'est pour cela que le laboratoire a développé cette technique de chromatographie liquide pour compléter le panel de techniques déjà en place. Néanmoins, l'HPLC-UV présente quelques limites. Notamment la capacité d'absorption dans l'UV de certaines molécules, ce qui réduit les possibilités dans un premier temps. Puisque l'absorption dans l'UV résulte du passage d'un électron d'un niveau excité à un niveau supérieur, l'absorption dépend donc de la structure électronique d'une molécule. Pour cela il est nécessaire que la molécule possède des groupements chromophores comme les groupements aromatiques, les carbonyles ou des liaisons conjuguées. Ces groupements absorbent quel que soit leur degré d'ionisation.

De plus, nous avons développé notre méthode sur 8 composés, nous devrons donc éprouver notre protocole selon plusieurs scenarii.

En outre, lors du développement de notre méthode, nous avions inclus la Warfarine dans notre protocole. Après plusieurs protocoles mis en place, nous n'avons pas su éviter la coélation de la Warfarine avec l'Acénocoumarol qui ont des temps de rétention similaires. Ce sont 2 molécules appartenant à la même famille des dérivés de la coumarine (cf figure 28) et leurs spectres sont similaires. Nous avons donc fait le choix de ne conserver que l'acénocoumarol qui a une meilleure solubilité (Solubilité de la Warfarine : 17 mg/L contre une solubilité de 49,1 mg/L).



**Figure 27** Structure de la warfarine et de l'acénocoumarol

Nous nous sommes interrogés sur la stabilité des composés toxiques dans une matrice chlorée, puisqu'il existe une obligation de chloration des réseaux d'eau. Les analyses ayant été faites à-partir d'échantillons d'eau ultrapure ou d'eau de bouteille, nous sommes en mesure de nous poser la question de l'impact de la chloration sur la dégradation du produit. C'est un axe que nous devrons prendre en compte dans les prochains travaux. De plus, nous devrons valider cette méthode avec la détermination des valeurs de détection et de quantification, en regard des concentrations de toxicité aiguë, la répétabilité, la reproductibilité.

De plus, nous avons pu détecter des molécules absentes de notre protocole d'analyse mais enregistrées au préalable dans notre bibliothèque comme le tiémonium contenu dans le Colchimax®. Dans le cas des molécules dont nous ne disposerions pas de leur courbe de calibration, nous ne pourrons que les identifier au moyen de la bibliothèque mais nous ne pourrons pas les quantifier. Sous réserve que la bibliothèque de spectres de molécules soit exhaustive.

Cette méthode a été développée pour détecter des toxiques présents dans l'eau mais aussi dans des matrices complexes alimentaires qui pourraient elles aussi servir de vecteur pour une éventuelle intoxication de masse. Il est donc obligatoire d'extraire les molécules d'intérêt avec une méthode d'extraction. Pour cela il est possible de procéder à l'extraction sur phase solide, ou à l'aide de toxitubes QuEChERS. Le but étant d'extraire et/ou de concentrer les molécules d'intérêt, tout en maintenant l'objectif d'analyser un échantillon par HPLC-UV.

## 5. Discussion et conclusion générale

Afin de répondre à une demande grandissante en termes de protection des populations vis-à-vis d'une possible menace chimique nous avons décidé de mettre en place un protocole d'extraction et d'analyse par HPLC-UV. Tout d'abord pour palier une attaque chimique dans le réseau d'EDCH qui serait un vecteur de grand impact puisque son maillage n'épargne aucune population. De plus, ce travail a permis d'élargir la multiplicité des échantillons en incluant les matrices alimentaires, qu'elles soient sèches ou non en incluant les sauces, les farines ou toute autre préparation.

Cette méthode d'analyse peut nécessiter une préparation de l'échantillon à analyser avec une étape rapide de purification par extraction avec la méthode QuEChERS.

Mais nous pouvons nous demander si les traitements du réseau d'EDCH permettraient de dégrader d'éventuels toxiques et jusqu'à quelle concentration. Les traitements habituels par des méthodes d'ozonation, de désinfection par UV et de chloration permettent la protection de l'eau vis-à-vis des bactéries et des virus. Qu'en serait-il des molécules chimiques ?

De plus, la photodégradation est un phénomène à prendre en compte, tant dans les manœuvres de protection des populations en cas d'attaque que dans l'échantillonnage et la conservation des échantillons. Pour aller plus loin dans notre exercice, c'est un point que nous pourrions étudier afin d'éviter toute dégradation du toxique.

La question de contamination volontaire ou involontaire est au cœur des discussions avec la problématique des polluants perfluorés comme les PFAS mais aussi la détection des micro et nanoplastiques retrouvés dans les eaux embouteillées. Cette nouvelle préoccupation ouvre le champ des recherches en matière de détection et de quantification avec la possibilité de mettre en place de nouvelles techniques d'analyse.



## **V. ANNEXES**

**Annexe 1: Tableau de cotation des molécules identifiées par leur numéro de classement**

N°	Indication	Accessibilité SIGMA	Prix / 100mg (€)	Score prix	Accessibilité GP	Score Accessibilité	Couleur	Gout	Score détectabilité	Score solubilité	Score Solubilité / valeur tox
20	Insecticide	1	24,56	1	1	1	1	1	1	0,1	1
21	Insecticide	1	38,28	1	1	1	1	1	1	0,01	1
22	Rodenticide	1	83,8	1	2	2	0,5	1	0,5	0,01	1
23	Drogue	1	51,4	1	1	1	1	1	1	0,001	1
24	Industrie	1	39	1	1	1	1	1	1	0,01	1
25	Industrie	1	25,12	1	1	1	0,5	1	0,5	0,1	1
26	Industrie	1	0,0489	10	1	10	1	1	1	1	1
27	Industrie	1	0,0525	10	1	10	1	1	1	1	1
28	Industrie	1	0,544	10	1	10	0,5	1	0,5	1	1
29	Gaz lacrymo	1	5,94	10	1	10	0,5	1	0,5	0,1	1
30	Insecticide	1	28,8	1	1	1	0,5	1	0,5	0,01	1
31	Insecticide	1	60,4	1	1	1	0,5	1	0,5	0,01	1
32	Pharmaceutique	1	0,0815	10	1	10	0,5	1	0,5	1	1
33	Industrie	1	0,238	10	1	10	0,5	1	0,5	1	1
34	Insecticide	1	1680	0,1	1	0,1	1	1	1	1	1
35	Industrie	1	7720	0,1	1	0,1	1	1	1	1	1
36	Insecticide	1	144	0,1	1	0,1	1	1	1	1	1
37	Insecticide	1	119	0,1	1	0,1	1	1	1	1	1
38	Pharmaceutique	1	0,0357	10	1	10	1	1	1	1	1
39	Pharmaceutique	1	289	0,1	1	0,1	1	1	1	0,01	1
40	Drogue	1	1477	0,1	1	0,1	1	1	1	0,01	1
41	Herbicide	1	162	0,1	1	0,1	1	1	1	0,01	1
42	Insecticide	1	0,056	10	1	10	1	1	1	0,001	0,01
43	Pharmaceutique	1	1000	0,1	1	0,1	1	1	1	0,01	1
44	Pharmaceutique	1	106	0,1	1	0,1	0,5	1	0,5	1	1
45	Insecticide	1	125,6	0,1	1	0,1	0,5	1	0,5	1	1

N°	Indication	Accessibilité SIGMA	Prix / 100mg (€)	Score prix	Accessibilité GP	Score Accessibilité	Couleur	Gout	Score détectabilité	Score solubilité	Score Solubilité / valeur tox
46	Pharmaceutique	1	155,4	0,1	1	0,1	0,5	1	0,5	1	1
47	Conservateur	1	16,78	1	1	1	1	1	1	1	1
48	Industrie	1	32,2	1	1	1	0,5	1	0,5	1	1
49	Industrie	1	2000	0,1	1	0,1	1	0,5	0,5	0,01	1
50	Drogue	1	4350	0,1	2	0,2	1	1	1	0,1	1
51	Pharmaceutique	1	4350	0,1	2	0,2	1	1	1	0,1	1
52	Industrie	1	2820	0,1	1	0,1	1	1	1	1	1
53	Pharmaceutique	1	223,5	0,1	1	0,1	1	1	1	0,1	1
54	Industrie	1	0,23	10	1	10	1	1	1	0,01	0,01
55	Industrie	1	0,181	10	1	10	1	1	1	0,01	0,01
56	Pharmaceutique	1	297	0,1	1	0,1	1	1	1	0,001	0,01
57	Pharmaceutique	1	2000	0,1	1	0,1	1	1	1	0,01	1
58	Industrie	1	0,123	10	1	10	1	1	1	0,001	0,01
59	Industrie	1	1,72	10	1	10	1	0,5	0,5	0,001	0,01
60	Herbicide	1	143	0,1	1	0,1	1	1	1	0,1	1
61	Industrie	1	0,0434	10	1	10	1	1	1	0,01	0,01
62	Insecticide	1	7,84	10	1	10	1	0,5	0,5	0,01	0,01
63	Insecticide	1	76,1	1	1	1	0,5	1	0,5	0,001	0,01
64	Industrie	1	2220	0,1	1	0,1	0,5	1	0,5	0,1	1
65	Industrie	1	4270	0,1	1	0,1	0,5	0,5	0,25	0,1	1
66	Industrie	1	0,0726	10	1	10	0,5	1	0,5	0,01	0,01
67	Insecticide	1	24,56	1	2	2	1	1	1	0,001	0,01
68	Herbicide	1	41,2	1	2	2	1	1	1	0,1	0,01
69	Herbicide	1	77,6	1	1	1	1	1	1	0,01	0,01
70	Insecticide	1	27,2	1	1	1	1	1	1	0,01	0,01
71	Herbicide	1	29,04	1	1	1	1	1	1	0,01	0,01

N°	Indication	Accessibilité SIGMA	Prix / 100mg (€)	Score prix	Accessibilité GP	Score Accessibilité	Couleur	Gout	Score détectabilité	Score solubilité	Score Solubilité / valeur tox
72	Insecticide	1	82	1	1	1	1	1	1	0,01	0,01
73	Insecticide	1	28,08	1	1	1	1	1	1	0,01	0,01
74	Herbicide	1	30,48	1	1	1	1	1	1	0,01	0,01
75	Pharmaceutique	1	1480	0,1	1	0,1	1	1	1	0,001	0,01
76	Insecticide	1	40	1	2	2	0,5	1	0,5	0,01	0,01
77	Insecticide	1	5,16	10	1	10	1	1	1	0,01	0,01
78	Insecticide	1	52,6	1	1	1	1	1	1	0,001	0,01
79	Industrie	1	19,72	1	1	1	1	1	1	0,01	0,01
80	Herbicide	1	41,2	1	1	1	1	1	1	0,01	0,01
81	Insecticide	1	48,2	1	1	1	1	1	1	0,01	0,01
82	Industrie	1	22,2	1	1	1	1	1	1	0,01	0,01
83	Herbicide	1	44,8	1	1	1	1	1	1	0,01	0,01
84	Herbicide	1	97,6	1	1	1	1	1	1	0,01	0,01
85	Herbicide	1	28,5	1	1	1	0,5	1	0,5	0,01	0,01
86	Insecticide	1	24,56	1	1	1	0,5	1	0,5	0,01	0,01
87	Rodenticide	1	134	0,1	1	0,1	0,5	1	0,5	0,001	0,01
88	Insecticide	1	42,12	1	1	1	1	1	1	0,001	0,01
89	Insecticide	1	62	1	1	1	1	1	1	0,001	0,01
90	Herbicide	1	86	1	1	1	0,5	1	0,5	0,01	0,01
91	Industrie	1	10,52	1	1	1	1	0,5	0,5	0,01	0,01
92	Herbicide	1	27,2	1	1	1	0,5	1	0,5	0,001	0,01
93	Pharmaceutique	1	4350	0,1	2	0,2	1	1	1	0,01	0,01
94	Pharmaceutique	1	1210	0,1	2	0,2	1	1	1	0,01	0,01
95	Herbicide	1	48,2	1	1	1	1	1	1	0,01	0,01
96	Fongicide	1	61,7	1	1	1	1	1	1	0,01	0,01
97	Fongicide	1	27,2	1	1	1	1	1	1	0,01	0,01
98	Insecticide	1	106	0,1	2	0,2	1	1	1	0,001	0,01

N°	Indication	Accessibilité SIGMA	Prix / 100mg (€)	Score prix	Accessibilité GP	Score Accessibilité	Couleur	Gout	Score détectabilité	Score solubilité	Score Solubilité / valeur tox
99	Fongicide	1	34,2	1	1	1	1	1	1	0,001	0,01
100	Fongicide	1	11,16	1	1	1	1	1	1	0,001	0,01
101	Industrie	1	133,6	0,1	1	0,1	1	1	1	0,01	0,01
102	Fongicide	1	24,56	1	1	1	0,5	1	0,5	0,01	0,01
103	Insecticide	1	212	0,1	1	0,1	0,5	1	0,5	0,001	0,01
104	Phytosanitaire	1	67,2	1	1	1	0,5	1	0,5	0,001	0,01
105	Industrie	1	1030	0,1	1	0,1	1	1	1	0,01	0,01
106	Industrie	1	1974	0,1	1	0,1	1	1	1	0,01	0,01

N°	DL50 (mg/kg)	Espèce considérée	DL50/10 (mg/kg)	TDLo Adulte voie orale (mg/kg)	Valeur tox retenue (mg/kg)	Concentration toxique pour un homme de 70 kg - 2L/j (mg/L)	Score DL50	Score final	Classe de risque
1	47	rat	4,7		4,7	164,5	1000	1000	Risque très élevé
2	46	rat	4,6		4,6	161	1000	500	Risque très élevé
3	810	rat	0,081		0,081	2,835	1000	500	Risque très élevé
4	5,886	souris	0,5886	0,51	0,51	17,85	1000	200	Risque élevé
5	228	rat	22,8	16	16	560	100	200	Risque élevé
6	293	rat	29,3		29,3	1025,5	100	200	Risque élevé
7	17,78	souris	1,778	0,1	0,1	3,5	1000	200	Risque élevé
8	1,6	rat	0,16	6,667	0,16	5,6	1000	200	Risque élevé
9	382	rat	38,2		38,2	1337	100	100	Risque élevé
10	7,5	rat	0,75	360	0,75	26,25	1000	100	Risque élevé
11	10	souris	1		1	35	1000	100	Risque élevé
12	3	rat	0,3		0,3	10,5	1000	100	Risque élevé
13	39	rat	3,9		3,9	136,5	1000	100	Risque élevé
14	13	rat	1,3		1,3	45,5	1000	100	Risque élevé
15	2,5	rat	0,25		0,25	8,75	1000	100	Risque élevé
16	192	rat	19,2		19,2	672	100	100	Risque élevé
17	0,5	rat	0,05	28	0,05	1,75	1000	100	Risque élevé
18	1,25	rat	0,125		0,125	4,375	1000	100	Risque élevé
19	17	rat	1,7		1,7	59,5	1000	100	Risque élevé
20	41	rat	4,1	24	4,1	143,5	1000	100	Risque élevé
21	8	rat	0,8		0,8	28	1000	100	Risque élevé
22	1,125	rat	0,1125		0,1125	3,9375	1000	100	Risque élevé
23	10	rat	1	0,0009	0,0009	0,0315	1000	100	Risque élevé
24	1	rat	0,1		0,1	3,5	1000	100	Risque modéré
25	30	rat	3		3	105	1000	50	Risque modéré
26	520	souris	52		52	1820	50	50	Risque modéré

N°	DL50 (mg/kg)	Espèce considérée	DL50/10 (mg/kg)	TDLo Adulte voie orale (mg/kg)	Valeur tox retenue (mg/kg)	Concentration toxique pour un homme de 70 kg - 2L/j (mg/L)	Score DL50	Score final	Classe de risque
27	1809	rat	180,9		180,9	6331,5	50	50	Risque modéré
28	202	rat	20,2		20,2	707	100	50	Risque modéré
29	50	rat	5		5	175	100	50	Risque modéré
30	2	souris	0,2	1,2	0,2	7	1000	50	Risque modéré
31	1	rat	0,1		0,1	3,5	1000	50	Risque modéré
32	710	rat	71		71	2485	50	25	Risque modéré
33	890	rat	89		89	3115	50	25	Risque modéré
34	18	rat	1,8		1,8	63	1000	10	Risque modéré
35	0,09	rat	0,009		0,009	0,315	1000	10	Risque modéré
36	20	rat	2		2	70	1000	10	Risque modéré
37	0,049	rat	0,0049	0,054	0,0049	0,1715	1000	10	Risque modéré
38	5000	rat	500		500	17500	10	10	Risque modéré
39	1	souris	0,1		0,1	3,5	1000	10	Risque modéré
40	5,1	rat	0,51		0,51	17,85	1000	10	Risque modéré
41	8	rat	0,8		0,8	28	1000	10	Risque modéré
42	46	rat	4,6		4,6	161	1000	10	Risque modéré
43	104	souris	10,4	1,428	1,428	49,98	1000	10	Risque modéré
44	3,34	souris	0,334	5,81	0,334	11,69	1000	5	Risque modéré
45	0,5	rat	0,05	0,309	0,05	1,75	1000	5	Risque modéré
46	0,012	rat	0,0012		0,0012	0,042	1000	5	Risque modéré
47	540	souris	54	700	54	1890	50	5	Risque modéré
48	59,5	rat	5,95	28	5,95	208,25	100	5	Risque modéré
49	2,24	rat	0,224		0,224	7,84	1000	5	Risque modéré
50	99	souris	9,9		9,9	346,5	100	2	Risque modéré
51	250	souris	25		25	875	100	2	Risque modéré
52	250	rat	25		25	875	100	1	Risque modéré
53	140	lapin	14		14	490	100	1	Risque modéré

N°	DL50 (mg/kg)	Espèce considérée	DL50/10 (mg/kg)	TDLo Adulte voie orale (mg/kg)	Valeur tox retenue (mg/kg)	Concentration toxique pour un homme de 70 kg - 2L/j (mg/L)	Score DL50	Score final	Classe de risque
54	268	rat	26,8		26,8	938	100	1	Risque modéré
55	177	rat	17,7		17,7	619,5	100	1	Risque modéré
56	0,825	rat	0,0825		0,0825	2,8875	1000	0	Risque modéré
57	125	rat	12,5	32	12,5	437,5	100	1	Risque modéré
58	490	rat	49		49	1715	100	1	Risque faible
59	82	rat	8,2		8,2	287	100	1	Risque faible
60	1150	rat	115		115	4025	50	1	Risque faible
61	1231	rat	123,1		123,1	4308,5	50	1	Risque faible
62	316	rat	31,6		31,6	1106	100	1	Risque faible
63	1,6	rat	0,16		0,16	5,6	1000	1	Risque faible
64	349	rat	34,9		34,9	1221,5	100	1	Risque faible
65	331	rat	33,1		33,1	1158,5	100	0	Risque faible
66	810	rat	81		81	2835	50	0	Risque faible
67	383	rat	38,3		38,3	1340,5	100	0	Risque faible
68	564	souris	56,4		56,4	1974	50	0	Risque faible
69	369	rat	36,9		36,9	1291,5	100	0	Risque faible
70	128	souris	12,8	500	12,8	448	100	0	Risque faible
71	110	souris	11		11	385	100	0	Risque faible
72	92,5	rat	9,25		9,25	323,75	100	0	Risque faible
73	358	rat	35,8		35,8	1253	100	0	Risque faible
74	367	rat	36,7		36,7	1284,5	100	0	Risque faible
75	260	souris	26	1,6	1,6	56	1000	0	Risque faible
76	66	rat	6,6		6,6	231	100	0	Risque faible
77	8970	rat	897		897	31395	10	0	Risque faible
78	60	souris	6	300	6	210	100	0	Risque faible
79	820	rat	82		82	2870	50	0	Risque faible
80	1150	souris	115		115	4025	50	0	Risque faible

N°	DL50 (mg/kg)	Espèce considérée	DL50/10 (mg/kg)	TDLo Adulte voie orale (mg/kg)	Valeur tox retenue (mg/kg)	Concentration toxique pour un homme de 70 kg - 2L/j (mg/L)	Score DL50	Score final	Classe de risque
81	644	rat	64,4	246	64,4	2254	50	0	Risque faible
82	2383	rat	238,3		238,3	8340,5	50	0	Risque faible
83	672	rat	67,2		67,2	2352	50	0	Risque faible
84	503	rat	50,3		50,3	1760,5	50	0	Risque faible
85	271	rat	27,1		27,1	948,5	100	0	Risque faible
86	66	rat	6,6		6,6	231	100	0	Risque faible
87	0,27	rat	0,027		0,027	0,945	1000	0	Risque faible
88	880	rat	88		88	3080	50	0	Risque faible
89	1480	rat	148		148	5180	50	0	Risque faible
90	663	rat	66,3		66,3	2320,5	50	0	Risque faible
91	2000	rat	200		200	7000	50	0	Risque faible
92	800	rat	80		80	2800	50	0	Risque faible
93	335	rat	33,5		33,5	1172,5	100	0	Risque faible
94	513	rat	51,3		51,3	1795,5	50	0	Risque faible
95	4480	rat	448		448	15680	10	0	Risque faible
96	3500	rat	350		350	12250	10	0	Risque faible
97	3400	souris	340		340	11900	10	0	Risque faible
98	1563	rat	156,3		156,3	5470,5	50	0	Risque faible
99	5000	rat	500		500	17500	10	0	Risque faible
100	10000	rat	1000		1000	35000	10	0	Risque faible
101	2400	souris	240		240	8400	50	0	Risque faible
102	6400	rat	640		640	22400	10	0	Risque faible
103	97	rat	9,7		9,7	339,5	100	0	Risque faible
104	5000	souris	500		500	17500	10	0	Risque faible
105	6040	rat	604		604	21140	10	0	Risque faible
106	4750	rat	475		475	16625	10	0	Risque faible

## Annexe 2 Protocole de dosage de la caféine dans un échantillon d'EDCH par HPLC-UV.

**Objectif : Déetecter et quantifier la caféine dans un échantillon hydrique suspect.**

### Matériel :

*Pour l'analyse chromatographique*

Ordinateur avec le logiciel Empower 3, ACQUITY ARC PDA – Shortcut

2998 PDA detector WATERS, Sample manager FTN-R Acquity-Arc WATERS, Quaternary solvent Manager-R WATERS.

Colonne XBridge PREMIER BEH C18 2.5 µm, 4.6 x 100 mm Column,

Solvant de stockage de la colonne : Acétonitrile 100%

Solvants de stockage du système : ACN 100% (si arrêt < 1 semaine) / Isopropanol 100% (si arrêt > 1 semaine)

### *Solvants :*

- Voie A : Water Eau ultra pure 100% (Eau tamponnée si besoin)
- Voie B : Water Eau ultra pure 100%
- Voie C : Acétonitrile 100%
- Voie D : Mélange H<sub>2</sub>O/ACN 90:10 (v/v) (mélange de la phase mobile initiale)
- Seal wash / prime wash : Water/ACN (90 :10) (mélange de la phase mobile initiale)

### *Conditions d'analyse :*

Débit 1 ml/min

Phase mobile initiale : H<sub>2</sub>O / ACN 90 :10 (v/v)

### *Gradient d'élution :*

- Conditions initiales pendant 3 minutes
- T<sub>3min</sub>, H<sub>2</sub>O / ACN 90 :10 (v/v)
- T<sub>10 min</sub>, H<sub>2</sub>O / ACN 10 :90 (v/v)
- T<sub>13min</sub>, H<sub>2</sub>O / ACN 10 :90 (v/v)
- T<sub>14 min</sub>, H<sub>2</sub>O / ACN 90 :10 (v/v)
- T<sub>15 min</sub>, H<sub>2</sub>O / ACN 90 :10 (v/v)

Temps de run 15 minutes

Température du four : 40°C

Volume injecté : 10 µL

### Méthode :

#### *Mise sous tension des appareils*

Allumer l'ordinateur, entrer les codes pour ouvrir la session.

Allumer les différents organes de la chromatographie dans l'ordre suivant: Injecteur, PDA, pompe. Vérifier que la lampe du détecteur est bien éteinte (durée de vie limitée d'une lampe). Éviter d'allumer et d'éteindre plusieurs fois par jour la lampe (allumage de la lampe équivaut à 3 heures de fonctionnement).

Lancer le logiciel  Empower et entrer les codes de la session.



### *Purge de la machine*

La colonne est stockée pour plusieurs jours dans **100% ACN** si arrêt de moins de 1 semaine.

Si arrêt supérieur à 1 semaine : le système est conditionné en **100% Isopropanol**.

Si le système a été conditionné en 100% d'isopropanol, rincer avec du méthanol 100% puis de l'eau. (injecteur, pompe).

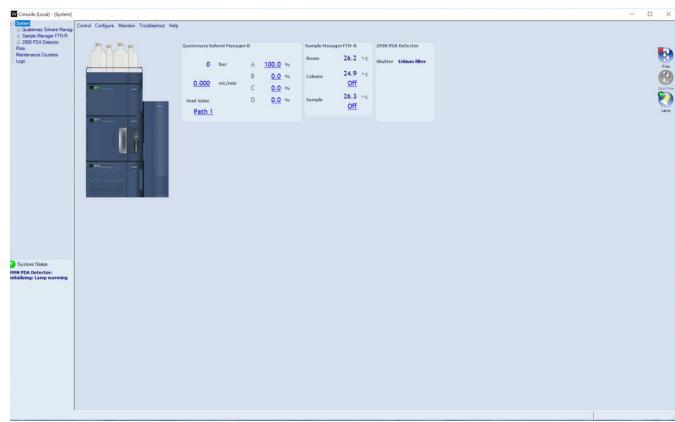
Dans « Quaternary Solvent Manager > Control > Prime Solvents (primer toutes les voies 3 minutes)

Puis Control > Prime seal wash (primer 3 minutes)

Dans « Sample Manager FTN-R » > Control > Prime

**Remplacer les solvants de stockage par les solvants nécessaires pour la phase mobile et lancer une purge :**

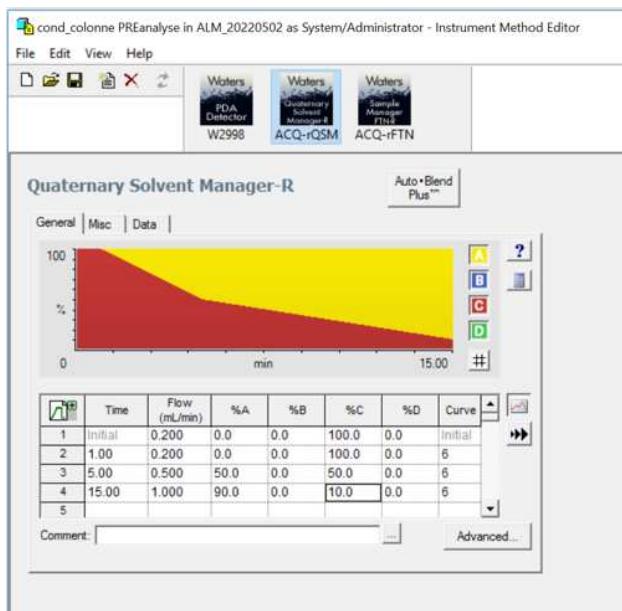
- **Lancer le Start-up system** : Dans l'onglet System et la machine lance sa purge automatiquement.
  - o **Si le niveau des solvants a été complété** : Sélectionner « Solvent Refresh »
  - o **Si les solvants ont été changés** : Sélectionner « Solvent Changeover »
    - « Use Custom Conditions »
- Prime – Sample Manager FTN-R : Prime Wash solvent 15sec / Prime Purge solvent 40 cycles**
- Prime – Quaternary Solvent Manager-R : Priming options Solvent A/B/C/D/Seal Wash + Priming duration 3 minutes**
- Sample temperature off**
- Column temperature 40°C**
- Flow 0.00 mL/min**
- Solvent A 90% / Solvent B 0% / Solvent C 10% / Solvent D 0%**
- Position path1**
- Purger l'injecteur “Prime” dans l'onglet injecteur.



Verifier que le liquide coule bien dans la poubelle. Vigilance : Si le liquide ne coule pas dans la tubulure de la poubelle et/ou si la pompe fait un gros « clac » vérifier que celle-ci n'est pas désarmorcée. Si c'est le cas, forcer le liquide à l'aide d'une seringue munie d'une tubulure. (procédure pompe désamorcée).

*Conditionnement de la colonne selon les conditions initiales d'analyse*

Automatique : Dans le logiciel Empower, choisir > **Run Samples** et dans le projet **ALM\_20220502**, selectionner le système Acquity ARC PDA.



**Figure 28** Paramètres de conditionnement de la colonne

## Enregistrement et analyse des échantillons

### Blanc : phase mobile initiale H<sub>2</sub>O/ACN (90 :10)

Prélever à l'aide d'une pipette Pasteur entre 1.0 ml et 2,0 ml de solution. Les vials peuvent contenir jusqu'à 2mL d'échantillon. Il existe des vials avec réducteurs intégrés de 300µL.

<i>Identification du vial</i>	<i>Emplacement</i>	<i>composition</i>
Blanc H <sub>2</sub> O ACN	1 :A,1	Phase mobile ACN/H <sub>2</sub> O (10:90)
Caf 1 1ug/ml	1 :A,2	Solution de caféine concentration 1ug/ml
Caf 2 0.5 ug/ml	1 :A,3	Solution de caféine concentration 0.5 ug/ml
Caf 3 0.25 ug/ml	1 :A,4	Solution de caféine concentration 0.25ug/ml
Caf 4 0.125 ug/ml	1 :A,5	Solution de caféine concentration 0.125 ug/ml
Caf 5 62.5 ng/ml	1 :A,6	Solution de caféine concentration 62.5 ng/ml
Caf 6 31.25 ng/ml	1 :A,7	Solution de caféine concentration 31.25 ng/ml
Caf inconnue	1 :A,8	Solution de caféine concentration inconnue

Verifier et noter la pression dans la colonne de chromatographie (~233 bars), la température du four à **40°C**.

Dans Run Sample enregistrer successivement les échantillons comme dans le tableau ci dessus en commençant par les standards dont les concentrations sont connues et placer l'échantillon à doser à la suite.

Pour enregistrer les vials d'échantillons standards de calibratrion pour la droite d'étalonnage : utiliser la fonction « **amonts** » . Pour enregistrer le nom de la molécule standard cliquer dans la case component puis copy from MethodSet, sélectionner **caf\_20220412** puis open. Renseigner les différentes concentrations de la gamme étalonnage puis cliquer sur Ok. Il y aura autant de lignes que de molécules étalon dans la méthode. (voir figure 3)

En fin de séquence, ajouter une méthode stop et de conditionnement de colonne : la lampe et le débit s'arrêtent automatiquement, la colonne sera au préalable conditionnée dans ses conditions de stockage (100% ACN) « **con colonne\_STOP BEHC18** ».

Dans la méthodSet de dosage de la caféine, les paramètres d'analyse des résultats sont enregistrés pour identifier la molécule de caféine grâce à la bibliothèque « **LASEM** » dans laquelle nous avions enregistré de nombreux spectres préalablement. La méthode permet de dresser une courbe d'étalonnage pour déterminer la concentration de l'échantillon. Si le système de chromatographie est saturé, il est nécessaire de diluer l'échantillon avant d'injecter. De plus, il est possible de concentrer l'échantillon par des méthodes d'extraction.

## *Récupération des résultats*

Allez dans l'onglet « Results set », l'ensemble des chromatogrammes s'y retrouvent, la courbe d'étalonnage se trouve dans l'onglet « curve ».

Il est possible d'éditer un rapport avec la touche « rapport ».

Si la chaîne de chromatographie est arrêtée plusieurs jours voire semaines : stocker le système sauf la colonne à 100% isopropanol. Pour cela, après avoir conditionné la colonne en 100% ACN. Remplacer toutes les voies en 100% isopropanol et purger l'ensemble du système : pompe/injecteurs.

*Conditions de stockage :*

	Colonne	Système
1-3j	100 % ACN	100% ACN
>3j	100 % ACN	100% isopropanol

**Figure 29** Run table conditionnement colonne + enregistrement des échantillons + méthode STOP

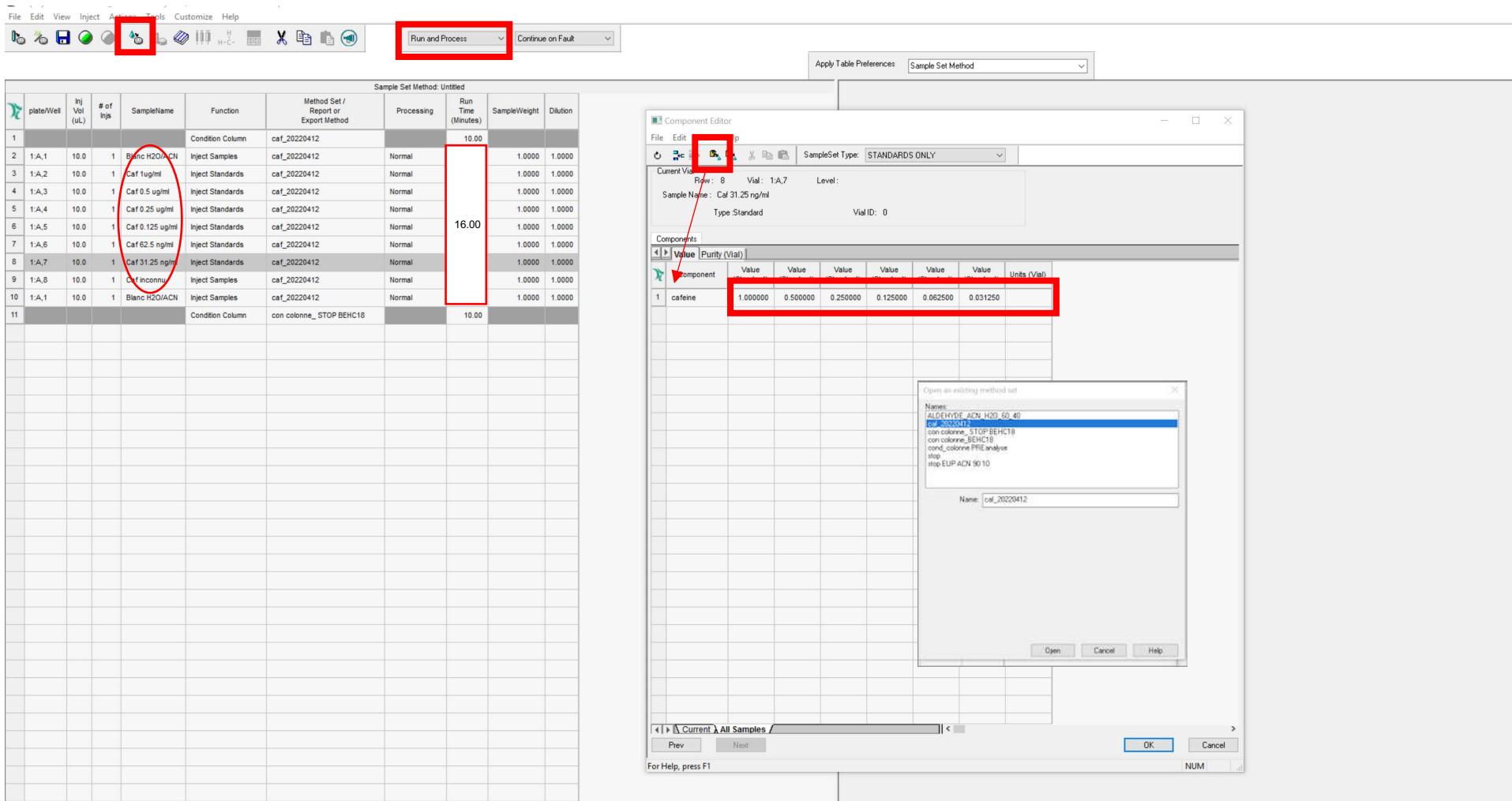
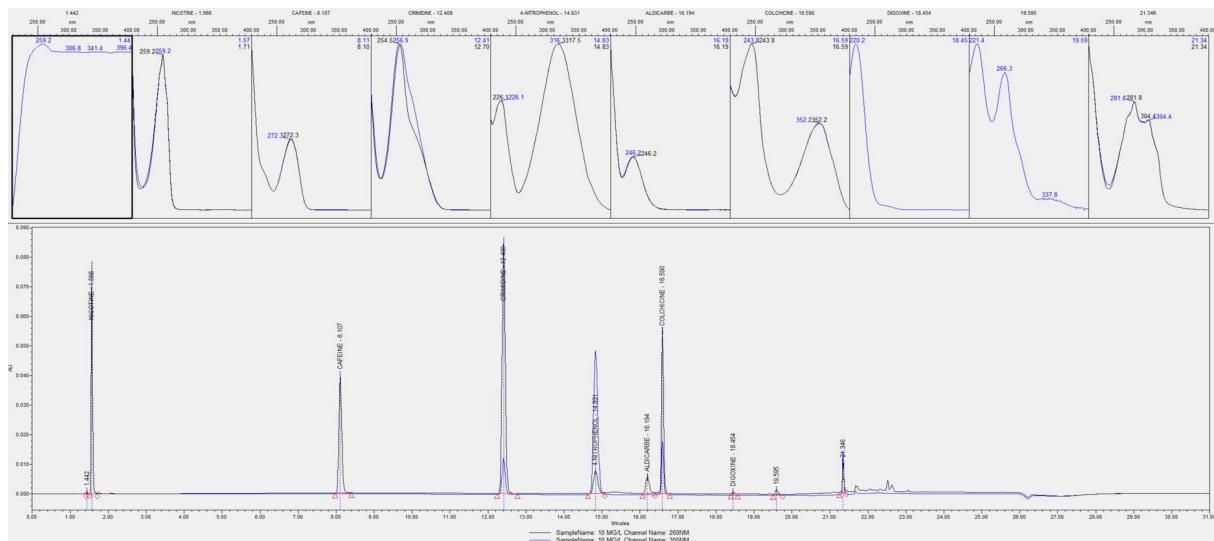
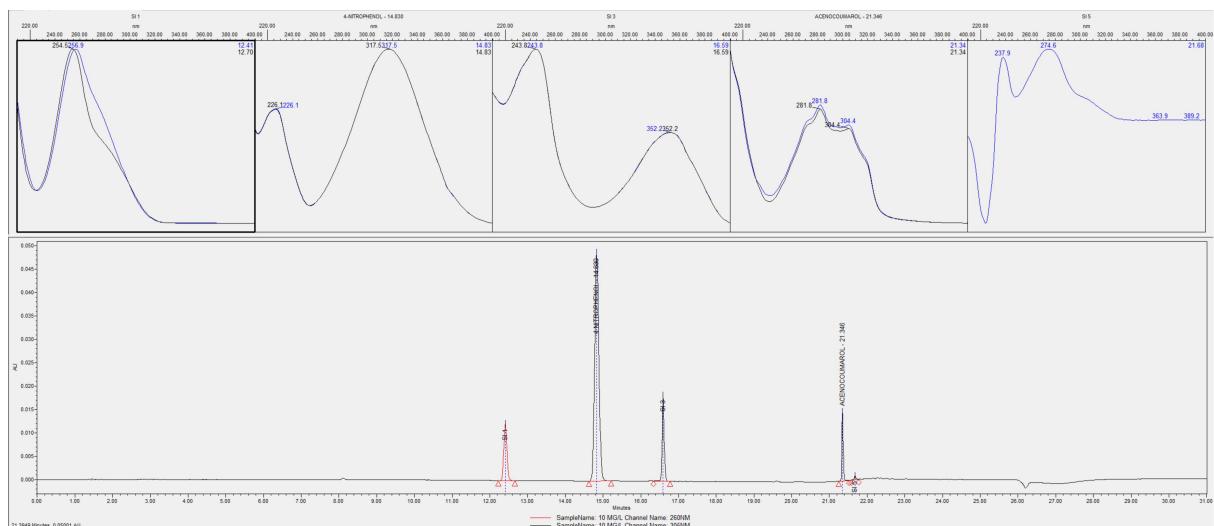


Figure 30 Run table fonction "Amonts" pour enregistrer les échantillons standard

### Annexe 3 Chromatogrammes et spectres de la caféine, crimidine, colchicine, 4-nitrophénol, aldicarbe, acénocoumarol, nicotine et digoxine.



**Figure 31** Spectres des molécules à 260 nm



**Figure 32** Spectres des molécules 4-nitrophénol (14 min) et Acénocoumarol (21,3 min) à 305 nm

## Annexe 4 Protocole de préparation de la solution tampon pH 3

**Objectif : Obtenir une solution tamponnée à pH 3 à partir de 0,3865 g d'acétate d'ammonium dissous dans 1 L d'eau ultrapure, en ajustant le pH avec HCl 1 M**

*Matériel :*

- Acétate d'ammonium ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ) : 0,3865 g (déjà dissous dans 1 L)
- Acide chlorhydrique (HCl) 1 M
- Eau ultrapure
- Bécher 2L,
- Agitateur magnétique, barreau aimanté
- pH-mètre calibré
- Pipette graduée ou burette
- Fiole jaugée 1L

*Méthode :*

### 1. Solution initiale

Utiliser la solution de **0,3865 g d'acétate d'ammonium dissout dans 1L d'EUP**  
Agiter si besoin pour homogénéiser.

### 2. Ajout de HCl :

À l'aide d'une pipette, **ajouter progressivement ~4,5 mL de HCl 1 M** à la solution, sous agitation continue.

### 3. Mesure du pH :

Après chaque petit ajout (1 mL), **vérifier le pH** à l'aide d'un pH-mètre.

Approcher doucement de la valeur cible **pH = 3,00**.

Ajuster si nécessaire :

- Si pH > 3 : continuer à ajouter HCl par petites fractions.
- Si pH < 3 : corriger en ajoutant une petite quantité de  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  dissout

### 4. Homogénéisation finale :

Agiter soigneusement pour homogénéiser la solution une fois le pH atteint.

### 5. Étiquetage et stockage :

Conserver la solution dans un flacon propre, étiqueté : Conservation à 4°C pour la préparation des échantillons pendant 4 jours maximum.

**Solution tampon –  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  – pH 3 – [date]**

600 mL de la solution sont stockés à 4°C comme constituant de la phase mobile.

## BIBLIOGRAPHIE

1. à 05h50 PTCL 22 avril 2024. leparisien.fr. 2024 [cité 25 juin 2024]. JO 2024 : « Bien manger en France, c'est important »... Les grandes ambitions pour l'alimentation des athlètes. Disponible sur: <https://www.leparisien.fr/jo-paris-2024/jo-2024-bien-manger-en-france-cest-important-les-grandes-ambitions-pour-lalimentation-des-athletes-22-04-2024-36X7NZVELZAEJFTCHPEPJFL56A.php>
2. D A. Consommation d'eau moyenne par personne [Internet]. IZI by EDF. [cité 6 juill 2022]. Disponible sur: <https://izi-by-edf.fr/blog/consommation-eau-une-personne/>
3. Eaux en bouteille : des pratiques trompeuses à grande échelle. 30 janv 2024 [cité 29 juill 2025]; Disponible sur: [https://www.lemonde.fr/planete/article/2024/01/30/eaux-en-bouteille-des-traitements-non-conformes-utilises-a-grande-echelle\\_6213815\\_3244.html](https://www.lemonde.fr/planete/article/2024/01/30/eaux-en-bouteille-des-traitements-non-conformes-utilises-a-grande-echelle_6213815_3244.html)
4. KANTAR L centre d'information sur l'eau-. Enquête nationale CIEau / TNS Sofres. <http://id.eaufrance.fr/inc/INC00000000000051308>; 2021 [cité 21 avr 2025]. Part des français buvant de l'eau du robinet tous les jours en 2018. Disponible sur: <https://chiffrecl.eaufrance.fr/1293>
5. Eau du robinet, que boivent les Français ? | Centre d'information sur l'eau [Internet]. 2019 [cité 29 juill 2025]. Disponible sur: <https://www.cieau.com/observatoire-de-leau/c-i-eau-infographies/eau-du-robinet-eau-en-bouteille-que-boivent-les-francais/>
6. Une nouvelle directive eau potable - Ministère de la Santé et de la Prévention [Internet]. [cité 8 juill 2022]. Disponible sur: <https://solidarites-sante.gouv.fr/sante-et-environnement/eaux/article/une-nouvelle-directive-eau-potable>
7. Copleutre MA. France Culture. 2025 [cité 29 juill 2025]. Polluant dans l'eau : le CVM, ce gaz cancérogène présent dans certaines canalisations en PVC. Disponible sur: <https://www.radiofrance.fr/franceculture/podcasts/le-reportage-de-la-redaction/polluant-dans-l-eau-le-cvm-ce-gaz-cancerogene-present-dans-certaines-canalisations-en-pvc-2336201>
8. PFAS : surveillance dans l'eau de consommation [Internet]. 2025 [cité 29 juill 2025]. Disponible sur: <https://www.auvergne-rhone-alpes.ars.sante.fr/pfas-surveillance-dans-leau-de-consommation>
9. Lefevre S, Genin-lomier S, Orlandini P, Cabre O. Maîtrise de la qualité des eaux destinées à la consommation humaine à bord des bâtiments de la Marine: enjeu des paramètres chimiques et organoleptiques. Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France. 2020;173(1):220-30.
10. Arrêté du 11 janvier 2007 relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine mentionnées aux articles R. 1321-2, R. 1321-3, R. 1321-7 et R. 1321-38 du code de la santé publique - Légifrance [Internet]. [cité 7 juill 2022]. Disponible sur: [https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000000465574?init=true&page=1&query=R.+1321-2&searchField=ALL&tab\\_selection=all](https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000000465574?init=true&page=1&query=R.+1321-2&searchField=ALL&tab_selection=all)
11. Initier, mettre en place, faire vivre un PGSSE [Internet]. Astee. [cité 2 août 2022]. Disponible sur: <https://www.astee.org/publications/initier-mettre-en-place-faire-vivre-un-pgsse/>
12. Instruction interministérielle n° 278/SGDSN/PSE/DTS du 04/05/18 relative à la structure et au fonctionnement du réseau national des laboratoires « BIOTOX- PIRATOX » | AIDA [Internet]. [cité 1 août 2022]. Disponible sur: <https://aida.ineris.fr/reglementation/instruction-interministerielle-ndeg-278sgdsnpsedts-040518-relative-a-structure>
13. Directive n° 80-778 du 15/07/80 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine [Internet]. [cité 24 août 2022]. Disponible sur: <https://aida.ineris.fr/node/25678/printable/print>
14. Instruction n° 0-681-2015/DEF/EMM/MDR du 27/05/15 relative à l'organisation et fonctionnement des laboratoires d'analyses de surveillance et d'expertise de la marine. | AIDA

- [Internet]. [cité 29 juill 2025]. Disponible sur: <https://aida.ineris.fr/reglementation/instruction-ndeg-0-681-2015defemmdr-270515-relative-a-lorganisation-fonctionnement>
15. Thibault FM, Forcet S, Lachenaud L, Vidal D. Réponse à la menace biologique : le réseau des laboratoires Biotox-Piratox. Revue Francophone des Laboratoires. 1 sept 2009;2009(415):71-5.
16. Livre blanc sur la défense et la sécurité nationale [Internet]. [cité 1 août 2022]. Disponible sur: <http://www.livreblancdefenseetsecurite.gouv.fr/>
17. ScienceDirect.com | Science, health and medical journals, full text articles and books. [Internet]. [cité 8 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com.ressources-electroniques.univ-lille.fr/>
18. ChemIDplus Advanced - Chemical information with searchable synonyms, structures, and formulas [Internet]. [cité 3 août 2022]. Disponible sur: <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/>
19. Gouvernement du Canada C canadien d'hygiène et de sécurité au travail. Qu'est-ce que DL50 et CL50? : Réponses SST [Internet]. 2022 [cité 19 août 2022]. Disponible sur: <https://www.cchst.ca/oshanswers/chemicals/ld50.html>
20. Nouveaux produits de synthèse - Synthèse des connaissances - OFDT [Internet]. [cité 19 août 2022]. Disponible sur: <https://www.ofdt.fr/produits-et-addictions/de-z/nouveaux-produits-de-synthese/>
21. US EPA O. Chemical Contaminants - CCL 4 [Internet]. 2014 [cité 3 août 2022]. Disponible sur: <https://www.epa.gov/ccl/chemical-contaminants-ccl-4>
22. US EPA O. Contaminant Candidate List 5 (CCL 5) [Internet]. 2018 [cité 3 août 2022]. Disponible sur: <https://www.epa.gov/ccl/contaminant-candidate-list-5-ccl-5>
23. ephy | [Internet]. [cité 24 août 2022]. Disponible sur: <https://ephy.anses.fr/>
24. A.MAISON, S.MALARD. Le nouveau système de classification et d'étiquetage des produits chimiques. 2009.
25. Aldicarbe | Sigma-Aldrich [Internet]. [cité 9 août 2022]. Disponible sur: <https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/search/aldicarbe?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=aldicarbe&type=product>
26. Moritz F, Droy JM, Dutheil G, Melki J, Bonmarchand G, Leroy J. Acute pancreatitis after carbamate insecticide intoxication. Intensive Care Med. 1994;20(1):49-50.
27. VIDAL [Internet]. [cité 11 août 2022]. Malathion : substance active à effet thérapeutique. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/malathion-2207.html>
28. Réponse du Ministère des affaires sociales, de la santé et des droits des femmes publiée dans le JO Sénat du 10/12/2015 - page 3359.
29. VIDAL [Internet]. [cité 11 août 2022]. Poux de tête : arrêt de commercialisation de PRIODERM suite à l'inscription du malathion sur liste I. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/actualites/22991-poux-de-tete-arret-de-commercialisation-de-prioderm-suite-a-l-inscription-du-malathion-sur-liste-i.html>
30. Malathion PESTANAL, analytical standard 121-75-5 [Internet]. [cité 11 août 2022]. Disponible sur: <http://www.sigmaaldrich.com/>
31. EFSA, 2009. Conclusion regarding the peer review of the pesticides risk assessment of the active substance malathion. EFSA scientific report 333, p.1-118.
32. #. Salle de presse | Inserm. 2021 [cité 25 août 2022]. « L'effet cocktail » des perturbateurs endocriniens mieux compris. Disponible sur: <https://presse.inserm.fr/leffet-cocktail-des-perturbateurs-endocriniens-mieux-compris/41920/>
33. Bulletin Officiel n°2003-48 [Internet]. [cité 21 août 2022]. Disponible sur: <https://solidarites-sante.gouv.fr/fichiers/bo/2003/03-48/a0483680.htm>
34. Zawilska JB, Kuczyńska K, Kosmal W, Markiewicz K, Adamowicz P. Carfentanil – from an animal anesthetic to a deadly illicit drug. Forensic Science International. 1 mars 2021;320:110715.
35. Negri A, Townshend H, McSweeney T, Angelopoulou O, Banayoti H, Prilutskaya M,

- et al. Carfentanil on the darknet: Potential scam or alarming public health threat? International Journal of Drug Policy. 1 mai 2021;91:103118.
36. Marx B, Scuvée É, Scuvée-Moreau J, Seutin V, Jouret F. Mécanismes de l'effet diurétique de la caféine. Med Sci (Paris). 1 mai 2016;32(5):485-90.
37. Pharmacie - HUG [Internet]. [cité 13 mai 2025]. Disponible sur: <https://www.hug.ch/pharmacie>
38. Résumé des caractéristiques du produit - CITRATE DE CAFEINE COOPER 25 mg/mL, solution injectable et buvable - Base de données publique des médicaments [Internet]. [cité 13 mai 2025]. Disponible sur: <https://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=65973294&typedoc=R>
39. Josef M. Peters, « Factors Affecting Caffeine Toxicity: A Review of the Literature », The Journal of Clinical Pharmacology and the Journal of New Drugs, vol. 7, no 3, 1967, p. 131–141.
40. ScienceDaily [Internet]. [cité 1 août 2022]. Tobacco and nicotine: They're good -- as a pesticide. Disponible sur: <https://www.sciencedaily.com/releases/2010/10/101027124734.htm>
41. Rogers AJ, Denk LD, Wax PM, « Catastrophic brain injury after nicotine insecticide ingestion », J Emerg Med, vol. 26, no 2, 2004, p. 169-72.
42. Zein MA, McElmurry SP, Kashian DR, Savolainen PT, Pitts DK, « Optical bioassay for measuring sublethal toxicity of insecticides in *Daphnia pulex* », Environ Toxicol Chem, vol. 33, no 1, 2014, p. 144-51.
43. Edward F. Domino, Erich Hornbach et Tsenge Demana, « The Nicotine Content of Common Vegetables », New England Journal of Medicine, vol. 329, 5 août 1993, p. 437–437.
44. ChemIDplus - 54-11-5 - Chemical information with searchable synonyms, structures, and formulas [Internet]. [cité 22 août 2022]. Disponible sur: <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/54-11-5>
45. Résumé des caractéristiques du produit - COLCHIMAX, comprimé pelliculé sécable - Base de données publique des médicaments [Internet]. [cité 13 mai 2025]. Disponible sur: <https://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=61331730&typedoc=R>
46. ThermoFisherScientific FDS Colchicine-Date de révision 15/12/2020 Numéro de révision :7.
47. VIDAL [Internet]. [cité 3 août 2022]. COLCHICINE OPOCALCIUM 1 mg cp séc. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/medicaments/colchicine-opocalcium-1-mg-cp-sec-20909.html>
48. Human & Experimental Toxicology. Vol. 16, Pg. 229, 1997.
49. PUYT J-D. Sémiologie et diagnostic différentiel des intoxications par les convulsivaants chez les carnivores domestiques. Rec Méd Vét. 1995;109-14.
50. Guide to the Chemicals Used in Crop Protection. Vol. 6, Pg. 139, 1973.
51. Notice patient - DIGOXINE NATIVELLE 0,25 mg, comprimé - Base de données publique des médicaments [Internet]. [cité 13 mai 2025]. Disponible sur: <https://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?typedoc=N&specid=67681303>
52. Digitaliques [Internet]. [cité 20 mai 2025]. Disponible sur: <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/digitaliques>
53. Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie. Vol. 153, Pg. 436, 1965.
54. New Zealand Medical Journal. Vol. 84, Pg. 443, 1976.
55. Résumé des caractéristiques du produit - SINTROM 4 mg, comprimé quadrisécable - Base de données publique des médicaments [Internet]. [cité 20 mai 2025]. Disponible sur: <https://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=61510352&typedoc=R>
56. « Handbook of Analytical Toxicology, » Sunshine, I., ed., Cleveland, OH, Chemical Rubber Co., 1969Vol. -, Pg. 3, 1969.
57. National Technical Information Service. Vol. 0TS0518152.,
58. Le-Roy B, Foucher B, Lagarde A, Mounier C, Bévalot F. Dosage plasmatique de quatre

anticoagulants directs par UHPLC/DAD. Toxicologie Analytique et Clinique. 1 déc 2016;28(4):278-85.

59. National Cancer Institute Screening Program Data Summary, Developmental Therapeutics Program. Vol. JAN1986.,

60. Finkelstein Y, Aks SE, Hutson JR, Juurlink DN, Nguyen P, Dubnov-Raz G, et al. Colchicine poisoning: the dark side of an ancient drug. Clin Toxicol (Phila). juin 2010;48(5):407-14.

Université de Lille  
UFR3S-Pharmacie  
**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**  
Année Universitaire 2024/2025

**Nom : MARECAUX**  
**Prénom : Anne Laure**

**Titre de la thèse :**  
**CRIBLAGE ET DOSAGE DE TOXIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE**  
**HAUTE PERFORMANCE APRES EXTRACTION SUR PHASE SOLIDE**

**Mots-clés :** Chromatographie liquide haute performance, détecteur UV, agent toxique, risque chimique, EDCH, contamination, extraction sur phase solide, QuEChERS

---

**Résumé :**

Aujourd’hui la menace d’une contamination involontaire ou volontaire par des substances chimiques est étudiée sous toutes ses formes afin de préserver et garantir la sécurité et la santé de tous. Cette sécurité passe notamment par la surveillance du réseau des eaux destinées à la consommation humaine mais peut être plus largement étendu au risque d’une contamination alimentaire. L’objectif de cette thèse est d’établir un classement de molécules en fonction de leur probabilité d’emploi dans le cas d’une attaque chimique, le 2<sup>nd</sup> objectif et de mettre en place une méthode d’extraction des agents chimiques afin de permettre leur détection et leur dosage par chromatographie liquide haute performance couplée à une détection UV.

Le classement des agents s'est fait selon l'attribution d'un score basé sur plusieurs critères. Puis, une méthode d'extraction QuEChERS et une méthode sur phase solide ont été employées afin d'extraire des toxiques dans des matrices complexes. Les échantillons ont par la suite été analysés par HPLC-UV. La méthode chromatographique a été mise au point pour 8 substances et sa pertinence a été vérifiée avec le dosage de la Colchicine dans un comprimé de Colchimax.

---

**Membres du jury :**

**Président : Monsieur le Professeur Jean-François GOOSSENS,**  
Professeur de chimie analytique – Université de Lille

**Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Guillaume GARCON**  
Professeur en toxicologie – Université de Lille

**Assesseur(s) : Madame Emeline Barbier**  
Docteur en pharmacie - Université de Lille

**Membre(s) extérieur(s) : Monsieur le Pharmacien en Chef Jean-Ulrich MULLOT**  
Pharmacien Chef des services de classe normale  
Professeur Agrégé du Val de Grâce