



ANALYSE DES MARQUEURS ORGANIQUES DU TABAGISME DANS LES MATRICES BIOLOGIQUES URINE ET CHEVEUX

I. E. Hassen^a, M.-M. Flament-Waton^a, O. Paisse^a, M.-F. Grenier Loustalot^a, H. Zarrouk^{b*}

^a Service Central d'Analyse du CNRS - USR 059, Chemin du Canal - Échangeur de Solaize, BP 22, 69390 Vernaison, France

^b Institut National de Recherche et d'Analyse Physico-chimique, Pôle technologique de Sidi Thabet, 2080 Sidi Thabet Tunisie

(Reçu le 17 Décembre 2004, accepté le 20 Mai 2005)

RESUME : La majorité des analyses biologiques s'appuient sur les deux matrices sang et urine. Cette dernière présente un inconvénient majeur au niveau de la fenêtre de détection très courte. Cette limitation a contribué ces dernières années à l'essor d'une matrice alternative : les cheveux, support beaucoup plus stable. L'objectif de ce travail -réalisé au Service Central d'Analyse du CNRS (Vernaison, France)- est de comparer les résultats d'analyse de composés organiques dans l'urine et les cheveux. L'application principale a porté sur l'étude du phénomène du tabagisme, à travers le développement d'un protocole analytique de routine permettant de doser les deux marqueurs organiques (la nicotine et son métabolite principal, la cotinine) dans ces deux matrices. Un suivi d'un programme de sevrage a été effectué par chromatographie en phase gazeuse ou liquide couplée à la spectrométrie de masse. Ce travail nous a permis de mettre en évidence plusieurs aspects importants, tels que l'influence de l'origine de l'échantillonnage et du métabolisme sur la représentativité des échantillons urinaires, ainsi que l'important complément d'information apporté par l'analyse de cheveux.

Mots clés : urine, cheveux, nicotine, cotinine, sevrage tabagique.

ABSTRACT: In the last few years, hair analysis has become an important alternative and complement to blood and urine analysis. The principal advantage of this matrix lies in its stability and the possibility of long-term detection. The purpose of this work was to compare the results of urine and hair analysis in a smoking cessation program study, and to develop a routine analytical procedure for the quantification of the two organic biological markers: nicotine (alkaloid of tobacco) and cotinine (its principal metabolite). The techniques used were gas and liquid chromatography coupled with mass spectrometry detector. The main results were concerning the influence of sampling and nicotine-metabolism on the urine analysis, and also the precious additional information gave by hair analysis.

Keywords: urine, hair, nicotine, cotinine, smoking cessation.

1. INTRODUCTION

L'analyse de la nicotine et de son principal métabolite, la cotinine [1-5], dans les différentes matrices biologiques permet d'examiner le comportement et les habitudes des fumeurs, de suivre les programmes de sevrage tabagique, ainsi que d'évaluer le degré d'exposition passive des personnes vivant à côté de fumeurs. A notre connaissance, il n'existe pas de travaux ayant porté sur le suivi d'un programme de sevrage parallèlement par analyses urinaires et de cheveux.

Notre objectif dans ce travail était de mettre au point une méthode simple et rapide pour doser simultanément la nicotine et la cotinine, et de suivre l'évolution dans le temps de leurs concentrations respectives dans les deux supports urine et cheveux d'un ex-fumeur abstinent. Une attention particulière a été apportée à l'analyse de la cotinine dans les échantillons urinaires. Cette molécule, grâce à sa plus grande stabilité dans le temps constitue en effet une sonde incontestable d'une consommation active de tabac et permet d'atténuer les inconvénients dus à un échantillonnage ponctuel. Par ailleurs, des analyses de nos deux marqueurs ont été effectuées dans les extraits de cheveux, principalement dans le but d'examiner le complément d'information qui pourrait être apporté aux résultats de l'analyse urinaire.

* correspondant



2. PRESENTATION DE LA NICOTINE - PHARMACOCINETIQUE ET METABOLISME

En termes de consommation, la nicotine constitue la principale drogue des temps modernes [6]. L'importante concentration de la nicotine dans le tabac (où elle peut représenter de 0,5 à 8% du poids sec selon les variétés) est sans doute à l'origine de l'intérêt tout particulier dont elle a fait l'objet depuis sa découverte [7-8]. L'analyse des composés organiques volatils présents dans la fumée issue de la combustion du tabac a montré qu'un fumeur absorbe en moyenne 1 mg de nicotine par cigarette, soit environ 10 à 15% de la quantité initialement présente dans le tabac [3, 8, 9]. A l'état pur, la nicotine (CAS #: [54-11-5], de formule brute $C_{10}H_{14}N_2$) se présente sous forme de solution claire qui brunit au contact de l'air. Son nom systématique est la (S)-3-(1-Méthyl-2-pyrrolidiny)pyridine. Cette molécule est caractérisée par une masse molaire $M_m = 162,23 \text{ g.mol}^{-1}$ et deux constantes d'acidité mesurées à 15°C : $pK_1 = 6,16$ et $pK_2 = 10,96$ [10].

La formule semi-développée de la nicotine est présentée sur la figure 1.

De nombreux travaux [2, 3, 5, 11-13] ayant été menés chez l'homme ont permis de montrer que la nicotine était intensivement métabolisée dans le foie. La période de demi-vie est estimée à environ 2 h, avec des variations interindividuelles assez importantes (de 40 min à 4 h selon les individus). La plupart des métabolites sont formés par réactions d'oxydation. La plus caractéristique de ces réactions est l'oxydation du carbone 5' du cycle pyrrolidinique qui conduit à la formation du métabolite principal : la cotinine, dont la formule semi-développée est présentée sur la figure 1.

On estime que pas moins de 70 à 80% de la quantité totale de la nicotine ingérée est métabolisée en cotinine via cette réaction [1-5]. Cet important taux de conversion confère à la cotinine la propriété très intéressante d'être un excellent marqueur biologique pour étudier la biotransformation des produits de tabac chez l'homme.

A l'état pur, cette molécule (CAS #: [486-56-6], de formule brute $C_{10}H_{12}N_2O$) se présente sous forme de solution huileuse. Son nom systématique est la 1-Méthyl-5-(3-pyridinyl)-2-pyrrolidinone. Elle est caractérisée par une masse molaire $M_m = 176,22 \text{ g.mol}^{-1}$. Tout comme la nicotine, la cotinine est à son tour largement métabolisée par réaction simultanée dans le foie. Une des importantes propriétés caractéristiques du métabolisme de la cotinine est sa longue demi-vie, d'environ 20 h, soit 10 fois plus longue que celle de la nicotine [2, 3, 5, 13, 14].

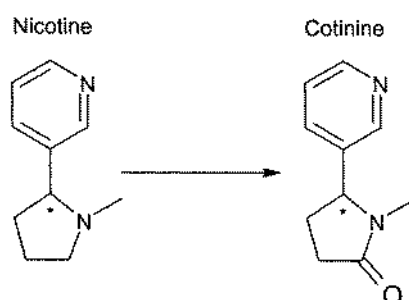


Figure 1 : Formules semi-développées de la nicotine et de la cotinine

3. MISE EN OEUVRE EXPERIMENTALE

3.1 Matériels

Les filtres utilisés (Acrodisc) sont de porosité $0,2 \mu\text{m}$ et $0,45 \mu\text{m}$ et sont en PTFE. L'extracteur automatique est de marque Zymarck RapidTrace SPE Workstation. Les colonnes d'extraction en phase solide (ou SPE pour Solid Phase Extraction) utilisées sont des colonnes greffées C_{18} (Bakerbond) et des colonnes en dioxyde de silicium (Extrelut NT-3 - Merck). Un broyeur de marque RETSH de chez FISHER BIOBLOCK SCIENTIFIC a été utilisé pour broyer les cheveux. Les chaînes analytiques utilisées pour les analyses en Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG-SM) et en Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse en mode Electrospray Positif (CLHP-SM-ES⁺) sont respectivement constituées d'un chromatographe HP 6890 Series GC couplé à un spectromètre de masse HP 5973



MSD et d'un chromatographe HP Series 1100 couplé à un spectromètre de masse HP Series 1100 MSD.

3.2 Réactifs

Nous avons disposé pour ce travail d'une solution de nicotine pure à 99 % achetée chez Sigma Chemical et d'une molécule standard de (-)-Cotinine fournie par Fluka. Tous les solvants et solutions utilisés (éther, méthanol, dichlorométhane, acétonitrile (SDS), diéthylène glycol (Aldrich), isopropanol (Prolabo), acide formique (Riedel de Haen), ammoniac (Labosi)) sont de qualité HPLC ou Pestipur. Les réactifs (hydroxyde de sodium, carbonate de potassium, acide borique et chlorure de potassium (PROLABO)) sont de qualité normapur.

3.3 Préparation des solutions standard

Deux solutions mères de nicotine et de cotinine ont été préparées à une concentration de 1 mg/ml dans le méthanol. A partir de ces solutions, nous avons préparé des mélanges standards présentant la même concentration pour ces deux molécules, soit respectivement : 500 ; 100 ; 10 et 1 µg/ml. Ces mélanges ont servi essentiellement à réaliser les études de linéarité et à calculer les rendements d'extraction.

3.4 Préparation des échantillons d'urine surchargés en nicotine et cotinine

Nous avons disposé d'échantillons fournis par une personne ne fumant pas et ne vivant pas au contact de fumeurs. L'analyse d'extraits en CG-SM a montré que ces échantillons étaient exempts de nicotine et de cotinine. Les concentrations choisies pour 'surcharger' ces urines blanches sont respectivement égales à 0,05 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 et 5 µg/ml. Pour chacun des ces niveaux de concentration, nous avons préparé une solution d'urine de volume total $V = 50$ ml. Pour surcharger tous les échantillons de la même manière, nous avons utilisé à chaque fois le même volume d'urine 'blanche' (soit 49 ml) auquel nous avons ajouté un volume adéquat de mélange standard (nicotine + cotinine) complété à un volume de 1 ml par du méthanol.

3.5 Préparation des échantillons de cheveux surchargés en nicotine et cotinine

Dans les cheveux, les concentrations choisies sont respectivement égales à 0 ; 10 ; 20 ; 50 ; 100 et 200 ng de nicotine et cotinine par mg de cheveux. Des prises d'essai de 50 mg de cheveux prétraités ont été surchargées à chaque fois par addition de quantités adéquates de mélanges standard de nicotine et de cotinine préparés dans le méthanol. Cette opération a été effectuée préalablement à l'étape d'hydrolyse.

3.6 Procédures d'extraction

3.6.1 Extraction liquide-liquide

A 5 ml d'urine à analyser, nous ajoutons 0,5 ml d'hydroxyde de sodium (2M) et 300 mg de carbonate de potassium K_2CO_3 . Une extraction liquide est ensuite effectuée avec 2x5 ml d'éther diéthylique. Après recueil de la phase organique, nous ajoutons 100 µl de diéthylène glycol (DEG), puis nous plaçons le tout sous un courant d'azote à température ambiante pour évaporer l'éther. A la fin de cette étape, aux 100 µl de DEG résiduels, nous additionnons 900 µl de méthanol pour obtenir un volume final d'échantillon = 1 ml. L'analyse se fait en injection directe de l'extrait ainsi obtenu en CG-SM ou en CLHP-SM-ES⁺.

3.6.2 Extraction solide-liquide sur cartouches Extrelut

On prélève 1,5 ml d'urine à analyser qu'on mélange avec 1,4 ml de NaOH (0,5M). Après le dépôt d'échantillon d'urine sur la colonne préalablement conditionnée, l'élution se fait par gravité avec 15 ml de mélange dichlorométhane/isopropanol (9 :1 v/v). Avant évaporation sous courant d'azote à 40°C, nous ajoutons 300 µl d'une solution d'acide chlorhydrique préparée dans le



méthanol ($0,025 \text{ mol.l}^{-1}$) pour prévenir l'évaporation des deux composés d'intérêt que sont la nicotine et la cotinine. Après évaporation à sec, le résidu est repris dans $150 \mu\text{l}$ de méthanol. L'extrait ainsi purifié peut être directement analysé en CG-SM ou CLHP-SM-ES⁺.

3.6.3 Extraction SPE sur cartouches Bakerbond C₁₈

A 2 ml d'urine à analyser, nous ajoutons $200 \mu\text{l}$ de tampon borate à $\text{pH} = 10$. Une centrifugation puis une filtration (porosité $0,2 \mu\text{m}$) sont ensuite effectuées pour débarrasser l'échantillon des particules en suspension. Notre laboratoire étant équipé d'un extracteur SPE automatique, nous avons donc mis au point une procédure d'extraction comme suit : on commence par conditionner la cartouche C₁₈ à 1 ml/min avec successivement $2 \times 1 \text{ ml}$ de méthanol, 1 ml d'eau ultra pure et enfin 1 ml de tampon borate ($\text{pH} = 9$). Après le dépôt des $2,2 \text{ ml}$ d'urine tamponnée à un débit fixé à $0,5 \text{ ml/min}$, on effectue un lavage avec 1 ml d'eau ultra pure à 1 ml/min . Enfin, et après avoir pris soin de sécher la colonne, nous effectuons une élution avec $2 \times 0,35 \text{ ml}$ de méthanol à un débit fixé à $0,5 \text{ ml/min}$. Nous obtenons donc finalement $0,7 \text{ ml}$ d'extrait purifié dissous dans le méthanol.

3.7 Protocoles analytiques

3.7.1 Analyse par CG-SM

L'injection se fait en mode splitless pulsé, et le volume d'injection et la température de l'injecteur sont respectivement fixés à $1 \mu\text{l}$ et 280°C . La colonne utilisée est de type HP5-MS ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$), le gaz vecteur employé est l'hélium avec un débit de 2 ml/min . Le programme de température adopté est le suivant : la température initiale est maintenue à 80°C pendant 1 min , suivie d'une montée à 220°C (20°C/min) puis à 310°C (30°C/min). On maintient le four à cette température finale (310°C) pendant 2 min . Le temps total de l'analyse est de 13 min . La détection peut se faire selon deux modes : le mode SCAN couvrant une gamme des masses allant de $m/z = 50$ à $m/z = 700$, ou le mode SIM en sélectionnant les ions 84 , 133 et 162 pour la nicotine et 98 , 119 et 176 pour la cotinine.

3.7.2 Analyse par CLHP-SM-ES⁺

L'injection se fait en mode automatique avec un volume fixé à $2 \mu\text{l}$. La colonne (dont la température a été maintenue à 50°C) est de type Waters Xterra RP18 $3,5 \mu\text{m}$ ($150 \times 2,1$) mm . Le débit est fixé à $0,3 \text{ ml.min}^{-1}$. Le gradient utilisé est résumé dans le tableau I.

Temps (min)	% (A)	% (B)	% (C)
0	80	0	20
8	16	0	84
8.01	0	0	100
8.5	0	50	50
14.99	0	50	50

Tableau I : Gradient utilisé pour l'analyse en CLHP-SM-ES⁺

La notation (A) désigne une solution aqueuse de formiate d'ammonium $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ dont le pH a été ajusté à 10 avec de l'ammoniaque NH_4OH . Les notations (B) et (C) désignent respectivement les deux solvants organiques acétonitrile (CH_3CN) et méthanol (CH_3OH). Les temps de rétention de la cotinine et la nicotine très répétables et sont respectivement égaux à $2,6$ et $6,9 \text{ min}$ à $\pm 0,1 \text{ min}$. La tension du fragmenteur a été optimisée à 100 V pour les deux molécules. Pour favoriser l'ionisation en mode électrospray positif, nous mélangeons en post-colonne l'éluat avec une solution d'acide formique à $0,01\%$ (v/v) préparée dans le méthanol et débitée à $0,2 \text{ ml/min}$. La détection peut se faire selon deux modes : le mode SCAN couvrant la gamme des masses allant de $m/z = 100$ à $m/z = 220$, ou le mode SIM avec les ions $m/z = 163,2$ (ion $(\text{M}+\text{H})^+$) pour la nicotine, et $m/z = 177,2$ (ion $(\text{M}+\text{H})^+$) pour la cotinine.

4. RESULTATS

4.1 Rendement

Pour calculer le rendement d'extraction, nous utilisons ces mêmes extraits d'urines blanches. Pour chaque niveau de concentration, nous réalisons deux extractions en parallèle : la première extraction est effectuée sur un échantillon d'urine préalablement surchargée, alors que la deuxième est effectuée sur une urine blanche. Pour ce dernier extrait, et juste avant l'analyse, nous effectuons une surcharge à la même concentration. Le rendement est obtenu en faisant le rapport des réponses fournies par ces deux échantillons en tenant compte du facteur de concentration.

$$R = \frac{\text{Concentration calculée dans l'extrait d'urine surchargée}}{\text{Concentration calculée dans l'extrait blanc surchargé après extraction}} \cdot 100$$

Les résultats pour les trois techniques d'extraction sont présentés dans le tableau II.

	CG-SM		CLHP-SM-ES ⁺	
	Nicotine	Colinine	Nicotine	Colinine
Extraction liquide-liquide	74,7	8,7	67,6	3,3
Extraction sur cartouches C ₁₈	3,6	76,3	3,6	78,4
Extraction sur colonnes Extrelut	46,5	45,1	62,4	45,0

Tableau II : Rendements des extractions liquide-liquide, C₁₈ et Extrelut

4.2 Comparaison des différents protocoles analytiques

4.2.1 Extraction liquide-liquide

Selon les résultats présentés dans le tableau II, et malgré les valeurs correctes de rendement d'extraction et de répétabilité pour la nicotine, notre protocole d'extraction liquide-liquide n'est pas adapté à l'analyse de la cotinine. Par ailleurs, ce type d'extraction présente l'inconvénient d'une mise en œuvre lourde et contraignante, difficilement compatible avec un protocole de routine, notamment au niveau du temps de préparation d'échantillons. Elle ne sera donc pas retenue dans la suite du travail.

4.2.2 Extraction Extrelut

Ce type d'extraction est intéressant à plusieurs niveaux. Elle offre en effet l'avantage d'une manipulation assez aisée comparée à l'extraction liquide-liquide, avec notamment un temps de préparation d'échantillons beaucoup plus réduit. Les rendements d'extraction sont corrects pour les deux composés, avec des valeurs situées autour de 50% environ. Les coefficients de variation étudiés en CLHP-SM-ES⁺ sont également très satisfaisants. Malheureusement, l'extraction solide-liquide présente un inconvénient majeur qui consiste dans le prix élevé des colonnes utilisées, ce qui limite beaucoup une utilisation éventuelle en analyses de routine.

4.2.3 Extraction SPE sur cartouches C₁₈

L'extraction de la nicotine en phase solide (SPE) sur des cartouches C₁₈ donne des rendements d'extractions très faibles. A l'inverse, et concernant la cotinine, les rendements d'extraction sont très corrects, autour de 80 %. Les coefficients de variation obtenus avec cette dernière technique ne dépassent pas les 1%, ce qui dénote d'une très bonne répétabilité de l'analyse.

L'extraction SPE présente un énorme avantage qu'on ne retrouve pas dans les autres techniques et qui consiste dans l'automatisation de toute la procédure. On retrouve notamment les effets positifs de cette automatisation dans les valeurs des coefficients de variation très faibles, mais également dans le gain de temps appréciable lors de notre analyse. C'est cette technique qui a été retenue pour la suite du travail.

4.3 Linéarité

La qualité de la courbe d'étalonnage sera estimée avec le coefficient de régression linéaire calculé avec la méthode des moindres carrés, qui doit être le plus proche de 1 pour témoigner d'une



bonne linéarité. Une extraction SPE sur cartouches C_{18} suivie d'une analyse par CLHP-SM-ES⁺ a permis de tracer la courbe représentée sur la figure 2. Toutes les mesures réalisées dans le cadre de cette étude montrent de très bons coefficients de régression linéaire, synonymes d'une bonne linéarité dans la gamme de concentration choisie.

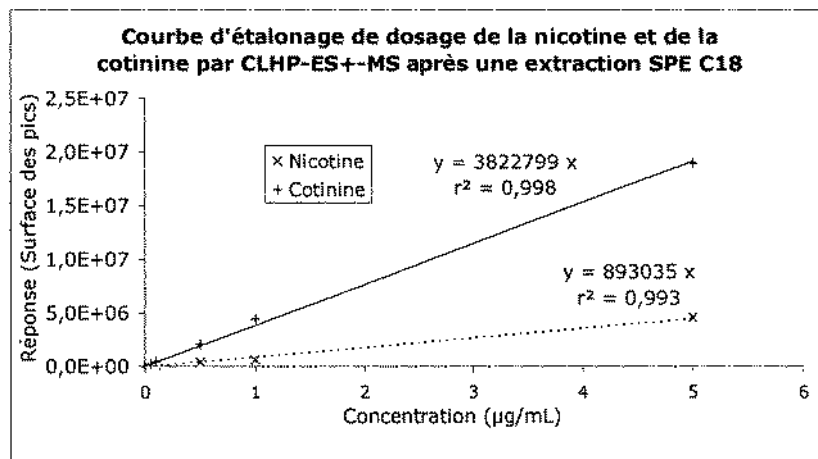


Figure 2 : Courbe d'étalonnage du dosage de la nicotine et de la cotinine. Extraction SPE, analyse par CLHP-SM.

4.4 Répétabilité

Ce paramètre a été estimé en comparant les résultats obtenus avec des extraits préparés dans les mêmes conditions. Le coefficient de variation (C.V.) d'une série de mesure se calcule à l'aide de l'écart-type (E.T.) et de la moyenne (Moy) de cette même série selon la formule : $C.V. = \frac{E.T.}{Moy} \times 100$.

Ce coefficient doit être le plus faible possible pour attester d'une bonne répétabilité des mesures. Pour ceci, tous les échantillons ont été préparés et analysés par CLHP-SM-ES⁺ trois fois. Les résultats sont présentés dans le tableau III.

Concentrations (µg/ml)	Nicotine			Cotinine		
	Moyenne	E. T.	C. V.	Moyenne	E. T.	C. V.
0,05	1,76E+04	1,94E+03	11,0	3,82E+04	1,24E+03	3,2
0,1	3,19E+04	1,24E+03	3,9	6,89E+04	2,44E+03	3,5
0,5	1,75E+05	1,33E+03	0,8	3,62E+05	2,26E+03	0,6
1	3,84E+05	9,17E+03	2,4	7,21E+05	4,78E+03	0,7
5	2,27E+06	3,97E+04	1,8	4,04E+06	1,74E+04	0,4

Tableau III : Etude de la répétabilité du dosage de la nicotine et de la cotinine. Extraction SPE et analyse par CLHP-SM-ES⁺

4.5 Limites de détection

Les limites de détection exprimées en µg/ml ont été obtenues par méthode graphique, en diluant progressivement les concentrations de nos deux composés dans les échantillons d'urines surchargées jusqu'à obtenir une hauteur de pic égale à trois fois au minimum l'amplitude du bruit de fond. Les valeurs obtenues avec les protocoles analytiques que nous avons adoptés sont résumées dans le tableau IV.

	CG-SM		CLHP-SM-ES ⁺	
	Nicotine	Cotinine	Nicotine	Cotinine
Extraction liquide-liquide	0.01	0.05	0.02	0.3
Extraction C_{18}	0.05	0.02	0.2	0.03
Extraction Extrelut	0.02	0.01	0.01	0.005

Tableau IV : Limites de détection en µg/ml déterminées avec les six protocoles d'extraction développés

Le tableau IV montre que la chromatographie en phase gazeuse présente des limites de détection plus basses que la CLHP-SM-ES⁺ pour les deux extractions liquide-liquide et C₁₈. Pour l'extraction Extrelut, les valeurs pour ces deux techniques d'analyse sont comparables. Notons toutefois que nous avons travaillé avec le même ordre de grandeur au niveau du volume injecté (1 µl pour la CG-SM et 2 µl pour la CLHP-SM). L'utilisation d'un volume d'injection plus grand (pouvant aller jusqu'à 50 µl), théoriquement permis en chromatographie liquide était limité par l'emploi du méthanol comme solvant des extraits recueillis. En effet, des tests réalisés avec différents volumes d'injection (3, 5 et 10 µl) ont montré une détérioration de l'allure des pics chromatographiques relatifs à nos deux composés (traînée très importante) pour des volumes injectés supérieurs à 2 µl.

5. SUIVI CINÉTIQUE D'UN PROGRAMME DE SEVRAGE TABAGIQUE

Le programme de sevrage tabagique que nous avons examiné lors de ce travail concernait un homme adulte, fumeur régulier depuis une longue période (sujet 1). L'arrêt de consommation de cigarettes s'est fait d'une manière progressive, en substituant la source d'apport de nicotine par des patchs de dose connue changés régulièrement.

5.1 Echantillons étudiés

Les échantillons d'urine analysés sont au nombre de 30 et couvrent une période d'environ 5 mois. Il s'agit de prélèvements ponctuels réalisés généralement le matin. Concernant les échantillons de cheveux, nous avons disposé de 3 échantillons prélevés respectivement au premier jour, 1 mois et 5 mois après le début du sevrage.

5.2 Analyse d'échantillons urinaires. Suivi cinétique

Dès leur réception, les urines sont placées immédiatement dans un congélateur dont la température est fixée à -18°C. Après décongélation, les extractions en phase solide sur cartouche C₁₈ et l'analyse chromatographique par CLHP-SM-ES⁺ ont été effectuées sur une période de deux jours, et les échantillons ont été conservés entre temps dans le réfrigérateur à 4°C. La courbe d'étalonnage a été tracée le jour même (préparations des solutions standards et analyse).

Nous avons représenté sur la figure 3 les courbes traçant l'évolution des concentrations de la nicotine et de la cotinine en fonction de la date de prélèvement.

5.2.1 Discussion

Nous pouvons faire plusieurs commentaires concernant l'allure de la courbe du suivi cinétique de la nicotine dans les urines (Figure 3).

Nous savons grâce aux précisions qui nous ont été fournies par notre sujet, que ce dernier continuait à fumer quelques cigarettes pendant les deux premières semaines tout en utilisant des patchs dosés qui délivrent théoriquement 21 mg de nicotine dans le sang sur une période de 24h (le premier patch a été posé deux jours après le début du sevrage). Cette accumulation de sources de nicotine entre patchs et cigarettes peut expliquer les pics observés dans les urines pour les premiers prélèvements.

Après cette phase initiale, notre sujet déclare avoir arrêté progressivement sa consommation de cigarettes, parallèlement à une diminution graduelle du dosage des patchs qui sont passés de 21 à 19, puis enfin à 14 mg/24h. Etant donné le métabolisme assez rapide de la nicotine et la ponctualité des prélèvements réalisés (donc ne traduisant pas fidèlement la variabilité de la matrice urinaire, très dépendante de paramètres physiologiques tels que le régime alimentaire ou l'hydratation...), la courbe de suivi cinétique a montré comme prévu des variations importantes de la concentration de la nicotine. Notons toutefois que cette courbe montre globalement une diminution progressive du taux de la nicotine dans les urines, jusqu'à sa disparition totale deux mois environ après le début du sevrage.

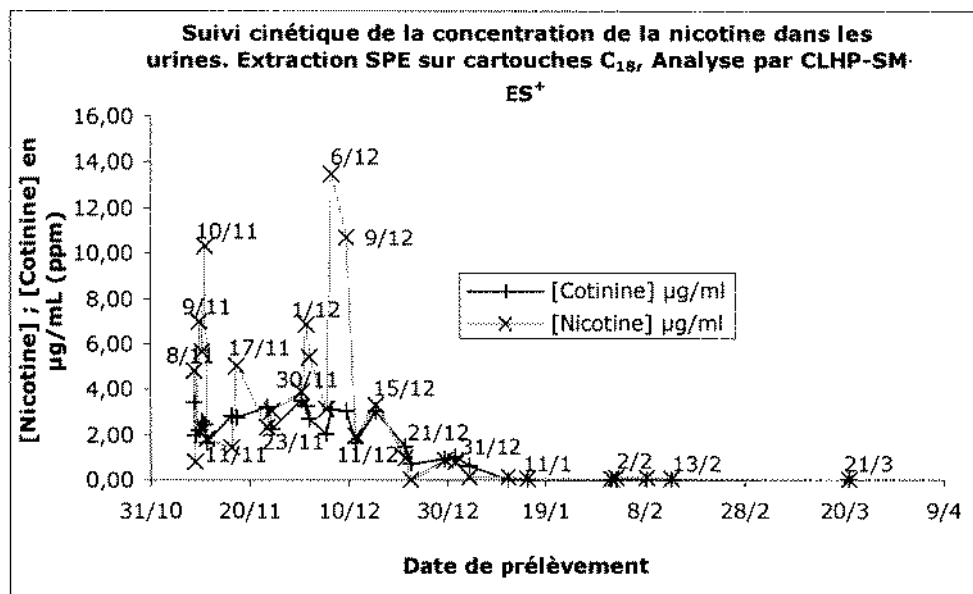


Figure 3 : Variation de la concentration de la nicotine et de la cotinine dans les urines (sujet 1) en fonction de la date de prélèvement. Echantillons ponctuels, extraction SPE et analyse par CLHP-SM-ES⁺

En examinant la courbe de suivi cinétique relative au dosage de la cotinine dans ces mêmes échantillons (figure 3), nous relevons qu'elle présente une allure moins dispersée que celle relative au dosage de la nicotine, particulièrement pour le premier mois après l'arrêt de consommation de cigarettes. Cette courbe illustre d'une manière plus claire la diminution continue et progressive dans le temps des traces de tabagisme dans les extraits urinaires. L'explication principale est liée à la période de demi-vie relativement importante de la cotinine (20 h), qui contribue à réduire d'une manière significative la dépendance de la concentration de cette molécule vis-à-vis de l'échantillon prélevé.

5.2.2 Importance de l'échantillonnage

L'analyse de substances organiques dans les urines soulève un certain nombre de problèmes à plusieurs niveaux. Le premier que nous nous sommes proposés d'examiner est celui de l'échantillonnage. Cette étape est très déterminante, dans le sens où l'urine demeure un extrait biologique très dépendant du moment du prélèvement [15]. En effet, le régime alimentaire du sujet et surtout de la quantité d'eau ingurgitée entre les différents prélèvements dans une seule et même journée engendrent des fluctuations dans l'aspect général de l'urine (couleur, densité...), ce qui se traduit automatiquement par une fluctuation dans la concentration de toutes les substances qui y sont contenues [2, 3].

Pour examiner l'influence de l'échantillonnage sur l'allure de la courbe de suivi cinétique, nous avons analysé en premier lieu cinq extraits d'urine collectés dans la même journée chez une personne fumant en moyenne 20 cigarettes par jour. Le premier prélèvement a été effectué au réveil le matin, et les quatre autres sont espacés d'un intervalle de 3 h environ jusqu'au dernier prélèvement réalisé le soir.

Les extraits obtenus après une purification sur cartouches C₁₈ et analyse par CLHP-SM-ES⁺ ont révélé une variation importante des concentrations de la nicotine et de la cotinine en fonction de l'heure de prélèvement. Afin d'obtenir une sorte d'échantillon moyen plus représentatif, nous avons alors pensé à recueillir toute l'urine excrétée sur une période de 24 heures. Une partie de ce recueil pourra être prélevée et analysée.

Pour examiner la validité de cette approche il nous fallait trouver un sujet fumeur qui s'engagerait à s'arrêter de fumer pendant une période de deux semaines minimum. Le but est de

voir si cette procédure d'échantillonnage permettrait d'obtenir une éventuelle amélioration de l'allure de la décroissance de la courbe de suivi cinétique de nicotine et de cotinine dans les urines. Deux personnes travaillant dans notre laboratoire se sont portées volontaires. Le sujet 2 (femme de 25 ans, fumant 10 cigarettes/jour en moyenne) a arrêté de fumer pendant 15 jours. Le sujet 3 (homme de 25 ans, 5 à 7 cigarettes/jour) a arrêté de fumer pendant un mois. Nos deux volontaires nous ont fournis tous les deux à trois jours un recueil de 24 h d'urine.

L'extraction a été effectuée sur cartouches C_{18} selon le protocole décrit précédemment, et l'analyse a été réalisée par CLHP-SM-ES⁺ et CG-SM. Les résultats obtenus sont très comparables pour les deux sujets. La figure 4 représente les résultats obtenus à partir des échantillons fournis par le sujet 2.

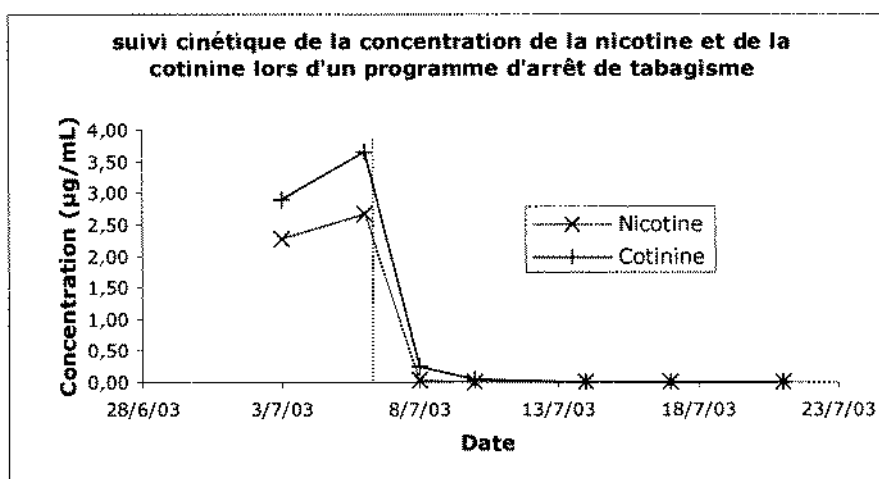


Figure 4 : Variation de la concentration de la nicotine et de la cotinine dans les urines (sujet 2) en fonction de la date de prélèvement. Echantillons moyens (24 heures), extraction SPE et analyse par CLHP-SM-ES⁺

L'examen des courbes (figure 4) montre bien une décroissance régulière du taux de nicotine et de cotinine dans les urines immédiatement après l'arrêt de consommation de cigarettes (représenté par un trait vertical). Cette décroissance est d'autant plus rapide que nos deux sujets n'ont pas eu recours à l'utilisation de patches de substitution. Notons que suite à une dizaine de jours de sevrage, il n'y avait quasiment plus aucune trace des deux molécules dans les échantillons urinaires moyens.

En tenant compte de tous ces résultats, nous avons clairement mis en évidence l'importance de l'échantillonnage pour ce suivi cinétique. Le prélèvement sur 24 h permet de nous affranchir de fluctuations dues à la dépendance de l'urine vis-à-vis du régime alimentaire et surtout du taux d'hydratation de la personne. Ce genre de prélèvement est certainement plus contraignant pour les sujets qui se soumettent à une telle étude, mais les résultats sont plus précis et représentatifs.

5.3 Analyse d'extraits de cheveux. Suivi cinétique

5.3.1 Introduction

Ces dernières années, l'utilisation des cheveux dans les laboratoires de toxicologie a connu un intérêt certain et croissant, grâce notamment aux nombreux avantages qu'ils offrent par rapport aux autres supports biologiques classiques tels que l'urine ou le sérum [16, 17]. Outre sa grande stabilité et sa conservation facile à température ambiante, ce support présente l'avantage d'offrir à l'analyste une grande fenêtre chronologique sur laquelle on peut étudier les phénomènes de soumission chimique ou d'expositions aux xénobiotiques. D'un autre côté, il existe malheureusement aussi quelques inconvénients qui limitent encore son utilisation. Le premier consiste en la complexité du support qui impose des étapes d'extraction plus ou moins fastidieuses et généralement peu reproductibles, ainsi que l'absence d'échantillons de référence [18, 19].



Dans un souci d'avoir la même approche analytique pour les deux matrices urine et cheveux, nous avons essayé lors de cette étude d'adapter le protocole détaillé précédemment d'analyse d'échantillons urinaires à l'analyse d'extraits de cheveux. Pour cela, il fallait réaliser plusieurs opérations de prétraitement, incluant une étape essentielle d'hydrolyse. L'objectif étant d'obtenir des échantillons liquides, qui peuvent alors subir les mêmes traitements que les échantillons urinaires. Ainsi, les différentes procédures d'extraction se retrouveraient grandement simplifiées et la comparaison entre les différentes matrices beaucoup plus aisée.

5.3.2 Prétraitement de l'échantillon

Après découpage des cheveux en fines portions, deux lavages successifs avec le dichlorométhane sont effectués, accompagnés à chaque fois d'une agitation au Vortex pendant 5 min. Cette opération a pour but de débarrasser les cheveux d'éventuelles pollutions extérieures. Après séchage à l'étuve, et afin d'assurer une parfaite homogénéisation de l'échantillon, il est nécessaire de broyer finement les cheveux de manière à obtenir un échantillon moyen sous forme de poudre. Cette opération est effectuée à l'aide d'un broyeur à billes.

5.3.3 Extraction

La première étape dans notre protocole d'extraction des deux composés à partir des cheveux consiste en une destruction de la matrice pilaire par hydrolyse basique. Pour cela, nous plaçons dans un tube 50 mg de cheveux broyés et 1 ml d'hydroxyde de sodium de concentration 2 mol.l^{-1} . Le chauffage à 85°C de ce mélange pendant 45 min assure la destruction totale de la matrice. Après refroidissement, 1 ml d'acide chlorhydrique (2 mol.l^{-1}) puis 2 ml de tampon phosphate (0.02 mol.l^{-1} , $\text{pH} = 7$) sont ajoutés dans le but de neutraliser et tamponner le pH de l'échantillon. Après une filtration à l'aide de seringues équipées de filtres en PTFE de porosité $0,45 \mu\text{m}$ puis $0,2 \mu\text{m}$, on obtient une solution limpide, qui sera déposée sur des cartouches C_{18} . Le protocole d'extraction adopté est exactement le même que celui décrit pour les échantillons urinaires. La seule différence réside dans le volume de l'échantillon déposé sur la cartouche SPE (4 ml au lieu de 2,2 ml).

5.3.4 Résultats

L'analyse des extraits de cheveux dopés montre que les courbes d'étalonnage relatives au dosage de la nicotine et de la cotinine sont bien linéaires avec des coefficients de régression respectivement égaux à 0,978 et 0,998.

Les résultats du suivi cinétique du sevrage ont été résumés sur la figure 5.

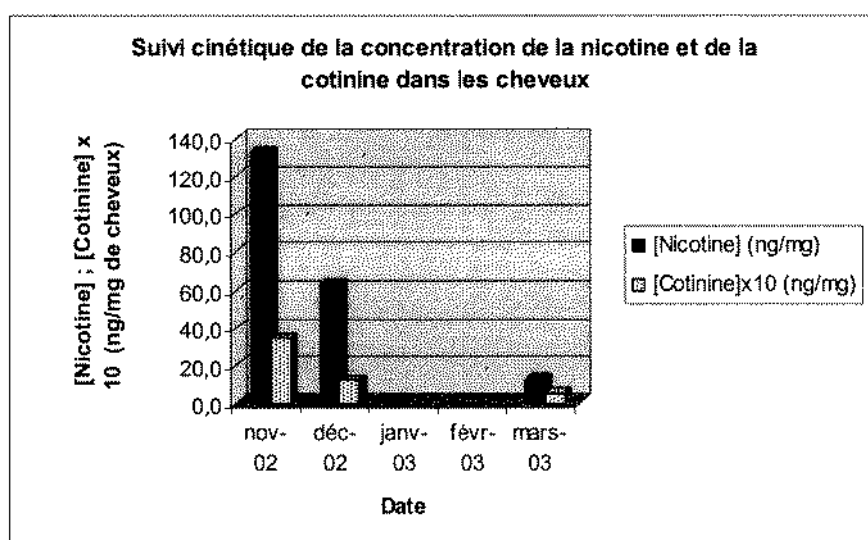


Figure 5 : Variation de la concentration de la nicotine et de la cotinine dans les cheveux (sujet 1) en fonction de la date de prélèvement. Extraction SPE et analyse par CLHP-SM-ES⁺

Cette dernière affiche une baisse continue dans le temps de la concentration des composés étudiés, ce qui est conforme aux prévisions. Comme deuxième résultat principal de cette analyse, nous pouvons noter que la détection des deux composés est encore possible jusqu'à cinq mois après le début du sevrage. Ceci est dû principalement à la grande stabilité de la matrice cheveux. Ainsi, la fenêtre de détection des deux molécules d'intérêt en particulier, et de tous les composés organiques en général, est beaucoup plus importante que dans les urines. C'est dans cette approche que l'analyse de cheveux trouve tout son intérêt.

D'une manière globale, les résultats ont été concordants et superposables pour les deux supports urine et cheveux. Ceci confirme des perspectives très intéressantes dans ce domaine, et ce même genre d'étude peut être appliqué à d'autres types de molécules.

6. CONCLUSION

Nous avons comparé dans cette étude six protocoles analytiques différents pour l'analyse de la nicotine et de la cotinine dans les échantillons urinaires et de cheveux. Après un examen attentif des résultats obtenus et le calcul des paramètres de linéarité, limite de détection, répétabilité et de rendement d'extraction, nous pouvons mettre en relief plusieurs conclusions. La première, portant sur l'aspect analytique, montre que les deux techniques CG-SM et CLHP-SM-ES⁺ donnent des résultats assez comparables avec nos différents échantillons, tant pour les calculs de rendement que pour les répétabilités des mesures. En terme de sensibilité, la CG-SM paraît être d'une manière générale une technique légèrement plus puissante pour l'analyse des deux composés. Ceci étant dit, la chromatographie liquide présente de son côté plusieurs avantages comme la possibilité d'injecter des volumes beaucoup plus importants qu'en CG-SM (possibilité d'amélioration des limites de détection). Par ailleurs, la robustesse de cette dernière n'est plus à démontrer, ce qui représente un avantage très important étant donné la complexité des matrices biologiques que nous étudions.

Tenant compte de tous les résultats présentés dans cette étude, le protocole analytique que nous pouvons retenir est basé sur une extraction SPE sur cartouche C₁₈, suivie d'une analyse en CLHP-SM-ES⁺.

Ce protocole offre des rendements d'extractions allant jusqu'à environ 80% pour la cotinine. La préparation d'échantillon, contrairement à l'extraction liquide-liquide est relativement aisée, et grâce à l'automatisation de toute l'étape d'extraction sur colonnes C₁₈, nous pouvons garantir une très bonne répétabilité de nos mesures.

L'examen des courbes de suivi cinétique relatives au dosage des deux molécules dans les échantillons urinaires nous a permis de formuler deux conclusions importantes : premièrement, et concernant les prélèvements ponctuels, nous avons vu que l'analyse du métabolite cotinine, plutôt que la molécule principale -la nicotine- fournit des résultats plus cohérents et représentatifs dans le temps.

Ensuite, nous avons mis en œuvre une autre approche basée sur des prélèvements sur une période de 24 h, une sorte d'échantillon moyen qui nous a permis d'illustrer une décroissance rapide (10 jours) de la concentration de nicotine et de cotinine dans les urines.

L'analyse d'extraits de cheveux a constitué un complément très utile dans notre suivi de sevrage. Nous avons mis en évidence le caractère très stable de ce support, et l'énorme avantage qu'il offre en permettant la détection de xénobiotiques après une longue période.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient tous les membres de l'équipe biochimie du Service Central d'Analyse du CNRS pour leur aide précieuse.

REFERENCES

- [1] E. E. K. Baidoo, M. R. Clench, R. F. Smith, L. W. Tetler, *J. Chromatogr. B*, 2003, 796, 303.



- [2] I. N. Papadoyannis, V. F. Samanidou, P. G. Stefanidou, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2002**, 25, 2315.
- [3] T. P. Moyer, J. R. Charlson, R. J. Enger, L. C. Dale, J. O. Ebbert, D. R. Schroeder, R. D. Hurt, *Clin. Chem.*, **2002**, 48, 1460.
- [4] N. L. Benowitz, P. Jacob, III., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **2001**, 51, 53.
- [5] S. Zevin, S. G. Gourlay, N. L. Benowitz, *Clin. Dermatol.*, **1998**, 16, 557.
- [6] F. W. Lavoie, T. M. Harris, *J. Emerg. Med.*, **1991**, 9, 133.
- [7] R. C. Baselt, R. H. Cravey, *Nicotine*, pp 591-595, in *Disposition of toxic drugs and chemicals in man (Third Edition)*, Year Book Medical Publishers, **1989**.
- [8] P. Kintz, *J. Chromatogr.*, **1992**, 580, 347.
- [9] N. Abrous, H. J. Aubin, I. Berlin, C. Junien, M. Kaminski, B. Le Foll, J. Le Houezec, N. Le Novere, P. Lefevre, L. Stinus, J.-P. Tassin, *Tabac : comprendre la dépendance pour agir*, pp 488, Editions Inserm, **2004**.
- [10] S. Budavari, M. J. O'neil, A. Smith, P. E. Heckelman, *The Merck Index*, Merck and Co, **1989**.
- [11] J.-G. Kim, U.-S. Shin, H.-S. Shin, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2002**, 23, 1496.
- [12] N. L. Benowitz, *Importance of nicotine metabolism in understanding the human biology of nicotine*, pp 19-24, in *Effects of Nicotine on Biological Systems. Advances in Pharmacological Sciences*, Franz Adlkofer, Klaus Thurau, Birkhäuser Verlag, **1991**.
- [13] T. Tuomi, T. Johnsson, K. Reijula, *Clin. Chem.*, **1999**, 45, 12.
- [14] S. Zevin, P. Jacob, III., P. Geppetti, N. L. Benowitz, *Drug Alcohol Depend.*, **2000**, 60, 13.
- [15] C. Oddoze, A. M. Pauli, J. Pastor, *J. Chromatogr. B*, **1998**, 708, 95.
- [16] M. Deveaux, P. Kintz, J.-P. Gouille, J. Bessard, G. Pepin, D. Gosset, *Forensic Sci. Int.*, **2000**, 107, 389.
- [17] Y. Nakahara, *J. Chromatogr. B*, **1999**, 733, 161.
- [18] L. Rivier, *Forensic Sci. Int.*, **2000**, 107, 309.
- [19] R. C. Kelly, T. Mieczkowski, S. A. Sweeney, J. A. Bourland, *Forensic Sci. Int.*, **2000**, 107, 63.